

Aus dem Institut für Tropenmedizin Tübingen

Direktor: Professor Dr. J. Knobloch

**Nachweis von *Histoplasma capsulatum*-DNA in Blutproben
von Mäusen und humanen Gewebeproben
mittels PCR-Verfahren**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

ANTJE FEUCHT

aus Stuttgart

2004

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Professor Dr. J. Knobloch

2. Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. U. Schumacher

DAS LEBEN IST ZUM VERRÜCKTWERDEN SCHÖN !

NICHT DASS ES SO WÄRE, ABER ICH SEHE ES SO.

BOHUMIL HRABAL

Meinen Eltern

1 Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Epidemiologie der Histoplasmose	3
1.2	Biologie und Lebensweise von <i>Histoplasma capsulatum</i>	3
1.3	Klinik und Therapie der Histoplasmose	5
1.4	Diagnostik einer <i>Histoplasma</i> -Infektion	6
1.5	Zielsetzung	8
2	Material und Methoden	
2.1	Geräte	9
2.2	Chemikalien	9
2.3	Puffer und Lösungen	10
2.4	Medien	10
2.5	Enzyme	10
2.6	Nukleotide	10
2.7	Kits	10
2.8	Oligonukleotide	10
2.9	Bakterienstamm und Vektor	12
2.10	Untersuchungsmaterialien	12
2.11	Infektion der Mäuse mit <i>Histoplasma capsulatum</i>	12
2.12	DNA-Extraktion	14
2.13	Nested-PCR zum Nachweis von <i>Histoplasma capsulatum</i> -spezifischer 18 S ribosomaler-DNA	15
2.14	Nested-PCR mit Zielsequenz in einem Gen, das für ein <i>H. capsulatum</i> - spezifisches Protein kodiert	17
2.15	Sensitivitätsbestimmung der neuen 100 kDa-PCR	18
2.16	Untersuchungen der Maus-Proben mittels Aktin-PCR	18
2.17	Untersuchungen der Humanproben mittels nested GAPDH-PCR	19
2.18	Kontrollen	20
2.19	Vorsichtsmaßnahmen bei PCR-Arbeiten	22
2.20	Agarose Gelelektrophorese	22
2.21	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	23

2.22	Konzentrationsbestimmung der DNA	23
2.23	Klonierung der 100 kDa-Zielsequenz	24
2.24	Sequenzierung der PCR-Amplifikate	26
3	Ergebnisse	
3.1	Ergebnisse der Blutkulturen bei den unbehandelten Mäusen	28
3.2	Ergebnisse der Blutkulturen bei den behandelten Mäusen	29
3.3	Nachweis von <i>Histoplasma capsulatum</i> -DNA mittels 18 S rDNA-PCR	31
3.4	Aufbau und Sensitivität einer nested-PCR zum Nachweis von <i>Histoplasma capsulatum</i> -spezifischer DNA außerhalb der ribosomalen DNA	34
3.5	PCR-Ergebnisse der Paraffin-eingebetteten humanen Gewebeproben	35
4	Diskussion	
4.1	Nachweis von <i>Histoplasma capsulatum</i> -spezifischer DNA im Blut experimentell infizierter Mäuse	39
4.2	Evaluation der 18 S rDNA- und 100 kDa-PCR zum Nachweis von <i>Histoplasma capsulatum</i> in humanen Gewebeproben	41
5	Zusammenfassung und Veröffentlichungen	45
6	Anhang	
6.1	Abkürzungen	47
6.2	Tabellen	48
7	Literatur	50
	Danksagung	53
	Lebenslauf	55

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Histoplasmose

Die Amerikanische Histoplasmose ist die häufigste systemische Mykose in den USA mit Schwerpunkt in den Staaten des Mittleren Westens und Südwestens. Es wird angenommen, dass in Endemiegebieten über 90 % der Bevölkerung eine Infektion mit *Histoplasma capsulatum* erwerben (Bradsher 1996). Die Inhalation von Mikrokonidien stellt den häufigsten Infektionsweg dar. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch findet nicht statt (Deepe 1998). Der überwiegende Teil der jährlichen 250.000-500.000 Neuinfektionen verläuft weitgehend asymptomatisch (Bodey und Rolston 1999). Die Erkrankung ist weltweit verbreitet, auch Teile Mittelamerikas (Mexico, Guatemala, Belize) und Südamerikas (Venezuela, Argentinien, Nordbrasilien) sind als Endemiegebiete beschrieben. Genaue epidemiologische Daten zur Verbreitung auf dem afrikanischen Kontinent fehlen. Die in Zentral- und Westafrika auftretende Afrikanische Histoplasmose wird durch *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* verursacht (Williams et al. 1971). Histoplasmosen in Mitteleuropa sind selten und setzen in der Regel einen Aufenthalt in einem Endemiegebiet voraus. Auch Haus- und Nutztiere sowie verschiedene Wildtiere können an Histoplasmose erkranken (Bradsher 1996).

1.2 Biologie und Lebensweise von *Histoplasma capsulatum*

Bei *H. capsulatum* handelt es sich um einen dimorph wachsenden Askomyzeten aus der Familie der Onygenaceae (Minamoto und Rosenberg 1997). Bei Körpertemperatur wandelt sich der Pilz von der saprophytären Myzelform in eine parasitäre Hefeform um (Abb. 1.1). Als natürliches Reservoir gelten nitratreiche Böden, die mit Guano von Vögeln oder Fledermäusen angereichert sind (Gugnani et al. 1994). Dort wächst der Pilz in der Myzelform, die die Makrokonidien und die kleineren, infektiösen Mikrokonidien bildet. Die Hefeform findet sich meist innerhalb der Zellen des Monozyten-Makrophagen Systems. Die einzelnen ovalären Zellen bei der amerikanischen Form (*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*) sind relativ klein mit einem Durchmesser von nur 2-3 μm (Deepe 1998). Die Hefeform der Afrikanischen Histoplasmose ist mit 7-15 μm deutlich grösser. Bei der Giemsa- und Gramfärbung bleibt die Zellwand ungefärbt. Samuel Darling, der *Histoplasma capsulatum* nach der Autopsie eines jungen

Mannes 1906 in Panama erstmals beschrieb, interpretierte die ungefärbte Zellwand fälschlicherweise als Kapsel (Darling 1906; Darling 1908). Aufgrund des vorwiegend intrazellulären Vorkommens und der scheinbar vorhandenen Kapsel, nannte er den bis dahin unbekanntem Erreger *Histoplasma capsulatum*. Die morphologischen und pathologischen Ähnlichkeiten zu Leishmanien veranlaßten Darling zu der Annahme, dass es sich bei diesem Erreger um einen Protozoen handelt. Erst der am Bernhard-Nocht-Institut in Hamburg tätige brasilianische Wissenschaftler da Rocha-Lima vermutete seine richtige Zugehörigkeit zu den Pilzen (da Rocha-Lima 1912; da Rocha-Lima 1912-13).

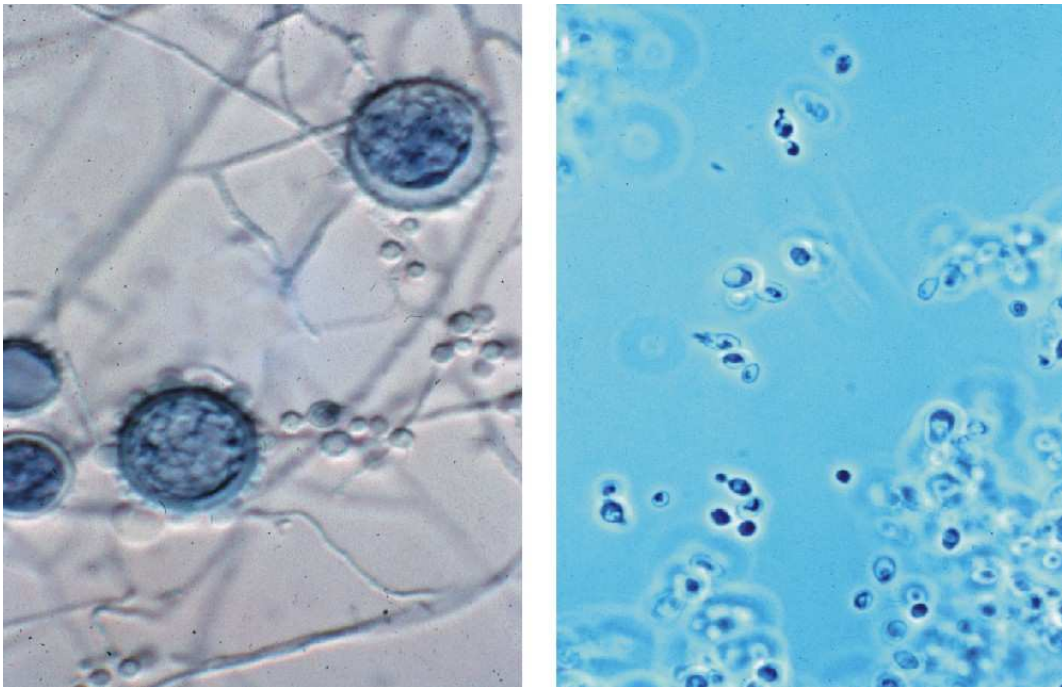


Abb. 1.1 Myzel mit Makro- und Mikrokonidien (links) einer bei Raumtemperatur gewachsenen Kultur von *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, rechts Hefezellen einer bei 37°C gewachsenen Kultur (Laktophenol-Anilinblau-Färbung), Originalvergrößerung 1000fach.

1.3 Klinik und Therapie der Histoplasmose

Nach Inhalation werden die Mikrokonidien von Alveolarmakrophagen aufgenommen, in denen sie sich zu Hefezellen umwandeln (Al-Abdely und Graybill 1999; Chaturvedi et al. 1995). Es entstehen kleine granulomatöse Entzündungsherde. Nur selten stellt die Haut die Eintrittspforte dar. Bei Immunkompetenten werden die Pilzzellen in den Makrophagen abgetötet und der überwiegende Teil der Infektionen verläuft klinisch inapparent. Symptomatische, milde Fälle verlaufen selbstlimitierend und es bildet sich im Anschluss eine Teilimmunität aus. In Fällen, bei denen initial eine hohe Konidienzahl aufgenommen wird, kann die Histoplasmose auch bei Immunkompetenten ein schweres Krankheitsbild mit respiratorischer Insuffizienz verursachen (Conces 1996). Bei vorbestehenden Lungenerkrankungen sind chronisch Verläufe mit Fibrose und Kavernenbildung wie bei der Tuberkulose möglich. Parainfektios werden Arthralgien, Hautveränderungen, wie z.B. ein Erythema nodosum, oder selten auch eine Perikarditis beobachtet (Bodey und Rolston 1999).

Bei Infizierten mit Defekten des zellulären Immunsystems (HIV-Infektion, hämatologische Grundleiden, Zytostatika-Therapie) kann es durch hämatogene Streuung zu schwer verlaufenden, disseminierten Erkrankungen kommen. Vor Beginn der antiretroviralen Therapie war die Histoplasmose bei bis zu 75 % der HIV-Infizierten in Endemiegebieten die AIDS-definierende Erkrankung (Minamoto und Rosenberg 1997). Meist handelte es sich hierbei um die Reaktivierung persistierender Infektionen. Grundsätzlich können neben Leber, Milz und Knochenmark verschiedene Organe wie z.B. der Gastrointestinaltrakt oder das ZNS befallen sein. Auch septische Verläufe sind möglich. Die klinische Abgrenzung von anderen Mykosen, einer Leishmaniose oder Miliartuberkulose kann im Einzelfall schwierig sein (Al-Abdely und Graybill 1999).

Die in Afrika vorkommende Varietät *duboisii* verursacht vor allem Haut- und Knocheninfektionen, während Lungenerkrankungen und Lymphadenopathien selten sind (Al-Abdely und Graybill 1999).

Milde, selbstlimitierende Verlaufsformen einer Histoplasmose benötigen keine antimykotische Therapie. Bei disseminierten Erkrankungen und ZNS-Beteiligung ist immer

eine intravenöse Therapie mit Amphotericin B (0,75 mg/ kg KG/ Tag) für die ersten 14 Tage einzuleiten (Wheat et al. 2000). Liegen Kontraindikationen gegen konventionelles Amphotericin B vor, ist der Einsatz von liposomalen Amphotericin B (1-3 mg/ kg KG/ Tag) gerechtfertigt. Nach Abschluß dieser Induktionstherapie wird, wie bei der Behandlung der nicht-disseminierten Verlaufsformen, Itraconazol (400 mg oral/ Tag) für 6-12 Monate verabreicht. Da selbst durch eine erfolgreiche Primärtherapie mit klinischer Remission in der Regel keine kurativen Erfolge erzielt werden, wird im Anschluß bei Immunsupprimierten eine dauerhafte Sekundärprophylaxe empfohlen. Ohne diese kommt es bereits innerhalb der ersten 6-12 Monaten zu Rezidiven. Mittel der Wahl ist hier ebenfalls Itraconazol, das in einer täglichen Dosis von 2 x 200 mg lebenslang oder bis zur Normalisierung der zellulären Immunität gegeben wird.

1.4 Diagnostik einer *Histoplasma*-Infektion

Die möglichst frühzeitige Diagnostik ist bei einem Erkrankungsverdacht von großer Bedeutung. Als Goldstandard in der Diagnostik einer Histoplasmose gilt die Identifizierung der Pilzzellen nach kultureller Anzucht aus Blutproben, Biopsien, Liquor oder Material aus der Bronchiallavage auf Sabouraud-Glukose-Agar (Minamoto und Rosenberg 1997). Diese ist jedoch aufgrund der hohen Infektionsgefahr nur in Labors erlaubt, die über Schutzmaßnahmen der Sicherheitsstufe 3 (Biostoffverordnung) verfügen. Weiterer Nachteil der Kultur ist, dass frühestens nach Tagen, eventuell auch erst nach Wochen, Wachstum von Pilzkolonien beobachtet werden kann.

Der Direktnachweis der Pilzzellen in histologischen Gewebeschnitten nach der PAS- und insbesondere der Silberfärbung nach Grocott ermöglicht eine schnellere Diagnose (Wheat 1994). Jedoch gelingt die Erregerdarstellung mit Hilfe dieser Färbungen abhängig vom Gewebetyp nur in 50-70 % der Fälle (Lunge 85 %, Leber 29 %). Verwechslungsgefahr besteht mit anderen Pilzspezies, *Pneumocystis jiroveci* und Leishmanien.

Der Hauttest mit Histoplasmin dient in epidemiologischen Studien zum Nachweis vorangegangener Auseinandersetzungen mit diesem Erreger. In der Diagnostik akuter Erkrankungen ist er jedoch wenig hilfreich (Deepe 1998). In einem Endemiegebiet

reagieren bis zu 90 % der Untersuchten und bei Immunsuppression kann der Test falsch negativ sein.

Ähnliches gilt für serologische Verfahren zum Nachweis spezifischer Antikörper, z.B. durch Immundiffusions-Tests oder ELISA. Auch hier fällt möglicherweise das Testergebnis aufgrund der massiven Immunsuppression mit fehlender Antikörperbildung negativ aus. Weiterer Nachteil dieser Methoden sind mögliche Kreuzreaktionen bei Erkrankungen mit anderen, eng verwandten Pilzspezies, die dann problematisch werden, wenn Zweit- oder Mehrfachinfektionen vorliegen (Al-Abdely und Graybill 1999).

Bei dem von Wheat angebotenen Antigen-Test mit polyklonalen Antikörpern wird das Problem der Kreuzreaktivität ebenfalls beobachtet, obwohl die Spezifität mit 98 % angegeben wird. Bei diesem Test, der jedoch bisher nicht kommerziell zur Verfügung steht, erfolgt der Nachweis von Histoplasma-Antigen in Serum oder Urin. In Fällen einer schweren Erkrankung besitzt dieser Test eine vergleichsweise hohe Sensitivität (44-75 % bei schweren Lungenerkrankungen und 82-92 % bei Fällen einer disseminierten Histoplasmose). Bei milden oder lokalisierten Infektionen verfügt er nur über eine Sensitivität von 20-39 %, d.h. er fällt daher häufig falsch negativ aus (Williams et al. 1994; Wheat et al. 1986).

Die Einführung molekularbiologischer Methoden wie der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht den Infektionsnachweis durch die Amplifikation spezifischer Erreger-DNA aus unterschiedlichsten Untersuchungsmaterialien (Makimura et al. 1994). Mit dieser von Saiki und Mullis 1985 beschriebenen Methode, können definierte DNA-Sequenzen in vitro schnell vervielfältigt werden. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der 5'-3'-Polymeraseaktivität einer thermostabilen DNA-Polymerase. Durch die mehrfache Wiederholung einzelner Zyklen, die jeweils aus 3 Schritten (Denaturierung der doppelsträngigen DNA, Anlagerung der Primer und DNA-Synthese) bestehen, wird das zu vervielfältigende DNA-Fragment exponentiell vermehrt und kann später auf einem Agarosegel dargestellt werden.

Am Tübinger Institut für Tropenmedizin wurde von Bialek et al. 2001 erstmalig eine sensitive nested PCR etabliert, die den spezifischen Nachweis von *Histoplasma capsulatum*-DNA aus Organextrakten im Tiermodell Maus ermöglichte. Es zeigte sich eine 3 bis 17fach höhere Sensitivität dieser PCR im direkten Vergleich mit der Kultur, wobei das Detektionslimit der PCR bei 5-10 Hefezellen lag.

1.5 Zielsetzung

Die Ziele dieser Arbeit waren,

- der Vergleich von Kultur und PCR aus Blutproben experimentell mit *Histoplasma capsulatum* infizierter Mäuse,
- der Aufbau einer neuen PCR-Methode mit Zielregion in einem Gen, das für ein *H. capsulatum*-spezifisches Protein kodiert und
- die Evaluation von zwei nested PCR Verfahren mit Zielsequenzen in verschiedenen Genen zum Nachweis von *H. capsulatum* in menschlichen Gewebeproben.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

DNA-Sequenzierer	Abi 373A, Perkin Elmer, Foster City, USA
Gelkammer	Stratagene, La Jolla, USA
PCR-Thermocycler	Primus 96 ^{plus} , MWG-Biotech, Ebersberg
Reaktionsgefäßöffner	MWG-Biotech, Ebersberg
Schüttler	Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
Spektrophotometer	Eppendorf, Hamburg
UV-Leuchte	Transilluminator, Bachofer, Reutlingen
Videosystem	Herolab Easy 429K, Herolab, Wiesloch
Zentrifugen	Biofuge 14, Heraeus, Wiesloch Jouan CR 422, Jouan, Saint-Herblain, Frankreich

2.2 Chemikalien

Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Bis-Acrylamid	Merck, Darmstadt
Dextran	Pharmacia, Uppsala, Schweden
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumhypochlorid	Merck, Darmstadt
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Xylol	Merck, Darmstadt

2.3 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen, Puffer und Nährmedien wurden autoklaviert (145 °C, 3 bar).

Thermolabile Lösungen wurden sterilfiltriert (Nitrofilter, 0,2 µm Porendurchmesser).

Wasser	Lösungen: deionisiertes "H ₂ O" (Millipore-Anlage) PCR: steriles <i>aqua ad iniectabilia</i> (Delta Pharma)
50 x RCL Puffer ¹	1 mM Tris, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM NaCl
5 x DNA-Ladepuffer	0,4 % Blue Dextran, 40 % Glycerin, 10 mM EDTA
10 x PCR Puffer	100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl; pH 8,3
50 x TAE	2 M Tris, 1 M Na-Acetat, 100 mM EDTA; pH 7,5

2.4 Medien

LB ² -Medium	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl; pH 7,0
SOC-Medium	2 % Trypton, 0,5 % Hefe, 20 mM Glukose, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 2 mM KCl

2.5 Enzyme

Proteinase K	Merck, Darmstadt
AmpliTa [®] q DNA Polymerase	Perkin Elmer, New Jersey, USA

2.6 Nukleotide

Desoxynukleosid-Triphosphate	Promega, Madison, USA
Dideoxynucleosid-Triphosphate	Perkin Elmer, Warrington, GB

2.7 Kits

QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
TOPO TA Cloning [®] Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Abi Prism [®] DNA Sequencing Kit	Perkin Elmer, Warrington, GB
CentriSep, Princeton Separation	Applied Biosystems, Foster City, USA

¹ Red Cell Lysis-Puffer

² Luria-Bertani

2.8 Oligonukleotide

Alle Primer wurden von der Fa. Roth GmbH, Karlsruhe bezogen.

Histoplasma capsulatum 18 S rDNA-PCR

Fungus I: 5'-GTT AAA AAG CTC GTA GTT G-3' (19 Basen, Tm³ 52°C)

Fungus II: 5'-TCC CTA GTC GGC ATA GTT TA-3' (20 Basen, Tm 58°C)

Histo I: 5'-GCC GGA CCT TTC CTC CTG GGG AGC-3' (24 Basen, Tm 82°C)

Histo II: 5'-CAA GAA TTT CAC CTC TGA CAG CCG A-3' (25 Basen, Tm 76°C)

Histoplasma capsulatum 100 kDa-PCR

HC I: 5'-GCG TTC CGA GCC TTC CAC CTC AAC-3' (24 Basen, Tm 78°C)

HC II: 5'-ATG TCC CAT CGG GCG CCG TGT AGT-3' (24 Basen, Tm 78°C)

HC III: 5'-GAG ATC TAG TCG CGG CCA GGT TCA-3' (24 Basen, Tm 76°C)

HC IV: 5'-AGG AGA GAA CTG TAT CGG TGG CTT G-3' (25 Basen, Tm 76°C)

Aktin-PCR

A 4: 5'-AGC CAT GTA CGT AGC CAT CCA GGC T-3' (25 Basen, Tm 78°C)

A 5: 5'-GGA TGT CAA CGT CAC ACT TCA TGA TGG-3' (27 Basen, Tm 80°C)

GAPDH⁴-PCR

Gap 1: 5'-GAC AAC AGC CTC AAG ATC ATC-3' (21 Basen, Tm 62°C)

Gap 2: 5'-GAC GGC AGG TCA GGT CCA CCA-3' (21 Basen, Tm 70°C)

Gap 3: 5'-AAT GCC TCC TGC ACC ACC-3' (18 Basen, Tm 58°C)

Gap 4: 5'-ATG CCA GTG AGC TTC CCG-3' (18 Basen, Tm 58°C)

³ Schmelzpunkt

⁴ Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

2.9 Bakterienstamm und Vektor

Für alle Arbeiten wurde *Escherichia coli* (TOP 10 cells, Invitrogen) verwendet. Der zur Klonierung eingesetzte pCR 2.1-TOPO[®] Vektor (3.9 kb) wird im Kit zur Verfügung gestellt.

2.10 Untersuchungsmaterialien

Das im ersten Teil dieser Arbeit untersuchte Mausblut wurde homozygoten (nu/nu) und heterozygoten (nu/+) Nacktmäusen (Stamm BALB/c) entnommen, die mit *H. capsulatum* infiziert worden waren. Eine Genmutation verursacht bei den nu/nu-Tieren eine Reifungsstörung der T-Zellen, die einen zellulären Immundefekt zur Folge hat. Die heterozygoten Tiere, deren Immunität nicht beeinträchtigt ist, dienten als Kontrolltiere.

Die Paraffinschnitte (5 µm) wurden im Institut für Histopathologie der Universitätsklinik Harare (Zimbabwe) von unterschiedlichen menschlichen Geweben erstellt, die zuvor in Formalin fixiert worden waren. Zusätzlich wurde eine Hämatoxylin/ Eosin- und eine Perjodsäure-Schiff-Reagenz (PAS)-Färbung durchgeführt. Es wurden 50 Gewebeproben (25 Hautproben, 16 Proben oropharyngealer Tumore oder Ulzera, 7 Lymphknotenbiopsien sowie je eine 1 Rektum- und Parotisbiopsie) identifiziert, in denen *H. capsulatum* mikroskopisch nachgewiesen worden war. Weitere 50 Gewebeproben (32 Haut-, 11 oropharyngeale Proben, 6 Lymphknoten- und 1 Rektum-Biopsie), in denen eine Pilzinfektion mikroskopisch ausgeschlossen wurde, dienten als Kontrolle.

2.11 Infektion der Mäuse mit *Histoplasma capsulatum*

Die Infektion der Mäuse wurde im Labor von Dr. Graybill, Audie Murphy Veteran Affairs Hospital, San Antonio, Texas mit der Möglichkeit von Schutzmaßnahmen der Sicherheitsstufe 3 nach Biostoffverordnung durchgeführt. Jeweils 48 immundefiziente und immunkompetente Mäuse wurden mit $2,4 \times 10^6$ bzw. $2,5 \times 10^7$ Kolonie-bildender Einheiten (CFU) Hefezellen von *H. capsulatum* intravenös infiziert (Abb. 2.1). Jeweils die Hälfte jeder Gruppe wurde nicht behandelt, während der andere Teil für 10 Tage mit liposomalem Amphotericin B (AmBisome[®], 10 mg/kg Körpergewicht/ Tag) therapiert wurde. Zur Beurteilung des natürlichen Verlaufs der Infektion wurden 24 nu/+ Kontrollmäuse mit der geringeren Dosis infiziert und nicht behandelt.

- Gruppe A: Infektionsdosis $2,5 \times 10^7$ CFU
in immunkompetente (nu/+) Mäuse:
24 Tiere – unbehandelt
24 Tiere – Amphotericin B-Therapie
- Gruppe B: Infektionsdosis $2,4 \times 10^6$ CFU
in immundefiziente (nu/nu) Mäuse:
24 Tiere – unbehandelt
24 Tiere – Amphotericin B-Therapie
in immunkompetente (nu/+) Mäuse:
24 Kontrolltiere – unbehandelt

Abb. 2.1 Infektionsdosis und Behandlung der verschiedenen Mäuse

Insgesamt wurden 120 Tiere am Tag 0 mit der jeweiligen Menge von Hefezellen infiziert. An den folgenden Tagen 1, 15, 22 und 29 wurden jeweils 6 Mäuse aus jeder Untergruppe getötet und das durch Herzpunktion gewonnene EDTA-Blut (250-500 μ l pro Tier) bis zur DNA-Extraktion tiefgefroren (-20 °C). Zuvor wurden 100 μ l jeder Blutprobe auf Sabouraud-Glucoseagar ausplattiert und die Zahl der nach 5-6 Tagen gewachsenen CFU dokumentiert. Die Ergebnisse dieses Kulturansatzes wurden mit denen der PCR-Reaktion verglichen. Das nach Tübingen transportierte Blut war Ausgangsmaterial für einen Teil dieser Arbeit.

Der Tierversuch wurde von der Ethikkommission der Universität von Texas genehmigt. Die Richtlinien zu Tierversuchen der *U.S. Public Health Service Policy on the Human Care and Use of Laboratory Animals* und *U.S. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* wurden befolgt.

2.12 DNA-Extraktion

Die DNA wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit extrahiert. Die Bestandteile der mitgelieferten Puffer sind von der Fa. Qiagen patentiert. Alle Pipettierarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

Extraktion aus Blut

In ein Eppendorf Reaktionsgefäß (1,5 ml) wurden 100 µl Mausblut und 400 µl 1 x RCLB pipettiert, durchmischt und für 10 Min. im Schüttler bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (10 Min., 12000 rpm) wurde der Überstand verworfen, das erhaltene Pellet erneut in 500 µl 1 x RCLB resuspendiert und unter den vorherigen Bedingungen geschüttelt und zentrifugiert. Dieses Pellet wurde dann mit 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K (Endkonzentration 1 mg/ml) versetzt und für 30 Min. bei 55 °C auf dem Schüttler bis zur vollständigen Lyse inkubiert. Die weitere Behandlung entspricht der unten aufgeführten Extraktion aus entparaffinierten Gewebeschnitten.

Extraktion aus Paraffinschnitten

Von jeder Gewebeprobe wurde ein Paraffinschnitt (5 µm) zur Extraktion verwendet. Um das Paraffin zu eliminieren, wurden zunächst 1000 µl Xylol hinzugefügt und dieser Ansatz für 5 Min. auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde das Xylol vorsichtig abpipettiert und dieser Schritt wiederholt. Dann wurden 1000 µl Ethanol_{abs} hinzugefügt und wie bei der Xylolbehandlung verfahren. Auch der Ethanol Schritt wurde ein zweites Mal durchgeführt. Um das Ethanol_{abs} vollständig zu entfernen, wurde es zunächst abpipettiert und das Reaktionsgefäß in der Vakuum-Zentrifuge so lange zentrifugiert, bis das Gewebehäutchen getrocknet war. Dieses wurde in 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K (Endkonzentration 1 mg/ml) mindestens 4 h (bis über Nacht) bei 55 °C inaktiviert.

Der nächste Schritt diente bei beiden Extraktionen der Zerstörung der Pilzzellwände und damit der Freisetzung der DNA. Die Proben wurden in Flüssigstickstoff bei -196 °C schockgefroren (1-2 Min.) und anschließend 2 Min. im Wasserbad gekocht. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt. Abschließend wurden die Proben noch-

mals 5 Min. im Wasserbad gekocht. Nach kurzer Kondensation im Kühlschrank wurden sie kurz anzentrifugiert (2000 rpm, 20 Sek.) und restliche DNAsen mit Proteinase K in einer Endkonzentration von 1 mg/ml bei 55 °C verdaut (30 Min.).

Jeder Probe wurden 200 µl AL-Puffer zugesetzt, gut gemischt und für 10 Min. bei 70 °C auf dem Schüttler inkubiert. Zur Protein-Fällung wurden 210 µl Ethanol_{abs} zugegeben und die Probe gut durchmischt. Das gesamte Probevolumen wurde auf eine QIAgen-Silicasäule gegeben und bei 9000 rpm (1 Min.) zentrifugiert. Nach Wechseln der Auffanggefäße wurden die Säulen zweimal mit 500 µl AW-Puffer durch Zentrifugation gewaschen. Im letzten Schritt wurde die an die Silicamembran gebundene DNA eluiert. Hierfür wurden die Säulen in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gesetzt und die DNA mit 2 x 50 µl AE-Puffer (70 °C) durch Zentrifugation (9000 rpm, 1 Min.) eluiert. Die extrahierte DNA-Menge lag somit in einem Gesamtvolumen von 100 µl vor, das bis zur PCR bei -20 °C gelagert wurde. Mit Ausnahme der Einfrier-Kochzyklen entspricht dieses Vorgehen den Empfehlungen des Herstellers.

2.13 Nested-PCR zum Nachweis von *Histoplasma capsulatum*-spezifischer

18 S ribosomaler-DNA

Die Untersuchung der Mausblutproben erfolgte mit einer bereits am Institut etablierten PCR (Bialek et al. 2001). Die Primer der 1. (Pilz)-PCR Fungus I und II begrenzen ein 429 bp großes Fragment des 18 S ribosomalen RNA-Gens von *Histoplasma capsulatum* (accession number X58572) zwischen den Positionen 576 (-594) und 1004 (-985). Die inneren Primer Histo I und II sind den Positionen 643-666 und 873-849 komplementär. Sie amplifizieren ein 231 bp langes Fragment.

Für den Reaktionsansatz (50 µl) der 1. PCR wurden die in Tab. 2.1 angegebenen Volumina pipettiert. Zunächst wurde ein sog. Master-Mix hergestellt, der alle Reagenzien bis auf die Proben-DNA enthält.

Tabelle 2.1

Pipettierschema der 18 S rDNA-, 100 kDa-, Aktin- und GAPDH-PCR

	Volumen	Endkonzentration
H ₂ O	27,7 µl	
10 x Puffer	5,0 µl	1x
MgCl ₂	5,0 µl	2,5 mM
Vorwärtsprimer (100 pmol/µl)	0,5 µl	1,0 µM
Rückwärtsprimer (100 pmol/µl)	0,5 µl	1,0 µM
dNTP-Mix (je 5 mM)	1,0 µl	100 µM
AmpliTa ^q ® DNA Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl	1,5 U
DNA-Extrakt	10,0 µl	

Für den Reaktionsansatz der nested-PCR wurden nur 1 µl Suspension der 1. PCR und eine Endkonzentration von 50 µM dNTPs eingesetzt. Entsprechend wurden für ein Gesamtvolumen von 50 µl mehr Wasser hinzugefügt.

Reaktionsbedingungen der 18 S rDNA-PCR:

1. Pilz-PCR

Vorbehandlung: 94 °C 5 Min.

35 Zyklen mit

Denaturierung: 94 °C 30 Sek.

Primeranlagerung: 50 °C 30 Sek.

DNA-Synthese: 72 °C 60 Sek.

Nachbehandlung: 72 °C 5 Min.

Nested-PCR

Vorbehandlung:	94 °C 5 Min.
30 Zyklen mit	
Denaturierung:	94 °C 30 Sek.
Primeranlagerung & DNA-Synthese:	72 °C 60 Sek.
Nachbehandlung:	72 °C 5 Min.

2.14 Nested-PCR mit Zielsequenz in einem Gen, das für ein *H. capsulatum*-spezifisches Protein kodiert (100 kDa-like protein)

Aufgrund der hohen Homologie von 99 % des gesamten 18 S RNA-Gens mit dem anderer dimorpher Pilze ist die eindeutige Identifizierung mit der 18 S rDNA-PCR nicht möglich. Daher wurden für die neu entwickelte nested-PCR Primer ausgewählt, die Zielsequenzen außerhalb des 18 S ribosomalen RNA-Gens amplifizieren. Sie liegen innerhalb eines Gens (accession number AJ005963) im Genom von *H. capsulatum*, das Sequenzhomologien zu einem 100-kDa Protein im menschlichen Genom zeigt (Porta et al. 1999). Das erste Primerpaar ist komplementär zu den Positionen 2227-2250 und 2617-2594, d.h. sie begrenzen ein 391 bp langes Fragment. Innerhalb dieser Sequenz amplifiziert das zweite Primerpaar ein 210 bp langes Fragment, das zwischen den Positionen 2291 (-2314) und (2500-) 2476 liegt.

Für die Reaktionsansätze wurden die in Tab. 2.1 angegebenen Volumina bzw. Endkonzentrationen der PCR-Reagenzien gewählt.

Reaktionsbedingungen der 100 kDa-PCR:

1. PCR

Vorbehandlung:	94 °C 5 Min.
35 Zyklen mit	
Denaturierung:	94 °C 30 Sek.
Primeranlagerung:	65 °C 30 Sek.
DNA-Synthese:	72 °C 60 Sek.
Nachbehandlung:	
	72 °C 5 Min.

Das Temperaturprofil und die Zyklenzahl der nested 100 kDa-PCR sind mit der nested-PCR der 18 S rDNA-PCR identisch.

2.15 Sensitivitätsbestimmung der neuen 100 kDa-PCR

Die Sensitivität der 100 kDa-PCR wurde durch eine Verdünnungsreihe ermittelt. Hierzu wurde die Konzentration von Plasmid-DNA spektralphotometrisch bestimmt, in die die *H. capsulatum*-spezifische Sequenz kloniert worden war. Von dieser Ausgangslösung wurde eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 1 ng/μl bis 0,01 fg/μl DNA in die 100 kDa-PCR eingesetzt und die untere Nachweisgrenze dieser neuen PCR ermittelt.

2.16 Untersuchungen der Maus-Proben mittels Aktin-PCR

Die Proben, bei denen keine *H. capsulatum*-spezifische DNA nachgewiesen werden konnte, wurden mit einer Aktin-PCR kontrolliert. Als Bestandteil des zellulären Zytoskeletts sollte jede Extraktion aus Zellen ein positives Ergebnis in der Aktin-PCR liefern. Ist dies nicht der Fall, muß entweder davon ausgegangen werden, daß die DNA-Extraktion nicht erfolgreich verlief und damit keine DNA im PCR-Ansatz eingesetzt wurde (die Extraktion muß dann wiederholt werden) oder der Ablauf der Reaktion durch Inhibitoren verhindert wurde.

Unter Verwendung der Primer A4 und A5 wird ein 450 bp großes Fragment amplifiziert. Die Reaktionsansätze dieser PCR entsprechen den Angaben in Tabelle 2.1.

Reaktionsbedingungen der Maus-Aktin-PCR:

Vorbehandlung:	94 °C 5 Min.
35 Zyklen mit	
Denaturierung:	94 °C 30 Sek.
Primeranlagerung:	57 °C 30 Sek.
DNA-Synthese:	72 °C 60 Sek.
Nachbehandlung:	
	72 °C 5 Min.

2.17 Untersuchungen der Humanproben mittels nested GAPDH-PCR

Bei den Paraffinschnittextrakten, in denen mit der 100 kDa-PCR keine *Histoplasma*-DNA nachgewiesen werden konnte, wurde zur Kontrolle eine GAPDH-PCR durchgeführt. Die GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) ist ein Enzym des Glucosestoffwechsels. Ihr Gen liegt in humanen Zellen in mehreren Kopien sowie zahlreich in Form sogenannter Pseudogene vor (GenBank accession number J04038.1). Lieferte diese ebenfalls ein negatives Ergebnis, wurde angenommen, daß die DNA in einem nicht mehr amplifizierbaren Zustand vorliegt. Zusätzlich wurden diese negativen Extrakte spektralphotometrisch auf ihren DNA-Gehalt bestimmt, um eine erfolglose Extraktion in diesen Fällen differenzieren zu können. Der erfolgreiche Nachweis von GAPDH Genen in DNA-Extrakten menschlicher Gewebeschnitte bestätigt also analog zur Aktin-PCR der Mausproben die Extraktion von humaner DNA.

Die amplifizierten Fragmente der genomischen DNA sind 610 bp (1. PCR) bzw. 325 bp (nested PCR) gross. Die Kopien der Pseudogene liegen als 441 bp und 248 bp große Amplifikate vor.

Unter Verwendung der Primer Gap 1 bis Gap 4 entsprechen die Reaktionsansätze bis auf eine Primerendkonzentration von 0.3 μM den Angaben in Tabelle 2.1. Des weiteren wurde in die nested PCR 2 μl DNA-Suspension der 1. PCR eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der GAPDH-PCR:

1. GAPDH-PCR

Vorbehandlung:	94 °C 5 Min.
35 Zyklen mit	
Denaturierung:	94 °C 30 Sek.
Primeranlagerung:	56 °C 30 Sek.
DNA-Synthese:	72 °C 45 Sek.
Nachbehandlung:	72 °C 5 Min.

Das Temperaturprofil der nested GAPDH-PCR gleicht dem der 1. PCR, wird jedoch mit 40 Zyklen ausgeführt.

2.18 Kontrollen

Untersuchung von DNA-Proben anderer Pilzspezies mit der *H. capsulatum* 100 kDa-PCR

Zu Beginn wurde die 100 kDa-PCR auf DNA-Proben, die aus Kulturen von *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* und *Aspergillus fumigatus* gewonnen wurden, angewendet. Da alle Proben in der PCR negativ waren, gab es keinen Hinweis auf eine Kreuzreaktion mit diesen Pilzspezies.

Leerwert

Bei der DNA-Extraktion wurde nach jeder 5. Probe eine Probe mit sterilem Wasser als sogenannter Extraktionsleerwert (LW) extrahiert. Da diese keine amplifizierbare Zielsequenz enthält, sollte sie in der PCR negativ sein. Ein positiver Leerwert weist auf

eine Kontamination hin, die entweder während der DNA-Extraktion oder während des PCR-Ansetzens entstanden sein kann. Ist der Leerwert positiv, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch einzelne Proben bei der Extraktion kontaminiert wurden. Die Extraktion wurde in diesen Fällen wiederholt, um falsch positive Befunde auszuschließen.

Negativkontrollen

Als Negativkontrollen dienten DNA-Extrakte nicht infizierter Probanden. Sie wurden während der Etablierung der PCR-Methode untersucht, um eine hohe Primer-Spezifität zu garantieren. Des Weiteren überwachen diese Kontrollen mögliche unspezifische oder durch Kontamination verursachte Reaktionen.

Positivkontrollen

Als Positivkontrolle wurde Plasmid-DNA (1 fg/ μ l) eingesetzt. Die klonierte Sequenz entspricht der Zielsequenz der 1. PCR. Mit einem positiven PCR-Ergebnis kann hierbei gezeigt werden, daß optimale Reaktionsbedingungen auch im Einzelversuch vorlagen.

Leerwert der nested-PCR

In diesem Ansatz wurden die Reagenzien der nested-PCR mit 1 μ l sterilem Wasser statt 1 μ l des 1. Reaktionsansatzes pipettiert. Auch mit dieser Kontrolle können Kontaminationen des Reaktionsgemisches oder unspezifische Reaktionen erkannt werden.

Inhibitorkontrollen

Jedes negative Ergebnis einer PCR kann auf einer Inhibition der Reaktion durch Substanzen, die in der Probe enthalten sind, beruhen. Zum Ausschluss bzw. Nachweis wurden sogenannte Inhibitorkontrollen durchgeführt. Hierzu wurde die PCR nach Zugabe der Zielsequenz in Form von Plasmid-DNA wiederholt. Bei positivem Ergebnis sind Inhibitoren ausgeschlossen, anderenfalls nachgewiesen und das negative PCR-Ergebnis nicht verwertbar.

2.19 Vorsichtsmaßnahmen bei PCR-Arbeiten

Zur Vermeidung einer Kontamination wurden folgende Vorsichtsmaßnahmen getroffen:

- Um eine evtl. stattgefundenene Kontamination zu detektieren, wurden die unten aufgeführten Kontrollen in allen Versuchen mitgeführt.
- Das Ansetzen des Reaktionsmixes erfolgte räumlich getrennt von Arbeiten mit funktionaler DNA; die Proben-DNA wurde ebenfalls in einem gesonderten Raum zugegeben.
- Die in der Extraktion und PCR verwendeten Reagenzien wurden aliquotiert und Reste verworfen.
- Für jeden Methodenschritt wurde ein eigener Pipettensatz zur Verfügung gestellt und ausschließlich gestopfte Pipettenspitzen verwendet.
- Das Pipettieren der Positiv-Kontrolle wurde an einem gesonderten Arbeitsplatz mit hierfür reservierten Pipetten durchgeführt; anschließend wurden die Handschuhe gewechselt, um die Verschleppung der Plasmid-DNA zu vermeiden.
- Für die PCR wurden sogenannte 16 x Strips (MWG Biotech, Ebersberg) als Reaktionsgefäße verwendet; die Reaktionsgefäße wurden mit einem speziellen Deckelöffner geöffnet und geschlossen, so daß das Berühren des Deckels mit der Hand und die dabei mögliche Kontamination entfiel.
- Alle Arbeitsflächen wurden regelmäßig mit einer 8 % Natriumhypochloridlösung gereinigt bzw. Gebrauchsgegenstände über Nacht mit UV-Licht bestrahlt.

2.20 Agarose Gelelektrophorese

Die Darstellung der PCR-Amplifikate (10 µl) erfolgte in Agarosegelen. Hierzu wurde Agarose in einer Konzentration von 1,8 % im entsprechenden Volumen 1 x TAE bis zur völligen Löslichkeit gekocht. Nach Abkühlung auf ca. 55 °C wurde Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) zugegeben und der Ansatz in die Gelkammer (Stratagene, La Jolla, USA) gegossen. Nach 30 Min. war die Agarose zum Gel erstarrt und die Proben konnten im Dextran-Ladepuffer aufgetragen werden. Als DNA Größenstandard wurde der Molekulargewichtsmarker VIII (Boehringer Mannheim) verwendet. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 80-100 V (Spannungsquelle: Heinzinger, Rosenheim). Das in die DNA interkalierend eingelagerte Ethidiumbromid kann auf einem UV-Transilluminator (312 nm) sichtbar gemacht werden. Die untere Nachweisgrenze liegt bei ungefähr 5 ng

DNA (Sambrook et al. 1989). Die Geldokumentation erfolgt durch eine Kamera mit angeschlossenem Videoprinter (Herolab Easy 429K).

2.21 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Mit der PAGE lassen sich DNA-Sequenzen mit nur einer Basenpaarlänge unterscheiden. Sie findet Anwendung in der Analyse der während der Sequenzierungsreaktion entstandenen DNA-Fragmente. Das Gel dient dabei als Molekularsieb. Vernetzte Polyacrylamidgele werden durch die Copolymerisation von Acrylamid mit Methylenbisacrylamid hergestellt. Als Radikalkettenstarter dient die Reaktion von Tetramethyldiamin (TEMED) mit Ammoniumpersulfat (APS), bei der ein freies Sulfat Radikalanion entsteht. Die Porengröße des Gels wird durch die Gelkonzentration und den Vernetzungsgrad, d.h. das Verhältnis Acrylamid/Bisacrylamid festgelegt. Zum Start der Polymerisation wurden zu 60 ml 6 %iger (w/v) Gellösung 350 µl 10 %iges (w/v) APS und 15 µl TEMED gegeben. Das Gel wurde zwischen zwei horizontale Glasplatten gegossen, die durch Abstandshalter (Spacer) voneinander getrennt wurden. Nach Polymerisation wurde die DNA des Sequenzierungsansatzes in 5 µl Formamid/ EDTA-Ladepuffer aufgetragen und eine Spannung von 150-200 V angelegt. Als Laufpuffer diente 1 x TAE.

2.22 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentrationsbestimmung der durch eine Mini-Präparation oder Extraktion gewonnenen DNA wurde spektralphotometrisch (BioPhotometer, Eppendorf) in Plastikküvetten durchgeführt. Die Bestimmung der OD_{260} unter Anwendung des Lambert-Beer-Gesetzes erfolgte entsprechend der Umrechnung für DNA $OD_{260} = 1 \sim 50 \mu\text{g/ml}$. Als Vergleichslösung diente H_2O bzw. Elutionspuffer. Jede DNA-Messung wurde dreimal wiederholt und der Mittelwert dieser OD-Werte ermittelt. Das Verhältnis von OD_{260} zu OD_{280} liegt bei sauberen Nukleinsäurelösungen zwischen 1,8 und 2,0. Werte $< 1,8$ deuten auf eine Proteinverunreinigung hin.

2.23 Klonierung der 100 kDa-Zielsequenz

Aufreinigung von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick Purifikation Kit (Qiagen, Hilden) von ungebundenen Primern bzw. Nukleotiden, der Taq-Polymerase und Salzen gereinigt. Dem zu reinigenden PCR-Produkt wurde das fünffache Volumen PB-Puffer zugegeben und dieser Ansatz auf eine QIAquick-Säule pipettiert. Nach der Zentrifugation (13000 rpm, 1 Min.) war die DNA an die Silicat-Membran der Säule gebunden und konnte mit 750 µl PE-Puffer gewaschen werden. Anschließend wurde die gereinigte DNA mit 30 µl EB (10 mM Tris-Cl; pH 8,5) durch Zentrifugation von der Säule eluiert.

Ligation

In dieser Reaktion werden mit Hilfe von DNA-Ligasen doppelsträngige DNA-Moleküle kovalent verbunden (ligiert). Eine T4-Ligase (aus *E. coli*) katalysiert die Ausbildung einer Phosphodiesterase zwischen dem 3'-OH-Ende und der 5'-Phosphatgruppe beider Fragmente. Die Ligation des PCR-Fragments in den pCR 2.1-TOPO[®] Vektor wurde unter Verwendung des TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen, Groningen) durchgeführt. Dieser Kit beruht auf dem Prinzip der Template-unspezifischen Polymeraseaktivität der Taq-Polymerase, die am 3'-Ende des Amplifikats der PCR-Reaktion ein einzelnes dATP anfügt. Dieses hybridisiert mit dem am 3'-Ende überhängenden dTTP innerhalb der *Multiple Cloning Site* (MCS) des bereits linearisierten Vektors. Zusätzlich ist an dieser Stelle der MCS eine Topoisomerase I kovalent gebunden, die diese Ligation spontan ermöglicht. Somit ist in diesem Kit keine T4-Ligase mehr erforderlich.

Pipettieransatz (5 µl):

- 3 µl PCR-DNA
- 1 µl pCR 2.1-TOPO[®] Vektor
- 1 µl H₂O

Nach der Inkubation bei RT (5 Min.) wurde die Ligation durch eine Stop-Lösung unterbrochen und der Ansatz bis zur Transformation auf Eis gestellt.

Transformation von *E. coli*-Zellen

In der Transformationsreaktion wurden 2 µl rekombinanter Vektoransatz in 50 µl elektrokompetenter *E. coli*-Zellen des Kits aufgenommen. Der Transformationsansatz wurde hierfür 30 Min. auf Eis gestellt und die Zellen anschließend im Wasserbad bei 42 °C hitzegeschockt (30 Sek.). Erneut auf Eis gestellt, wurde 250 µl SOC-Medium hinzugefügt und für 30 Min. bei 37 °C auf dem Schüttler durchmischt. Die transformierten Zellen (150 µl) konnten dann auf LB/Amp-Platten (Ampicillin-Konzentration 50 µg/ml) ausplattiert werden. Diese wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Auswahl geeigneter Bakterienklone

Der Plasmidvektor gewährleistet das selektive Wachstum der erfolgreich transformierten *E. coli*-Bakterien auf den Agarplatten, da nur diese das Ampicillinresistenz-Gen des Vektors enthalten. Zur Identifizierung rekombinanter Klone dient der Verlust der β-Galactosidase-Aktivität dieser Bakterien. Der Vektor besitzt einen Teil des *lacZ*-Gens, der ein N-terminales Fragment der β-Galaktosidase codiert. Komplementiert wird es durch ein mutiertes *lacZ*-Gen in der Wirtszelle. Beide β-Galaktosidase-Anteile sind zwar einzeln inaktiv, können aber zu einem funktionellen Protein reassoziieren, welches in der Lage ist, das auf den Agarplatten dazugegebene Substrat X-Gal enzymatisch zu spalten. Dies ist an einer Blaufärbung der Kolonien des Bakterienrasens zu erkennen. Durch die Insertion einer Sequenz in die *Multiple Cloning Site* des Vektors resultiert die Inaktivierung der β-Galaktosidase. Die rekombinanten Klone erscheinen dann als weiße Plaques.

Vermehrung geeigneter Klone

Zur Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurden 3 ml LB/Amp-Nährmedium (100 µg/ml) mit Einzelkolonien der *E. coli*-Stämme mit Hilfe eines autoklavierten Zahnstochers beimpft. Dieser Ansatz wurde in einem sterilen Red Cap Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) über Nacht im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Aus diesen Bakteriensuspensionen konnte durch eine Mini-Präparation die Plasmid-DNA gewonnen werden. Um die erfolgreiche Klonierung zu prüfen, wird die Plasmid DNA sequenziert. Zur Herstellung einer Bakterienstocklösung wurden 850 µl der LB/Amp-Kultur mit 150 µl Glycerin bei -70 °C aliquotiert gelagert.

Plasmidisolierung aus *E. coli* (Minipräparation)

Zur Plasmidgewinnung wurde der QIAprep Spin Miniprep Kit (Fa. Qiagen) verwendet. Die über Nacht in 3 ml LB/Amp Medium inkubierten Zellen wurden durch 10 minütige Zentrifugation bei 8000 rpm geerntet. Die Bakteriensedimente wurden in 250 µl P1-Puffer (100 µg/ml RNase A, 50 mM Tris pH 7,5, 1 M EDTA pH 8,0) resuspendiert und die Zellen anschließend durch Zugabe von je 250 µl P2-Lösung (200 mM NaOH, 1 % SDS) für 5 Min. lysiert. Die Zugabe von 350 µl neutralisierender N3-Lösung (3 M Kalium-Acetat, pH 5,5) führte zur Denaturierung der Proteine, die gemeinsam mit der genomischen DNA und den Zellresten ausfielen. Nach Zentrifugation waren die kürzeren, in der Lösung verbliebenen Plasmide im Überstand vorhanden. Dieser wurde auf Qiagen-Säulen pipettiert, an deren Ionenaustauschermatrix die Plasmid-DNA mit PB- und PE-Puffer gewaschen wurde. Die gereinigte Plasmid-DNA konnte anschließend mit 50 µl H₂O von den Säulen eluiert werden. Das Vorgehen entspricht den Anweisungen des Herstellers.

2.24 Sequenzierung der PCR-Amplifikate

Um ein in der PCR amplifiziertes Fragment zu sequenzieren, müssen vor der Cycling-Reaktion alle ungebundenen PCR-Reagenzien entfernt werden. Die Sequenzierung wurde mit dem Abi Prism[®] DNA Sequencing Kit (Perkin Elmer) durchgeführt. Diese Methode basiert auf der abgewandelten Sequenzierungsreaktion durch das Prinzip des Kettenabbruchs nach Sanger et al. (1977). Unter Verwendung gewöhnlicher dNTPs kommt es beim Einbau der Didesoxy-Nukleotide (ddNTP) zum Kettenabbruch, da diese an Position der freien 3'OH-Gruppe ein Wasserstoff-Atom besitzen. An dieser Stelle wird die DNA-Synthese basenspezifisch unterbrochen und es entstehen unterschiedlich große DNA-Fragmente.

Der Terminator Ready Reaktion Mix enthält die AmpliTaq[®] DNA Polymerase, fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Nukleotide (ddNTP), dNTPs und die zur Cycling-Reaktion benötigten Puffer. Als Sequenzierprimer dienten die jeweiligen Vorwärtsprimer (Fungus I und Histo I der 18 S rDNA-PCR bzw. HC I und HC III der 100 kDa-PCR).

Pipettieransatz (20 μ l):

4 μ l Terminator Ready Reaction Mix

3 μ l Sequenzierprimer (2 pmol/ μ l)

6 μ l DNA

7 μ l H₂O

Reaktionsbedingungen der Sequenzierungsreaktion:

25 Zyklen mit:

Denaturierung: 96 °C 30 Sek.

Primeranlagerung: 50 °C 15 Sek.

DNA-Synthese: 60 °C 4 Min.

Anschließend wurde das Produkt der Sequenzierungsreaktion mit Hilfe von CentriSep-Säulen (Princeton, Applied Biosystems) von überschüssigen markierten ddNTP gereinigt und auf einem 6 % Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Laseranregung der fluoreszenzmarkierten ddNTPs in einem Sequenzierautomaten (DNA-Sequenzierer Abi 373A, Applied Biosystems, PE). Die Ergebnisse der Sequenzierungsreaktion wurden mit den Sequenzen der Datenbank (National Center for Biotechnology Information, Washington, D.C.) verglichen (Software: Blast Search).

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Blutkulturen bei den unbehandelten Mäusen

In der Gruppe der unbehandelten immunkompetenten (nu/+) Nacktmäuse konnte einen Tag nach der experimentellen Infektion (p.i.) mit $2,5 \times 10^7$ Kolonie-bildenden Einheiten (CFU) bei insgesamt 5 von 6 Tieren *H. capsulatum* (3 CFU / 100 µl Blut [Median]) aus dem Blut kultiviert werden (Tab. 3.1). Der Erregernachweis gelang bis zum 15. Tag p.i., an dem noch bei 5 Tieren die Kultur positiv war (1 CFU / 100 µl Blut [Median]). Ab Tag 22 p.i. konnte bei keinem immunkompetenten Tier *H. capsulatum* aus dem Blut mehr kultiviert werden. Die negativen Kulturergebnisse dieser Tiere an den Tagen 22 und 29 weisen darauf hin, dass die Infektion bei den immunkompetenten Mäusen selbstlimitierend verläuft (Abb. 3.1), obwohl die initiale Dosis von $2,5 \times 10^7$ CFU nach Angaben des Laborleiters, Dr. Graybill, als letal angesehen wird.

Trotz niedrigerer Infektionsdosis von nur $2,4 \times 10^6$ *H. capsulatum* CFU, gelang es den unbehandelten immundefizienten (nu/nu) Mäusen nicht, den Erreger zu eliminieren (Abb. 3.1). Am ersten Tag p.i. war die Infektion bei zwei Tieren mit der Kultur nachweisbar (2 CFU / 100 µl Blut [Median]) (Tab. 3.1). Im weiteren stieg die Konzentration der Hefezellen weiter an und war bei fast allen Tieren an den Tagen 15, 22 und 29 p.i. nicht mehr auszählbar (>1000 CFU / 100 µl Blut). Vor dem 29. Tag waren bereits 4 von 6 Tieren frühzeitig verstorben.

Erwartungsgemäß gelang es den mit $2,4 \times 10^6$ *H. capsulatum* CFU infizierten immunkompetenten Kontrollmäusen, die Infektion auch ohne Therapie bereits innerhalb der ersten 15 Tage zu überwinden. An Tag 1 p.i. konnten bei nur 3 von 6 Mäusen Pilzzellen von *H. capsulatum* (1 CFU / 100 µl Blut [Median]) angezüchtet werden (Tab. 3.1). Ab Tag 15 p.i. blieben die Blutkulturen der weiteren 18 Mäuse dieser Gruppe steril.

Tab 3.1

Kulturergebnisse von Blutproben der fünf mit *H. capsulatum* infizierten Mausgruppen; angegeben ist die Anzahl der Mäuse mit pos. Blutkultur bezogen auf die Zahl der auswertbaren Tiere pro Untersuchungstag; in [Klammern] der Median der Erregerkonzentration als CFU *H. capsulatum* / 100 µl Blut.

	Tag 1	Tag 15	Tag 22	Tag 29
nu/+ Tiere unbehandelt	5/6 [3]	5/6 [1]	0/6	0/6
nu/+ Tiere mit Therapie	5/6 [8]	0/6	0/6	0/4*
nu/nu Tiere unbehandelt	2/5* [2]	5/5* [6]	6/6 [>1000]	2/2† [>1000]
nu/nu Tiere mit Therapie	5/6 [3]	3/6 [2]	4/6 [2]	3/6 [2]
nu/+ Kontrolltiere unbehandelt	3/6 [1]	0/6	0/6	0/5†

* = bei einem Teil der Tiere war die Kultur wegen Kontamination mit anderen Mikroorganismen nicht auswertbar

† = ein Teil der Tiere ist vor geplanter Untersuchung verstorben

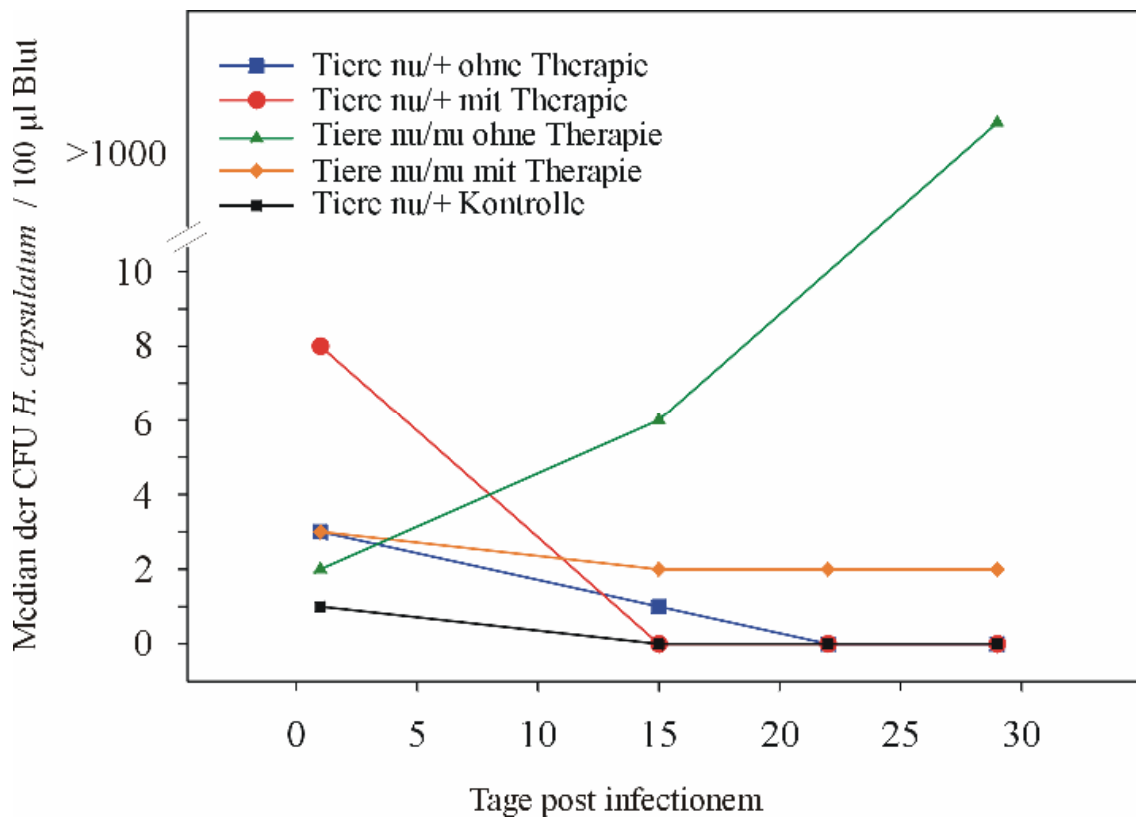
3.2 Ergebnisse der Blutkulturen bei den behandelten Mäusen

Die Untersuchung der behandelten Tiere zeigt den Verlauf der Infektion unter einer Amphotericin B-Therapie. Unter den immunkompetenten (nu/+) Tieren war die Infektion lediglich am 1. Tag nach der Infektion bei 5 der 6 Mäuse mit im Median 8 CFU / 100 µl Blut nachweisbar (Tab. 3.1). Ab Tag 15 p.i. konnte bei keinem Tier mehr *H. capsulatum* aus dem Blut kultiviert werden. Im Vergleich dazu war die Infektion bei den unbehandelten immunkompetenten Tieren zu diesem Zeitpunkt noch nachweisbar (Tab. 3.1). Der Unterschied wird auf die erfolgreiche medikamentöse Therapie zurückgeführt.

Die immundefizienten (nu/nu) Tiere überlebten trotz ihrer beeinträchtigten zellulären Immunität mit der Amphotericin Behandlung alle bis Tag 29 p.i. (Tab. 3.1). Bei den unbehandelten (nu/nu) Tieren waren bis zu diesem Tag bereits vier Tiere verstorben. An

Tag 1 p.i. waren 3 CFU / 100 µl Blut [Median] angezüchtet worden. Die Kolonienkonzentration stieg im weiteren Verlauf unter der Therapie nicht an, jedoch war bei einem Teil der Tiere auch noch an Tag 29 p.i. *H. capsulatum* im Blut nachweisbar (2 CFU / 100 µl [Median]). Die Therapie mit Amphotericin B ermöglicht den Tieren zwar eine deutliche Reduktion der Erregerkonzentration, aber es kommt nicht zu einer kompletten Elimination wie bei den immunkompetenten Tieren (Abb. 3.1). Für die erfolgreiche Elimination scheint die intakte zelluläre Immunität erforderlich zu sein.

Abbildung 3.1 Blutkulturergebnisse der *H. capsulatum* Infektion im Mausmodell



3.3 Nachweis von *Histoplasma capsulatum*-DNA mittels 18 S rDNA-PCR

Die Anwendung der 18 S rDNA-PCR in diesem Tiermodell zeigt, dass die *Histoplasma capsulatum* Infektion im Blut der Tiere nicht nur durch die kulturelle Anzucht von Pilzzellen nachgewiesen werden kann, sondern auch durch den Nachweis von spezifischer DNA (Abb. 3.2).

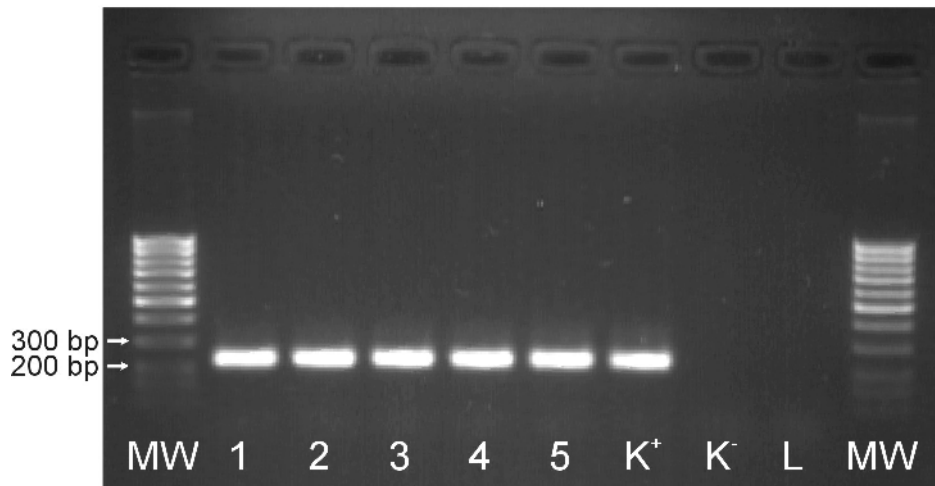


Abb. 3.2

Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel (1,8 %) mit Darstellung der 231 bp langen Amplifikate der nested 18 S rDNA-PCR

DNA-Extrakte von Blutproben (1-5) der immunkompetenten, unbehandelten Mäuse an Tag 1. K⁺: Positivkontrolle; K⁻: Negativkontrolle; L: Extraktions-Leerwert; MW: DNA-Marker (100 bp-Leiter).

Von den 120 Mäusen waren 5 Tiere vor der geplanten Untersuchung verstorben, so dass insgesamt 115 Blutproben zur DNA-Extraktion zur Verfügung standen. Bei 3 dieser Proben war die DNA-Extraktion nicht erfolgreich und die von diesen Tieren gewonnene Blutmenge für eine zweite Extraktion zu gering. Damit konnten insgesamt 112 DNA-Proben mittels 18 S rDNA-PCR untersucht werden. In 37 Proben wurde ein Amplifikat nachgewiesen, von denen 29 mittels Sequenzierung als *H. capsulatum*-spezifisch identifiziert werden konnten. Die Einzelergebnisse der PCR- und Kulturuntersuchungen sind in den Tabellen 6.1 und 6.2 des Anhangs dargestellt.

Bei allen 12 immunkompetenten Tieren konnte an Tag 1 p.i. Pilz-spezifische DNA nachgewiesen werden. Die PCR wurde nach Behandlung der Tiere bereits an Tag 15 analog zu den Kulturergebnissen negativ. Bei den unbehandelten Tieren konnte DNA zu diesem Zeitpunkt noch in 4 Blutproben nachgewiesen werden. Die negativen PCR-Ergebnisse aller immunkompetenten Tiere an den Tagen 22 und 29 p.i. entsprachen den Kulturergebnissen, d.h. auch die PCR ergab keinen Hinweis auf eine persistierende Infektion. Folglich korreliert der Nachweis spezifischer DNA mittels PCR-Methode mit dem Vorhandensein vitaler Pilzzellen in den Blutproben. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass nach Heilung der Tiere keine frei zirkulierende DNA im Blut persistiert, die weiterhin zu positiven PCR-Ergebnissen führen könnte.

Während bei einem Teil der immundefizienten Tiere am 1. Tag p.i. *H. capsulatum* in geringer Keimzahl kultivierbar war, gelang kein DNA-Nachweis mittels PCR-Methode. Bei den unbehandelten Mäusen stieg die Anzahl der CFU im weiteren Verlauf, parallel dazu wurde die PCR positiv. An den Tagen 22 und 29 p.i. konnte bis auf ein Tier in allen Proben spezifische DNA nachgewiesen werden. In der Gruppe der behandelten Tiere konnte auch an den Tagen 15, 22 und 29 p.i. keine *H. capsulatum*-spezifische DNA amplifiziert werden, obwohl bei einem Teil der Tiere *H. capsulatum* in geringer Konzentration kultiviert werden konnte.

Die Ergebnisse der PCR-Methode korrelieren mit den Ergebnissen der Kultur im Verlauf der Infektion mit *H. capsulatum* bei Mäusen. Der Nachweis *H. capsulatum*-spezifischer DNA ist nicht nur nach einer hohen Infektionsdosis von $2,5 \times 10^7$ CFU möglich, sondern auch dann, wenn die Tiere mit nur $2,4 \times 10^6$ CFU infiziert wurden.

Der Vergleich beider Methoden zeigt, daß in den 26 Fällen der erfolgreichen kulturellen Anzucht auch ein positives PCR-Ergebnis erzielt werden konnte (Abb 3.2). Nur bei zwei immunkompetenten Tieren am Tag 1 war das Kulturergebnis trotz positiver PCR negativ.

In 21 Fällen wurde trotz positivem Kulturergebnis mit der PCR-Methode keine spezifische DNA amplifiziert (Abb. 3.2). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass zwar 100 µl Blut pro Kulturansatz eingesetzt wurden, aber nur 10 µl, d.h. 1/10 der aus 100 µl

Blut extrahierten DNA wurden in der PCR-Untersuchung verwendet. Daher sind die Kultur- und PCR-Ergebnisse nur bedingt vergleichbar. Die Zahl der angezüchteten CFU lag in Fällen eines negativen PCR-Ergebnisses zwischen 0-7 pro 100 µl Blut. Diese Konzentration ist bereits als Detektionslimit dieser PCR-Methode vorbeschrieben (Bialek et al. 2001). Bei 59 Tieren war die Infektion weder mit der PCR- noch der Kulturmethode nachzuweisen.

Tab. 3.2 Vergleich der PCR- und Kulturergebnisse zum Nachweis von *H. capsulatum* Infektion im Blut von 108* Mäusen

Kultur	18 S rDNA-PCR		
	Positiv	negativ	gesamt
positiv	26	21	47
negativ	2	59	61
gesamt	28	80	108

* = bei 4 der 112 Tiere, deren DNA-Extrakte mittels PCR untersucht wurden, war die Blutkultur mit anderen Mikroorganismen kontaminiert. Somit konnten die Ergebnisse beider Methoden nur bei 108 Tieren verglichen werden.

Kontrollen

Mit jeder Probe, bei der mittels PCR keine spezifische DNA von *H. capsulatum* nachgewiesen werden konnte, wurde eine Inhibitorkontrolle durchgeführt. Diese Kontrollen mit positiver Zielsequenz in Form von Plasmid-DNA lieferten alle ein im Gel darstellbares Amplifikat (Tab. 6.1 und 6.2). Die Anwesenheit von Inhibitoren als Ursache der negativen PCR-Ergebnisse konnte somit ausgeschlossen werden.

Des weiteren wurden alle Proben mit negativem PCR-Ergebnis in eine Maus-Aktin-PCR eingesetzt. Der Nachweis von Aktin-Sequenzen in diesen Proben belegt die erfolgreiche Extraktion von amplifizierbarer Maus-DNA. Zusätzlich wurde sie bei 24 Proben durchgeführt, die bereits in der *H. capsulatum* 18 S rDNA-PCR ein Amplifikat aufwiesen. Auch für diese Proben war die Maus-Aktin-PCR positiv.

Sequenzanalyse der positiven 18 S rDNA-PCR Mausproben

Die Amplifikate der 18 S rDNA-PCR von 37 Mausproben wurden sequenziert. Davon zeigten 29 eine Homologie von 98-99 % zu der 18 S rDNA Sequenz von *Histoplasma capsulatum* in der Datenbank (accession number X58572) (Tab. 6.1 und 6.2). Die restlichen Sequenzen ergaben eine Homologie von 95-99 % zu diversen Pilzspezies der Klasse Euzozomyces. Eine eindeutige Zuordnung war zwar nicht möglich, aber der Nachweis von *H. capsulatum*-spezifischer DNA konnte ausgeschlossen werden. Das PCR Ergebnis wurde daher als negativ bezeichnet.

3.4 Aufbau und Sensitivität einer nested PCR zum Nachweis von *H. capsulatum*-spezifischer DNA Sequenzen außerhalb der ribosomalen DNA

Die Sequenzanalyse der Amplifikate im Mausmodell zeigten, dass die 18 S rDNA-PCR in einigen Fällen keine eindeutige Identifizierung und damit Zuordnung zu einer Pilzspezies erlaubt. Grund hierfür ist die hohe Homologie der gesamten 18 S-DNA diverser Schimmelpilze der Ordnung Onygenales. Zum Nachweis von *H. capsulatum*-spezifischer DNA wurde ein weiteres PCR-Verfahren entwickelt. Hierfür wurde ein Gen von *H. capsulatum* als Zielsequenz gesucht, das für ein spezifisches Protein kodiert und bisher bei keiner anderen Pilzspezies beschrieben wurde (Porta et al. 1999).

Für die Bestimmung der Sensitivität dieser neuen PCR wurde eine Verdünnungsreihe von Plasmid-DNA mit der klonierten Zielsequenz erstellt. Nach Durchführung der 1. Reaktion gelang der Nachweis eines Amplifikates mittels Agarose-Elektrophorese bei Einsatz von minimal 100 fg klonierter Plasmid-DNA. In der nested PCR führte der Einsatz von 0,1 fg DNA noch zum Nachweis eines Amplifikates, das mittels Sequenzierung als *H. capsulatum*-spezifisch identifiziert wurde. Diese Nachweisgrenze war bei mehreren Wiederholungen reproduzierbar. Abhängig von der noch nicht bestimmten Kopienzahl pro Genom entspricht die DNA Menge bei einer Kopie pro Genom etwa 1-5 CFU von *H. capsulatum*.

3.5 PCR-Ergebnisse der Paraffin-eingebetteten humanen Gewebeproben

Zum Nachweis extrahierter amplifizierbarer humaner DNA wurde die GAPDH nested-PCR durchgeführt. Trotz wiederholter Extraktion konnte in den Extrakten von nur 29

der 50 *Histoplasma*-positiven Proben und 33 der 50 *Histoplasma*-negativen Gewebeproben humane DNA nachgewiesen werden (Tab. 3.3). Aus den restlichen 21 bzw. 17 Schnitten konnte keine amplifizierbare humane DNA mehr extrahiert werden, obwohl die spektralphotometrische DNA-Messung in allen negativen Proben ausreichende Mengen von DNA nachwies. Ausgehend von einer Schädigung der DNA in diesen Proben wurden daher nur die GAPDH-PCR positiven Gewebeproben zur Analyse der *H. capsulatum*-spezifischen PCR-Methoden verwendet.

Ergebnisse der Histoplasma-positiven Gewebe

Mit der 100 kDa-PCR-Methode wurde bei 20 der 29 *Histoplasma*-positiven Gewebeproben mit amplifizierbarer DNA ein positives PCR-Ergebnis erzielt (Abb. 3.3 und Tab. 3.3). Die Sequenzierung der 20 Amplifikate zeigte in allen Fällen eine nahezu komplette Identität mit der *H. capsulatum*-spezifischen Sequenz der GenBank.

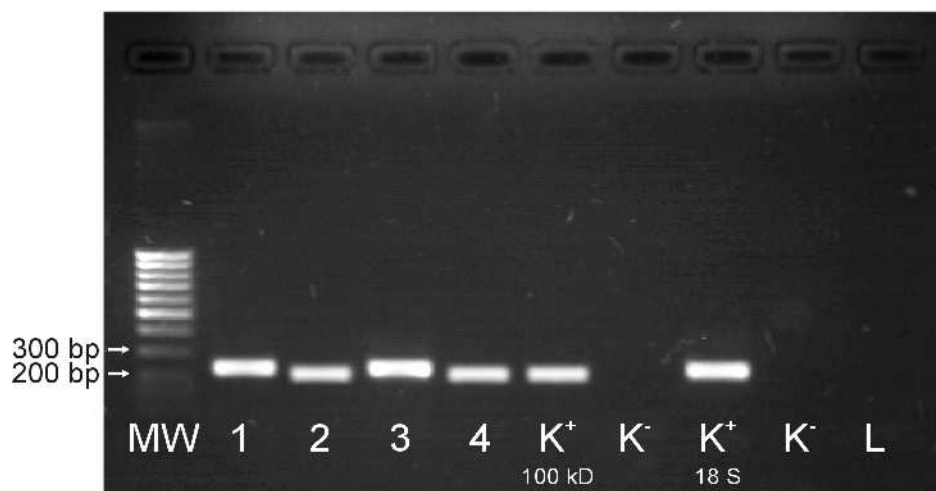


Abb. 3.3

Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel (1,8 %) mit Darstellung der 231 bp (18 S rDNA-PCR) und 210 bp (100 kDa-PCR) langen Amplifikate der *H. capsulatum*-PCR Verfahren

DNA-Extrakte aus Haut- (1 und 2) und Lymphknoten-Proben (3 und 4),

K⁺: Positivkontrolle der 100 kD- bzw. 18 S-PCR; K⁻: Negativkontrolle; L: Extraktions-Leerwert; MW: DNA-Marker (100 bp-Leiter)

Die 18 S rDNA-PCR lieferte bei 26 von 29 untersuchten Geweben ein Amplifikat (Tab. 3.3). Aber nur 20 Amplifikate stimmten mit der Sequenz von *Histoplasma capsulatum* überein, während die anderen 6 eine Homologie von 95-99 % zu verschiedenen Pilzspezies der Klasse Euscomycetes ergaben. Diese PCR-Ergebnisse wurden als unspezifische Amplifikationen und somit als negativ angesehen.

Bei den 20 in der 18 S rDNA-PCR positiven Schnitte handelte es sich um die selben Gewebeproben, in denen auch mittels 100 kDa-PCR erfolgreich *Histoplasma*-spezifische DNA amplifiziert wurde.

Bei 9 Gewebeproben ergab sich ein diskrepanter Befund, d.h. trotz lichtmikroskopischer Diagnose einer Histoplasmose gelang der Nachweis *H. capsulatum*-spezifischer DNA in keinem der beiden eingesetzten PCR-Verfahren. Nach erneuter Extraktion konnte trotz des Nachweises amplifizierbarer humaner DNA (GAPDH-PCR positiv) weder mit der 18 S rDNA-PCR noch mit der 100 kDa-PCR *H. capsulatum*-spezifische DNA nachgewiesen werden.

Insgesamt konnte aus DNA-Extrakten von 11 Hautproben (55 %), 6 Proben aus dem Nasen-Rachenraum (30 %) und 3 Lymphknoten-Biopsien (15 %) *H. capsulatum*-spezifische DNA amplifiziert werden. Die prozentuale Verteilung der PCR-positiven Gewebearten entspricht der Zusammensetzung der 29 untersuchten Proben. Somit ist der erfolgreiche Nachweis *H. capsulatum*-spezifischer DNA bei beiden PCR-Methoden unabhängig von der Art des untersuchten Gewebes.

Tab. 3.3 PCR-Ergebnisse und Sequenzanalyse der 100 humanen Gewebeproben

	<i>Histoplasma</i> -positive Schnitte (n = 50)	<i>Histoplasma</i> -negative Schnitte (n = 50)
positives GAPDH-PCR-Ergebnis (amplifizierbare humane DNA)	29	33
100 kDa-PCR-Amplifikat <i>H. capsulatum</i> -spezifisch	20 20	0 0
18 S-PCR-Amplifikat <i>H. capsulatum</i> -spezifisch	26 20	18 0

Ergebnisse der *Histoplasma*-negativen Gewebeproben

Entsprechend den Ergebnissen der GAPDH-PCR konnte nur aus 33 der insgesamt 50 Gewebeproben amplifizierbare humane DNA gewonnen werden (Tabelle 3.3). Die 100 kDa-PCR lieferte aber für alle 50 Gewebe ein negatives Ergebnis.

Mit der 18 S rDNA-PCR wurde aus 18 der 50 DNA-Extrakte von Kontrollschnitten DNA amplifiziert. Die Sequenzanalyse ergab bei keinem dieser Amplifikate *H. capsulatum*-spezifische DNA, sondern wie bereits im Mausmodell ausschließlich Sequenzen anderer ubiquitär vorhandener Euaskomyzeten.

Die 12 in der 18 S rDNA-PCR positiven Schnitte mit amplifizierbarer DNA wurden von Geweben angefertigt, die physiologischerweise häufig mit apathogenen Pilzen besiedelt sein können (Haut, Schleimhaut des Rektums und des Mund-Rachen-Raums). Es besteht daher die Möglichkeit, dass Kontaminationen mit Pilzen mit der 18 S rDNA-PCR detektiert wurden und zu einem Amplifikat in dieser PCR führten. Bei den anderen 6 Schnitten, die in der GAPDH-PCR negativ waren, konnte keine amplifizierbare DNA im Gewebe gewesen sein. Für diese Proben ist daher anzunehmen, dass bei der Verarbeitung der Gewebe eine Kontamination durch Pilze der Umgebung stattgefunden hat, mit denen die 18 S-PCR ebenfalls kreuzreagierte.

Kontrollen

Alle Leerwertproben, die bei der DNA-Extraktion und beim Ansetzen der PCR-Reaktionen mitgeführt wurden, blieben in beiden PCR-Methoden negativ. Eine hierbei möglicherweise entstandene Kontamination kann somit weitgehend ausgeschlossen werden.

Inhibitorkontrollen wurden für alle 80 in der 100 kDa-PCR und für die 56 in der 18 S rDNA-PCR negativen Schnitte durchgeführt. Diese Kontrollen mit positiver Zielsequenz in Form von Plasmid-DNA lieferten ausschließlich positive Ergebnisse, so dass inhibierende Substanzen als Ursache eines negativen PCR-Ergebnisses ausgeschlossen werden konnten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass mit beiden PCR-Methoden der Nachweis *Histoplasma capsulatum*-spezifischer DNA aus DNA-Extrakten von Formalin-fixierten humanen Gewebeproben gelingt. In dieser Studie wiesen beide Methoden die gleiche Sensitivität auf. Die Sequenzanalyse der Amplifikate der 18 S rDNA-PCR bestätigt noch einmal die im Mausmodell gewonnene Erkenntnis der geringen Spezifität dieser PCR. Nur durch eine zusätzliche Sequenzanalyse der Amplifikate kann die Spezifität geklärt werden. Im Gegensatz hierzu wurden mit der neuen 100 kDa-PCR keine falsch positiven Ergebnisse gewonnen.

4 Diskussion

4.1 Nachweis von *H. capsulatum* spezifischer DNA im Blut infizierter Mäuse

Die Anwendung der 18 S rDNA-PCR in diesem Tiermodell zeigt erstmalig den spezifischen Nachweis von *Histoplasma capsulatum* DNA im Blut infizierter Mäuse. Die Arbeit ergänzt damit Ergebnisse, die in einem anderen Tiermodell bei der Untersuchung von Organhomogenaten immunkompetenter ICR-Mäusen (Bialek et al. 2001) erhoben wurden. Bei diesen Versuchstieren war der spezifische Nachweis von *H. capsulatum* DNA aus Lungen- und Milzgewebe mittels 18 S rDNA-PCR gelungen. Dabei konnten Bialek *et al.* zeigen, dass die nested PCR im Vergleich zur Kulturmethode den Vorteil einer 3-17fach höheren Sensitivität besitzt. Die Kulturen der Blutproben dieser ICR-Mäuse waren alle steril geblieben, und bei keinem Tier gelang der Nachweis von *H. capsulatum*-spezifischer DNA aus dem Blut. Die Mäuse waren jedoch im Gegensatz zu den Tieren dieser Arbeit auch nur mit 8000 CFU *H. capsulatum* i.v. infiziert worden.

Obwohl die Untersuchung der Organhomogenate eine höhere Sensitivität der PCR-Methode im Vergleich zur Kultur ergab, wurde in dieser Studie aus 21 Blutproben trotz positivem Kulturergebnis keine spezifische DNA amplifiziert. Da jedoch 100 µl Blut pro Kulturansatz eingesetzt wurden, aber nur 1/10 des aus 100 µl Blut gewonnenen DNA-Extraktes, sind Kultur- und PCR-Ergebnisse nur bedingt vergleichbar. Die Zahl der angezüchteten CFU lag in diesen 21 Fällen mit negativen PCR-Ergebnis zwischen 0-7 pro 100 µl Blut. Diese Konzentrationen liegen unter bzw. am beschriebenen Detektionslimit der Methode von etwa 5 Zellen *H. capsulatum* im Extraktionsvolumen (Bialek et al. 2001). Auch Reid und Schäfer (1999) beschrieben bei der Untersuchung von Bodenproben mit einer nested PCR-Methode ein vergleichbares Detektionslimit von 10 Zellen *H. capsulatum*.

Bei zwei Proben war die Anzucht des Pilzes in Kultur nicht gelungen, obwohl mit der PCR *H. capsulatum*-spezifische DNA nachgewiesen werden konnte. Ursache dafür könnte die Anwesenheit nicht mehr vermehrungsfähiger, bereits geschädigter Pilzzellen in der Probe sein. Aber trotz der hohen Sensitivität dieser PCR-Methode wird weder

nach Spontanheilung noch nach erfolgreicher Therapie frei zirkulierende *H. capsulatum*-DNA im Blut detektiert. Es kann also davon ausgegangen werden, dass der Nachweis spezifischer *H. capsulatum*-DNA ausschließlich bei Anwesenheit vitaler Pilzzellen in den Blutproben gelingt.

Es fällt auf, dass am ersten Tag nach der Infektion bei allen immunkompetenten Tieren *H. capsulatum*-spezifische DNA aus den Blutproben nachgewiesen werden kann, jedoch bei keinem immundefizienten Tier. Die immundefizienten Tiere wurden zwar mit einer niedrigeren Infektionsdosis von nur $2,4 \times 10^6$ CFU infiziert, aber auch immunkompetente Mäuse mit dieser niedrigeren Infektionsdosis weisen spezifische DNA auf. Vorstellbar ist, dass *H. capsulatum* bei den immunkompetenten Tieren frühzeitig nach der intravenösen Infektion von Abwehrzellen (v.a. Monozyten) phagozytiert wird und daher mittels PCR spezifische DNA aus Blutextrakten nachweisbar ist. Bei den immundefizienten Tieren hingegen wird der Pilz vermutlich aufgrund des zellulären Immundefekts kaum phagozytiert und wandert in die Organe, wie z.B. Lunge und Milz. Da er auch vom Makrophagen-Monozyten-System dieser Organe nicht erfolgreich bekämpft werden kann, könnte es nach einer Vermehrung in den Organen zu einem Anstieg der Pilzzellkonzentration im Blut kommen, was den Nachweis spezifischer DNA und die Anzucht des Erregers ermöglicht. Diese unkontrollierte Vermehrung ist auch am ehesten für den frühzeitigen Tod von 4 der 6 unbehandelten immundefizienten Mäuse verantwortlich. Die entnommenen Organe dieser Tiere waren durchsetzt von Pilzgranulomen.

Die immunkompetenten Mäuse können die *H. capsulatum*-Infektion erfolgreich bekämpfen und den Erreger vollständig eliminieren. Entsprechend werden die Blutkulturen steril und der PCR-Nachweis negativ. Im Gegensatz dazu ist bei den immundefizienten Tieren trotz Amphotericin B-Therapie von einer Persistenz des Pilzes auszugehen. Auf den Menschen übertragen verdeutlicht dieses Tiermodell damit die Notwendigkeit einer Sekundärprophylaxe nach klinischer Remission einer disseminierten Histoplasmose bei immundefizienten Patienten. Diese Prophylaxe sollte mindestens bis zu einer CD₄-Zellkonzentration von mehr als 300/ μ l oder lebenslang durchgeführt werden.

Der Verlauf der tierexperimentellen Histoplasmose kann mittels PCR verfolgt werden. Sie beschreibt dabei nicht nur den natürlichen Verlauf der Erkrankung, sondern zeigt auch den Einfluss einer Amphotericin B-Therapie. Bei Medikamententestungen im Tiermodell könnte daher die Kultur durch die PCR ersetzt werden, was eine deutliche Reduktion des Infektionsrisikos des Laborpersonals bedeuten würde.

4.2 Evaluation der 18 S rDNA- und 100 kDa-PCR zum Nachweis von *Histoplasma capsulatum* in humanen Gewebeproben

Der spezifische Nachweis von *Histoplasma capsulatum*-DNA aus Extrakten von Formalin-fixierten humanen Gewebeproben gelang in dieser Arbeit mit beiden PCR-Methoden, die eine identische Sensitivität aufwiesen. Mit der neuen 100 kDa-PCR wurde jedoch im Gegensatz zur 18 S rDNA-PCR kein falsch-positives Ergebnis erzielt. Das beweist die hohe Spezifität der neuen nested PCR bei vergleichbarer Sensitivität. Damit gelang die Entwicklung einer nested-PCR-Methode, bei der das im Gel nachgewiesene Amplifikat nicht durch eine zusätzliche Sequenzierung identifiziert werden muß.

Bei der Entwicklung der nested 18 S rDNA-PCR wurde die Zielregion der Primer im 18 S ribosomalen Gen gewählt. Da dieses Gen in Form mehrerer Kopien im Pilzgenom vorliegt, wird von einer höheren Sensitivität dieser PCR ausgegangen. Dies wäre besonders dann von Vorteil, wenn nur wenige Pilzzellen in der Probe vorhanden sind. Bei der Untersuchung der Paraffinschnitte mit der 18 S rDNA-PCR konnte diese höhere Sensitivität jedoch nicht belegt werden. Nachteil dieser hoch konservierten Zielregion innerhalb der 18 S rDNA ist die Kreuzreaktion der Primer mit der DNA anderer Schimmelpilze. So ist es trotz relativ stringenter Reaktionsbedingungen, die durch eine hohe Primer-Bindungstemperatur von 72 °C in der nested PCR gewährleistet sind, bei 24 Proben zur Amplifikation von DNA gekommen, die jedoch nicht als *H. capsulatum*-spezifisch identifiziert wurde. Da Schimmelpilze ubiquitär vorhanden sind, wird der Einsatz dieser PCR in der klinischen Diagnostik immer eine Sequenzierung erforderlich machen, um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen. Ähnliche Erfahrungen wurden bereits bei der Parakokzidioidomykose und der Blastomykose gemacht (Bialek et al. 2000a und 2003). Da diese Methode aber DNA auch verwandter humanpathogener

Pilze detektieren kann, wird sie als Screeningmethode zum Nachweis der DNA dimorpher Pilze der Familie Onygenaceae eingesetzt (Bialek et al. 2000b).

Zum Nachweis von *H. capsulatum*-spezifischer DNA wurde eine weitere PCR entwickelt. Den Erfahrungen bei der Parakokzidioidomykose folgend (Bialek et al. 2000a) wurde hierfür ein Gen von *H. capsulatum* als Zielsequenz gesucht, das für ein spezifisches Protein kodiert und bisher bei keiner anderen Pilzspezies nachgewiesen wurde. Porta et al. beschrieben 1999 ein Gen, das ca. 1 Stunde nach der Phagozytose durch murine Makrophagen von den *H. capsulatum*-Hefezellen exprimiert wird. Über die Funktion dieses Proteins, das als homolog zum menschlichen 100 kDa-Proteins gilt, ist bisher nur wenig bekannt. Es scheint aber für das intrazelluläre Überleben der Pilzzellen von Bedeutung zu sein.

Die Gewebeproben dieser Arbeit waren einer Formalinfixierung ausgesetzt, jedoch liegen weder detaillierte Angaben bezüglich der Fixationsdauer noch zur Formalinlösung vor. Mehrere Arbeiten beschreiben die negativen Auswirkungen einer Formalinfixierung auf DNA (Ben-Ezra et al. 1991 und Ohara et al. 1992). Es kommt zu einer Quervernetzung der DNA mit Zellproteinen, was bei langer Dauer zu irreversiblen Schädigungen an der DNA führt. Eine Amplifikation wird dann unmöglich. Solche Schädigungen werden für die negativen Ergebnisse der sensitiven nested GAPDH-PCR bei 38 % der Proben verantwortlich gemacht.

In 9 Gewebeproben, in denen *H. capsulatum* mikroskopisch nachgewiesen wurde, konnte trotz positiver GAPDH-PCR keine spezifische Pilz-DNA amplifiziert werden. Da das funktionelle Gen der GAPDH in humanen Zellen in Form mehrerer Kopien vorliegt (pro Zelle bis zu 70 Kopien), muss diese PCR im Vergleich zur Pilz-PCR eine höhere Sensitivität haben (Ercolani et al. 1988). Zudem ist die Zahl der menschlichen Zellen pro Gewebeschnitt wesentlich höher als die Anzahl der Pilzzellen. Die erfolgreiche Amplifikation des GAPDH-Gens ist daher ungleich sensitiver als der Nachweis des spezifischen *Histoplasma capsulatum*-Gens. Eine weitere Erklärung für diese negativen Befunde, könnte die inhomogene Verteilung von Pilzzellen sein. Der positive mikroskopische Nachweis in einigen Gewebeschnitten kann nicht die Anwesenheit des

Erregers im gesamten Gewebeblock beweisen. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass die histologische Diagnose unzutreffend ist, d.h. dass die mittels Pilzfärbung nachgewiesenen Hefezellen nicht zur Gattung *Histoplasma* gehören. Zusammen mit den entsprechenden Gewebeveränderungen ist die Diagnose einer Histoplasmose zwar sehr wahrscheinlich, sie wurde aber in keinem Fall durch Erregeranzucht und Identifizierung bestätigt.

Bei den 50 *Histoplasma*-positiven Gewebeproben dieser Arbeit handelte es sich ausschließlich um Fälle von so genannter Amerikanischer Histoplasmose. Die durch *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* verursachte Erkrankung, wurde in Zimbabwe zum ersten Mal 1997 nachgewiesen (Coutts et al. 1997). Die Afrikanische Histoplasmose ist in West- und Zentralafrika endemisch und wird von *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* hervorgerufen. Entsprechend den veröffentlichten Sequenzen der GenBank ist die 18 S rDNA beider Varietäten dieser Pilzart identisch, folglich müsste die 18 S rDNA-PCR die DNA von beiden amplifizieren. Ob das Gen des 100 kDa-Proteins im Genom von *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* oder in dem eines anderen dimorphen Pilzes vorkommt, ist bisher nicht bekannt. Offensichtlich ist das 100 kDa Gen in Fällen der Amerikanischen Histoplasmose in Afrika jedoch weit verbreitet und alle 210 bp langen PCR-Amplifikate zeigten eine Übereinstimmung mit der Sequenz der GenBank.

Die bisherige Standardmethode des kulturellen Ansatzes erlaubt erst nach Tagen, eventuell auch erst nach Wochen eine Aussage über das Vorliegen einer Histoplasmose. Mit der Entwicklung der 100 kDa-PCR wurde eine schnellere und dennoch spezifische und sensitive Methode erfolgreich etabliert. Sie könnte daher von großer Bedeutung für die Diagnostik der Histoplasmose beim Menschen sein. Zum einen kann beim Nachweis der Infektion innerhalb weniger Stunden eine spezifische Therapie begonnen werden, zum anderen könnte eine reaktivierte Histoplasmose bei bekannter Erst-erkrankung frühzeitig entdeckt werden. Weitere Studien anhand verschiedener Untersuchungsmaterialien sind aber erforderlich, um die Sensitivität dieser PCR in der Routinediagnostik zu bestimmen.

5 Zusammenfassung

Invasive Mykosen sind lebensbedrohliche Erkrankungen vor allem bei Patienten mit Defekten des zellulären Immunsystems. Auch bei der Histoplasmose, verursacht durch den dimorphen Pilz *Histoplasma capsulatum*, ist ein disseminierter Befall nach Inhalation der Erreger bei Immungeschwächten möglich. Nur die frühzeitige Diagnostik einer Histoplasmose bietet die Möglichkeit einer rechtzeitigen antimykotischen Therapie. Diagnostische Methoden sollten sensitiv und spezifisch und möglichst innerhalb eines Arbeitstages durchführbar sein. Sowohl Verfahren zum Direktnachweis wie die kulturelle Anzucht der Pilzzellen oder die mikroskopische Identifizierung in Patientenmaterial als auch serologische Methoden mit Antikörper- und Antigen-Nachweis erfüllen diese Anforderungen jedoch nur teilweise.

Bereits 2001 war von Bialek et al. eine 18 S DNA-PCR-Methode zum Nachweis von *Histoplasma capsulatum*-spezifischer DNA im Tiermodell aufgebaut worden. In der vorliegenden Arbeit zeigten ergänzende Untersuchungen, dass der Nachweis der Pilz-DNA auch im Blut infizierter Mäuse möglich ist. Dabei stellte sich jedoch heraus, dass es aufgrund der hoch konservierten Zielregion innerhalb der 18 S rDNA häufig zu einer Kreuzreaktion der Primer kommt. Wir entwickelten daher eine neue PCR mit Zielregion in einem Gen, das für ein *Histoplasma capsulatum*-spezifisches Protein kodiert und evaluierten erstmals beide Methoden an menschlichem Untersuchungsmaterial. Die Ergebnisse der Untersuchung von 100 Formalin-fixierten humanen Gewebeproben aus unterschiedlichen Organen zeigten, dass mit beiden PCR-Methoden der Nachweis von *Histoplasma capsulatum*-spezifischer DNA gelingt und beide die gleiche Sensitivität besitzen. Die Sequenzanalyse der Amplifikate bewies jedoch, dass mit der neuen 100 kDa-PCR im Gegensatz zur 18 S r DNA-PCR kein falsch positives Ergebnis erzielt wurde. Mit dieser neuen nested-PCR Methode gelang somit die Entwicklung einer schnellen und dennoch spezifischen und sensitiven Methode, die für die Diagnostik der Histoplasmose von großer Bedeutung sein könnte.

Veröffentlichungen der eigenen Daten

1. Bialek, R., Fischer, J., Feucht, A., Najvar, L.K. et al. (2001). Diagnosis and monitoring of murine histoplasmosis by a nested PCR assay. *J. Clin. Microbiology* 39: 1506-1509
2. Bialek, R., Feucht, A., Aepinus, C., Just-Nübling, G. et al. (2002). Evaluation of two nested PCR Assays for Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in Human Tissue. *J. Clin. Microbiology* 40: 1644-1647

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

bp	Basenpaare
CFU	<i>colony forming units</i> , Kolonie-bildende Einheiten
DNA	Desoxynukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ethanol _{abs}	Ethanol, absolut
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
kD	Kilodalton
LB/Amp	Luria-Bertani/Ampicillin-haltig
Min.	Minute
nd	nicht durchgeführt
nude	nackt
dNTP	desoxyNukleosidtriphosphate
ddNTP	didesoxyNukleosidtriphosphate
OD _x	Optische Dichte bei x nm
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RCLB	<i>red cell lysis buffer</i> , Puffer zur Erythrozytenlyse
RT	Raumtemperatur (~ 25°C)
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sek.	Sekunden
18 S rDNA	18 S ribosomale-DNA
TEMED	Tetramethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
T _m	<i>melting temperature</i> , Schmelzpunkt
U	<i>Units</i> , Enzymeinheiten
w/v	<i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen
var	varietas

6.2 Tabellen

Tabelle 6.1 PCR- und Kulturergebnisse von Blutproben der fünf mit *H. capsulatum* infizierten Mausgruppen an den Tagen 1 und 15 nach Infektion.

Tier	Tag 1				Tag 15				
	CFU	18S-PCR	Inhib.	Aktin	CFU	18S-PCR	Inhib.	Aktin	
Untergruppe 1 (nu/+) Kontrolle ID 2,5x10 ⁷ CFU	A	5	+	nd	+	1	+	nd	+
	B	1	+	nd	+	1	(+)	+	+
	C	0	+	nd	+	17	+	nd	nd
	D	3	+	nd	+	1	+	nd	nd
	E	3	+	nd	nd	0	(+)	+	+
	F	2	+	nd	+	2	+	nd	nd
Untergruppe 2 (nu/+) Amphotericin B ID 2,5x10 ⁷ CFU	A	10	+	nd	nd	0	-	+	+
	B	0	+	nd	nd	0	-	+	+
	C	14	+	nd	nd	0	-	+	+
	D	1	+	nd	nd	0	-	+	+
	E	8	+	nd	nd	0	-	+	+
	F	5	+	nd	nd	0	-	+	+
Untergruppe 3 (nu/nu) Kontrolle ID 2,4x10 ⁶ CFU	A	kont.	-	+	+	3	+	nd	+
	B	1	-	+	+	6	-	+	+
	C	0	-	+	+	6	+	nd	+
	D	0	Ø DNA	nd	nd	kont.	+	nd	nd
	E	0	-	+	+	5	-	+	+
	F	3	-	+	+	>1000	+	nd	nd
Untergruppe 4 (nu/nu) Amphotericin B ID 2,4x10 ⁶ CFU	A	3	-	+	+	0	-	+	+
	B	4	-	+	+	0	-	+	+
	C	3	-	+	+	0	-	+	+
	D	3	-	+	+	2	-	+	+
	E	2	Ø DNA	nd	nd	7	-	+	+
	F	0	-	+	+	1	-	+	+
Untergruppe 5 (nu/+) Kontrolle ID 2,4x10 ⁶ CFU	A	1	+	nd	+	0	Ø DNA	nd	nd
	B	1	+	nd	+	0	-	+	+
	C	0	(+)	+	+	0	-	+	+
	D	2	-	+	+	0	-	+	+
	E	0	(+)	+	+	0	-	+	+
	F	0	-	+	+	0	-	+	+

Legende der Tabellen 6.1 und 6.2

+ = positiv (+) = Amplifikatnachweis, Sequenzanalyse ergab andere Pilzspezies

- = negativ

Aktin = Maus Aktin-PCR (Kontrolle)

>1000 = Anzahl der gewachsenen CFU nicht auszählbar

CFU = Kolonie-bildende Einheiten (*colony forming units*) von *H. capsulatum* / 100 µl Blut

Tabelle 6.2 PCR- und Kulturergebnisse von Blutproben der fünf mit *H. capsulatum* infizierten Mausgruppen an den Tagen 22 und 29 nach Infektion.

Tier	Tag 22				Tag 29				
	CFU	18S-PCR	Inhib.	Aktin	CFU	18S-PCR	Inhib.	Aktin	
Untergruppe 1 (nu/+) Kontrolle ID 2,5x10 ⁷ CFU	A	0	–	+	+	0	–	+	+
	B	0	–	+	+	0	–	+	+
	C	0	–	+	+	0	(+)	+	+
	D	0	–	+	+	0	–	+	+
	E	0	–	+	+	0	–	+	+
	F	0	–	+	+	0	–	+	+
Untergruppe 2 (nu/+) Amphotericin B ID 2,5x10 ⁷ CFU	A	0	–	+	+	kont.	–	+	+
	B	0	–	+	+	kont.	–	+	+
	C	0	–	+	+	0	–	+	+
	D	0	–	+	+	0	–	+	+
	E	0	–	+	+	0	–	+	+
	F	0	–	+	+	0	–	+	+
Untergruppe 3 (nu/nu) Kontrolle ID 2,4x10 ⁶ CFU	A	>1000	+	nd	+	>1000	+	+	+
	B	>1000	+	nd	+	>1000	+	+	+
	C	>1000	+	nd	nd	†	nd	nd	nd
	D	26	+	nd	+	†	nd	nd	nd
	E	>1000	+	nd	+	†	nd	nd	nd
	F	15	–	+	+	†	nd	nd	nd
Untergruppe 4 (nu/nu) Amphotericin B ID 2,4x10 ⁶ CFU	A	0	–	+	+	0	–	+	+
	B	1	–	+	+	0	(+)	+	+
	C	3	–	+	+	2	–	+	+
	D	4	–	+	+	0	–	+	+
	E	1	–	+	+	2	(+)	+	+
	F	0	–	+	+	5	(+)	+	+
Untergruppe 5 (nu/+) Kontrolle ID 2,4x10 ⁶ CFU	A	0	–	+	+	0	–	+	+
	B	0	–	+	+	0	–	+	+
	C	0	–	+	+	0	–	+	+
	D	0	–	+	+	0	–	+	+
	E	0	–	+	+	0	–	+	+
	F	0	–	+	+	†	nd	nd	nd

Legende der Tabellen 6.1 und 6.2

ID = Infektionsdosis

Inhib. = Inhibitorkontrolle der 18 S-PCR

kont. = Kultur wegen Kontamination mit anderen Mikroorganismen nicht auswertbar

Ø DNA = keine DNA extrahierbar

nd = nicht durchgeführt

† = Tiere sind vor geplanter Untersuchung verstorben

7 Literatur

Al-Abdely H. and Graybill, J.R. Histoplasmosis, Blastomycosis, Coccidioidomycosis, and Cryptococcosis. In: Tropical Infectious Diseases, Vol 1: 626-636. Churchill Livingstone Press, Philadelphia 1999

Ben-Ezra, J., Johnson, D.A., Rossi, J., Cook, N., and Wu, A. (1991). Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J. Histochem. Cytochem.*, 39: 351-354

Bialek, R., Ibricevic, A., Aepinus, C., Najvar, L.K., Fothergill, A.W., Knobloch, J., and Graybill, J.R. (2000 a). Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 2940-2942

Bialek, R., Fischer, J., Feucht, A., Najvar, L.K., Dietz, K., Knobloch, J., and Graybill, J.R. (2001). Diagnosis and monitoring of murine histoplasmosis by a nested PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 1506-1509

Bialek, R., Feucht, A., Aepinus, C., Just-Nübling, G., Robertson, V.J., Knobloch, J., and Hohle, R. (2002 b). Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in Human Tissue. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 1644-1647

Bialek, R., Cascante Cirera, A., Herrmann, T., Aepinus, C., Shearn-Bochsler, V.I., and Legendre, A.M. (2003). Nested PCR assays for detection of Blastomyces dermatitidis DNA in paraffin-embedded canine tissue. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 205-208

Bradsher, R.W. (1996). Histoplasmosis and Blastomycosis. *Clin. Infect. Dis.*, 22: 102-111

Bodey, G.P. and Rolston, K. Deep fungal infections. In: Infectious Diseases, Vol.1, Chapter 7. Mosby Press, London, 1999

Chaturvedi, S., Frame, P., and Newman, S.L. (1995). Macrophages from human immunodeficiency virus-positive persons are defective in host defense against *Histoplasma capsulatum*. *J. Infect. Dis.*, 171: 320-327

Conces, D.J. (1996). Histoplasmosis. *Semin. Roentgenol.*, 31: 14-27

Coutts, A.M., Robertson, V.J., Musvaire, P., Douie, C., and Matenga (1997). Dual infection with *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* in human immunodeficiency virus infection. *Centr. Afr. J. Med.*, 43: 88-89

Darling, S.T. (1906). A protozoal general infection producing pseudotubercles in the lung and focal necroses in the liver, spleen and lymphnodes. *J. Am. Med. Assoc.*, 46: 1283-1285

- Darling, S.T.** (1908). Histoplasmosis: A fatal infectious disease resembling kala-azar found among natives of the tropical America. *Arch. Intern. Med.*, 2: 107
- Deepe, G.S.** *Histoplasma capsulatum*. In: Principles and Practice of Infectious Diseases, Vol. 2: 2718-2733 (5th edition). Churchill Press, New York 1998
- Ercolani, L., Florence, B., Denaro, M., and Alexander, M.** (1988). Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *J. Biol. Chem.*, 163: 15335-15341
- Gugnani, H.C., Muotoe-Okafor, F.A., Kaufman, L., and Dupont, B.** (1994). A natural focus of *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* is a bat cave. *Mycopathologia*, 127: 151-157
- Makimura, K., Murayama, S.Y., and Yamaguchi, H.** (1994). Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. *J. Med. Microbiol.*, 40: 358-364
- Minamoto, G.Y., and Rosenberg, A.S.** (1997). Fungal infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Med. Clin. North Am.*, 81:381-409
- Ohara, Y., Honma, M., and Iwasaki, Y.** (1992). Sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting human T-cell leukemia virus type I sequences in paraffin-embedded tissue. Effect of unbuffered formalin fixation. *J. Virol. Methods*, 37: 83-88
- Porta, A., Colonna-Romano, S., Callebaut, I., Franco, A., Marzullo, L., Kobayashi, G.S., and Maresca, B.** (1999). An homologue of the 100-kDa protein (p100) is differentially expressed by *Histoplasma capsulatum* during infection of murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 254: 605-613
- Reid, T.M., and Schafer, M.P.** (1999). Direct detection of *Histoplasma capsulatum* in soil suspensions by two stage PCR. *Mol. Cell. Probes*, 13: 269-273
- Rocha-Lima da, H.** (1912). Histoplasmosse und epizootische Lymphangitis. *Arch. Schiffs. Tropenhyg.*, 16: 79-85
- Rocha-Lima da, H.** (1912-13). Beitrag zur Kenntnis der Blastomykosen- Lymphangitis epizootica und Histoplasmosis. *Zentralbl. Bakteriol.*, 67: 233-49
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich H.A., and Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** *Molecular Cloning, a Laboratory Manual* (2nd edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467

Watterson, B. (1996). There's treasure everywhere. A Calvin & Hobbes Collection. Universal Press Syndicate Company, Kansas City

Wheat, L.J. Histoplasmosis. In: Infectious Diseases, 50: 508-514. Lippincott Company, Philadelphia 1994

Wheat, L.J., Kohler, R.B. and Tewari, R.P. (1986). Diagnosis of disseminated histoplasmosis by detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in serum and urine specimens. N. Eng. J. Med., 314: 83-88

Wheat, L.J., Sarosi, G., McKinsey, D., Hamill, R., Bradsher, R., Johnson, P., Loyd, J., and Kaufmann, C. (2000). Practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis. Clin. Infect. Dis., 30: 688-695

Williams, A.O., Lawson, E.A., and Lucas, A.O. (1971). African histoplasmosis due to *Histoplasma duboisii*. Arch. Path., 92: 306-318

Williams, B., Fojtasek, M., Connolly-Stringfield, P. and Wheat, J. (1994). Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection during an outbreak in Indianapolis. Arch. Pathol. Lab. Med., 118: 1205-1208

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. med. Jürgen Knobloch, der es mir ermöglichte, auf dem spannenden Gebiet der Tropenmedizin zu promovieren,

Privatdozent Dr. med. Ralf Bialek, der mir als Wissenschaftler und Mediziner gleichermaßen ein Vorbild ist, für die hervorragende Betreuung und ausdauernde Korrektur dieser Arbeit,

Dr. rer. nat. Oliver Schneider, Dipl. Biol. Walter Deschle und Dr. med. Ann-Cathrin Uhlemann für ihre wertvolle und prompte Hilfe und die vielen gemeinsamen Stunden,

unserer bzw. der Arbeitsgruppe von Dr. rer. nat. Ulrike Zelck für eine sehr gute Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft in vielen praktischen Fragen des Laboralltags,

Dr. med. Dipl.-Phys. Jens Reinhard für die unschätzbare Hilfe in Sachen Software,

meinen Eltern, ohne deren beständige Unterstützung und wohlwollende Hilfe kein zweites Studium möglich gewesen wäre,

und vor allem Marc, für seine geduldige und liebevolle Begleitung bei der Entstehung meines Zwei-Buchstabenprojekts und die stetige Erinnerung an das Leben neben der Medizin.



Lebenslauf

23. Juli 1971 geboren in Stuttgart
1978 - 1991 Schulzeit in Ditzingen,
Abitur am Gymnasium Glemsau im Juli 1991

Studium

10/91 - 11/97 Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen, Abschluss Diplom
10/1993 Vordiplom
08/94 - 07/95 Auslandsstudium an der Universität von Miami, Florida, mit
wissenschaftlicher Labortätigkeit bei R.P. Bunge, MD. und
C. Fernandez-Valle, Ph.D., The Miami Project, School of
Medicine
12/96 - 11/97 Diplomarbeit am Max Planck Institut bei Prof. Dr. F. Bonhoeffer
mit dem Thema: Expressionsanalyse zweier
Transkriptionsfaktoren in der embryonalen Hühnchenretina
04/96 - 11/02 Studium der Medizin an der Universität Tübingen
Ärztliche Vorprüfung: 23.03.1998
Erstes Staatsexamen: 23.03.1999
Zweites Staatsexamen: 19.09.2001
05/99 - 04/04 Dissertation am Institut für Tropenmedizin bei Prof. Dr. med.
J. Knobloch mit dem Thema: Nachweis von Histoplasma
capsulatum-DNA in Blutproben von Mäusen und humanen
Gewebeproben mittels PCR-Verfahren
10/01 - 09/02 Praktisches Jahr am Marienhospital Stuttgart:
22.10.01-10.02.02 im Fach Neurologie
11.02.02-31.05.02 im Fach Chirurgie, teils in Melbourne,
Australien
01.06.02-22.09.02 im Fach Innere Medizin, Luzern, Schweiz
6.11.2002 Abschluss des Medizinstudiums mit dem 3. Abschnitt der Ärztlichen
Prüfung, Marienhospital Stuttgart

Beruf

seit 1.02.2003 Ärztin an der Klinik für Innere Medizin bei Prof. Dr. med. B. Braun,
Kreiskrankenhaus Reutlingen

