

Aus dem Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. J. Knobloch

**Aufbau eines PCR-verlaufskontrollierten
Mausmodells zur Zygomycose**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard -Karls -Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Nadine Désirée Schmidt-Rüdt

aus

Sindelfingen

2009

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. R. Bialek

2. Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. U. Schumacher

Meinen Eltern

Inhalt

1 Einleitung.....	1
1.1 Die Zygomycose.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Übertragung.....	2
1.1.3 Pathogenese und Risikofaktoren.....	2
1.1.4 Klinik.....	5
1.1.5 Prognose.....	6
1.1.6 Diagnostik.....	7
1.1.7 Therapie.....	10
1.2 Tiermodelle zur Zygomycose.....	12
1.2.1 Grundlagen.....	12
1.2.1.1 Modell-Erstellung.....	12
1.2.1.2 Auswertung.....	13
1.3 Ziele der Arbeit.....	13
2 Material.....	15
3 Methoden.....	21
3.1 Das Tiermodell.....	21
3.2 Probengewinnung.....	25
3.3 Untersuchungsmethoden.....	28
3.3.1 Histologie.....	28
3.3.2 Kultur.....	29
3.3.3 PCR.....	29
3.3.3.1 DNA-Extraktion aus Biopsaten.....	29
3.3.3.2 Konventionelle Polymerasekettenreaktion.....	32
3.3.3.3 Nachweis erfolgreicher DNA-Extraktion.....	35
3.3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	39
3.3.3.5 Sequenzierung der PCR-Produkte.....	40
3.3.3.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	42

3.3.4 LightCycler-PCR.....	43
3.3.5 Statistische Methoden.....	46
3.3.5.1 Lineare Regression.....	46
3.3.5.2 Rsquare.....	46
3.3.5.3 Rsquare adjusted.....	46
3.3.5.4 Maximum-likelihood-Methode.....	46
3.3.5.5 Odds-Ratio.....	49
4 Ergebnisse.....	51
4.1 Das Tiermodell.....	51
4.1.1 Überlebensbeobachtung.....	51
4.1.2 Modell.....	53
4.1.3 Fazit	56
4.2 Untersuchungsmethoden.....	56
4.2.1 Histologie.....	56
4.2.2 Kultur.....	61
4.2.3 PCR.....	64
4.2.3.1 Etabliertes Standardverfahren.....	65
4.2.3.2 Auswertung nach erster PCR.....	66
4.2.3.3 PCR-ZM1-ZM3.....	67
4.2.3.4 Aktin-PCR.....	70
4.2.3.5 Sequenzierung.....	71
4.2.3.6 Kontrollen.....	71
4.2.4 LightCycler-PCR.....	72
4.2.5 Fazit.....	75
4.3 Vergleich der Methoden.....	76
4.3.1 Spezifität.....	78
4.3.2 Sensitivität.....	78
4.3.3 Fazit	83
5 Diskussion.....	85
5.1 Erkenntnisse aus der Arbeit.....	85
5.1.1 Das Tiermodell.....	85

5.1.2 Diagnostik.....	87
5.1.3 Methodenvergleich.....	90
5.2 Abweichungen von Standards.....	92
5.2.1 Geeignetes PCR-Verfahren.....	92
5.2.2 Aktin-Negative Proben.....	92
5.2.3 Sequenzierung der PCR-Amplifikate.....	93
5.3 Zielerfüllung.....	94
5.4 Fazit.....	95
6 Zusammenfassung.....	97
7 Anhang	101
7.1 Abkürzungen.....	101
8 Literaturverzeichnis.....	103
9 Danksagung.....	109

1 Einleitung

1.1 Die Zygomycose

Zygomyzeten sind Schimmelpilze, die beim Menschen eine Vielzahl von Erkrankungen verursachen können. In Publikationen aus dem 19. Jahrhundert wurden sie erstmals als Verursacher der Zygomycose beschrieben [42]. Als Erreger von opportunistischen Infektionen haben sie in den letzten Jahrzehnten durch die steigende Zahl immunsupprimierter Patienten, den vermehrten Gebrauch von Chemotherapeutika und intensiveren Chemotherapien zunehmend an Bedeutung gewonnen [8].

1.1.1 Epidemiologie

Bei den Zygomyzeten handelt es sich um weltweit verbreitete, ubiquitär vorkommende Fadenpilze, die meist in verfaulendem Obst und Gemüse, Tierfezes und altem Brot, sowie im Boden zu finden sind [1][18][21][42].

Als Krankheitserreger der Zygomycose beim Menschen wird zumeist der Erreger *Rhizopus arrhizus* gefunden [18][42]. Die Klasse der Zygomyzeten gehört zum Stamm der Zygomycota und wird in die Ordnungen der Mucorales und der Entomophthorales eingeteilt, siehe Tabelle 1.

Tabelle 1: Taxonomie des *Rhizopus arrhizus*

	Name
Organismenreich	Myceteas (Syn. Fungi, Mycobionta)
Stamm	Zygomycota
Klasse	Zygomyzeten
Ordnung	Mucorales
Familie	Mucoraceae
Gattung	Rhizopus
Art	Rhizopus arrhizus

1.1.2 Übertragung

Bei der asexuellen Fortpflanzung bilden Zygomyceten eine Großzahl an Sporangiosporen in sackähnlichen Strukturen. Diese können leicht über die Luft verbreitet und über die Inhalation in Sinus und Lunge, durch Aufnahme mit der Nahrung oder perkutan durch kleinere Verletzungen bis zu großflächigen Verbrennungen in den menschlichen Organismus gelangen [42].

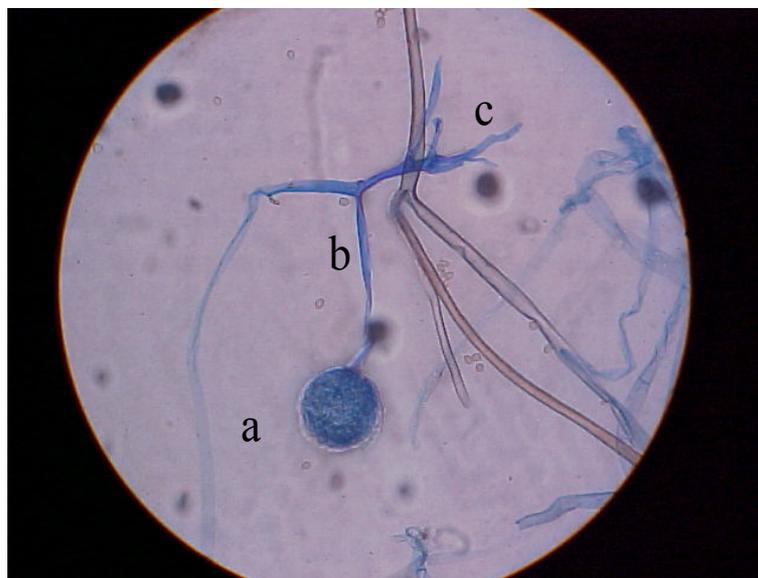


Abbildung 1: Lichtmikroskopisches Bild von Schimmelpilzen der Art *Rhizopus arrhizus*, a: Sporangium gefüllt mit Sporangiosporen, b: Sporangiophore, c: Rhizoid, (Originalvergrößerung 1:200, Lacto-Phenol-Blau-Färbung).

1.1.3 Pathogenese und Risikofaktoren

Beim Gesunden stellen Zygomycosen, wenn die Pilze nicht durch Verletzungen in die Haut inokuliert werden, eine Rarität dar. Wodurch das Wachstum der Hyphen letztendlich ausgelöst wird, ist unbekannt. Kommt es zur Germination der Sporen im Organismus, beginnt der Schimmelpilz mit der Bildung von Hyphen, wodurch er wächst. Die Ausbildung eines Mycels zeigt den Beginn einer inva-

siv wachsenden Mykose an, die sich sehr rasch in die umliegenden Regionen ausbreiten kann. Zygomyceten zeigen dabei eine hohe Affinität zur Invasion von Blutgefäßen [21]. Diese Invasion führt zu Thrombosierung, Infarzierung und Nekrosen des betroffenen Gewebes sowie zu hämatogener Disseminierung und septischer Thromboembolisation anderer Organe und Gewebe [21][42].

Es sind keine Initiatoren für die Erkrankung bekannt; doch es gibt einige Risikofaktoren, die sowohl die Infektion begünstigen als auch ihr klinisches Erscheinungsbild beeinflussen [18]:

Der Diabetes mellitus zeigt das höchste Risikopotential zur Entwicklung einer Zygomycose, besonders in Verbindung mit einer Ketoazidose [33][42]. Es wurde gezeigt, dass diabetische sowie mit Cortison behandelte Mäuse für eine Infektion mit inokulierten Sporen des *Rhizopus arrhizus* empfänglich waren, während nicht konditionierte Mäuse nicht erkrankten [21][42]. Eine Erklärung mag darin liegen, dass die Gattung der *Rhizopus* spp. ein Ketonkörper-Reduktasesystem besitzt, welches ihr Überleben in einem sauren und glukosereichen Milieu, wie etwa im Blut eines Patienten mit Diabetes mellitus in der Ketoazidose, ermöglicht, wohingegen ihr Wachstum in Serum von normal gesunden Individuen gehemmt wird [23]. Zudem ist *Rhizopus* spp. zum Wachstum und zur Bildung von Virulenzfaktoren auf Eisen angewiesen. Die Bildung von Siderophoren, die als eisenbindenden Liganden Hydroxamate besitzen, ermöglicht *Rhizopus* spp. ein Wachstum auch in eisenarmer Umgebung, welches bei hoher Eisenverfügbarkeit, wie im Blut von Diabetikern auf Grund von beeinträchtigter Transferrinbindung, zusätzlich stimuliert wird [9][10][25][49].

Außerdem scheint das Immunsystem eine entscheidende Rolle bei der Unterdrückung der Entstehung einer Mukormykose zu spielen:

Beim Immungesunden verhindern Monozyten/Makrophagen die Infektion durch Abtötung der Sporen durch Phagozytose [42]. Desweiteren können funktionstüchtige neutrophile Granulozyten mit Hilfe ihres oxidativen zytotoxischen Systems die Pilzhyphen zerstören, von denen sie über Chemotaxis angezogen werden.

Der Patient mit Diabetes mellitus besitzt ein beeinträchtigt Makrophagen-/Monozytensystem und aus dem Zustand einer Ketoazidose kann eine funktionelle Neutropenie resultieren [42].

Auch ein anderweitig geschwächtes Immunsystem konnte schon früh mit der Entstehung der Zygomycose in Verbindung gebracht werden. So wurden viele Erkrankungsfälle bei Patienten mit soliden Tumoren, Leukämien und Lymphomen beobachtet [42]. Hier konnte ebenfalls eine Verbindung zur Neutropenie, entstehend entweder durch Fortschreiten der Grunderkrankung oder deren Behandlung mit Chemotherapeutika, gezogen werden [12][42]. So stellt eine Neutropenie mit $<1000/\mu\text{l}$ für eine Woche das Hauptrisiko für eine Zygomycose bei Patienten mit Krebserkrankung dar [12]. Andererseits wurde die Erholung der neutrophilen Granulozyten ($>1000/\mu\text{l}$) als positiver Prognosefaktor für das Überleben solcher Patienten in einer univarianten Analyse herausgestellt [37]. Auch für Patienten mit chronischem oder akutem Steroidgebrauch ergab sich ein erhöhtes Risiko an einer Zygomycose zu erkranken [22][42]. Zu Grunde mag die Tatsache liegen, dass Cortison sowohl die normale inflammatorische Zellimmunantwort verhindert als auch einen diabetischen Zustand verursachen kann [33][42].

Der oben bereits erwähnte Eisenbedarf von Zygomyceten scheint auch wegweisend bei der Erklärung des erhöhten Risikos einer Erkrankung bei Dialysepatienten, die Feroxamine/Desferroxamine zur Behandlung einer Eisen- oder Aluminiumüberladung erhielten [9][10][42]. Es sind bereits mehrfach Fälle von Mukormykosen assoziiert mit Deferoxamintherapien beschrieben worden [10]. Es wird vermutet, dass die Feroxamine als Siderophoren fungieren, die den Pilzen das Eisen für Wachstum und Sporulation zur Verfügung stellen [55]. Bereits die Eisenüberladung an sich (d.h. auch ohne Feroxamingebrauch) scheint ein wichtiger Faktor bei der Pathogenese der Mukormykosen zu sein [31]. So wird bei der Hämochromatose und bei vermehrter Gabe von Erythrozytenkonzentraten ein erhöhtes Risiko verzeichnet [21][42].

Es zeigen auch andere Erkrankungen, die zu einer eingeschränkten Abwehrkraft führen, ein erhöhtes Risikopotential für die Entwicklung einer Zygomycose. Dazu gehören zum Beispiel: AIDS, intravenöser Drogenabusus, Unterernährung und Hyperthyreodismus [18][42]. Bei der Entstehungsgeschichte der Pilzinfektion könnten hier ebenfalls die bereits beschriebenen Mechanismen eine Rolle spielen.

1.1.4 Klinik

Mukormykosen sind das dritthäufigste Krankheitsbild invasiver Pilzinfektionen nach der Aspergillose und der Candida-Infektion [38]. Bei der durch sie verursachten Zygomycose wird am häufigsten die Gattung *Rhizopus* bzw. die Art *Rhizopus arrhizus* aus klinischen Materialien isoliert [15][18][32][42].

Beim Menschen kommen sinuidale/rhinozerebrale, pulmonale, kutane und subkutane, sowie gastrointestinale und disseminierte Infektionen mit Zygomyzeten vor [42][54].

Die rhinozerebrale Infektion ist die häufigste klinische Erscheinungsform der Zygomycose. Die Infektion entsteht in den Sinus und zeigt anfänglich die klinischen Symptome einer akuten Sinusitis. Von den Sinus ausgehend kann es zu einer raschen Ausbreitung der Infektion in umliegende Strukturen und Gewebe kommen [23]. Eine Ausdehnung in die Orbita mit Erblindung sowie über den Nervus opticus ins Gehirn mit vornehmlichem Befall der Frontallappen wird oft beobachtet [40]. Weitere zerebrale Komplikationen sind Sinus cavernosus- und Arteria carotis interna-Thrombosen [53].

Die pulmonale Infektion wird meist bei Patienten mit einer vorbestehenden Neutropenie beobachtet. Ausgehend von Bronchioli und Alveolen kann es von einer solitären nodulären Läsion bis hin zum Befall der gesamten Lunge mit dem Bild einer diffusen Pneumonie kommen [18][42][53]. Ähnlich wie bei der Aspergillose oder Pneumonien anderer Ätiologie treten uncharakteristische Symptome wie Husten, Fieber, Thoraxschmerzen, Dyspnoe und Haemoptysis

auf [21]. Eine Ausbreitung per continuitatum in das Mediastinum und das Herz ist möglich [16].

Die gastrointestinale Form wird bei Patienten mit Malnutrition beobachtet. Sie zeigt das Bild eines intraabdominalen Abszesses und wird meist erst bei der Autopsie diagnostiziert.

Bei der kutanen Form entstehen dermale Nekrosen, die bis auf den Muskel reichen können [42][53].

Die disseminierte Infektion der Zygomycose, ausgehend von jeglicher dieser Formen, über die hämatogene Streuung wird vor allem in Herz, Knochen, Nieren, Mediastinum, Trachea und Harnblase sowie im Gehirn beobachtet [42][53]

1.1.5 Prognose

Die Letalität der Zygomycose ist hoch, in einigen Studien wird sie mit bis zu 100% angegeben [27][35]. Sie wird maßgeblich von der Grundkrankheit der Patienten und der Ausprägungsform der Zygomycose bestimmt:

Bei einer Analyse von 179 Patienten mit rhinocerebraler Zygomycose betrug die Letalität 50%. Es überlebten 75% der behandelten Immungesunden, 60% der Patienten mit Diabetes mellitus, aber nur 20% der Patienten mit anderen systemischen Erkrankungen [7].

In einer weiteren retrospektiven Analyse von 208 Fällen rhinocerebraler Zygomycose seit 1970 wurden verspätete Diagnose und Behandlung, Hemiparese oder Hemiplegie bei den Betroffenen, beidseitiger Befall der Sinus, Leukämie, Nierenerkrankungen und vorausgegangene Deferoxaminbehandlungen als negative Prognosefaktoren beschrieben [59].

Die Überlebensrate von Patienten mit pulmonaler Zygomycose ist wesentlich schlechter, als bei der rhinocerebralen Infektion [18].

In einer retrospektiven Studie über 255 Fälle, mit Grunderkrankungen wie Leukämie oder Lymphomen (37%), Diabetes mellitus (32%), chronischem Nierenversagen (18%), vorausgegangenen Organtransplantationen (7,6%), oder

vorbestehenden bekannten soliden Tumoren (5,6%), betrug die Letalität insgesamt 80%, bei Patienten mit isolierter Lungenzygomycose 65% und 96% bei Erkrankten mit disseminierter Infektion [52].

1.1.6 Diagnostik

Eine möglichst frühzeitige Diagnose ist auf Grund eines möglichen schnellen Progresses der Erkrankung sehr wichtig.

Im Labor erfolgt diese durch den Nachweis des Pilzes aus klinischem Material. Dazu können Biopsien infizierten Gewebes, Sputum, verschiedene Exsudate und Abstriche herangezogen werden. Die histopathologische Diagnose der Zygomycose erfolgt über den Nachweis einzelner Hyphen. Ganze Mycele und Sporangiosporen werden selten in vivo gefunden [21]. Im Gewebe produziert *Rhizopus* spp. unterschiedlich weite (6–15µm) hyaline Hyphen, die nicht durch Septen unterbrochen werden und typischerweise keine parallelen Konturen zeigen. Eine unregelmäßige Verzweigung ist in weiten 45° bis 90° großen Winkeln zu beobachten [42][54]. Wenn überhaupt ist meist nur eine schwache Reaktion des umliegenden Gewebes in Form einer akuten eitrigen, fokal granulomatösen Entzündung zu beobachten [53].

In Sputum, Exsudaten und Abstrichen hingegen zeigen sich eher spärlich vorhandene dickwandige refraktile Hyphen mit Durchmessern von 6-15 µm, geschwollene Zellen (bis zu 50 µm) und frakturierte Hyphenbestandteile [53].

Mit verschiedenen Färbungen, wie der PAS-Färbung und der HE-Färbung, können die Hyphen zur besseren Identifizierung unter dem Lichtmikroskop eingefärbt werden [21].

Rhizopus-Kulturen wachsen sehr schnell und können eine Höhe von bis zu einem Zentimeter erreichen. Sie besitzen ein zuckerwatteartiges Aussehen und neigen dazu in sich selbst zu kollabieren [42][53]. Ihre Oberfläche geht von einer anfangs weißen Färbung mit der Zeit in eine graue bis gelbbraune Färbung über [53]. Die Zygomyceten wachsen bei 37°C gut auf den meisten in der Rou-

tine angewandten Pilzkulturmedien, vorausgesetzt sie enthalten keine Cycloheximide, da sie darauf sensitiv reagieren [21]. Allerdings ist bei der Probenbearbeitung für die Kultur von der üblichen mechanischen Homogenisation des klinischen Materials abzusehen. Es besteht die Gefahr, die empfindlichen aseptalen Hyphen dabei zu zerbrechen, so dass diese nicht mehr in der Kultur wachsen [42].

Eine mögliche Diagnosefindung über serologische Antikörper-Suchtests kann auch durchgeführt werden, ist aber durch mangelnde Spezifität und die fehlende Möglichkeit, die krankheitsverursachende Spezies genau zu bestimmen, zur Zeit noch wenig nützlich. Außerdem gibt es im klinischen Routinegebrauch keine serologischen Tests für den Nachweis von Pilzbestandteilen [42].

Weitere Untersuchungsmöglichkeiten bietet die Molekularbiologie mit Methoden wie der Polymerase-Kettenreaktion. Diese, von Saiki und Mullis beschriebene Methode, dient zum Nachweis der Gegenwart von pathogenen Erregern im Probenmaterial durch Amplifikation spezifischer Erreger-DNA. Mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase mit 5'-3'- Polymeraseaktivität werden in mehreren Zyklen (bestehend aus Denaturierung der doppelsträngigen DNA, Anlagerung der Primer und Synthese der DNA) die gesuchten Sequenzen bei Vorhandensein in vitro exponentiell vermehrt, so dass sie später im Agarosegel dargestellt werden können [46].

Für den spezifischen Nachweis von Zygomyceten-DNA aus Gewebsextrakten wurde von Bialek et al. 2005 erstmalig eine sensitive PCR etabliert [6].

Eine Abwandlung dieser Methode findet sich in der LightCycler-Diagnostik. Sie ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und gleichzeitig die Möglichkeit zur Quantifizierung und Spezifizierung der Ausgangs-DNA bietet, wodurch weitere Schritte wie Gelelektrophorese und Sequenzierung unnötig werden.

Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während jedes PCR-Zyklus am Ende der Primeranlagerungsphase durchgeführt. Dazu werden sequenzspezifische Oligonukleotide (Hybridisationsproben) dem Standard PCR-Ansatz hinzugefügt. Sie sind mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und binden zwischen den beiden Primern in räumlicher Nähe zueinander während des Amplifikationszyklus an die Ziel-DNA. Regt man das Fluoreszenz der ersten Hybridisationsprobe an, emittiert diese keine Fluoreszenz, sondern überträgt die Energie auf den benachbarten zweiten Fluoreszenzfarbstoff. Dieser emittiert nun eine Fluoreszenz, deren Stärke proportional zur Menge der spezifischen DNA, die für die Hybridisierung zur Verfügung steht, zunimmt. Dies macht eine relative Quantifizierung der DNA möglich. Um die Menge an anfänglich vorhandener DNA in den einzelnen Proben vergleichen zu können, wird der Crossing Point bestimmt, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt, also genug DNA amplifiziert wurde. Dieser Punkt wird um so schneller erreicht, je mehr Ausgangs-DNA vorhanden war.

Mit der LightCycler-PCR kann man außerdem die Amplifikationsprodukte während des Verfahrens identifizieren und sogar Mutationen nachweisen, indem man die charakteristische Schmelztemperatur der Hybridisierungssonden bestimmt. Die Temperatur, bei der die Hälfte der Pilz-DNA-Sonden Hybride denaturiert sind wird mit T_m bezeichnet. Sie ist für jede Pilzart spezifisch und hängt von Länge und Nukleotidkomposition der Sonden ab.

Die klinische Diagnose der Zygomycose gestaltet sich schwierig, da Mykosen keine pathognomonischen klinischen oder radiologischen Merkmale besitzen.

Die Möglichkeit einer Erkrankung an einer rhinocerebralen Mukormycose sollte bei jedem Risikopatienten mit Symptomen einer Sinusitis, besonders bei zugrundeliegender Ketoazidose, verändertem Bewusstseinszustand und infarziertem Gewebe der Nase oder des Gaumens in Erwägung gezogen werden.

Es sollte daraufhin eine endoskopische Beurteilung der Sinus auf eventuelle Nekrosen hin durchgeführt werden [18].

Bei der pulmonalen Zygomycose unterscheidet sich das Erscheinungsbild nicht von diffusen, durch andere Erreger, zum Beispiel *Aspergillus* spp. oder Mykobakterien, hervorgerufenen Pneumonien [41]. Röntgenaufnahmen des Thorax können unspezifische fokale Verdichtungen bis großflächigen Verschattungen zeigen. Radiologische Zeichen für Infarzierung mit cavitären Läsionen und Luftsichelzeichen sind selten und differenzieren nicht zwischen Aspergillosen, Mucormycosen und anderen Erregern [34][43].

Ultraschall, CT und MRT sind weitere unterstützende Methoden, um durch Zygomyceten verursachte Infektionsherde aufzuspüren. Durch sie können zum Beispiel Entzündungen von Organen mit abszessverdächtigen Bereichen sichtbar gemacht werden, wie sie auch die Zygomycose zeigen kann [18].

1.1.7 Therapie

Die Standardtherapie der invasiven Zygomycosen besteht aus Korrektur der krankheitsbegünstigenden Faktoren, aggressiver Chirurgie und Gabe von Antimykotika [21][42].

Bei beginnenden Symptomen ist die sofortige Behandlung indiziert, da ansonsten mit einem letalen Ausgang zu rechnen ist.

Die radikale chirurgische Sanierung betroffener Gewebe sollte, soweit möglich, sofort nach Diagnosestellung durchgeführt werden, da sie einen entscheidenden Einfluss auf die Prognose der Zygomycose besitzt [52]. Bei der rhinocerebralen Form der Zygomycose kann dies die Entfernung eines Teils der Gesichteweichteile, Nasenknorpel, Gaumen, Orbitabestandteile und sogar Hirngewebes bedeuten. Lobektomien bei pulmonaler Zygomycose und Entfernung anderer betroffener Organteile, soweit möglich, können die Überlebenschancen der Betroffenen steigern [18].

Bei der obligaten medikamentösen Behandlung hat sich Amphotericin B als effektives Medikament in klinischer Anwendung für die Therapie der invasiven Zygomycose erwiesen [21][18]. Das Medikament zeigt allerdings nicht in allen Fällen eine Wirkung und wird auch durch seine Nebenwirkungen in der Anwendung beschränkt [21][42]. Eine mögliche Alternative ist das liposomale Amphotericin B, das, ohne die Toxizität zu erhöhen, in höheren Dosen gegeben werden und die Bluthirnschranke besser überqueren kann [21].

Azole sind im Allgemeinen weniger effektiv [42]. Posaconazol allerdings zeigt *in vitro* eine gegen Zygomycosen gerichtete Aktivität [39][51]. In neueren Studien konnte ebenso eine *in vivo* Aktivität ermittelt werden, so dass Posaconazol eine Option bei Versagen der Amphotericin B-Therapie bietet und auch eingesetzt werden kann, wenn die Nebenwirkungen dieser Therapie deren Wirkung übersteigen [29][24].

Echinocandine gelten als ineffektiv. Caspofungin-Azetat hat *in vitro* eine sehr hohe MHK-Rate [39] und erweist sich trotz seiner Beeinflussung der GS-Synthese des *Rhizopus arrhizus* nicht als sinnvolles Monotherapeutikum [29]. Es konnte im Tiermodell lediglich die Überlebensrate bei mit niedriger Infektionsdosis infizierter Versuchstieren verbessern und zeigte keine Wirkung bei Tieren mit hoher Infektionsdosis [2]. Als Kombinationspartner von Amphotericin B hingegen wird im Mausmodell eine höhere Effektivität als bei der Monotherapie mit Amphotericin B verzeichnet [50].

Zur Korrektur der zu Grunde liegenden krankheitsbegünstigenden Bedingungen gibt es weitere spezielle Behandlungsansätze:

Es werden Behandlungsversuche in Kombination mit einer hyperbaren Sauerstoffbehandlung unternommen, um über eine Steigerung der Neutrophilenaktivität [33] das Pilzwachstum zu hemmen [17].

1.2 Tiermodelle zur Zygomycose

Die hohe Letalität der Zygomycosen trotz antimykotischer Therapie erfordert die Entwicklung und Testung weiterer Therapeutika, insbesondere neuer Antimykotika. Dazu ist bisher unverändert ein Tierversuch erforderlich.

1.2.1 Grundlagen

1.2.1.1 Modell-Erstellung

Die Durchführung eines Tiermodells zur Erforschung einer infektiösen Erkrankung setzt voraus, dass die humanpathogenen Keime auch bei Tieren zu einer Infektion führen. Für viele Zygomyceten wird dies beschrieben. Künstlich wird eine Infektion am erfolgreichsten bei Mäusen und Kaninchen gesetzt, Affen und Ratten scheinen sich hingegen weniger zu eignen [58].

Da es sich um eine opportunistische Erkrankung handelt, muss ein Weg gefunden werden, um die Tiere für eine Infektion empfänglich zu machen. In verschiedenen Experimenten wurde versucht, diesen Zustand mit einer Cortisontherapie, einem durch Alloxan induzierten Diabetes oder der Züchtung von Tieren mit einer natürlichen selektiven Immundefizienz zu erreichen [58]. In der Abhandlung von Yamaguchi wird beschrieben, dass eine Vielzahl zu diesem Thema veröffentlichten Arbeiten eine Cortisonbehandlung als sehr effektive Möglichkeit darstellen, Mäuse für eine intravenöse Infektion mit Zygomyceten empfänglich zu machen.

Es muss für das Tierexperiment zudem eine zu injizierende Sporendosis gefunden werden, welche eine zum Menschen vergleichbare Schwere der Erkrankung bewirkt, nicht aber sofort zum Tod führt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die letale Dosis der Infektion mit *Rhizopus arrhizus* zwischen 10^3 und 10^6 Sporen für eine Maus liegt.

Für die Infektion kommen eine intravenöse, eine intrazerebrale oder eine intraperitoneale Route in Frage [58].

1.2.1.2 Auswertung

Die Auswertung des Tiermodells besteht in der Überlebensbeobachtung der Tiere und dem Infektionsmonitoring.

Überlebensbeobachtung

Der Verlauf der bei den Tieren erzeugten Erkrankung lässt sich an ihrer Überlebensdauer und -rate beurteilen. Über den Vergleich der durchschnittlichen Todeszeit unterschiedlich behandelte Tiergruppen sind Rückschlüsse auf die Wirkung von Medikamenten möglich.

Infektionsmonitoring

Im Tiermodell muss die Infektion selbst ausgewertet werden können, also eine Erkrankung bestätigbar sein, ohne den Tod des Tieres als Beweis dafür zu benötigen. Bisher waren Tiermodelle zur Zygomycose in ihrer Aussagekraft begrenzt, da es an geeigneten Methoden des Infektionsmonitoring mangelte.

Die Diagnostik wurde vor allem mit Hilfe der Histopathologie durchgeführt. Durch das sehr begrenzte Organvolumen, welches durch histologische Verfahren beurteilt werden kann, hat die Methode aber ihre Grenzen [3].

Eine Alternative dazu bietet, wie bereits erwähnt, die Anzüchtung der Krankheitserreger in der Kultur. Durch die dabei notwendige Homogenisierung der Ausgangsproben kommt es allerdings oft zur Zerstörung der Hyphen und die Kulturen bleiben steril [42].

Es liegt daher nahe, das Monitoring der Zygomycose im Tiermodell mit PCR-Methoden zu versuchen, da diese bereits in Tiermodellen zur Histoplasmose, Aspergillose und Kryptokokkose erfolgreich etabliert wurden [4][5][6][30].

1.3 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, eine Grundlage für eine bessere Erforschung der Therapie der Zygomycose zu schaffen, um die Heilungschancen dieser Erkrankung zu verbessern. Hierzu soll ein Mausmodell entwickelt werden, welches künftig als Referenz für die Erforschung der Zygomycose und zur Testung von Antimy-

kotika zur Verfügung steht. Es sollen weiter die Diagnostikmethoden etabliert werden, mit denen eine Verlaufskontrolle der Zygomycose durch die Analyse des Organbefalls der einzelnen Tiere nach Beendigung des Experiments bestmöglich durchgeführt werden kann.

Konkret:

- Im Modell soll der Organbefall der Zygomyceten (hier *Rhizopus arrhizus*) bei immunsupprimierten Mäusen in Abhängigkeit der Infektionsdosis bestimmt werden.
- Weiter soll eine Infektionsdosis bestimmt werden, die nicht letal ist, aber eine ausreichende Infektion verursacht, so dass die Wirkung von Therapeutika analysiert werden kann.
- Es wird verglichen, ob der Nachweis spezifischer DNA des Erregers mittels PCR in definierten Organbiopsien eine ähnliche Sensitivität wie die bisherigen Standardmethoden Kultur und Histologie aufweist und somit geeignet ist, die Zygomycose im Tiermodell im Verlauf zu kontrollieren

2 Material

Tiere

40 ICR- Mäuse, fünf Wochen alt, ca. 25 g schwer vom Institute of Cancer Research

Tierversorgung

Sani-Chips ® Streu	Harlan Teklad, Madison, USA
18% Protein Rodent Diet Nahrung	Harlan Teklad, Madison, USA
Plastikwasserflasche	Harlan Teklad, Madison, USA

Kommerzielle Kits

QIAamp® Mini Kit	Qiagen, Hilden
Amplitaq® DNA-Kit	Applied Biosystems, Roche, USA
Qiaquick®PCR Purifikation Kit	Qiagen, Hilden
ABI PRIS®M Big Dye™ Cycle Sequenzing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Roche, USA
Amplitaq® DNA-Kit	Applied Biosystems, Roche, USA
LightCycler - Fast Start DNA Master	Roche Diagnostics, Mannheim

Chemikalien

Puffer	Roche, New Jersey, USA
Agarose	Invitrogen, UK
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
Aqua bidest.	Eigenproduktion
Bisacrylamid	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
EDTA	Merck, Darmstadt

Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Formamid Glycerin	Merk, Darmstadt
Kortison, CortoneR konz. 50mg/ml USA	Merck & Co., INC West Point, USA
MgCl ₂	Roche, New Jersey, USA
Stickstoff	Tec-Lab, Königstein
Tetramethyldiamin	Roth, Karlsruhe
Tris HCL	Sigma, Deisenhofen

Enzyme

Proteinase K, konz.: 20mg/ml	Qiagen, Hilden, Roth, Karlsruhe
AmpliTaq Polymerase	Roche, New Jersey, USA
Taq DNA polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim

Nukleotide

Desoxynukleosid-Triphosphat Set (jedes dNTP 100mM)	Promega, Wisconsin, USA
---	-------------------------

Oligonukleotide

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

Die Hybridisationsproben der LightCycler-PCR stammten von TIB MOLBIOL, Berlin.

Molekulargewichtsmarker

Standard 100bp Leiter äquimolar	Roth, Karlsruhe
---------------------------------	-----------------

Rezepturen

Ladepuffer	
100mg	Bromphenolblau (1%ig)

5ml Glycerin

5ml Wasser

TAE (50x)

2,0M Tris, pH 8,0

1,0M Eisessig

0,5M EDTA ad Aqua

Schutzkleidung

Handschuhe: Safe Skin Satin Plus

Nitra Touch

Laborkittel

Kimberly-Clark, USA

Ansell Medical, München

Klopmann, Deutschland

Verbrauchsmaterialien

Biopsie-Stanze 4mm

Centri-Step® Zentrifugationssäulen

Eppendorfgefäße

Filzstifte

Glasbehältnisse, Trichter, Erlenmaierkolben

Parafilm

PCR-Reaktionsgefäße

Petrischalen

Pinzette, Pipetten

Pipettenspitzen

Plastiktube Probiotek

Probenkamm

Spritzen: PlastipakMR B-DMR 1ml

Tekmar Lab® Bag

PFM, Köln

Princeton Sep. Adelphia

Eppendorf, Hamburg

Staedtler, Deutschland

Schott, Duran, Deutschland

American National Can™, Men-aska, USA

Biozym, Hessisch Oldendorf

Nitidez, Mexiko

Roth, Karlsruhe

Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf

Atzteca, San Nicolas de los Garca, Mexiko

Peqlab, Erlangen

Becton Dickinson, Columbien

Tekmar, Canada

Geräte

373 ABI PRISM™ mit Genetik Analyzer 310 Abzugskammer	Perkin Elmer, Foster City, USA Laborbau SYKE, Deutschland/ Bender u. Hobein AG, Zürich, Schweiz
Beheizbarer Schüttler	Eppendorf, Hamburg Bright-Line
Computer	Maxdata, Deutschland
Dampfsterilisator Varioklav 400	H+P GmbH, Oberschleißheim
Fotoanlage	Kaiser, Deutschland
Fotodrucker	Mitsubishi, Japan
Gefrierschrank	AEG, Deutschland
Gelkammer	Peqlab, Erlangen
Haemacytometer	Warner-Cambert. Tech., Buffalo NW, USA
Heizplatte, Ikamak®RH	KA Works Wilmington, USA
Hermle Tischzentrifuge	Edison, N.J., USA
Kühlschrank	Liebherr, Deutschland
Labconco Purifier™ ClassII Banch	Labconco Corporation, USA
LightCycler instrument	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler-Kapillare	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler-Kühlblock	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler-Zentrifuge	Roche Diagnostics, Mannheim
Macintosh Quadra 650	Macintosh, USA
Mikrowelle MWG-Biotech	Ebersberg
Netzgerät	Heinzinger, Deutschland
PCR-Cycler	MWG-Biotech, Enersberg, Peqlab, Erlangen
Reaktionsgefäßklemmständer aus Edelstahl	Eigenbau
Spektralphotometer zur DNA-Messung	Beckmann, München
Sterilbank antair BSK	W.H. Mahl, Kaarst
UV-Anlage	LTF Labortechnik, Deutschland

Vortex Mixer Volt 110-120

American Scientific Products,
Mac Gaw, USA

Zentrifuge

Heraeus, Sepatech, Deutsch-
land

3 Methoden

3.1 Das Tiermodell

Der Tierversuch wurde im Mikrobiologischen Labor unter der Leitung von Frau Dr. Gloria Gonzalez Gonzalez an der Universität von Nuevo Leon in Monterrey, Mexiko durchgeführt.

Im Tiermodell wurden die einzelnen Tiere (Mäuse) mit dem Erreger *Rhizopus arrhizus* (selbstgezüchteter Stamm des Laboratorio de Micología de la Universidad autonoma de Nuevo Leon) infiziert, um später Proben ihrer Organe auf einen Befall hin zu untersuchen.

Richtlinien

Das Versuchslabor unterliegt den mexikanischen Richtlinien für Gebrauch und Pflege von Labortieren. Diese Richtlinien entsprechen den US-Guidelines: 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, sowie dem Deutschen Tierschutzgesetz.

Das Protokoll zum Tierexperiment wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt.

Erregeranzucht

14 Tage vor Infektion der Mäuse wurden 10 Pilzkulturen von *Rhizopus arrhizus* auf Sabouraud-Agar in Glasflaschen geimpft und bei 30+/- 0,5°C bebrütet.

Vorbereitungen

Es wurden 40 ICR Mäuse (Institute of Cancer Research) im Alter von sechs Wochen mit einem Gewicht von durchschnittlich 25g für die Experimente verwendet.

Um die Tiere für eine Infektion mit *Rhizopus arrhizus* empfänglich zu machen, wurden sie mittels einer dreitägigen Cortisontherapie immunsupprimiert. Pro Tag bekamen sie 100mg/kg, sprich 0,05 ml, subkutan in die Nackenpartie inji-

ziert: eine Dosis am Tag vor der Infektion (Tag -1), eine am Tag der Infektion (Tag 0) und schließlich eine Injektion am Tag nach der Infektion (Tag 1).

Infektion

Am Tag 0 erhielten die Tiere ihre Infektion mit einer definierten Sporenanzahl des Erregers *Rhizopus arrhizus*.

Es wurden Gruppen à acht Mäusen mit jeweils 10^3 , 10^4 , 10^5 und 10^6 Sporen infiziert. Weitere acht Mäuse dienten als Kontrollgruppe und wurden ohne Infektion aber nach Cortisontherapie unter identischen Bedingungen gehalten.

Herstellung der Infektionsdosis

In den zehn Glasflaschen mit vor 14 Tagen angesetzten *Rhizopus arrhizus*-Kulturen hatte sich ein 'wolliger' weißer Rasen (Hyphen) gebildet und 6 Kulturen trugen bereits eine gräulich verfärbte Oberschicht, die die Sporenbildung anzeigt. Diese sechs Kulturen wurden zur Sporengewinnung eingesetzt (Siehe auch Abb. 1).

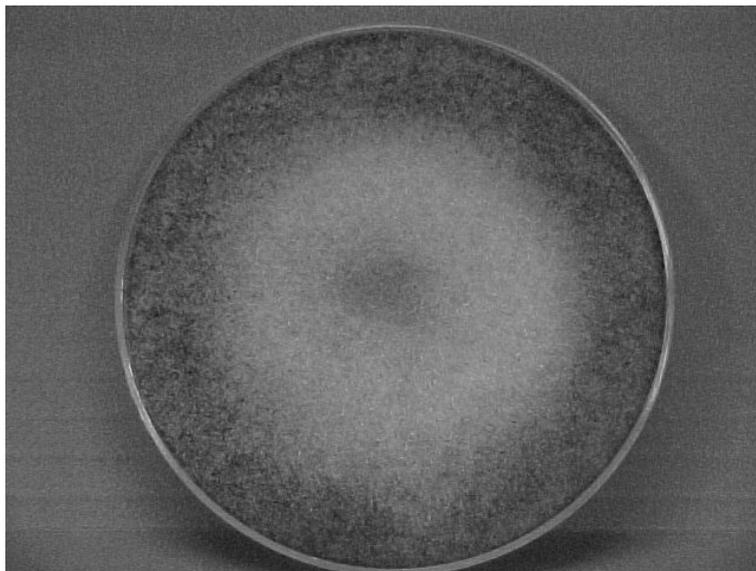


Abbildung 2: *Rhizopus arrhizus* Kultur mit bereits vorhandener Sporenbildung auf Sabouraud-Agar

Dazu wurden die Glasflaschen mit steriler isotoner Kochsalzlösung aufgefüllt und die Konidien mit sterilen Holzstäbchen suspensiert.

Um die Sporen von gelösten Rasenbestandteilen zu trennen, wurden die Suspensionen aus den Flaschen durch einen Filter in sterile Plastikgefäße gefüllt, 10 Minuten bei 2500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und das Sediment mit neuer isotoner Kochsalzlösung aufgegossen. Dieser Waschvorgang wurde dreimal durchgeführt.

Zur Bestimmung der Sporenkonzentration in der Lösung wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe aufgestellt (Konzentrationen: 1:10,...,1:100 000).

Die erste klar erscheinende Lösung war die Verdünnung von 1:1000.

Ihre Sporenkonzentration wurde durch Auszählen in der Neubauer-Kammer bestimmt, hier waren es durchschnittlich 41 Sporen in der Kammer.

Daraus konnte die erforderliche Infektionsdosis wie folgt berechnet werden:

- Bei 10^3 :

$$2 \times 10^3 \text{ in } 0,2\text{ml} \Rightarrow 1 \cdot 10^4 \text{ Sporen/ml}$$

(0,2ml: Die vorgesehene Infektionsdosis von 10^3 Sporen befindet sich nach dieser Rechnung in 0,1ml. Um jedoch die Tiere mit der gewünschten Sporendosis zu infizieren, ist es sinnvoll ein Infektionsvolumen von 0.2ml statt 0.1ml der Suspension zu verwenden, da viele Sporen bei der Bearbeitung verloren gehen indem sie zum Beispiel an der Gefäßwand der Infektionsspritze haften bleiben. Durch das verdoppelte Volumen kann davon ausgegangen werden, dass die gewünschte Infektionsdosis von 10^3 Sporen in den Blutkreislauf der Maus gelangt)

Durch das Ergebnis in der Neubauer-Kammer ergibt sich folgende weitere Verdünnung: Tube 1/1000 $\Rightarrow 41 \cdot 10^4 / 1 \cdot 10^4 \Rightarrow 41$; Verdünnung $\Rightarrow 1/40$

→ 1,0ml Tube 1/1000 + 40ml isotone Kochsalzlösung

→ 0,5ml Tube 1/1000 + 20ml isotone Kochsalzlösung

- Bei 10^4 :

0,5ml Tube isotone Kochsalzlösung

- Bei 10^5 :
0,5ml Tube 1/10+20ml isotone Kochsalzlösung
- Bei 10^6 :
0,5ml Tube 1/1+20ml isotone Kochsalzlösung

Die hergestellten Infektionslösungen wurden den Mäusen in einem Volumen von 0,2ml in die Schwanzvene injiziert.

Zusätzlich wurden zur Kontrolle der Infektionsdosis Kulturen von den Lösungen der Verdünnungsreihe angefertigt: Die Lösungen wurden auf Sabouraud-Agar in Petrischalen ausgegossen, diese mit Parafilm-Band verschlossen und bei $30\pm 0,5^\circ\text{C}$ inkubiert.

Nach deren Beurteilung zeigte sich folgendes Ergebnis der tatsächlich injizierten Dosis je 0.1ml:

- 5×10^3 statt 1×10^3
- 6×10^4 statt 1×10^4
- 5×10^5 statt 1×10^5
- 5×10^6 statt 1×10^6

Versuchsverlauf

Die Mäuse einer Gruppe wurden jeweils zu vier Tieren in Käfigen gehalten. Sie verblieben im Tierlabor und bekamen pro Tag eine 'Lichtdosis' von ca. 10h, um einen normalen Tag-Nacht-Rhythmus zu simulieren.

Die Tiere wurden täglich auf Krankheitszeichen kontrolliert. Schwer erkrankte Mäuse wurden vorzeitig getötet, um die Dauer eines möglichen Leidens zu minimieren. Die übrigen Tiere verblieben über eine Versuchsdauer von 21 Tagen unter Beobachtung.

Am Tag 4 des Experiments verstarb in der Gruppe mit der höchsten Infektionsdosis von 5×10^6 Sporen das erste Tier.

An den folgenden Versuchstagen starben im Verlauf weitere 17 Tiere aus verschiedenen Dosisgruppen vorzeitig, wie in Tabelle 2 dargestellt. Drei Tiere da-

von wurden auf Grund der Schwere ihrer Erkrankung vorzeitig getötet. Das Sterbedatum wurde auf den nächsten Tag datiert, ausgehend von dem erwarteten Ableben.

Tabelle 2: Protokolltage an denen einzelne Tiere vorzeitig verstorben sind, T = Tag des Protokolls

Mäuse	Kontrollgruppe	5×10^3	6×10^4	5×10^5	5×10^6
1		T13	T8	T5	T4
2			T8	T5	T5
3			T12	T6	T5
4			T13	T11	T6
5				T17	T6
6					T6
7					T6
8					T7

Am Tag 21 der Studie wurden alle bis zu diesem Zeitpunkt noch lebenden Tiere mit einer Pentobarbital-Überdosis (300 mg/kg intraperitoneal) Tiere getötet.

Verfahren bei gestorbenen Tieren

Alle vorzeitig verstorbenen Tiere wurden aus den Käfigen entfernt um die Organbiopsien sofort zu entnehmen.

Auch die Organe der am Tag 21 des Versuchs getöteten Tiere wurden sofort exstirpiert und weiter bearbeitet.

3.2 Probengewinnung

Durchführung

Der auf dem Rücken liegenden Maus wurde mit der Pinzette das Bauchfell angehoben und mit einer Schere eingeschnitten, um die Bauchhöhle freizulegen. Es wurden nacheinander Leber, Milz und die linke Niere dargestellt und herauspräpariert ohne den Darm zu verletzen, um Kontaminationen mit Darminhalt

zu vermeiden. Die Organe wurden anschließend in eine beschriftete Petrischale gelegt.

Nachfolgend wurde der Brustraum des Tieres eröffnet, indem die Schere entlang des Brustbeines durch die Rippen geführt wurde. Die linke Lunge konnte so reseziert werden.

Im Folgenden wurde der Kadaver auf den Bauch gedreht, der Callus mit der Schere vom Fell befreit und aufgeschnitten, um das Gehirn zu entnehmen.

Bei der Präparation fielen bei einigen Tieren makroskopisch erkennbare granulomatöse Herde in einzelnen Organen, sowie Spleno- und Hepatomegalien auf.

Aus jedem der fünf Organe in der Petrischale wurden nun je drei Proben mit einem Biopsiemesser entnommen.

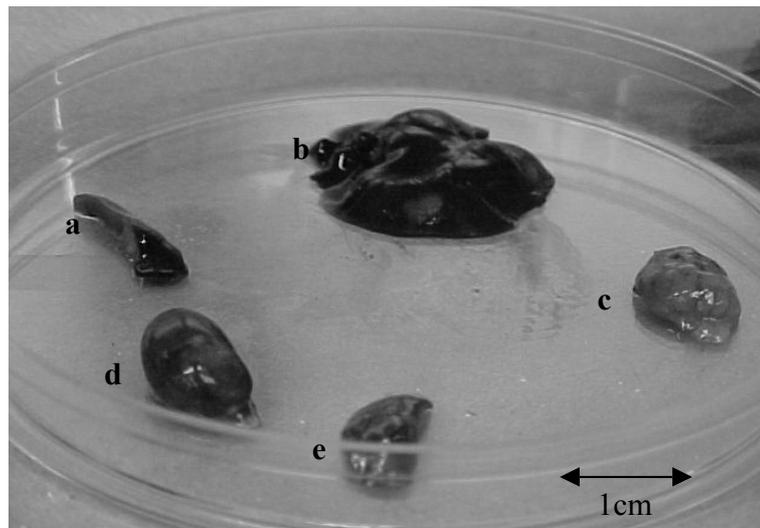


Abbildung 3: Herauspräparierte Mausorgane: a: Milz, b: Leber, c: Gehirn, d: linke Niere, e: linke Lunge.

Die erste Organbiopsie, die für die Kultur bestimmt war, wurde in einer sterilen Plastiktüte mit 1ml isotoner Kochsalzlösung im Gefrierfach bei -20°C gelagert (Abbildung 4).

Die für die Histologie vorgesehene Biopsie kam in ein kleines Glasgefäß mit 4ml 5%igem Formalin (Abbildung 5).

Die dritte Organbiopsie wurde in einem Eppendorfgefäß ohne Zusätze bei -20°C eingefroren, um sie später für die DNA-Extraktion zu verwenden (Abbildung 5). Die Tüten und Gefäße wurden mit Tiernummer (1-8 pro Gruppe), Dosisgruppe und Organbezeichnung beschriftet.

Sicherheitsmaßnahmen bei Entnahme der Biopsien

Der gesamte Arbeitsvorgang wurde unter aseptischen Bedingungen mit Schutzkleidung unter der Sterilbank durchgeführt.

Um Kontaminationen von außen zu vermeiden, wurden Haut und Fell der toten Mäuse mit Ethanol eingesprüht. Die verwendeten Instrumente, wie Schere und Pinzette, wurden zwischen den einzelnen Organentnahmen mit Ethanol gereinigt, zudem wurde pro Maus ein separates Biopsiemesser verwendet.

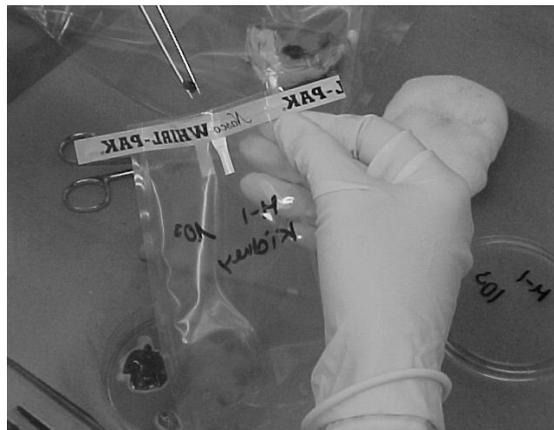


Abbildung 4: Lagerung der für die Kultur vorgesehenen Biopsie in einer sterilen Plastiktüte mit steriler Kochsalzlösung

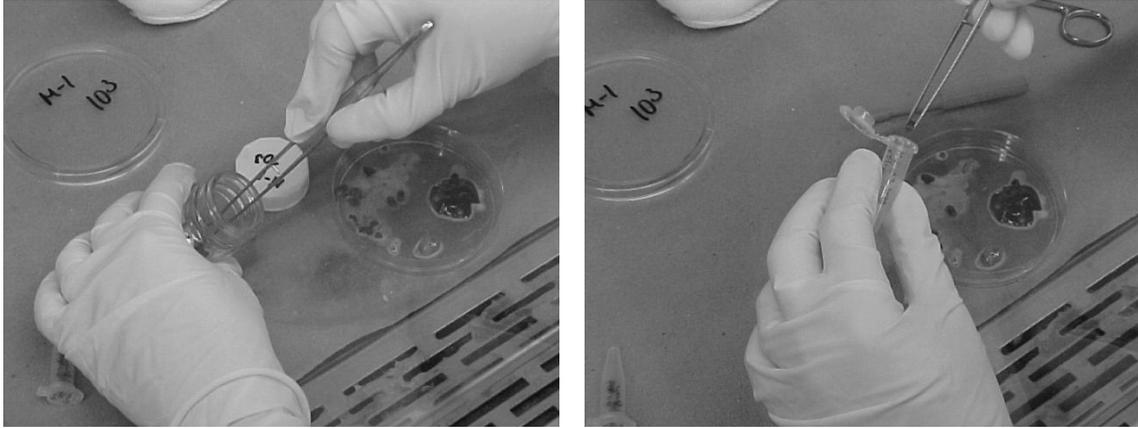


Abbildung 5: Lagerung der Organproben für die Histologie (links) und die DNA-Extraktion (rechts)

3.3 Untersuchungsmethoden

3.3.1 Histologie

Die histologische Untersuchung der Organe wurde von Herrn Dr. Ceceñas, Pathologe an der Universität von Nuevo Leon in Monterrey, Mexiko durchgeführt.

Die Biopsate wurden in 5% Formaldehyd fixiert und nach 24 Stunden in Paraffin eingebettet. Dann wurden sie mit dem Mikrotom in 4 mm dicke Scheiben zerschnitten und zur Identifizierung eventueller Infektionen mit *Rhizopus arrhizus* sowohl mit der mit der HE-Färbung (Hämatoxylin–Eosin–Färbung), als auch mit der PAS-Färbung (Perjodsäure–Schiffsches Reagenz) und der Grocott-Färbung gefärbt und anschließend im Lichtmikroskop betrachtet. Erkennbare Hyphen aus jedem Schnitt wurden abgezählt um eine Angabe zur Infektion machen zu können.

3.3.2 Kultur

Die Biopsie wurde im Beutel mit der isotonen Kochsalzlösung leicht zerdrückt. Dann wurde das Homogenisat in ein Glasröhrchen gegossen, gevortext, anschließend auf einen Sabouraud Agar in eine Petrischale gegossen und gleichmäßig mit einer Pipettenspitze verteilt.

Nach Inkubation bei 35°C für 16h (über Nacht) wurden die eventuell entstandenen KBEs (Kolonie bildende Einheiten) ausgezählt, bevor sich daraus ein kompletter Rasen bilden konnte.

3.3.3 PCR

3.3.3.1 DNA-Extraktion aus Biopsaten

Durchführung

Es wurde der QIAmp® DNA Mini Kit entsprechend den Herstellerangaben mit einigen Modifikationen verwendet:

Zu jeder bis dahin bei –20°C in 2ml Eppendorfgefäße eingefrorenen Biopsie wurden 150ml Aqua dest. hinzugefügt. Anschließend wurden 180ml ATL Puffer und 20ml Proteinase K zugeben und der Ansatz bei 56°C im Thermoshaker über Nacht inkubiert, bis das Gewebe vollständig lysiert war.

War nun ein Homogenisat entstanden, schloß sich eine Flüssigstickstoff-Koch-Behandlung zur Zerstörung der Pilzzellenwände an. In einem Reaktionsgefäßklemmständer aus Edelstahl wurden die Biopsien in den Eppendorfgefäßen erst für 30 Sekunden in einen N₂ Behälter mit –196°C getaucht und dann für 5 Minuten in ein Wasserbad mit 100°C gestellt. Dieser Vorgang wurde mit erneuten 30 Sekunden im Stickstoffbehälter und 3 Minuten im Wasserbad noch zwei mal durchgeführt.

Dann wurden jeder Probe 200ml AL Puffer zugesetzt, die Lösung gevortext und für 10 Minuten im Thermoshaker bei 70°C inkubiert.

Nach Zugabe von 200ml Ethanol (96%) wurde die Probe gevortext, die gesamte Flüssigkeit auf die Qiagen-Säule aufgetragen und bei 8000 rpm eine Minute lang zentrifugiert. Anschließend war die Säule in ein neues 2ml Auffangröhrchen zu stellen und das Filtrat zu verwerfen.

Zum Waschen der Säule wurden 500ml AW 1 Puffer aufgetragen, die Säule bei 8000rpm eine Minute lang zentrifugiert, dann in ein neues Auffangröhrchen verbracht und das Filtrat verworfen.

500ml AW 2 Puffer wurden nun auf die Säule aufgetragen, die Säule bei 13000rpm für drei Minuten zentrifugiert und nach Beseitigen des Filtrates wurde die Säule in ein 1,5ml Eppendorfgefäß gestellt.

Der nächste Schritt wurde insgesamt zweimal durchgeführt: Auftragen von 80ml AE Puffer auf die Säule, Inkubation der Probe bei Raumtemperatur über 5 Minuten und Zentrifugation bei 8000rpm über eine Minute.

Nun konnte die Säule verworfen werden, die extrahierte DNA befand sich im Eluat.

Dieses wurde kurzfristig bei 4°C gelagert und nach Deutschland überführt. Dort erfolgte eine Auftrennung in drei Fraktionen, von denen zwei bei -20°C gelagert wurden. Eine Portion jeder Probe wurde bei 4°C zur weiteren Diagnostik verwahrt.

Bei diesem Vorgang wurden die Proben zur leichteren Bearbeitung durchnummeriert und im weiteren Verlauf auch nur noch unter dieser Nummer bearbeitet (siehe Tabelle 2).

Tabelle 3: Kennzeichnung der einzelnen Proben

Tier*	Organe	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^5$	$6 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^3$	Kontrollen
M1	Gehirn	1	41	81	121	161
	Leber	2	42	82	122	162
	Lunge	3	43	83	123	163
	Milz	4	44	84	124	164
	Niere	5	45	85	125	165

M2	Gehirn	6	46	86	126	166
	Leber	7	47	87	127	167
	Lunge	8	48	88	128	168
	Milz	9	49	89	129	169
	Niere	10	50	90	130	170
M3	Gehirn	11	51	91	131	171
	Leber	12	52	92	132	172
	Lunge	13	53	93	133	173
	Milz	14	54	94	134	174
	Niere	15	55	95	135	175
M4	Gehirn	16	56	96	136	176
	Leber	17	57	97	137	177
	Lunge	18	58	98	138	178
	Milz	19	59	99	139	179
	Niere	20	60	100	140	180
M5	Gehirn	21	61	101	141	181
	Leber	22	62	102	142	182
	Lunge	23	63	103	143	183
	Milz	24	64	104	144	184
	Niere	25	65	105	145	185
M6	Gehirn	26	66	106	146	186
	Leber	27	67	107	147	187
	Lunge	28	68	108	148	188
	Milz	29	69	109	149	189
	Niere	30	70	110	150	190
M7	Gehirn	31	71	111	151	191
	Leber	32	72	112	152	192
	Lunge	33	73	113	153	193
	Milz	34	74	114	154	194
	Niere	35	75	115	155	195
M8	Gehirn	36	76	116	156	196
	Leber	37	77	117	157	197
	Lunge	38	78	118	158	198

	Milz	39	79	119	159	199
	Niere	40	80	120	160	200

* Tier jeder Infektions-/Kontrollgruppe

Sicherheitsmaßnahmen bei der Extraktion

Der Arbeitsvorgang des Extrahierens wurde gänzlich mit einem separaten Pi-pettensatz und gestopften Pipetten unter der Sterilbank durchgeführt um Kon-taminationen vorzubeugen. Zudem wurden alle Reagenzien sowie Gebrauchs-gefäße zunächst aliquotiert und eventuelle Restvolumina nach Gebrauch der Portionen verworfen.

3.3.3.2 Konventionelle Polymerasekettenreaktion

Durchführung

Die Zielsequenz der PCR liegt im 18S rRNA-Gen von Zygomyceten.

Zur Bestimmung der Proben wurden verschiedene PCR-Verfahren getestet:

Zuerst erfolgte die Untersuchung der Biopsieextrakte bei einem Teil der Pro-ben mit einem am Institut bereits etablierten PCR-Standardverfahren zur Ampli-fikation zygomycetenspezifischer DNA [6].

Die dabei verwendeten Primer ZM1 und ZM2 (siehe Tabelle 4) sind den Posi-tionen 711-730 und den dazu korrespondierenden Positionen 1117-1096 von *Rhizopus arrhizus* (GenBank®, Accession number AF113440) komplementär. Sie amplifizieren ein 408 bp langes Fragment.

Die Primer der nested PCR ZM1 und ZM3 (siehe Tabelle 4) begrenzen ein 176-177 bp langes nested Produkt der ersten Reaktion, entsprechend den Po-sitionen 711-730 und den korrespondierenden Positionen 886-864.

Tabelle 4: Primer der Zygomyceten-18S ribosomale DNA-PCR

ZM1	5'-ATT ACC ATG AGC AAA TCA GA-3'
ZM2	5'-TCC GTC AAT TCC TTT AAG TTT C-3'
ZM3	5'-CAA TCC AAG AAT TTC ACC TCT AG-3'

Für die Durchführung der PCR wurde der Applied Biosystems Roche AmpliTaq®DNA-Kit eingesetzt. Der Reaktionsansatz bestand dabei aus 50µl: 10µl extrahierter DNA in einem Gesamtvolumen von 50µl ergänzt durch Zugabe von 10x Roche Buffer II (um einen optimalen pH-Wert zu erhalten), MgCl₂ Lösung (zur Unterstützung der Primerbindung), der beiden Primer, sowie 1.5U AmpliTaq DNA Polymerase und einer 100mM Konzentration jedes Desoxynukleosid Triphosphat (genaues Pipettierschema siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Reaktionsansatz der 1. PCR

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
Aqua bidest.	28.2µl	
10xPuffer	5µl	1 x
MgCl ₂ -Lsg.	5µl	2,5mM
Primer ZM1	0.5µl	0,5mM
Primer ZM2	0.5µl	0,5mM
dNTP-Mix	0.5µl	50mM
AmpliTaq	0.3µl	1,5U
Ansatzvolumen	40µl	
DNA-Volumen	10µl	
Gesamtvolumen	50µl	

Die Reaktionsgemische der PCR unterliegen nach anfänglicher fünf minütiger Denaturierung 35 Zyklen mit den Reaktionsstufen Denaturierung bei 94°C für 30s, Anlagerung der Primer bei 50°C für 30s und Verlängerung der Primer bei 72°C für eine Minute. Die Reaktion wurde dann mit einer letzten Elongation über fünf Minuten bei 72°C abgeschlossen (Tabelle 6).

Tabelle 6: Zygomyceten-PCR-Temperaturprofi

Vorbehandlung		5 Min. 94°C
35 Zyklen:	Denaturierung	30 Sek. 94°C
	Primeranlagerung	30 Sek. 50°C
	DNA Synthese	60 Sek. 72°C
Nachbehandlung		5 Min. 72°C

Bei der anschließend durchgeführten nested PCR wurde als Probe jeweils 1µl des aus der ersten PCR erhaltenen Produktes eingesetzt. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Reaktionsansatz nested PCR

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
Aqua bidest.	37.2µl	
10xPuffer	5µl	1 x
MgCl ₂ -Lsg.	5µl	2,5mM
Primer ZM1	0.5µl	0,5mM
Primer ZM3	0.5µl	0,5mM
dNTP-Mix	0.5µl	50mM
AmpliTaq	0.3µl	1,5U
Ansatzvolumen	49µl	
DNA-Volumen	1µl	
Gesamtvolumen	50µl	

Das Temperaturprofil der nested Reaktion ist mit dem der 1. PCR identisch (Tabelle 6).

Basierend auf den Ergebnissen, die aus diesem Verfahren ermittelt werden konnten (siehe Ergebnisse), wurden die Proben im weiteren Verlauf noch mit abgewandelten Versionen des bereits beschriebenen Standardverfahrens untersucht.

Zum einen wurde eine stichprobenartige Auswertung der PCR-Produkte im Agarosegel (siehe: Agarose-Gelelektrophorese -Darstellung der PCR-Ergebnisse) schon nach Durchführung nur der ersten PCR versucht.

Zum anderen wurde eine PCR mit den gesamten extrahierten Biopsaten nach Reaktionsansatz der ersten PCR, aber unter Zuhilfenahme der Primer ZM1 und ZM3 durchgeführt (genannt: ZM1/ZM3-PCR) (genaues Pipettierschema siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: ZM1/ZM3-PCR-Pipettierschema

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
Aqua bidest.	28.2µl	
10xPuffer	5µl	1 x
MgCl ₂ -Lsg.	5µl	2,5mM
Primer ZM1	0.5µl	0,5mM
Primer ZM3	0.5µl	0,5mM
dNTP-Mix	0.5µl	50mM
AmpliAq	0.3µl	1,5U
Ansatzvolumen	40µl	
DNA-Volumen	10µl	
Gesamtvolumen	50µl	

Die PCR-Reaktion wurde dabei mit dem Temperaturprofil der Zygomyceten-PCR durchgeführt (siehe Tabelle 6).

3.3.3.3 Nachweis erfolgreicher DNA-Extraktion

Um die Aussagekraft der PCR-Ergebnisse sicherzustellen, ist es wichtig nachzuweisen, dass die DNA-Extraktion erfolgreich war. Dies gilt insbesondere für Proben, bei denen in der Gelauswertung (siehe unten) keine Bande zu erkennen war und die somit als negativ zu werten sind.

Dies geschieht durch den Nachweis von Maus-Aktin-DNA, die, da Aktin ein Bestandteil des Zytoskeletts der Mauszellen ist, in jeder Extraktion enthalten sein muss. Bei fehlendem Nachweis muss davon ausgegangen werden, dass die

DNA-Extraktion möglicherweise fehlerhaft war und so keine DNA im PCR-Ansatz eingesetzt, oder der Ablauf der Reaktion durch Inhibitoren verhindert wurde.

Im Tiermodell wurde dieser Nachweis stichprobenartig für die Proben 43, 51, 94, 96, 102, 114, 118, 123, 127, 132, 136, 139, 161, 165, 167, 169, 173, 176, 180, 182, 184 und 188 durchgeführt.

In dieser Kontroll-PCR soll unter Verwendung der Primer A4 und A5 (siehe Tabelle 9) ein 450 bp langes Fragment des β -Aktin-Gens der Maus-DNA amplifiziert werden. Der Primer A4 ist dabei komplementär zu den Positionen 312-336 und der Primer A5 zu den Positionen 790-764 der Sequenz X03765.1 (Accession Number) in GenBank® .

Tabelle 9: Primer der Aktin-PCR

A 4	5'-AGC CAT GTA CGT AGC CAT CCA GGC T-3'
A 5	5'-GGA TGT CAA CGT CAC ACT TCA TGA TGG-5'

Auch hierzu wurde als Grundlage wieder der Roche AmpliTaq®DNA-Kit verwendet. Der Reaktionsansatz in dieser PCR entspricht den Angaben aus Tabelle 10.

Tabelle 10: Aktin-PCR-Pipettierschema

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
Aqua bidest.	28.2µl	
10xPuffer	5µl	1 x
MgCl ₂ -Lsg.	5µl	2,5mM
Primer A4	0.5µl	0,5mM
Primer A5	0.5µl	0,5mM
dNTP-Mix	0.5µl	50mM
AmpliTaq	0.3µl	1,5U
Ansatzvolumen	40µl	
DNA-Volumen	10µl	
Gesamtvolumen	50µl	

Die Amplifikation im Thermocycler folgte dem in Tabelle 11 dargestellten Temperaturprofil.

Tabelle 11: Aktin-PCR Temperaturprofil

Vorbehandlung		5 Min. 94°C
35 Zyklen:	Denaturierung	30 Sek. 94°C
	Primeranlagerung	30 Sek. 50°C
	DNA Synthese	60 Sek. 72°C
Nachbehandlung		5 Min. 72°C

Kontrollen

- Extraktionsleerwert

Zum Nachweis möglicher Kreuzkontaminationen und unspezifischer PCR-Produkte wurde bei der DNA-Extraktion nach jeder 20. Probe eine Probe mit sterilem Wasser als sogenannter Extraktionsleerwert extrahiert. Die Proben verblieben den ganzen Versuch über zwischen den Reihen der Organproben und wurden exakt der gleichen Behandlung unterzogen. Ein positives PCR-Ergebnis bei fehlender amplifizierbarer

Zielsequenz dieser Proben würde so auf eben solche Verunreinigungen möglicherweise der gesamten Proben hindeuten.

- PCR-Leerwert

Zur Detektion eventueller Kontaminationen oder unspezifischer Amplifikationen während der PCR wurde ein Leerwert mitgeführt, der statt extrahierter DNA nur 10µl, bzw. in der nested PCR 1µl steriles Wasser beinhaltete. Da so keine amplifizierbare Sequenz enthalten ist, muss der Leerwert negativ sein, das Gegenteil würde auf eine Verunreinigung der Reagenzien mit der Zielsequenz oder einer Kontamination durch exogene DNA hindeuten. In diesem Fall muss der gesamte PCR-Vorgang wiederholt werden, um aussagekräftige Ergebnisse zu ermitteln.

- Positivkontrolle

Als Postivkontrolle bei den Zygomyceten-PCRs wurden extrahierte DNA des *Rhizopus arrhizus*, sowie später durch Sequenzierung als *Rhizopus arrhizus* identifizierte Biopsatextrakte eingesetzt. Mit ihnen ist ein positives Ergebnis zu erzielen. Tritt dies nicht ein, deutet es auf einen Fehler im Reaktionsansatz hin, wobei wiederum ein Neuansatz durchgeführt werden müsste.

Zur Positivkontrolle bei der Aktin-PCR wurden DNA-Extrakte aus Organen nicht infizierter Mäuse mitgeführt.

- Negativkontrollen

Für die Negativkontrolle bei den Zygomyceten-PCRs wurden DNA-Extrakte aus Organen nicht infizierter Mäuse verwendet, um unspezifische Reaktionen der Primer mit der Wirts-DNA ausschließen zu können.

Als Negativkontrolle bei der Aktin-PCR diente extrahierte DNA aus humanem Blut sowie Fisch-DNA.

Sicherheitsmaßnahmen bei PCR-Arbeiten

Jede PCR wurde nach einem standardisierten, optimierten Protokoll durchgeführt.

Zum Schutz vor Kontaminationen wurde nur mit Reagenzien gearbeitet, die initial in dampfsterilisierte Reaktionsgefäße aliquotiert worden waren. So konnten

sie für nur einen Ansatz verwendet werden. Eventuelle Restvolumina wurden verworfen.

Zudem waren nur gestopfte Pipettenspitzen und getrennte Pipettensätze im Einsatz.

Die einzelnen Arbeitsschritte wie Ansetzen des Reaktionsmixes, Zugabe der Positivkontrolle, PCR-Durchführung und Darstellung des PCR-Produkts im Gel wurden entsprechend des Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik (MiQ) für diagnostische Verfahren der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM; Roth et al., 1997) an räumlich getrennten Arbeitsplätzen unter Verwendung stationärer Arbeitsgeräte durchgeführt.

Auch wurden die Verhaltensempfehlungen zum Arbeiten an Sterilbänken beachtet.

Alle Arbeitsflächen wurden regelmäßig mit einer 8%igen Natriumhypochloridlösung gereinigt und Gebrauchsgegenstände über Nacht mit UV-Licht bestrahlt.

3.3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Das 1,8 %ige Agarosegel wurde aus 50ml 1xTAE-Puffer und 0,9g Agarose hergestellt. In einem Erlenmaierkolben wurden beide Substanzen zusammen erhitzt, bis sich die Agarose ganz gelöst hatte. In auf 60°C abgekühltem Zustand wurde der Lösung dann 2,5µl Ethidiumbromid (EtBr; 0,1% in H₂O bidest) beigefügt. Zum Polymerisieren wurde das flüssige Gel in die Gelkammer gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Eventuell bestehende Luftblasen wurden mittels einer Pipettenspitze an den Gelrand gezogen und wenn möglich entfernt. Nach 20 minütigem Aushärten konnte das Gel in die Elektrophoresenkammer eingesetzt und mit TAE-Puffer überschichtet werden.

Zur Analyse der PCR-Amplifikationsprodukte wurden im Anschluß 10µl ihrer Suspension mit 5µl 1:2 mit Aqua bidest. verdünntem Ladepuffer in einer Mikrotiterplatte oder auf einem Parafilm vermischt. 10µl dieser Lösung wurden in eine Geltasche gefüllt.

Dann wurde eine Spannung von 90V angelegt, die die Fragmente dazu bringt mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zu ihrer Größe ist, im elektrischen Feld zu wandern. Das Gel war so nach ca. 30-45 Minuten auswertbar. Dazu war es unter einen UV-Transiluminator zu legen und in einem UV-Licht von 312nm mit Hilfe einer digitalen Video-Fotoanlage zu fotografieren. Die Ergebnisse wurden dabei in einem vorgegebenen Protokoll dokumentiert.

Längenbestimmung der PCR-Produkte

Mit den Amplifikaten lief gleichzeitig ein Molekulargewichtsmarker „Standard 100bp Leiter äquimolar“ der Firma Roth im Gel mit. Dieser besteht aus Phagen-DNA, die durch eine spezifische Restriktionsendonuklease in 12 Fragmente definierter Größe (1114-110 bp) gespalten ist. So wandern die Amplifikate mit den Fragmenten bekannter Länge parallel im Gel und durch den direkten Vergleich kann die Fragmentgröße bestimmt werden.

3.3.3.5 Sequenzierung der PCR-Produkte

Zur Sicherstellung, dass es sich bei der PCR gefundenen DNA mit gewünschter Fragmentlänge auch wirklich um ein Fragment der 18S rDNA von *Rhizopus arrhizus* handelt, sind die PCR-Produkte, die als positiv befundet wurden, zu sequenzieren und die Ergebnisse mit den Daten in GenBank® zu vergleichen. Bei diesem Tiermodell wurde dies stichprobenartig für die Proben 1, 7, 13 und 19 durchgeführt.

Unter Zuhilfenahme des QIAquick® PCR Purifikation Kit wurden die zu sequenzierenden PCR-Produkte den Herstellerangaben folgend aufgereinigt. Es sollen jegliche Störfaktoren, wie nicht verbrauchte DNA-Polymerase, Reste von Desoxynukleotiden und Primern, sowie Salze, entfernt werden, um nicht durch deren Interferieren verfälschte Ergebnisse zu erlangen.

Die DNA-Konzentration in den aufgereinigten Proben wurde mit dem Spektralphotometer bestimmt. Je nach der ermittelten Konzentration konnten nun 3-

12µl des aufgereinigten Amplifikats zur anschließenden Cycle-Sequenzreaktion herangezogen werden.

Angestrebt wurde dabei eine Konzentration von 90 ng DNA/µl.

Diese Sequenzierung wurde mittels des ABI PRIS®M Big Dye™ Cycle Sequencing Ready Reaction Kit durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Abwandlung der Kettenabbruchmethode nach Sanger et al.[47]. Die im Kit verwendeten fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide besitzen ein Wasserstoffatom an ihrem 3'Ende anstelle einer freien OH-Gruppe. Ihr Einbau während der Elongation führt zu einem Kettenabbruch an der jeweiligen Stelle. Da jedes von ihnen ein unterschiedliches Dichlororhodamin trägt, wird eine basenspezifische Kennzeichnung erreicht. So lassen sich DNA-Amplifikate bis zu einer Länge von 1000bp sequenzieren.

Der Reaktionsansatz für die Sequenzierung setzte sich aus je 3-12µl des gereinigten PCR-Produkts, 4µl Big Dye Reaktionsmix und 3µl Sequenzierprimer (6 pmol/µl) (in diesem Fall ZM 3, 1:50 verdünnt), die mit Aqua bidest. zu einem Gesamtvolumen von 20µl aufzufüllen sind, zusammen. Der Big Dye Reaktionsmix bestand dabei aus: A-Dye Terminator (Dichloro[R6G]), T-Dye Terminator (Dichloro[ROX]), G-Dye Terminator (Dichloro[R110]), C-Dye Terminator (Dichloro[TAMARA]), Desoxynukleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dTTP, dUTP), 5 U Amplitaq DNA-Polymerase, FS (mit thermostabiler Pyrophosphatase) in Tris-HCL Puffer mit einem pH-Wert von 9,0 (siehe auch Tabelle 12).

Tabelle 12: Pipettierschema (20µl) für die Sequenzierung

Reagenzien	Pipettierschema
PCR-Produkt	3-12µl
Big Dye Reaktionsmix	4µl
Sequenzierprimer	3µl
Aqua bidest	1-10µl

Die Cycle-Sequenzreaktion wurde mit dem in Tabelle 13 dargestellten Temperaturprofil gefahren.

Tabelle 13: Sequenzierungs-PCR-Temperaturprofil

25 Zyklen:	Denaturierung	30 Sek. 96°C
	Primeranlagerung	15 Sek. 50°C
	DNA Synthese	4 Min. 60°C

Entsprechend des Herstellerprotokolls wurden die erhaltenen Produkte von eventuell verbliebenen Dye-Terminatorenresten mittels Centri-Sep®-Zentrifugationssäulen gereinigt.

Sequenzanalyse

Im Anschluss wurde die DNA in einem 6%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe Polyacrylamid-Gelelektrophorese) und vom Detektionsmodul des 373 Automated DNA-Sequencer mit ABI PRISM® System analysiert.

Mit Hilfe der Programme Datacollection 1.2.1. und Analysis 2.1. wurden die direkt an einen Macintosh Quadra 650 Computer weitergeleiteten aufgezeichneten Signale ausgewertet und als Basencodedefolge (A-T-G-C) im Chromatogramm dargestellt.

Die ermittelten Basensequenzen waren mit Hilfe der Suchprogramme BLAST (NCBI) und FASTA (EMBL) mit in GenBank® aufgeführten Nukleotidsequenzen auf Homologien hin zu vergleichen.

3.3.3.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, die sequenzierten DNA-Fragmente zu analysieren. Mit Hilfe dieser sogenannten PAGE lassen sich DNA-Sequenzen bis auf eine Basenpaarlänge hin unterscheiden.

Das Gel stellt eine Art Molekularsieb dar, das durch die Kopolymerisation von Acrylamid und Methylenbisacrylamid entstanden ist. In seinen Poren, deren Weite durch unterschiedliche Konzentrationen der Acrylamide variiert werden kann, bleiben die Amplifikate entsprechend ihrer Größe hängen.

Zu 60ml 6%iger Gellösung wurden 350µl 10%iges Ammoniumpersulfat (APS) und zum Schluss 50µl Tetramethyldiamin (TEMED) zugegeben, das durch seine Reaktion mit APS als Radikalkettenstarter für die Polymerisation dient.

Die Lösung wurde zwischen zwei horizontale Glasplatten, die durch Abstandhalter voneinander getrennt waren, gegossen.

Nach abgeschlossener Polymerisation wurden die Amplifikate der Sequenzierungs-PCR in 5µl Formamid / EDTA-Ladepuffer aufgetragen, die Gelkammer mit 1xTAE Laufpuffer beschichtet und eine Spannung von 150-200 V angelegt.

3.3.4 LightCycler-PCR

Durchführung

Die LightCycler-PCR Zielsequenz liegt wie die der Standard-PCR im 18S rRNA-Gen von Zygomyceten. Die dabei verwendeten Primer ZM1 und ZM2 (siehe Tabelle 4) sind den Positionen 711-730 und den dazu korrespondierenden Positionen 1117-1096 von *Rhizopus arrhizus* (GenBank®, Accession number AF113440) komplementär und amplifizieren ein 408bp langes Segment. Als Hybridisationsproben für die spezifische Detektierung der *Rhizopus arrhizus*-Amplifikate wurden Rhory-HP1 und Rhory-HP2 verwandt (siehe Tabelle 14), die wiederum den Positionen 802-822 und den dazu korrespondierenden Positionen 825-852 von *Rhizopus arrhizus* (GenBank®, Accession number AF113440) komplementär sind.

Tabelle 14: Oligonucleotide der LightCycler- Hybridisationsproben ([FL]: Fluoreszein; [Red640]: LightCycler-Red-640-N-Hydroxy-Succinimid Ester)

Rhory-HP1	CGT TGG TTT AGG TAC TTC AGT-[FL]
Rhory-HP2	[Red640]-TGA TGA ATA GAA ACG GTT AGG GGC ATT

Für die Durchführung der LightCycler-PCR wurde der Applied Biosystems Roche AmpliTaq®DNA-Kit eingesetzt.

Der Reaktionsansatz in den LightCycler-Kapillaren bestand dabei aus 20µl: 5µl extrahierter DNA in einem Gesamtvolumen von 20µl ergänzt durch Zugabe von 2µl LightCycler Fast Start DNA Master Hybridization Probes , MgCl₂ Lösung (zur Unterstützung der Primerbindung), der beiden Primer, sowie der beiden Hybridisationsproben Rhory 1 und 2 und Aqua bidest. (genaues Pipettierschema siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Reaktionsansatz der LightCycler-PCR

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
LightCycler Fast Start DNA Master Hybridization Probes	2µl	
MgCl ₂ -Lsg., 25 mM	1,6µl	3mM
Primer ZM1, 100µM	0.1µl	0,5µM
Primer ZM2, 100µM	0.1µl	0,5µM
Hybridisation probe Rhory-HP 1,3 µM	1.33µl	0.2µM
Hybridisation probe Rhory-HP 2,3 µM	1.33µl	0.2µM
Aqua bidest.	8.54	
Ansatzvolumen	15µl	
DNA-Volumen	5µl	
Gesamtvolumen	20µl	

Die Kapillaren wurden verschlossen, kurz zentrifugiert und in den LightCycler positioniert. Die Reaktionsgemische der LightCycler-PCR unterliefen nun nach anfänglicher 10 minütiger Denaturierung 50 Zyklen mit den Reaktionsstufen Denaturierung bei 95°C für 10s, Anlagerung der Primer bei 50°C für 20s und Verlängerung der Primer bei 72°C für 30s. Die Reaktion wurde durch eine Kühlung bei 40°C über 2 Minuten abgeschlossen (Tabelle 16).

Tabelle 16: Zygomyceten-LightCycler-PCR-Temperaturprofil

50 Zyklen:	Denaturierung	10 Sek. 95°C
	Primeranlagerung	20 Sek. 50°C
	DNA Synthese	30 Sek. 72°C

Die Fluoreszenz zur Bestimmung der Crossing Points wurde dabei am Ende jeder Primer-Anlagerungsphase gemessen. War nach mehr als 35 Zyklen keine Fluoreszenz ermittelbar, wurde die Probe als negativ gewertet.

Kontrollen

Jedem Ansatz wurde eine Positiv- und eine Negativkontrolle zugefügt. Bei der Negativkontrolle wurde das DNA-Volumen durch Aqua bidest. ersetzt. Bei der Positivkontrolle wurden 5µl *Rhizopus arrhizus*-DNA dem Reaktionsmix beigelegt.

Sicherheitsmaßnahmen

Vor der ersten Denaturierung besteht das Risiko einer unspezifischen Primeranlagerung und damit der Synthese unspezifischer Amplifikate. Diese nicht-spezifischen Produkte könnten dann während der PCR-Zyklen mit den spezifischen Produkten konkurrieren und die Amplifikations-Effizienz dieser senken. Um das zu verhindern, wurde im LightCycler-PCR-Ansatz eine modifizierte thermostabile Form einer rekombinanten *Taq* DNA-Polymerase verwendet. Diese ist bei Raumtemperatur inaktiv, so dass es zu keiner Elongation vor der ersten Denaturierung kommen kann. Das Enzym wird so erst bei der anfänglichen 10minütigen Denaturierung bei 95° aktiviert.

3.3.5 Statistische Methoden

3.3.5.1 Lineare Regression

Eine Regressionsanalyse ist ein statistisches Verfahren, das nach einer Beziehung zwischen einer abhängigen und einer oder mehreren unabhängigen Variablen sucht. Zur Beschreibung dieses gerichteten Zusammenhangs verwendet man eine Funktion. Die lineare Regression beschreibt so den linearen Zusammenhang zwischen einer abhängigen und einer unabhängigen Variablen.

In dieser Arbeit konnten signifikante lineare Zusammenhänge zwischen Infektiionsdosis und Überlebenszeit, sowie Anteil infizierter Organe identifiziert werden, die durch solche Funktionen beschrieben werden konnten.

3.3.5.2 Rsquare

Rsquare, das Bestimmtheitsmaß, gibt den Anteil der zu erklärenden Varianz an der Gesamtvarianz an.

Rsquare = 0 Modell erklärt nichts an Varianz.

Rsquare = 1 Modell erklärt Varianz vollständig

Ein Rsquare nahe 1 bedeutet, dass das Modell die Daten gut erklärt.

3.3.5.3 Rsquare adjusted

Der Rsquare adjusted berücksichtigt die Anzahl der für ein Modell verwendeten Parameter.

3.3.5.4 Maximum-likelihood-Methode

Die Maximum-likelihood-Methode ist ein Verfahren zur Schätzung der Populationskennwerte auf Grundlage von Stichprobenwerten. In dieser Arbeit wurde sie zur Einschätzung der Sensitivität der jeweiligen Methode zum Nachweis der Infektion eines bestimmten Organs benutzt. Zudem wird der Unterschied der Sensitivitäten der Methoden zueinander dargestellt.

Um zu einem positiven Testergebnis zu kommen, müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein: Das Tier muss infiziert sein, das jeweilige untersuchte

Organ muss infiziert sein und die verwendete Methode muss die Infektion adäquat detektieren können. Es sei p die Wahrscheinlichkeit, dass ein Tier infiziert ist. Es sei p_0 die Wahrscheinlichkeit, dass ein Organ infiziert ist und es sei s_M die Sensitivität der jeweiligen Methode, d. h. für die Methoden Histologie, Kultur, PCR und LightCycler-PCR seien die Sensitivitäten s_{Histo} , s_{Kultur} , s_{PCR} und s_{LC} . Das Modell kann für weitere Methoden in gleicher Weise erweitert werden. Aus dieser Überlegung ergibt sich:

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Test positiv ausfällt ist $p \cdot p_0 \cdot s_M$.

Da alle drei Parameter schlecht zu schätzen sind, wird die Infektionswahrscheinlichkeit mit $p \cdot p_0$ zusammengefasst. Bis auf das Tier 24 sind alle Tiere, die eine Sporendosis erhielten, auch infiziert. Die fehlende Infektion dieses Tieres beeinträchtigt die Schätzung von p_0 , nicht jedoch den eigentlich gesuchten Wert s_M . Daher kommt es zu keiner Beeinträchtigung der Aussagekraft.

Es wird angenommen, dass die Infektionswahrscheinlichkeit von der Dosis abhängt. Bei Dosis 0 wird kein Tier infiziert, bei hohen Dosen werden alle Tiere infiziert. Dazwischen wurde ein sigmoider Verlauf angenommen, wie er oft bei Dosis-Wirkungskurven beobachtet wird. Die Infektionswahrscheinlichkeit $P(\text{Dosis})$ eines Tieres lässt sich in diesem Fall mit der folgenden Funktion in Abhängigkeit von der Dosis beschreiben:

$$P(\text{Dosis}) = \frac{1}{1 + \left(\frac{D50}{\log_{10}(\text{Dosis})} \right)^a}$$

Dabei sind a und $D50$ die Parameter der Kurve, genauer ist $D50$ die Dosis, bei der 50% der Tiere infiziert werden, a beschreibt die Steilheit der sigmoiden Kurve.

Um nun die Sensitivität für die jeweilige Methode, im Vergleich zu den anderen Methoden, zu errechnen, wird die Likelihood-Funktion aufgestellt. Diese stellt sich, wie hier am Beispiel der Proben für die Histologie, wie folgt dar:

$$\frac{1}{1 + \left(\frac{D50}{\log_{10}(Dosis)} \right)^a} \times \begin{pmatrix} [1 - sHisto]^{[1-H]} x \\ [1 - sHisto + dKultur]^{[1-K]} x \\ [1 - sHisto + dPCR]^{[1-P]} x \\ [1 - sHisto + dLC]^{[1-L]} x \\ sHisto^H x \\ [1 - sHisto + sKultur]^K x \\ [1 - sHisto + sPCR]^P x \\ [1 - sHisto + sLC]^{LC} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} [1 - H] x \\ [1 - K] x \\ [1 - P] x \\ [1 - L] \end{pmatrix} x$$

$$\left(1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{D50}{\log_{10}(Dosis)} \right)^a} \right)$$

H, K, P, L der Funktion bezeichnen das bei der Probenuntersuchung ermittelte Ergebnis mit der jeweiligen Methode. Ein positives Ergebnis wird mit „1“ angegeben, ein negatives Ergebnis mit „0“.

Ergeben alle vier Methoden ein negatives Ergebnis, so ist der erste Summand Null und es bleibt 1- P(Dosis). Sobald ein Organ bei mindestens einer Methode als positiv nachgewiesen wird, fällt der zweite Summand weg und es wird angenommen, dass das Organ infiziert ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass alle vier Methoden zufällig ein falsch negatives Ergebnis zeigen, wird hier vernachlässigt. Auch wird angenommen, dass die Spezifität der Methoden gleich 1 ist .

Mit der Funktion kann nun die Sensitivität sM einer Methode mit dem Unterschied dM der anderen Methoden dazu geschätzt und anschließenden auf seine Signifikanz überprüft werden.

Es zeigte sich, dass bei Leber und Niere die Infektionswahrscheinlichkeit bei den getesteten Dosen so hoch war, dass die Tiere der Stichprobe immer infiziert waren und die Infektionswahrscheinlichkeit im Modell deshalb als konstant

angenommen wurde. Die Infektionswahrscheinlichkeit wird dann mit p_i bezeichnet und die ermittelten Schätzwerte werden mit p_{Leber} und p_{Niere} angegeben.

3.3.5.5 Odds-Ratio

Um das Verhältnis zweier Sensitivitäten auszudrücken, wird die Odds-Ratio verwendet:

$$\Psi = \frac{s_1/(1-s_1)}{s_2/(1-s_2)}$$

Sie drückt aus, um welchen Faktor die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses mit Methode 1 größer ist als mit Methode 2.

4 Ergebnisse

4.1 Das Tiermodell

4.1.1 Überlebensbeobachtung

In der Gruppe mit der höchsten Infektionsdosis von 5×10^6 Sporen überlebte kein Tier die gesamte Versuchsdauer. Von den mit 5×10^5 Sporen infizierten Mäusen überlebten nur 3 Tiere von 8 Tieren die komplette Beobachtungszeit. Zwischen dieser und der nächst niedrigeren Infektionsdosis von 6×10^4 Sporen zeigte sich kein wesentlicher Unterschied, hier lebten nur noch 4 von 8 Tieren bei Versuchsende.

In der Gruppe mit der niedrigsten Infektionsdosis von 5×10^3 Sporen überlebten 7 von 8 Tiere und in der Kontrollgruppe überlebten alle Tiere die komplette Versuchsdauer.

Zur Diagnostik wurden alle noch lebenden Tiere am 21. Tag nach Beobachtungsbeginn mit einer Pentobarbital-Überdosis getötet (zur Überlebensdauer siehe auch Abbildung 6).

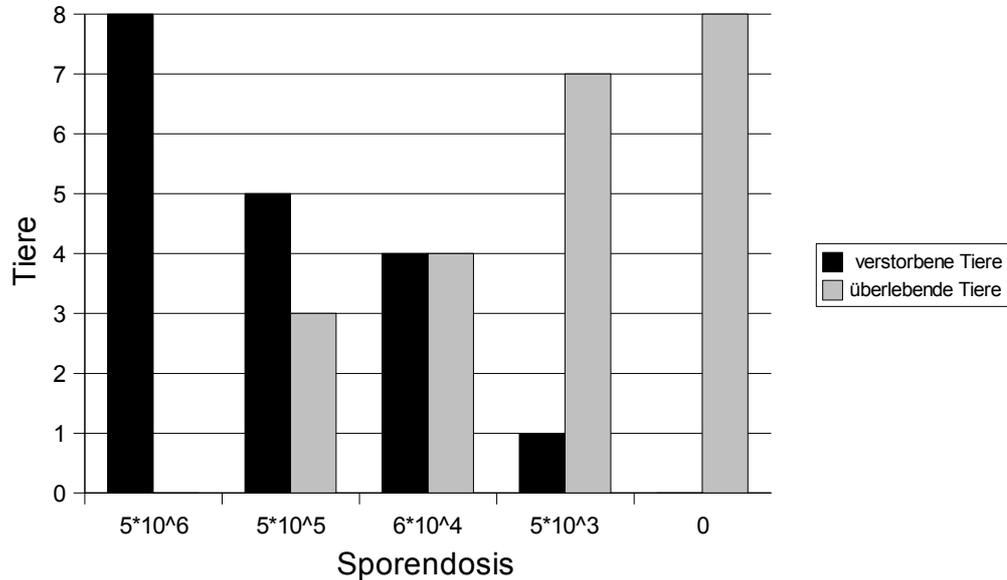


Abbildung 6: Darstellung der verstorbenen/überlebenden Tiere abhängig von der Infektionsdosis am Ende der 21 tägigen Beobachtung

In Abbildung 7 sind die Überlebenskurven der Tiere, die mit unterschiedlichen Sporenmengen infiziert wurden, dargestellt. Man sieht hier keine Überschneidung der Kurven, d. h. von einer niedrigeren Dosisgruppe waren zu keinem Zeitpunkt mehr Tiere gestorben, als bei einer höheren Dosisgruppe. Es ist deutlich eine Beziehung zu erkennen: je höher die verabreichte Sporendosis war, desto mehr Tiere verstarben während des Beobachtungszeitraumes.

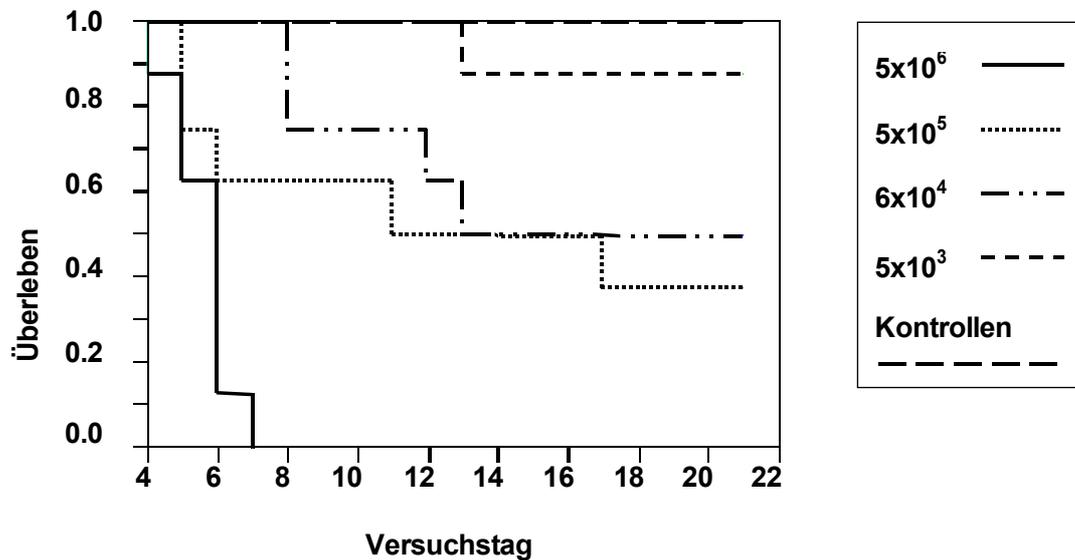


Abbildung 7: Überleben der infizierten Mäuse in Abhängigkeit von der Konzentration der zur Infektion verwendeten Pilzsporen dargestellt als Kaplan Meier-Kurve

4.1.2 Modell

Die willkürliche Beendigung des Tiermodells durch das Töten der Tiere am 21. Tag des Beobachtungszeitraums schränkt die Aussage über das Überleben der Tiere ein. Den Daten wird dadurch eine sogenannte Zensur zugefügt. Um eine gültige Aussage über die Überlebenszeiten der Tiere machen zu können, wird den Daten daher ein Modell angepasst, das diese Zensur berücksichtigt. In dem Modell zeigt sich eine annähernde Lognormalverteilung der Überlebenszeiten der Tiere, d. h., es scheint ein linearer Zusammenhang zwischen Überlebenswahrscheinlichkeit und Infektionsdosis zu bestehen. Abbildung 8 zeigt für jede Konzentration der Sporen die Daten und die angepassten Geraden in einem Lognormalplot.

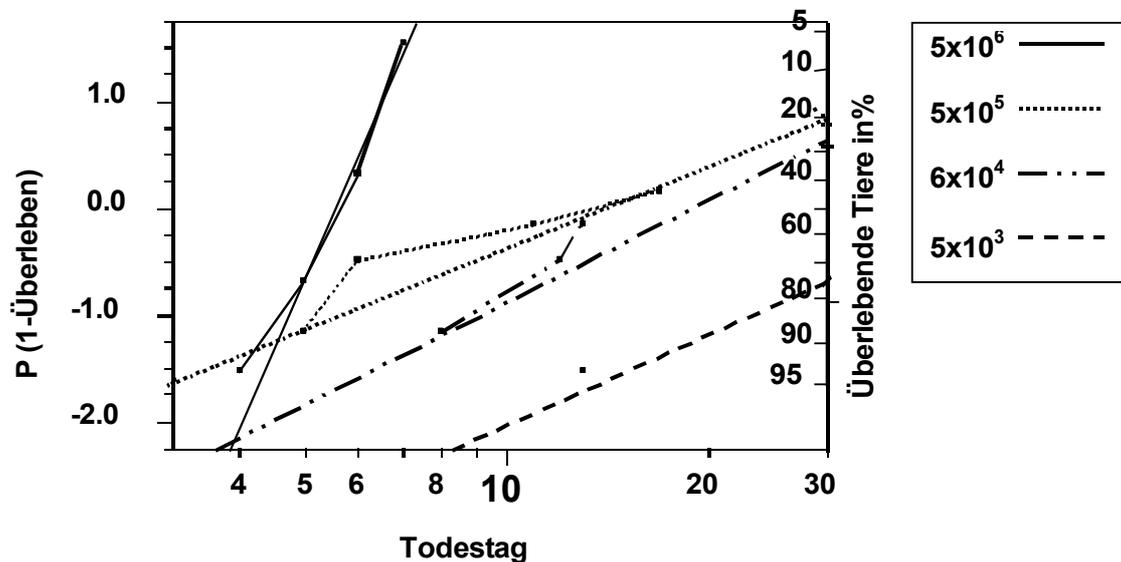


Abbildung 8: Lognormal Plot der Überlebenszeiten

Aus diesem Modell ergeben sich die mittleren Todestage in Tabelle 11. Diese Tabelle zeigt, dass der mittlere Todestag bei Berücksichtigung der Zensur in der Gruppe mit der Infektionsdosis von 5×10^6 Sporen am 5,6. Tag liegt. Bei den mit 5×10^5 Sporen infizierten Mäusen liegt der mittlere Todestag am 14,1. Tag, bei den mit 6×10^4 Sporen infizierten Mäusen am 19,0. Tag und bei den mit 5×10^3 Sporen infizierten Tieren am 52,7. Tag unter Beachtung der Zensur.

Tabelle 17: mittlere Todestage der einzelnen Dosisgruppen unter Berücksichtigung des Zensors (Tötung aller Tiere am Tag 21. des Versuchs)

Dosisgruppe	mittlerer Todestag aus Modell	Standardabweichung	Todestag aus Modell
5×10^3	52,7		2,27
6×10^4	19,0		2,07
5×10^5	14,1		2,50
5×10^6	5,6		1,18

Untersucht man den Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der den Tieren verabreichten Sporendosis und den Logarithmen der Überlebenszeiten aus dem Modell, stellt sich dieser als annähernd linear dar:

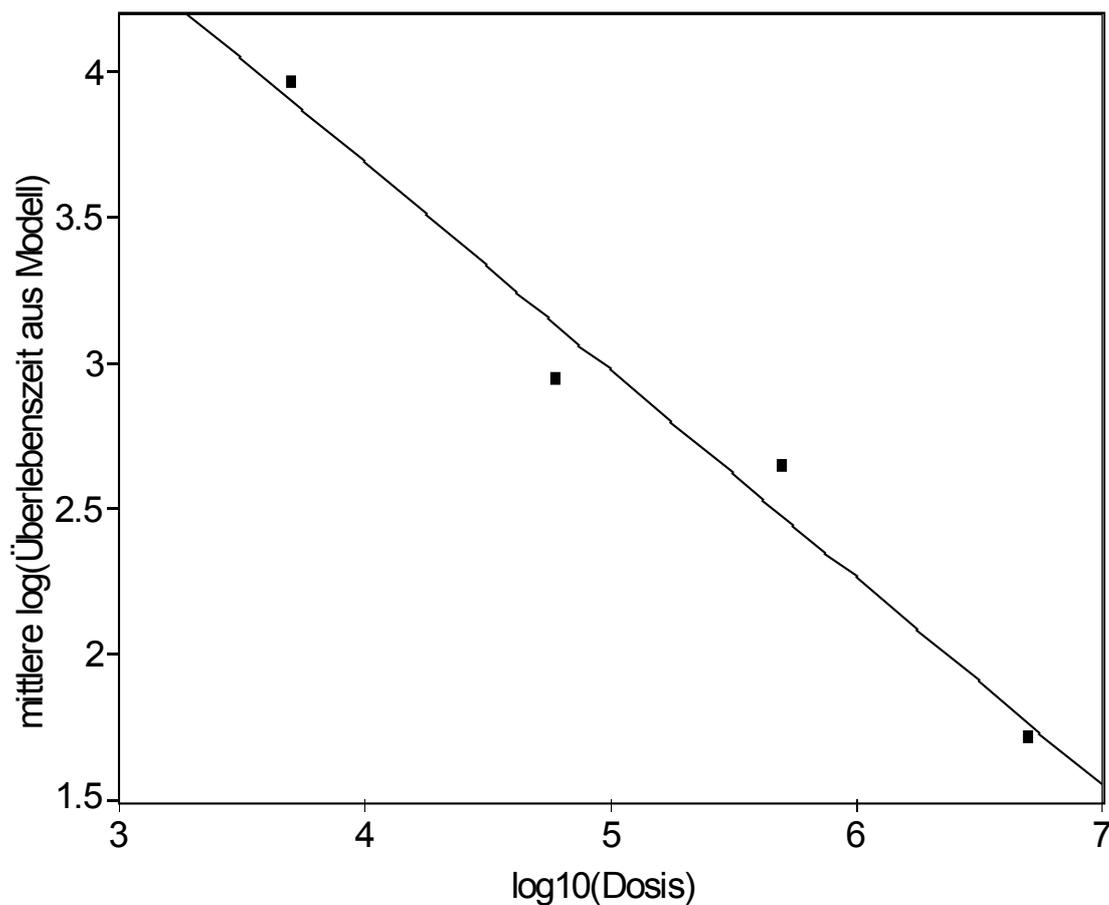


Abbildung 9: Zusammenhang zwischen Sporendosis und den Überlebenszeiten aus dem Modell

Aus diesem neuen Modell ergibt sich folgende Formel:

$$\log(\text{Mittlere Überlebenszeit aus Modell}) = 6.54 - 0.71 \log_{10}(\text{Dosis})$$

mit Hilfe derer die erforderliche Dosis bei gewünschter Überlebensdauer der Versuchstiere zu ermitteln ist. Das Bestimmtheitsmaß R^2 ist hier 0,97, der R^2 adjusted liegt hier bei 0,96. Es kann also von einer hohen Validität der mit der Formel errechneten Voraussagen ausgegangen werden.

Mit einem $p = 0,014$ ergibt sich eine signifikante Abhängigkeit der Überlebenszeit von der Infektionsdosis.

4.1.3 Fazit

Bei der weiteren Forschung zur Zygomycose ist die Verwendung dieses Modells zur Grundlage der Versuchsplanung und Durchführung vorstellbar. Zum einen kann das Modell zur Interpretation von Daten aus einer, mit diesem Mausmodell durchgeführten Therapiestudie herangezogen werden. Zum anderen ist es möglich, mit Hilfe der aus dem Modell ermittelten Formel die Überlebensdauer der Versuchstiere durch Verabreichung einer errechneten Dosis zu beeinflussen.

4.2 Untersuchungsmethoden

Bei den Ergebnissen der verschiedenen Methoden werden die Proben der Organe im Folgenden wie in Tabelle 3 aufgeführt bezeichnet.

4.2.1 Histologie

Bei der Histologie wurden insgesamt 200 mit HE-, PAS- und nach Grocott gefärbte Proben unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Es wurden 55 Proben durch den mikroskopischen Nachweis von Hyphen als positiv befundet, bei 143 Proben zeigten sich keine Hyphen im Gewebe, 2 Proben konnten auf Grund von Materialverlust nicht evaluiert werden.

Tabelle 18: Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Gewebeproben von den 40 ICR Mäusen des Experimentes. Die histologischen Ergebnisse wurden wie folgt semiquantifiziert: das „+“ Zeichen gibt den positiven histologischen Nachweis von Hyphen des *Rhizopus arrhizus* im gesamten Gewebeschnitt an. 1-5 Hyphen wurden mit „+“, 6-10 Hyphen mit „++“, 11-15 Hyphen mit „+++“, sowie 16 und mehr Hyphen mit „++++“ angegeben, fehlender Hyphenachweis wurde mit „-“ gekennzeichnet.

Probe	Ergeb.								
1	+	41	+	81	-	121	-	161	-
2	+	42	+	82	+	122	++	162	-
3	+	43	+	83	-	123	-	163	-
4	++++	44	++++	84	++	124	-	164	-
5	+++	45	++++	85	++++	125	+++	165	-
6	-	46	-	86	-	126	-	166	-
7	++	47	-	87	++	127	-	167	-
8	-	48	+	88	-	128	-	168	-
9	++	49	+++	89	-	129	-	169	-
10	++++	50	++	90	++++	130	-	170	-
11	+	51	-	91	-	131	-	171	-
12	++	52	+++	92	++	132	-	172	-
13	-	53	-	93	-	133	-	173	-
14	++	54	-	94	-	134	-	174	-
15	++++	55	++++	95	+++	135	-	175	-
16	+	56	-	96	-	136	-	176	-
17	++	57	+++	97	-	137	-	177	-
18	+	58	-	98	-	138	-	178	-
19	+++	59	+	99	+	139	-	179	-
20	++++	60	++++	100	+++	140	-	180	-
21	+	61	-	101	-	141	-	181	-
22	-	62	-	102	-	142	-	182	-
23	+	63	-	103	-	143	-	183	-
24	++	64	-	104	-	144	-	184	-

25	++++	65	-	105	-	145	-	185	-
26	-	66	-	106	-	146	-	186	-
27	+	67	-	107	-	147	-	187	-
28	+	68	-	108	-	148	-	188	-
29	-	69	-	109	-	149	-	189	-
30	+++	70	-	110	-	150	-	190	-
31	-	71	-	111	-	151	-	191	-
32	+++	72	-	112	-	152	-	192	-
33	+	73	-	113	-	153	-	193	-
34	+	74	-	114	-	154	-	194	-
35	++++	75	-	115	-	155	+++	195	-
36	-	76	-	116	-	156	-	196	-
37	+++	77	-	117	-	157	-	197	-
38	-	78	-	118	-	158	-	198	-
39	-	79	-	119	-	159	-	199	-
40	++++	80	-	120	nicht eval.	160	-	200	nicht eval.

Stellt man die Verteilung der ermittelten Ergebnisse grafisch dar, sieht man die Tendenz der Zunahme von erkrankten Organen mit steigender verabreichter Sporendosis. Außerdem fällt eine hohe Anzahl positiver Ergebnisse bei Untersuchung von Leber und Niere auf, während in den Schnitten des Gehirns seltener Hyphen beobachtet werden konnten.

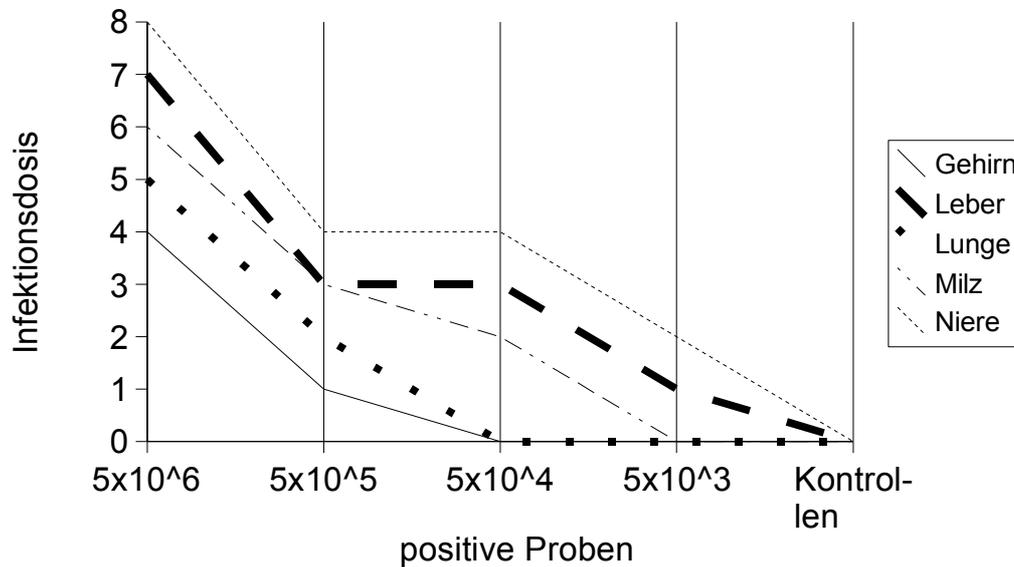


Abbildung 10: Grafische Darstellung der Verteilung der positiven Kulturergebnisse bezogen auf die verabreichte Infektionsdosis und das jeweilige Organ

Zur weiteren Veranschaulichung des Ergebnisses werden die Hyphenmengen im jeweiligen Organ grafisch im Mosaikplot dargestellt. Es zeigt sich dabei eine Zunahme der Menge der gefundenen Hyphen mit steigender Infektionsdosis. Es ist eine Organpräferenz zu beobachten; während selbst in der Gruppe mit der höchsten Infektionsdosis nur vereinzelt Hyphen im Gehirn nachzuweisen waren, stieg die Menge nachweisbarer Hyphen in Milz, Leber und Niere mit Infektionsdosis deutlich an.

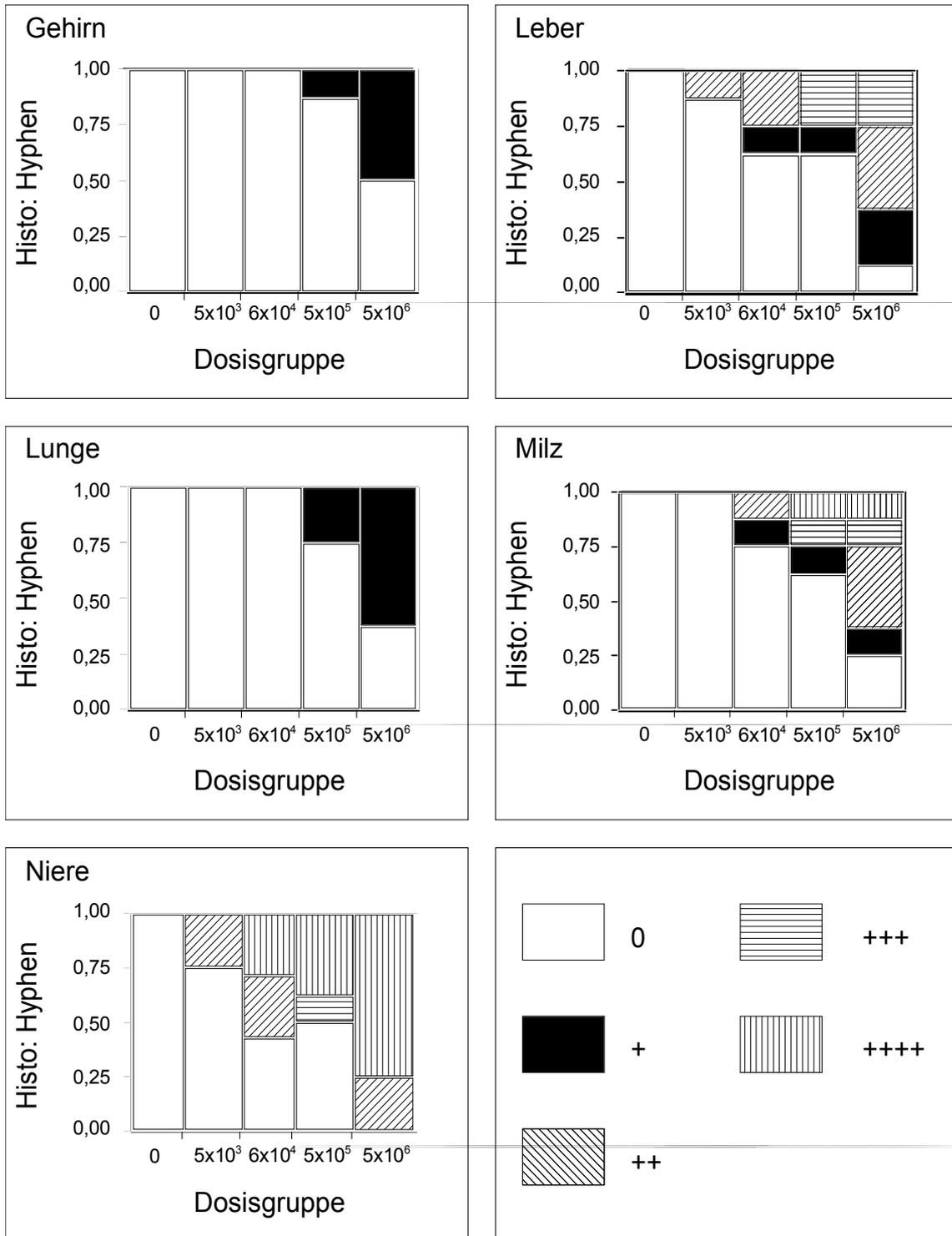


Abbildung 11: Darstellung der gesichteten Hyphenanzahl pro Organ und Dosis

Da sich bei keinem Tier der Kontrollgruppe (Probe 161-200) ein positives Ergebnis zeigt, scheint die Annahme, dass die Spezifität dieser Methode gleich 1 ist, gerechtfertigt.

4.2.2 Kultur

Die aus den Gewebebiopsien angelegten Kulturen wurden nach einer Inkubationszeit von 16h auf koloniebildende Einheiten (KBE) hin untersucht. Bei 91 Proben konnte Pilzwachstum beobachtet und dokumentiert werden. 109 Proben blieben auch nach mehrtägiger Beobachtung negativ.

Tabelle 19: Quantitative Kulturergebnisse der Organbiopsien, angegeben sind die koloniebildenden Einheiten pro Biopsie. Konnten keine Pilzkolonien aus den Gewebeproben gezüchtet werden, wurde das Ergebnis mit „0“ bezeichnet.

Probe	Ergebnis	Probe	Ergeb.	Probe	Ergeb.	Probe	Ergeb.	Probe	Ergeb.
1	900	41	135	81	10	121	0	161	0
2	5000	42	1100	82	125	122	0	162	0
3	4000	43	300	83	10	123	150	163	0
4	4000	44	305	84	65	124	0	164	0
5	6000	45	1000	85	10	125	80	165	0
6	280	46	70	86	0	126	0	166	0
7	1400	47	700	87	60	127	10	167	0
8	700	48	310	88	30	128	0	168	0
9	6000	49	230	89	70	129	0	169	0
10	1100	50	1100	90	20	130	0	170	0
11	18000	51	20	91	0	131	0	171	0
12	8000	52	700	92	750	132	20	172	0
13	700	53	900	93	100	133	0	173	0
14	0	54	350	94	175	134	0	174	0
15	1200	55	110	95	50	135	0	175	0
16	180	56	0	96	10	136	30	176	0
17	100	57	65	97	1500	137	10	177	0

18	140	58	0	98	20	138	0	178	0
19	100	59	95	99	100	139	10	179	0
20	70	60	0	100	40	140	140	180	0
21	545	61	0	101	0	141	0	181	0
22	15000	62	0	102	10	142	0	182	0
23	10000	63	0	103	0	143	0	183	0
24	8000	64	0	104	0	144	0	184	0
25	12000	65	0	105	10	145	0	185	0
26	180	66	20	106	0	146	0	186	0
27	21000	67	0	107	0	147	10	187	0
28	18000	68	0	108	0	148	0	188	0
29	2200	69	0	109	0	149	0	189	0
30	3100	70	0	110	0	150	0	190	0
31	200	71	0	111	0	151	0	191	0
32	200	72	0	112	110	152	110	192	0
33	200	73	0	113	0	153	0	193	0
34	100	74	0	114	20	154	0	194	0
35	400	75	0	115	135	155	20	195	0
36	60	76	0	116	0	156	0	196	0
37	400	77	0	117	0	157	0	197	0
38	160	78	0	118	0	158	0	198	0
39	100	79	0	119	0	159	0	199	0
40	120	80	0	120	0	160	0	200	0

Bei den ermittelten Ergebnissen, ist vor allem in der grafischen Darstellung die Zunahme von erkrankten Organen mit steigender verabreichter Sporendosis zu erkennen. Zudem werden auch hier vermehrt positive Ergebnisse bei Untersuchung der Leber und Niere ermittelt, während aus den Biopsien des Gehirns seltener KBEs gezüchtet werden konnten.

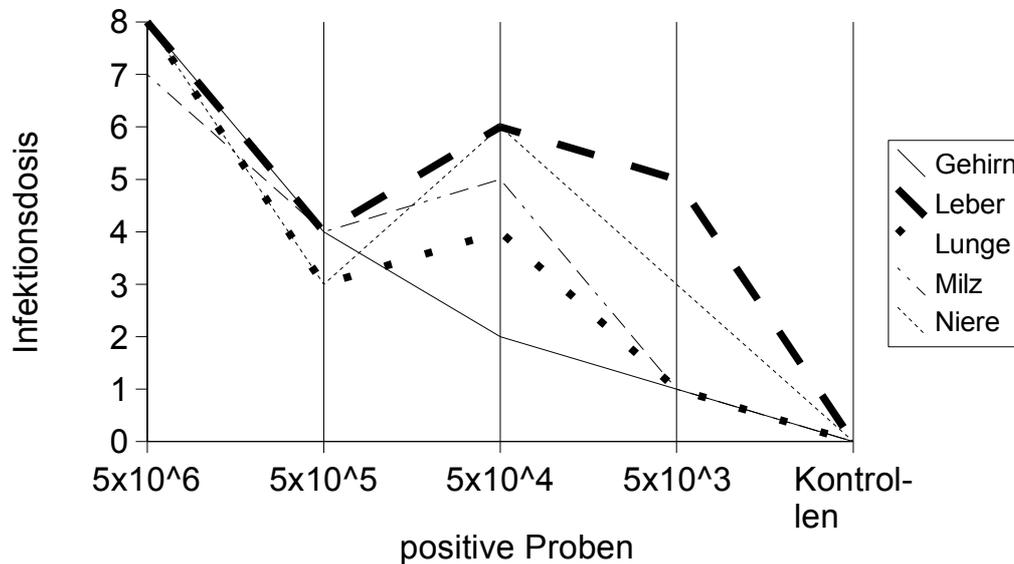


Abbildung 12: Grafische Darstellung der Verteilung der positiven Ergebnisse der Kultur bezogen auf die verabreichte Infektionsdosis und das jeweilige Organ

Auch die Menge der beobachteten KBEs im Verhältnis zur gegebenen Dosis kann für das jeweilige Organ grafisch dargestellt werden. Mit steigender verabreichter Sporendosis steigt hier die Anzahl der anzüchtbaren KBEs. Die Ausprägung der Zunahme scheint dabei vom untersuchten Organ abhängig zu sein und ähnelt der Verteilung der Ergebnisse aus der histologischen Untersuchung. Es zeigt sich auch hier eine Präferenz für Leber und Niere, auch bei Milz und Lunge zeigen sich hier ähnlich gute Nachweistendenzen. Weniger KBEs gehen aus den Hirnbiopsien hervor.

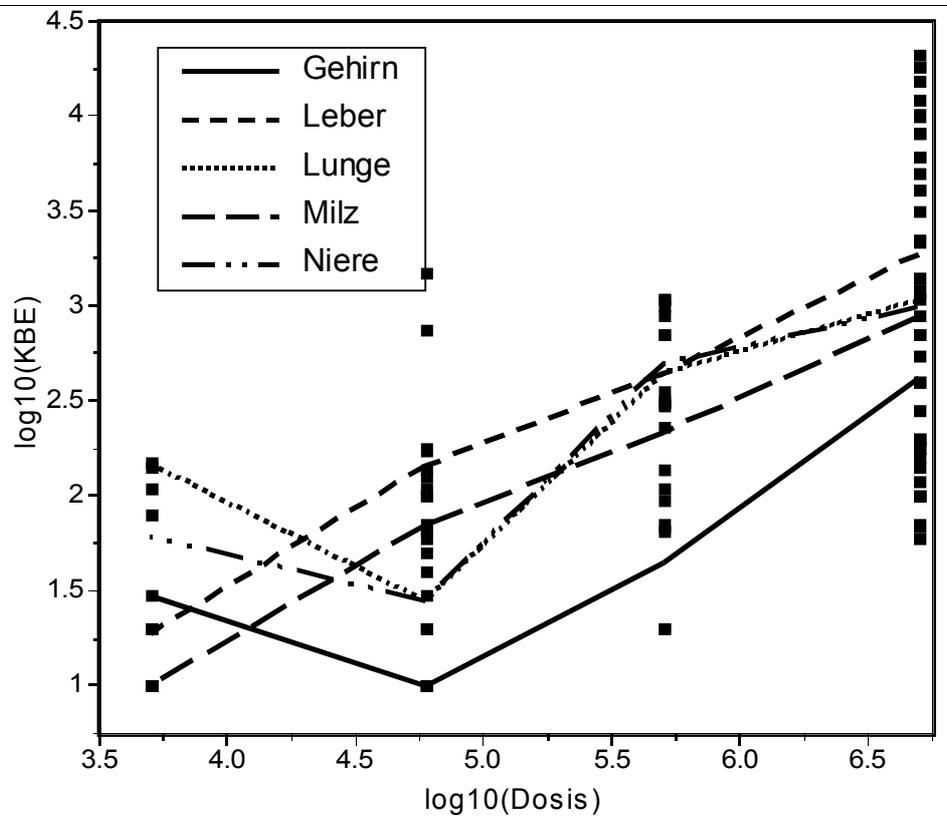


Abbildung 13: Darstellung der Anzahl mikroskopisch nachgewiesener KBEs im Verhältnis zur Dosis

Da sich bei keinem Tier der Kontrollgruppe (Probe 161-200) ein positives Ergebnis zeigt, scheint die Annahme, dass die Spezifität dieser Methode gleich 1 ist, gerechtfertigt.

4.2.3 PCR

Die Zielsequenz der PCR liegt im 18 S ribosomalen DNA-Gen von Zygomyceten.

Die Untersuchung der Proben wurde mit verschiedenen PCR-Verfahren durchgeführt:

4.2.3.1 Etabliertes Standardverfahren

Zuerst wurden die Biopsieextrakte einiger Proben mit einem am Institut bereits etablierten PCR-Standardverfahren zur Amplifikation zygomycetenspezifischer DNA untersucht [6]. Hier wurde im ersten Schritt die PCR mit den Primern ZM1 und ZM2 durchgeführt. Im anschließenden nested PCR-Verfahren wurde sich der Primer ZM1 und ZM3 bedient.

Zeigte sich in der Gelauswertung unter UV-Licht eine Bande auf der durch den Molekulargewichtsmarker gekennzeichneten Länge von 177 bp, wurde das Ergebnis als positiv befundet. Zeigte sich keine Bande bei der gewünschten Länge, wurde die PCR als negativ bewertet.

Tabelle 20: Evaluation der Gewebeproben mit PCR-Standardverfahren ([6]). Ein positives Ergebnis ist mit „+“, ein negatives mit „-“ gekennzeichnet.

Probe	Ergebnis	Probe	Ergebnis	Probe	Ergebnis	Probe	Ergebnis
1	+	141	+	161	+	181	+
2	+	142	+	162	+	182	+
3	+	143	+	163	+	183	+
4	+	144	+	164	-	184	+
5	+	145	+	165	+	185	+
6	+	146	+	166	+	186	+
7	+	147	+	167	+	187	+
8	+	148	+	168	+	188	+
9	+	149	-	169	-	189	-
10	+	150	+	170	+	190	+
11	+	151	-	171	+	191	+
12	+	152	+	172	+	192	+
13	+	153	+	173	+	193	+
14	+	154	-	174	-	194	-
15	+	155	+	175	+	195	+
16	+	156	-	176	+	196	+
17	+	157	+	177	-	197	+

18	+	158	+	178	+	198	+
19	+	159	+	179	+	199	+
20	+	160	-	180	+	200	+

4.2.3.2 Auswertung nach erster PCR

Die Ergebnisse des PCR-Standardverfahrens ([6]) zeigten hier äußerst unbefriedigende Ergebnisse. Ursache der vielen „falsch“ positiven Ergebnisse könnten Kreuzkontaminationen sein, die aber durch die negativen Kontrollen weitgehend ausgeschlossen werden konnten. Alternativ kommen unspezifische Amplifikationen in Betracht, was durch eine Sequenzierung der Amplifikate nachweisbar war. Wenn aber eine Differenzierung spezifische – unspezifische Amplifikation jedesmal eine Sequenzierung erfordert, ist die Methode für den Tierversuch zu aufwendig und teuer. Es wurde daher eine Alternative gesucht. Zunächst wurde nur die 1.PCR mit den Primern ZM1 und ZM2 durchgeführt – diese ergab aber bei allen untersuchten Proben ein negatives Ergebnis (Tabelle 21).

Tabelle 21: stichprobenhafte Auswertung der Gewebeproben nach der ersten PCR mit den Primern ZM1 und ZM2. Ein positives Ergebnis ist mit „+“, ein negatives mit „-“ gekennzeichnet.

Probe	Ergebnis	Probe	Ergebnis
71	-	131	-
72	-	132	-
73	-	133	-
74	-	134	-
75	-	135	-
76	-	136	-
77	-	137	-
78	-	138	-
79	-	139	-

Probe	Ergebnis	Probe	Ergebnis
80	-	140	-

Es zeigte sich so, dass die 1. PCR mit den Primern ZM1 / ZM2 für die Bewertung anhand eines ethidiumbromidgefärbten Agarosegels wenig sensitiv, also nicht geeignet ist.

Es wurde nun die Detektion des *Rhizopus arrhizus* in abgewandelter Form zum PCR-Standardverfahren ([6]) versucht:

4.2.3.3 PCR-ZM1-ZM3

Auf Grund der bisher ermittelten Ergebnisse wurde eine PCR mit den gesamten extrahierten Biopsaten mit den Primern ZM1 und ZM3 durchgeführt.

Zeigte sich in der Gelauswertung unter UV-Licht eine Bande auf der durch den Molekulargewichtsmarker gekennzeichneten Länge von 177bp, wurde das Ergebnis als positiv befundet. Zeigte sich keine Bande bei der gewünschten Länge, war das Ergebnis als negativ zu bewerten.

Tabelle 22: PCR-ZM1-ZM3-Evaluation der Gewebeproben. Ein positives Ergebnis ist mit „+“, ein negatives mit „-“ gekennzeichnet.

Probe	Ergebnis	Probe	Ergeb.	Probe	Ergeb.	Probe	Ergeb.	Probe	Ergeb.
1	+	41	+	81	+	121	-	161	-
2	+	42	+	82	+	122	+	162	-
3	+	43	-	83	+	123	-	163	-
4	+	44	+	84	+	124	+	164	-
5	+	45	+	85	+	125	+	165	-
6	+	46	+	86	+	126	-	166	-
7	+	47	+	87	+	127	-	167	-
8	+	48	+	88	+	128	-	168	-
9	+	49	+	89	+	129	-	169	-
10	+	50	+	90	+	130	-	170	-

11	+	51	-	91	-	131	+	171	-
12	+	52	+	92	+	132	-	172	-
13	+	53	+	93	+	133	+	173	-
14	+	54	+	94	-	134	-	174	-
15	+	55	+	95	+	135	-	175	-
16	+	56	+	96	-	136	-	176	-
17	+	57	+	97	+	137	-	177	-
18	+	58	-	98	+	138	-	178	-
19	+	59	+	99	+	139	-	179	-
20	+	60	+	100	+	140	+	180	-
21	+	61	-	101	+	141	-	181	-
22	+	62	-	102	-	142	-	182	-
23	+	63	-	103	+	143	-	183	-
24	+	64	-	104	-	144	-	184	-
25	+	65	+	105	-	145	-	185	-
26	+	66	+	106	+	146	-	186	-
27	+	67	+	107	+	147	+	187	-
28	+	68	+	108	-	148	+	188	-
29	+	69	+	109	-	149	-	189	-
30	+	70	+	110	+	150	+	190	-
31	+	71	-	111	+	151	+	191	-
32	+	72	+	112	+	152	+	192	-
33	+	73	+	113	+	153	+	193	-
34	+	74	-	114	-	154	-	194	-
35	+	75	+	115	+	155	+	195	-
36	+	76	-	116	-	156	-	196	-
37	+	77	-	117	-	157	+	197	-
38	+	78	-	118	-	158	+	198	-
39	+	79	-	119	-	159	-	199	-
40	+	80	+	120	-	160	-	200	-

Die Ergebnisse dieses PCR-Verfahrens wurden durch eine Probesequenzierung einiger Amplifikate (siehe 4.2.3.5) überprüft. Es ist hier von einer spezifischen Amplifizierung auszugehen.

Es handelt sich so bei der PCR mit den Primern ZM1 und ZM3 um eine sensitive Methode zur Detektion von *Rhizopus arrhizus* – DNA im Gewebe. Da sich außerdem bei keinem Tier der Kontrollgruppe (Probe 161-200) ein positives Ergebnis zeigt, scheint die Annahme, dass die Spezifität auch bei diese Methode gleich 1 ist, gerechtfertigt.

Stellt man die Verteilung der ermittelten Ergebnisse grafisch dar, sieht man auch hier die Tendenz der Zunahme von erkrankten Organen mit steigender verabreichter Sporendosis. Außerdem fällt ein hoher Grad an positiven Ergebnissen bei Untersuchung der Leber und Niere auf, während aus den Biopsien des Gehirns seltener Pilz-DNA amplifiziert werden kann.

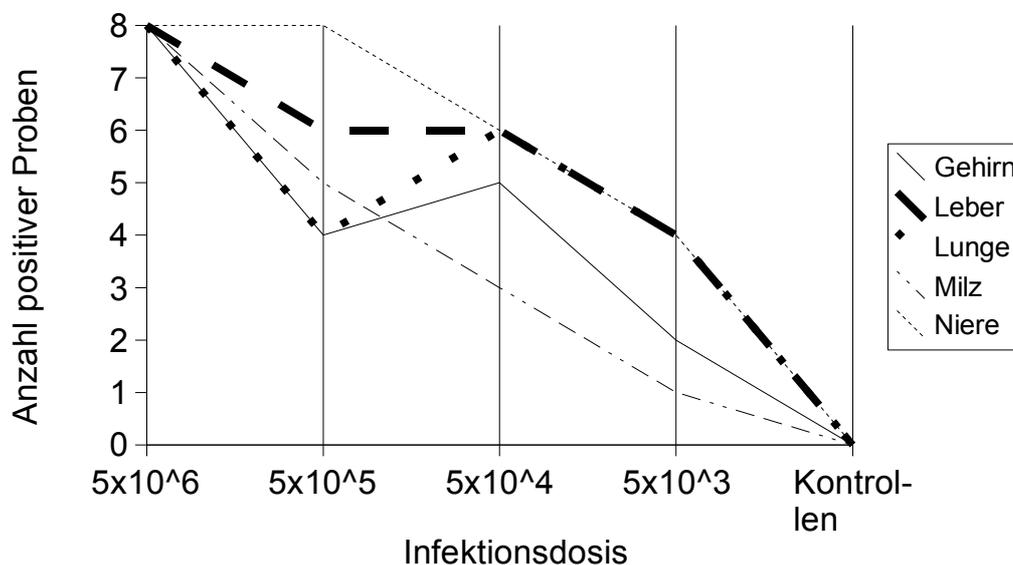


Abbildung 14: Grafische Darstellung der Verteilung der positiven Ergebnisse der PCR bezogen auf die verabreichte Infektionsdosis und das jeweilige Organ

4.2.3.4 Aktin-PCR

Ob eine erfolgreiche Extraktion stattgefunden hat, wurde durch den Nachweis von einem 479bp langem Stück der β -Aktin-DNA in den Proben bei diesem Experiment überprüft.

Tabelle 23: Aktin-PCR-Evaluation der Gewebeproben. Ein positives Ergebnis ist mit „+“, ein negatives mit „-“ gekennzeichnet.

Pro- be	Ergeb- nis	Probe	Erg	Probe	Erg	Probe	Erg	Probe	Erg
43	+	91	+	120	+	137	+	160	+
51	+	94	-	121	+	138	+	161	+
58	+	96	+	123	+	139	-	165	+
61	+	102	+	126	+	141	+	167	+
62	+	104	-	127	+	142	+	169	-
63	+	105	+	128	+	143	+	173	+
64	+	108	+	129	+	144	+	176	+
71	+	109	+	130	+	145	+	180	+
74	+	114	+	132	+	146	+	182	+
76	+	116	+	133	+	149	-	184	+
77	+	117	+	134	-	154	-	188	+
78	+	118	+	135	+	156	+		
79	+	119	+	136	+	159	+		

Bei der Überprüfung aller 53, mit der Zygomyceten-PCR negativen Proben, zeigte sich eine spezifische Bande bei 47 von 53 Proben (89%). Die Proben der Kontrollmäuse wurden stichprobenhaft auf Maus DNA kontrolliert. Von 10, bei der Zygomyceten-PCR negativen Proben, waren 9 positiv (90%). Bei den negativen Proben 94, 139 und 169 wurde stichprobenartig eine weitere Überprüfung über eine Verdünnungsreihe (1:5, 1:10) durchgeführt, um eine Inhibition der Aktin-PCR durch zu hohe DNA-Konzentrationen auszuschließen. Es konnte aber in keinem Fall Maus-DNA nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden die Proben der infizierten Mäuse, die eine Sporeninjektion erhalten hatten,

noch auf eventuell vorhandene Inhibitoren kontrolliert. Dazu wurden den sechs Proben zu einem erneuten PCR-Durchlauf 2 µl der Positivkontrolle hinzugefügt. Daraufhin zeigten alle Proben ein positives Ergebnis. Damit können PCR-Inhibitoren als Ursache eines fehlenden Maus-DNA-Nachweises ausgeschlossen werden und es ist von einer fehlerhaften DNA-Extraktion auszugehen, so dass das negative Ergebnis der Zygomyceten-PCR ebenfalls nicht gewertet werden kann.

4.2.3.5 Sequenzierung

Die Spezifität der Amplifikate aus der 18S rDNA-PCR wurde stichprobenhaft durch die Sequenzierung von 4 Proben überprüft.

Die Sequenz von vier Amplifikaten (Probennummer: 1, 7, 13 und 19) war zu 100% identisch mit der in GenBank® des National Center for Biotechnology Information, Washington (NCBI) hinterlegten 18S rDNA Sequenz von *Rhizopus arrhizus* (Gen Accession No 113440).

4.2.3.6 Kontrollen

Leerwerte

Alle Leerwertproben, die bei der DNA-Extraktion und beim Ansetzen der PCR-Reaktionen mitgeführt wurden, blieben bei der ZM1-ZM3-PCR-Methode negativ. So kann eine Kreuzkontamination oder eine unspezifische Amplifikation weitgehend ausgeschlossen werden.

Positivkontrollen

Die eingesetzten Positivkontrollen der ZM1-ZM3-PCR und der Maus-Aktin-PCR waren in allen Fällen positiv, so dass von optimalen PCR-Bedingungen für alle Proben ausgegangen werden kann.

Negativkontrollen

Die bei der ZM1-ZM3-PCR verwendeten DNA-Extrakte aus Organen nicht infizierter Mäuse zeigten keine Bande im Agarosegel auf und blieben damit negativ. Damit können unspezifische Reaktionen der Primer mit der Wirts-DNA aus-

geschlossen werden. Auch die aus humanem Blut extrahierte DNA blieb wie die Fisch-DNA bei der Aktin-PCR negativ.

4.2.4 LightCycler-PCR

Die mit der LightCycler-PCR untersuchten Proben ergaben die folgenden Ergebnisse. Bei einem Crossing Point (CP) größer 35 wurde das Ergebnis als negativ betrachtet.

Tabelle 24: Ergebnisse der LightCycler-PCR und Angabe der ermittelten Crossing Points

Pr o.	Ergeb- nis	CPs	Pro	Erg	CPs	Pro	Erg	CPs	Pro	Erg	CPs
1	positiv	21.89	51	positiv	31.63	101	negativ		151	negativ	
2	positiv	25.88	52	positiv	20.98	102	negativ		152	positiv	30.89
3	positiv	26.28	53	positiv	29.94	103	negativ		153	negativ	
4	positiv	22.77	54	positiv	23.90	104	negativ		154	negativ	
5	positiv	18.63	55	positiv	21.63	105	negativ		155	positiv	26.67
6	positiv	18.30	56	positiv	28.91	106	negativ		156	negativ	
7	positiv	26.90	57	positiv	19.93	107	negativ		157	negativ	
8	positiv	31.93	58	positiv	31.20	108	negativ		158	negativ	
9	positiv	22.84	59	positiv	21.03	109	negativ		159	negativ	
10	positiv	20.11	60	positiv	23.58	110	negativ		160	negativ	
11	positiv	21.87	61	positiv	32.38	111	negativ		161	negativ	
12	positiv	20.91	62	negativ		112	negativ		162	negativ	
13	positiv	25.64	63	positiv	32.71	113	negativ		163	negativ	
14	positiv	19.49	64	negativ		114	negativ		164	negativ	
15	positiv	18.71	65	negativ		115	positiv	27.73	165	negativ	
16	positiv	24.74	66	negativ		116	negativ		166	negativ	
17	positiv	21.85	67	negativ		117	negativ		167	negativ	
18	positiv	21.29	68	negativ		118	negativ		168	negativ	
19	positiv	19.86	69	positiv	34.21	119	negativ		169	negativ	
20	positiv	20.30	70	negativ		120	negativ		170	negativ	
21	positiv	25.46	71	negativ		121	positiv	30.96	171	negativ	

22	positiv	19.89	72	negativ		122	positiv	28.01	172	negativ	
23	positiv	30.88	73	negativ		123	negativ		173	negativ	
24	positiv	21.25	74	negativ		124	positiv	27.79	174	negativ	
25	positiv	19.02	75	negativ		125	positiv	25.61	175	negativ	
26	positiv	23.71	76	negativ		126	negativ		176	negativ	
27	positiv	20.51	77	negativ		127	negativ		177	negativ	
28	positiv	22.92	78	negativ		128	negativ		178	negativ	
29	positiv	25.79	79	negativ		129	negativ		179	negativ	
30	positiv	19.63	80	negativ		130	negativ		180	negativ	
31	positiv	24.78	81	positiv	25.96	131	negativ		181	negativ	
32	positiv	19.62	82	positiv	26.84	132	negativ		182	negativ	
33	positiv	22.51	83	positiv	32.20	133	negativ		183	negativ	
34	positiv	20.48	84	positiv	30.58	134	negativ		184	negativ	
35	positiv	19.44	85	positiv	18.33	135	negativ		185	negativ	
36	positiv	26.69	86	positiv	29.85	136	negativ		186	negativ	
37	positiv	19.00	87	positiv	19.91	137	positiv	33.11	187	negativ	
38	positiv	31.33	88	positiv	29.31	138	positiv	32.82	188	negativ	
39	positiv	23.32	89	positiv	21.01	139	negativ		189	negativ	
40	positiv	22.61	90	positiv	16.92	140	positiv	30.46	190	negativ	
41	positiv	23.02	91	positiv	30.11	141	positiv	32.51	191	negativ	
42	positiv	29.25	92	positiv	25.20	142	negativ		192	negativ	
43	positiv	33.50	93	positiv	32.57	143	positiv	33.59	193	negativ	
44	positiv	25.77	94	negativ		144	negativ		194	negativ	
45	positiv	24.69	95	positiv	21.44	145	negativ		195	negativ	
46	positiv	17.32	96	negativ		146	negativ		196	negativ	
47	positiv	28.06	97	negativ		147	positiv	30.34	197	negativ	
48	positiv	32.19	98	negativ		148	negativ		198	negativ	
49	positiv	28.67	99	positiv	31.70	149	negativ		199	negativ	
50	positiv	22.75	100	positiv	24.63	150	negativ		200	negativ	

Die Verteilung der positiven Ergebnisse zeigt, dass die Zahl an erkrankten Organen mit steigender verabreichter Sporendosis zunimmt. Bei der Untersuchung von Leber und Niere sind zudem mehr positive Ergebnisse zu sehen, die

Biopsien des Gehirns bleiben in der Analyse, wie auch schon bei den anderen Methoden, häufiger negativ.

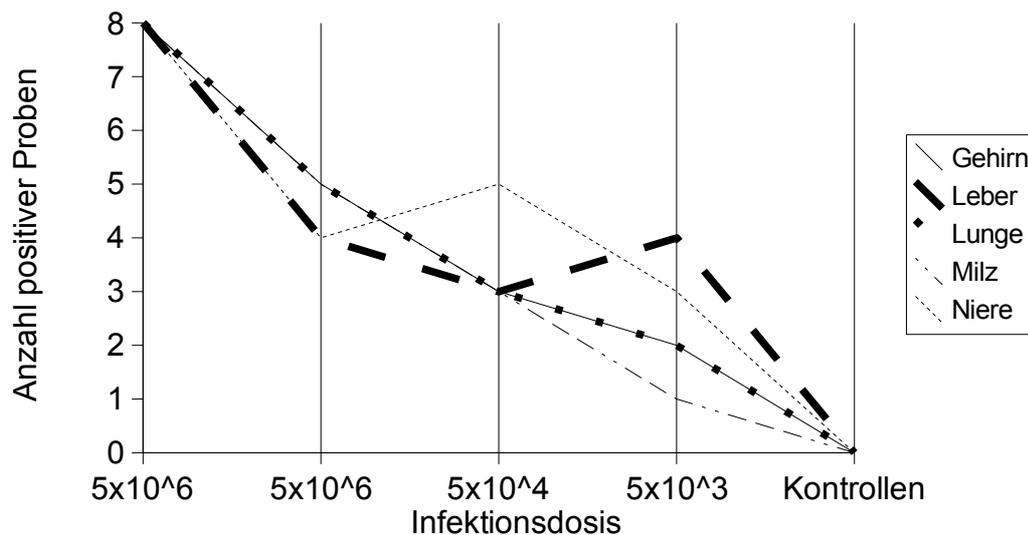


Abbildung 15: Grafische Darstellung der Verteilung der positiven Ergebnisse der LightCycler-PCR bezogen auf die verabreichte Infektionsdosis und das jeweilige Organ

Zur Semiquantifizierung der in der Probe vorhandenen spezifischen Zygomyceten-DNA wird die Höhe der Crossing Points, bzw. die Menge der amplifizierten DNA im Verhältnis zur eingesetzten Dosis für die unterschiedlichen Organe grafisch dargestellt. Dabei zeigt sich eine Verkleinerung der Crossing Points mit steigender Dosis, d. h. es befindet sich mehr der gesuchten DNA in der untersuchten Probe.

In der Grafik zeigt sich ein hohes DNA-Vorkommen vor allem in den Proben von Leber und Niere. Im Vergleich dazu ist die Konzentration der spezifischen *Rhizopus arrhizus* DNA in den positiven Gehirn- und Lungenproben geringer.

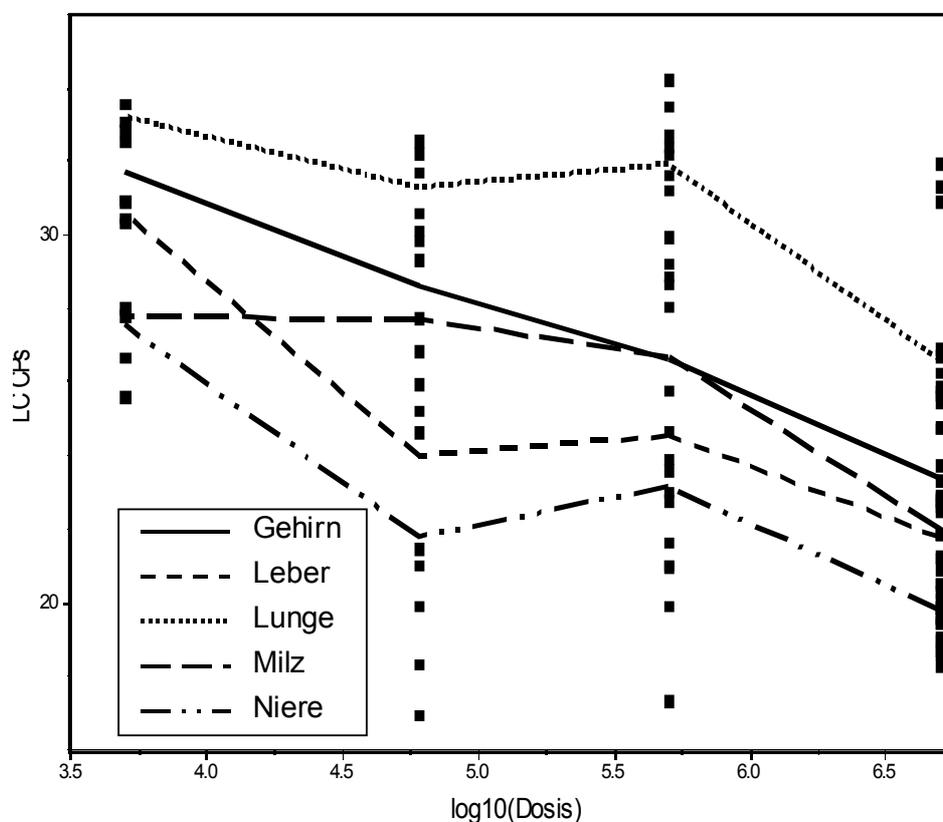


Abbildung 16: Semiquantitative *Rhizopus arrhizus* DNA-Menge im Verhältnis zur Infektionsdosis

Da sich bei keinem Tier der Kontrollgruppe (Probe 161-200) ein positives Ergebnis zeigt, scheint die Annahme, dass die Spezifität dieser Methode gleich 1 ist, gerechtfertigt.

4.2.5 Fazit

Unabhängig von der Untersuchungsmethode zeigt sich eine positive Korrelation der Anzahl positiver Ergebnisse, bzw. der Menge der nachgewiesenen spezifischen Zygomyceten-DNA mit der Infektionsdosis.

Es ist generell eine Organpräferenz der Infektion mit *Rhizopus arrhizus* zu erkennen. Es sind vor allem Leber und Niere bei allen Methoden öfter und bereits bei geringerer Infektionsdosis befallen, auch ist die Menge nachweisbarer Pilzelemente bzw. der DNA größer, so dass ein schwererer Organbefall angenommen werden kann.

Das Gehirn zeigt sich bei allen Methoden generell eher weniger, leichter und später, also erst bei steigender Infektionsdosis erkrankt.

Zudem scheint die Spezifität aller Methoden bei 1 zu liegen, da sich bei keinem Tier der Kontrollgruppe in einem diagnostischen Verfahren ein positives Ergebnis zeigt.

4.3 Vergleich der Methoden

Um die einzelnen Ergebnisse der verschiedenen Methoden bei den mit Sporen infizierten Mausgruppen vergleichen zu können, muss zuerst festgelegt werden in welchem Fall ein Tier, bzw. ein Organ als erkrankt, also positiv, bzw. als nicht erkrankt, also negativ angesehen wird.

Ein Tier gilt als erkrankt, wenn in mindestens einem seiner Organe Pilze nachgewiesen werden können. Bei einem oder mehreren befallenen Organen ist aber nicht gleichzeitig zu folgern, dass alle Organe erkrankt seien, da die im Blut der infizierten Tiere zirkulierenden Sporen nicht gleichmäßig in alle Organe einwandern und dort aussprossen können. Der Befall einzelner Organe könnte zudem von der Infektionsdosis abhängig sein.

Da keine weiteren Kontrollmöglichkeiten als die hier untersuchten Methoden zur Verfügung stehen, gilt eine Probe nun als positiv, bzw. ein Organ als erkrankt, wenn mindestens eine der vier Methoden ein positives Ergebnis anzeigt.

Daraus folgt, dass es, mit Ausnahme bei einem Tier der Gruppe mit der Infektionsdosis von 6×10^4 , bei allen Tieren, die eine Infektionsdosis mit *Rhizopus arrhizus* erhielten, zu einer Erkrankung gekommen ist. Für die Proben der Organe der Mausgruppen, die eine Sporeninjektion erhielten, ist die Anzahl der erkrankten Tiere in Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25: Anzahl positiver bzw. negativer Proben aller Organe je Dosisgruppe

Dosis	5×10^6	5×10^5	6×10^4	5×10^3	0
Positiv/erkrankt	40	35	32	27	0
Negativ/nicht erkrankt	0	5	8	13	40

Betrachtet man nun den Zusammenhang von Sporendosis und Anteil der infizierten Organe, zeigt sich, dass der Anteil der infizierten Organe mit dem \log_{10} der Dosis linear zunimmt.

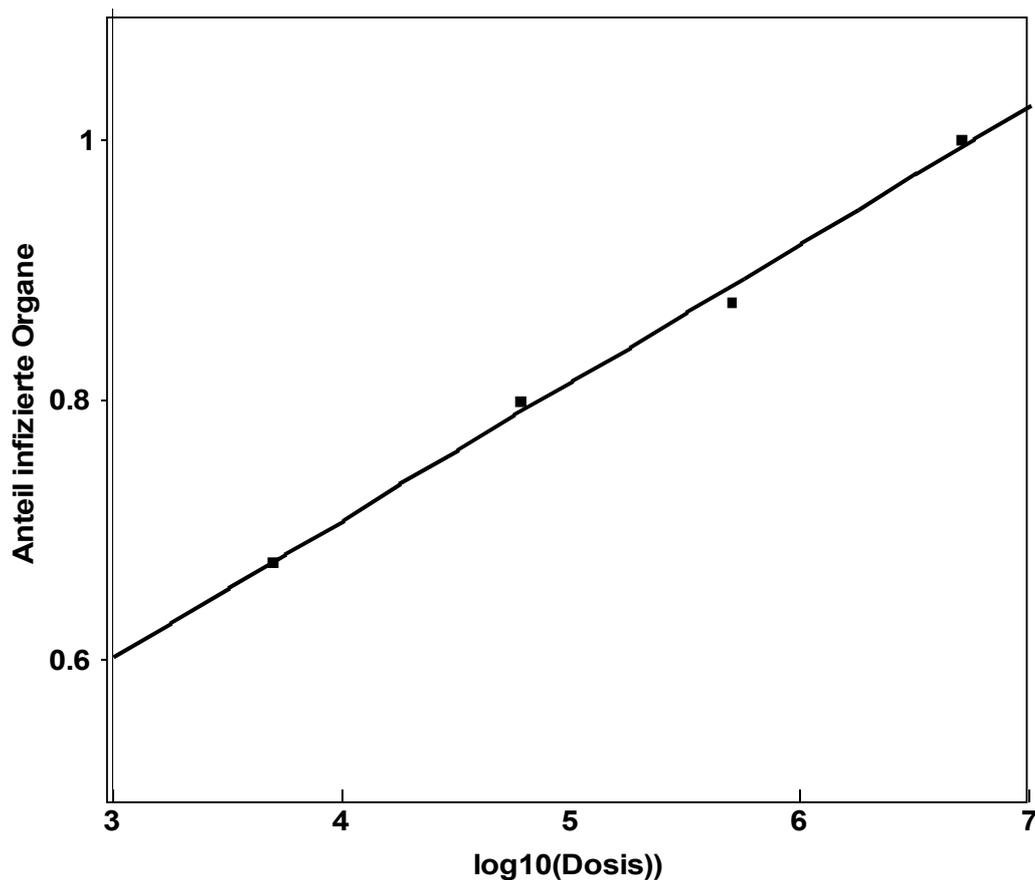


Abbildung 17: Abhängigkeit der erkrankten Organe zur Höhe der verabreichten Sporendosis

Daraus ergibt sich ein lineares Regressionsmodell, das sich mit folgender Formel beschreiben lässt: Anteil erkrankter Organe = $b \cdot \log_{10}(\text{Dosis}) + c$ mit $b=0,106$ und $c=0,284$. R^2 ist 0,99 und R^2 adjusted ist 0,99. Die Abhängigkeit der erkrankten Organe zur Höhe der Sporendosis ist mit $p = 0,0027$ signifikant.

Dies bedeutet, dass mit Hilfe dieser Formel abgeschätzt werden kann, mit welcher Wahrscheinlichkeit bei einer definierten Infektionsdosis Organe befallen werden. Eine Möglichkeit, die bei der Planung eines weiteren Tierexperiments, eventuell zur Testung einer Behandlung der Zygomycose, von Nutzen sein kann.

4.3.1 Spezifität

Bei den Ergebnissen der verschiedenen Methoden fällt auf, dass es bei keiner Methode ein positives Ergebnis bei einem Tier aus der Kontrollgruppe gegeben hat. Dies ergibt eine geschätzte Spezifität $Sp = 1$ mit einem Konfidenzintervall von $[0,9;1,0]$.

Im Folgenden wird nun eine Spezifität von 1 (oder nahe bei 1) für alle Methoden, unter Tolerierung eines möglichen kleinen Fehlers, angenommen.

4.3.2 Sensitivität

Zum Vergleich der Methoden wurde nach der Maximum-likelihood-Methode ein Modell erstellt, das die Sensitivitäten der Methoden schätzt und ihre Unterschiede sowie deren Signifikanz wiedergibt.

Gehirn

Die Sensitivität der Histologie betrug = 0,18, für die Kultur = 0,55, für die PCR = 0,69 und für die LightCycler-Methode = 0,84.

Mit der Maximum-likelihood-Funktion lassen sich die Unterschiede wie folgt schätzen:

Tabelle 26: Sensitivitäten und Unterschiede der Methoden beim Gehirn

	Histologie	Kultur	PCR	LC
Histologie	0,18	0,36	0,51	0,66
Kultur	-0,36	0,55	0,15	0,29
PCR	-0,51	-0,15	0,69	0,15
LC	-0,66	-0,29	-0,15	0,84

Aus dem Modell ergibt sich dadurch ein signifikanter Unterschied für:

Kultur vs. Histologie (Odds ratio: 5,58)

PCR vs. Histologie (Odds ratio: 10,14)

LC vs. Histologie (Odds ratio: 23,92)

LC vs. Kultur (Odds ratio: 4,30)

Dies bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit eine Infektion des Gehirns erfolgreich nachzuweisen mit der Kultur 5,58 mal, mit der PCR 10,14 mal und mit der LightCycler-PCR sogar 23,92 mal höher ist als mit der Histologie. Die LightCycler-PCR weist zudem eine Infektion 4,3 mal eher nach, als die Kultur.

So zeigt sich, dass bei den Proben aus dem Gehirn mit Kultur, PCR und LightCycler-PCR signifikant bessere Ergebnisse zu erzielen sind, als mit der Histologie. Zudem ist die LightCycler-Methode signifikant besser als die Kultur.

pLeber

Die Sensitivität der Histologie betrug = 0,46, für die Kultur = 0,76, für die PCR = 0,79 und für die LightCycler-Methode = 0,69.

Mit der Maximum-likelihood-Funktion zeigte sich dabei ein signifikanter Unterschied für:

Kultur vs. Histologie (Odds ratio: 3,72)

PCR vs. Histologie (Odds ratio: 4,42)

So sind die Methoden Kultur und PCR signifikant besser geeignet zur Detektierung eines erkrankten Organs, hier der Leber, als die Histologie.

Lunge

Die Sensitivität der Histologie betrug = 0,26, für die Kultur = 0,58, für die PCR = 0,77 und für die LightCycler-Methode = 0,80.

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich dabei für:

Kultur vs. Histologie (Odds ratio: 3,93)

PCR vs. Histologie (Odds ratio: 9,53)

LC vs. Histologie (Odds ratio: 11,38)

Wieder kann verdeutlicht werden, Kultur, PCR und LC sind gegenüber der Histologie signifikant geeignetere Methoden zur Erfassung von erkrankten Organen, hier bei der Untersuchung der Leber.

Milz

Die Sensitivität der Histologie betrug = 0,58, für die Kultur = 0,79, für die PCR = 0,89 und für die LightCycler-Methode = 0,95.

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich dabei für:

PCR vs. Histologie (Odds ratio: 5,86)

LC vs. Histologie (Odds ratio: 13,76)

Dies bedeutet, dass LC und PCR wiederum signifikant besser geeignet sind um eine Erkrankung der Milz nachzuweisen, als die Methode der Histologie.

pNiere

Die Sensitivität der Histologie betrug = 0,62, für die Kultur = 0,69, für die PCR = 0,89 und für die LightCycler-Methode = 0,76.

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich dabei für:

PCR vs. Histologie (Odds ratio: 4,96)

PCR vs. Kultur (Odds ratio: 3,64)

Hier erweist sich nun die Methode der PCR als signifikant besser geeignet zur Diagnose einer Zygomycose der Niere als die Methoden von Kultur und Histologie.

In Tabelle 27 sind die Verhältnisse der Sensitivitäten der einzelnen Methoden im Überblick dargestellt. Es zeigt sich, bis auf eine Ausnahme für die LightCy-

cler-Methode bei Proben der Leber, eine größere Sensitivität der Methoden PCR und LightCycler-PCR gegenüber den Standardmethoden Kultur und Histologie.

Tabelle 27: Sensitivität der einzelnen Methoden im Vergleich

Organ	Sensitivität der Methoden
Gehirn	LC > PCR > Kultur > Histologie
Leber	PCR > Kultur > LC > Histologie
Lunge	LC > PCR > Kultur > Histologie
Milz	LC > PCR > Kultur > Histologie
Niere	PCR > LC > Kultur > Histologie

Um die Ergebnisse zu veranschaulichen, werden die verschiedenen Sensitivitäten und ihr Verhältnis zueinander im Folgenden grafisch dargestellt.

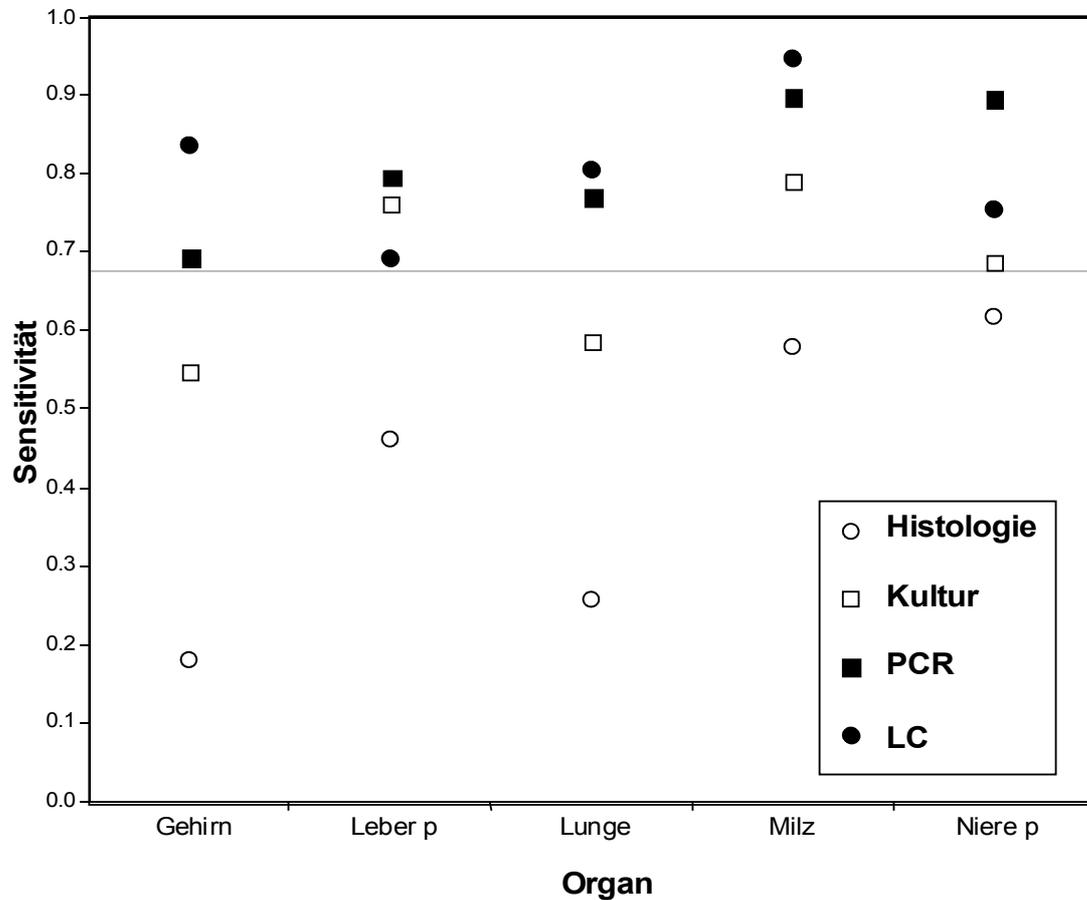


Abbildung 18: Vergleich der Sensitivitäten der einzelnen Methoden bei den verschiedenen Organen

Der Unterschied der Sensitivität zwischen den Methoden PCR und Histologie ist bei jedem Organ signifikant, die PCR-Diagnostik erbringt also immer einen besseren Nachweis als die Histologie. Zudem besteht auch eine signifikant höhere Nachweiswahrscheinlichkeit gegenüber dem kulturellen Verfahren bei Proben der Niere.

Die LightCycler-Methode zeigt ebenfalls bei drei Organen eine signifikant höhere Sensitivität als die Histologie, sowie bei Proben des Gehirns eine signifi-

kant höhere Nachweiswahrscheinlichkeit einer Erkrankung des Organs gegenüber der Kultur.

Der Nachweis mittels Kultur zeigt ebenfalls bei drei Organen eine signifikant höhere Sensitivität als die Histologie, wird aber, wie schon erwähnt, in einigen Fällen von der Methode von PCR und LightCycler-PCR übertroffen.

Die Histologie zeigt bei allen Organen die geringste Sensitivität.

4.3.3 Fazit

Mit der aus diesem Modell hervorgehenden Formel lässt sich in Zukunft der Anteil der erkrankten Organe bestimmen, da mit ihrer Hilfe die dazu notwendige anfängliche Sporendosis errechnet werden kann.

Zudem wurde im Modell gezeigt, dass PCR und LightCycler-PCR in der Regel die größte Sensibilität bei der Diagnostik der Zygomycose besitzen. Sie selbst unterscheiden sich in ihrer Sensitivität nicht signifikant. PCR und LightCycler-PCR scheinen somit gleichwertige Methoden und im Allgemeinen sensitiver als die Standardmethoden Histologie und Kultur.

5 Diskussion

5.1 Erkenntnisse aus der Arbeit

5.1.1 Das Tiermodell

Diese Arbeit betrachtet das Überleben der Versuchstiere in Abhängigkeit von der Infektionsdosis. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass ein linearer Zusammenhang zwischen dem Überleben der Versuchstiere und der Höhe der verabreichten Sporendosis besteht.

Die Ergebnisse der Überlebensbeobachtung der Versuchstiere decken sich mit denen anderer Studien, die zu diesem Thema veröffentlicht wurden. In einer Arbeit zur Wirkung von Amphotericin B starben alle mit einer Sporendosis $\geq 5 \times 10^4$ infizierten Kontrolltiere bis zum 4. Tag, Tiere aus den Gruppen mit einer Infektionsdosis $\leq 5 \times 10^3$ überlebten die Infektion zum Teil bis über den zwölften Beobachtungstag hinaus, der das Ende des Experiments darstellte [28]. Die Abweichung in der absoluten Überlebenszeit der Tiere zwischen diesem und dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Modell mag in der unterschiedlichen Weise liegen, in der die Versuchstiere für eine Zygomyceteninfektion empfänglich gemacht wurden. Als Versuchstiere wurden dort Mäuse mit einem, durch eine Gabe von 210mg/kg Streptozocin intraperitoneal 10 Tage vor Infektion induzierten Diabetes, für das Experiment ausgewählt.

In einer anderen Studie verstarben die Tiere mit einer Infektionsdosis von 5×10^6 bei einer Immunsuppression von 200mg/kg Cyclophosphamid am Tag -4/+1/+4 bis zum 7. Tag wie auch im Falle des im Rahmen dieser Arbeit erstellten Tiermodells [2].

Das Tiermodell dieser Arbeit unterscheidet sich von den oben aufgeführten Studien insofern, als dass es bei dem hier erstellten Tiermodell um die reine Beobachtung des Überlebens der Versuchstiere geht. Es wurde parallel kein Medikament getestet, so dass die Aussage über das durchschnittliche Überleben der Tiere unter der Infektion nicht ausschließlich auf der Überlebensbeob-

achtung der Kontrollgruppe beruht. Es wurden immunsupprimierte Tiere mit unterschiedlicher Infektionsdosis infiziert, als Kontrollgruppe ebenso immunsupprimierte Tiere ohne Infektion gewählt und die Tiere über 21 Tage beobachtet. In einem weiteren Modell wurden ebenfalls Beobachtungen zur Sterblichkeitsrate von Mäusen in Abhängigkeit der Infektionsdosis angestellt, in diesem Fall um den Einfluss von Diabetes mellitus auf die pulmonale Mucormycose zu untersuchen. Auch hier zeigte sich eine Abnahme des Überlebens der Versuchstiere mit zunehmender Infektionsdosis [57].

Basierend auf der Überlebensbeobachtung der Tiere erlaubt das Modell dieser Arbeit eine Aussage über eine für die Therapietestung geeignete Höhe der Infektionsdosis. So wird eine für die Verlaufsbeobachtung einer Therapiewirkung zur Zygomycose sinnvolle Überlebenszeit der Tiere mit einer Infektionsdosis zwischen 5×10^5 bis 6×10^4 erreicht. Hier liegt der Todestag im Mittel zwischen 14,1 und 19,0d, dies stellt einen günstigen Beobachtungszeitraum für eine eventuelle Wirkung dar.

Aus dem Zusammenhang zwischen der Sporendosis und dem Überleben der Tiere konnte in dieser Arbeit ein Modell erstellt werden, das die Überlebensdauer der Tiere vorhersagbar und beeinflussbar macht.

Es ist vorstellbar, dass sich ein vergleichbares Vorgehen zur Errechnung der erforderlichen Dosis für die gewünschte Überlebensdauer der Versuchstiere (hier für *Rhizopus arrhizus*) auch auf andere Zygomyzetenarten übertragen lässt. Die unterschiedliche Virulenz der einzelnen Zygomyzetenspezies erfordert es vermutlich jede Spezies einzeln zu testen, um auch für sie aus dem Zusammenhang zwischen Infektionsdosis und Überleben ein Modell erstellen zu können. Das im Rahmen dieser Arbeit erarbeitete Modell gibt hier allerdings bereits einen Anhalt in welcher Größenordnung die Infektionsdosen zu wählen sind.

5.1.2 Diagnostik

In diesem Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Höhe der Infektionsdosis auch Einfluss auf die Menge der positiven Ergebnisse aller untersuchten Methoden hat, d.h., es konnte nachgewiesen werden, dass eine höhere Dosis zu einer vermehrten Infektion der Organe der Tiere führt. Der Zusammenhang stellte sich als linear dar. Alle Methoden waren in der Lage diesen Effekt nachzuweisen.

Basierend auf den Versuchsergebnissen wurde ein Diagnosemodell erstellt, welches eine Abschätzung des Anteils der infizierten Organe in Abhängigkeit von der Sporendosis erlaubt. Diese nun mögliche Vorausberechnung ermöglicht es geeignete Voraussetzungen für die Testung von Antimykotika zu schaffen.

Das Diagnosemodell könnte auch auf andere Zygomycetenformen ausgeweitet werden. Es müsste dazu ebenso wie das schon diskutierte Überlebensmodell für jede Pilzart in einem separaten Tiermodell angepasst werden.

Bei der Durchsicht der Literatur konnte kein Tiermodell gefunden werden, bei welchem diese Zusammenhänge derart ausgewertet worden sind.

In einem Tiermodell zur Aspergillose konnte allerdings ein ähnlicher Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Infektionsdosen (hier 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 Konidien/ml) und dem Überleben der Tiere, sowie dem dort durch Kultur und LightCycler-PCR ermittelten Organbefall gefunden werden. Basierend auf diesen Beobachtungen wäre es so durchaus möglich Modelle zu erstellen, die mit denen dieser Arbeit vergleichbar sind [13].

In dem Modell dieser Arbeit wurden zur Beurteilung der Infektion das Überleben der Versuchstiere und die Ausprägung der Organinfektion verwandt. Dies deckt sich mit dem Vorgehen anderer Studien, die ebenfalls diese Parameter zur Verlaufskontrolle des Tiermodells erfolgreich eingesetzt haben [2] [36].

Bei der Betrachtung der Ergebnisse aus dem Tiermodell war zu erkennen, dass bei allen Dosisstärken eine Organpräferenz der Infektion vorlag. Leber und Niere waren generell öfter und, wie durch die quantitativen Methoden nachgewiesen, stärker befallen, im Gehirn der Tiere hingegen ließ sich seltener eine Infektion detektieren.

Eine Möglichkeit der Erklärung für die Ergebnisse bezüglich des Gehirns wäre, dass die Blut-Hirn-Schranke für die Zygomycose, welche eine Affinität zu Blutgefäßen besitzt, in diese einwächst und so in den Organismus disseminiert [21], eine gewisse Barriere für die Infektion darstellt. So bleibt das Gehirn eher von der Erkrankung verschont als die anderen untersuchten Organe.

Zudem wurde in einer weiteren Studie gezeigt, dass die Zygomyceteninfektion des Gehirns weniger über eine Disseminierung der Infektion im Organismus, sondern vor allem über die direkte Inoculation der Sporen in die Sinus erfolgt [56].

Die Leber enthält Zellen mit Phagozytosefähigkeit und sinusoidale Zellen mit Mannose-Rezeptoren auf der Oberfläche. Diese Rezeptoren fungieren als *PRRs (Pattern Recognition Receptors)*, welche spezifisch an konservierte Oberflächenstrukturen der Pilze, allgemein auch als *PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns)* bezeichnet, binden und diese für die Effektorzellen des angeborenen Immunsystems markieren und opsonieren. Dieser hohe Anteil an Zellen der Immunabwehr könnte den hohen Pilzbefall des Lebergewebes in der während der Infektion vorliegenden Aktivität des Organismus gegen den Erreger erklären [26].

Die Präferenz der Zygomycose für die Niere in diesem Modell scheint hingegen weniger offensichtlich erklärbar. Der reine Befall der Niere ist eine eher seltene Form der Zygomycose [14]. Auch konnten bei Durchsicht der Literatur keine ähnlichen Beobachtungen in anderen Tiermodellen gefunden werden. In einer Studie zu Caspofungin wurde die Niere allerdings als eines der beiden die Infektion am besten repräsentierenden Organe gesehen und untersucht, da hier bei der makroskopischen Untersuchung der Organnekrosen ein ,von den Un-

tersuchern als „abnormster“ bezeichneter Befund vorlag [29]. Dort wurde auch im Vergleich zu Leber, Lunge und Milz in der Niere ein höherer Pilzbefall des Gewebes festgestellt. Allerdings zeichnete sich in dieser Studie, im Gegensatz zu den Ergebnissen dieses Tiermodells, das Gehirn als das am stärksten von Hyphen befallene Organ ab. Eine Erklärung mag in dem veränderten Hirnstoffwechsel der Ketoazidose liegen, da bei den Versuchstieren zuvor ein Diabetes induziert worden war und nur Tiere mit nachgewiesener Ketonurie in das Modell aufgenommen wurden.

In diesem Modell hat sich die Präferenz der Niere über den gesamten Verlauf bestätigt. Werden auf Basis dieses Modells nun neue Antimykotika getestet, so gilt ihr zusammen mit der Leber ein besonderes Augenmerk. Bei dem ansonsten typisch schweren Befall dieser beiden Organe können Veränderungen der Infektion durch eine Therapie besonders gut gesehen werden.

Bei der genaueren Betrachtung der einzelnen Methoden scheint auf Grund der Negativität sämtlicher Kontrollen die Annahme gerechtfertigt, dass die Spezifität aller Methoden gleich 1 ist.

Zur Beurteilung der Organinfektion wurde in diesem Modell auf die Biopsie des Organs als Quelle des zu untersuchenden Materials zurückgegriffen. Angesichts der Ergebnisse ist ein Fehler in der Auswertung, bedingt durch eine lokalisierte Infektion, die durch eine Biopsie in unterschiedlichem Maße „getroffen“ wird, wenig wahrscheinlich. Es wären in einem solchen Fall mehr Kultur bzw. Histologie positive bei PCR bzw. LC negativen Ergebnisse zu erwarten gewesen.

Ein systematischer Fehler durch die Biopsiemethode ist so unwahrscheinlich und es kann angenommen werden, dass die Biopsie den Organinfekt hinreichend wiedergibt. Die Beschränkung auf die Biopsie scheint somit sinnvoll und sie sollte daher als Methode der Wahl in weiteren Tiermodellen angewendet werden, da so zum einen die Extraktion der DNA erleichtert und zum anderen die mauseigene DNA in der späteren Probe limitiert wird.

5.1.3 Methodenvergleich

Bei dem Vergleich der Methoden stellten sich PCR und LightCycler-PCR als die sensitivsten zur Diagnostik der Zygomycose im Tiermodell heraus.

Als einzige Ausnahme zeigt sich beim Vergleich der Leberbiopsien eine geringere Sensitivität der LC-Methode als der der Kultur. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich darin zu sehen, dass gerade in den Leberbiopsien durch die Organbeschaffenheit eine hohe Konzentration von wirtseigener DNA vorliegt, die gerade diese spezifische PCR-Methode hemmt. Durch das gleichbleibende Verhältnis von Pilz- zu Wirts-DNA wäre auch durch Verdünnung hier keine Verbesserung zu erwarten.

Untereinander scheinen sich PCR und LightCycler-PCR in ihrer Sensitivität nicht wesentlich zu unterscheiden.

Bei Durchsicht der Literatur auf die Ergebnisse anderer Studien konnten zwei Tiermodelle zur Zygomycose gefunden werden, bei denen ebenfalls die Überlebenszeiten der Tiere und der Anteil der infizierten Organe als Maßstab für die Infektion genutzt wurden. Dort wurde festgestellt, dass die beiden in den Studien verwendeten Diagnostikmethoden - Histologie und Kultur- nur zusammen zu einer Aussage über die Infektion führten [19][20]. Die Autoren begründeten dies damit, dass bei der Kultur durch die Homogenisierung oft Hyphen zerstört werden. Diese Modelle benötigten also zwei Diagnostikmethoden, um eine Aussage über die Infektion zu treffen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die hier verwendeten PCR-Methoden für die selbe Aussage bereits allein besser qualifiziert sind.

In verschiedenen Tiermodellen und Studien zur Zygomycose wurden molekularbiologische Diagnostikmethoden bereits erfolgreich eingesetzt und die Qualität ihrer Ergebnisse evaluiert. Vergleiche zwischen den einzelnen Arbeiten sind schwierig, da die Arbeiten methodisch recht unterschiedlich sind und unterschiedliche Techniken zur Bestimmung der Nachweisgrenze angewendet wurden. Es lässt sich aber generell eine Tendenz in der Beurteilung der Sensitivität der PCR-Methoden gegenüber den Standardmethoden erkennen.

So wurde in einem weiteren Modell zur Zygomycose festgestellt, dass durch die PCR bei 70% der experimentell infizierten Tiere eine Infektion festgestellt werden konnte, auch wenn die Histologie negativ blieb [48], was wiederum die Überlegenheit der molekularbiologischen Diagnostikmethode zeigt. Es wurde hier allerdings eine Identifikation der Hyphen bis zur Sequenzierung durchgeführt. In dem Modell dieser Arbeit ist die Spezifität der Amplifikate in der Light-Cycler-PCR durch die spezifische Bindung der Hybridisationsproben bereits gewährleistet. Zudem könnte die Spezifität durch die Bestimmung der charakteristischen Schmelztemperatur der Amplifikate durchgeführt werden. Es wäre dabei aber kein weiterer Arbeitsschritt nach dem PCR-Durchlauf, wie die Sequenzierung, notwendig.

Ein weiteres Mausmodell, welches mit quantitativer PCR verlaufskontrolliert wurde, führt als Ergebnis an, dass das PCR-Verfahren als Diagnostikmethode bei der Zygomycose der Kultur überlegen ist und die Höhe des Organbefalls zuverlässiger wiedergibt als die Kultur [29].

In einer Studie, die sich mit dem Nachweis von Zygomyceten- und Aspergillusinfektionen von Gewebe befasst, zeigte sich die PCR als verwendete Diagnostikmethode der Kultur überlegen [44].

Vor allem für andere invasive Pilzkrankungen sind schon verschiedene PCR-Verfahren in der Literatur beschrieben worden. Auch hier zeigten die molekularbiologischen Methoden ihre Zuverlässigkeit, beispielsweise in Modellen zur Aspergillose [11][26]. Hier stellte sich die Kultur weniger sensitiv dar als die LightCycler-PCR. Gleiches konnte für diese Erkrankung auch bei Kultur versus PCR nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kamen alle Autoren der verschiedenen Tiermodelle, die meist im Rahmen von Therapiestudien durchgeführt worden waren, zu dem Ergebnis, dass die molekulardiagnostischen Methoden global betrachtet sensitiver als eine Kultur waren, eine statistische Berechnung als Grundlage dieser Schlussfolgerung oder die Berechnung der Höhe eines Unterschiedes wurden

jedoch nicht angegeben. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig für die Zygomyceten-PCR Verfahren mit unterschiedlichen Infektionsdosen durchgeführt, wobei es keinerlei Beeinflussung durch getestete Medikamente oder andere experimentelle Versuche gab. Die Ergebnisse legen nahe, dass die molekularbiologischen Verfahren qualifiziert sind, als alleinige Diagnostikmethoden im Tiermodell zu fungieren.

5.2 Abweichungen von Standards

5.2.1 Geeignetes PCR-Verfahren

Zur Beurteilung der verschiedenen Diagnostikmethoden für die Zygomycose wurden die Proben mit einem am Institut bereits etablierten PCR-Standardverfahren untersucht [6]. Die Ergebnisse dieses Verfahrens zeigten einen hohen Anteil an „falsch“ positiven Proben. Unter Ausschluss von Kontaminationen durch negative Kontrollen war hier von unspezifischen Amplifikationen auszugehen. Um nicht jedesmal eine im Rahmen des Tiermodells zu aufwendige und zu teure Sequenzierung durchführen zu müssen, wurde das PCR-Verfahren für das Tiermodell modifiziert. So wurde ein PCR-Verfahren mit den Primern ZM1 und ZM3 entwickelt. Auf eine nested PCR konnte hierbei verzichtet werden. Das modifizierte Verfahren zeigte Amplifikate der gesuchten Länge, die durch eine Sequenzierung als spezifisch nachgewiesen werden konnten. Es wurde daraufhin für das gesamte Experiment verwandt. Eine Sequenzierung der Proben, wie sie in der klinischen Diagnostik anzustreben ist, ist nunmehr im Tiermodell bei bekanntem Erreger mit diesem Verfahren nicht notwendig und der Fokus der Bemühungen kann gänzlich auf die Auswertung der im Modell zu testenden Antimykotika gerichtet werden.

5.2.2 Aktin-Negative Proben

Nach geltenden Qualitätsstandards ist als Nachweis einer erfolgreichen DNA-Extraktion die Amplifikation von Wirtsgenen erforderlich [45].

In diesem Experiment konnte der Nachweis bei den untersuchten Proben in drei Fällen nicht erbracht werden. Als Ursache kommt eine nicht erfolgreiche Extraktion, sowie eine Hemmung der Amplifikation durch Inhibitoren im Probenansatz in Frage. Solche Inhibitoren konnten durch einen erneuten PCR-Durchlauf dieser Proben mit zugefügter Positiv-Kontrolle ausgeschlossen werden, da in diesem Durchgang eindeutig die Maus-DNA der Positivkontrolle nachgewiesen werden konnte. Es ist also davon auszugehen, dass die Extraktion von DNA bei den im Experiment gewonnenen Proben nicht erfolgreich verlaufen ist. Die Proben wurden deshalb bei der Auswertung des Experiments nicht berücksichtigt.

Um sie in die Wertung nehmen zu können, hätte die Extraktion wiederholt werden müssen. Es sollte daher in Zukunft bei Entnahme der Biopsien ein Organrest zurückgehalten und bei -20°C eingefroren werden, um bei nachgewiesener fehlgeschlagener Extraktion diese nochmals durchführen zu können. Bei diesem Tiermodell war dies auf Grund der räumlichen Trennung (Extraktion der Proben in Monterrey / Mexiko und PCR-Durchführung in Tübingen) nicht möglich.

5.2.3 Sequenzierung der PCR-Amplifikate

Die durch die Sequenzierung zu beantwortende Frage war, ob es sich bei dem PCR-Amplifikat um eine *Rhizopus arrhizus*-spezifische Sequenz oder um eine Sequenz einer verwandten Pilzspezies oder gar um eine unspezifische Amplifikation handelte. Alle sequenzierten PCR-Amplifikate waren zu 100% mit der in GenBank®, National Center for Biotechnology Information, Washington (NCBI), hinterlegten 18S rDNA Sequenz von *Rhizopus arrhizus* (Gen Accession No 113440) identisch. Diese Sequenz weist eine ausreichend hohe Variabilität auf, um verwandte und möglicherweise unspezifisch reagierende Pilzspezies sowie unspezifische Amplifikationen von Maus-DNA sicher abzugrenzen. Auf Grund der kontrollierten Bedingungen im Tierversuch, bei dem die Tiere intravenös mit *Rhizopus arrhizus* infiziert wurden und der Tatsache, dass alle Sequenzierungen ein identisches Ergebnis zeigten, wurde auf die Sequenzierung

aller Amplifikate verzichtet und das Ergebnis auch für die übrigen nicht-sequenzierten Proben als zutreffend angenommen, zumal die standardisierte Durchführung einer Sequenzierung im Tiermodell, wie bereits oben erwähnt, angesichts der Kosten und des zeitlichen Aufwands als schlecht durchführbar anzusehen ist.

5.3 Zielerfüllung

Ziel dieser Arbeit war es, ein Mausmodell mit etablierten Diagnostikmethoden zu entwickeln, welches künftig als Referenz für die Erforschung der Zygomycose und zur Testung von Antimykotika zur Verfügung steht.

Im Modell sollte der Organbefall von *Rhizopus arrhizus* bei immunsupprimierten Mäusen in Abhängigkeit der Infektionsdosis bestimmt werden. Dies wurde mit allen vier verwendeten Diagnostikmethoden durchgeführt und beschrieben. Bei den Ergebnissen aller Methoden konnte ein linearer Zusammenhang zwischen Organbefall und Dosis erkannt werden. Ein Regressions-Modell ermöglicht, die Wahrscheinlichkeit zu schätzen, mit welcher bei einer definierten Infektionsdosis Organe befallen werden. Hiermit lässt sich zukünftig der Anteil der erkrankten Organe bestimmen, der mit Verabreichung einer bestimmten Infektionsdosis erzeugt wird. So kann nun jedes zukünftige Modell individuellen Anforderungen angepasst werden.

Weiter sollte eine Infektionsdosis bestimmt werden, die nicht letal ist, aber eine ausreichende Infektion verursacht, so dass die Wirkung von Therapeutika analysiert werden kann. Bei Durchführung des Tierexperimentes konnte beobachtet werden, dass eine Sporendosis zwischen 5×10^5 und 6×10^4 nicht unmittelbar letal wirkt, die Tiere im Durchschnitt für einen Zeitraum zwischen 14,2-19,0 Tagen am Leben bleiben und es zu einer ausreichend nachweisbaren Infektion kommt. Außerdem konnte aus dem beobachteten linearen Zusammenhang zwischen Überlebenszeiten und Infektionsdosis über ein Modell eine Formel be-

rechnet werden, die es ermöglicht, das Überleben der Versuchstiere bei Verabreichung jeder Sporendosis im Voraus abzuschätzen, so dass eine optimale Infektionsdosis unter Berücksichtigung der besonderen Ansprüche eines jeden weiteren Testverfahrens individuell vorausberechnet werden kann.

Ein wesentliches Ziel der Arbeit war es, die diagnostische Sensitivität der PCR und des LightCycler mit der Sensitivität der etablierten Nachweismethoden der Zygomycose zu vergleichen. Im biomathematischen Sinn repräsentieren jedoch weder die bisherigen Standardmethoden Kultur und Histologie, noch PCR und LightCycler die „Wahrheit“. Der Vergleich wurde daher basierend auf einem mathematischen Modell unter der Verwendung der Maximum-Likelihood-Methode durchgeführt. Durch das Modell konnten die Sensitivitäten der Methoden geschätzt und ihre Unterschiede, sowie deren Signifikanz wiedergegeben werden. Die Ergebnisse demonstrieren, dass PCR und LightCycler die signifikant sensitivsten der getesteten Methoden waren und somit am besten geeignet sind, die Zygomycose im Tiermodell im Verlauf zu kontrollieren und die Standard-Methoden in der Bedeutung als diagnostische Verfahren abzulösen.

5.4 Fazit

Diese Arbeit bietet eine Grundlage für eine bessere Erforschung der Therapie der Zygomycose. Mit dem Modell dieser Arbeit als Referenz können nun neue Antimykotika standardisiert getestet werden. Dabei können zudem Beobachtungen zur Beeinflussung der Überlebenszeit, sowie der Größe des Anteils des Organbefalls angestellt werden, die die getesteten Antimykotika genau in ihrer Wirkungsweise beschreiben und sie daher auch miteinander vergleichbar machen. Dies stellt einen wichtigen Fortschritt dar auf dem Weg eine erfolgreichen Therapie der Zygomycose.

Der Vergleich der verschiedenen Diagnostikmethoden, basierend auf einem Modell der Maximum-Likelihood-Methode, zeigte, dass PCR und LightCycler signifikant sensitiver sind als Kultur und Histologie. Dieses Ergebnis verdeutlicht,

dass eben diese Methoden ein wertvolles Instrument in der Diagnostik der Zygomycose sein können und das Potential haben könnten, die bisherigen Standardmethoden als wichtigste diagnostische Tests abzulösen. Im Tiermodell könnten sie sogar zukünftig als alleinige Diagnostik-Methoden verwendet werden und den Ablauf damit entscheidend vereinfachen und beschleunigen.

Die Ergebnisse des Methodenvergleichs legen nahe, PCR und LightCycler-PCR auch in der klinischen Diagnostik standardmäßig durchzuführen, um die Früherkennung der Erkrankung zu verbessern und einen schnelleren Therapiebeginn zu ermöglichen.

6 Zusammenfassung

Die Zygomycose ist eine lebensbedrohliche opportunistische Pilz-Infektion, die sich in den letzten Jahren zunehmend zu einem klinisch bedeutsamen Krankheitsbild entwickelt hat. Die bisherigen Therapiemöglichkeiten sind unzureichend, so dass die Erkrankung einen oft letalen Ausgang nimmt.

Um die Heilungschancen der Zygomycose zu verbessern soll in dieser Arbeit ein Mausmodell entwickelt werden, welches künftig als Referenz für die Erforschung der Zygomycose und zur Testung von Antimykotika zur Verfügung steht. Im Modell soll eine Infektionsdosis bestimmt werden, die nicht letal ist, aber eine ausreichende Infektion verursacht. Es soll der Organbefall der Zygomyceten (hier *Rhizopus arrhizus*) in Abhängigkeit der Infektionsdosis bestimmt werden und für das ganze Modell Diagnostikmethoden etabliert und verglichen werden, mit denen eine Verlaufskontrolle der Zygomycose durchgeführt werden kann.

Methoden

Es wurden 40 Labormäuse in Gruppen zu je 8 Tieren eingeteilt mit Cortisongaben immunsupprimiert und mit einer Sporendosis von je 5×10^6 , 5×10^5 , 6×10^4 und 5×10^3 infiziert. Eine Kontrollgruppe erhielt keine Infektion. Das Überleben der Tiere wurde über eine Versuchsdauer von 21 Tagen beobachtet. Den verstorbenen Tieren, sowie den am Ende der 21 Tage getöteten Tieren wurden jeweils fünf Organe entnommen (Gehirn, Lunge, Leber, Milz und Niere) von denen je drei Proben genommen wurden. Eine Probe wurde histologisch auf Hyphen untersucht, eine weitere wurde zur kulturellen Anzucht eventuell vorhandener Pilzsporen verwandt. Die dritte Probe wurde der molekularbiologischen Diagnostik zugeführt. Nach Extraktion der DNA wurde ein Teil der Probe dazu verwandt mit der PCR die gesuchte Pilz-DNA zu amplifizieren und über eine Gelelektrophorese nachzuweisen. Der andere Teil wurde mit der LightCycler-PCR untersucht, um ebenfalls Rhizopus-DNA zu amplifizieren sie aber über Hybridisationssonden zu spezifizieren und zu quantifizieren.

Ergebnisse

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass ein linearer Zusammenhang zwischen Überleben der Versuchstiere und der Höhe der verabreichten Sporendosis besteht, woraus sich ein mathematisches Modell erstellen ließ, welches die Überlebensdauer der Tiere unter Berücksichtigung der verabreichten Sporendosis vorhersagbar und kontrollierbar macht.

Alle getesteten Methoden konnten *Rhizopus arrhizus* in den Organproben mit unterschiedlicher Sensitivität anzeigen. Zudem scheint die Annahme gerechtfertigt, dass die Spezifität aller Methoden gleich 1 ist.

Weiterhin hat sich gezeigt, dass die Dosis auch Einfluss auf die Menge der positiven Ergebnisse aller untersuchten Methoden hat, eine höhere Dosis also auch eine stärkere und vermehrte Infektion der Organe verursacht. Aus dieser Verbindung ließ sich ein weiteres Modell ableiten, auf dessen Basis sich der Anteil der infizierten Organe in Abhängigkeit von der Infektionsdosis schätzen lässt.

Beim Vergleich der Methoden stellten sich PCR und die LightCycler-PCR als die sensitivsten Methoden heraus. Untereinander unterschieden sich diese nicht signifikant in ihrer Sensibilität.

Diskussion

Bei Durchführung des Tierexperimentes konnte beobachtet werden, dass eine Sporendosis zwischen 5×10^5 und 6×10^4 nicht unmittelbar letal wirkt, die Tiere im Durchschnitt für einen Zeitraum zwischen 14,2-19,0 Tagen am Leben bleiben und es zu einer ausreichend nachweisbaren Infektion kommt. Das aus dem beobachteten linearen Zusammenhang zwischen Überlebenszeiten und Infektionsdosis erstellte mathematische Modell erlaubt es, eine optimale Infektionsdosis unter Berücksichtigung der besonderen Ansprüche eines jedweden weiteren Testverfahrens individuell voraus zu berechnen.

Das Modell zum Anteil der Organinfektion in Bezug auf die Infektionsdosis ermöglicht eine Vorausberechnung des Organbefalls, was eine nützliche Grundlage für die Testung von Antimykotika darstellt. Die Infektionsdosis bzw. der

Anteil der Organinfektion kann individuell an die Bedürfnisse des jeweiligen Modells angepasst werden. Es ist denkbar, das Modell auch auf andere Zygomycetenformen auszuweiten.

In diesem Modell hat sich die Präferenz der Infektion von Leber und Niere über den gesamten Verlauf bestätigt. So gilt diesen Organen ein besonderes Augenmerk bei der Testung neuer Antimykotika auf Grundlage dieses Modells.

Da PCR und LightCycler signifikant sensitiver sind als Kultur und Histologie, stellen diese Methoden ein wertvolles Instrument in der Diagnostik der Zygomycose dar und haben das Potential die bisherigen Standardmethoden als wichtigste diagnostische Test abzulösen.

Das im Rahmen dieser Arbeit erstellte Tiermodell und die PCR-Methoden können zukünftig als Basis verwendet werden, um neue Therapiemethoden für die Zygomycose zu entwickeln und bieten so die Möglichkeit, einen Fortschritt in der Therapie dieser Erkrankung zu erreichen.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

bp	Basenpaare
CFU	Kolonie bildende Einheiten
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxyNukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HE	Hämatoxilin-Eosin
ICR	Institute of Cancer Research
KBE	Kolonie bildende Einheiten
LC	LightCycler-PCR
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
PAS	Perjodsäure-Schiffsches Reagenz
PCR	Polymerasekettenreaktion
PPR	Pattern Recognition Receptors
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
Tris	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3-Propandiol

8 Literaturverzeichnis

- 1: Abdel Hafez, S.I.I., (1984), Composition on fungal flora of four cereal grains in Saudi Arabia. *Mycopathologia*, 85: 53-57
- 2: Barchiesi, F., Spreghini, E., Santinelli, A., Fothergill, A. W., Pisa, E., Giannini, D., Rinaldi, M. G., Scalise, G., (2007), Posaconazole Prophylaxis in Experimental Systemic Zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* , 51: 73–77
- 3: Bialek R., Ernst F., Najvar L. K., Dietz K., Knobloch J., Graybill J. R. Schaumburg-Lever, G., (2002), Comparison of staining methods and a nested PCR assay to detect *Histoplasma capsulatum* in tissue sections. *Am. J. Clin. Pathol.*, 117 : 597-603
- 4: Bialek R., Fischer J., Feucht A., Najvar L. K., Dietz K., Knobloch J., Graybill, J. R., (2001), Diagnosis and monitoring of murine histoplasmosis by nested PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 39 : 1506-1509
- 5: Bialek R., Weiss M., Bekure-Nemariam K., Najvar L. K., Alberdi M. B., Graybill J. R. and U. Reischl , (2002), Detection of *Cryptococcus neoformans* DNA in tissue samples by nested and real time PCR assays. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 9: 461-496
- 6: Bialek, R., Konrad, F., Kern, J., Aepinus, C., Cecenas, L., Gonzalez, G. M., Just-Nübling, G., Willinger, B., Presterl, E., Lass-Flörl, C., Rickerts, V., (2005), PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue. *J. Clin. Pathol.*, 58: 1180-1184
- 7: Blitzer, A., Lawson, W., Meyers, B.R., Biller, H.F., (1980), Patient survival factors in paranasal sinus mucormycosis. *Laryngoscope*, 90: 635-648
- 8: Bodey, G., Bueltmann, B., Duguid, W., Gibbs, D., Hanak, H., Hotchi, M., Mal, (1996), Fungal Infections in cancer Patients: an international autopsy survey. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 11: 99-109
- 9: Boelaert, J. R., de Locht, M., Van Cutsem, J., Kerrels, V., Cantinieaux, B., (1993), Mucormycosis during deferoxamine therapy is a siderophore-mediated infection. *J. Clin. Invest.*, 91: 1979-1986
- 10: Boelaert, J. R., Fenves, A.Z., Coburn J.W., (1991), Deferoxamine therapy and mucormycosis in dialysis patients: Report of an international registry. *Am. J. Kidney Dis.*, 18: 660-667
- 11: Bowman, J. C., Abruzzo, G. K., Anderson, J. W., Flattery, A. M., Gill, C. J., Pikounis, V. B., Schmatz, D. M., Liberator, P. A., Douglas, C. M., (2001), Quantitative PCR Assay to Measure *Aspergillus fumigatus* Burden in a Murine Model of Disseminated Aspergillosis: Demonstration of Efficacy of Caspofungin Acetate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45: 3474-3481
- 12: Brown A. E., (1990), Overview of fungal infections in cancer patients. *Semin. Oncol.*, 17: 2-5
- 13: Buitrago, M. J., Gómez-López, A., Mellado, E., Rodríguez-Tudela, J. L., Cuenca-Estrella, M., (2005), Detección de *Aspergillus* spp. mediante PCR en tiempo real en un modelo murino de infección pulmonar. *Enferm. Infecc. Microb. Clín.*, 23: 464-468
- 14: Carrillo-Esper, R., Elizondo-Argueta, S., Vicuña-González, R. M.,

- González-Trueba, E. F., (2006), Isolated renal mucormycosis. *Gac. Med. Mex.*, 142: 511-514
- 15: Chakrabarti, A., Das, A., Sharma, A., Panda, N., Das, S., Gupta, K.L., Sakh, (2001), Ten years' experience in zygomycosis at a tertiary care centre in India. *J. Infection*, 42: 261-266
- 16: Connor, B. A., R. J. Anderson, J. W. Smith., (1979), *Mucor* mediastinitis. *Chest.*, 75: 525-526
- 17: Couch, L., Theilen, F., Mader, J.T., (1988), Rhinocerebral mucormycosis with cerebral extension successfully treated with adjunctive hyperbaric oxygen therapy. *J. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 114: 791-794
- 18: Cox, G. M., (Stand: 15. 05. 2005), Mucormycosis (zygomycosis). www.uptodate.com, 13: 1-7
- 19: Dannaoui, E., Meis, J. F. G. M., Loebenberg, D., Verweij, P. E., (2003), Activity of Posaconazole in Treatment of Experimental Disseminated Zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* , 47: 3647–3650
- 20: Dannaoui, E., Mouton, J. W., Meis, J. F. G. M., Verweij, P. E., Eurofung Network†, (2002), Efficacy of Antifungal Therapy in a Nonneutropenic Murine Model of Zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46(6): 1953–1959
- 21: Eucker, J., Sezer, O., Graf, B., Possinger, K., (2001), Mucormycoses. *Mycoses*, 44: 253-341
- 22: Funada, H., and T. Matsuda, (1996), Pulmonary mucormycosis in a haematology ward. *Intern. Med.*, 35: 540-544
- 23: Gale, G. R., Welch, A., (1961), Studies of opportunistic fungi. *Am. J. Med.*, 45: 604-612
- 24: Greenberg, R. N., Mullane, K., van Burik, J.-A. H., Raad, I., Abzug, M. J., Anstead, G., Herbrecht, R., Langston, A., Marr, K. A., Schiller, G., Schuster, M., Wingard, J. R., Gonzalez, C. E., Revankar, S. G., Corcoran, G., Kryscio, R. J., Hare, R., (2006), Posaconazole as Salvage Therapy for Zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50(1): 126–133
- 25: Holzberg, M., Artis, W.M., (1983), Hydroxamate siderophore production by opportunistic and systemic fungal pathogens. *Infect. Immun.*, 40: 1134-1139
- 26: Hummel, M., Baust, C., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Schleiermacher, D., Spiess, B., Skladny, H., Mörz, H., Hehlmann, R., Buchheidt, D., (2004), Detection of *Aspergillus* DNA by a nested PCR assay is superior to blood culture in an experimental murine model of invasive aspergillosis. *J. Med. Microbiol.* , 53: 803-806
- 27: Husain, S., Alexander, B.D., Munoz, P., Avery R.K., Houston, S., Pruett, T., (2003), Opportunistic mycelial fungal infections in organ transplant recipients: emerging importance of non-*Aspergillus* mycelial fungi. *Clin. Infect. Dis.*, 37: 221-229
- 28: Ibrahim, A. S., Avanesian, V., Spellberg, B., Edwards, J. E. Jr., (2003), Liposomal amphotericin B, and not amphotericin B deoxycholate, improves survival of diabetic mice infected with *Rhizopus oryzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47: 3343-3344
- 29: Ibrahim, A. S., Bowman, J. C., Avanesian, V., Brown, K., Spellberg, B., Edwards, J. E. Jr., Douglas, C. M., (2005), Caspofungin inhibits *Rhizopus*

- oryzae 1,3-beta-D-glucan synthase, lowers burden in brain measured by quantitative PCR, and improves survival at a low but not a high dose during murine disseminated zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49: 721-727
- 30: Löffler J., Kloepfer K., Hebart H., Najvar L., Graybill J. R., Kirkpatrick W. R., Patterson T. F., Dietz K., Bialek R. and H. Einsele, (2002), Polymerase chain reaction detection of *Aspergillus* DNA in experimental models of invasive aspergillosis. *J. Infect. Dis.*, 185: 1203-1206
- 31: Maertens J., Demuyneck H., Verbeken E.K., Zache´e P., Verhoef G. E. E., Vandenberghe P. and M.A. Boogaerts, (1999), Mucormycosis in allogeneic bone marrow transplant recipients: report of five cases and review of the role of iron overload in the pathogenesis. *Bone Marrow Transplant.*, 24: 307-312
- 32: Marchevsky, A.M., Bottone, E.J., Geller, S.A., Giger, K., (1980), The changing spectrum of disease, etiology and diagnosis of mucormycosis. *Hum. Pathol.*, 11: 457-464
- 33: Mc Nulty, J. S., (1982), Rhinocerebral mucormycosis: Predisposing factors. *Laryngoscope*, 92: 1140-1143
- 34: Murphy, R.A., Miller, W.T., (1996), Pulmonary mucormycosis. *Semin. Roentgenol.*, 31: 83-87
- 35: Nosari, M., Oreste, P., Montillo, M., Carrafiello, G., Draisci, M., Muti, G., (2000), Mucormycosis in hematologic malignancies: an emerging fungal infection. *Haematologia*, 85: 660-667
- 36: Odds, F. C., Van Greven, F., Espinel-Ingroff, A., Bartlett, M. S., Ghannoum, M. A., Lancaster, M. V., Pfaller, M. A., Rex, J. H., Rinaldi, M. G., Walsh T. J., (1998), Evaluation of Possible Correlations between Antifungal Susceptibilities of Filamentous Fungi In Vitro and Antifungal Treatment Outcomes in Animal Infection Models. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42(2): 282-288
- 37: Pagano L., Ricci P., Tonso A., Nosari A., Cudillo L., Montillo M., Cenacchi A., Pacilli L., Fabbiano F. and A. del Favero and Gimema Infection Program, (1997), Mucormycosis in patients with haematological malignancies: a retrospective clinical study of 37 cases. *Br. J. Haem.*, 99: 331-336
- 38: Pfaffenbach, B., Donhuijsen, K., Pahnke, J., Bug, R., Adamek, R.J., Wegener, (1994), Systemic fungal infections in hematologic neoplasms. An autopsy study of 1,053 patients. *Med. Klin.*, 89: 299-304
- 39: Pfaller M.A., Diekema, D.J., (2004), Rare and Emerging Opportunistic Fungal Pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.*, 42: 4419-4431
- 40: Pillsbury, H. C., Fischer, N. D., (1977), Rhinocerebral mucormycosis. *Arch. Otolaryngol.*, 103: 600-604
- 41: Randhawa H.S., (2000), Respiratory and systemic mycoses: an overview. *Indian J. Chest Dis. Allied Sci.*, 42: 207-219
- 42: Ribes, J.A., Vanover-Sams, C.L., Baker D.J., (2000), Zygomycetes in Human Disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13: 236-301
- 43: Rickerts V., Loeffler, J., Böhme, A., Einsele, H., Just-Nübling, G., (2001), Diagnosis of Disseminated Zygomycosis Using a Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol. Inf. Dis.*, 20: 744-745

- 44: Rickerts, V., Mousset, S., Lambrecht, E., Tintelnot, K., Schwerdtfeger, R., Presterl, E., Jacobi, V., Just-Nübling, G., Bialek, R., (2007), Comparison of histopathological analysis, culture, and polymerase chain reaction assays to detect invasive mold infections from biopsy specimens. *Clin. Infect. Dis.*, 44(8): 1078-1083
- 45: Roth, A., Mauch, H., Göbel, U., (1997), Heft 1 Nukleinsäuren-Amplifikationstechniken in: Mauch, H., Lüttichen, R. und Gatermann, S. N:MiQ Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, Fischer, Stuttgart: 1. Auflage
- 46: Saiki, R. K., Bugawan, T.L., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., (1986), Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, 324: 163-166
- 47: Sanger F., Nicklen S, Coulson A. R., (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat.l Acad. Sci. USA*, 74(12): 5463-7
- 48: Schwarz, P., Bretagne, S., Gantier, J.-C., Garcia-Hermoso, D., Lortholary, O., Dromer, F., Dannaoui, E., (2006), Molecular Identification of Zygomycetes from Culture and Experimentally Infected Tissues. *J. Clin. Microbiol.*, 44(2): 340-349.
- 49: Sheldon W.H., and Bauer, (1995), The development of the acute inflammatory response to experimental cutaneous mucormycosis in normal and diabetic rabbits. *J. Exp. Med.*, 110: 845-852
- 50: Spellberg B., Fu, Y., Edwards, J.E., Jr., Ibrahim, A.S., (2005), Combination therapy with amphotericin B lipid complex and caspofungin acet. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49: 830-836
- 51: Sun, Q.N., Fothergill, A.W., McCarthy, D.I., Rinaldi, M.G., (1999), In vitro activities of posaconazole, amphotericin B, and fluconazole against. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46: 1581-1582
- 52: Tedder, M., Spratt, J.A., Anstadt, M.P., Hegde, S.S., Tedder, S.D., Lowe, J, (1994), Pulmonary Mucormycosis: Results of medical and surgical therapy. *Ann. Thorac. Surg.*, 57: 1044-1050
- 53: The DoctorFungus Corporation, Zygomycosis [online]. available from world wide web, <http://www.doctorfungus.org/thefungi/rhizopus.htm> : Stand:15. 05. 2005
- 54: The DoctorFungus Corporation, Rhizopus [online]. available from world wide web, <http://www.doctorfungus.org/mycoses/human/zygo/zygomycosis.htm> : Stand:15. 05. 2005
- 55: Van Cutsem J, Boelaert JR., (1989), Effects of deferoxamine, feroxamine and iron on experimental mucormycosis (zygomycosis). *Kidney Int.*, 36: 1061-1068
- 56: Waldorf, A. R., Diamond, R., (1984), Cerebral mucormycosis in diabetic mice after intranasal challenge. *Infect. Immun.*, 44: 194-195
- 57: Waldorf, A. R., Ruderman, N., Diamond, R. D. , (1984), Specific Susceptibility to Mucormycosis in Murine Diabetes and Bronchoalveolar Macrophage Defense against Rhizopus. *J. Clin. Invest.*, 74: 150-160
- 58: Yamaguchi H., Zygomycosis. Makoto Miyaji M. D., *Animal Models in medical mycology* : 134-140

59: Yohai, R. A., Bullock, J.D., Aziz, A.A., Markert, R.J., (1994), Survival Factors in rhino-orbital-cerebral mucormycosis. *Surv. Ophthalm.*, 39: 3-22

9 Danksagung

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

Herrn Professor Dr. R. Bialek, der mir diese Arbeit ermöglicht hat, in deren Rahmen ich einzigartige Erfahrungen sammeln konnte, für seine exzellente und engagierte Betreuung, die Vermittlung der Begeisterung an der Wissenschaft und seine Ausdauer bei der Korrektur der Arbeit.

Frau Dr. Gloria Gonzales Gonzales und ihrem Team von der Universität Autonoma de Nuevo Leon für die warmherzige Aufnahme, fachkundige Anleitung und engagierte Betreuung,

Frau Dr. Schönfisch und dem Team vom Institut für Medizinische Biometrie, Universitätsklinikum Tübingen für die Unterstützung bei den statistischen Berechnungen,

Herrn Dr. Ceceñas von der Universität Autonoma de Nuevo Leon für die histologische Bearbeitung der Proben,

Herrn Dr. Reischl und seinem Team der Universität Regensburg für die Bearbeitung der Proben mit der LightCycler-PCR,

Dipl. Biol. Walter Deschle und Dr.rer. nat Oliver Schneider, für die Einweihung in die Geheimnisse der Laborarbeit, sowie auch den übrigen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe und der Arbeitsgruppe von Dr. rer. nat. Ulrike Zelck für die schöne Arbeitsatmosphäre und stetige Hilfsbereitschaft,

meinen Eltern Marion und Peter Schmidt-Rüdt, die mir eine sorgenfreie Studienzeit ermöglicht und mich stets auf meinem Weg geduldig und liebevoll unterstützt haben,

den unermüdlichen Korrekturlesern dieser Arbeit,

Simon, der nicht müde wurde, sich an meiner statt mit den Tücken der Informationsverarbeitung auseinanderzusetzen, für seine Zeit, stetige Motivation und liebevolle Unterstützung.