

Aus der Abteilung Medizinische Mikrobiologie  
(Prof. Dr. med. U. Groß)  
im Zentrum Hygiene und Humangenetik  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Göttingen

---

***Optimierung der molekularbiologischen Diagnostik  
systemischer Mykosen***

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Rolf Christian SCHETTLER

aus

Northeim

Göttingen 2012

<b>Dekan:</b>	Prof. Dr. med. C. Frömmel
<b>I. Berichterstatter:</b>	Prof. Dr. med. U. Groß
<b>II. Berichterstatter/in:</b>	Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Weidmann
<b>III. Berichterstatter/in:</b>	
<b>Tag der mündlichen Prüfung:</b>	04.06.2012

<b>I.</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>II.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Bedeutung wichtiger Pilzarten als Krankheitserreger	1
1.2.	Diagnostik von Pilzinfektionen	4
1.3.	Fragestellung und Motivation	6
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>7</b>
2.1.	Material	7
2.1.1.	Spezies	7
2.1.2.	Geräte	8
2.1.3.	Aufarbeitungssysteme/ PCR-Kits	9
2.1.4.	Chemikalien	9
2.1.5.	Primer/ Enzyme/ Sonden/ Antikörper	10
2.1.6.	Verbrauchsmaterialien	10
2.1.7.	Lösungen	11
2.2.	Methoden	12
2.2.1.	Herstellung von seriellen Pilzverdünnungsreihen	12
2.2.2.	Kultivierung der bakteriellen Negativkontrolle	13
2.2.3.	Kultivierung und Aufarbeitung der PCR-Positivkontrolle	13
2.2.4.	DNA-Präparation aus seriellen Pilzverdünnungsreihen	13
2.2.5.	DNA-Präparation aus seriellen Pilzverdünnungsreihen in EDTA-Blut	19
2.2.6.	DNA-Amplifikation via Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
2.2.6.1.	Primerdesign	23
2.2.6.2.	PCR-Protokolle (A-C)	25
2.2.7.	Agarose-Gelelektrophorese	30
2.2.8.	Hybridisierung nach "Southern-Blot"-Verfahren	30
2.2.8.1.	Sonden	31
2.2.9.	Kontaminationsprophylaxe/ Kontaminationsquellen	33
2.2.10.	Standardisierung	33

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
3.1.	Vergleich der DNA-Präparationsprotokolle inkl. Protokoll I. und II	34
3.1.1.	Protokoll III.	35
3.1.2.	Protokoll IV.	37
3.1.3.	Protokoll V.	38
3.1.4.	Protokoll VI.	40
3.1.5.	Protokoll VI.b.	41
3.1.6.	Übersicht der Aufarbeitungsprotokolle	43
3.2.	Vergleich der PCR-Amplifikationsprotokolle	43
3.2.1.	PCR-Protokoll A / Standard	44
3.2.2.	Southern-Blot	44
3.2.3	PCR-Protokoll B / Real-Time-PCR	46
3.2.4	PCR-Protokoll C / Nested-PCR	47
3.2.5	Übersicht der Amplifikationsprotokolle	49
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>50</b>
4.1.	Effizienz der DNA-Extraktionen	51
4.2.	Vergleich der DNA-Amplifikationsmethoden	54
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>58</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>59</b>

## II. Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
Bsp.	Beispiel/ beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CFU	Kolonie bildende Einheiten
°C	Grad Celsius
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
E-cups	Eppendorf-cups
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii ; und andere
EtBr	Ethidiumbromid
evtl.	eventuell
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gravitationskraft; Gramm
h	Stunde/n
HCl	Wasserstoffchlorid; Salzsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
HR-CT	hochauflösende Computertomografie
inkl.	inklusive
k.A.	keine Angabe
M	Mol
max.	maximal
mM	Milimol

## II. Abkürzungsverzeichnis

---

mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µl	Mikroliter
N <sub>2</sub>	Stickstoff
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	Phosphate-buffered-saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	Privatdozent
pg	Pikogramm
pH	pondus Hydrogenii
pmol	Pikomol
Prof.	Professor
RCLB	Red-cell-lysis-buffer
rpm	rotation per minute/ Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time-PCR/ Echtzeit-PCR
s.	siehe
s.Abb.	siehe Abbildung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde/n
spp.	Spezies
Std.	Stunde
Taq	Thermophylus aquaticus
T <sub>m</sub>	theoretischer Schmelzwert
T <sub>M</sub>	DNA-Schmelzwert
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tx p.a.	Röntgen-Thorax-Aufnahme mit posterior- anteriorem Strahlengang
U	Unit

## II. Abkürzungsverzeichnis

---

u.a.	unter anderem
Univ.	Universität
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
WCLB	White-cell-lysis-buffer
Wiss.	Wissenschaftlich/-e
x	X ; mal
z.B.	zum Beispiel
zzgl.	zuzüglich
~, ≈	ungefähr
%	Prozent
>	größer als
=	gleich
&	und
-	bis; minus; Bindestrich
/	pro; bei
∞	unendlich
≤	kleiner gleich
∅	Durchmesser
®	geschütztes Markenzeichen

### **Nukleotidbasen**

A	Purinbase Adenin
C	Pyrimidinbase Cytosin
G	Purinbase Guanin
T	Pyrimidinbase Thymidin

### **Spezies**

<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

### 1. Einleitung

Pilze sind ubiquitär vorkommende eukaryontische Lebewesen, die bei einer Anzahl von ~ 1.500.000 Spezies (Hawksworth, 2001) mehr als ¼ des Biomassenreservoirs der Erde ausmachen. Wurde im ausgehenden 18. Jahrhundert vom damaligen Direktor des Mannheimer Botanischen Gartens, F.C. Medicus (1803), noch die Auffassung proklamiert, dass Pilze spontan entstehen würden und nichts als Kristalle wären, die aus dem Schleim von verrottetem Material pflanzlichen und tierischen Ursprungs entstünden, so wissen wir heute, dass es sich durchaus um hochentwickelte Organismen handelt. Glücklicherweise sind hiervon nur ca. 150 Arten humanpathogen, bei denen die Hefe *Candida albicans* und der Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* aktuell eindeutig die häufigsten Erreger darstellen (Winston et al., 1995; Patel und Paya, 1997; Kullberg und Oude Lashof, 2002).

#### 1.1. Bedeutung wichtiger Pilzarten als Krankheitserreger

Die meisten humanpathogenen Hefen und Schimmelpilze, so auch *C. albicans* und *A. fumigatus*, können als physiologische Haut- oder Schleimhautkommensalen auch bei Gesunden vorkommen und dann u.a. in Stuhlproben, Haut- und Schleimhautabstrichen nachgewiesen werden. Ohne Infektzeichen gilt dies jedoch „per definitionem“ nicht als Infektion.

Innerhalb der vergangenen drei Dekaden hat die Inzidenz der invasiven Mykosen signifikant zugenommen (Wilson LS et al., 2002; Nucci und Marr, 2005; Bassetti et al., 2011). So hat sich beispielsweise die Anzahl der *Candida* – Infektionen in den USA vervielfacht, *Candida* rangiert als vierthäufigster Keim bei Blutinfektionen - gleichauf mit gramnegativen Bakterien (Beck – Sagué und Jarvis, 1993; Abi-Said et al., 1997; Edmond et al., 1999; Wisplinghoff et al., 2004; Mikulska et al., 2011). Ähnliches gilt für Europa, wo *Candida*-Infektionen mit zu den am häufigsten nachgewiesenen Erkrankungen zählen (Bouza et al., 1999; Bouza und Munoz, 2008). Als Grund hierfür ist u.a. die zunehmende Anzahl immunkompromittierter Patienten mit HIV-Infektionen (Marty und Mylonakis, 2002) und deutlich ausgedehntere Intensivtherapieregime zu nennen. Verschiedene

## 1. Einleitung

---

Pathogenitätsfaktoren sind in der Vergangenheit diesbezüglich diskutiert worden. Hierbei steht neben der Änderung des Wirtsmilieus und der damit verbundenen Verschiebung der mikrobiologischen Flora sowie einer evtl. vorliegenden Immundefizienz des Wirtsorganismus` in erster Linie die Adhäsion des Erregers an epitheliale Wirtszellen im Vordergrund, die als Anfang der Infektion nunmehr als Virulenzmechanismus akzeptiert ist (Sundstrom, 1999). Der weitere Krankheitsverlauf mit Übergang von Kolonisation und Invasion zur Disseminierung gestaltet sich oft fließend und ist klinisch nicht immer eindeutig. So kann sich z.B. *C. albicans* bei gastrointestinalen Infektionen als antibiotikaresistenter Keim in der gestörten Darmflora ungehinderter vermehren und leichter die Darmwand penetrieren (Andrutis et al., 2000).

Auch die Anzahl der *Aspergillus* – Infektionen steigt (Upton et al., 2007; Erjavec et al., 2009; Kriengkauykiat et al., 2011). Waren Anfang der neunziger Jahre noch rund 30% der Pilzinfektionen bei onkologischen Patienten auf *Aspergillus* zurückzuführen, so war dieser Schimmelpilz Anfang des neuen Jahrtausends schon Hauptinfektionsursache (Lin et al., 2001). Untersuchungen aus den USA ergaben, dass sich die Zahl der *Aspergillus*-assoziierten Todesfälle zwischen 1980 und 1997 vervierfacht hat (McNeil et al., 2001). Dies ist wahrscheinlich multifaktoriell bedingt, wobei die Hauptgründe u.a. in der Intensivierung chemotherapierter Tumorerkrankungen (Labbe et al., 2007) sowie ausgedehnterer Organtransplantationen (Rubin, 2002) mit iatrogenen Immunsuppression zu sehen sind (Kousha et al., 2011). Auch eine potentere und oft zu schnell, zu lange und zu radikal durchgeführte Gabe von Breitbandantibiotika kann diesbezüglich begünstigend wirken.

Für *C. albicans*, 1846 erstmalig als Krankheitserreger beschrieben (Berg, 1846) und als Kommensale eigentlich harmlos, ist eine Einteilung zwischen nicht-invasiver und invasiver Candidose als Zustand der Infektion beschrieben (Bodey et al., 1993). Die nicht-invasive Candidose steht für die häufig milder verlaufende Form des Haut- und Schleimhautbefalls (z.B. mukokutane oder vulvovaginale Candidosen), sowie den Nachweis in verschiedenen Körperflüssigkeiten (z.B. urogenitaler Nachweis). Für die invasive Candidose lassen sich Subgruppen definieren: Die häufigste Form ist die Candidämie mit Nachweis von *Candida spp.* im Blut. Hiervon abgegrenzt werden kann die akut disseminierte Candidose mit hämatogen entstandener Organinvasion, sowie die chronisch disseminierte

## 1. Einleitung

---

Candidose als manifeste Organinfektion. In neueren Studien hat sich gezeigt, dass neben *Candida* – Infektionen mit *C. albicans* zunehmend auch „Nicht – albicans Stämme“ eine Rolle spielen (Rangel-Frausto et al., 1999; Pfaller und Diekema, 2007; Hachem et al., 2008; Pereira et al., 2010; Mikulska et al., 2011). Hier seien vor allem *C. tropicalis*, *C. glabrata* und *C. krusei* (= *Issatchenkia orientalis*) genannt.

Die klinische Einteilung bei *Aspergillus* – Infektionen ist dagegen auf Grund von anfänglich oftmals fehlender Klinik schwieriger und wird häufig als „wahrscheinlich“ oder „nachgewiesen“ beschrieben.

Der in der Umwelt ubiquitär vorkommende Pilz, 1863 von Johann Baptist Georg Wolfgang Fresenius erstmals beschrieben (Fresenius, 1863), kann durch seine ungeschlechtlichen Sporen, den Konidien, vorzugsweise den Respirationstrakt, seltener den Gastrointestinaltrakt, das ZNS oder die Haut infizieren (Walsh, 1998). Diesbezüglich zeigen Untersuchungen auch die Möglichkeit der Übertragung durch kontaminiertes Leitungswasser (Warris et al., 2001). Neben *A. fumigatus*, der in > 80% der Fälle für eine humanpathogene *Aspergillus*-Infektion verantwortlich zu sein scheint, kommen mit abnehmender Relevanz auch *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* und *A. nidulans* vor (Wald et al., 1997). Eine diagnostische Einteilung kann in eine akut- bzw. chronisch-invasive Aspergillose vorgenommen werden (Latgé, 1999). Die akute, meist pulmonal-invasive Aspergillose kann bei stark abwehrgeschwächtem Organismus disseminiert verlaufen, andere Organsysteme befallen und somit trotz eingeleiteter Therapie nicht selten letal enden (Denning, 1996; Patterson et al., 2000; Stevens et al., 2000; Wanke et al., 2000; Lin et al., 2001). Davon zu unterscheiden ist die chronisch-invasive Form des immunkompetenten Patienten mit lokalem Befall und Abkapselung (z.B. pulmonales Aspergillom). Auch sind nicht invasive Formen evident, z.B. die allergisch-bronchopulmonale Aspergillose, die bei Patienten mit allergischem Asthma als Hypersensitivitätsreaktion zu beobachten ist und zu keiner systemischen Infektion führt.

*S. cerevisiae*, eine auch als Bier- oder Bäckerhefe bekannte Gattung der Ascomyceten (= Schlauchpilze), hat unter Normalbedingungen keine pathologische Relevanz für den Menschen. Einige Stämme, so z.B. *S. boulardii* (=

## 1. Einleitung

---

*S. cerevisiae* Hansen CBS 5926), werden gar als durchfallhemmende Mittel oder Appetitanreger therapeutisch eingesetzt.

### 1.2. Diagnostik von Pilzinfektionen

Bisher gestaltet sich die zeitgerechte Diagnostik der häufig immunsupprimierten, multimorbiden Patienten oft schwierig. So stellen Kliniker die Diagnose einer invasiven und nur all zu oft lebensbedrohlichen Pilzkrankung nicht selten auf Grund „weicher“ klinischer Parameter: Verschlechterung des Allgemeinzustandes, Erhöhung der Infektionsparameter trotz antibiotischer Therapie, topische Keimbesiedlungen (z.B. Soor). Radiologische Untersuchungen (z.B. konventionelle Röntgen-Diagnostik bzw. HR-CT; s. Abb. 1, Bild 1 & 2) können hier oft nur Verdachtsmomente widerspiegeln (Hjortrup et al., 1997).

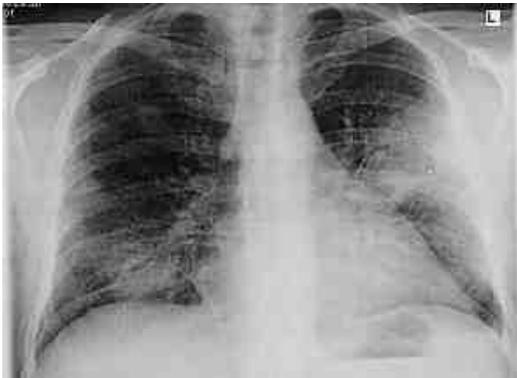


Bild 1: konventioneller Röntgen-Tx p.a.



Bild 2: CT-Schichtaufnahme

**Abbildung 1:** 40-jähriger Patient mit *Aspergillus*-Pneumonie des linken Mittelfeldes bei maligner hämatologischer Grunderkrankung und iatrogenen Immunsuppression

Ein zeitnaher Beginn der antimykotischen Therapie ist jedoch essenziell für eine gute Überlebensrate der Patienten (Morrell et al., 2005; Greene et al., 2007). Ist dies nicht gegeben, können leider auf Grund des oft raschen Progresses der Erkrankungen die meisten Pilz-Infektionen erst post mortem eindeutig diagnostiziert werden (Markin et al., 1990). Dies ist ein Grund, warum bei bisher fehlender Labor-Standardisierung der „Goldstandard“ zur klinischen Beurteilung

## 1. Einleitung

---

invasiver Mykosen laut Empfehlung der DGHO (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie/ Onkologie) weiterhin der kulturelle und/ oder der histopathologische Nachweis aus sonst sterilen Körperflüssigkeiten ist (Ruhnke et al., 2003). Diese diagnostischen Methoden sind jedoch sehr zeitaufwendig. Beispielsweise benötigt man für die kulturelle Anzüchtung und Differenzierung von *C. albicans* zwei bis drei Tage – bei *A. fumigatus* kann sich dies sogar noch weiter verzögern. Dadurch wird eine zeitnahe, valide Diagnose erschwert.

Bereits in den neunziger Jahren wurde deshalb intensiv nach Alternativmethoden für den Pilznachweis gesucht. Anfänglich gute Ergebnisse bei der Durchführung serologischer Detektionsverfahren begründeten bisher keinen Durchbruch als alleinige Nachweisverfahren (Ruhnke et al., 2003). So kann eine fehlende oder herabgesetzte Immunantwort bei Immunsuppression, z.B. im Rahmen onkologischer Therapieregime oder bei HIV-Infektionen, zu falsch negativen Testergebnissen führen. Auch kann die Verwertbarkeit von Antigentests an möglicher Kreuzreaktivität mit unspezifischen Antigenen (z.B. Rheumafaktoren) oder schlechter Sensibilität (Kappe et al., 1996) scheitern.

Mit dem Aufkommen der PCR-Methodik ab Mitte der achtziger Jahre wurden vermehrt molekularbiologische Verfahren für die mykologische Diagnostik eingesetzt. Im Laufe der Zeit haben sich daher viele Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren beschäftigt (Müller et al., 1998; Löffler et al., 1997 & 2000a; Bialek et al., 2001). Definiertes Ziel war und ist es, entweder durch mechanische Krafteinwirkung oder durch enzymatische Lyse Pilz-DNA standardisiert zu isolieren. In der nachfolgenden Amplifikation der DNA mittels PCR (Einsele et al., 1997; Löffler et al., 2000b; Jaeger et al., 2000) sollen dann möglichst niedrige Nachweisgrenzen erreicht werden. Die Spezifität für Pilz-DNA wird hierbei durch ein spezielles Design der Primersonden, die an sogenannte „18S-Multicopy-Gene“ des Pilzgenoms binden, gewährleistet. Da die Sonden „pilzspezifisch“, aber nicht „speziesspezifisch“ sind, ergibt sich so die Möglichkeit eines weitgefächerten „Screenings“ von Untersuchungsmaterial.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Hilfe der modernen molekularbiologischen Verfahren ein Meilenstein in der Diagnostik invasiver Mykosen gesetzt wurde. Lediglich ein direkter Vergleich und eine einheitliche Standardisierung der unterschiedlichen Methoden stehen noch aus.

### 1.3. Fragestellung und Motivation

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung bzw. Identifikation einer möglichst sensitiven und spezifischen molekularbiologischen Methode zum Nachweis der häufigsten human-pathogenen Pilze *C. albicans* und *A. fumigatus*. Dabei sollte eine Standardisierung der Methodik bei möglichst geringem Zeitaufwand erreicht werden. Somit sollte ein Verfahren etabliert werden, das in die klinische Routinediagnostik integriert werden kann und valide Ergebnisse innerhalb von ein bis zwei Arbeitstagen ermöglicht.

Die Arbeit gliedert sich hierdurch in fünf wesentliche Teile:

- Der Vergleich von publizierten Aufarbeitungsprotokollen (s. 2.2.4., Protokolle I. – V.) unter standardisierten Labor- und PCR-Bedingungen
- Die Entwicklung eines optimierten und zusätzlichen „home-made“-Protokolls (s. 2.2.4., Protokoll VI.)
- Die Untersuchung von artifiziell kontaminiertem EDTA-Blut (s. 2.2.5.)
- Der Vergleich unterschiedlicher, bekannter PCR-Methoden (s. 2.2.6.)
- Die Sensitivitätssteigerung durch „Southern-Blot“-Technik (s. 2.2.8.).

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Spezies

Für die seriellen Verdünnungsreihen wurden die Pilzspezies freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Utz Reichard aus der Abteilung für Mykologie des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt. *C. albicans* und *S. cerevisiae* wurden dabei der „Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen“ (DSMZ, Braunschweig) entnommen, bei *A. fumigatus* handelt es sich um ein Patientenisolat (Reichard et al., 1990):

*Candida albicans* (DSMZ 6659)

*Saccharomyces cerevisiae* (DSMZ 1333)

*Aspergillus fumigatus* (D 141 / NRRL 6585).

Die mitgeführte bakterielle DNA wurde der „American Type of Culture Collection“ (ATCC, Rockville/ Maryland) entnommen und aus

*Staphylococcus aureus* (ATCC; 25923)

isoliert.

Für die Erstellung der LightCycler®-Referenzkurven wurden zusätzlich folgende Pilz-Spezies mit einer Anzahl von  $10^6$  Zellen / ml verwendet, die freundlicherweise von Frau Prof. Dr. M. Borg-von Zepelin aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt wurden:

## 2. Material und Methoden

---

<i>Candida albicans</i>	[SC 5314] (klinisches Isolat nach Fonzi und Yrwin, 1993)
<i>Candida tropicalis</i>	[DSMZ 4328]
<i>Candida tropicalis</i>	[DSMZ 4959]
<i>Candida glabrata</i>	(klinisches Isolat der Mykologie Göttingen; Probe 1)
<i>Candida glabrata</i>	(klinisches Isolat der Mykologie Göttingen; Probe 2)
<i>Aspergillus flavus</i>	[DSMZ 818].

### 2.1.2. Geräte

---

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
Zentrifuge	5415C	Eppendorf / Hamburg
Zentrifuge	5417R	Eppendorf / Hamburg
Zentrifuge	5415D	Eppendorf / Hamburg
Zentrifuge	Z233MK-2	Hermle / Wehingen
Vortexer	Reax I	Heidolph / Schwabach
Thermomixer	Compact	Eppendorf / Hamburg
Thermomixer	Comfort	Eppendorf / Hamburg
Wasserbad	Typ 1012	GFL / Burgwedel
Mikrowelle	KOR-63D7	DAEWOO / Korea
Spannungsgerät	EPS 400 / 500	Amersham / England
Elektrophoresekammer		Stratagene/ USA
Waage	440-33	Kern&Sohn / Balingen
pH-Meter	766 Calimatic	Knick / Berlin
pH-Meter	CG 804	Schott / Hofheim
UV-Digitalkamera	Bio Doc II	Biometra / Göttingen
Thermocycler	T3	Biometra / Göttingen
Zellruptierer	Fast Prep FP 120A-230	Qbiogene / USA
Real-Time-PCR-Gerät	Light Cycler 1,5	Roche / Mannheim

---

## 2. Material und Methoden

---

Zählkammer	THOMA-Zählkammer Tiefe 0,1 mm; 0,0025 mm <sup>2</sup>	Supe-Rior / Germany
Durchlichtmikroskop	Axioskop 50	Carl Zeiss / Germany
Aluminiumständer (zum E-cup Verschluss)		Wiss. Werkstätten / Univ. Göttingen
Magnetrührer	Monotherm	Variomag / USA
Schwenktisch	Duomax 1030	Heidolph / Schwabach
Vakuufofen	PVT 220	Heraeus / Hanau

### 2.1.3. Aufarbeitungssysteme/ PCR-Kits

System	Hersteller
Qiamp®DNA Mini-Kit	Qiagen GmbH / Hilden
FastDNA®Kit	Bio 101 / USA
LightCycler® FastStart DNA Master <sup>Plus</sup>	
SYBR-Green I-Kit	Roche / Mannheim

### 2.1.4. Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
100 bp DNA Größenstandart	Gene Ruler 100 bp MBI Fermentas / St. Leon-Rot
10x PCR Puffer	PCR Reaction Buffer Roche / Mannheim
Magnesium-Chlorid	MgCl <sub>2</sub> 25 mM Roche / Mannheim
Ethidiumbromid	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub> Merck / Darmstadt
EDTA	Ethylendiamintetra- essigsäure Roth / Karlsruhe
SDS	Natriumdodecylsulfat Roth / Karlsruhe
Ethanol 96%	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH Merck / Darmstadt
Tris	Tris(hydroxymethyl)- Aminomethan Merck / Darmstadt
Tris – HCl 99,9%; pH 8,0	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> Paesel & Lorei / Hanau

## 2. Material und Methoden

---

Stickstoff (flüssig)		Wiss. Werkstätten / Univ. Göttingen
Natriumchlorid	NaCl	Roth / Karlsruhe
Natriumhydrazidplättchen	NaOH	Merck / Darmstadt
Salzsäure 37% (rauchend)	HCl	Merck / Darmstadt
β-Mercaptoethanol 99%	C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> OS	Roth / Karlsruhe
Isopropanol (2-Propanol)	CH <sub>3</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub>	Merck / Darmstadt
Phenol-Chloroform-Isoamyl- Alkohol (25:24:1)		Roth / Karlsruhe
Agarose	Roti Garose NEE0 Ultra	Roth / Karlsruhe
Magermilchpulver	Sucofin®	Zeven / Germany
Detektionssystem	ECL®-Detection- Reagents (RPN 2105)	Amersham / England
Tri-Na-Citratdihydrat	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> Na <sub>3</sub> +2H <sub>2</sub> O	Merck / Darmstadt

### 2.1.5. Primer / Enzyme / Sonden / Antikörper

#### Bezeichnung

#### Hersteller

---

Proteinase K-PCR Grade (20,6 mg / ml)	Roche / Mannheim
Proteinase K	Qiagen / Hilden
Primer & Digoxigenin markierte Sonden	Sigma / Steinheim
Anti-Digoxigenin Antikörper Fab fragments (konjugiert mit Peroxidase; 150mU/ml)	Roche / Mannheim
Zymolyase-100T (von <i>Arthrobacter luteus</i> ) (100.000 U/ g)	ICN Biomedicals / USA
Taq DNA Polymerase (5U / µl)	Roche / Mannheim
Heringssperma DNA	Invitrogen / USA

### 2.1.6. Verbrauchsmaterialien

#### Bezeichnung

#### Hersteller

---

Pipettenspitzen mit Filter, steril (1000 µl, 100 µl, 10 µl)	Sarstedt / Nümbrecht
Impfeschlingen, steril (1 µl)	Sarstedt / Nümbrecht

## 2. Material und Methoden

---

Safe-lock-cups (1,5 ml)	Eppendorf / Hamburg
Safe-seal micro-tube (2 ml)	Sarstedt / Nümbrecht
PCR Softtubes (0,5 ml)	Biozym Diagnostik / Hess. Oldendorf
Nitrozellulose-Membran (Optitran BA-S 83; reinforced; 0,2 µm)	Schleicher & Schuell / Dassel
Glasplatten und -wannen;	Wissenschaftliche Werkstätten /
Gelträger; Gelkämme	Univ. Göttingen
Gel Blotting-Papier (GB 004; 3 mm)	Schleicher & Schuell / Dassel
Glass-Beads (0,5 mm)	Merlin / Holland
Agarplatten (Blut & Sabouraud - Glucose)	Mikrobiologie / Göttingen
Labor-Film Biomax ML	Eastman-Kodak / USA

### 2.1.7. Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lysis buffer	0,05M EDTA pH 8,0 + 0,3% SDS
TE-Puffer	0,01M Tris-HCl - 0,001 M EDTA; pH 8,0
White-cell-lysis-buffer (WCLB)	10 mM Tris, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0,2 % SDS, 200 µg Proteinase K / ml
Zymolyase-Arbeitslösung	300 mg Zymolyase / ml, 50 mM Tris pH 7,5, 10mM EDTA, 28 mM β-Mercaptoethanol
Red-cell-lysis-buffer (RCLB)	10 mM Tris pH 7,6 , 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM NaCl
50x TAE-Puffer	2 M Tris-HCl (pH 8,6), 50 mM EDTA (pH 8,0), 5,7% Essigsäure)
Hydrolyselösung	1,5 M NaCl + 0,5 M NaOH
Neutralisationslösung	1,5 M NaCl + 0,5 M Tris-Cl pH 8,0
Blockpuffer	1x PBS + 0,1% Tween20 + 5% Magermilchpulver pH 7,4
Denhardt´s Reagenz (50x)	2% Ficoll 400, 2% Polyvinylpyrrolidon

## 2. Material und Methoden

---

Prähybridisierungslösung	1M Na <sup>+</sup> = 10,8 ml H <sub>2</sub> O, 6 ml 20x SSC, 1 ml SDS 10%, 2 mg Denhardt´s-Reagenz, 0,2 mg Heringssperma-DNA
SSC	3M NaCl + 0,3M Natriumcitrat; pH 7,0
PBS (Phosphate-buffert-saline)	NaCl + KCl + Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Herstellung von seriellen Pilzverdünnungsreihen

Die Zellen wurden einer 24 - 48 Stunden bei 37°C bebrüteten Sabouraud-Glucose-Agar-Platte entnommen, in PBS verdünnt und gleichmäßig gemischt. Danach wurde eine Thoma-Zählkammer mit 10 µl der Suspension beschickt und die 16 Zählquadrate mit einem Durchlichtmikroskop mäanderförmig von links nach rechts ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl pro ml wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$\underline{\text{Zellzahl (Gesamt aller 16 Quadrate) / Quadrateanzahl} \times 2,5 \times 10^5 = \text{Zellen pro ml}}$$

Die Zellzahl wurde auf  $1 \times 10^6$  / ml mit PBS eingestellt und zu je 1000 µl in 1,5 ml Eppendorf-cups (E-cups) aliquotiert. Zur Kontrolle wurden abschließend nochmals 10 µl eines Aliquots in der Zählkammer ausgezählt.

Um standardisierte, serielle Verdünnungsreihen von  $9 \times 10^5$  bis minimal  $9 \times 10^0$  Zellen zu erhalten, wurden in 900 µl ddH<sub>2</sub>O jeweils 100 µl der nächst niedrigeren Verdünnungsstufe zugegeben und mindestens 5 sek gemischt (Bsp.: 100 µl von E-cup 1 ( $1 \times 10^6$  Zellen / ml) in E-cup 2 (900 µl ddH<sub>2</sub>O) ergibt  $9 \times 10^5$  Zellen in E-cup 1 und  $1 \times 10^5$  Zellen in E-cup 2; usw.).

### 2.2.2. Kultivierung der bakteriellen Negativkontrolle

Hierzu wurde eine Blutagar-Platte mittels „Drei-Ösen-Ausstrich“ mit dem Bakterium *S. aureus* beimpft und bei 37°C 16 Stunden bebrütet. Drei bis vier Bakterienkolonien wurden anschließend entnommen, mit 900 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt und in das DNA-Präparationsprotokoll integriert.

### 2.2.3. Kultivierung und Aufarbeitung der PCR-Positivkontrolle

Zur Bestätigung der einwandfreien Funktion der DNA-Amplifikationsmethoden wurde eine PCR-Positivkontrolle hergestellt.

Um die Dauer hierfür zu minimieren wurden von einer mit *C. albicans* beimpften Sabouraud-Glucose-Agarplatte vier bis fünf Kolonien abgenommen, mit 1,5 ml ddH<sub>2</sub>O vermischt und zusammen mit ca. 200 - 300 mg „Glas-Beads“ (Ø 0,5 mm) in ein „screw-cap“-Eppendorfgefäß überführt. Eingesetzt in den FastPrep®Cell-Disruptor wurde ein Zyklus von 3x 30 sek mit Geschwindigkeit 6.0 und 1x 40 sek mit ebenfalls 6.0 gewählt. Zwischen den Zyklen wurde die Probe jeweils auf Eis gekühlt. Danach folgte ein dreimaliger Zyklus von Kochen im Wasserbad bei 100°C für 5 min und Tiefrieren in flüssigem Stickstoff für 1 min. Nach letztmaligem Aufkochen der Probe und folgender Abkühlung auf RT wurde die Aufarbeitung aliquotiert und für die PCR verwendet. Überschüssiges Material wurde für weitere Versuche bei -20°C gelagert.

### 2.2.4. DNA-Präparation aus seriellen Pilzverdünnungsreihen

Insgesamt kamen sechs unterschiedliche DNA-Präparationsmethoden mit drei grundlegend unterschiedlichen Zellysemechanismen zur Anwendung (Protokoll I. – VI.).

Zusätzlich zu den Verdünnungsreihen wurde bei jedem Aufarbeitungszyklus eine Bakterien- und eine Aufarbeitungsnegativkontrolle mitgeführt.

**Protokoll I.** ⇒ *mechanische Ruptur mit Bio101 Fast DNA®Kit*

- 
- 1.) Herstellung der seriellen Verdünnungsreihen mit  $9 \times 10^5$  –  $9 \times 10^0$  Zellen
  - 2.) Zentrifugation mit 14.000 x g / 10 min; Überstände verwerfen
  - 3.) Resuspendieren der Pellets in 100 µl ddH<sub>2</sub>O

## 2. Material und Methoden

---

- 4.) Überführen der Proben in Bio 101-cup; Mischung mit 1000 µl CLS-Y Puffer (Beads)
- 5.) Einsetzen in Fast Prep®Cell-Disruptor; Zellzertrümmerung für 2 x 20 sek mit eingestellter Geschwindigkeit 5.0
- 6.) Zentrifugation 14.000 x g / 5 min
- 7.) Überstände in neue E-cups überführen und weitere 5 min bei 14.000 x g zentrifugieren
- 8.) 600 µl der Überstände in neue E-cups überführen und mit 600 µl „binding-matrix“ bis zur Homogenität mischen
- 9.) Inkubation von 5 min bei RT
- 10.) Zentrifugation 14.000 x g / 1 min
- 11.) Verwerfen der Überstände und Resuspension der Pellets mit 500 µl SEWS-M Puffer
- 12.) Zentrifugation 14.000 x g / 1 min
- 13.) Verwerfen der Überstände und weitere Zentrifugation bei 14.000 x g / 10 sek
- 14.) Elution der DNA durch Zugabe von 100µl DES Puffer
- 15.) Inkubation 2-3 min
- 16.) Zentrifugation 14.000 x g / 1 min
- 17.) Überführung der Überstände in neue E-cups und Ansetzen der PCR-Reaktionen

*Dauer: ca. 4 Std.*

**Protokoll II.** ⇒ *mechanische Ruptur mittels „Glass-Beads“ in Fast Prep®Cell-Disruptor (modifiziert nach Müller et al., 1998)*

---

- 1.) Herstellung der seriellen Verdünnungsreihen mit  $9 \times 10^5$  –  $9 \times 10^0$  Zellen
- 2.) Zentrifugation 14.000 x g / 10 min; Überstände verwerfen
- 3.) Inkubation der Pellets in 500 µl „Lysis buffer“ (0,05M EDTA pH 8,0 + 0,3% SDS) für 45 min bei RT
- 4.) Überführen der Proben in 2-ml-screw-cap-Eppendorf-Gefäße und Auffüllen mit ca. 200-300 mg „Glass-Beads“ (Ø 0,5mm)

## 2. Material und Methoden

---

- 5.) Zertrümmerung der Zellen für 30 sek bei Geschwindigkeit 6.5
- 6.) Kühlen der Gefäße auf Eis für 10 min
- 7.) Wiederholung von Punkt 5.) und 6.)
- 8.) Zentrifugation 14.000 x g / 5 min
- 9.) Abnehmen der Überstände und Überführung in neue E-cups
- 10.) Zugabe von 300 µl „glass-milk-binding-matrix“ (aus Bio101 FastDNA®Kit)
- 11.) Mischung per Inversion für 2-3 min
- 12.) Zentrifugation 14.000 x g / 3 min
- 13.) Verwerfen der Überstände
- 14.) Resuspension der Pellets in 500 µl 80% Ethanol
- 15.) Zentrifugation 14.000 x g / 2 min
- 16.) Verwerfen der Überstände
- 17.) Wiederholung von Punkt 15.) und 16.)
- 18.) Resuspension der Pellets in 100 µl TE-Puffer (pH 8,0)
- 19.) Kochen im Wasserbad bei 70°C / 10 min
- 20.) Zentrifugation 14.000 x g / 2 min
- 21.) Überführen der Überstände in neue E-cups und Ansetzen der PCR-Reaktionen

*Dauer: ca. 4 Std.*

**Protokoll III.** ⇒ *enzymatisch-thermische Lyse mit Phenol-Chloroform-Extraktion (nach Löffler et al., 2000a)*

---

- 1.) Herstellung der seriellen Verdünnungsreihen mit  $9 \times 10^5$  –  $9 \times 10^0$  Zellen
  - 2.) Auffüllen der E-cups mit ddH<sub>2</sub>O auf je 1000 µl Gesamtvolumen
  - 3.) Zentrifugation 12.700 x g / 10 min
  - 4.) Verwerfen von 900 µl
  - 5.) Zugabe von 500 µl WCLB-Puffer; Inkubation  
45 min / 65°C bei 1400 rpm
  - 6.) 3-maliger Zyklus: 1 min schockgefrieren in Stickstoff  
5 min kochen im Thermoblock bei 95°C / 800 rpm
  - 7.) Abkühlen auf RT / Anzentrifugation / Überführung in 2-ml-E-cups
-

## 2. Material und Methoden

---

- 8.) Zugabe von 500 µl ddH<sub>2</sub>O und 500 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1); gründlich vortexen
- 9.) Überführung der oberen Phase in neue E-cups
- 10.) Zugabe von 900 µl Isopropanol (eiskalt; Lagerung bei -20°C); entspricht einem Verhältnis 1:1 zum Probenmaterial
- 11.) gründliches Vortexen und Lagerung bei -80°C / 10 min
- 12.) Zentrifugation 15.000 x g / 10 min bei 4°C / Verwerfen der Überstände
- 13.) Zugabe von 500 µl EtOH 70%; nicht vortexen!
- 14.) Zentrifugation mit 14.000 x g / 5 min; Überstände verwerfen
- 15.) Trocknung der Pellets in geöffneten E-cups im Thermoblock bei 37°C
- 16.) Zugabe von 100 µl ddH<sub>2</sub>O, Vortexen und Ansetzen der PCR-Reaktionen

*Dauer: ca. 4 Std.*

**Protokoll IV.** ⇒ *thermische Ruptur mit Qiagen-Präparation  
(nach Bialek et al., 2001)*

---

- 1.) Herstellung der seriellen Verdünnungsreihen mit  $9 \times 10^5$  –  $9 \times 10^0$  Zellen
  - 2.) Zentrifugation der E-cups für 12.700 x g; Überstände verwerfen
  - 3.) Zugabe von 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K (jeweils aus dem Qiamp®DNA Mini-Kit); vortexen für ca. 5 sek
  - 4.) Inkubation mind. 2 Std. bei 55°C / 1100 rpm im Thermoblock
  - 5.) Einsetzen der E-cups in Aluminium-Ständer mit zusätzlichem mechanischen Verschluss der E-cup-Deckel
  - 6.) Kochen im Wasserbad bei 100°C für 5 min
  - 7.) 3-maliger Zyklus: 1 min schockgefrieren in Stickstoff  
5 min kochen im Wasserbad
  - 8.) Abkühlung auf RT
  - 9.) Zugabe von 20 µl Proteinase K; vortexen für ca. 5 sek
  - 10.) Inkubation für 1 Std. im Thermoblock bei 55°C / 1100 rpm
  - 11.) Anzentrifugieren der E-cups und Zugabe von 200 µl AL-Puffer
  - 12.) 15 sec vortexen und 10 min bei 70°C im Thermoblock (1100 rpm) inkubieren; anzentrifugieren
-

## 2. Material und Methoden

---

- 13.) Zugabe von 200 µl Ethanol (99%); 15 sek vortexen; anzentrifugieren
- 14.) Überführung der Suspensionen in Qiagen-Säulen; Zentrifugation 1 min / 6000 x g
- 15.) Überführung der Säulen in neue 2-ml-Gefäße
- 16.) Zugabe von 500 µl AW1-Puffer; Zentrifugation 6000 x g / 1 min
- 17.) Überführung der Säulen in neue 2-ml-Gefäße
- 18.) Zugabe von 500 µl AW2-Puffer; Zentrifugation 1000 x g / 3 min
- 19.) Überführung der Säulen in 1,5-ml-E-cups
- 20.) Elution durch Zugabe von 100 µl AE-Puffer; Inkubation 1 min bei RT; Zentrifugation 6000 x g / 1 min
- 21.) Ansetzen der PCR-Reaktionen

*Dauer: ca. 5 Std.*

**Protokoll V.**⇒ *enzymatische Lyse mit Qiagen-Präparation*  
(nach Löffler et al., 1997)

---

- 1.) Herstellung der seriellen Verdünnungsreihen mit  $9 \times 10^5$  –  $9 \times 10^0$  Zellen
  - 2.) Zentrifugation 12.700 x g / 10 min; Überstände verwerfen
  - 3.) Pellets in 1 ml WCLB aufnehmen und für mind. 45 min (max. 2 Std.) bei 65°C/ 1400 rpm im Thermoblock inkubieren
  - 4.) Zentrifugation 2000 x g / 10 min; Überstände verwerfen
  - 5.) Pellets in 500 µl 50mM NaOH aufnehmen; Inkubation im Thermoblock bei 95°C / 10 min
  - 6.) Neutralisation mit 25 µl 1M HCl; Zentrifugation 2500 x g / 10 min; Überstände verwerfen
  - 7.) Inkubation der Pellets mit 500 µl Zymolyase-Arbeitslösung für 45 min / 37°C im Thermoblock
  - 8.) Zentrifugation 5000 x g / 10 min; Überstände verwerfen
  - 9.) Zugabe von 180 µl ATL-Puffer + 20 µl Proteinase-K (jeweils aus dem Qiamp®DNA Mini-Kit) und Inkubation bei 56°C / 1100 rpm im Thermoblock mind. 2 Std.
  - 10.) E-cups anzentrifugieren
  - 11.) Zugabe von 200 µl AL Puffer
-

## 2. Material und Methoden

---

- 12.) 15 sek vortexen und 10 min bei 70°C im Thermoblock (1100 rpm) inkubieren; an zentrifugieren
- 13.) Zugabe von 200 µl Ethanol (99%); 15 sek vortexen; an zentrifugieren
- 14.) Überführung der Suspensionen in Qiagen-Säulen; Zentrifugation 1 min / 6000 x g
- 15.) Überführung der Säulen in neue 2-ml-Gefäße
- 16.) Zugabe von 500 µl AW1-Puffer; Zentrifugation 6000 x g / 1 min
- 17.) Überführung der Säulen in neue 2-ml-Gefäße
- 18.) Zugabe von 500 µl AW2-Puffer; Zentrifugation 1000 x g / 3 min
- 19.) Überführung der Säulen in 1,5-ml-E-cups
- 20.) Elution durch Zugabe von 100 µl AE-Puffer; Inkubation 1 min bei RT; Zentrifugation 6000 x g / 1 min
- 21.) Ansetzen der PCR-Reaktionen

*Dauer: ca. 6 ½ Std.*

**Protokoll VI.**⇒ enzymatische Lyse mit thermischer Ruptur und Qiagen-Präparation (Lugert et al., 2006)

---

- 1.) Herstellung der seriellen Verdünnungsreihen mit  $9 \times 10^5$  –  $9 \times 10^0$  Zellen
- 2.) Zentrifugation 12.700 x g / 10 min; Überstände verwerfen
- 3.) Pellets in 1 ml WCLB aufnehmen und für mind. 45 min (max. 2 Std.) bei 65°C/ 1400 rpm im Thermoblock inkubieren
- 4.) Zentrifugation 2000 x g / 10 min; Überstände verwerfen
- 5.) Inkubation der Pellets mit 500 µl Zymolyase-Arbeitslösung für 45 min / 37°C im Thermoblock
- 6.) Zentrifugation 5000 x g / 10 min; Überstände verwerfen
- 7.) Zugabe von 180 µl ATL-Puffer + 20 µl Proteinase-K (jeweils aus dem Qiamp®DNA Mini-Kit) und Inkubation bei 55°C / 1100 rpm im Thermoblock mind. 2 Std.
- 8.) Einsetzen der E-cups in Aluminium-Ständer mit zusätzlichem mechanischen Verschluss der E-cup-Deckel
- 9.) Kochen im Wasserbad bei 100°C für 5 min

## 2. Material und Methoden

---

- 10.) 3-maliger Zyklus: 1 min schockgefrieren in Stickstoff  
5 min kochen im Wasserbad
- 11.) Abkühlung auf RT
- 12.) E-cups an zentrifugieren
- 13.) Zugabe von 200 µl AL Puffer
- 14.) 15 sek vortexen und 10 min bei 70°C im Thermoblock (1100 rpm) inkubieren; an zentrifugieren
- 15.) Zugabe von 200 µl Ethanol (99%); 15 sek vortexen; an zentrifugieren
- 16.) Überführung der Suspensionen in Qiagen-Säulen; Zentrifugation 1 min / 6000 x g
- 17.) Überführung der Säulen in neue 2-ml-Gefäße
- 18.) Zugabe von 500 µl AW1-Puffer; Zentrifugation 6000 x g / 1 min
- 19.) Überführung der Säulen in neue 2-ml-Gefäße
- 20.) Zugabe von 500 µl AW2-Puffer; Zentrifugation 1000 x g / 3 min
- 21.) Überführung der Säulen in 1,5-ml-E-cups
- 22.) Elution durch Zugabe von 100 µl AE-Puffer; Inkubation 1 min bei RT; Zentrifugation 6000 x g / 1 min
- 23.) Ansetzen der PCR-Reaktionen

*Dauer: ca. 8 Std.*

### **2.2.5. DNA-Präparation aus seriellen Pilzverdünnungsreihen in EDTA-Blut**

Die seriellen Pilzverdünnungsreihen (s. 2.2.1) wurden mit 100 µl humanem EDTA-Blut einer gesunden Spenderin gemischt und mit der sensitivsten DNA-Präparationsmethode (Protokoll VI., s. 2.2.4.) unter vorheriger hypotoner Erythrozytenlyse aufgearbeitet. Somit kann die Sensitivität zwischen PBS- und blutversetzten Pilzsuspensionen verglichen werden.

## 2. Material und Methoden

---

**Protokoll VI.b.** ⇒ *hypotone, enzymatische Lyse mit thermischer Ruptur und Qiagen-Präparation (Lugert et al., 2006)*

---

- 1.) Herstellung der seriellen Verdünnungsreihen mit  $9 \times 10^5$  –  $9 \times 10^0$  Zellen
- 2.) Zentrifugation 12.700 x g / 10 min; Überstände verwerfen
- 3.) Pellets in 100 µl EDTA-Blut aufnehmen; vortexen
- 4.) Erythrozyten-Lyse durch Zugabe von 800 µl RCLB
- 5.) Inkubation bei RT (25°C) / 10 min im Thermoblock (1400 rpm)
- 6.) Zentrifugation 5000 x g / 10 min; Überstände verwerfen
- 7.) Pellets in 1 ml WCLB aufnehmen und für mind. 45 min (max. 2 Std.) bei 65°C/ 1400 rpm im Thermoblock inkubieren
- 8.) Zentrifugation 2000 x g / 10 min; Überstände verwerfen
- 9.) Inkubation der Pellets mit 500 µl Zymolyase-Arbeitslösung für 45 min / 37°C im Thermoblock
- 10.) Zentrifugation 5000 x g / 10 min; Überstände verwerfen
- 11.) Zugabe von 180 µl ATL-Puffer + 20 µl Proteinase-K (jeweils aus dem Qiamp®DNA Mini-Kit) und Inkubation bei 55°C / 1100 rpm im Thermoblock mind. 2 Std.
- 12.) Einsetzen der E-cups in Aluminium-Ständer mit zusätzlichem mechanischen Verschluss der E-cup-Deckel
- 13.) Kochen im Wasserbad bei 100°C für 5 min
- 14.) 3-maliger Zyklus: 1 min schockgefrieren in Stickstoff  
5 min kochen im Wasserbad
- 15.) Abkühlung auf RT
- 16.) E-cups anzentrifugieren
- 17.) Zugabe von 200 µl AL Puffer
- 18.) 15 sek vortexen und 10 min bei 70°C im Thermoblock (1100 rpm) inkubieren; anzentrifugieren
- 19.) Zugabe von 200 µl Ethanol (99%); 15 sek vortexen; anzentrifugieren
- 20.) Überführung der Suspensionen in Qiagen-Säulen; Zentrifugation 1 min / 6000 x g
- 21.) Überführung der Säulen in neue 2-ml-Gefäße
- 22.) Zugabe von 500 µl AW1-Puffer; Zentrifugation 6000 x g / 1 min
- 23.) Überführung der Säulen in neue 2-ml-Gefäße

## 2. Material und Methoden

---

- 24.) Zugabe von 500 µl AW2-Puffer; Zentrifugation 1.000 x g / 3 min
- 25.) Überführung der Säulen in 1,5-ml-E-cups
- 26.) Elution durch Zugabe von 100 µl AE-Puffer; Inkubation 1 min bei RT; Zentrifugation 6000 x g / 1 min
- 27.) Ansetzen der PCR-Reaktionen

*Dauer: ca. 8,5 Std.*

### 2.2.6. DNA-Amplifikation via Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in-vitro*-Methode zur Amplifikation definierter DNA-Sequenzen (Mullis et al., 1986).

Das Enzym ist die Taq-Polymerase, eine thermostabile DNA-Polymerase. Die Reaktion kann in drei unterschiedliche Teilbereiche untergliedert werden:

- a.) Denaturierung und damit Aufspaltung der DNA-Stränge
- b.) Anlagerung („Annealing“) der sequenzspezifischen Oligonukleotide („Primer“) an die komplementäre DNA-Sequenz
- c.) Amplifikation der DNA durch Synthese neuer „Tochter“-DNA-Stränge.

Dieser Zyklus wird mehrfach wiederholt, wodurch eine ausreichende Menge an DNA generiert wird.

Da die Aufheiz- und Abkühlzeiten in konventionellen Thermocyclern (s. 2.2.6.2., Protokoll A) bauartbedingt vordefiniert sind, wurde zur weiteren Zeitoptimierung des Untersuchungsablaufs ein Real-Time-PCR-Protokoll (s. 2.2.6.2., Protokoll B) unter Verwendung des Light-Cycler®-1.5-Systems von Roche® mitvergleichen.

Der Light-Cycler® der Firma Roche® ist ein Thermocycler mit optischer Einheit (Wittwer et al., 1990; Wittwer und Garling, 1991). Wie im konventionellen Thermoblock wird auch hier die Temperatur während des PCR-Zyklus im Thermocycler reguliert. Dies geschieht allerdings nicht durch Erhitzen einer statischen Masse, sondern durch Luftzirkulation mittels Ventilator-technik, die, je nach Messprogramm, durch eine Heizspindel entsprechend reguliert werden kann.

## 2. Material und Methoden

---

Durch die relativ geringe Wärmekapazität der Luft ist es somit möglich, schnelle Temperaturgradienten von bis zu 20°C pro Sekunde mit einer Abweichung von  $\pm 0,3^\circ\text{C}$  am Probenmaterial zu generieren. Das Probenkarussell, bestehend aus Glaskapillaren für ein Probenvolumen von bis zu 20  $\mu\text{l}$ , gewährleistet ein großes Verhältnis von Oberfläche zu untersuchtem Material und begünstigt somit ebenfalls eine kurze Amplifikationsdauer durch schnelle Aufheiz- und Abkühlzyklen. In der implantierten optischen Einheit wird über Photodioden die emittierte Fluoreszenz des generierten PCR-Produktes gemessen. Hierdurch kann die DNA-Amplifikation in Echtzeit („Real-Time“) am Monitor durch die entsprechende Software grafisch dargestellt werden, da der Anstieg der Fluoreszenz mit jedem neuen PCR-Zyklus in direktem Verhältnis zum generierten PCR-Produkt steht. Dies kann in Bezug zur Zyklenzahl visualisiert werden. Abhängig von der eingesetzten Menge der Ziel-DNA heben sich nach einer bestimmten Zyklenzahl die emittierten Fluoreszenzsignale des generierten PCR-Produkts signifikant von denen des Hintergrundes ab (Phase der exponentiellen Signalzunahme). Dieser Punkt wird von der Software erkannt und ist als Crossing Point definiert, d.h. als der Punkt, an dem der exponentielle und damit quantifizierbare Anstieg der DNA-Menge stattfindet. Über die Bestimmung der Crossing Points können daher quantitative Aussagen über die Ausgangsmenge an Ziel-DNA getätigt werden. Bei Messzeiten von  $\sim 20$  Millisekunden pro Kapillare lässt sich somit eine komplette PCR unterhalb einer Stunde realisieren (Wittwer et al., 1997a; Rasmussen, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Real-Time-PCR-Untersuchungen das „LightCycler FastStart DNA Master<sup>Plus</sup> SYBR Green I – Kit“ nach Herstellerangaben verwendet, um neben *C. albicans* und *A. fumigatus* auch die apathogene Spezies *S. cerevisiae* detektieren zu können und somit ein breites Screeningspektrum zu gewährleisten.

Die Amplifikation der DNA wird dabei durch Messung des vom sequenzunabhängigen Cyaninfarbstoffes SYBR-Green ausgehenden fluoreszierenden Signals bei 530 nm gemessen. Dieses Signal wird bei Bindung von SYBR-Green in die Doppelstrang-DNA emittiert und nimmt proportional mit der amplifizierten DNA-Menge zu. Die enthaltene FastStart Taq Polymerase basiert auf der „Hot-Start“-Technologie und minimiert somit die Amplifikation von unspezifischen PCR-Produkten (Kellogg et al., 1994; Birch, 1996).

## **2. Material und Methoden**

---

Ein Nachteil hierbei ist jedoch die geringe Spezifität, da zwischen den unterschiedlichen PCR-Produkten während der Amplifikation nicht direkt unterschieden werden kann. Dies lässt sich ausgleichen, indem nach abgelaufener PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt wird, wodurch auf Grund unterschiedlicher Schmelzpunkte der gebildeten PCR-Amplifikate eine Spezifizierung vorgenommen werden kann. Hierbei wird die DNA durch kontinuierliche Temperaturerhöhung auf bis zu 95°C aufgeschmolzen. Bei einem für das DNA-Fragment spezifischen Temperaturwert denaturiert der DNA-Doppelstrang zu zwei Einzelsträngen. Dadurch wird der Farbstoff SYBR-Green freigesetzt. Nachfolgend erfolgt eine Fluoreszenzabnahme, so dass ein grafisch darstellbarer Peak entsteht. Da die DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifische Primerdimere, ist eine Unterscheidung möglich. Die Höhe des Peaks kann hierbei eine näherungsweise Aussage über die synthetisierte DNA-Menge geben.

### **2.2.6.1. Primerdesign**

Es wurden drei unterschiedliche PCR-Protokolle (s. 2.2.6.2., Protokoll A - C) zur Amplifikation genutzt. Bei den Protokollen A und C wurden die PCR-Analysen stets im selben Thermocycler (T3; Biometra/ Göttingen) unter identischen Bedingungen durchgeführt. Protokoll B (abgewandelt nach Löffler et al., 2000b) verwendet das Real-Time PCR-System („Light-Cycler® 1,5“) von Roche.

Das PCR-Produkt wurde anschließend mittels Flachbett-Gelelektrophorese (s. 2.2.7.) dargestellt.

#### *Primerdesign der Protokolle A & B*

Um möglichst alle Pilzspezies zu erfassen, wurde eine „Screening-PCR“ verwendet (Einsele et al., 1997), deren Primer an häufig im Pilzgenom vorkommende Gene, sogenannte „18S-Multicopy-Gene“, binden. Somit ist die Amplifikation der DNA zwar pilzspezifisch, aber nicht speziesspezifisch und alle drei untersuchten Pilzarten können gut detektiert werden.

## 2. Material und Methoden

---

*Primersequenz (Einsele et al., 1997):*

P1 5'-ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG-3'

P2 5'-CCGATCCCTAGTCGGCATAG-3'

Die Länge des generierten DNA-Fragments beträgt in Abhängigkeit der Pilzspezies 482-503 bp. Für das Protokoll B wurden die Primer HPLC-gereinigt verwendet; für Protokoll A wurden sie entsalzt eingesetzt.

### Primerdesign des Protokolls C

Bei dem Protokoll C (Jaeger et al., 2000) handelt es sich um eine Nested-PCR, d.h. eine in zwei aufeinander folgenden PCRs verlaufende Amplifikation der DNA. Während der ersten PCR wird mit Hilfe panfungaler Primer die DNA aller Pilzspezies vermehrt („Screening-PCR“; Länge des DNA-Fragments 728 – 744 bp). In der zweiten PCR werden dann speziesspezifische Primer eingesetzt. Hier kamen auf Grund der Vorgabe des Protokolls nur Primer für *C. albicans* (Länge des DNA-Fragments 402 bp) und *A. fumigatus* (Länge des DNA-Fragments 520 bp) zum Einsatz. Die Proben für *S. cerevisiae* sollten als zusätzliche Negativkontrollen dienen.

*Primersequenz (Jaeger et al., 2000):*

Panfungale Primer

Pffor 5'-AGGGATGTATTTATTAGATAAAAAATCAA-3'

Pfrev2 5'-CGCAGTAGTTAGTCTTCAGTAAATC-3'

*C. albicans* - spezifische Primer

Cafor2 5'-GGGAGGTAGTGACAATAAATAAC-3'

Carev3 5'-CGTCCCTATTAATCATTACGAT-3'

## 2. Material und Methoden

---

*A.fumigatus* - spezifische Primer

Asfufor 5'-CCAATGCCCTTCGGGGCTCCT-3'

Asfurev 5'-CCTGGTCCCCCCACAG-3'

### 2.2.6.2. PCR-Protokolle (A-C)

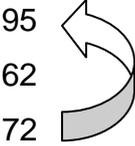
Protokoll A „Standard“ (Einsele et al., 1997)

PCR-Ansatz (1 x) für konventionellen Thermocycler

Reagenzien	[ $\mu$ l]
10 x Reaktions-Puffer	5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	14
Taq-Polymerase (1 U)	0,2
dNTP-Mix (25 mM je Nukleotid)	0,4
Wasser; PCR-Grade	18,3
P1-Primer (100 pmol)	1
P2-Primer (100 pmol)	1

PCR-Programm Thermocycler T3

Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Zeit [sek]
95	60
95	30
62	60
72	120
4	$\infty$



Heizdeckeltemperatur 105 $^{\circ}$ C

*Dauer: ca. 3 Std.*

## 2. Material und Methoden

---

Alle Proben eines Laufs (serielle Verdünnungen der drei Spezies; Bakterien-, Aufarbeitungs- und PCR-Negativkontrolle; Positivkontrolle) wurden parallel pipettiert.

Nach Erstellung eines „Mastermixes“ wurde jeder aliquotierte PCR-Ansatz mit je 10 µl (d.h. 10%) aufgearbeiteter DNA vermischt und mit einem konventionellen Thermocycler untersucht (s. 2.1.2.; Modell T3 Biometra/ Göttingen). Nach Abschluss der Amplifikation erfolgte die Detektion der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese (s. 2.2.7.).

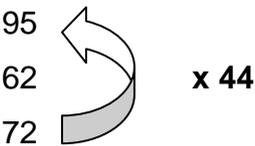
### Protokoll B „Real-Time-PCR“ (modifiziert nach Löffler et al., 2000b)

PCR-Ansatz (1 x) für Light-Cycler®1.5

Reagenzien	[µl]
MgCl <sub>2</sub> (3 mmol)	12
Master-SYBR-Green (inkl. Taq-Polymerase)	2
Wasser; PCR-Grade	3,5
P1-Primer (12,5 pmol)	0,25
P2-Primer (12,5 pmol)	0,25

PCR Programm Light-Cycler®1.5

Temperatur [°C]	Zeit [sek]
95	600
95	1
62	15
72	25
4	∞



*Dauer: ca. 50 min*

## 2. Material und Methoden

---

Nach Erstellung eines „Mastermixes“ wurden die aliquotierten und in die Glaskapillaren überführten 1 x PCR-Ansätze mit jeweils 2µl (d.h. 2%) aufgearbeiteter DNA vermischt, 30 sek bei 1500 x g zentrifugiert und schließlich in den Light-Cycler®1.5 eingesetzt.

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden grafisch dargestellt und das Ergebnis ausgedruckt. Anhand der differierenden Schmelzkurven können die verschiedenen Spezies zugeordnet werden (s. 3.2.3.). Zusätzlich wurden die Proben nach erfolgreichem Durchlaufen des Programms in E-cups abzentrifugiert (1500 x g / 30 sek) und das Ergebnis der PCR-Analysen in der Flachbett-Gelelektrophorese (s. 2.2.7.) bestätigt.

### Protokoll C „Nested-PCR“ (Jaeger et al., 2000)

PCR-Ansatz (1x) für Nested-PCR im konventionellen Thermocycler

#### *1. Ansatz mit panfungalen Primern*

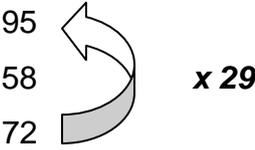
Reagenzien	[µl]
10 x PCR-Reaktions-Puffer	5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2
Taq-DNA-Polymerase (1 U)	0,4
dNTP Mix (25 mM je Nukleotid)	0,4
Wasser; PCR-Grade	31,6
Pffor-Primer	0,2
Pfrev-Primer	0,2

## 2. Material und Methoden

---

### PCR-Programm Thermocycler T3

Temperatur [°C]	Zeit [sek]
95	300
95	30
58	30
72	20
72	420
4	∞



Heizdeckeltemperatur 105°C

Dauer: ca. 1 ½ Std.

Nach Erstellung eines „Mastermixes“ wurde jeder aliquotierte 1 x PCR-Ansatz mit je 10 µl (d.h. 10%) aufgearbeiteter DNA vermischt und mit einem konventionellen Thermocycler untersucht (s. 2.1.2.; Modell T3 Biometra/ Göttingen). Nach Abschluss der Amplifikation erfolgte die Ergebnisdarstellung mittels Gelelektrophorese (s. 2.2.7.).

PCR-Ansatz (1x) für Nested-PCR im konventionellen Thermocycler

2. Ansatz mit *C. albicans*-spezifischen Primern

Reagenzien	[µl]
10 x PCR-Reaktions-Puffer	5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2
Taq-DNA-Polymerase (1 U)	0,2
dNTP Mix (25 mM je Nukleotid)	0,4
Wasser; PCR-Grade	40,5
Cafor2-Primer	0,34
Carev3-Primer	0,36

## 2. Material und Methoden

---

PCR-Ansatz (1x) für Nested-PCR im konventionellen Thermocycler

### 2. Ansatz mit *A. fumigatus*-spezifischen Primern

Reagenzien	[ $\mu$ l]
10 x PCR-Reaktions-Puffer	5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2
Taq-DNA-Polymerase (1 U)	0,4
dNTP Mix (25 mM je Nukleotid)	0,4
Wasser; PCR-Grade	40,35
Asfufor-Primer	0,38
Asfurev-Primer	0,47

PCR-Programm Thermocycler T3

Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Zeit [sek]
95	300
95	30
66	30
72	20
72	420
4	$\infty$

 **x 39**

Heizdeckeltemperatur 105 $^{\circ}$ C

*Dauer: ca. 2 Std.*

Nach Erstellung eines „Mastermixes“ wurde jeder 1 x PCR-Ansatz mit je 1  $\mu$ l erfolgreich amplifizierter DNA der ersten „panfungalen“-PCR-Untersuchung gemischt. Die Untersuchung erfolgte mit einem konventionellen Thermocycler (s. 2.1.2.; Modell T3 Biometra/ Göttingen). Hierbei war das PCR-Programm bei allen verwendeten speziesspezifischen Primern identisch. Nach Abschluss der Amplifikation erfolgte die Ergebnisdarstellung mittels Flachbett-Gelelektrophorese (s. 2.2.7.).

### 2.2.7. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Darstellung der amplifizierten DNA wurde das Verfahren der Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Hierbei wird die DNA innerhalb eines elektrischen Feldes ihrer Größe nach aufgetrennt und der eingelagerte Farbstoff EtBr mit UV-Licht sichtbar gemacht. Dies ist möglich, da das zum Gel zugegebene Ethidiumbromid (EtBr/ SL: 10mg / ml; EK 1µg / ml) in der DNA interkaliert und bei UV-Exposition zur Emission von Fluoreszenzen angeregt wird.

Um die Molekulargewichte der DNA-Produkte bestimmen zu können, wurde stets ein 100bp-Marker als Größenstandart mitgeführt.

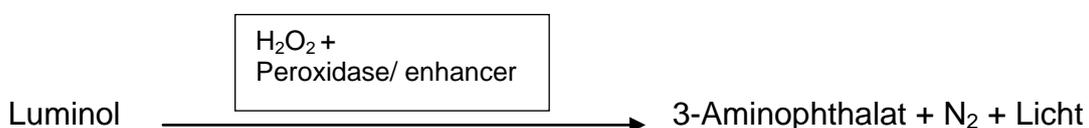
#### 1,5%iges (bzw. 1%iges) Agarose-Gel:

60 ml 1 x TAE-Puffer wurden mit 0,9 g (bzw. 0,6 g) Agarose vermischt und 2 min in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurden 6 µl EtBr (10 mg / ml) hinzugefügt. Die nun fertige Lösung wurde in eine, mit einem 16er-Gelkamm beschickte, Gelkammer geben. Nach ca. 30 min Aushärtephase wurden je 10 µl der amplifizierten DNA mit 2 µl Ladepuffer (6 x „Loading-dye“) versetzt und in die Geltaschen eingebracht. In 1 x TAE-Trennpuffer wurden die Proben ca. 30 min bei 150 V aufgetrennt und das Gel abschließend unter UV-Licht fotografiert.

### 2.2.8. Hybridisierung nach „Southern-Blot“-Verfahren

Für eine spätere genaue Speziesidentifikation mit paralleler Sensitivitätssteigerung wurde das „Southern-Blot“-Verfahren (modifiziert nach Sambrook et al., 1997) angewandt.

Hierbei wird die aufgetrennte DNA auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und fixiert. Daraufhin wird mit einer speziesspezifischen, Digoxigenin-markierten Sonde hybridisiert und diese mittels Antidigoxigenin-Antikörper (kombiniert mit Peroxidase) detektiert. Durch das ECL®-System (Verwendung laut Herstellerangaben; Gleichung s. Figur 1) können die Banden visuell auf doppelseitigem Film dargestellt werden.



Figur 1: Gleichung ECL®-System

### 2.2.8.1. Sonden

Die SONDENSEQUENZEN, die Hybridisierungstemperatur und die hochstringente Waschttemperatur wurden der Publikation von Einsele et al. (1997) entnommen. Der theoretische Schmelzwert ( $T_m$ ) lag für die *C. albicans* –spezifische Sonde C<sub>DIG</sub> bei 83,2°C und für die *A. fumigatus* – spezifische Sonde A<sub>DIG</sub> bei 85,5°C.

Da theoretisch Hybridisierungstemperaturen von bis zu 5 – 10°C unter dem  $T_m$ -Wert möglich sind, wären für C<sub>DIG</sub> Temperaturen bis zu 73 bzw. 78°C denkbar; für A<sub>DIG</sub> Temperaturen bis zu 75,5 bzw. 80,5°C.

*Berechnungsformel (Sambrook et al., 1997):*

$$T_m = 81,5 + 16,6(\log_{10}[Na^+]) + 0,41 (\text{Fraktion } G's + C's) - (600/N)$$

(*N*=Kettenlänge; *G*=Guanin; *C*=Cytosin)

#### Sonden:

C<sub>DIG</sub> 5'-TCTGGGTAGCCATTTATGGCGAACCCAGGAC-3'

A<sub>DIG</sub> 5'-TGGGGAACCTCATGGCCTTCACTGGCTGTG-3'

#### Protokoll:

- 1.) Die DNA-Proben wurden in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt und fotografiert (s. 2.2.7.). Anschließend wurden die beiden Gele auf je 4,5 x 9 cm zugeschnitten, um die DNA auf eine Membran übertragen zu können.
- 2.) Denaturierung mit 0,25 M HCl / 10 min
- 3.) Hydrolyse der DNA und Zerlegung in Einzelstränge mit Hydrolyselösung  
2 x 20 min
- 4.) Neutralisation in Neutralisationslösung ( 2 x 20 min; s. 2.1.7.)
- 5.) *Aufbau der Blotting-Aparatur.*
  - Glaswanne mit Transferpuffer (20x SSC) füllen
  - Glasplatte quer einlegen; 2 Lagen WHATMANN 3mm Papier so auflegen, dass sie in den Puffer reichen
  - Gel mit der Oberseite nach unten auf das Papier auflegen und die Seiten mit Parafilm oder Haushaltsfolie abdecken

## 2. Material und Methoden

---

- Nitrozellulosemembran zuerst in H<sub>2</sub>O und dann in 2x SSC kurz wässern; daraufhin luftblasenfrei auf das Gel legen
  - 2 Lagen WHATMANN-Papier (in 2x SSC getränkt) auflegen
  - Zellstoff (ca. 20 cm Dicke) darüber legen und mit Glasplatte und Gewicht beschweren
  - Blotzeit = > 12 Std.; in der Regel über Nacht
- 6.) Nach dem Blot die Nitrozellulosemembran in 6x SSC waschen
  - 7.) Lufttrocknung der Membran über 30 min; danach Festbacken der DNA im Vakuumofen bei 80°C / 1 Std. (alternativ: zeitsparende UV-Quervernetzung der DNA im „Cross-linker“)
  - 8.) Prähybridisierung bei 42°C / 2 Std. in Prähybridisierungslösung (s. 2.1.7.)
  - 9.) Hybridisierung mit speziesspezifischer Sonde ( $\approx 1$  pmol / ml Sondenkonzentration) für max. 3 Std. in Prähybridisierungslösung (s. 2.1.7.)
  - 10.) Waschen mit 6x SSC + 0,5% SDS
    - a.) Niedrigstringent: 2 x 15 min bei 37°C
    - b.) Hochstringent: 1 x 7 min bei 77°C
  - 11.) Äquibrilierung der Membran in PBS pH 7,5 bei RT / 1 min
  - 12.) Abblocken des Hintergrundes mit Blockpuffer (s. 2.1.7.) bei RT / 40 min
  - 13.) 10 ml Blockpuffer mit 10  $\mu$ l Anti-Digoxigenin-Antikörper (kombiniert mit Peroxidase (POD); Fab Fragments, 150 mU/ml) mischen. Inkubation der Membran bei RT / 1,5 Std.
  - 14.) Waschen mit 1x PBS + 0,1% Tween20 / 3 x 7 min
  - 15.) Ansetzen der ECL-Reagenzien 1 und 2 im Verhältnis 1:1 (laut Herstellerangaben; Gesamtvolumen 16  $\mu$ l); mindestens 0,125 ml / cm<sup>2</sup> Membran
  - 16.) Inkubation der Membran bei RT / 1 min
  - 17.) Einlegen der Membran in eine Klarsichthülle und Überführung in eine Filmkassette
  - 18.) Belichtung des Films (2, 5 und 10 min Intervall; je nach Signalstärke ist die optimale Belichtungszeit differierend ) und Entwicklung

*Dauer: ca. 16 Std. zzgl. ca. 12 Std. Blotzeit über Nacht.*

### 2.2.9. Kontaminationsprophylaxe/ Kontaminationsquellen

Zur Kontaminationsprophylaxe wurden die Forderungen von Kwok und Higuchi (1989) angewandt.

DNA-Präparation und PCR-Ansatz fanden in örtlich getrennten Räumen statt. Intermittierende Tisch- und Handschuhhygiene war obligat. Alle Reaktionsgefäße oder Pufferbehältnisse wurden (so weit nicht schon steril angeliefert) autoklaviert verwendet. Um „carry-over“-Kontaminationen von E-cup zu E-cup zu vermeiden wurde, so weit möglich, nur die aktuell zu bearbeitende Probe eröffnet. Es wurden ausschließlich sterile Pipettenspitzen mit Filter verwendet, die so gelagert und gehandhabt wurden, dass eine aerogene Kontamination durch Pilzsporen minimiert wurde.

Als Kontaminationsquellen sind dennoch nicht auszuschließen:

- aerogene Pilzsporen
- Rest-DNA in Pufferlösungen (s. 4.1.)
- PCR Inhibitoren in Pufferlösungen (s. 4.1. & 4.2.).

### 2.2.10. Standardisierung

Aus Gründen der Standardisierung wurde sowohl die Auszählung als auch die Protokolldurchführung jeweils von der selben Person durchgeführt. Die Hauptversuche (s. 2.2.4. Protokoll III. – VI.; s. 2.2.5. Protokoll VI.b.; s. 2.2.6.2. Protokolle A-C) wurden jeweils mindestens dreimalig unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Vergleich der DNA-Präparationsprotokolle inkl. Protokoll I. und II.

Um einen direkten Sensitivitätsvergleich der Präparationsprotokolle I. – VI. (s. 2.2.4.) erstellen zu können, wurde das PCR-Protokoll A zur Amplifikation verwendet und somit als „Standard“ definiert (s. 2.2.6.2.).

Bei Beginn der Arbeit wurde in Vorversuchen die generelle Nachweisgrenze der Präparationsprotokolle für *C. albicans* ermittelt.

Hierbei zeigte sich, dass bei Präparationsprotokoll I. (s. 2.2.4.) unter den gegebenen Laborbedingungen bei Konzentrationen von  $\leq 9 \times 10^3$  Zellen keine Signale mehr detektiert werden konnten. Dies wurde von der Herstellerfirma mit der Aussage bestätigt, dass die minimale Nachweisgrenze für dieses Aufarbeitungsprotokoll bei  $1 \times 10^7$  Zellen läge. Daraufhin wurde dieses Protokoll aufgrund seiner ungenügenden Effizienz bei keinen weiteren DNA-Präparationen eingesetzt. Bei Protokoll II. verhielt es sich ähnlich. Hier wurde bei den Verdünnungsstufen mit einer DNA-Menge äquivalent zu  $9 \times 10^7$  *C. albicans* - Zellen begonnen. Als Ergebnis waren auch hier keinerlei spezifische Signale sichtbar. Ein weiterer Vorversuch mit allen drei zu untersuchenden Spezies und DNA-Äquivalenzen von  $9 \times 10^4$  –  $9 \times 10^{-1}$  Zellen zeigte ebenfalls keine Signale.

Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass auch das Protokoll II. nicht effizient genug ist. Auch ist eine Standardisierung (vgl. 2.2.4; Protokoll II; Punkt 9.) wegen variierender Mengen Überstandes schlecht möglich. Aus diesen Gründen wurde Protokoll II. ebenfalls zu keinen weiteren Präparationen herangezogen.

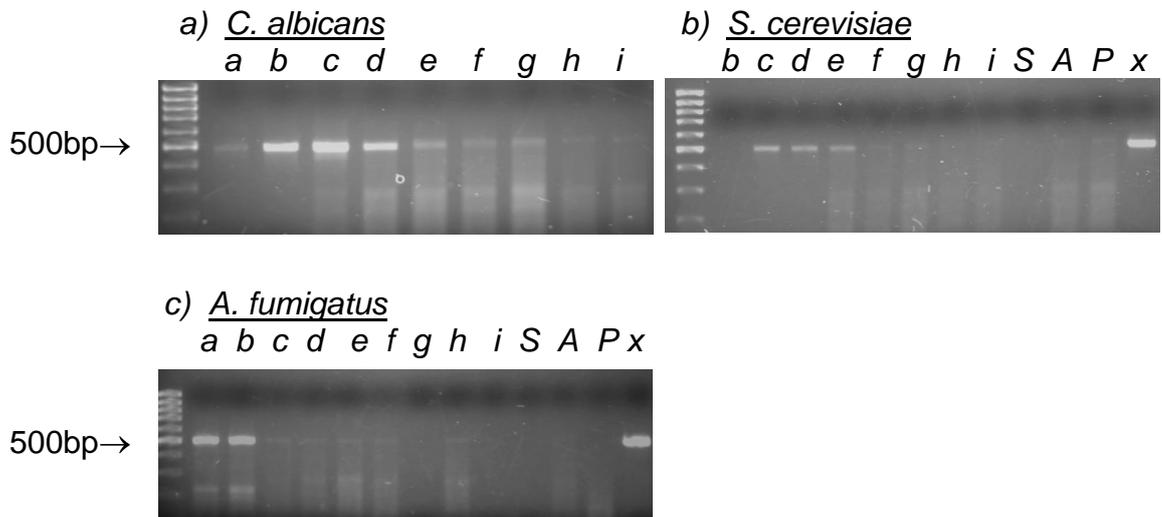
Der Zeitaufwand war bei beiden Protokollen mit ca. 4 Std. verhältnismäßig gering. Die Protokolle III. – VI. zeigten bei den im weiteren Verlauf aufgearbeiteten Verdünnungsstufen von  $9 \times 10^4$  –  $9 \times 10^0$  gute Ergebnisse, so dass sie als „Hauptversuche“ definiert und wiederholt verwendet wurden. Die dargestellten Sensitivitätsgrenzen (s. 3.1.6.) konnten dabei mindestens dreimalig wiederholt dargestellt werden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1.1. Protokoll III. (s. 2.2.4.)

→ DNA-Extraktion mittels enzymatisch-thermischer Lyse unter Verwendung von Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol

Auf Grund der Erkenntnisse der Vorversuche wurde bei der DNA-Aufarbeitung mit Verdünnungsstufen von  $9 \times 10^7$  –  $9 \times 10^0$  Zellen für *C. albicans* und *A. fumigatus* gearbeitet; für *S. cerevisiae* kamen  $9 \times 10^6$  –  $9 \times 10^0$  Zellen zum Einsatz. In der nachfolgenden PCR wurden dann 10% DNA-Äquivalenzen eingesetzt (s. 2.2.6.2.). Es zeigte sich, dass durch das parallele Bearbeiten einer großen Probenanzahl, den relativ großen Einzelvolumina und durch den finalen Trocknungsvorgang bei offenen E-cups eine hohe Kontaminationsgefahr gegeben ist. Diese resultiert in oftmals durchgängigen Fehl- bzw. Doppelbanden, sowie verunreinigten Kontrollproben (s. Abb. 2).



**Abbildung 2:** Sensitivität des Nachweises der untersuchten Spezies *C. albicans*, *A. fumigatus* und *S. cerevisiae* bei Verwendung von Protokoll III. und PCR A

**Legende:** Buchstaben a – i entsprechen der DNA von  $9 \times 10^7$  –  $9 \times 10^1$  eingesetzten Zellen;  
S = *Staphylococcus aureus*; A = Aufarbeitungs-Negativ-Kontrolle;  
P = PCR-Negativ-Kontrolle; x = *C. albicans* – Positivkontrolle

### 3. Ergebnisse

---

Eine Standardisierung des Protokolls war schlecht möglich, da die Phasentrennung unter Punkt 9. (vgl. Seite 16) anwenderindividuell unterschiedlich ausfällt und somit die überführte DNA-Menge variiert. Somit war eine Reproduzierbarkeit technisch bedingt sehr eingeschränkt.

Auffällig ist die mit  $9 \times 10^6$  Zellen vergleichsweise geringe Sensitivität bei Verwendung von *A. fumigatus*. Einmalig konnte mit  $9 \times 10^5$  Zellen hier eine um eine Zehnerpotenz verbesserte Sensitivität nachgewiesen werden. Ebenso ist die schlechte bzw. nicht vorhandene Nachweisbarkeit für hohe DNA-Mengen von *C. albicans* und *S. cerevisiae* augenscheinlich (s. Bande „a“ für *C. albicans* & Bande „b“ für *S. cerevisiae*).

Durch die erwähnten, häufigen Kontaminationen lässt sich eine Abgrenzung der Sensitivität für die drei bearbeiteten Spezies schwer stellen. Bezug nehmend auf die sich dreimalig wiederholt stark dargestellten DNA-Amplifikate ergeben sich folgende Nachweisgrenzen (s. Abbildung 2 a-c):

<u>Spezies</u>	<u>Nachweisgrenze (Zellzahl)</u>
<i>C. albicans</i>	$9 \times 10^4$
<i>A. fumigatus</i>	$9 \times 10^6$ (einmalig $9 \times 10^5$ )
<i>S. cerevisiae</i>	$9 \times 10^3$

**Tabelle 1:** Nachweisgrenzen von Protokoll III. und PCR A für die eingesetzten Pilzspezies

Die Aufarbeitungsdauer ist mit ca. 4 h sehr kurz und in den Arbeitsalltag gut integrierbar.

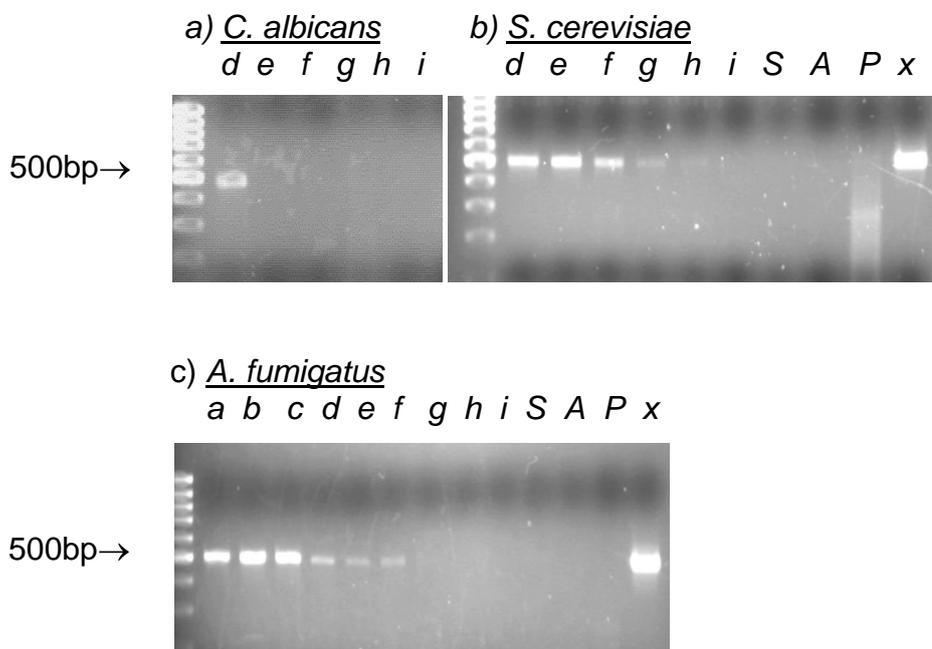
### 3. Ergebnisse

---

#### 3.1.2 Protokoll IV. (s. 2.2.4.)

→ *thermische Ruptur im Kombination mit Qiagen-Präparation mittels Qiamp®DNA Mini-Kit*

Bei relativ guten Nachweisgrenzen für *A. fumigatus* und *S. cerevisiae* können mit diesem Protokoll standardisierte Ergebnisse innerhalb eines Arbeitstages erhalten werden. Lediglich die Nachweisgrenze von *C. albicans* ist im Vergleich zu den folgenden Protokollen als ungenügend zu bewerten (s. Abb. 3).



**Abbildung 3:** Sensitivität des Nachweises der untersuchten Spezies *C. albicans*, *A. fumigatus* und *S. cerevisiae* bei Verwendung von Protokoll IV. und PCR A

**Legende:** Buchstaben a – i entsprechen der DNA von  $9 \times 10^7$  –  $9 \times 10^{-1}$  eingesetzten Zellen;  
S = *Staphylococcus aureus*; A = Aufarbeitungs-Negativ-Kontrolle;  
P = PCR-Negativ-Kontrolle; x = *C. albicans* - Positivkontrolle

### 3. Ergebnisse

---

Somit ergeben sich folgende Nachweisgrenzen (s. Abb. 3 a-c):

<u>Spezies</u>	<u>Nachweisgrenze (Zellzahl)</u>
<i>C. albicans</i>	$9 \times 10^4$
<i>A. fumigatus</i>	$9 \times 10^3$ (einmalig $9 \times 10^2$ )
<i>S. cerevisiae</i>	$9 \times 10^1$

**Tabelle 2:** Nachweisgrenzen von Protokoll IV. und PCR A für die eingesetzten Pilzspezies

Die Nachweisgrenze von *A. fumigatus* ist mit minimal  $9 \times 10^2$  Zellen schon deutlich niedriger als die von Protokoll III. (s. 3.1.1.). Eine Sensitivitätssteigerung des Nachweises von *C. albicans* ist nicht zu verzeichnen.

Die Aufarbeitungsdauer liegt mit ca. 5 h nur unwesentlich über der von Protokoll III. und ist somit ebenfalls anwenderfreundlich.

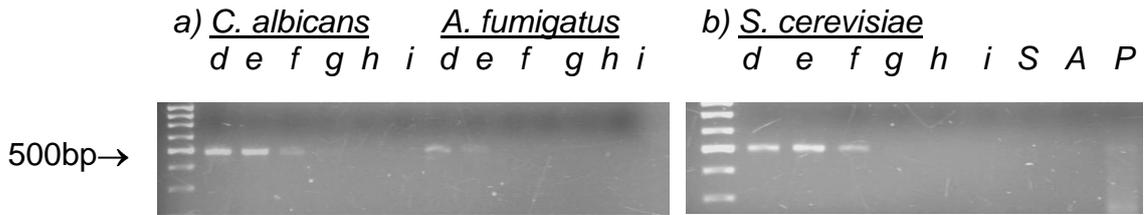
#### 3.1.3. Protokoll V. (s. 2.2.4.)

→ *enzymatische Lyse im Kombination mit Qiagen-Präparation mittels Qiamp®DNA Mini-Kit*

Dieses, auf zusätzlicher enzymatischer Lyse der Zellwände beruhende Protokoll stellt sich als gut standardisierbar dar, wenngleich eine lange Bearbeitungsdauer mit häufigen Inkubationspausen einkalkuliert werden muss.

Auffällig ist die im Vergleich relativ schlechte Nachweisgrenze für *A. fumigatus* bei gleichzeitig guter Sensitivität für den Nachweis von *C. albicans* (s. Abb. 4).

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 4:** Sensitivität des Nachweises der untersuchten Spezies *C. albicans*, *A. fumigatus* und *S. cerevisiae* bei Verwendung von Protokoll V. und PCR A

**Legende:** Buchstaben d – i entsprechen der DNA von  $9 \times 10^4$  –  $9 \times 10^{-1}$  eingesetzten Zellen;  
 S = *Staphylococcus aureus*; A = Aufarbeitungs-Negativ-Kontrolle;  
 P = PCR-Negativ-Kontrolle

Somit ergeben sich folgende Ergebnisse (s. Abb. 4 a&b):

<u>Spezies</u>	<u>Nachweisgrenze (Zellzahl)</u>
<i>C. albicans</i>	$9 \times 10^2$ (einmalig $9 \times 10^1$ )
<i>A. fumigatus</i>	$9 \times 10^4$
<i>S. cerevisiae</i>	$9 \times 10^2$ (einmalig $9 \times 10^1$ )

**Tabelle 3:** Nachweisgrenzen von Protokoll V. und PCR A für die eingesetzten Pilzspezies

Die Bearbeitungsdauer beträgt mit ca. 6-7 h zwar nahezu einen Arbeitstag; trotzdem ist dieses Protokoll durch häufige Inkubationsphasen gut in den Laboralltag integrierbar.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1.4. Protokoll VI. (s. 2.2.4.)

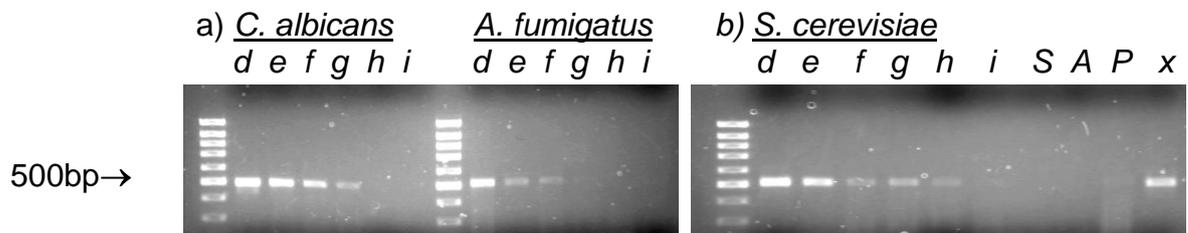
→ Kombination aus enzymatischer Lyse und thermischer Ruptur mit nachfolgender Qiagen-Präparation mittels Qiamp®DNA Mini-Kit

Die enzymatische Lyse des Protokolls V. durch Verwendung von Zymolyase scheint weniger effektiv die filamentöse Zellwandstruktur der Spezies *A. fumigatus* aufzubrechen. Der alleinige thermische Rupturvorgang mit Temperaturgradienten von bis zu 286°C in kürzester Zeit mit Anwendung von Proteinase K in Protokoll IV. kann scheinbar die Zellwand von *C. albicans* nur unzureichend schädigen.

Aus diesen Erkenntnissen der bisher durchgeführten Protokolle entstand ein optimiertes, eigenes Protokoll zur Freisetzung und Reinigung fungaler DNA (Lugert et al., 2006).

Ziel war es, ein Protokoll zu erstellen, das die DNA der beiden untersuchten und medizinisch wichtigen Pilzspezies möglichst effizient isoliert.

Hierzu wurden Elemente aus vorherigen Protokollen miteinander kombiniert. Das Resultat ist eine enzymatische Lyse mittels Zymolyase und Proteinase K in Kombination mit thermischer Ruptur und abschließend standardisierter DNA-Aufreinigung durch das Qiamp®DNA-Mini-Kit.



**Abbildung 5:** Sensitivität des Nachweises der untersuchten Spezies *C. albicans*, *A. fumigatus* und *S. cerevisiae* bei Verwendung von Protokoll VI. und PCR A

**Legende:** Buchstaben d – i entsprechen der DNA von  $9 \times 10^4$  –  $9 \times 10^1$  eingesetzten Zellen;  
S = *Staphylococcus aureus*; A = Aufarbeitungs-Negativ-Kontrolle;  
P = PCR-Negativ-Kontrolle; x = *C. albicans* - Positivkontrolle

### 3. Ergebnisse

---

Somit ergeben sich folgende Ergebnisse (s. Abb. 5 a&b):

<u>Spezies</u>	<u>Nachweisgrenze (Zellzahl)</u>
<i>C. albicans</i>	$9 \times 10^1$
<i>A. fumigatus</i>	$9 \times 10^2$
<i>S. cerevisiae</i>	$9 \times 10^1$ (einmalig $9 \times 10^0$ )

**Tabelle 4:** Nachweisgrenzen von Protokoll VI. und PCR A für die eingesetzten Pilzspezies

Wie in Abbildung 5 ersichtlich, konnte mit dieser Aufarbeitungsmethode die höchste Sensitivität des Nachweises der bearbeiteten Spezies erzielt werden. Es ergab sich somit ein für alle untersuchten Spezies universell einsetzbares, reproduzierbares Aufarbeitungsmanagement.

Die Kontaminationswahrscheinlichkeit durch Gefäßwechsel oder offenes Pipettieren ist ähnlich der aus Protokoll V. und somit akzeptabel.

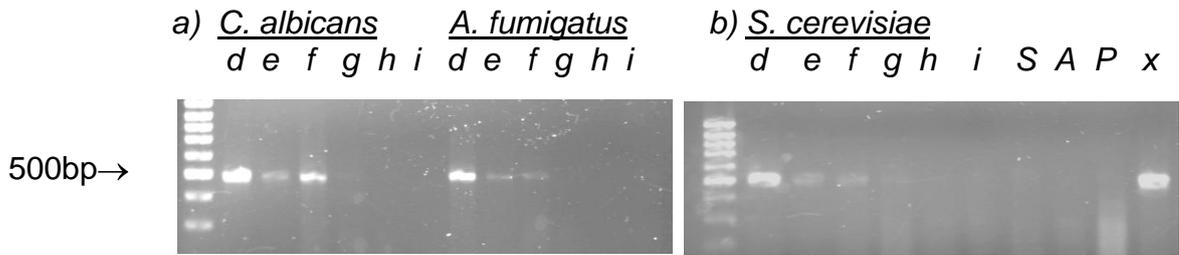
Bezüglich der Aufarbeitungsdauer ist das Protokoll mit ca. 8 h Bearbeitungsdauer zwar eindeutig das längste der verglichenen DNA-Extraktionsmethoden. Am Ende erzielt es jedoch bei beiden untersuchten, humanpathogenen Spezies die höchste Sensitivität. Somit ist Protokoll VI. den anderen verglichenen Optionen als Screeningmethode deutlich überlegen.

#### 3.1.5. Protokoll VI.b. (s. 2.2.5.)

→ *hypotone Erythrozytenlyse in Kombination mit enzymatischer Lyse und thermischer Ruptur mit nachfolgender Qiagen-Präparation mittels Qiamp®DNA Mini-Kit*

Mit dem sensitivsten Protokoll VI. (s. 2.2.4.) wurden die artifiziell infizierten Blutproben einer gesunden Spenderin untersucht. Hierzu wurden die seriellen Pilzsuspensionen mit sterilem EDTA-Blut versetzt und untersucht. Am Anfang fand eine hypotone Erythrozytenlyse unter Verwendung von RCLB (Löffler et al., 1997) statt. Als Ergebnis (vgl. Abb. 6) zeigte sich eine um den Faktor 10 verringerte Sensitivität des Nachweises beider humanpathogener Spezies im Vergleich zur Verwendung von PBS-Puffer-Suspensionen (s. 3.1.6).

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 6:** Sensitivität des Nachweises der untersuchten Spezies *C. albicans*, *A. fumigatus* und *S. cerevisiae* bei Verwendung von EDTA-Blut als Medium und Protokoll VI.b. und PCR A

**Legende:** Buchstaben d – i entsprechen der DNA von  $9 \times 10^4$  –  $9 \times 10^{-1}$  eingesetzten Zellen;  
 S = *Staphylococcus aureus*; A = Aufarbeitungs-Negativ-Kontrolle;  
 P = PCR-Negativ-Kontrolle; x = *C. albicans* - Positivkontrolle

Somit ergeben sich folgende Ergebnisse (s. Abb. 5 a&b und 6 a&b):

<u>Spezies</u>	<u>Nachweisgrenze (Zellzahl)</u>	
	Pilzsuspensionen + PCR A	EDTA-Blut-Proben + PCR A
<i>C. albicans</i>	$9 \times 10^1$	$9 \times 10^2$ (einmalig $9 \times 10^1$ )
<i>A. fumigatus</i>	$9 \times 10^2$	$9 \times 10^3$ (einmalig $9 \times 10^2$ )
<i>S. cerevisiae</i>	$9 \times 10^1$	$9 \times 10^2$

**Tabelle 5:** Nachweisgrenzen von Protokoll VI.b. und PCR A für die eingesetzten Pilzspezies

Der Zeitaufwand durch die zusätzliche Erythrozytenlyse hat eine auf ca. 8,5 h verlängerte Aufarbeitungszeit zur Folge. Somit ist die Integration des kompletten Aufarbeitungsprotokolls in den Arbeitstag schwierig.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1.6. Übersicht der Aufarbeitungsprotokolle

<u>Protokoll</u>	<u>Aufarbeitungsart</u>	<u>Dauer</u>	<u>Nachweisgrenzen der Spezies</u>			<u>Anmerkungen</u>
			C. <i>albicans</i>	A. <i>fumigatus</i>	S. <i>cerevisiae</i>	
I.	mechanisch	4h	k.A.	k.A.	k.A.	nicht verwertbar
II.	mechanisch	4h	k.A.	k.A.	k.A.	nicht verwertbar
III.	thermisch/ enzymatisch	4h	$9 \times 10^4$	$9 \times 10^6$	$9 \times 10^3$	schlechte Standardisierung
IV.	thermisch/ enzymatisch	5h	$9 \times 10^4$	$9 \times 10^3$	$9 \times 10^1$	unzureichende Sensitivität des Nachweises von C. <i>albicans</i>
V.	enzymatisch	6-7h	$9 \times 10^2$	$9 \times 10^4$	$9 \times 10^2$	hoher Zeitbedarf; unzureichende Sensitivität des Nachweises von A. <i>fumigatus</i>
VI.	thermisch/ enzymatisch	8h	$9 \times 10^1$	$9 \times 10^2$	$9 \times 10^1$	höchster Zeitbedarf; höchste Sensitivität des Nachweises der untersuchten Spezies
VI.b.	hypotone Lyse/ thermisch/ enzymatisch	8,5h	$9 \times 10^2$	$9 \times 10^3$	$9 \times 10^2$	unzureichende Sensitivität des Nachweises von EDTA- Blut-Proben im Vergleich zu reinen Pilzsuspensionen

**Tabelle 6:** Übersicht der Aufarbeitungsprotokolle (s. 2.2.4 & 2.2.5.) unter Verwendung von Standard-PCR A (s. 2.2.6.2.); k.A.= keine Angabe; Nachweisgrenze in Zellzahl

#### 3.2. Vergleich der PCR-Amplifikationsprotokolle

Wie schon unter 3.1. erwähnt, fungierte das PCR-Protokoll A als Standard-Amplifikationsmethode, mit welcher der Vergleich der Aufarbeitungsprotokolle III. – VI.b. durchgeführt wurde (s. 3.1.1. – 3.1.5.). Als Alternativmethoden wurden sowohl eine Nested-PCR-Technik (s. 3.2.4.), als auch eine zeitoptimierte Real-Time-PCR-Methode (s. 3.2.3.) untersucht, die mittels Schmelzkurvenanalyse eine Spezieszuordnung ermöglichen kann.

#### 3.2.1. PCR – Protokoll A / Standard (s. 2.2.6.2.)

Hierzu wurde, wie zuvor bereits erwähnt, ein konventioneller Thermocycler (T3; Biometra Göttingen) mit programmiertem, 34-fachen Heizzyklus verwendet (s. 2.2.6.2.). Das Primerdesign wurde einer Publikation von Einsele et al. (1997) entnommen (s. 2.2.6.1.). In Vorversuchen ergab sich hierbei kein Detektionsunterschied zwischen 1µl und 10µl verwendeter DNA-Suspension, so dass stets mit 10µl gearbeitet wurde.

Die Handhabung dieses Protokolls erwies sich als sehr anwenderfreundlich. Auch hielten sich Logistik- und Zeitaufwand in Grenzen.

Die Nachweisgrenze für die Detektion der eingesetzten Pilzspezies betrug bei mindestens drei unabhängigen PCR-Analysen (s. 2.2.10.) für *C. albicans* und für *S. cerevisiae*  $9 \times 10^1$ . Bei *A. fumigatus* ergab sich eine Sensitivität von  $9 \times 10^2$ .

#### 3.2.2. Southern – Blot (s. 2.2.8.)

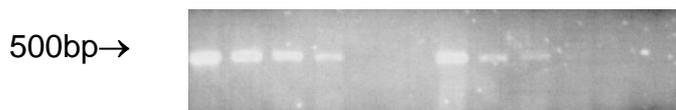
→ nach Durchführung von Protokoll VI. (vgl. 2.2.4.) und PCR A (vgl. 2.2.6.2.)

Zur Verbesserung der Nachweisfähigkeit von fungaler DNA mit gleichzeitiger Möglichkeit der Speziesidentifizierung wurde ein "Southern-Blot" nach DNA-Aufarbeitung mittels Protokoll VI. (s. 2.2.4.) und Amplifikation durch PCR A (s. 2.2.6.2.) exemplarisch durchgeführt (s. 2.2.8.). Die zu untersuchenden Spezies wurden mindestens dreimal getestet. Da für *S. cerevisiae* keine passende Sonde zur Verfügung stand und der Pilz ohnehin ohne pathologische Relevanz ist, wurde hierbei nur *C. albicans* und *A. fumigatus* eingesetzt. Es zeigte sich für *A. fumigatus* eine um den Faktor 10 verbesserte Nachweisbarkeit nach Hybridisierung gegenüber der alleinigen Gelelektrophorese. Für *C. albicans* bot der Hybridisierungsschritt hier jedoch noch keine durchweg signifikante Sensitivitätssteigerung. Da jedoch in der Gelelektrophorese schwach dargestellte DNA-Banden nach Hybridisierung sehr deutlich sichtbar waren, ist von einer Sensitivitätssteigerung auszugehen (s. Abb. 7).

Die Untersuchungsdauer beträgt ca. 28 h (inkl. ca. 12 h Blot-Zeit).

### 3. Ergebnisse

a) *C. albicans*      *A. fumigatus*  
       d e f g h i      d e f g h i



Gelelektrophorese nach Verwendung von Protokoll VI. mit PCR A

b) *C. albicans*      *A. fumigatus*  
       d e f g h i      d e f g h i



Hybridisierung mit *Candida*-spezifischer Sonde C<sub>Dig</sub>; Belichtungszeit 2 Minuten.

c) *C. albicans*      *A. fumigatus*  
       d e f g h i      d e f g h i



Hybridisierung mit *Aspergillus*-spezifischer Sonde A<sub>Dig</sub>; Belichtungszeit 2 Minuten.

**Abbildung 7:** Sensitivität des Nachweises der untersuchten Spezies *C. albicans* und *A. fumigatus* bei Verwendung von Protokoll VI. und PCR A (a) mit anschließender speziesspezifischer Hybridisierung (b) und (c)

**Legende:** Buchstaben d – i entsprechen der DNA von  $9 \times 10^4$  –  $9 \times 10^{-1}$  eingesetzten Zellen

Somit ergeben sich folgende Ergebnisse (s. Abb. 7 a-c):

<u>Spezies</u>	<u>Nachweisgrenze (Genome)</u>	
	nach alleiniger Gelelektrophorese (a)	nach zusätzlicher Hybridisierung (b) & (c)
<i>C. albicans</i>	$9 \times 10^1$	$9 \times 10^1$
<i>A. fumigatus</i>	$9 \times 10^2$	$9 \times 10^1$
<i>S. cerevisiae</i>	$9 \times 10^1$	k.A.

**Tabelle 7:** Nachweisgrenzen von Protokoll VI. und PCR A (a) für die untersuchten Pilzspezies mit anschließender speziesspezifischer Hybridisierung (b) & (c); k.A. = keine Angabe

### 3. Ergebnisse

---

#### 3.2.3. PCR - Protokoll B / Real-Time-PCR (s. 2.2.6.2.)

Zur Kontrolle der Real-Time-Amplifikationsmethode wurde parallel mit gleicher DNA die Standard-PCR A (s. 2.2.6.2., Protokoll A) durchgeführt. Hierbei zeigten sich stets Amplifikate für alle untersuchten Spezies, so dass von einer korrekten Aufarbeitung der DNA ausgegangen werden konnte. Nachfolgend durchgeführte Gelelektrophoresen mit durch die Real-Time-PCR amplifizierter DNA bestätigten das graphische Ergebnis.

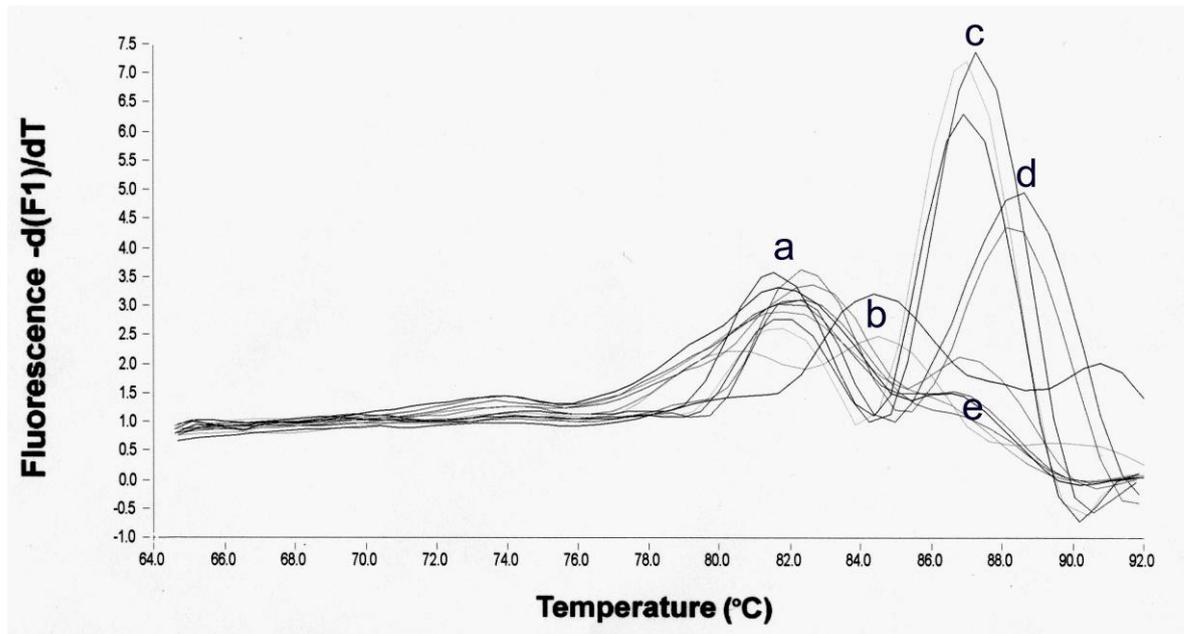
Im Zuge der weiteren Real-Time-PCR-Analysen konnten alle drei standardmäßig untersuchten Pilz-Spezies (*C. albicans*; *A. fumigatus*; *S. cerevisiae*) wiederholt unter Verwendung von gleicher DNA-Menge amplifiziert werden (s. Tabelle 8). Hierbei wurde erneut die Verbesserung der Sensitivität durch das Aufarbeitungsprotokoll VI. bestätigt (s. Tabelle 8).

<u>Protokoll</u>	<u>Nachweisgrenze (Genome)</u>		
	<i>C. albicans</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>S. cerevisiae</i>
IV.	$1,8 \times 10^4$	$1,8 \times 10^3$	$1,8 \times 10^1$
V.	$1,8 \times 10^2$	$1,8 \times 10^4$	$1,8 \times 10^2$
VI.	$1,8 \times 10^1$	$1,8 \times 10^2$	$1,8 \times 10^1$

**Tabelle 8:** Ergebnisse der Real-Time-PCR-Amplifikationen nach DNA-Aufarbeitung durch Protokolle IV.-VI.

Zur Visualisierung der Speziesidentifikation mittels RT-PCR unter Verwendung des sequenzunspezifischen Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green wurde eine exemplarische Schmelzkurvenanalyse (s. 2.2.6.) mit der DNA-Menge von  $2 \times 10^4$  Genome unterschiedlicher humanpathogener Pilze erstellt, die deutlich die speziesspezifisch divergenten Schmelzkurven zeigt (s. Abbildung 8).

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 8:** Schmelzkurve der Spezies *C. albicans*, *C. tropicalis* und *S. cerevisiae* („c“), *A. fumigatus* und *A. flavus* („b“), *C. glabrata* („d“) und der Negativkontrollen („e“) unter Verwendung von Aufarbeitung VI (s. 2.2.4.). Der Peak „a“ stellt unspezifische Primerdimere dar.

An Hand der noch zu ermittelnden definitiven Schmelzwerte („T<sub>M</sub>-Werte“) der unterschiedlichen Spezies könnte somit in Zukunft eine eindeutige Speziesidentifikation während der PCR-Untersuchung möglich sein. Weitere Referenzuntersuchungen sind diesbezüglich nötig.

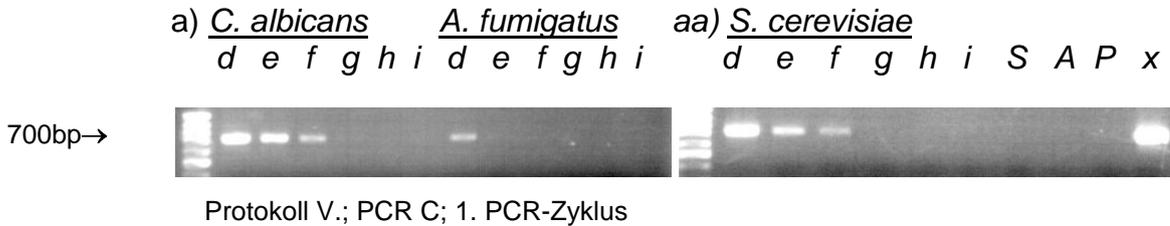
#### 3.2.4. PCR – Protokoll C / Nested-PCR (s. 2.2.6.2.)

Die Untersuchungen mittels Nested-PCR (s. 2.2.6.2., Protokoll C) ergaben bei erhöhtem Zeitaufwand trotz mehrfacher Wiederholungen nur unbefriedigende Ergebnisse. Der erste PCR-Lauf unter Verwendung panfungaler Primer zeigte zwar noch identische Ergebnisse wie die des Standardprotokolls A (s. 2.2.6.2., Protokoll A) (s. Abb. 9 a/aa). Im zweiten Teil der Untersuchung ergaben sich jedoch trotz stringenter räumlicher Trennung der Arbeitsschritte unter Verwendung sowohl der *Candida*-spezifischen, als auch der *Aspergillus*-spezifischen Primer durchgehend Kontaminationsprobleme, wie exemplarisch in Abbildung 9 b/bb & 9 c/cc ersichtlich. Hierbei kam es bei Verwendung der beiden speziesspezifischen Primer bei allen untersuchten Spezies nahezu durchgehend zu positiven bzw.

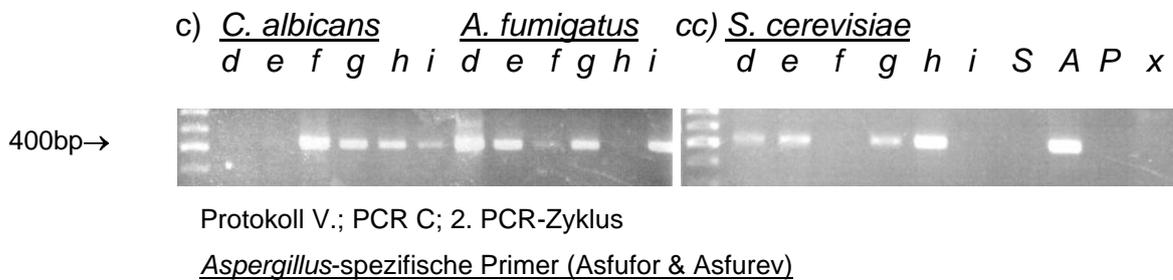
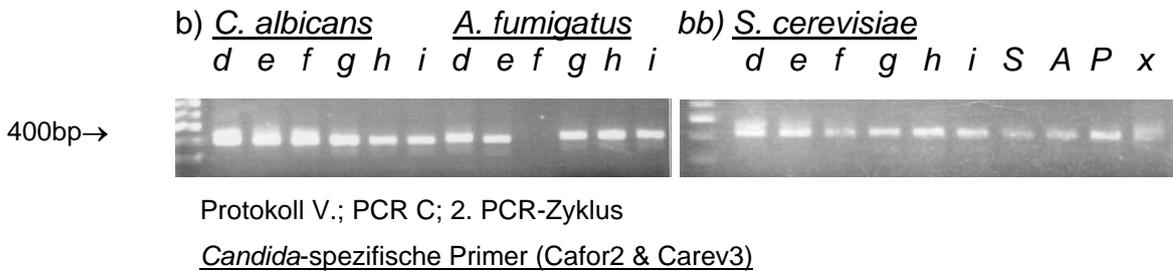
### 3. Ergebnisse

falsch positiven Ergebnissen. Weiterhin führte der zweite, „sensitivitätssteigernde“ Amplifikationszyklus dazu, dass auch die verwendeten Negativkontrollen falsch positive Ergebnisse erbrachten.

#### 1. PCR-Zyklus



#### 2. PCR-Zyklus



**Abbildung 9:** Sensitivität des Nachweises der drei untersuchten Spezies *C. albicans*, *A. fumigatus* und *S. cerevisiae* bei Verwendung von Protokoll V. und PCR C

**Legende:** Buchstaben d – i entsprechen der DNA von  $9 \times 10^4$  –  $9 \times 10^1$  eingesetzten Zellen; S = *Staphylococcus aureus*; A = Aufarbeitungskontrolle/ negativ; P = PCR-Kontrolle/negativ; x = *C. albicans*-Positivkontrolle

### 3. Ergebnisse

---

Dies lässt den Schluss zu, dass die Nested-PCR bei 50% höherem Zeitaufwand gegenüber der Standard-PCR A eine sehr hohe Kontaminationsanfälligkeit bietet und daher nicht als standardisierbare „Screening“-PCR praktikabel ist. Auf weitere Nested-PCR-Untersuchungen wurde somit verzichtet.

#### 3.2.5. Übersicht der Amplifikationsprotokolle

<b>Protokoll</b>	<b><i>C. albicans</i></b>	<b><i>A. fumigatus</i></b>	<b><i>S. cerevisiae</i></b>
<b>A</b> (Standard)	$9 \times 10^1$	$9 \times 10^2$	$9 \times 10^1$
<b>A</b> (Standard) +Southern-blotting	$9 \times 10^1$	$9 \times 10^1$	k.A.
<b>B</b> (RT-PCR)	$1,8 \times 10^1$	$1,8 \times 10^2$	$1,8 \times 10^1$
<b>C</b> (Nested-PCR) Zyklus 1	$9 \times 10^1$	$9 \times 10^3$	$9 \times 10^1$
<b>C</b> (Nested-PCR) Zyklus 2	k.A.	k.A.	k.A.

**Tabelle 10:** Übersicht der Amplifikationsprotokolle A - C (s. 2.2.6.2. & 2.2.8) unter Verwendung des Aufarbeitungsprotokolls VI. (s. 2.2.4.); k.A.= keine Angabe; Nachweisgrenze in Genomen

## 4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Vergleich unterschiedlicher DNA-Extraktions- und Amplifikationsmethoden zum Nachweis von humanpathogenen Pilzspezies, um dadurch die Diagnostik der oftmals foudroyant verlaufenden Mykosen des meistens immunsupprimierten Patienten zu verbessern (Morrell et al., 2005; Greene et al., 2007).

Es wurden unterschiedliche Aufarbeitungstechniken miteinander verglichen und bewertet:

- mechanische Ruptur
- thermische Ruptur
- enzymatische Lyse.

Da die bisher verwendeten Methoden eine unbefriedigende Sensitivität aufwiesen, wurde mit dieser Arbeit ein Aufarbeitungszyklus entwickelt, der die Vorteile von enzymatischer Lyse und thermischer Ruptur in Kombination mit der standardisierbaren Qiagen-Präparation als DNA-Extraktionsmethode verbindet. Hierdurch wurde ein universelles Screeningverfahren zur Diagnostik unterschiedlicher Pilzspezies für den klinischen Alltag etabliert.

Weiterhin wurden die unterschiedlichen Pilz-Konzentrationen mit sterilem, humanen EDTA-Blut versetzt, um die Möglichkeit der DNA-Detektion aus Vollblut exemplarisch zu untersuchen.

Bei den PCR-Amplifikationstechniken wurde in dieser Arbeit eine „Standard“-PCR sowohl mit einer „Real-Time“-Amplifikationsmethode, als auch mit einer „Nested-PCR“-Technik verglichen. Exemplarisch wurde die zusätzliche Anwendung eines „Southern-Blots“ als sensitivitätssteigernder Hybridisierungsschritt untersucht.

### 4.1. Effizienz der DNA - Extraktionen

Auf der einen Seite ist der relativ geringe Zeitaufwand der angewandten Protokolle I. und II. mit ca. 4 Std. verlockend, jedoch erweisen sich die Ergebnisse allein durch mechanische Ruptur als nicht sensitiv genug. Innerhalb der ersten Versuchsreihen ergab sich bereits eine ungenügende Nachweisgrenze für *C. albicans*, so dass diese Protokolle nicht weiter verwendet wurden. Dies korreliert mit den Herstellerangaben des Fast-Prep®-Cell-Disruptors, die eine Mindest-DNA-Menge von  $10^7$  Zellen für eine erfolgreiche Präparation angeben.

Als Möglichkeit der thermisch-enzymatischen Lyse ergab das Protokoll III. (Löffler et al., 2000a) eine ungenaue Nachweisbarkeit hoher DNA-Mengen für *C. albicans* und *S. cerevisiae*. Ein Grund hierfür könnte die schlechte Standardisierbarkeit und somit erhöhte Fehlerquelle nach Fällung der DNA mit folgender optischer Phasentrennung vor der Weiterverarbeitung sein. Der finale, parallele Trocknungsvorgang der Pellets in geöffneten E-cups kann ebenfalls, z.B. durch aerogene Sporen bei *A.fumigatus*-Spezies, zu DNA-Verunreinigungen beitragen. Des Weiteren ist die Geruchsbelastung durch das Phenol-Chloroform auch unter optimalen Belüftungsverhältnissen durch Verwendung einer größeren Menge toxischer Substanzen enorm, so dass von einer erhöhten gesundheitlichen Belastung des Laborpersonals auszugehen ist. Trotzdem ist das Protokoll III. ein kompaktes, rasch durchführbares Aufarbeitungsprotokoll, welches für *C. albicans* eine schon relativ hohe Sensitivität von  $9 \times 10^4$  detektierbaren Genomen aufweist. Somit besteht die Möglichkeit, innerhalb eines Labortages suffiziente Ergebnisse zu erzielen.

Das Protokoll IV. (Bialek et al., 2001) zeichnet sich durch seine einfache Handhabung ohne großen materiellen Einsatz, sowie seine relative Zeitersparnis von rund 40% gegenüber dem zeitlich aufwendigsten Protokoll VI. aus. Proteinase K, eine Serinprotease, wird als Lyseenzym verwendet und dient durch Lösen der Peptidbindungen der Proteine zur Freisetzung von DNA. Dank integriertem Qiagen-DNA-Mini-Kit ist eine gute Standardisierbarkeit der DNA-Extraktion gegeben. Mögliche „carry-over“-Kontaminationen können somit limitiert werden. Leider ergab sich auch hierbei eine relativ schlechte Effizienz des Nachweises von *C. albicans*, was auf eine zu ineffiziente Wirkweise von Proteinase K bei *Candida*-

#### 4. Diskussion

---

Zellen hinweist. Insgesamt stellt das thermisch-enzymatische DNA-Extraktionsprotokoll eine schnelle, teilweise jedoch stark kontaminationsbehaftete Methode des Pilznachweises dar. Im Vergleich zu den nachstehenden Protokollen ist die Sensitivität dieses Protokolls schlechter, so dass es für den täglichen klinischen Einsatz nur bedingt empfehlenswert ist.

Bei dem Protokoll V. (Löffler et al., 1997) konnte die bewährte Qiagen-Präparationsmethode aus dem Protokoll IV. übernommen und mit Zymolyase als weiterem Lyseprotein der Zellwände kombiniert werden.

Zymolyase, aus dem Kulturüberstand von *Arthrobacter luteus* gewonnen, besitzt als Kombination aus vier Lyse-Enzymen eine hohe Aktivität gegen unterschiedliche Zellwandpolymere von Hefezellwänden. Das Hauptenzym, die beta-1-3-Glucan Laminaripentahydrolase, fragmentiert die Zellwand-Glucane zu Pentameren und die beta-1-3-Glucanase baut die Zellwand durch Hydrolyse zu Glucanen und Glucose ab. Die in geringer Menge vorhandene Protease und Mannase wirken auf die Glycoproteine und Mannane der Hefezellwand und erzeugen so Sphäroblasten, die durch weitere Aufarbeitungsschritte DNA freisetzen können. Hierdurch zeigte sich eine deutliche Verbesserung der Nachweisgrenzen von *C. albicans*, was die besonders effiziente Wirkweise an den Zellwänden der Hefezellen unterstreicht (Löffler et al., 1997).

Bei *A. fumigatus* hingegen zeigt sich keine signifikante Steigerung der Sensitivität. Gegenteilig wird hier eher eine niedrigere Sensitivität als bei Protokoll IV. gemessen, was auf eine deutlich rigidere Polysaccharid-Wandstruktur der Spezies hindeutet, die sich ohne Thermorupturschritt nur schwer zerstören lässt. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass das Lyseenzym Zymolyase eine unterschiedliche Affinität zu den Zellwandstrukturen der untersuchten Spezies aufweist, gleichzeitig aber in Kombination mit Proteinase K effektive Resultate in der Aufarbeitung von Pilz-DNA erbringen kann.

Die Arbeitsgruppe um Rimek (Rimek et al., 1999) hat bereits Ende der neunziger Jahre gezeigt, dass eine mögliche Kontamination der zu untersuchenden DNA durch mit *Saccharomyces-sensu-stricto-Komplex* oder *Kluyveromyces lodderae* verunreinigter Zymolyase hervorgerufen werden kann. Daher sollte die Zymolyase zum Ausschluss etwaiger Kontaminationsmöglichkeiten vor Verwendung auf die Gegenwart von Fremd-DNA mittels PCR getestet werden.

In der hier vorliegenden Arbeit hat sich jedoch nie eine Kontamination durch verunreinigte Zymolyase gezeigt.

#### 4. Diskussion

---

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die rein enzymatische Lyse unter Verwendung von Zymolyase und Proteinase K (Protokoll V.) in Kombination mit der gut standardisierbaren Aufarbeitungstechnik des Qiagen-DNA-Mini-Kits für die Spezies *C. albicans* überlegen gegenüber der rein mechanischen (Protokolle I. – III.) bzw. der thermisch-enzymatischen (Protokoll IV.) Aufarbeitungsmethoden darstellt. Bei *A. fumigatus* scheint jedoch die thermische Komponente bei der Zellwandruptur eine deutlichere Rolle zu spielen, so dass hier die Kombination aus hohem Temperaturgradienten und enzymatischer Lyse die DNA effektiver freisetzt (Protokoll IV.).

Eine hohe Effizienz der Zellwandlyse bedeutet jedoch auch einen hohen Zeitaufwand, so dass das Protokoll V. mit 6 – 7 Std. reiner Aufarbeitungszeit nur erschwert zu Ergebnissen innerhalb eines Labortages führen kann.

Aufgrund der oben genannten Erkenntnisse wurde das kombinierte thermisch-enzymatische Protokoll VI. unter Einbeziehung von Zymolyase zur optimalen Zellwandruptur aller untersuchten Pilzspezies entwickelt (Lugert et al., 2006). Hier ist allerdings sowohl der zeitliche, als auch der materielle Aufwand im Vergleich zu den anderen Methoden am höchsten, so dass mit Ergebnissen erst nach ca. 8 Std. zu rechnen ist. Ebenfalls ist mit zusätzlichen Arbeitsschritten zur Testung der Zymolyase auf ggf. vorhandene Fremd-DNA zu rechnen. Gleichzeitig stellt dieses Protokoll jedoch die effizienteste DNA-Aufarbeitungsmethode für alle drei untersuchte Pilzspezies dar und ist somit als universelle Screeningmethode geeignet. Durch die sehr gut standardisierbare DNA-Aufreinigung mittels Qiagen-DNA-Mini-Kit und der nachfolgenden PCR wurden niedrige Nachweisgrenzen für *C. albicans* ( $9 \times 10^1$  Genome), *A. fumigatus* ( $9 \times 10^2$  Genome) und für *S. cerevisiae* ( $9 \times 10^1$  Genome) erzielt.

Insgesamt konnte so ein universell einsetzbares Aufarbeitungsschema entwickelt werden, welches mit höchster Effizienz die unterschiedlichen Zellwandstrukturen der untersuchten Spezies aufbricht und unter allen aufgeführten Protokollen die besten Ergebnisse liefert.

Mit Hilfe dieses Protokolls wurde auch die Sensitivität des Pilznachweises in EDTA-Vollblut untersucht. Dabei erfolgte zusätzlich eine vorgeschaltete hypotone Erythrozyten-Lyse, so dass bereits ein Großteil der korpuskulären Anteile des Blutes eliminiert und vor den weiteren Untersuchungsschritten von der verbleibenden Pilz-DNA getrennt wurde. Hierbei ergaben die Versuchsreihen nach PCR eine durchgehend um eine Zehnerpotenz niedrigere Sensitivität im Vergleich

#### 4. Diskussion

---

zum Protokoll VI. und der Verwendung von PBS anstelle von EDTA-Blut. Dies kann an unterschiedlichen, im Vollblut existenten PCR-Inhibitoren liegen. Bekannt ist, dass u.a. sowohl Immunglobulin G (Abu Al-Soud und Rådström, 2000) wie auch Lactoferrin und Hämoglobin die PCR effizient hemmen können und somit als die drei größten PCR-Inhibitoren anzusehen sind (Wilson IG, 1997; Sachse, 2002). EDTA fungiert als Chelatbildner mit  $Mg^{2+}$ -Ionen (Rossen et al., 1992) und wirkt somit ebenfalls PCR hemmend. Die Untereinheiten des Hämoglobins, das Häm und Bilirubin, können Eisen-Ionen in die PCR-Mixtur einbringen und die Amplifikationseffizienz dadurch stark vermindern (Bruhn und Fölsch, 2008). Ebenso gilt Häm als kompetitiver Inhibitor der Ziel-DNA mit regulatorischer Wirkung auf die DNA-Polymerase (Sachse, 2002). Zur weiteren Etablierung der Methode in der klinischen Diagnostik erscheint es daher sinnvoll, sogenannte Inhibitionskontrollen mitzuführen. Dabei wird ein Aliquot des zu untersuchenden Patientenmaterials artifiziell mit Pilz-DNA kontaminiert und davon dann parallel eine PCR durchgeführt.

#### 4.2. Vergleich der DNA-Amplifikationsmethoden

Zu Anfang wurden alle aufgearbeiteten DNA-Proben nach dem als „Standard“ definierten konventionellen PCR-Protokoll A amplifiziert, um die Sensitivitätsgrenzen der Aufarbeitungsprotokolle miteinander zu vergleichen.

Unter Verwendung der in 2.2.6.1. aufgeführten panfungalen Primer, die zwar pilzspezifisch, nicht aber speziesspezifisch an „18S-Multicopy-Gene“ binden, kann dieses breit angelegte, universelle PCR-Protokoll vorhandene Pilz-DNA effizient amplifizieren. Somit stellt es eine gute Screeningmöglichkeit für die Erregersuche im klinischen Alltag dar. Exemplarisch wurde ebenfalls die für Menschen apathogene Bäckerhefe *S. cerevisiae* mit aufgearbeitet und amplifiziert. Die anzusetzenden 90 Minuten bis zum Erhalt der Ergebnisse nach Ethidiumbromid-Färbung und Gelelektrophorese sind relativ gering.

Entgegen den Ergebnissen von Einsele et al. (1997) wurde jedoch aus Gründen der Zeitoptimierung der finale Hybridisierungsschritt mittels „Southern-Blot“-Verfahren nicht permanent, sondern nur exemplarisch unter Verwendung des

#### 4. Diskussion

---

sensitivsten Aufarbeitungsprotokolls VI. durchgeführt. Durch Weglassen der Hybridisierung konnte somit eine Zeitersparnis von ~ 28 Std. erzielt werden. Jedoch ist ein gleichzeitiger Sensitivitätsverlust von bis zu  $10^1$  Genomen einzukalkulieren. Die Ergebnisse zeigen dennoch sehr sensitive Nachweisgrenzen für *C. albicans* und *A. fumigatus* von  $9 \times 10^1$  bzw.  $9 \times 10^2$  Genomen auch ohne Hybridisierungsschritt.

Nach „Southern-Blotting“ mittels Digoxigenin-markierter Oligonukleotid-Sonden konnte die Nachweisgrenze für *A. fumigatus* nochmals um eine Zehnerpotenz auf  $9 \times 10^1$  Genome bei gleichzeitiger Spezifizierung der Proben gesenkt werden. Man kann davon ausgehen, dass eine ähnliche Sensitivitätssteigerung durch die abschließende Hybridisierung auch bei *C. albicans* möglich ist, hier jedoch wegen der geringen Anzahl der Untersuchungen noch nicht gelang.

Somit zeigen die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse eine geringere Sensitivität als die von Einsele et al. (1997) erzielten: Hier konnten nach Hybridisierung ein bzw. zwei Genome für *C. albicans* bzw. *A. fumigatus* detektiert werden. Etwaige Sensitivitätsunterschiede könnten sich durch den unterschiedlichen apparativen und labortechnischen Aufbau der Versuchsprotokolle erklären lassen. Sowohl die Taq-Polymerasen als auch die Thermocycler wurden von unterschiedlichen Herstellern verwendet und können somit zu Diskrepanzen der Ergebnisse beitragen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das PCR-Protokoll A nach Einsele et al. (1997) ein gut standardisierbares, universell einsetzbares, relativ zeitintensives und wenig kontaminationsbelastetes Screeningprotokoll für Pilz-DNA darstellt. Dennoch muss stringent auf eine örtliche Trennung der Arbeitsschritte bei bestmöglichen Hygienestandards geachtet werden, um Kreuzkontaminationen durch aerogene Pilzsporen oder Rest-DNA in Pufferlösungen zu vermeiden.

Bei der Nested-PCR wird nach einer initialen DNA-Amplifikation mittels panfungaler Primer zum Screening des Patientenmaterials auf vorhandene Pilz-DNA ein zweiter PCR-Zyklus mit speziesspezifischen Primern im konventionellen Thermocycler durchgeführt (Jaeger et al., 2000). Mit dieser Vorgehensweise soll eine signifikante Sensitivitätssteigerung erreicht und im zweiten Schritt speziesspezifische DNA amplifiziert werden.

Im ersten „Screening“-Zyklus unter Verwendung panfungaler Primer konnte die in PBS verdünnte, aufgearbeitete DNA mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden: Für *C. albicans* und *S. cerevisiae* lag die Nachweisgrenze bei  $9 \times 10^1$  Genomen; bei

#### 4. Diskussion

---

*A. fumigatus* konnten  $9 \times 10^3$  Genome detektiert werden. Dies liegt unterhalb der von Riggsby et al. (1982) bzw. Jaeger et al. (2000) erzielten Sensitivitäten, die den Nachweis von 10pg *Candida*-DNA (entsprechend ~ 270 Genomen) bzw. 100pg *Aspergillus*-DNA nach panfungaler PCR (entsprechend dem ersten PCR-Zyklus) erzielten.

Der zweite PCR-Zyklus unter Verwendung der speziesspezifischen Primer ergab in unserer Untersuchung im Gegensatz zu den bisher veröffentlichten Daten enttäuschende Ergebnisse. Ein Grund hierfür könnte sein, dass Riggsby et al. (1982) und Jaeger et al. (2000) ausschließlich gereinigte DNA verwendeten.

Anstatt der erwarteten Sensitivitätssteigerung ergaben unsere Untersuchungen nahezu durchgehende, falsch positive Ergebnisse. Auch nach mehrmaliger Wiederholung der Testläufe unter Berücksichtigung bestmöglicher Hygienestandards und stringenter örtlicher Trennung der Arbeitsschritte konnte dieses Phänomen nicht komplett ausgeblendet werden.

Es ist möglich, dass durch die hohe Probenanzahl und mögliche aerogene Sporen die Untersuchungsproben nicht gänzlich steril gehalten werden konnten. Auch ist der deutlich erhöhte materielle und zeitliche Untersuchungsbedarf mit mehr als 200 Minuten bei insgesamt drei herzustellenden PCR-Zyklen wesentlich aufwändiger als der der anderen durchgeführten PCR-Protokolle.

Generell erscheint die Nested-PCR-Technik für eine große Probenanzahl aus den genannten Gründen eher ungeeignet und sollte daher als Screenigmethode nur unter Vorbehalt Verwendung finden.

Um eine zeitliche Optimierung der Ergebnisse zu erzielen, wurde das von Löffler et al. (2000b) publizierte Real-Time-PCR-Protokoll modifiziert verwendet. Hierbei wird der konventionelle Thermocycler durch den Light-Cycler® ersetzt. Die Primer wurden der Publikation von Einsele et al. (1997) entnommen. Das PCR-Setting war bei gleichzeitiger Erhöhung der Zyklanzahl ähnlich.

Anstelle der in der Originalpublikation (Löffler et al., 2000b) verwendeten FRET-Analyse (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) (Clegg, 1995; Wittwer et al., 1997b), die unter Verwendung von speziesspezifischen Oligonukleotiden eine eindeutige Identifikation der eingesetzten DNA erlaubt hätte, lag das Augenmerk in der vorliegenden Untersuchung primär auf dem Vergleich der Sensitivitätsgrenzen bei Optimierung des zeitlichen Laborablaufs.

Daher wurde hier SYBR-Green zur Detektion der amplifizierten DNA eingesetzt. Somit wird unter Verwendung der panfungalen Primer mit nachfolgender

#### 4. Diskussion

---

Schmelzkurvenanalyse innerhalb eines PCR-Laufs der Nachweis eines breiten Spektrums unterschiedlicher Pilz-DNA ermöglicht. In Zukunft könnte über die Bestimmung der speziesindividuellen DNA-Schmelzwerte („T<sub>M</sub>-Werte“) eine genaue Identifizierung der jeweiligen Pilzart erzielt werden. Dies konnte in dieser Arbeit bereits für unterschiedliche humanpathogene Pilzspezies exemplarisch dargestellt werden.

Mit dem in dieser Arbeit erstellten Untersuchungsaufbau konnte eine Nachweisgrenze von  $1,8 \times 10^1$  Genome für *C. albicans* und *S. cerevisiae*, sowie  $1,8 \times 10^2$  Genome für *A. fumigatus* erzielt werden. Somit wird die höhere Sensitivität dieser Amplifikationstechnik gegenüber Standard-PCR deutlich. Würde der zusätzliche Hybridisierungsschritt hier ebenfalls eingepflegt werden, könnte eine weitere Sensitivitätssteigerung bei gleichzeitiger Speziesidentifikation durch Verwendung der spezifischen Oligonukleotidsonden erzielt werden. Löffler et al. (2000b) konnten unter Anwendung der FRET-Analyse eine Sensitivität von fünf CFU je Spezies bei gleichzeitiger Spezifikation der untersuchten DNA erreichen.

Mit einem Zeitaufwand von ca. 50 Minuten ist die DNA-Amplifikation bei gleichzeitig erhöhter Zyklenzahl gegenüber der Standard-PCR nahezu halbiert. Nachteilig an dieser Untersuchungstechnik ist ganz offensichtlich das offene, parallele Bestücken der Real-Time-PCR-Röhrchen mit aufgearbeiteter DNA, was eventuell zu Kontaminationen beitragen könnte.

Zusammenfassend ergibt die Real-Time-PCR das beste und zeiteffizienteste Amplifikationsverfahren aller untersuchten PCR-Protokolle bei gleichzeitig sehr guter Sensitivität.

### 5. Zusammenfassung

Mit der hier vorliegenden Arbeit wurde das Ziel verfolgt, eine möglichst schnelle und effiziente Methode des Nachweises der häufigsten humanpathogenen Pilzspezies zu etablieren.

Die klinisch initial oft inapparent und bei immunsupprimierten Patienten nicht selten letal verlaufenden systemischen Mykosen wie Candidiasis und Aspergillose werden bisher häufig zu spät diagnostiziert. Daher bestand das Ziel dieser Arbeit darin, den Stellenwert der PCR und verschiedener DNA-Aufarbeitungsmethoden zu evaluieren: Hierzu wurden unterschiedliche, bereits bekannte Aufarbeitungstechniken zur Zerstörung der rigiden Zellwand der Pilzzellen mit nachfolgender Reinigung und Amplifikation der DNA miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass auf Grund der verschiedenen Zellwandstrukturen von *C. albicans* und *A. fumigatus* unterschiedliche Aufarbeitungsschritte notwendig sind. Die thermisch-enzymatische DNA-Elution war nur für *A. fumigatus* relativ sensibel. Bei der rein enzymatischen Aufarbeitung unter Verwendung von Zymolyase und Proteinase K konnte *C. albicans* mit einer deutlich höheren Sensitivität als *A. fumigatus* nachgewiesen werden. Um die beiden häufigsten Pilzgattungen *Candida* und *Aspergillus* gleichermaßen nachweisen zu können, wurde ein Protokoll entwickelt, das die thermische Ruptur und die Verwendung der Lyseenzyme Proteinase K und Zymolyase kombiniert.

Nach Identifikation bzw. Entwicklung der effizientesten DNA-Aufarbeitungsmethode wurden im zweiten Teil dieser Arbeit unterschiedliche DNA-Amplifikationsmethoden miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Real-Time-PCR-Technik mittels Light-Cycler® unter Verwendung des sequenzunabhängigen Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green bei niedrigstem Zeitaufwand den sensitivsten Nachweis von *C. albicans* und *A. fumigatus* erbrachte. Die Kombination aus der universell verwendbaren, relativ zeitintensiven DNA-Aufarbeitung mit der zeiteffizienten Real-Time-PCR-Technik ergibt somit einen effektiven Synergismus für den sensitiven Nachweis humanpathogener Pilzspezies.

## 6. Literaturverzeichnis

**Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S (1997):**  
The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. Clin Infect Dis 24:1122-1128

**Abu Al-Soud W, Rådström P (2000):**  
Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces and meat. J Clin Microbiol 38(12):4463-70

**Andrutis KA, Riggle PJ, Kumamoto CA, Tzipori S (2000):**  
Intestinal lesions associated with disseminated candidiasis in an experimental animal model. J Clin Microbiol 38:2317-23

**Bassetti M, Taramasso L, Nicco E, Molinari MP, Mussap M, Viscoli C (2011):**  
Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Italy. PloS One 6(9):e24198

**Beck-Sagué C, Jarvis WR (1993):**  
Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. J Infect Dis 167:1247-1251

**Berg FT:**  
Om torsk hos barn. L.J. Hjerta, Stockholm 1846

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

**Birch DE (1996):**  
Simplified hot start PCR. Nature 381:445-446

**Bodey GP, Anaissie EJ, Edwards JE :**  
Definitions of *Candida* infections; in: Bodey GP: Candidiasis: Pathogenesis, diagnosis and treatment. Raven Press, New York 1993, 407-08

**Bouza E, Munoz P (2008):**  
Epidemiology of candidemia in intensive care units  
Int J Antimicrob Agents 32:87-91

**Bouza E, Perez-Molina J, Munoz P (1999):**  
Report of ESGNI01 and ESGNI02 studies. Bloodstream infections in Europe  
Clin Microbiol Infect 5:1-12

**Bruhn HD, Fölsch UR:**  
Labormedizin. Interaktionen, Methodik und Laborwerte. Pathophysiologie und Klinik. Schattauer Verlag, Stuttgart 2008, 302

**Clegg RM (1995):**

Fluorescence resonance energy transfer. *Curr Opin Biotechnol* 6:103-110

**Denning DW (1996):**

Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 23:608-615

**Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP (1999) :**

Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis* 29(2):239-44

**Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothehöfer I, Müller CA, Bowden RA, van Burik J-A, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U (1997):**

Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 35:1353-1360

**Erjavec Z, Kluin-Nelemans H, Verweij PE (2009):**

Trends in invasive fungal infections, with emphasis in invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 15:625-633

**Fonzi WA, Irwin MY (1993):**

Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134(3):717-28

**Fresenius JBGW:**

Beitrag zur Mykologie 3. Heinrich Ludwig Bröner Verlag, Frankfurt am Main 1863, 81-82

**Greene RE, Schlamm HT, Oestmann JW (2007):**

Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: clinical significance of the halo-sign. *Clin Infect Dis* 44:373-379

**Hachem R, Hanna H, Kontoyiannis D, Jiang Y, Raad I (2008):**

The changing epidemiology of invasive candidiasis: *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. *Cancer* 112:2493-2499

**Hawksworth DL (2001):**

The magnitude of fungal diversity: the 1,5 Million species estimate revisited. *Mycol Res* 105:1422-1432

**Hjortrup A, Rassmussen A, Hansen BA, Høiby N, Heslet L, Moesgaard F, Kirkgaard P (1997):**

Early bacterial and fungal infection in liver transplantation after oral selective bowel decontamination. *Transpl Proc* 29:3106-10

**Jaeger EEM, Carroll NM, Choudhury S, Dunlop AAS, Towler HMA, Matheson MM, Adamson P, Okhravi N, Lightman S (2000):**

Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium* species in ocular samples using Nested PCR. *J Clin Microbiol* 38:2902-2908

**Kappe R, Schulze-Berge A, Sonntag HE (1996):**

Evaluation of eight antibody tests and one antigen test for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycoses* 39(1-2):13-23

**Kellogg DE, Rybalkin I, Mukhamedova N, Vlasik T, Siebert PD, Chenchik A (1994):**

TaqStart antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing antibody directed against Taq DNA polymerase. *Biotechniques* 16:1134-1137

**Kousha M, Tadi R, Soubani AO (2011):**

Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev* 20(121):156-74

**Kullberg BJ, Oude Lashof AM (2002):**

Epidemiology of opportunistic invasive mycoses. *Eur J Med Res* 7:183-191

**Kriengkauykiat J, Ito JI, Dadwal SS (2011):**

Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections. *Clin Epidemiol* 3:175-91

**Kwok S, Higuchi R (1989):**

Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237-8

**Labbe AC, Su SH, Lavardiere M (2007):**

High incidence of invasive aspergillosis associated with intestinal graft-versus-host disease following nonmyoablative transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 13:1192-200

**Latgé JP (1999):**

*Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 12:310-350

**Lin S-J, Schranz J, Teutsch SM (2001):**

Aspergillosis case-fatality rate: systemic review of the literature. *Clin Infect Dis* 32:358-66

**Löffler J, Hebart H, Schumacher U, Reitze H, Einsele H (1997):**

Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J Clin Microbiol* 35:3311-3312

**Löffler J, Hebart H, Brauchle U, Schumacher U, Einsele H (2000a):**

Comparison between plasma and whole blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA by PCR. *J Clin Microbiol* 38:3830-3833

**Löffler J, Henke N, Hebart H, Schmidt D, Hagemeyer L, Schumacher U, Einsele H (2000b):**

Quantification of fungal DNA by using Fluorescence Resonance Energy Transfer and the Light Cycler system. *J Clin Microbiol* 38:586-590

**Lugert R, Schettler C, Gross U (2006):**

Comparison of different protocols for DNA preparation and PCR for the detection of fungal pathogens *in vitro*. *Mycoses* 49:298-304

**Markin RS, Stratta RJ, Woods GL (1990):**

Infection after liver transplantation. *Am J Surg Pathol* 14(1):64-78

**Marty F, Mylonakis E (2002):**

Antifungal use in HIV infection. *Expert Opin Pharmacother* 3:91-102

**McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, Phelan MA, Conn LA, Plikaytis BD, Warnock DW (2001):**

Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin Infect Dis* 33:641-647

**Medicus FC:**

Pflanzen-physiologische Abhandlungen. Entstehung der Schwämme. Vegetabilische Crystallisation. Von den Ursachen der Saftbewegung im Pflanzenreiche. Band 3. Heinrich Gräff Verlag, Leipzig 1803

**Mikulska M, Bassetti M, Ratto S, Viscoli C (2011):**

Invasive *Candidiasis* in Non-Hematological Patients. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 3:e2011007

**Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH (2005):**

Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infections until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality  
*Antimicrob Agents Chemother* 49:3640-3645

**Müller F-MC, Werner KE, Kasai M, Francesconi A, Chanock SJ, Walsh TJ (1998):**

Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high-speed cell disruption. *J Clin Microbiol* 36:1625-1629

**Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Ehrlich H (1986):**

Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51:263-273

**Nucci M, Marr KA (2005):**

Emerging fungal diseases. *Clin Infect Dis* 41:521—526

**Patel R, CV Paya (1997):**

Infections in solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol Rev* 10:86-124

**Patterson TF, Kirkpatrick WR, White M (2000):**

Invasive aspergillosis. Disease spectrum, treatment practices and outcomes. *Medicine* 79(4):250-260

**Pereira GH, Muller PR, Szeszs MW, Levin AS, Melhem MS (2010):**

Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans* candida species. *Med Mycol* 48(6):839-42

**Pfaller MA, Diekema DJ (2007):**

Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20:133-163

**Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, Saiman L, Patterson J, Rinaldi M, Pfaller M, Edwards JE Jr., Jarvis W, Dawson J, Wenzel RP (1999):**

National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. Clin Infect Dis 29:253-258

**Rasmussen R:**

Quantification on the Light-Cycler; in: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K: Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications. Springer Verlag, Berlin 2001, 21-34

**Reichard U, Büttner S, Eiffert H, Staib F, Rüchel R (1990):**

Purification and characterisation of an extracellular serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* and its detection in tissue. J Med Microbiol 33:243-251

**Riggsby WS, Torres-Bauza LJ, Wills JW, Townes TM (1982):**

DNA content, kinetic complexity and the ploidy question in *Candida albicans*. Mol Cell Biol 2:853-862

**Rimek D, Garg AP, Haas WH, Kappe R (1999):**

Identification of contaminating fungal DNA sequences in zymolyase. J Clin Microbiol 37:830-1

**Rossen L, Nørskov P, Holstrøm K, Rasmussen OF (1992):**

Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. Int J Food Microbiol 17(1):37-45

**Rubin RH (2002):**

Overview: pathogenesis of fungal infections in the organ transplant recipient. Transpl Infect Dis 4:12-17

**Ruhnke M, Böhme A, Buchheidt D, Donhuijsen K, Einsele H et al. (2003):**

Diagnosis of invasive fungal infections in hematology and oncology. Guidelines of the infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). Ann Hematol 82:141-148

**Sachse K:**

Specificity and performance of diagnostic PCR assays; in: Sachse K & Frey J: Methods in molecular biology, vol. 216: PCR detection of microbial pathogens. Humana Press Inc., Totowa/ New Jersey 2002, 30-34

**Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T:**

Molecular cloning. A laboratory manual. Bd. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1997

**Stevens DA, Kan VL, Judson MA (2000):**

Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. Clin Infect Dis 30:696-709

**Sundstrom P (1999):**

Adhesins in *Candida albicans*. Curr Opin Microbiol 2(4):353-7

**Upton A, Kirby KA, Carpenter P, Boeckh M, Marr KA (2007):**

Invasive aspergillosis following haematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality. Clin Infect Dis 44:531-540

**Wald A, Leisenring W, van Burik JA, Bowden RA (1997):**

Epidemiology of *Aspergillus* infections in a larger cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. J Infect Dis 175(6):1459-1466

**Walsh TJ (1998):**

Primary cutaneous aspergillosis – an emerging infection among immunocompromised patients. Clin Infect Dis 27(3):453-7

**Wanke B, Santos Lazéra M, Nucci M (2000):**

Fungal infections in the immunocompromised host. Mem Inst Oswaldo Cruz 95:153-158

**Warris A, Voss A, Verweij PE (2001):**

Hospital sources of *Aspergillus*: New routes of transmission? Rev Iberoam Micol 18(4):156-62

**Wilson IG (1997):**

Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl Environ Microbiol 63:3741-3751

**Wilson LS, Reyes CM, Stolpman M, Speckman J, Allen K, Beney J (2002):**

The direct cost and incidence of systemic fungal infections. Value Health 5:26-34

**Winston DJ, C Emmamonilides, RW Busutill (1995):**

Infections in liver transplant recipients. Clin Infect Dis 21(5):1077-89

**Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB (2004):**

Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24.179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis 39:309-317

**Wittwer CT, Fillmore GC, Garling DJ (1990):**

Minimizing the time required for DNA amplification by efficient transfer to small samples. Anal Biochem 186:328-331

**Wittwer CT, Garling DJ (1991):**

Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. Biotechniques 10:76-83

**Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis U (1997a):**

The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. Biotechniques 22:176-181

**Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997b):**

Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. Biotechniques 22:130-131,134-138

## Danksagung

Zu aller Erst möchte ich ganz herzlich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Uwe Groß für die Übertragung dieses spannenden Disserationsthemas und die Bereitstellung des Laborplatzes danken.

Seine Tür stand zu jeder Zeit prompt und gerne offen für Anregungen und Diskussionen – ohne seine stete Unterstützung beim Fortgang der Arbeit wäre ich sicherlich nie so weit gekommen.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Dr. phil. nat. Raimond Lugert bedanken. Ohne sein immer offenes Ohr, seinen schier nie enden wollenden Optimismus beim Fortgang der Arbeit und seinem sicherlich übernormalen, konstruktiven Engagement während der prolongierten Abfassung wäre diese Arbeit wahrscheinlich nie zu Stande gekommen.

Herrn Prof. Dr. med. Utz Reichardt und Frau Prof. Dr. M. Borg-von Zepelin möchte ich hier für die freundliche Überlassung der Spezies-Proben danken.

Mein weiterer Dank gilt dem gesamten Team des Mikrobiologischen Instituts der Universität Göttingen. Hierbei war vor allem die freundschaftliche, immer von Unterstützung geprägte Zusammenarbeit mit Frau K. Kunze und Frau M. Targatz ganz besonders bereichernd. Vielen Dank dafür!

“Last but not least“ gilt ein besonderer Dank meiner Ehefrau Birgit, die mit ihrem Verständnis, ihrer Anteilnahme und nicht zuletzt ihrer fachlichen Kompetenz bei der Durchsicht dieser Arbeit immer an meiner Seite stand.

### Lebenslauf

Ich wurde am 13.10.1977 als zweiter Sohn der Lehrerin Margret Schettler und des Physikers Dr. Rolf Schettler in Northeim geboren.

Von 1983 bis 1987 absolvierte ich meine Grundschulzeit in Hattorf am Harz, um anschließend von 1987 bis 1989 die Orientierungsstufe in Wulften zu besuchen.

Ab 1989 bis 1993 absolvierte ich die Unterstufe des Gymnasiums in Herzberg am Harz. Anschließend folgte ein einjähriger Einführungssprachkurs Russisch an der staatlichen Universität Kharkov/ Ukraine, welchen ich erfolgreich abschloss.

Ab 1994 besuchte ich die Oberstufe des Gymnasiums Herzberg und legte dort 1997 die allgemeine Hochschulreife ab.

Von 1997 bis 1998 diente ich während meiner Wehrdienstzeit bei der Fernmeldeeinheit Frankenberg/ Eder; anschließend folgte ein viermonatiges Pflegepraktikum in den Kliniken Herzberg und Osterode GmbH.

Im Oktober 1998 schrieb ich mich für das Erststudium für Humanmedizin an der Georg-August-Universität zu Göttingen ein. Nach Durchführung des praktischen Jahres am Diakonie-Krankenhaus Rotenburg/ Wümme mit dem Wahlfach Neurologie schloss ich mein Studium im November 2005 mit dem dritten Staatsexamen erfolgreich ab. Von Anfang Dezember 2005 bis Ende Dezember 2006 war ich als Assistenzarzt der I. Medizinischen Klinik des Diakonie-Krankenhauses Rotenburg/ Wümme unter Leitung von Herrn Chefarzt Prof. Dr. med. J. Potratz in den Schwerpunkten Kardiologie/ Onkologie tätig.

Ab Januar 2007 realisierte ich zusammen mit meiner Ehefrau Birgit unser privat organisiertes Entwicklungshilfeprojekt „Spuren-hinterlassen.com“ während unserer zehnmönatigen Westafrikadurchquerung. Hierbei engagierte ich mich vor Ort ehrenamtlich im Schwerpunkt Tropenmedizin im Rahmen einer mehrwöchigen ärztlichen Tätigkeit im G.P.H.A.-Hospital in Takoradi/ Ghana.

Seit März 2008 bin ich als Assistenzarzt der Inneren Medizin bei den Kliniken Herzberg und Osterode GmbH unter der Leitung der Chefärzte Dres. Thiele und Schmidt (Schwerpunkte Kardiologie und Gastroenterologie) angestellt. Ich habe zwei wunderbare Töchter, Johannah Abiona & Julia Meara.