

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität Tübingen**

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth

**Weiterentwicklung und Evaluierung eines DNS-
Microarrays zur Identifikation von humanpathogenen
Pilzen**

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

**der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu
Tübingen vorgelegt von Ulrike Strandhagen, geb. Baumgärtel,
aus Weimar**

2010

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. U. Schumacher

2. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. J. Löffler

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Inhaltsverzeichnis..... | 3 |
| 1 Einleitung | 6 |
| 1.1 Klinische Bedeutung von Pilzinfektionen..... | 6 |
| 1.2 Diagnostische Möglichkeiten..... | 6 |
| 1.3 Microarray-Technologie..... | 8 |
| 1.4 Zielsetzung..... | 12 |
| 2 Material und Methoden..... | 13 |
| 2.1 Material | 13 |
| 2.1.1 Chemikalien..... | 13 |
| 2.1.2 Bioreagenzien..... | 14 |
| 2.1.3 Primer | 15 |
| 2.1.4 Geräte..... | 15 |
| 2.1.5 Verbrauchsmaterialien..... | 17 |
| 2.1.6 Referenzstämme | 18 |
| 2.1.7 Klinische Isolate..... | 19 |
| 2.1.8 Software | 21 |
| 2.1.9 Puffer und Lösungen | 22 |
| 2.2 Methoden | 24 |
| 2.2.1 Isolierung der DNS | 24 |
| 2.2.2 Vorbereitung der DNS | 25 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|----|
| 2.2.3 | Sequenzierung..... | 31 |
| 2.2.4 | Herstellung des Arrays | 31 |
| 2.2.5 | Hybridisierung..... | 40 |
| 2.2.6 | Fragmentierung | 41 |
| 2.2.7 | Auswertung..... | 42 |
| 2.2.8 | Versuche zur Validierung des Microarrays | 43 |
| 3 | Ergebnisse | 45 |
| 3.1 | Etablierung..... | 45 |
| 3.1.1 | Isolierung der DNS | 45 |
| 3.1.2 | Optimierung der Markierungs-PCR..... | 45 |
| 3.1.3 | Optimierung der Hybridisierungsbedingungen..... | 47 |
| 3.1.4 | Sondendesign..... | 52 |
| 3.1.5 | Interner Standard..... | 55 |
| 3.1.6 | Auswertung..... | 56 |
| 3.2 | Validierung | 58 |
| 3.2.1 | Hybridisierung von Pilzproben | 58 |
| 3.2.2 | Sensitivität | 69 |
| 4 | Diskussion..... | 75 |
| 4.1 | Etablierung..... | 75 |
| 4.1.1 | Isolierung der DNS | 75 |
| 4.1.2 | Optimierung der Markierungs-PCR..... | 76 |
| 4.1.3 | Optimierung der Hybridisierungsbedingungen..... | 76 |
| 4.1.4 | Sondendesign..... | 79 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.1.5 | Interner Standard..... | 80 |
| 4.2 | Validierung | 82 |
| 4.2.1 | Hybridisierung von Pilzproben | 82 |
| 4.2.2 | Sensitivität | 88 |
| 5 | Zusammenfassung und Ausblick | 91 |
| 6 | Anhang..... | 93 |
| 6.1 | Tabellen | 93 |
| 6.1.1 | Einbauraten der Referenzstämme | 93 |
| 6.1.2 | Übersicht über die klinischen Isolate | 95 |
| 6.1.3 | Sonden | 98 |
| 6.2 | Abkürzungsverzeichnis | 102 |
| 6.3 | Literaturverzeichnis | 104 |
| 7 | Danksagung | 108 |
| 8 | Lebenslauf..... | 110 |

1 Einleitung

1.1 Klinische Bedeutung von Pilzinfektionen

In den letzten Jahren haben Pilzinfektionen stark an klinischer Bedeutung gewonnen. Insbesondere gilt dies für die oft rasant verlaufenden und lebensbedrohlichen invasiven Mykosen. Dabei handelt es sich zumeist um opportunistische Infektionen mit eigentlich apathogenen Keimen bei immungeschwächten Patienten (Lionakis, 2008). Die Zahl dieser Patienten hat durch Fortschritte in der Intensivmedizin und in der Therapie von onkologischen Erkrankungen, aber auch durch die weitere Ausbreitung von Krankheiten wie AIDS oder Diabetes mellitus, zugenommen. Neben *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus*, die immer noch die häufigsten Verursacher invasiver Mykosen sind, werden vermehrt Infektionen durch seltenere Pilze, wie *Mucor*, *Fusarium* oder *Malassezia* Spezies oder resistente Stämme wie *Candida glabrata* beobachtet (Randhawa, 2000; Warnock, 2007).

1.2 Diagnostische Möglichkeiten

Dies stellt neue Anforderungen an die Mikrobiologie: Die Diagnose einer invasiven Pilzinfektion muss einfach, schnell und präzise, möglichst auf Speziesebene, gestellt werden. Nur so kann rasch eine spezifische Therapie eingeleitet werden, die die Lebensqualität oder gar das Leben des Patienten rettet und gleichzeitig Resistenzbildungen, die bei der Therapie bakterieller Infektionen bereits zu großen Problemen führen, vermeidet.

Die klinischen Frühzeichen einer invasiven Mykose sind sehr unspezifisch und mild. Auch bildgebende Verfahren zeigen erst in fortgeschrittenen Stadien Auffälligkeiten, z.B. in Lunge oder Leber, die sich aber auf dieser Grundlage noch keiner Spezies zuordnen lassen.

Einleitung

Bisher stützt sich die mykologische Diagnostik hauptsächlich auf die Morphologie. Bei Verdacht auf eine Pilzinfektion werden Körperflüssigkeit oder Gewebe auf einer Kulturplatte ausgestrichen, inkubiert und nach einer gewissen Zeit makroskopisch und mikroskopisch untersucht. Je nach Spezies muss der Pilz dabei mehrfach auf frische Kulturplatten überimpft werden oder es dauert einige Wochen, bis der Pilz das Reifestadium erreicht, in dem er die für ihn charakteristischen Merkmale entwickelt. Diese zu erkennen erfordert, besonders bei selteneren Spezies, ein fundiertes Fachwissen, ganz abgesehen davon, dass es zu diesem Zeitpunkt für den Patienten längst zu spät sein kann. Werden Hochrisikopatienten prophylaktisch mit einem Breitspektrum-Antimykotikum behandelt, kann das zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führen, wie zum Beispiel durch das nephrotoxische Amphotericin B (Ullmann, 2008), und die Züchtung von resistenten Pilzen fördern. Zusätzlich kann es schon bei Verdacht auf die Infektion mit einem aggressiven Pilz notwendig sein, den Infektionsherd großzügig operativ zu entfernen um eine weitere Ausbreitung zu verhindern. Dies kann eine starke Einschränkung der Lebensqualität mit sich bringen und war unnötig, wenn sich der Verdacht durch die endgültige Diagnose nicht bestätigt.

Immunologische Methoden, die also auf dem Nachweis von Antikörpern oder Antigenen beruhen, wie der Test auf Galactomannan, einen Zellwandbestandteil von *Aspergillus sp.*, zeigten in der Mykologie bisher keine zuverlässigen Ergebnisse, werden aber weiter intensiv erforscht (Foy, 2007; Yeo, 2002).

Dagegen hat die Molekularbiologie in den letzten Jahrzehnten stark an Bedeutung gewonnen (Walsh, 1998). Der schnelle und genaue Nachweis spezifischer Nukleinsäuren entspricht den bereits erwähnten Anforderungen an die moderne Diagnostik (Yeo, 2002). Dabei ist die Extraktion von DNS aus Pilzzellen mit einem höheren Aufwand bei geringerer Ausbeute als bei menschlichen Zellen oder Viren verbunden (Löffler, 1997a). Am Universitätsklinikum Tübingen findet

Einleitung

bereits die Vervielfältigung der 18S rDNS Region mittels PCR, die Aufschlüsselung dieses Genomsegmentes durch Sequenzierung in einem auswärtigen Labor und der anschließende Abgleich mit einer Sequenzdatenbank klinische Anwendung. Dank dieser Methode können auch seltene Erreger zuverlässig identifiziert werden. Die Sequenzierung ist jedoch ein technisch relativ aufwändiges Verfahren, das nicht vor Ort durchgeführt werden kann, wodurch wiederum die Diagnosestellung verzögert wird. Außerdem machen bereits kleinste Beimischungen anderer Pilzspezies die Sequenzierung unmöglich.

Neben der Sequenzierung, die gegenwärtig als Goldstandard in der molekularbiologischen Diagnostik gilt, wurden verschiedene Nachweise durch Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde beschrieben, unter anderem die Southern Blot Methode (Einsele, 1997) und ein PCR-Enzym-Immunoassay (Löffler, 1997b).

1.3 Microarray-Technologie

Eine weitere molekularbiologische Möglichkeit stellt die Microarray-Technologie dar. Mittlerweile gibt es auf diesem Gebiet viele verschiedene Systeme, die alle in etwa auf folgendem Prinzip beruhen: Auf einem Trägermaterial wird an einer definierten Stelle eine Sonde fixiert, die in der Lage ist, eine spezifische Struktur, die nachgewiesen werden soll, zu binden. Diese Struktur wird in einer bestimmten Weise markiert und in Lösung auf das Trägermaterial gegeben. Ist nach Abwaschen der Lösung an der definierten Stelle ein Signal durch die Markierung erkennbar, so ist damit nachgewiesen, dass die Struktur in der Lösung vorhanden sein muss.

Diese Strukturen können zum Beispiel Proteine, RNS oder DNS sein, die radioaktiv oder durch den Einbau fluoreszierender Bestandteile markiert werden. Die Methode ermöglicht die parallele Untersuchung auf verschiedene

Einleitung

Strukturen, wenn die entsprechenden Sonden auf dem Trägermaterial angeordnet werden.

Der erste Nachweis spezifischer DNS Sequenzen nach diesem Prinzip wurde 1975 von Edwin Southern veröffentlicht (Southern 1975). In dem seither als *Southern-Blot* bekannten Verfahren werden allerdings die zu untersuchenden Proben auf einer Membran fixiert und anschließend durch die Hybridisierung mit markierten Sonden nachgewiesen. Diese aufwändige Methode wurde zu einem System weiterentwickelt, in dem die Sonden in sogenannten *Spots* auf Zellulosemembranen immobilisiert und mit der markierten Zielstruktur hybridisiert wurden. Da die *Spots* relativ groß waren, wurden diese Systeme auch als Macroarrays bezeichnet. Im Jahr 2000 wurde der *reverse line probe assay* vorgestellt, der die Hybridisierung durch eine Farbreaktion anzeigt (Martin, 2000), allerdings auf 10-20 Sonden begrenzt ist (Zwart, 2003).

Dagegen zeichnen sich Microarrays durch eine größere Spotdichte (über 500 Spots pro cm² möglich) und die Fixierung der Sonden auf einer festen, nicht permeablen Oberfläche aus. Abbildung 1 veranschaulicht die Funktionsweise eines Oligonukleotid Microarrays, wie er auch in dieser Arbeit verwendet wurde.

Einleitung

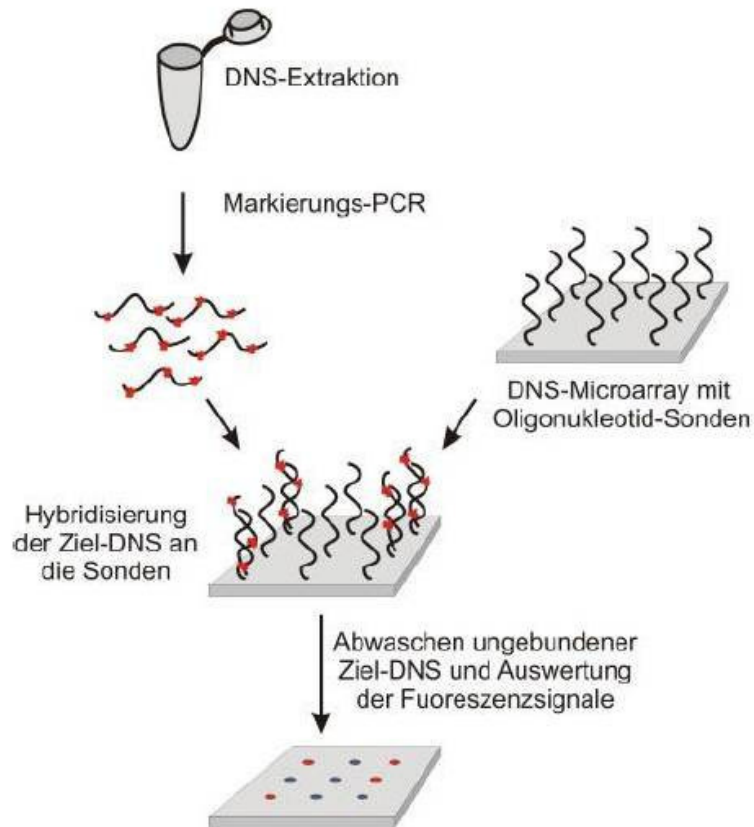


Abbildung 1: Funktionsprinzip eines DNS-Microarrays
übernommen aus Neugebauer (2007)

Für den Einsatz in der mikrobiologischen Diagnostik ist ein DNS Microarray besonders geeignet, da nicht nur viele Tausend Spezies und Gruppen, sondern auch Toxingene und zu Resistenzen führende Mutationen gleichzeitig nachgewiesen werden können - vorausgesetzt, die entsprechenden Sonden stehen zur Verfügung.

Es wurden bereits verschiedene Microarrays für die Identifizierung von Viren (Chizhikov, 2002; Kim, 2003), Bakterien (Fukushima, 2003; Kakinuma, 2003) und Antibiotika-Resistenzen von Bakterien (Grimm, 2004) veröffentlicht.

Einleitung

Im Jahr 2004 hat Dirk Leinberger am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart im Rahmen seiner Diplomarbeit in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen den ersten Microarray für die mykologische Diagnostik entwickelt (Leinberger, 2004). Dieser basierte auf dem Nachweis fluoreszenzmarkierter DNS durch Bindung an Oligonukleotid-Sonden und erfasste 8 *Candida*- und 4 *Aspergillus*-Spezies.

Als Primer für die PCR, die parallel als Amplifizierungs- und Markierungs-PCR diente, wurden die ITS Primer ITS1 und ITS4 verwendet. Sie entsprechen je einer, über alle Spezies hinweg, konservierten Region des 18S bzw. 28S Gens. Ihre Zielregion besteht neben der stark konservierten 5,8S rDNS aus den variablen *Internal-transcribed-spacer*(ITS)-Regionen ITS1 und ITS2, die aufgrund ausreichender Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies und gleichzeitig geringen Unterschieden innerhalb einer Spezies gut zur Spezies-Identifizierung geeignet schienen (White, 1990; Fujita, 1995; Gaskell, 1997; Henry, 2000; Sugita 2002). Abbildung 2 gibt einen Überblick über diese Genomregionen.

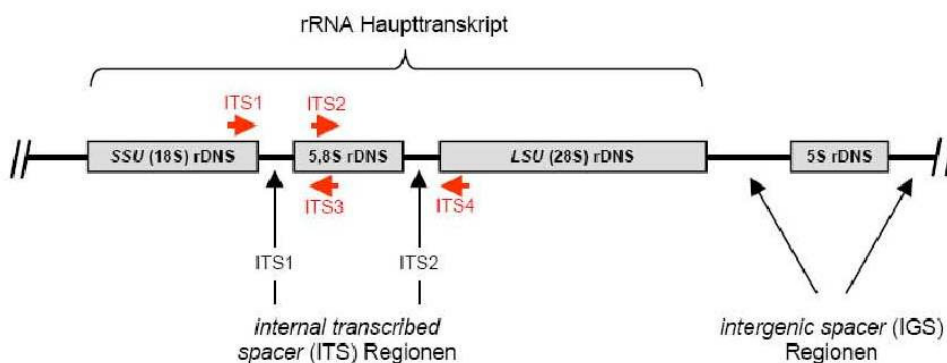


Abbildung 2: Übersicht über die für die molekularbiologische Identifizierung von Schimmelpilzen wichtigen Genomregionen
Übernommen aus Leinberger (2004)

Einleitung

1.4 Zielsetzung

Das Ziel meiner Arbeit war die Weiterentwicklung des Microarrays von Leinberger (Leinberger, 2004):

Das Spektrum der nachweisbaren Spezies sollte um klinisch relevante Pilze anderer Gruppen, insbesondere aus dem Bereich der Zygomyceten, und die häufigsten Umweltkeime erweitert werden.

Der Versuchsaufbau sollte bezüglich Sensitivität und Spezifität der Ergebnisse optimiert werden. Im Einzelnen sollte ein neues DNS-Extraktionsprotokoll getestet, die Markierungs-PCR mit verschiedenen Polymerasen verglichen und die Hybridisierungsbedingungen variiert werden.

Es sollte eine Methode gefunden werden, um Mischinfektionen diagnostizieren und quantifizieren zu können.

Schließlich sollte überprüft werden, ob die Sensitivität des Microarrays für eine Diagnostik direkt aus der Blut- oder Gewebeprobe, d.h. ohne Kultur, ausreichend ist.

Der weiterentwickelte Microarray sollte mit Referenzstämmen für alle Zielspezies und klinischen Isolate validiert werden.

Diese Ziele sollten gemeinsam mit Wibke Neugebauer von der Akademie der Künste in Stuttgart erreicht werden, die sich im Rahmen ihrer Diplomarbeit mit dem Pilzbefall auf Kunstwerken auseinandersetzte. Die Anzucht der Referenzstämmen und klinischen Isolate sowie die DNS-Extraktion sollten im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene an der Universität Tübingen stattfinden, Markierungs-PCR, Herstellung, Hybridisierung und Auswertung der Microarrays am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

| Produkt | Hersteller |
|---|--------------------------------------|
| Bromphenolblau | Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) |
| DMSO | Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) |
| EDTA | Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) |
| Ethidiumbromid | Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) |
| Ethylenglycol | Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) |
| HCl | Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) |
| KCl | Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) |
| NaCl | Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) |
| NA ₂ EDTA; H ₂ O | Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) |
| NaH ₂ PO ₄ | Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) |
| Na ₂ HPO ₄ ; H ₂ O | Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) |
| Na ₂ SO ₄ | Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) |
| NaOH | Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) |
| Orange G | Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) |
| Triton X-100 | Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) |
| Essigsäure | Fluka Chemie (Buchs, Schweiz) |
| Essigsäure | Riedel de Häen (Seelze, Deutschland) |
| Agarose | Gibco BRL (Eggenstein, Deutschland) |
| SDS | Carl Roth GmbH & Co |
| Glycerin | Riedel de Häen (Seelze, Deutschland) |
| Tris | Riedel de Häen (Seelze, Deutschland) |

Material und Methoden

| Produkt | Hersteller |
|---|---|
| LiChrosolv Wasser für die Chromatographie (HPLC Wasser) | Merck (Darmstadt, Deutschland) |
| Natriumcitrat; 2H ₂ O | Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) |
| Nexterion Spot I und Spot III Druckpuffer | PeqLab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland) |

2.1.2 Bioreagenzien

Tabelle 2: Bioreagenzien

| Produkt | Hersteller |
|--|--|
| DNA-Längenstandard | Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) |
| dNTPs (dCTP, dGTP, dATP, dTTP) | Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) |
| FluoroLink Cy3-dCTP | Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) |
| High Pure PCR Template Preparation Kit | Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) |
| Primer (ITS1-4) | Sigma-Genosys (Steinheim, Deutschland) |
| QIAquick PCR Purification Kit | Qiagen (Hilden, Deutschland) |
| RQ1RNase-Free Dnase | Promega (Mannheim, Deutschland) |
| Taq DNA-Polymerase | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |

2.1.3 Primer

Tabelle 3: Primer

| Name | Verwendung | Sequenz (5' → 3') | Länge | Tm [°C] |
|------|--|----------------------|-------|---------|
| ITS1 | Vorwärtsprimer für Amplifikation und Sequenzierung | TCCGTAGGTGAACCTGCGG | 19 | 61,5 |
| ITS2 | Sequenzierung | GCTGCGTTCTTCATCGATGC | 20 | 61,5 |
| ITS3 | Sequenzierung | GCATCGATGAAGAACGCAGC | 20 | 61,5 |
| ITS4 | Rückwärtsprimer für Amplifikation und Sequenzierung | TCCTCCGCTTATTGATATGC | 20 | 55,6 |

2.1.4 Geräte

Tabelle 4: Geräte

| Gerät | Typbezeichnung | Hersteller |
|---|---|--|
| Agarose- Gelelektrophorese- Apparaturen | Mini-Sub Cell GT, Power Pac 300 | Biorad (München, Deutschland) |
| Array-Scanner | ScanArray Express (Version 2.2.0.0022) | Perkin Elmer Lifesciences (Boston, USA) |
| Array-Spotter | Microgrid II Microarrayer | Biorobotics (Cambridge, Großbritannien) |

Material und Methoden

| Gerät | Typbezeichnung | Hersteller |
|---------------------------|---|---|
| Brutschrank | Heraeus Kelvitron | Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland) |
| Gel-Dokumentations-System | Image Analyzer Las-1000 Plus | Fujifilm (Düsseldorf, Deutschland) |
| Hybridisierungssofen | OV5 Hybridisierungssofen | Biometra (Göttingen, Deutschland) |
| PCR-Gerät | Master Cycler Gradient S | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Pipetten | 2,5µl, 10µl, 20µl, 100µl, 500µl, 1000µl | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Slide-Schüttler | Thermomixer Comfort mit Slide-Aufsatz | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Spektrophotometer | ND-1000 Spectrophotometer | NanoDrop Technologies (San Diego, USA) |
| Sterilbank | Hera Safe | Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland) |
| Trockenschrank | Universal Ofen (Model U) | Memmert (Schwabach, Deutschland) |
| Vortexer | Vortex-Genie 2TM | Scientific Industries (New York, USA) |

Material und Methoden

| Gerät | Typbezeichnung | Hersteller |
|-------------|---|--|
| Wasserbad | Umwälzthermostat EC-5M | JULABO Labortechnik GmbH (Seelbach, Deutschland) |
| Zentrifugen | Centrifuge 5417 C, 5810 R (Rotor: A-4-62), 5417 R und Mini-Spin | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| | Varifuge K Inert Typ 4050 | Heraeus Christ (Hanau, Deutschland) |

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

| Produkt | Hersteller |
|--|--|
| 384 Well Polystyrol(PS)-Microplatten (U-Form) | Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland) |
| Abdeckfolie (PCR-foil, adhesive foil seals) | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Gene Frames und Coverslips | ABgene (Hamburg, Deutschland) |
| MagNA Lyser Green Beads | Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) |
| Nexterion™ Slide E (epoxysilane coated substrate) | Schott Nexterion AG (Mainz, Deutschland) |
| Oligonukleotid-Sonden mit 5' Aminomodifikation | Metabion (Planegg-Martinsried, Deutschland) |
| Oligonukleotid-Sonden mit 5' Aminomodifikation und 3' Cy3-Modifikation | Metabion (Planegg-Martinsried, Deutschland) |

Material und Methoden

| Produkt | Hersteller |
|-----------------|--|
| Pipettenspitzen | Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland) |

2.1.6 Referenzstämme

Tabelle 6: Referenzstämme

| Spezies | DSM | ATCC |
|-------------------------------------|--------------------------------|-------------|
| <i>Absidia corymbifera</i> | 1144 | - |
| <i>Absidia glauca</i> | 811 | 20093 |
| <i>Acremonium chrysogenum</i> | 880 | 11550 |
| <i>Acremonium strictum</i> | 3567 | 34717 |
| <i>Alternaria alternata</i> | 1102 | - |
| <i>Aspergillus flavus</i> | 818 | 10124 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | 819 | 9197 |
| <i>Aspergillus niger</i> | klinisches Isolat (ST 717/04) | |
| <i>Aspergillus terreus</i> | 826 | 10020 |
| <i>Aspergillus versicolor</i> | 1943 | 11730 |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> | 2404 | 9348 |
| <i>Candida albicans</i> | 1386 | 10231 |
| <i>Candida dubliensis</i> | klinisches Isolat (ST 2792/03) | |
| <i>Candida glabrata</i> | - | 90030 |
| <i>Candida guilliermondi</i> | 6381 | 6260 |
| <i>Candida krusei</i> | 3433 | 24210 |
| <i>Candida lusitanae</i> | klinisches Isolat (ST 3324/03) | |
| <i>Candida parapsilosis</i> | 5784 | 22019 |
| <i>Candida tropicalis</i> | - | 750 |
| <i>Chaetomium globosum</i> | 1962 | 6205 |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> | 62121 | - |
| <i>Cladosporium herbarum</i> | 63422 | - |

Material und Methoden

| Spezies | DSM | ATCC |
|-------------------------------------|---------------------------------|-------------|
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 11959 | 90112 |
| <i>Cunninghamella blakesleeana</i> | 1906 | 8688a |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 2018 | - |
| <i>Fusarium solani</i> | 1164 | 11712 |
| <i>Malassezia furfur</i> | 6170 | - |
| <i>Mucor hiemalis</i> | klinisches Isolat (ST 2608/05) | |
| <i>Paecilomyces lilacinus</i> | 846 | 10114 |
| <i>Paecilomyces variotii</i> | 1961 | 10121 |
| <i>Penicillium aurantiogriseum</i> | 1250 | 8731 |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | 844 | 11710 |
| <i>Penicillium citrinum</i> | 1179 | 8506 |
| <i>Penicillium expansum</i> | 1282 | 1282 |
| <i>Rhizomucor pusillus</i> | klinisches Isolat (VA 18415/06) | |
| <i>Rhizopus oryzae</i> | 905 | 10260 |
| <i>Rhodosporidium sphaerocarpum</i> | 4628 | 22043 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 70449 | 18824 |
| <i>Trichoderma longibrachiatum</i> | 768 | 13631 |
| <i>Trichoderma viride</i> | 63065 | - |

2.1.7 Klinische Isolate

Tabelle 7: Klinische Isolate

| Labornummer | morphologische Diagnose | Zielspezies |
|--------------------|--------------------------------|--------------------|
| VA 18105/06 | <i>Absidia sp.</i> | Ja |
| VB 12570/06 | <i>Aspergillus flavus</i> | Ja |
| VB 17921/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 17900/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 17787.3/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 17868.1/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |

Material und Methoden

| Labornummer | morphologische Diagnose | Zielspezies |
|--------------------|--------------------------------|--------------------|
| VB 17786.1/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 17834/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 18339.2/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 16433/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 18812/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 19112/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 19327.1/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 18702/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 18586/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VA 23061/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 18789/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 19326.2/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| ST 4670/06 | <i>Aspergillus niger</i> | Ja |
| VB 9904/06 | <i>Aspergillus niger</i> | Ja |
| VB 19559/06 | <i>Aspergillus terreus</i> | Ja |
| VB 16083/06 | <i>Aspergillus sp.</i> | Ja |
| VB 8765/06 | <i>Aspergillus sp.</i> | Ja |
| VB 1478/06 | <i>Aspergillus sp.</i> | Ja |
| VA 103469/04 | <i>Candida dubliensis</i> | Ja |
| VB 9293/06 | <i>Fusarium sp.</i> | Ja |
| VB 23074/06 | <i>Fusarium sp.</i> | Ja |
| VA 25572/06 | <i>Fusarium sp.</i> | Ja |
| VA 23926.1/06 | <i>Mucor sp.</i> | Ja |
| ST 2608/05 | <i>Mucor sp.</i> | Ja |
| ST 3572/05 | <i>Mucor sp.</i> | Ja |
| ST 985/05 | <i>Mucor sp.</i> | Ja |
| ST 16193/06 | <i>Paecilomyces sp.</i> | Ja |
| VB 17787.2/06 | <i>Penicillium sp.</i> | Ja |
| VA 21270/06 | <i>Penicillium sp.</i> | Ja |

Material und Methoden

| Labornummer | morphologische Diagnose | Zielspezies |
|--------------|---------------------------------|-------------|
| VA 21587/06 | <i>Rhizopus sp.</i> | Ja |
| VA 21546/06 | <i>Rhizopus sp.</i> | Ja |
| ST 6043/06 | <i>Rhizopus sp.</i> | Ja |
| VA 20441/06 | <i>Rhizopus sp.</i> | Ja |
| VA 18415/06 | <i>Rhizomucor sp.</i> | Ja |
| VA 28047/00 | <i>Rhizomucor sp.</i> | Ja |
| VA 102986/04 | <i>Rhizomucor sp.</i> | Ja |
| ST 3352/03 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Ja |
| ST 3481/03 | <i>Candida norvegensis</i> | Nein |
| ST 3852/03 | <i>Candida pelliculosa</i> | Nein |
| VA 116042/03 | <i>Candida kefyr</i> | Nein |
| VB 14421/06 | <i>Wangiella sp.</i> | Nein |
| ST 3771/06 | <i>Syncephalastrum</i> | Nein |

2.1.8 Software

Tabelle 8: Software

| Produkt | Hersteller |
|---|--|
| Kommerzielle Software | |
| EditSeq™ (Version 5.00) | DNASTar (Madison, USA) |
| Microsoft Excel | Microsoft (Richmond, USA) |
| ScanArray Express (Version 2.2.0.0022) | Perkin Elmer Lifesciences Inc. (Waltham, USA) |
| SeqMan II™ (Version 5.00) | DNASTar (Madison, USA) |
| Kostenlose Software | |
| http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ | Nukleotide-Nukleotide BLAST (blastn) |
| BioEdit Sequence Alignment Editor (Version 7.0.5.2) | Hall. T.A. 1999. (Nucl.Acids.Symp.Ser. 41:95-98) |

Material und Methoden

| Produkt | Hersteller |
|---------------------------------|---|
| IDT SciTools Oligo Analyzer 3.0 | http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoTools Oligo Analyzer |

2.1.9 Puffer und Lösungen

TAE-Puffer:

| | |
|--------------------|----------|
| Tris | 242 g/l |
| Essigsäure (100%) | 57 ml/l |
| EDTA (0,5 M, pH 8) | 100 ml/l |

Probenpuffer:

| | |
|-------------|-------------|
| Glycerin | 60% (v/v) |
| Xylencyanol | 0,05% (m/v) |
| Orange G | 0,2% (m/v) |
| EDTA | 60 mM |

DNA-Längenstandard 1kb+

Leiter:

| | |
|-----------------------|--------|
| Stammlösung | 25 µl |
| TE-Puffer (1x) | 325 µl |
| Probenpuffer (pH 7,5) | 150 µl |

Spüllösung 1:

0,1% (v/v) Triton x 100

Spüllösung 2:

0,5 µl konz. HCl pro ml ddH₂O

Spüllösung 3:

100 mM KCl

Blockierungslösung:

25% (v/v) Ethylenglykol
0,5 µl konz HCl pro ml ddH₂O

Material und Methoden

20 x SSPE:

| | |
|--|---------|
| NaCl | 175,3 g |
| NaH ₂ PO ₄ ; 1H ₂ O | 88,2 g |
| Na ₂ EDTA | 7,4 g |
| H ₂ O | 800 ml |
| mit 10 M NaOH auf pH 7,4 einstellen | |
| ddH ₂ O | ad 1 l |

20 x SSC:

| | |
|--|---------|
| NaCl | 175,3 g |
| Na ₃ Citrat; 2 H ₂ O | 88,2 g |
| mit konz. HCl auf pH 7,0 einstellen | |
| ddH ₂ O | ad 1 l |

Waschlösung 1:

2 x SSC
2% SDS

Waschlösung 2:

2 x SSC

Waschlösung 3:

0,2 x SSC

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung der DNS

Die DNS-Isolierung erfolgte nach einem Protokoll von Löffler (unveröffentlicht). Alle in diesem Verfahren verwendeten Pufferlösungen stammten aus einem Kit (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland).

Sowohl die Referenzstämme als auch die klinischen Isolate wurden bei 37°C für 2 bis 5 Tage auf Kartoffel-Glucose-Agar angezüchtet. Für die DNS Isolierung wurden anschließend die Konidien mit ca. 10 ml destilliertem Wasser von den Platten gewaschen. Die so entstandene Suspension wurde 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert (Varifuge K Typ 4050, Heraeus Christ, Hanau, Deutschland), der Überstand verworfen und das Konidien Pellet in 1 ml H₂O resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren für 10 Minuten mit 3000 rpm (Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland, auch bei allen weiteren Isolations-schritten) und Abgießen des Überstandes, wurde das Pellet über einem Gitter aufgeschabt. Um die Zellwände der Konidien aufzubrechen wurde das Pellet mit Keramik Beads (Ø 1,4 mm) für 1 Minute auf einem Vortex gerüttelt. Nach Zugabe von *Binding Buffer* und Proteinase K wurde die Lösung 15 Minuten bei 70°C im Wasserbad inkubiert und dann Isopropanol hinzugegeben. Anschließend wurde das Volumen ohne Beads auf eine Säule (High Pure Filter Tube) pipettiert und eine Minute mit 8000 rpm zentrifugiert. Nach Behandlung mit *Inhibitor Removal Buffer*, zweimaligem Waschen (dazwischen jeweils Zentrifugation und Umsetzen in ein neues Auffangbehältnis) und schließlich der Zugabe von 200 µl *Elution Buffer* wurde die Säule erneut zentrifugiert und das Eluat aufgefangen. Dieses enthielt die isolierte DNS und wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

2.2.2 Vorbereitung der DNS

2.2.2.1 Amplifikation und Markierung

Die Amplifikation der Ziel-DNS erfolgte mittels PCR. Als Primer dienten die pilzspezifischen Consensus-Primer ITS1 und ITS4.

Zur Markierung wurden dem PCR Ansatz fluoreszenzmarkierte Nukleotide (Cy3-modifiziertes dCTP), in einigen Vorversuchen zunächst im Verhältnis 1:1 (Cy3 markiertes dCTP : nicht markiertes dCTP), später im Verhältnis 2:3 zugegeben.

In der Etablierungsphase wurden neben der, in allen weiteren Versuchen verwendeten, Taq-DNA-Polymerase (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) auch die Advantage-GC-Genomic PCR (Clontech, Mountain View, USA), die Expand-High-Fidelity-PCR und die GC-Rich-PCR (beide Roche, Mannheim, Deutschland) getestet, um herauszufinden, welche Polymerase die ITS1 und ITS2 Region der Pilz-DNS am effektivsten amplifiziert (die jeweilige Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und die PCR-Protokolle können sie den Tabellen x-y entnehmen).

Um eine Aussage über das Verhalten eines möglichst breiten Spektrums an Pilzspezies treffen zu können, wurde dieser Versuch mit DNS von *Aspergillus terreus*, *Fusarium solani* und *Rhizopus oryzae* wiederholt.

Die Versuche zur Auswahl der geeignetsten Polymerase und die Amplifikation der für die Sequenzierung benötigten DNS wurden ohne fluoreszenzmarkierte Nukleotide durchgeführt.

Alle in Stuttgart durchgeführten PCR-Versuche erfolgten im Master Cycler Gradient Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Erfolg der Amplifikation wurde mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.2.2) überprüft.

Material und Methoden

Tabelle 9: PCR-Reaktionsansatz für die Taq-DNA-Polymerase (Eppendorf)

| Komponente | Ausgangskonz. | Volumen | Endkonz. |
|------------------------------|----------------------|----------------|-----------------|
| Vorwärtsprimer ITS1 | 20 µM | 1 µl | 0,4 µM |
| Rückwärtsprimer ITS4 | 20 µM | 1 µl | 0,4 µM |
| dNTP Mix | je 2,5 mM | 4 µl | 0,2 mM |
| Template | | | 100 ng / 50 µl |
| Reaktionspuffer ¹ | 10x | 5 µl | 1x |
| Mg ²⁺ | 25 mM | 2 µl | 2,5 mM |
| Polymerase | 5 U/µl | 0,5 µl | 2,5 U / 50 µl |
| DMSO | | 1,25 µl | 2,5% |
| HPLC H ₂ O | | ad 50 µl | |

¹enthält 15mM MgCl₂

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die Advantage-GC-Genomic-PCR (Clontech)

| Komponente | Ausgangskonz. | Volumen | Endkonz. |
|-----------------------|----------------------|----------------|-----------------|
| Vorwärtsprimer ITS1 | 20 µM | 1 µl | 0,4 µM |
| Rückwärtsprimer ITS4 | 20 µM | 1 µl | 0,4 µM |
| dNTP Mix | 2,5 mM | 4 µl | 0,2 mM |
| Template | | | 100 ng / 50 µl |
| Reaktionspuffer | 5x | 10 µl | 1x |
| Mg ²⁺ | 25 mM | 2,2 µl | 1,1 mM |
| Polymerase | 5-6 U/µl | 1 µl | 5-6 U |
| <i>GC-Melt</i> | 5 M | 10 µl | 1 M |
| HPLC H ₂ O | | ad 50 µl | |

Material und Methoden

Tabelle 11: Reaktionsansatz für die Expand-High-Fidelity-PCR (Roche)

| Komponente | Ausgangskonz. | Volumen | Endkonz. |
|------------------------------|---------------|----------|----------------|
| Vorwärtsprimer ITS1 | 20 µM | 1 µl | 0,4 µM |
| Rückwärtsprimer ITS4 | 20 µM | 1 µl | 0,4 µM |
| dNTP Mix | je 2,5 mM | 4 µl | 0,2 mM |
| Template | | | 100 ng / 50 µl |
| Reaktionspuffer ¹ | 10x | 5 µl | 1x |
| Polymerase | 3,5 U/µl | 0,75 µl | 2,63 U / 50 µl |
| DMSO | | 1,25 µl | 2,5% |
| HPLC H ₂ O | | ad 50 µl | |

¹ enthält 15mM MgCl₂

Tabelle 12: Reaktionsansatz für die GC-Rich-PCR (Roche)

| Komponente | Ausgangskonz. | Volumen | Endkonz. |
|-------------------------------|---------------|----------|----------------|
| Vorwärtsprimer ITS1 | 20 µM | 1 µl | 0,4 µM |
| Rückwärtsprimer ITS4 | 20 µM | 1 µl | 0,4 µM |
| dNTP Mix | je 2,5 mM | 4 µl | 0,2 mM |
| Template | | | 100 ng / 50 µl |
| Reaktionspuffer ¹ | 5x | 10 µl | 1x |
| Polymerase | 2 U/µl | 1 µl | 2 U |
| <i>GC-resolution solution</i> | 5 M | 10 µl | 1 M |
| HPLC H ₂ O | | ad 50 µl | |

¹ enthält 7,5mM MgCl₂

Material und Methoden

Tabelle 13: Reaktionsansatz für die Markierungs-PCR mit der Taq-DNA-Polymerase

| Komponente | Verhältnis 1:1 | | Verhältnis 2:3 | |
|------------------------------------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|
| | Volumen | Endkonz. | Volumen | Endkonz. |
| Vorwärtsprimer ITS1 (20µM) | 1 µl | 0,4 µM | 1 µl | 0,4 µM |
| Rückwärtsprimer ITS4 (20µM) | 1 µl | 0,4 µM | 1 µl | 0,4 µM |
| dNTP Mix ohne dCTP (je 2,5 mM) | 2 µl | 0,1 mM | 2 µl | 0,1 mM |
| dCTP (2,5 mM) | 1 µl | 0,05 mM | 1,2 µl | 0,06 mM |
| Cy3 dCTP (1 mM) | 2,5 µl | 0,05 mM | 2 µl | 0,04 mM |
| Template | ~100 ng / 50 µl | | ~100 ng / 50 µl | |
| Reaktionspuffer (10x) ¹ | 5 µl | 1x | 5 µl | 1x |
| Mg ²⁺ (25 mM) | 2 µl | 2,5 mM | 2 µl | 2,5 mM |
| Polymerase (5 U/µl) | 0,5 µl | 2,5U/50µl | 0,5 µl | 2,5U/50µl |
| DMSO | 1,25 µl | 2,5% | 1,25 µl | 2,5% |
| HPLC H ₂ O | ad 50 µl | | ad 50 µl | |

¹enthält 15 mM MgCl₂

Tabelle 14: PCR Protokoll für die Advantage-GC-Genomic-PCR und die Taq-DNA-Polymerase

| Programmschritt | Denaturierung | Annealing | Extension | Zyklen |
|-----------------|---------------|---------------|--------------|--------|
| 1 | 95 °C, 3 min | | | 1 |
| 2 | 95 °C, 30 sec | 55 °C, 30 sec | 68 °C, 1 min | 35 |
| 3 | | | 68 °C, 7 min | 1 |

Tabelle 15: PCR Protokoll für die GC-Rich-PCR und die Expand-High-Fidelity-PCR

| Programmschritt | Denaturierung | Annealing | Extension | Zyklen |
|------------------------|----------------------|------------------|------------------|---------------|
| 1 | 95°C, 3 min | | | 1 |
| 2 | 95°C, 30 sec | 55°C, 30 sec | 72°C, 1 min | 35 |
| 3 | | | 72°C, 7 min | 1 |

2.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Um den Erfolg der PCR zu überprüfen, wurde jedes PCR Produkt in eine Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Dazu wurde zunächst das Gel aus 40 ml 1,5%iger Agaroselösung (w/v) und 5 µl Ethidiumbromid-Stammlösung gemischt und in einen Gelträger mit Probenaschenkamm gegossen. Nach einer Polymerisationszeit von 25 Minuten wurde der Probenaschenkamm entfernt, das Gel in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt und die Kammer mit TAE-Puffer gefüllt, bis das Gel komplett mit Puffer bedeckt war. Anschließend wurden je 2 µl PCR-Produkt mit 2 µl Probenpuffer und 2 µl H₂O gemischt und in die Probenaschen gefüllt.

Die Elektrophorese wurde unter einer konstanten Spannung von 110 V für 40 Minuten durchgeführt. Als DNS-Längenstandard diente die 1kb+-Leiter.

Die Detektion der Banden erfolgte mit dem Image Analyzer Las-1000 Plus (Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland).

2.2.2.3 Aufreinigung

Die verbleibenden 48 µl PCR Produkt wurden mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* (Quiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt und abschließend in 30 µl H₂O gelöst.

2.2.2.4 Bestimmung der DNS Konzentration und der Einbaurate des Fluoreszenzfarbstoffes

Nach der Aufreinigung wurde die DNS Konzentration bestimmt, um später eine definierte Menge in der Hybridisierung einsetzen zu können. Parallel wurde auch die Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes Cy3 gemessen. Beide Messungen erfolgten photometrisch mit dem ND-1000 Spektrophotometer (Nanodrop Technologies, San Diego, USA) aus 1,5 µl aufgereinigtem PCR Produkt. Das Absorptionsmaximum der DNS liegt bei 260 nm, das Absorptionsmaximum von Cy3 bei 550 nm.

Die gemessenen Konzentrationen wurden in Formel 1 eingesetzt, um die Einbaurate zu berechnen. Diese gibt an, jedes wievielte Nukleotid in der amplifizierten DNS fluoreszenzmarkiert ist.

Formel 1: Berechnung der Einbaurate des Fluoreszenzfarbstoffes

$$R = \frac{\frac{C_{\text{DNS1}}}{M_A} \times 1000}{C_F}$$

R: Einbaurate von Cy3 in Nukleotide/Cy3

C_{DNS1} : DNS Konzentration in ng/µl

C_F : Cy3 Konzentration in pmol/µl

M_A : Durchschnittliches Molekulargewicht eines Nukleotids in g/mol, entspricht 330 g/mol

Die Zielregion der verschiedenen Spezies war unterschiedlich lang. Um dennoch eine konstante Anzahl an PCR Produkten einsetzen zu können, wurde die DNS Konzentration mit Hilfe der Formel 2 von ng/µl in pmol/µl umgerechnet:

Formel 2: Umrechnung der DNS Konzentration von ng/µl in pmol/µl

$$C_{\text{DNS2}} = \frac{C_{\text{DNS1}} \times 1000}{(L_{\text{F}} \times 2) \times M_{\text{A}}}$$

C_{DNS2} : DNS Konzentration in pmol/µl

L_{F} : Fragmentlänge in Nukleotiden

Im Anschluss an die Bestimmung der DNS-Konzentration wurde das aufgereinigte PCR Produkt bis zur Hybridisierung bei -20 °C eingefroren.

2.2.3 Sequenzierung

Der Microarray soll die bisherige Diagnostik auf morphologischer Basis verbessern. Um die Ergebnisse der Microarray-Experimente überprüfen zu können, musste also eine dritte, etablierte Methode zur Pilzidentifizierung herangezogen werden. Daher wurde jede verwendete Probe, sowohl die Referenzstämme als auch die klinischen Isolate, durch ein externes Labor mit Hilfe der Primer ITS1, ITS2, ITS3 und ITS4 sequenziert (GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland). Aus den, auf diese Weise erhaltenen, vier Sequenzen wurde im Anschluss die gesamte relevante Genomregion (ITS1; 5,8s; ITS2) rekonstruiert (Consensus Sequenz) und, mit Hilfe der Online-Suchmaschine BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), mit den in der Internetdatenbank Genbank verfügbaren Sequenzen verglichen.

2.2.4 Herstellung des Arrays

2.2.4.1 Sondendesign

Die verwendeten Sonden wurden von Wibke Neugebauer und Dirk Leinberger am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart entwickelt. Als Basis dienten ITS-Sequenzen aus der Internetdatenbank *Genbank* sowie die Sequenzen der verwendeten Referenzstämme, die zum Zeitpunkt des Sonden-

Material und Methoden

designs allerdings größtenteils noch nicht vorlagen. Die zu entwickelnden Sonden mussten folgenden Anforderungen gerecht werden: hohe Sensitivität, hohe Spezifität und einheitliche Hybridisierungseffizienz (Sessitsch et al., 2006).

Die bestmögliche Sensitivität, das heißt, dass die Ziel-DNS trotz vereinzelter speziesinterner Mutationen möglichst effizient an die Sonde binden kann, wurde erreicht, indem alle erhältlichen Sequenzen der jeweiligen Zielsequenz heruntergeladen und mit Hilfe des Multiple-Alignment-Programms SeqManII (Version 5.00) (DNASTar, Madison, USA) verglichen wurden. Dieses Programm ordnete die Sequenzen so untereinander an, dass alle Unterschiede und Übereinstimmungen zwischen ihnen zu erkennen waren. Dies ermöglichte die Bildung einer zusammenfassenden Consensus-Sequenz, in der alle uneindeutigen Basen durch bestimmte Abkürzungen gekennzeichnet waren. Anschließend wurde eine Basenabfolge gesucht, die möglichst in der ITS-Sequenz aller Stämme der jeweiligen Spezies, aber nicht in denen der anderen Spezies, vorkam.

Um diesen zweiten, als Spezifität bezeichneten, Punkt zu erfüllen wurden zu jeder Zielspezies auch je 3 Sequenzen von 10 Nicht-Zielspezies der gleichen Gruppe heruntergeladen und jeweils eine Consensus-Sequenz gebildet. Der Vergleich der Consensus-Sequenz der Zielspezies mit den 10 Consensus-Sequenzen der Nicht-Zielspezies erfolgte mit dem Programm BioEdit (BioEdit Sequence Alignment Editor, Version 7.0.5.2). So wurden die Unterschiede zwischen den Spezies deutlich und man konnte die Lage der Sonde wählen, wobei darauf geachtet wurde, dass die Sonde sich durch mindestens zwei unpassende Basenpaare (mismatches) von den Nicht-Zielspezies unterschied. In einigen Fällen wurde es nötig, die Zielspezies mit Hilfe mehrerer Sonden eindeutig abzugrenzen.

Neben den speziesspezifischen Sonden wurden auch Sonden entworfen, die bestimmte Gruppen abbildeten. Dazu wurden Bereiche ausgewählt, die zwischen den einzelnen Spezies einer Gruppe möglichst gleich waren, sich aber

Material und Methoden

gleichzeitig möglichst stark von anderen Gruppen unterschieden. Auch für die Gruppensonden wurde ein Mehrsondenkonzept gewählt (Behr et al., 2000).

Der dritte angesprochene Punkt, neben Sensitivität und Spezifität, der beachtet werden musste, ist die Hybridisierungseffizienz. Das bedeutet, dass alle Sonden, die auf einem Array eingesetzt werden, ein einheitliches thermodynamisches Verhalten zeigen sollten, also alle ungefähr gleich gut DNS binden sollten. Die Hybridisierungseffizienz ist abhängig von der Schmelztemperatur, also der Temperatur, bei der Sonde und Ziel-DNS sich wieder voneinander lösen würden, und der Neigung, Sekundärstrukturen zu bilden und hat damit einen direkten Einfluss auf die Sensitivität.

Die Schmelztemperatur wiederum ist abhängig von der Länge der Sonde und dem Anteil von Guanin und Cytosin, da diese stärkere Bindungen eingehen (3 Wasserstoffbrücken) als Adenin und Thymin (2 Wasserstoffbrücken). Je länger die Sonde ist und je höher der GC-Gehalt, desto höher ist auch die Schmelztemperatur. Da möglichst lange Sonden entworfen werden sollten, wurde versucht, den GC-Gehalt gering zu halten.

Die Schmelztemperaturen der entworfenen Sonden wurden mit Hilfe des Internetprogramms Oligo Analyzer 3.0 (Integrated DNA Technologies, Coralville USA 2006) berechnet, wobei der akzeptierte Bereich von 50-55°C durch die Sonden aus der Arbeit Leinberger (Leinberger, 2004) bereits vorgegeben war.

Als Sekundärstrukturen bezeichnet man unerwünschte Basenpaarungen, entweder zwischen zwei benachbarten Sonden (Self-dimere) oder innerhalb einer Sonde (Hairpin). Die Stabilität solcher Strukturen wurde ebenfalls mit dem Oligo Analyzer 3.0 berechnet und in ΔG (Gibb'sche freie Energie) ausgedrückt. Je größer ΔG , desto mehr Energie muss aufgebracht werden um eine Sekundärstruktur zu bilden. Deshalb wurden nur Sonden ausgewählt, für die der berechnete ΔG Wert für Self-dimere über -6 kcal/mol und für Hairpins über -0,2 kcal/mol lag.

Material und Methoden

Zum Abschluss wurde jede Sondensequenz, die alle bisher genannten Kriterien erfüllte, mit Hilfe der Online-Suchmaschine BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) mit allen, in der Genbank vorhandenen, Sequenzen verglichen. Dabei sollten möglichst nur Sequenzen der Zielspezies, bei Gruppensonden nur Spezies der entsprechenden Gruppe, vollständig mit der Sonde übereinstimmen. War die Sondensequenz auch im Genom anderer Spezies vorhanden, so wurde versucht, eine neue Sonde zu entwerfen. War dies nicht möglich, so wurden die zusätzlichen Spezies näher untersucht und wiederum durch ein Mehrsondenkonzept abgegrenzt.

Zu jeder Sonde wurde eine *antisense*-Sonde mit komplementärer Basenfolge erstellt.

Um der Ziel-DNS später den Zugang zu den gedruckten Sonden zu erleichtern, wurden am 5' Ende jeder Sonde ein 14T Abstandshalter (Spacer) und eine Aminomodifikation eingebaut.

Die auf diese Weise entworfenen Sonden wurden bei Metabion (Planegg-Martinsried, Deutschland) bestellt.

Die Benennung der Sonden erfolgte nach folgendem System: Großbuchstaben standen für Gruppen, Kleinbuchstaben für einzelne Spezies. Dementsprechend bestanden die Namen der Gruppensonden nur aus den ersten drei großgeschriebenen Buchstaben des Gruppennamens (z.B. FUS1S/AS) während die Namen der Speziessonden zusätzlich die ersten drei Buchstaben des Speziesnamens enthielten (z.B. FUSsol1S/AS). Wurden für eine Gruppe oder Spezies mehrere Sonden entwickelt, so wurden diese durchnummeriert. Ein S oder AS kennzeichnete, ob es sich bei einer Sonde um die *sense*- oder *antisense*-Variante handelte. Deckte eine Sonde mehrere Gruppen oder Spezies ab, so wurden die Anfangsbuchstabentriplets aller Gruppen oder Spezies mit Bindestrichen verbunden (z.B. PAEvar-spe-sin1S/AS). Kodierte die Sonde nur für eine bestimmte Untergruppe, wurde diese mit einem Unterstrich angehängt (z.B.

Material und Methoden

AURpul_pul1S/AS). Eine Ausnahme bildeten in diesem System die *Aspergillus*- und *Candida*-Sonden, für die die von Leinberger (2004) verwendete Gruppenbezeichnung mit nur einem Großbuchstaben weitgehend beibehalten wurde (z.B. Afum1S/AS).

2.2.4.2 Kontrollen

Neben den Sonden für die einzelnen Pilzspezies und -gruppen wurden auch verschiedene Kontrollsonden auf den Array gedruckt. Diese sollten die Überprüfung der Qualität und den Vergleich der Experimente miteinander ermöglichen.

Die Druckkontrolle (SC), ein fluoreszenzmarkiertes Molekül, zeigte an, ob die Sonden überhaupt auf den Glasträger übertragen worden waren.

Der Erfolg der Hybridisierung wurde mit Hilfe der positiven Hybridisierungskontrolle (PC) überprüft. Da die Kontrollsequenz nicht mit der DNS von Zielspezies interagieren darf, wurde für die PC eine Sequenz aus dem Genom von *Arabidopsis thaliana* (Acker-Schmalwand) ausgewählt, einer Pflanze, die nicht mit den Pilzen verwandt ist. Jeder Hybridisierung wurde, zur positiven Hybridisierungskontrolle komplementäre, fluoreszenzmarkierte DNS zugegeben, die, nach korrekt verlaufener Hybridisierung, an die PC gebunden hatte und ein Signal zeigte.

Im Gegensatz dazu wurde der Hybridisierung keine Sequenz zugegeben, die zur negativen Hybridisierungskontrolle (NC) komplementär gewesen wäre. Diese sollte also auch kein Signal zeigen.

Die Prozesskontrollen (PC1AS und PC3AS), die bereits von Leinberger (2004) entwickelt worden waren, zeigten an, ob Pilz DNS im Hybridisierungsansatz enthalten war und ob diese bindungsfähig war. Dazu wurden für die Sonden Sequenzen aus dem Bereich der 18s rDNS gewählt, die über alle Pilzspezies konserviert sind. Auch der Ansatzpunkt für den ITS1 Primer liegt in dieser Region weshalb sie in allen mit diesem Primer amplifizierten DNS Strängen

Material und Methoden

vorhanden sein sollten. Auch diese Sonden sollten bei jeder erfolgreichen Hybridisierung von Ziel DNS ein Signal abgeben.

Um auch bei Mischungen aussagekräftige relative Signale bilden zu können, wurde eine weitere Kontrollsonde entwickelt, die im weiteren Interner Standard genannt wird (weitere Erläuterung siehe Diskussion). Tabelle 16 enthält die genauen Sequenzen aller verwendeten Kontrollsonden.

Tabelle 16: Übersicht über die verwendeten Kontrollsonden

| Kontrollsonde | Sequenz (5' -> 3') |
|--|------------------------------|
| Druckkontrolle (SC) | Cy3-TCTAGACAGCCACTCATA |
| Positive Hybridisierungskontrolle (PC) | GATTGGACGAGTCAGGAGC |
| Negative Hybridisierungskontrolle (NC) | TCTAGACAGCCACTCATA |
| zur PC komplementäre Kontroll-DNS | Cy3-GCTCCTGACTCGTCCAATC |
| Prozesskontrolle (PK1AS) | TCCTTCCGCAGGTTCAC |
| Prozesskontrolle (PK3AS) | GCAGGTTCACCTACGGA |
| Interner Standard (PK6AS) | GCATTTGTTTGGGATAGTAGCC |

2.2.4.3 Drucken der Sonden

Die Sonden wurden lyophilisiert geliefert, mit HPLC Wasser auf eine Konzentration von 100 µM aufgefüllt, mit Druckpuffer (Spot I und III im Verhältnis 1:3) auf eine Endkonzentration von 20 µM verdünnt und anschließend alle in die Vertiefungen einer 384-well-Polystyrol-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Position der Sonde auf der Mikrotiterplatte bestimmte dabei bereits die spätere Position auf dem Microarray.

Der Microgrid II Microarrayer (Biorobotics, Cambridge, Großbritannien) mit 4 Nadeln (Accelerator slit pins PT 30000, Point Technologies) druckte jede Sonde im Abstand von etwa 320 µm mit einem Spotdurchmesser von 130-150 µm dreifach nebeneinander. Der komplette Array bestand aus 784 Spots, die auf 4 Unterarrays mit je 14x14 Spots verteilt waren. Je

Material und Methoden

Objektträger wurden 2 Arrays auf die, mit Epoxidharz beschichtete, Glasoberfläche gedruckt. Die Luftfeuchtigkeit lag während des gesamten Druckvorgangs kontrolliert bei 54% rF. Um die Sonden auf dem Objektträger zu fixieren, wurde dieser nach dem Drucken für 30 Minuten in einen 60°C warmen Trockenofen (Memmert, Schwabach, Deutschland) gelegt.

Um nicht gebundene Sonden und Salzurückstände zu entfernen, wurden die Objektträger 4, 5, 10 und 1 Minute in den Spüllösungen 1, 2, 3 und ddH₂O gewaschen, die durch einen Magnetrührer in ständiger Bewegung gehalten wurden. Um freigebliebene Bindungsstellen auf der Epoxidoberfläche zu besetzen, wurden sie anschließend in der Blockierungslösung bei 50°C im Hybridisierungssofen inkubiert und ständig bewegt, bevor sie wieder mit destilliertem Wasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen wurden.

2.2.4.4 Layout

Der Array wurde aus vier Subarrays mit je 14x14 Sondenspots zusammengesetzt. In den Ecken aller vier Subarrays wurden Druckkontrollen platziert, in Längsrichtung dazwischen abwechselnd positive und negative Hybridisierungskontrollen. Alle Spezies- und Gruppensonden wurden nach dem gleichen Prinzip angeordnet: der *sense*-Sonden Spot in dreifacher Ausführung nebeneinander, darunter drei *antisense*-Sonden Spots. In der jeweils linken oberen Ecke jedes Subarrays befanden sich die Prozesskontrollen PK1AS und PK3AS. Der Interne Standard (PK4-6) wurde ebenfalls als Triplet gedruckt, zur besseren Orientierung wurden aber *sense*- und *antisense*-Sonden nebeneinander gesetzt. Um eventuelle regionale Unterschiede der vier Subarrays in der Signalintensität zu erfassen, wurde der Interne Standard auf jedem Subarray zweifach platziert. Verwandte Gruppen und Spezies wurden möglichst auf einem Subarray zusammengefasst. So befinden sich beispielsweise auf dem linken oberen Subarray die Zygomyceten und Basidiomyceten, auf den anderen die

Material und Methoden

Ascomyceten. Die Positionen der einzelnen Sonden sind in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt.

Im Rahmen des Redesigns wurden, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, einige Sonden ersetzt, das Anordnungssystem wurde aber beibehalten. Die entgültige Version (Layout 2.1) ist in Abbildung 4 dargestellt.

Material und Methoden

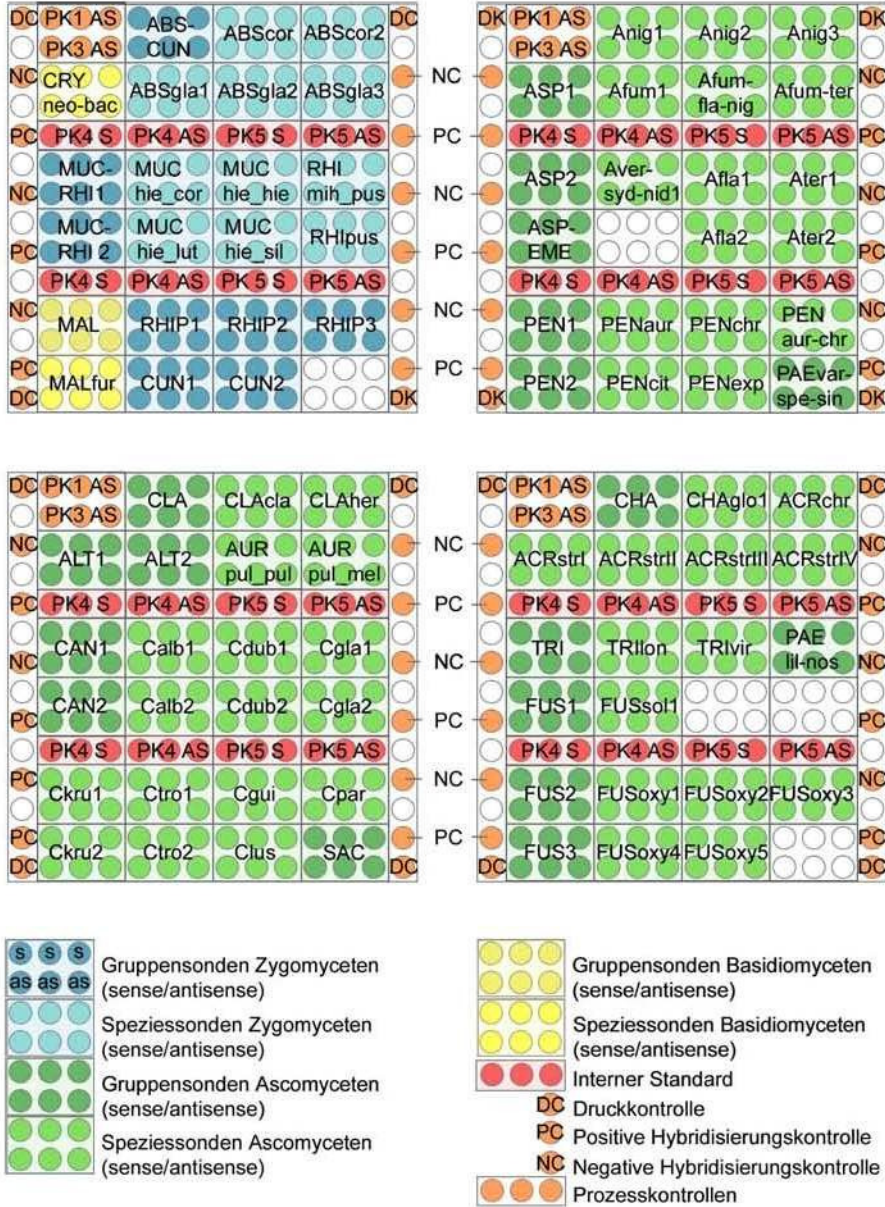


Abbildung 3: Layout 2.0 übernommen aus Neugebauer, 2007

Material und Methoden

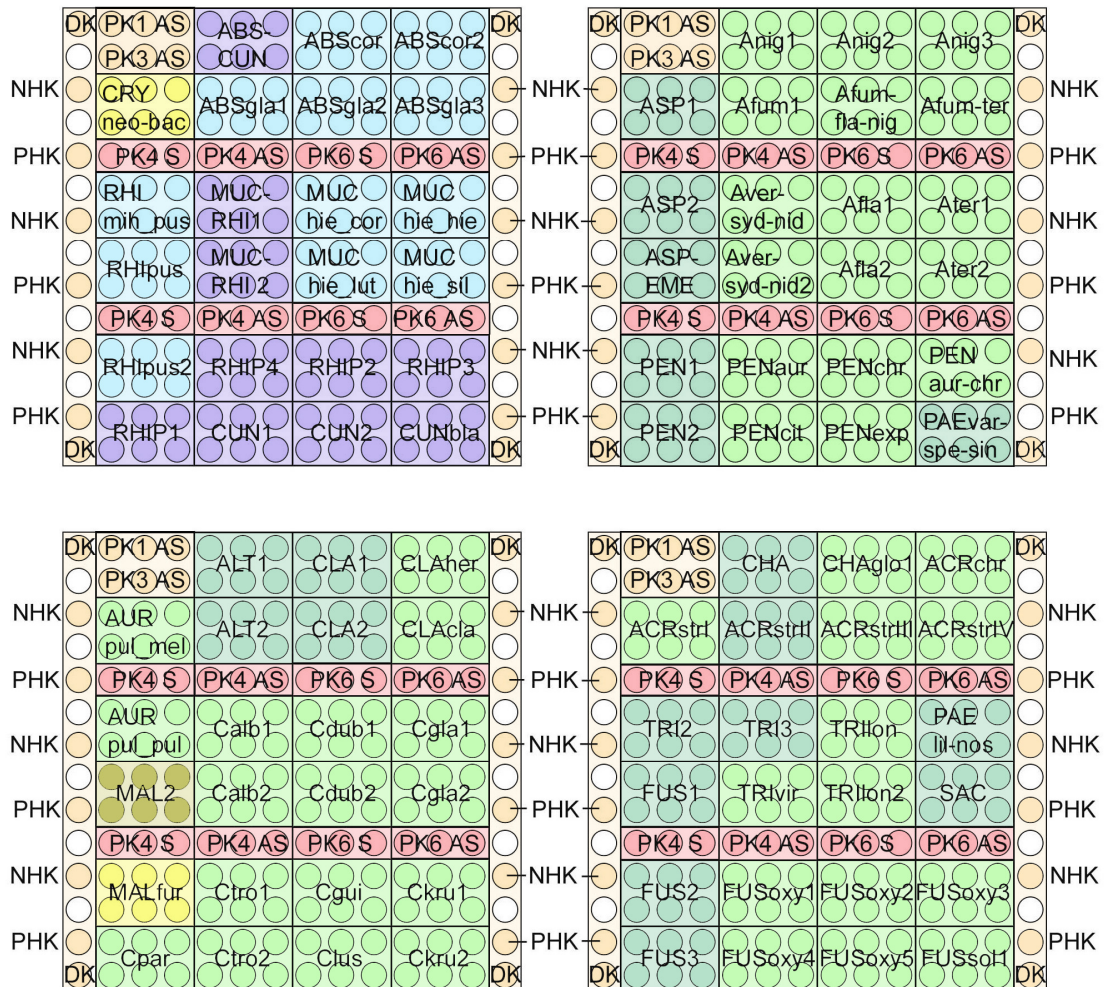


Abbildung 4: Layout 2.1

2.2.5 Hybridisierung

Mit Hilfe einer Schablone wurden um die Arrays kleine Plastikrähmchen (Gene Frame, Abgene, Hamburg, Deutschland) geklebt, in die später der Hybridisierungsansatz eingefüllt werden sollte.

Dieser setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 17: Hybridisierungsansatz

| Komponente | Menge |
|-----------------------------------|--------------|
| Ziel-DNS | 0,3 pmol |
| Positive Hybridisierungskontrolle | 0,05 pmol |
| SSPE | 2x |
| SDS | 0.10% |
| RHOsph | 0,15 pmol |
| ddH ₂ O | ad 70 µl |

Die fertige Lösung wurde zehn Minuten bei 95°C in einem Thermocycler (Master Cycler Gradient Thermocycler, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) denaturiert und anschließend sofort eine Minute auf Eis abgekühlt, damit die, beim Denaturieren entstandenen, Einzelstränge erhalten blieben.

Der denaturierte Ansatz wurde in den Geneframe auf dem Array pipettiert, mit einem Plastikplättchen (cover slip, Abgene, Hamburg, Deutschland) verschlossen und bei 53°C und 1200 rpm für 2 Stunden im Thermomixer (Thermomixer comfort mit Thermoblock, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) hybridisiert. In einem Gerät konnten 4 Slides gleichzeitig bearbeitet werden.

Nach 2 Stunden wurden Coverslip und Geneframe vom Slide abgezogen. Um die DNS-Fragmente abzuwaschen, die nicht an Sonden gebunden hatten, wurden die Slides in einem Tray je 10 Minuten in die Waschlösungen Wash 1 bis 3 gesetzt, die durch einen Magnetrührer in Bewegung gehaltenen wurden. Im Anschluß wurden die Slides mit Stickstoff trocken geblasen und bis zur Auswertung lichtgeschützt aufbewahrt.

2.2.6 Fragmentierung

Im Rahmen der Vorversuche wurde folgendes Fragmentierungsverfahren erprobt: Eine DNase (Promega, Mannheim, Deutschland) zerteilte die DNS Doppelstränge in einem Ansatz von 20 µl mit einer Enzymaktivität von 0,4 mU/ng in

Material und Methoden

kleinere Bruchstücke. Dies geschah fünf Minuten bei Raumtemperatur, bevor der Vorgang durch Erwärmen des Ansatzes auf 65°C für zehn Minuten im Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gestoppt wurde. Der Hybridisierungsansatz für fragmentierte DNS und die Hybridisierung entsprachen dem Vorgehen beim Denaturieren, lediglich der Denaturierungsschritt entfiel.

2.2.7 Auswertung

Die Auswertung der Hybridisierung erfolgte mit dem Array Scanner ScanArray Express Version 2.2.0.0022 (Perkin Elmer Lifesciences, Boston, USA). Ein Laser mit einer Wellenlänge von 543 nm regte den in die Ziel-DNS eingebauten Fluoreszenzfarbstoff an. Jedes Slide wurde bei verschiedenen Signalverstärkungen (PMT) gescannt. Das Ergebnis wurde als 16bit-Tiff-Datei gespeichert. Die Höhe der einzelnen Sondensignale wurde dabei in 65536 Graustufen codiert. Die dadurch entstandenen Zahlenwerte wurden durch die Software des Scanners auf verschiedene Arten verrechnet und in einer .csv-Datei angegeben. Für die weitere Verarbeitung wurde jedoch nur der „Hintergrund korrigierte Mittelwert“ (Mittelwert der Intensitäten der Pixel eines Spots abzüglich des Medians der Pixel des lokalen Hintergrunds) in eine Microsoft Excel Datei kopiert. Durch die Hintergrundkorrektur entstanden für die Sonden ohne Signal teilweise negative Werte. Dies wurde korrigiert, indem alle Signale kleiner Null auf Null gesetzt wurden. Bei 65536 Graustufen können auch Signale unter 300 noch nicht als signifikant gewertet werden. Daher wurden auch diese in einem zweiten Schritt auf Null gesetzt (erster cutoff). Anschließend wurden für jede Sonde aus den Signalstärken der 3 Spots Mittelwert (gemittelte absolute Intensität I) und Standardabweichung berechnet. Um die gemittelten absoluten Intensitäten verschiedener Versuche vergleichen zu können, wurden sie in Bezug zum Internen Standard, also der Sonde PK6AS für die Spezies *Rhodospiridium*

Material und Methoden

sphaerocarpum, gesetzt, von der jeder Hybridisierung eine konstante Menge (0,15 pmol) zugegeben wurde. Die gemittelte absolute Intensität dieser Sonde wurde als 100% definiert und die Signale der anderen Sonden im Bezug dazu als relative Spotintensitäten angegeben (RSI).

Nach der Hybridisierung der Referenzstämme wurde ein zweiter cutoff eingeführt, wodurch alle RSI unter einem bestimmten Prozentsatz der PK6AS Sonde auf Null gesetzt wurden. Bei Sonden, die eng verwandte Spezies abdeckten, bestand die Möglichkeit, zusätzliche individuelle cutoffs anzuwenden.

2.2.8 Versuche zur Validierung des Microarrays

2.2.8.1 Hybridisierung von Mischungen

Um zu überprüfen, wie gut der Microarray in der Lage war, die einzelnen Bestandteile von Mischungen zu erkennen, wurde die markierte DNS der beiden Zielspezies *Trichoderma viride* und *Fusarium solani* in den Mischungsverhältnissen 99:1, 90:10, 75:25, 50:50, 25:75; 10:90 und 1:99 hybridisiert. Die Gesamtmenge an eingesetzter DNS betrug jeweils 0,3 pmol und entsprach damit, wie auch alle weiteren Parameter, den, im Rahmen vorangegangener Versuche ermittelten, Standardbedingungen.

2.2.8.2 Konidienverdünnung

Die Versuche zur Sensitivität des Microarrays wurden mit *Aspergillus fumigatus* durchgeführt. Zunächst wurde eine Suspension aus Konidien hergestellt und in Zehnerschritten von 10^6 bis 10^1 Konidien pro Milliliter verdünnt. Aus je einem Milliliter dieser verdünnten Suspensionen wurde, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, die DNS isoliert und in 200 μ l Elutionspuffer gelöst. In die Markierungs-PCR konnten aus methodischen Gründen jedoch jeweils nur 30 μ l DNS eingesetzt werden, also nur 15% der isolierten DNS. Von den Proben, die die DNS aus 10^1 bis 10^3 Konidien enthielten, wurden jeweils 25 μ l aufgereinigtes PCR-Produkt für die Hybridisierung eingesetzt. Die höher konzentrierten Proben

Material und Methoden

enthielten so viel DNS, dass für die Hybridisierung, genau wie bei den bisherigen Proben, 100 ng abgemessen wurden.

2.2.8.3 DNS-Verdünnung

Auch für die zweite Versuchsreihe zur Sensitivität wurde *Aspergillus fumigatus* verwendet.

Die DNS-Verdünnungsreihe wurde in einer Sterilbank hergestellt um eine Kontamination zu vermeiden. Mit Hilfe des nanodrop (ND-1000 Spektrophotometer, NanoDrop Technologies, San Diego, USA) wurde eine DNS-Lösung auf 33 ng/μl verdünnt. 33 ng entsprechen 10^6 Genomen und sollten in der höchsten Stufe der Verdünnungsreihe enthalten sein. Von dieser Lösung wurden 10 μl in 90 μl H₂O gegeben, was einer DNS Konzentration von 3,3 ng/μl und damit 10^5 Genomen/μl entspricht. Dieses Vorgehen wurde bis zu einer Verdünnungsstufe von 33 fg/μl (1 Genom) wiederholt.

Alle weiteren Arbeitsschritte wurden so ausgeführt, wie sie in den entsprechenden Kapiteln beschrieben sind, wobei die PCR parallel mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden und als einfache Amplifizierungs-PCR ohne Cy3-dCTP durchgeführt wurde.

Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung

3.1.1 Isolierung der DNS

Mit der angewandten Methode konnte aus allen verwendeten Spezies DNS isoliert werden. Die im Anschluss im Eluat gemessene DNS-Konzentration lag zwischen 9 ng/μl (VB 17787.2/06, *Penicillium sp.*) und 116 ng/μl (ST 3572/05, *Mucor sp.*). Lediglich die DNS-Isolation aus *A. niger* Kulturen gelang nicht zuverlässig, das heißt in zwei Fällen konnte weder durch eine PCR noch durch photometrische Vermessung DNS im Eluat nachgewiesen werden. In diesen beiden Fällen zeigte sich das Eluat außerdem dunkel verfärbt, während es bei erfolgreicher Isolation stets klar und farblos war. Eine Variation der eingesetzten Konidienmenge und eine Verlängerung des Arbeitsschrittes in dem die DNS freigesetzt wird (Zermahlen der Konidien zwischen Keramikbeads) brachten keine Verbesserung.

Die Arbeitszeit für die DNS-Isolation betrug eine Stunde.

3.1.2 Optimierung der Markierungs-PCR

3.1.2.1 Wahl der Polymerase

Die Höhe der Signale in der im Anschluss an die PCR-Versuche jeweils durchgeführten Agarose-Gelelektrophorese (Abbildung) und die gemessenen DNS-Konzentrationen (Abbildungen 5 und 6) zeigten, dass mit der Taq-DNA-Polymerase (Eppendorf, Hamburg, Deutschland), unabhängig von der Spezies, die höchste Anzahl Amplifikate hergestellt werden konnte. Daher wurde im weiteren Verlauf der Arbeit die Taq-DNA-Polymerase als Standard gewählt.

Ergebnisse

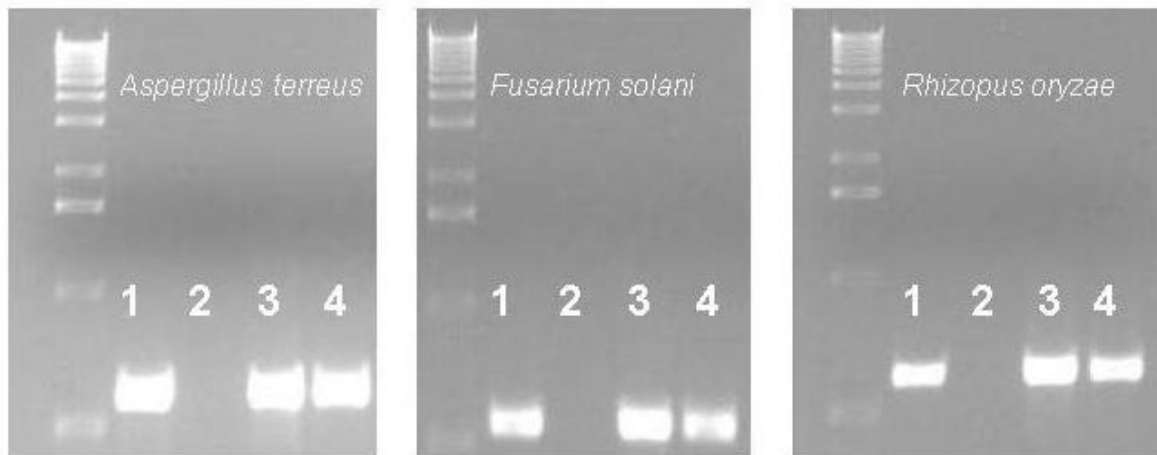


Abbildung 5: Agarose-Gelelektrophorese nach PCR mit den verschiedenen Polymerasen

- 1: Expand High Fidelity PCR (Roche)
- 2: GC-Rich PCR (Roche)
- 3: Advanced GC-Genomic PCR (Clontech)
- 4: Taq-DNA-Polymerase (Eppendorf)

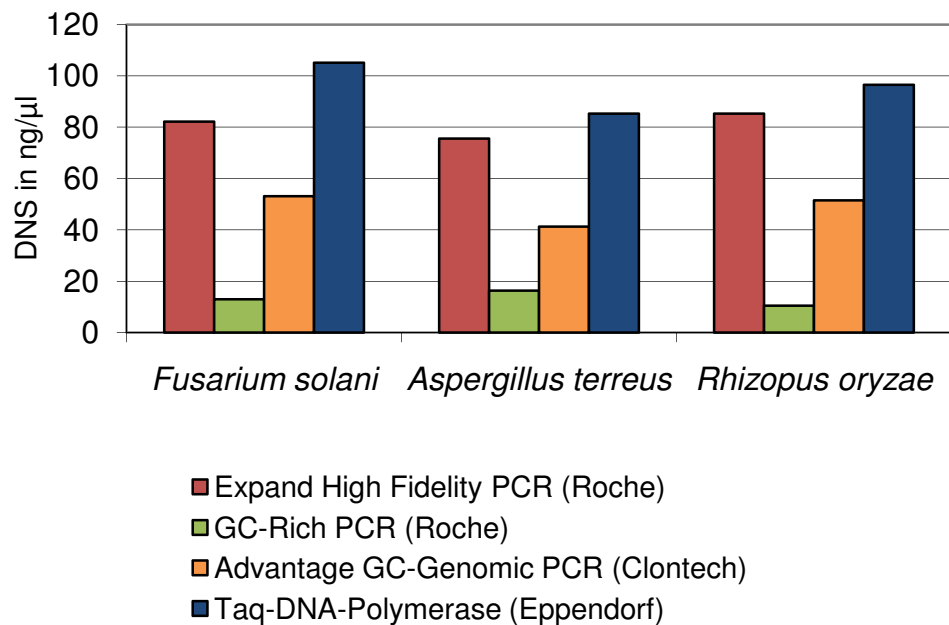


Abbildung 6: DNS-Konzentration nach PCR mit den verschiedenen Polymerasen

Ergebnisse

3.1.2.2 Bestimmung der DNS-Konzentration und der Einbaurate des Fluoreszenzfarbstoffes

Damit später eine definierte Menge DNS in der Hybridisierung eingesetzt werden konnte, wurde nach der Amplifikation die DNS-Konzentration bestimmt. Parallel wurde auch die Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes Cy3 gemessen.

Die Labelling-PCR für die ersten fünf Referenzstämme wurde mit fluoreszenzmarkiertem (Cy3 dCTP) und unmarkiertem Cytosin (dCTP) im Verhältnis eins zu eins durchgeführt, was zu Einbauraten zwischen 42 (*Aspergillus versicolor*) und 80 (*Rhizopus oryzae*) führte. Das heißt, jedes 42. bis 80. eingebaute dCTP war fluoreszenzmarkiert.

Die Erfahrung in der Arbeitsgruppe hatte gezeigt, dass deutlich geringere Einbauraten für die Hybridisierungsversuche ausreichten, weshalb in allen weiteren Labelling-PCRs Cytosin im Verhältnis zwei (Cy3 dCTP) zu drei (dCTP) eingesetzt wurde. Dies ergab Einbauraten zwischen 62 (*Aspergillus fumigatus*) und 150 (*Penicillium chrysogenum*). Die Einbauraten sämtlicher Referenzstämme sind in Tabelle 18 im Anhang aufgeführt.

3.1.3 Optimierung der Hybridisierungsbedingungen

3.1.3.1 Vergleich von Denaturierung und Fragmentierung

Die DNS folgender Spezies wurde sowohl denaturiert als auch fragmentiert getestet: *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus oryzae*, *Rhodosporidium sphaerocarpum*, *Trichoderma longibrachiatum*. Parallel wurden bei diesen Versuchen auch zwei Zusammensetzungen der Hybridisierungslösung verglichen: SSPE 6x ohne SDS und SSPE 2x mit zusätzlich 0,01% SDS.

Über alle diese Spezies hinweg zeigten sich nach der Fragmentierung folgende Charakteristika im Vergleich zur Denaturierung: Der Unterschied zwischen den absoluten Signalen der *sense*- und *antisense*-Sonden einer Spezies wurde geringer, wobei

Ergebnisse

jeweils die Sonde, die bei denaturierter DNS das stärkere Signal zeigte, auf fragmentierte DNS schwächer ansprach und umgekehrt.

Die absoluten spezifischen Signale nach Fragmentierung waren niedriger als nach Denaturierung. Relativ dazu wurden die Kreuzhybridisierungssignale stärker und eng verwandte Spezies waren schlechter voneinander abgrenzbar.

Dies lässt sich besonders gut am Beispiel von *Penicillium chrysogenum* und *Penicillium aurantiogriseum* zeigen, deren Sonden sich nur in einer Base unterscheiden: Während das Signal der spezifischen, und zur Unterscheidung zwischen diesen beiden Spezies wichtigen, Sonde PENchr1 abnahm zeigte die gemeinsame Sonde PENaur-chr das höchste Signal. Auch die Kreuzhybridisierungen mit den Sonden Afum-fla-nig und Aver-syd-nid wurden stärker (siehe Abbildung 7).

Da sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität der Hybridisierung durch die Fragmentierung abnahmen, wurde die Denaturierung als Standard für die DNS-Vorbereitung gewählt.

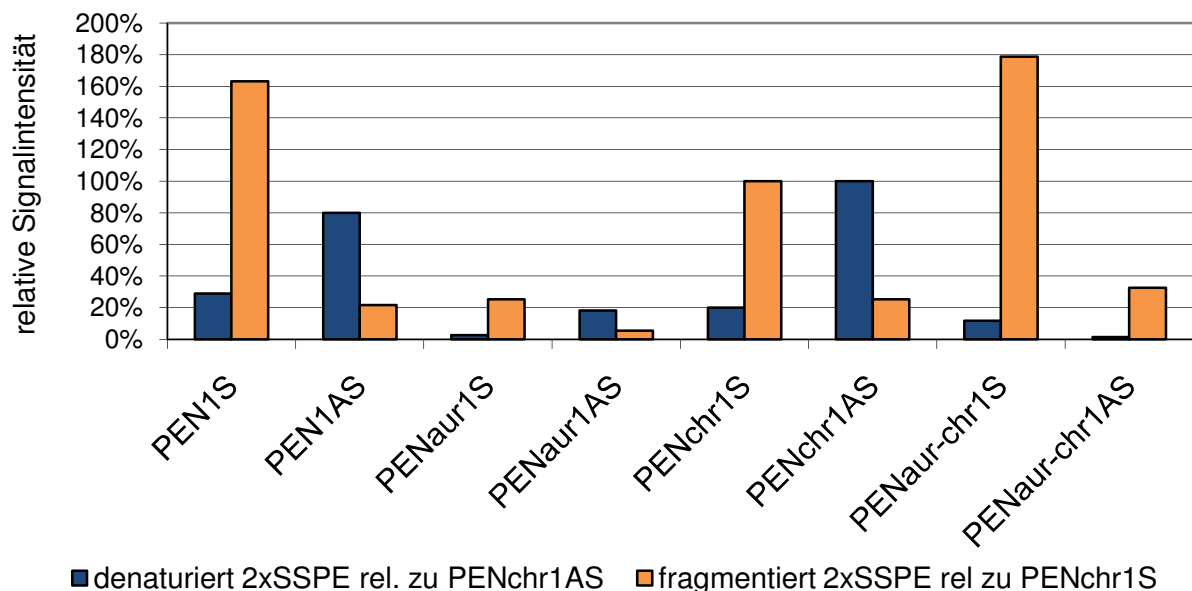


Abbildung 7: Vergleich von Denaturierung und Fragmentierung am Beispiel von *Penicillium chrysogenum*

Signalintensitäten relativ zum jeweils stärksten spezifischen Signal (PENchr1S/AS), weitere Hybridisierungsbedingungen: 53°C, 2h

Ergebnisse

3.1.3.2 SSPE-Konzentration

Parallel zum Vergleich von Denaturierung und Fragmentierung (siehe 3.1.3.1) wurde an denselben Spezies die Auswirkung unterschiedlicher Konzentrationen des Puffers SSPE untersucht.

Der Einsatz von 2x SSPE und zusätzlich 0,001% SDS führte bei allen getesteten Spezies, im Vergleich zur Hybridisierung mit 6x konzentriertem SSPE ohne SDS, zu einer Abnahme der absoluten Signalintensitäten (Sensitivität). Er bewirkte aber auch eine Vergrößerung der Intensitätsdifferenz zwischen spezifischen und falsch positiven Signalen, also eine Zunahme der Spezifität (siehe Abbildung 8) und wurde daher in die Standardbedingungen übernommen.

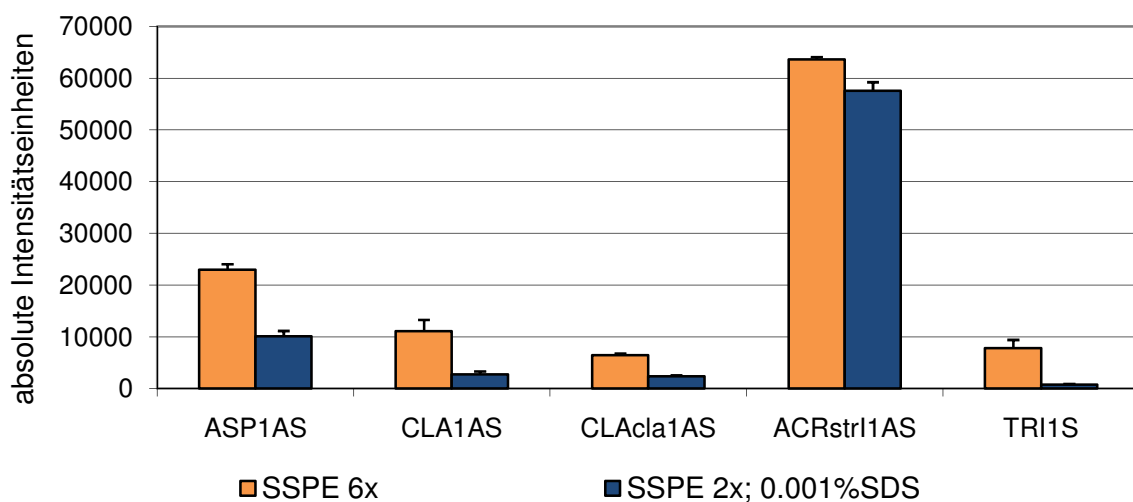


Abbildung 8: Auswirkung der SSPE-Konzentration auf Kreuzhybridisierungen am Beispiel von *Acremonium strictum*, dargestellt in absoluten Intensitätseinheiten, weitere Hybridisierungsbedingungen: denaturierte DNS, 53°C, 2h

3.1.3.3 Hybridisierungstemperatur

Um die optimale Hybridisierungstemperatur zu finden, wurde der Temperaturbereich von 49°C bis 55°C mit den Spezies *Fusarium oxysporum*, *Cladosporidium herbarum*

Ergebnisse

und *Rhizopus oryzae* bei jeweils 49 °C, 51 °C, 53 °C und 55 °C überprüft. Alle weiteren Hybridisierungsparameter entsprachen dem bis dahin erarbeiteten Optimum: 2x SSPE; 0,01% SDS; denaturierte DNS; 0,3 pmol Spezies DNS; 0,2 pmol *Rhodosporidium sphaerocarpum* DNS; zwei Stunden Hybridisierungsdauer.

In den meisten Fällen bestätigte es sich, dass die absoluten Signale mit steigenden Temperaturen abnahmen. Bei allen Versuchen fielen die absoluten Signale bei 55 °C stark ab. Bei 49 °C zeigte sich das höchste Kreuzhybridisierungssignal: Bei der Hybridisierung von *Rhizopus oryzae* entsprach das falsch positive Signal der RHlpus1S Sonde 12% von PK6AS. Zwischen 51 °C und 53 °C konnten keine konstanten Unterschiede festgestellt werden. Als Standardtemperatur wurden 53 °C gewählt. Die Abbildungen 9 und 10 zeigen die Ergebnisse der Versuche zur Hybridisierungstemperatur am Beispiel der Spezies *Fusarium oxysporum*.

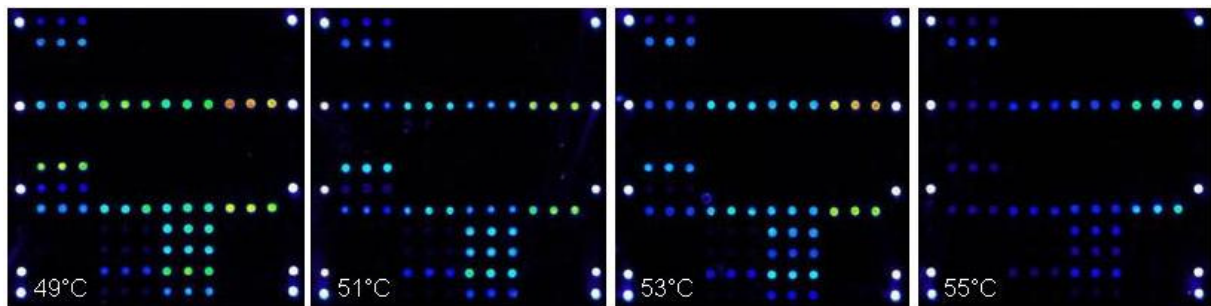


Abbildung 9: Auswirkung verschiedener Hybridisierungstemperaturen am Beispiel von Arraybildern der Spezies *Fusarium oxysporum*
Dargestellt wurde jeweils nur der untere linke Subarray

Ergebnisse

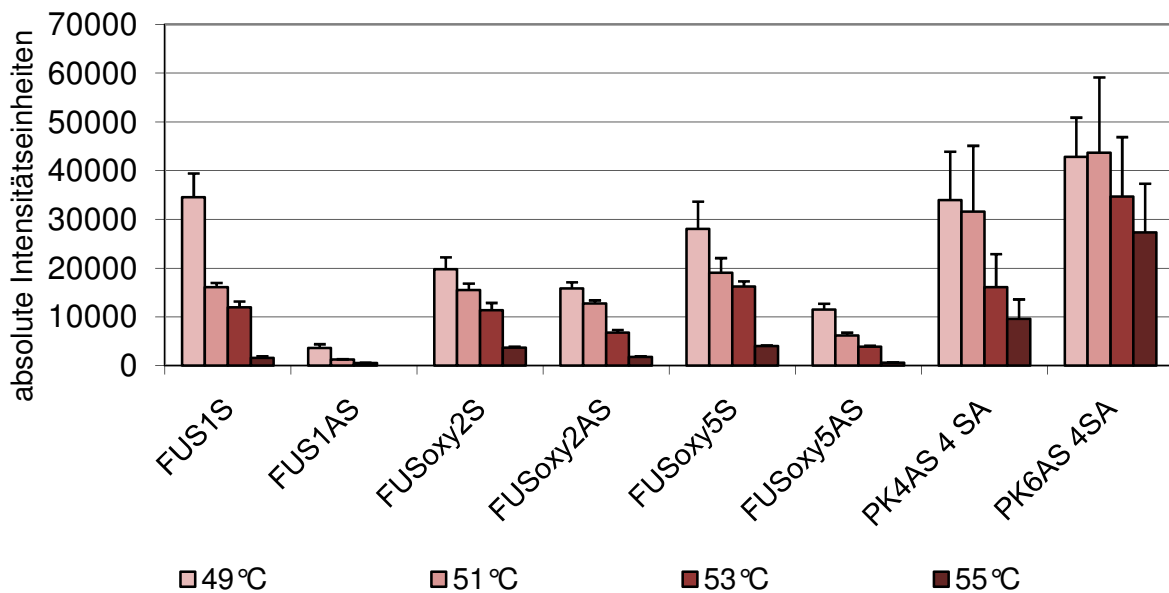


Abbildung 10: Auswirkung der Hybridisierungstemperatur auf die absoluten Signale am Beispiel *Fusarium oxysporum*

Dargestellt in absoluten Intensitätseinheiten, Hybridisierung: denaturierte DNS, 2x SSPE, 0,001% SDS, 2h

3.1.3.4 SDS-Konzentration

Durch das Herabsetzen der SSPE-Konzentration und die Versuche zur Hybridisierungstemperatur wurden ausreichend stringente Hybridisierungsbedingungen gefunden. In einer weiteren Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob eine Erhöhung der Konzentration des neu eingeführten SDS die Sensitivität verbessert, das heißt zu höheren absoluten Signalen führt, ohne im Gegenzug die Spezies-Diskriminierung wieder zu verschlechtern.

Exemplarisch wurden die Spezies *Fusarium oxysporum* und *Acremonium strictum* ausgewählt.

Bei *Fusarium oxysporum* kam es durch eine Erhöhung der SDS-Konzentration von 0,001% auf 0,01% zu einer starken Zunahme der absoluten Signale aller spezifischen Sonden, die sich bei einer weiteren Erhöhung auf 0,1% nicht bei allen Sonden

Ergebnisse

fortsetzte. Während beispielsweise das Signal der Sonde FUSoxy2S weiter deutlich anstieg, fiel das Signal der Sonde FUS1S ab (siehe Abbildung 11).

Acremonium strictum zeigte ein Maximum der absoluten Signale bei 0,1% SDS. Weder bei einer Erhöhung von 0,01% auf 0,1%, noch bei einer weiteren Erhöhung auf 1%, konnte eine Verschlechterung der Speziesdiskriminierung festgestellt werden. Das Verhältnis zwischen dem höchsten spezifischen Signal (ACRstr1AS) und den falsch positiven Signalen blieb konstant.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein SDS-Anteil von 0,1% für die optimierte Hybridisierungslösung festgelegt.

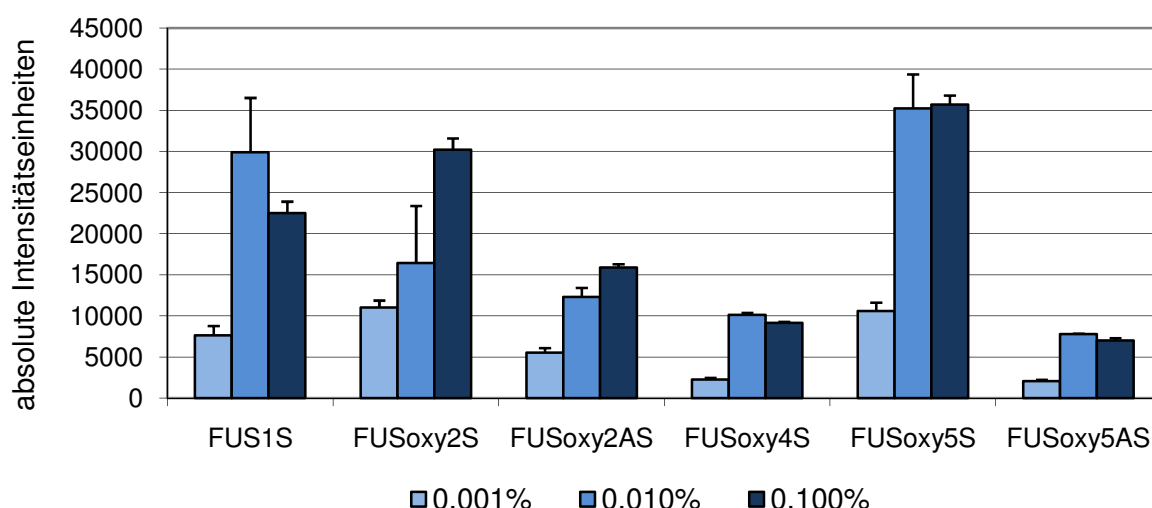


Abbildung 11: Auswirkung der SDS-Konzentration auf die absoluten Signale am Beispiel *Fusarium oxysporum*

Dargestellt in absoluten Intensitätseinheiten, Hybridisierung: denaturierte DNS, 2x SSPE, 0,001% SDS, 53 °C, 2h

3.1.4 Sondendesign

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 48 Speziessonden, 24 Gruppensonden und die zugehörigen *antisense*-Sonden von Wibke Neugebauer entwickelt. Insgesamt waren auf dem Array Sonden für 40 Spezies und 15 Gruppen vorhanden. Die Schmelztemperatur T_m lag für alle Sonden zwischen 47,3 °C (Ctro1S) und 57,1 °C (ASP1S). Be-

Ergebnisse

trachtet man nur die neu entworfenen Sonden, so lag T_m zwischen 49,7°C (FUSoxy4S) und 55,3°C (TRI2S).

Die Sondenlänge betrug zwischen 17 und 24 Basen.

Bis auf die im Folgenden beschriebenen Ausnahmen lagen die ΔG Werte für Haarnadelstrukturen (Hairpin), wie im Kapitel „Material und Methoden“ gefordert, über -0,2 kcal/mol, die ΔG Werte für Dimere (Self-dimer) über -6 kcal/mol. Für die Sonden ABSgla1S-3S, FUSoxy1S, FUSsol1S, PEN2S und MAL2S wurden Dimer-Werte von -6,3 bis -10,36 kcal/mol toleriert, für die Sonden FUSoxy4S, FUSoxy2S, FUSsol1S, CHA1S, MUC-RHI1S und MUC-RHI2S mussten hairpin-Werte von -0,28 bis -0,9 kcal/mol akzeptiert werden.

Beim Vergleich der Genbanksequenzen stellte sich heraus, dass unter einem Speziennamen teilweise mehrere Subspezies zusammengefasst werden. Diese können sich in ihren Sequenzen sehr ähneln, wie die 52 *formae speciales* von *Fusarium oxysporum*, die durch die 5 Sonden FUSoxy1S/AS bis FUSoxy5S/AS abgedeckt werden konnten. Sie können aber auch sehr unterschiedlich sein, wie die vier Unterformen von *Mucor hiemalis* oder *Acremonium strictum*, für die einzelne Sonden entworfen werden mussten.

Von *Cunninghamella blakesleeana* wurde in der Genbank bisher nur eine Sequenz veröffentlicht, was nicht ausreichte, um eine Speziessonde zu entwickeln. *Saccharomyces cerevisiae* und *Alternaria alternata* entstammen sehr homogenen Gruppen, sodass keine Sondensequenz gefunden werden konnte, die diese Spezies gegen andere Vertreter ihrer Gruppe abgrenzt. Für alle drei Spezies wurden also nur Gruppensonden entworfen.

Die Gruppen *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Aureobasidium* und *Cryptococcus* sind dagegen so heterogen, dass keine Sondensequenz gefunden werden konnte, die alle Spezies als Gruppensonde abgedeckt hätte, weshalb lediglich Speziessonden für die Zielspezies aus diesen Gruppen entwickelt wurden.

Die bereits vorhandenen *Aspergillus*- und *Candida*-Speziessonden wurden durch sechs weitere ergänzt: für *Aspergillus fumigatus* Afum-fla-nig1S/AS und Afum-

Ergebnisse

ter1S/AS, für *Aspergillus niger* Anig3S/AS, für *Candida glabrata* Cgla2S/AS, für *Candida krusei* Ckru2S/AS und für *Candida tropicalis* Ctro2S/AS.

Da die *Aspergillus*-Gruppensonde ASP1S/AS sich als sehr unspezifisch herausgestellt hat wurde für die *Aspergillus sp.* außerdem eine weitere Gruppensonde entwickelt (ASP-EME1S/AS), die neben *Aspergillus sp.* nur noch die eng verwandte Gruppe *Emericella sp.* abdeckt.

Die Prozesskontroll-Sonden PC1AS und PC3AS von Leinberger (2004) wurden in dieser Funktion übernommen, konnten aber nicht mehr als interner Standard verwendet werden, da mit der neuen Array-Version auch Mischungen verschiedener Spezies erkannt werden sollten.

Als interner Standard wurden deshalb zwei Sonden für die ITS-Region der Tiefseehefe *Rhodospodium sphaerocarpum* entwickelt (PK4S/AS und PK5S/AS, siehe Kapitel 3.1.5).

Um hohe Signale bei möglichst geringem Verbrauch von fluoreszenzmarkierter *Rhodospodium*-DNS zu erreichen, wurde die PK4 Sonde, die in den ersten Versuchen die höheren Signale gezeigt hatte, verlängert und ersetzte in der zweiten Array-Version als PK6S/AS die schwächere PK5 Sonde.

An folgenden Sonden konnten in den ersten Versuchen Kreuzhybridisierungen beobachtet werden: Die *Candida*-Gruppensonden CAN1S/AS und CAN2S/AS waren aufgrund ihrer Lage im 5,8S Gen zu unspezifisch. Spezifischere Gruppensonden konnten aber aufgrund der Heterogenität der *Candida*-Gruppe nicht gefunden werden, weshalb die zweite Array-Version keine *Candida*-Gruppensonde mehr enthält. Die *Malassezia*-Gruppensonde MAL1S/AS wurde durch die überarbeitete Sonde MAL2S/AS ersetzt, die *Trichoderma*-Gruppensonde TRI1S/AS durch TRI2S/AS und TRI3S/AS. Die Speziessonden für *Aspergillus versicolor*, *Trichoderma longibrachiatum* und *Rhizomucor pusillus* (Aver-syd-nid1S/AS, TRllon1S/AS und RHlpus1S/AS) wurden auf dem Array belassen, aber jeweils durch eine zweite Version ergänzt.

Im Anhang befindet sich eine Tabelle mit den Details zu allen Sonden.

Ergebnisse

3.1.5 Interner Standard

Bevor *Rhodospiridium sphaerocarpum* als interner Standard eingeführt werden konnte, mussten Kreuzhybridisierungen ausgeschlossen werden. Außerdem sollte die einzusetzende Menge an *Rhodospiridium*-DNS so eingestellt werden, dass später die relativen Intensitäten der spezifischen Signale möglichst nahe bei 100% liegen. Die absolute Intensität der *Rhodospiridium*-Sondensignale sollte also im Bereich der absoluten Intensität der spezifischen Sondensignale aller auf dem Microarray vorhandenen Spezies liegen.

Um etwaige Kreuzhybridisierungen zu entdecken, wurde die *Rhodospiridium*-DNS zunächst allein (ohne Zielspezies) hybridisiert. Dabei zeigten sich leichte Kreuzsignale auf den, bereits als zu unspezifisch erkannten (siehe Kapitel 3.1.4), Sonden MAL1 und CAN2AS. Das Signal der MAL1 lag dabei deutlich unter der ersten cutoff-Grenze von 300 Einheiten, das der CAN2AS-Sonde mit 319 nur knapp oberhalb.

Für die erste Array-Version Chip 2.0 wurden die zwei *Rhodospiridium-sphaerocarpum*-Sonden PK4 und PK5 entworfen.

Während die PK4-*antisense*-Sonde, bei 0,3 pmol eingesetzter DNS, Signale im Bereich von 35.000 Intensitätseinheiten aufwies und damit deutlich über der durchschnittlichen Intensität der spezifischen Signale der Referenzspezies von etwa 20.000 lag, zeigten die PK5-Sonden keine oder nur sehr schwache Hybridisierungen. Die Intensität der Sondensignale schwankte stark zwischen den einzelnen Subarrays, was zu einer hohen Standardabweichung führte.

Im Rahmen des Redesigns wurde die PK5-Sonde durch eine verlängerte Version der PK4-Sonde (PK6AS) ersetzt. Die Verlängerung sollte die Hybridisierungseffizienz der Sonde weiter erhöhen und auf diese Weise hohe Signale bei geringem DNS Bedarf ermöglichen.

Die *Candida*-Gruppensonde CAN2AS wurde nicht in die neue Version Chip 2.1 übernommen, die *Malassezia*-Gruppensonde MAL1S wurde neu entworfen.

Der Test auf dem veränderten Microarray zeigte keine Kreuzhybridisierungen mehr. Das Signal der PK6AS-Sonde war etwa doppelt so stark wie das PK4AS-Signal. Da

Ergebnisse

bereits der Versuch mit dem alten Layout nahegelegt hatte, dass eine geringere Menge *Rhodospiridium-sphaerocarpum*-DNS ausreichen sollte, um Signalstärken im Bereich der spezifischen Sonden zu erreichen, wurde dieser Versuch mit 0,1; 0,15 und 0,2 pmol durchgeführt (siehe Abbildung 12). In allen weiteren Versuchen wurden 0,15 pmol *Rhodospiridium-sphaerocarpum*-DNS verwendet.

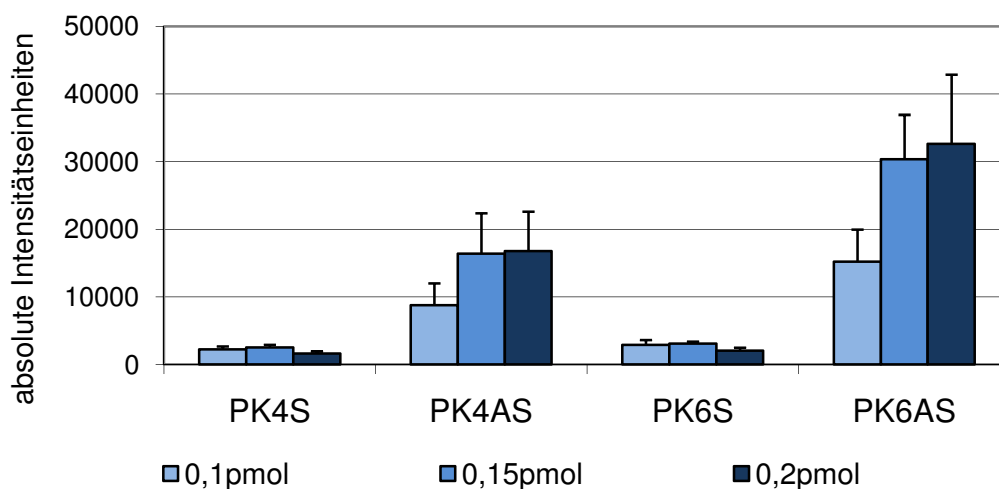


Abbildung 12: Auswirkung unterschiedlicher Konzentrationen an *Rhodospiridium-sphaerocarpum*-DNS auf die Signalstärken der Sonden des internen Standards

Darstellung in absoluten Intensitätseinheiten, Hybridisierung: 2x SSPE, 0,001% SDS, denaturierte DNS, 53°C, 2h

3.1.6 Auswertung

Zur Auswertung wurden die hybridisierten Arrays gescannt (ScanArray Express Version 2.2.0.0022, Perkin Elmer Lifesciences, Boston, USA). Dabei konnten verschiedene Intensitäten (PMT-Werte) eingestellt werden. Je höher der PMT-Wert, desto höher wurden auch die absoluten Signale (siehe Abbildung 13). Die auf den Internen Standard (PK6AS) bezogenen relativen Signale blieben weitgehend konstant, solange das Signal des internen Standards nicht in den Bereich der Sättigung fiel (siehe Abbildung 14). Die relativen Signale von Arrays, die mit unterschiedlichem

Ergebnisse

PMT-Wert gescannt wurden, können also miteinander verglichen werden. Die meisten Arrays wurden dennoch einheitlich bei PMT 50 ausgewertet.

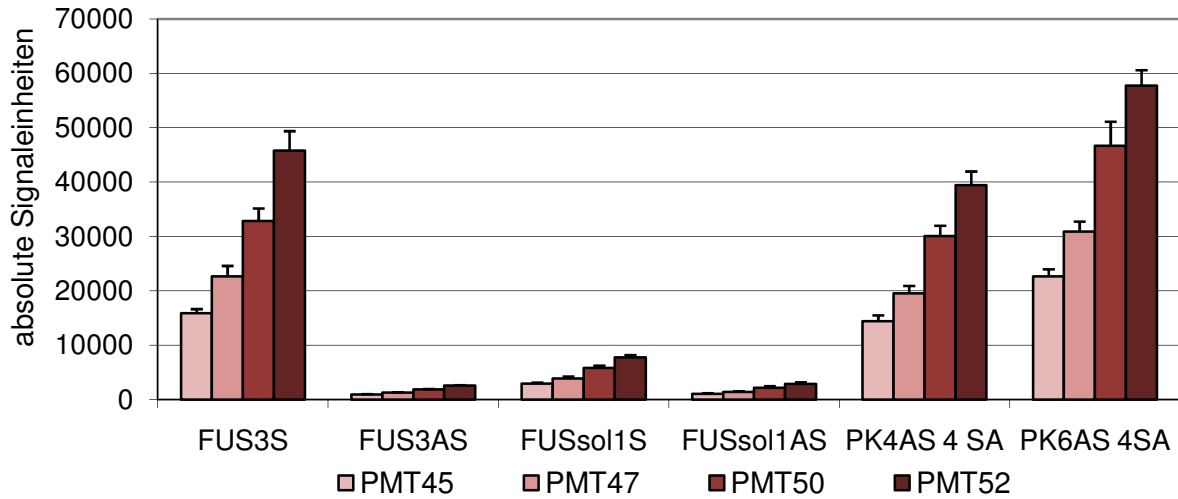


Abbildung 13: Auswirkung der Scanintensität auf die absolute Signalintensität am Beispiel *Fusarium solani*

Dargestellt in absoluten Intensitätseinheiten, Hybridisierung: denaturierte DNS, 2x SSPE, 0,001%SDS, 53°C, 2h

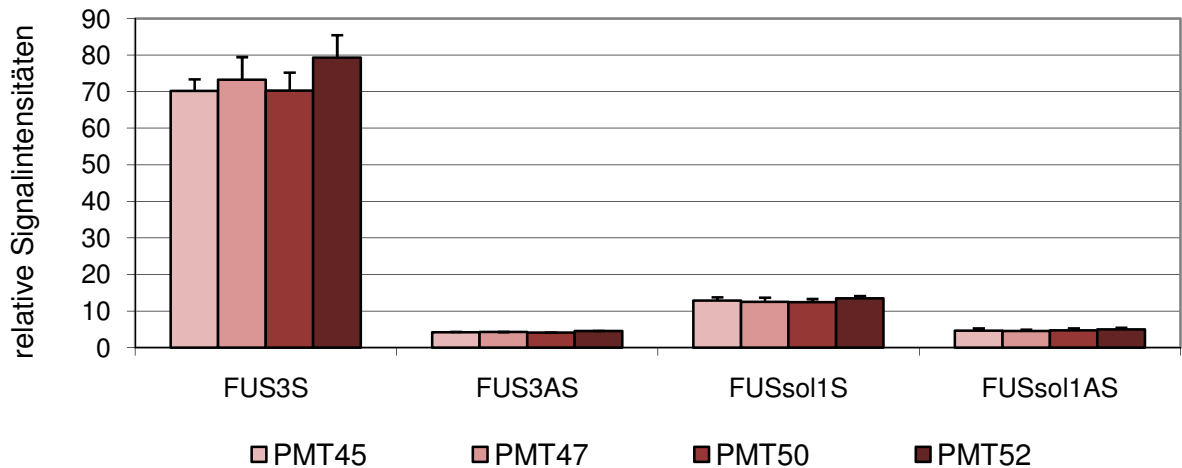


Abbildung 14: Auswirkung der Scanintensität auf die relative Signalintensität am Beispiel *Fusarium solani*

Intensität relativ zu PK6AS in % dargestellt, Hybridisierung: denaturierte DNS, 2x SSPE, 0,001%SDS, 53°C, 2h

Ergebnisse

3.2 Validierung

3.2.1 Hybridisierung von Pilzproben

3.2.1.1 Referenzstämme

Alle 40 Referenzstämme wurden unter den zuvor optimierten Bedingungen getestet: 0,3 pmol denaturierte DNS, 0,15 pmol Interner Standard, 2x SSPE und 0,1% SDS im Hybridisierungsansatz, Hybridisierung für zwei Stunden bei 53 °C.

Im Folgenden werden die Ergebnisse nach Pilzgruppen geordnet dargestellt:

Die *Candida*-Spezies bildeten mit acht Vertretern die größte Gruppe auf dem Array: *Candida albicans*, *Candida dubliensis*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondi*, *Candida krusei*, *Candida lusitaniae*, *Candida parapsilosis* und *Candida tropicalis*. Wie bereits beschrieben, enthält der Array keine *Candida*-Gruppensonde. Es konnten aber alle acht Referenzstämme eindeutig über die Speziessonden identifiziert werden. Die jeweils höchsten relativen Signale bewegten sich dabei zwischen 21% (Clus1AS) und 116% (Calb1AS). Sie zeigten keine Kreuzhybridisierungen, weder untereinander noch mit den Sonden für neu hinzugekommene Spezies (siehe Abbildung 15).

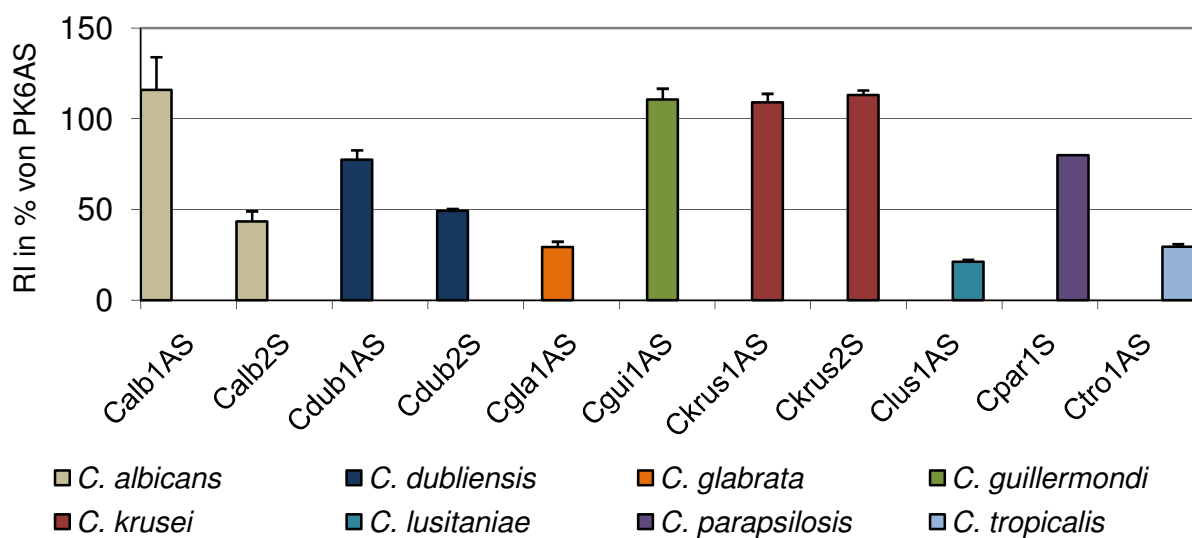


Abbildung 15: die Referenzstämme der *Candida*-Gruppe

Intensität relativ zu PK6AS in % dargestellt, Sondenauswahl für die Abbildung durch zweiten cutoff bei 15%

Ergebnisse

Die *Aspergillus*-Gruppe war mit fünf Spezies vertreten: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* und *Aspergillus versicolor*. Die relativen Signale der Gruppensonden erreichten nicht bei allen Spezies den zweiten cutoff-Wert von 15%. Die neu entworfene Gruppensonde ASP-EME1S/AS erreichte als höchstes Signal 9%. Auch das höchste Kreuzhybridisierungssignal (*Aspergillus fumigatus* auf ALT1S) blieb mit 5% deutlich unter dem zweiten *cutoff*. Über die Speziessonden, von denen je Spezies mindestens zwei Signale von deutlich über 15% abgaben, wurden alle fünf Spezies eindeutig erkannt (siehe Abbildung 16).

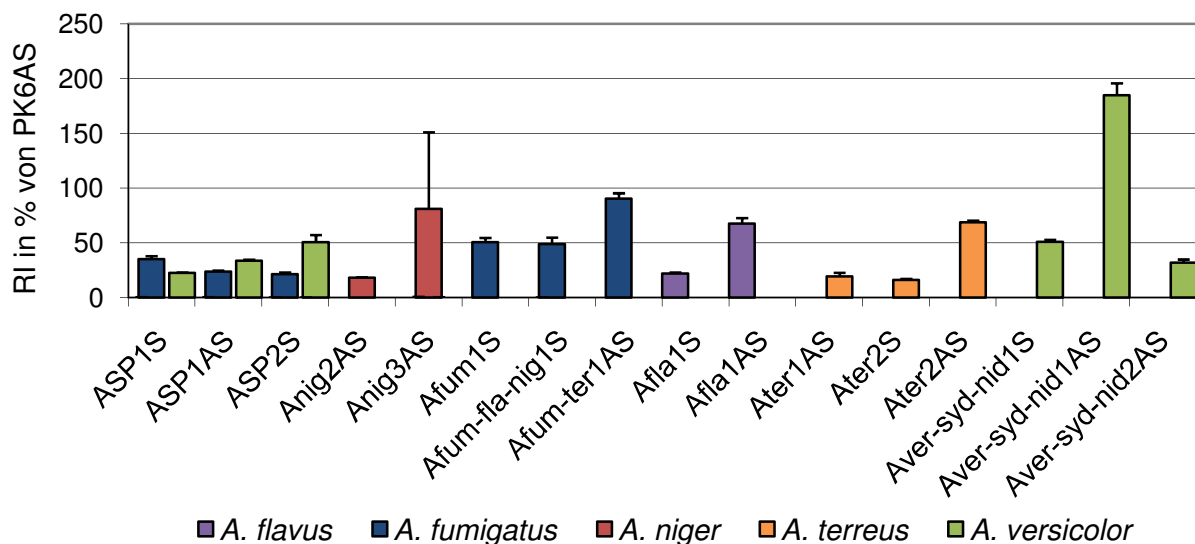


Abbildung 16: die Referenzstämme der *Aspergillus*-Gruppe

Intensität relativ zu PK6AS in % dargestellt, Sondenauswahl für die Abbildung durch zweiten cutoff bei 15%

Die beiden Vertreter der *Paecilomyces*-Gruppe, *Paecilomyces variotii* und *Paecilomyces lilacinus*, wurden nicht durch eine Gruppensonde repräsentiert, zeigten aber starke speziesspezifische Signale. *Paecilomyces variotii* reagierte recht stark (24%) mit der unspezifischen *Aspergillus*-Gruppensonde ASP1S (siehe Abbildung 17).

Ergebnisse

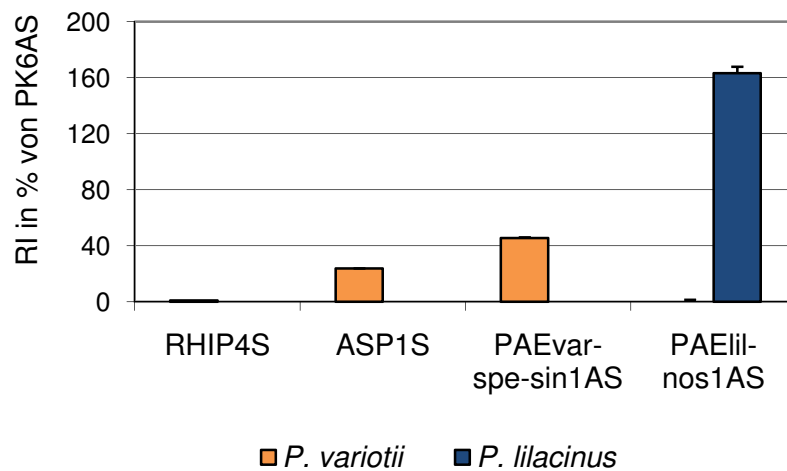


Abbildung 17: die Referenzstämme der Paecilomyces-Gruppe
Intensität relativ zu PK6AS in % dargestellt

Von den vier *Penicillium*-Spezies *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium citrinum* und *Penicillium expansum* erzeugten nur die ersten beiden signifikante Signale auf der Gruppensonde PEN1AS. Alle vier reagierten etwa gleich stark mit der ASP1AS-Sonde (22-28%). Bis auf *Penicillium citrinum* zeigten die Spezies untereinander Kreuzhybridisierungen bis 38% (*Penicillium expansum* auf PENaur-chr1S). Das jeweilige richtig positive, speziesspezifische Signal lag mit 86-114% aber deutlich darüber (siehe Abbildung 18).

Ergebnisse

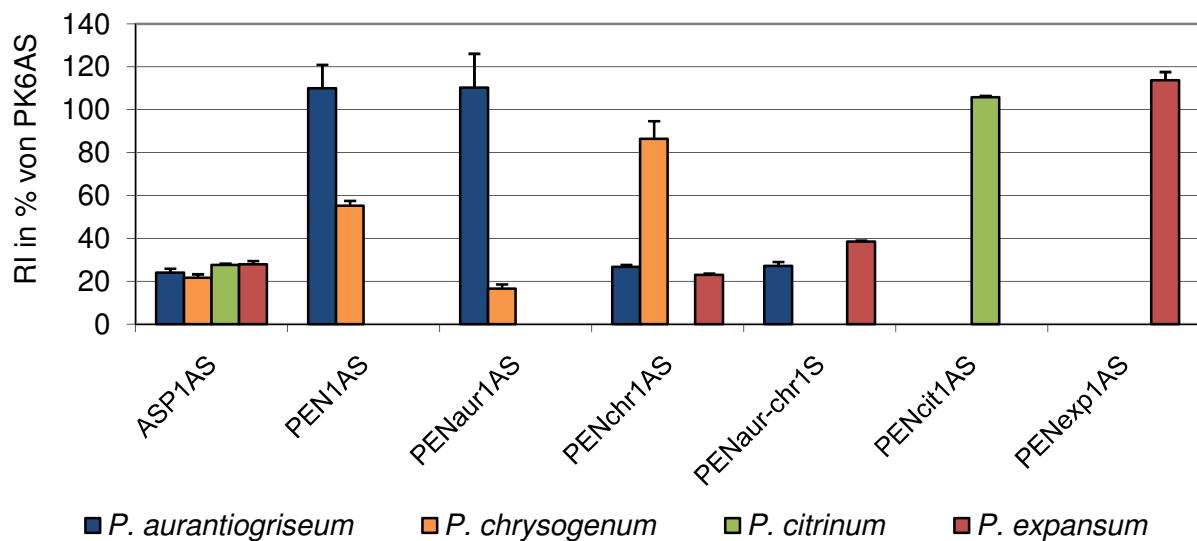


Abbildung 18: die Referenzstämme der *Penicillium*-Gruppe

Intensität relativ zu PK6AS in % dargestellt, Sondenauswahl für die Abbildung durch zweiten cutoff bei 15%

Die *Fusarium*-Gruppe wurde durch zwei Spezies repräsentiert: Während *Fusarium oxysporum* über die starken Signale von einer Gruppensonde und drei Speziessonden eindeutig definiert wurde, lag das stärkste speziesspezifische Signal für *Fusarium solani* mit 12% (FUSsol1S) nur 1% über dem Kreuzhybridisierungssignal von *Trichoderma viride* mit derselben Sonde. Das stärkste gruppenspezifische Signal war aber mit 70% (FUS3S) deutlich und auf einer anderen Gruppensonde lokalisiert als die zweite Kreuzhybridisierung von *Trichoderma viride* (5% auf FUS1S). Die *Fusarium*-Spezies selbst zeigten keine Kreuzhybridisierungen (siehe Abbildung 19). Die beiden *Trichoderma*-Spezies (*Trichoderma viride* und *Trichoderma longibrachiatum*) reagierten neben den gerade beschriebenen Kreuzhybridisierungen auch mit der ASP1AS-Sonde (28 und 34%). Mit 75% (TRI3AS) bis 143%(TRLvir1AS) fielen die spezifischen Signale aber deutlich stärker aus (siehe Abbildung 19).

Ergebnisse

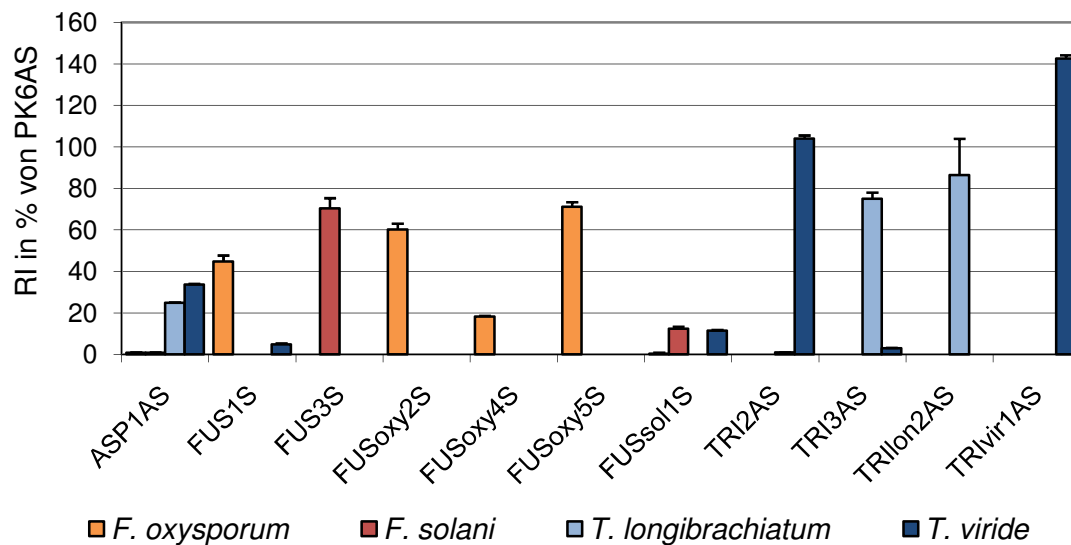


Abbildung 19: die Referenzstämme der Gruppen Fusarium und Trichoderma
Intensität relativ zu PK6AS in % dargestellt

Die Familie der Zygomyceten ist durch sechs Spezies aus fünf Gruppen auf dem Microarray vertreten: *Absidia corymbifera*, *Absidia glauca*, *Cunninghamella blakesleeana*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor hiemalis* und *Rhizomucor pusillus*. *Absidia corymbifera* reagierte zwar nicht mit der Gruppensonde, dafür betrug das stärkste speziesspezifische Signal 114% (ABScor2S). *Absidia glauca* zeigte sowohl auf der Gruppensonde ABS-CUN1AS als auch auf der Speziessonde ABSgla1AS deutliche Signale. Für *Cunninghamella blakesleeana* konnte keine Speziessonde entworfen werden. Diese Spezies erzeugte Signale auf den Gruppensonden CUN (51%) und ABS-CUN1AS (7%). Kreuzhybridisierungen zeigten sich bei keinem dieser drei Referenzstämme (siehe Abbildung 20). *Rhizopus oryzae* reagierte sowohl mit der Speziessonde RHIP3S (41%) als auch mit der *Rhizopus*-Gruppensonde RHIP1AS (83%) deutlich. Es zeigten sich leichte Kreuzhybridisierungen (1%) mit verschiedenen Sonden. Für *Rhizomucor pusillus* betrug das höchste speziesspezifische Signal 93% (RHlpus1S), das höchste gruppenspezifische Signal 38% (RHlmih_pus1AS). *Mucor hiemalis* reagierte mit keiner der speziesspezifischen Sonden, zeigte aber als einzige

Ergebnisse

Spezies ein eindeutiges Signal auf der Gruppensonde MUC-RHI1S (58%) (siehe Abbildung 21).

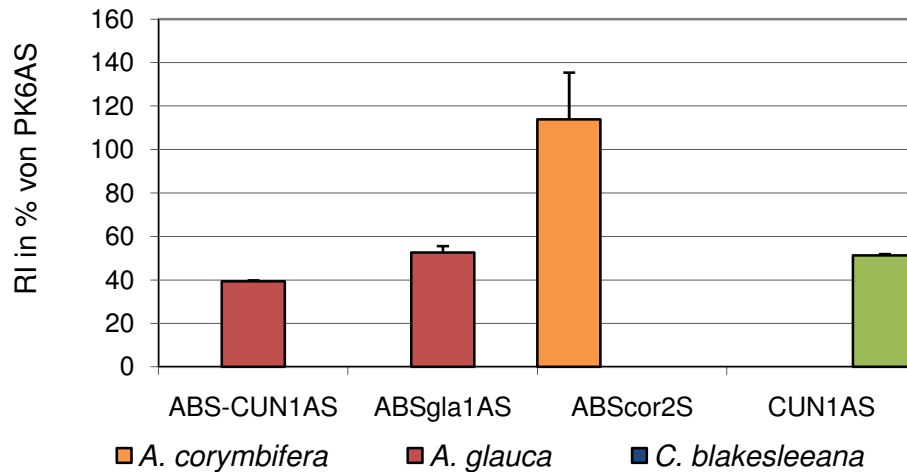


Abbildung 20: die Referenzstämme der Gruppen *Absidia* und *Cunninghamella*

Intensität relativ zu PK6AS in % dargestellt, Sondenauswahl für die Abbildung durch zweiten cutoff bei 15%

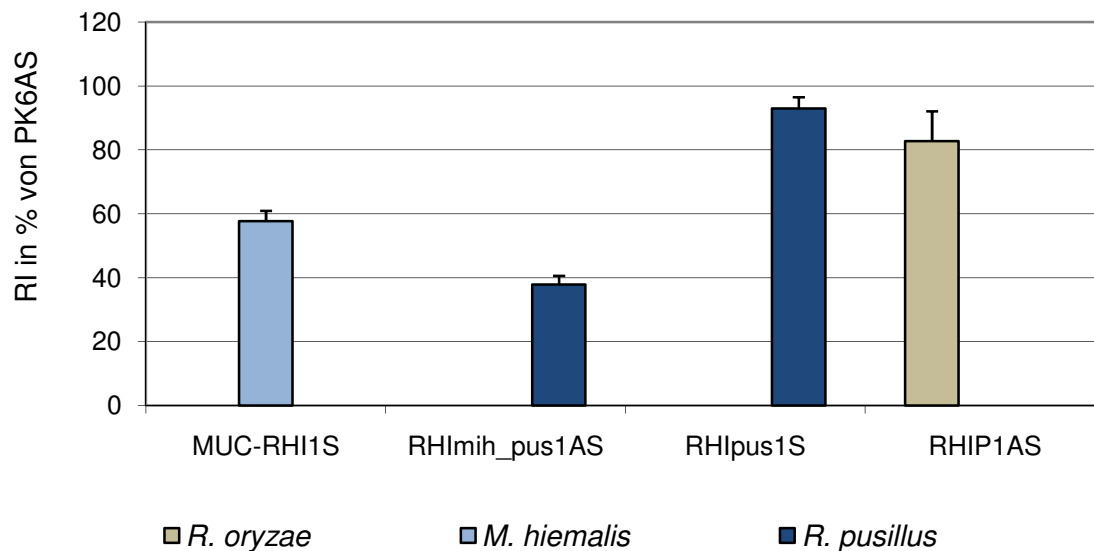


Abbildung 21: die Referenzstämme aus der Gruppe der Zygomyceten: *Rhizopus oryzae*, *Mucor hiemalis* und *Rhizomucor pusillus*

Intensität relativ zu PK6AS in % dargestellt, Sondenauswahl für die Abbildung durch zweiten cutoff bei 15%

Ergebnisse

Die beiden Spezies *Cryptococcus neoformans* und *Malassezia furfur* sind die einzigen Vertreter ihrer jeweiligen Gruppe auf dem Array. Beide werden der Familie der Basidiomyceten zugerechnet. Für *Cryptococcus neoformans* konnte nur eine Speziessonde entworfen werden, für *Malassezia furfur* sowohl eine Spezies- als auch eine Gruppensonde. Alle drei Sonden reagierten stark mit ihrer Zielspezies (52% bis 151%). Kreuzhybridisierungen waren nicht zu beobachten (siehe Abbildung 22).

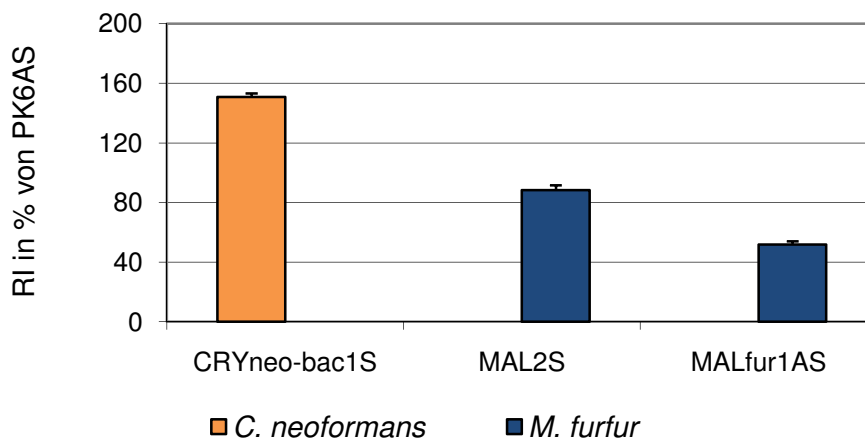


Abbildung 22: die Basidiomyceten Referenzstämme *Cryptococcus neoformans* und *Malassezia furfur*

Intensität relativ zu PK6AS in % dargestellt, Sondenauswahl für die Abbildung durch zweiten cut off bei 15%

Die bisher noch nicht besprochenen Ascomyzeten *Acremonium chrysogenum*, *Acremonium strictum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Chaetomium globosum*, *Aureobasidium pullulans* und *Alternaria alternata* zeigten jeweils auf ihrer Gruppen- bzw. Speziessonde das stärkste Signal. Die *Acremonium* Spezies reagierten zusätzlich mit der, bereits als zu unspezifisch erkannten, Sonde ASP1AS. *Acremonium strictum* erzeugte außerdem Kreuzhybridisierungen bis zu 13% mit den *Cladosporidium*-Sonden (siehe Abbildung X).

Cladosporium herbarum und *Cladosporium cladosporioides* reagierten weitgehend identisch mit den Gruppensonden CLA1 und CLA2. Die speziesspezifische Sonde CLAcla1AS zeigte für *Cladosporium cladosporioides* das stärkere Signal (siehe Abbildung 23).

Ergebnisse

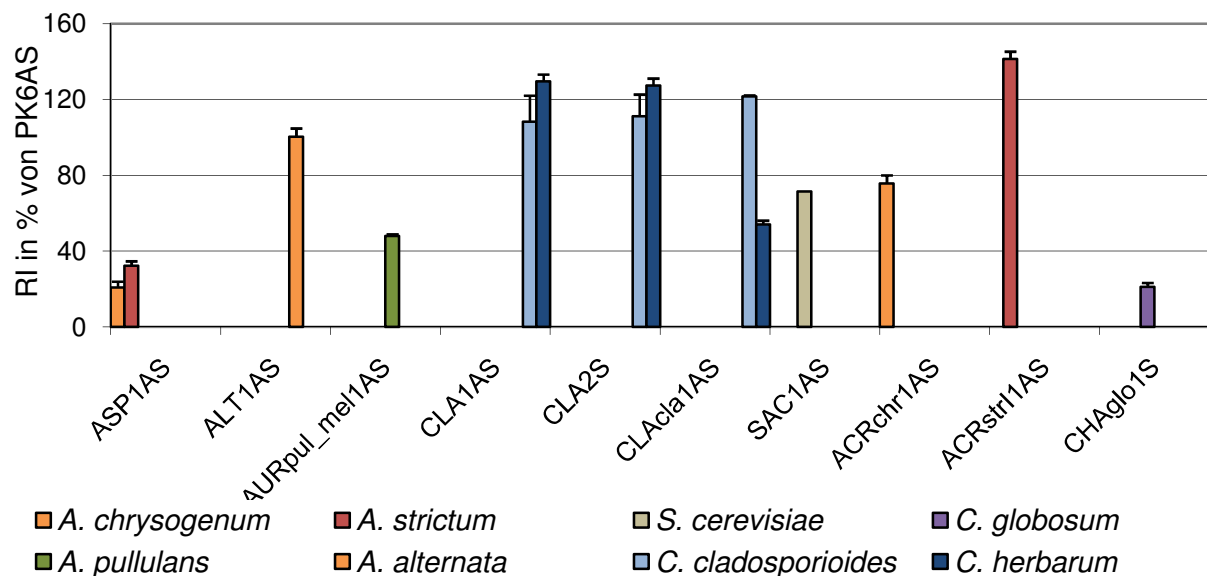


Abbildung 23: alle weiteren Referenzstäme der Familie der Ascomyceten

Intensität relativ zu PK6AS in % dargestellt, Sondenauswahl für die Abbildung durch zweiten cutoff bei 15%

Zusammenfassend lässt sich Folgendes festhalten:

Alle Spezies wurden eindeutig über ein charakteristisches Sondenset identifiziert. Die *Aspergillus*-Gruppensonde ASP1S/AS reagierte mit vielen Spezies unterschiedlicher Gruppen und war damit zu unspezifisch für den Microarray geworden. Kreuzhybridisierungen betragen in der Regel höchstens 13% während jeweils mindestens ein spezifisches Signal deutlich über diesem Wert lag. Zur Unterscheidung zwischen richtig und falsch positiven Signalen wurde deshalb ein zweiter cutoff bei 15% festgelegt. Die sehr eng verwandten Spezies der *Penicillium*-Gruppe zeigten Kreuzhybridisierungen bis 38%. Hier wurde zusätzlich ein individueller *cutoff* angewandt.

3.2.1.2 klinische Isolate

Die 48 klinischen Isolate wurden in gleicher Weise wie die Referenzstäme bearbeitet und ausgewertet.

Unter den 48 Proben fanden sich 42 Zielspezies. Für fünf Spezies waren keine Sonden auf dem Array vorhanden. Sie erzeugten kein Signal, also keine Kreuzhybridisie-

Ergebnisse

rungen (*C. norvegensis*, *C. pelliculosa*, *C. kefyr*, *Wangiella sp.*, *Syncephalastrum sp.*). Die Probe VB 8765/06, die morphologisch als *Aspergillus*-Spezies identifiziert wurde, erzeugte nur auf den relativ unspezifischen *Aspergillus*-Gruppensonden (ASP1S/AS, ASP2S) ein Signal, konnte also nicht bestimmt werden. Die Sequenzierung mit anschließendem Datenbankabgleich, die für jedes klinische Isolat durchgeführt wurde, ergab *Aspergillus nidulans*, also keine Zielspezies. Die restlichen 42 Proben konnten zum Großteil (74%) auf Speziesebene bestimmt werden. In sechs Fällen bedeutete dies eine Differenzierung der morphologischen Diagnose. Eine Verschlechterung der Diagnose um eine Ebene im Vergleich zur Morphologie oder ein Widerspruch zur Sequenzierung wurde nicht beobachtet. Die stärksten Kreuzhybridisierungen betrugen 2 %. 16 der 48 klinischen Isolate waren *Aspergillus fumigatus* Proben, 12 gehörten zur Familie der Zygomyceten.

Tabelle 19 im Anhang zeigt die Ergebnisse für jedes einzelne klinische Isolat. Die Abbildungen 24 und 25 zeigen die Auswertung mit Hilfe der Referenzstämme am Beispiel von Spezies, die durch den Array genauer identifiziert werden konnten als durch die morphologische Diagnostik. Zur besseren Übersicht wurde das Hybridisierungsmuster der Referenzstämme in Grautönen, die Signale der klinischen Isolate dagegen farbig gehalten. Abbildung 26 zeigt die Auswertung der Spezies *Mucor* und *Rhizomucor*, für die keine Referenzstamm-DNS isoliert werden konnte.

Ergebnisse

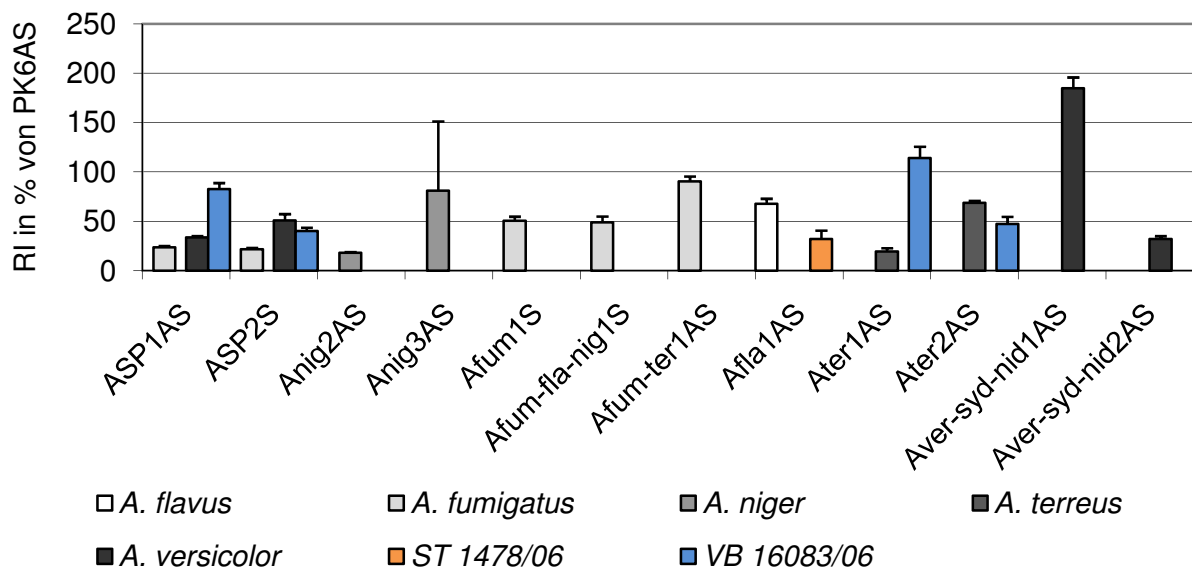


Abbildung 24: klinische Isolate aus der *Aspergillus*-Gruppe, die durch den Array genauer identifiziert werden konnten, im Vergleich mit den Referenzstämmen

Intensität relativ zu PK6AS in % dargestellt, Sondenauswahl für die Abbildung durch zweiten cutoff bei 15%. ST 1478/06 wurde als *Aspergillus flavus* erkannt, VB 16083/06 als *Aspergillus terreus*.

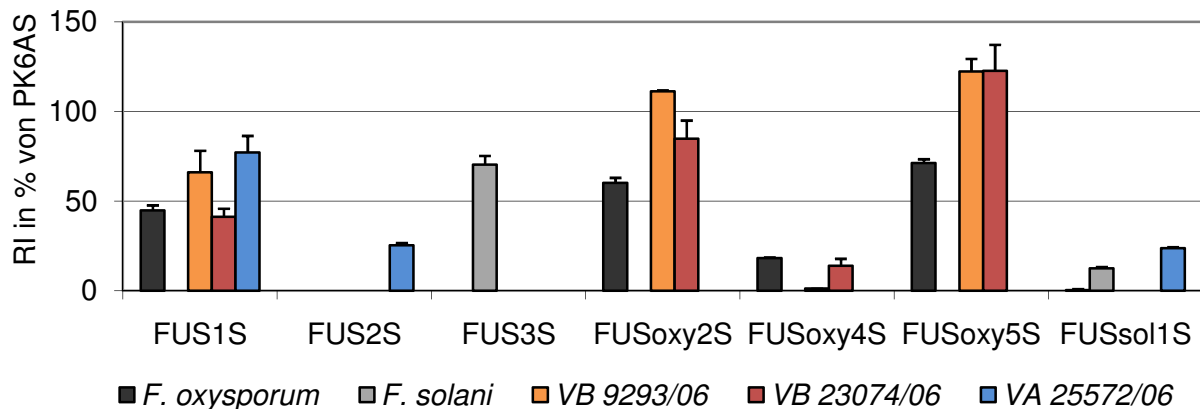


Abbildung 25: klinische Isolate der *Fusarium*-Gruppe im Vergleich mit den *Fusarium*-Referenzstämmen

Intensität relativ zu PK6AS in % dargestellt, Sondenauswahl für die Abbildung durch zweiten cutoff bei 15%. VB 9293/06 und VB 23074/06 wurden als *Fusarium oxysporum* erkannt, VA 25572/06 als *Fusarium solani*.

Ergebnisse

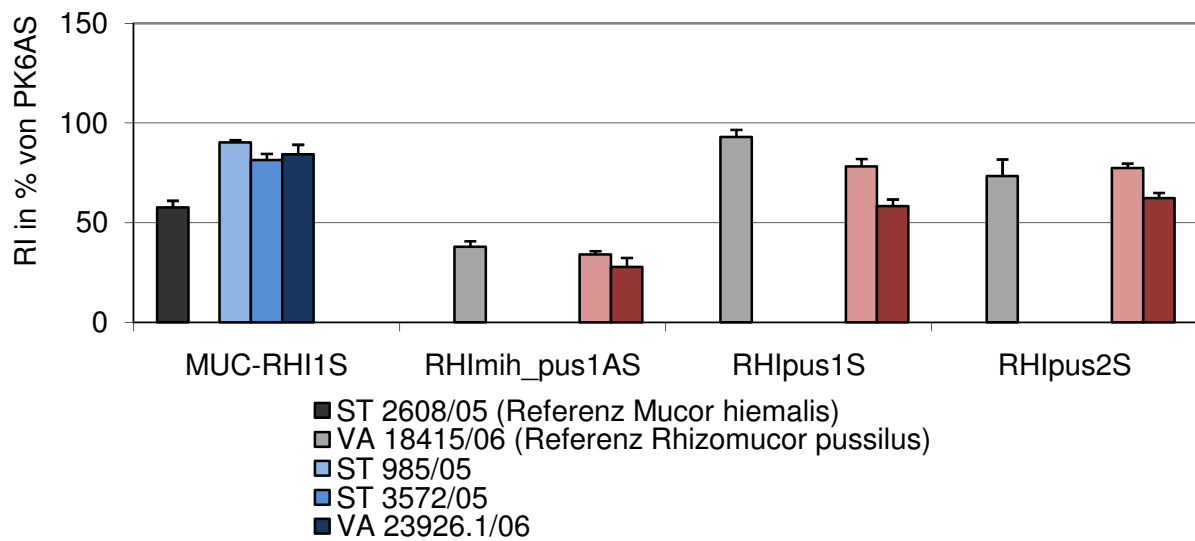


Abbildung 26: klinische Isolate der Spezies *Mucor hiemalis* und *Rhizomucor pussilus*
Intensität relativ zu PK6AS in % dargestellt, Sondenauswahl für die Abbildung durch zweiten cutoff bei 15%. ST 985/05, ST 3572/05 und VA 23926.1/06 wurden als *Mucor* erkannt, VA 28047/00 und VA 102986/04 als *Rhizomucor pussilus*.

3.2.1.3 Mischungen

Für den Mischungsversuch wurde die markierte DNS der beiden Zielspezies *Trichoderma viride* und *Fusarium solani* in definierten Mischungsverhältnissen eingesetzt.

Die *Fusarium*-Gruppensonde FUSsol1S wies dabei schwankende Werte auf, unabhängig vom Mischungsverhältnis der beiden Spezies. Die Höhe des Kreuzhybridisierungssignals von *Trichoderma viride* auf dieser Sonde entsprach in etwa der des richtig positiven Signals von *Fusarium solani*.

Die ebenfalls bekannte Kreuzhybridisierung von *Trichoderma viride* mit der *Aspergillus*-Gruppensonde ASP1S/AS dagegen stieg mit zunehmender *Trichoderma viride*-Konzentration.

Die beiden Gruppensonden FUS3S und TRI2AS spiegelten gut die verschiedenen Mischungsverhältnisse. Auch die unterschiedliche Hybridisierungseffizienz der beiden Spezies zeigte sich in ihnen: die gleiche Menge DNS erzeugt bei *Trichoderma viride* jedes Mal das höhere Signal (siehe Abbildung 27).

Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich also Folgendes festhalten: *Fusarium solani* konnte in einer Mischung mit *Trichoderma viride* nicht als Spezies erkannt werden. Es wurde aber angezeigt, dass eine *Fusarium*-Spezies enthalten sein musste, die durch die Gruppensonde FUS3S abgedeckt war. *Trichoderma viride* ließ sich in einer Mischung mit *Fusarium solani* bis zu einem Mischungsanteil von 10% eindeutig nachweisen. Die Intensität der Sondersignale hing direkt von der Menge an eingesetzter DNS ab. Der Array konnte die einzelnen Bestandteile einer Mischung detektieren, bis zu einem gewissen Grad auch das Mengenverhältnis.

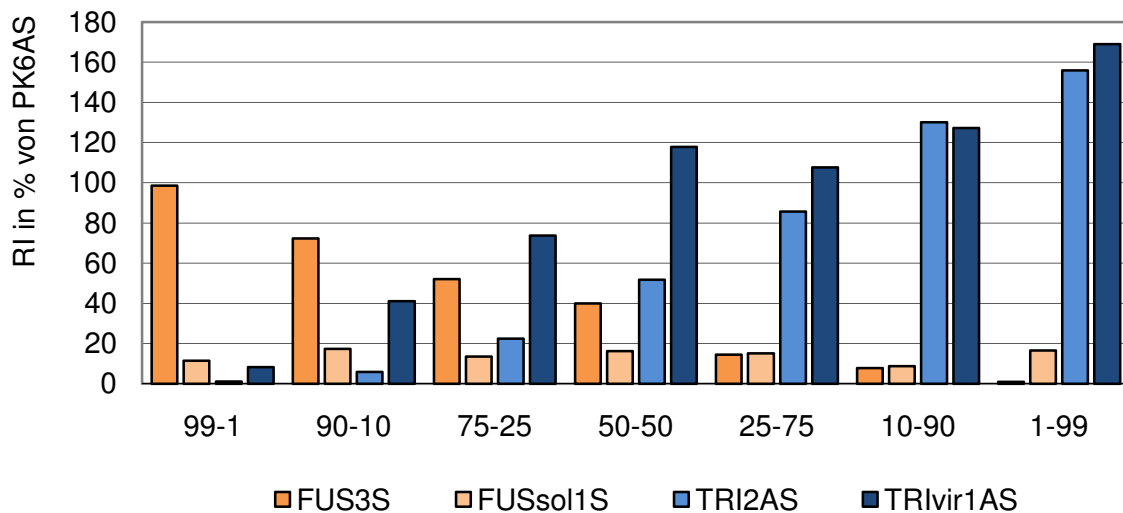


Abbildung 27: Auswirkung verschiedener Mischungsverhältnisse der Spezies *Fusarium solani* und *Trichoderma viride* in % auf die Signalintensität
Intensität relativ zu PK6AS in % dargestellt

3.2.2 Sensitivität

3.2.2.1 Konidienverdünnung

Obwohl in der Markierungs-PCR nur 15% der isolierten DNS (30 µl) eingesetzt werden konnten, zeigte sich in der Gelelektrophorese bei jeder Verdünnungsstufe, also bis 10 Konidien/ml, eine Bande. Bei der Vermessung der aufgereinigten PCR-Produkte enthielten die Proben, in die 10^4 Konidien oder mehr eingesetzt worden waren, so viel DNS, dass für die Hybridisierung, genau wie bei den bisherigen Proben,

Ergebnisse

100 ng abgemessen werden konnten. Von den stärker verdünnten Proben wurden jeweils 25 µl aufgereinigtes PCR-Produkt für die Hybridisierung eingesetzt.

Bei der Auswertung fiel auf, dass sowohl bei den stark verdünnten Proben, als auch bei der Negativkontrolle der PCR, mehrere *Rhizomucor*-Sonden Signale zeigten. Die höher konzentrierten Proben, von denen also nur wenige µl eingesetzt wurden, und auch die Negativkontrolle der Extraktion, die in einer späteren PCR fluoreszenzmarkiert wurde, zeigten diese Signale nicht (Abbildung 28). *Aspergillus fumigatus* hatte bisher auch keine Kreuzhybridisierungen mit *Rhizomucor*-Sonden gezeigt. Dies alles lässt darauf schließen, dass die Markierungs PCR mit *Rhizomucor*-DNS, die am selben Tag verarbeitet worden war, kontaminiert wurde.

Beide Negativkontrollen zeigten kein *Aspergillus*-Signal. Das erste signifikante Signal zeigte die Sonde Afum-ter1AS in der Verdünnungsstufe 10^2 , also bei 100 eingesetzten Konidien, (1440 ± 78 absolute Intensitätseinheiten bei PMT50, bzw. $4,5 \pm 0,2$ % von PK6AS). 1000 eingesetzte Konidien führten bereits zu einem relativen Signal dieser Sonde von $39,6 \pm 5,4$ % von PK6AS (siehe Abbildung 29).

Ergebnisse

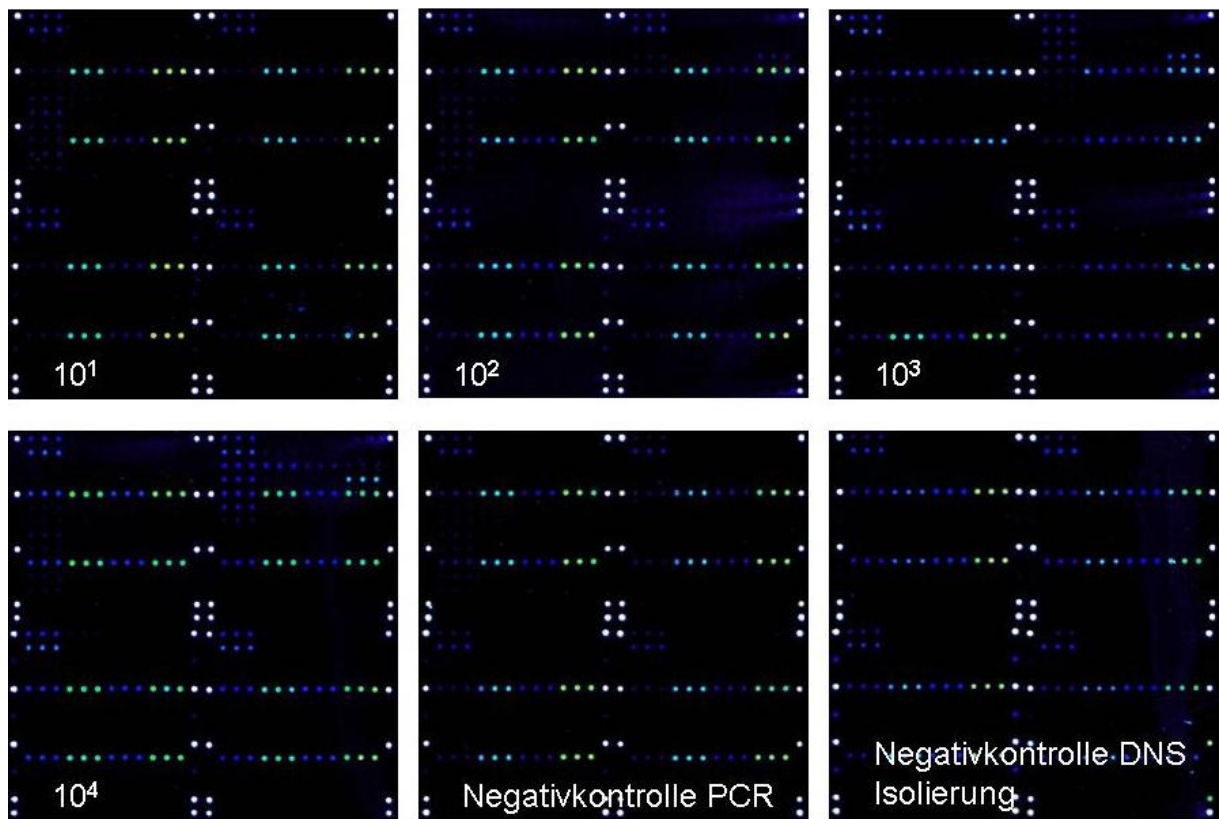


Abbildung 28: Arrayphotos der Konidienverdünnungsreihe (*A. fumigatus*)

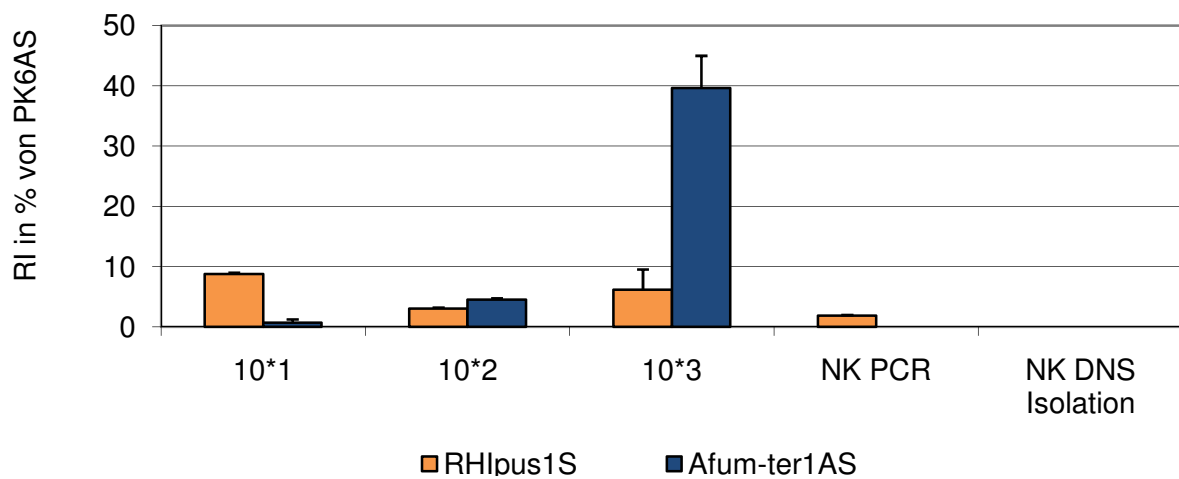


Abbildung 29: Kondienverdünnungsreihe

Aspergillus fumigatus, Intensität relativ zu PK6AS in % dargestellt, für die Abbildung wurden jeweils die stärkste spezifische Sonde für *Aspergillus fumigatus* und die Kontamination *Rhizomucor pusillus* ausgewählt

Ergebnisse

3.2.2.2 DNS-Verdünnung

Diese Versuchsreihe sollte *A.fumigatus*-DNS in Verdünnungsstufen von 33 ng DNS/ μ l bis 33 fg DNS/ μ l, entsprechend 10^6 bis 10^0 Genomen, enthalten. Im Laufe des Experimentes fiel jedoch folgender Fehler auf: Von jeder Verdünnungsstufe wurden 10 μ l für den PCR-Ansatz verwendet. Die höchste Konzentrationsstufe enthielt also 10^7 Genome, dafür fehlte die höchste Verdünnungsstufe, in der nur noch 1 Genom (10^0) enthalten sein sollte. Für eine Wiederholung fehlte das nötige Material. Bis 10 Genome blieb das Experiment dennoch aussagekräftig.

Es wurde vermutet, dass fluoreszenzmarkierte Nukleotide die Sensitivität der PCR beeinträchtigen könnten. Um dies zu untersuchen, wurde die Verdünnungsreihe parallel in einer Markierungs-PCR und einer einfachen PCR amplifiziert. Die Auswertung mittels Agarose-Gelelektrophorese zeigte aber in beiden Fällen eindeutige Bänder bis zu einer Konzentration von 1000 Genomen (siehe Abbildung 30).

Ergebnisse

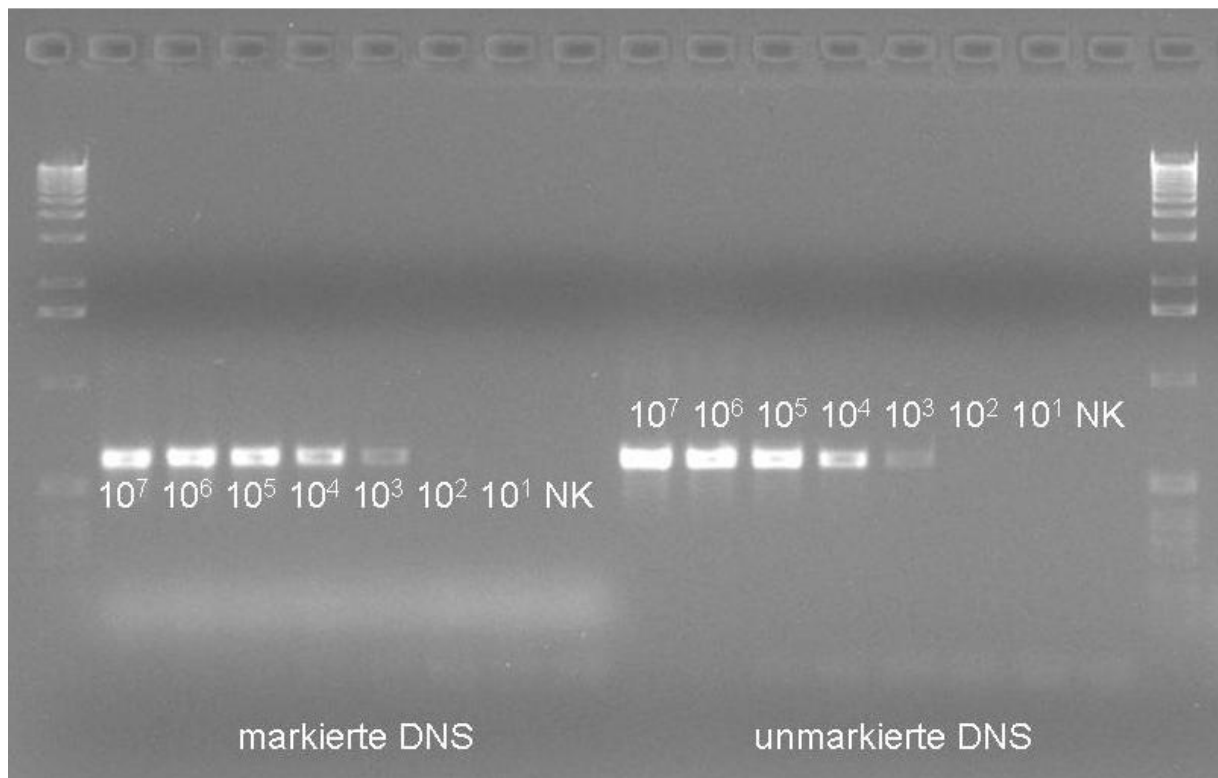


Abbildung 30: Agarose-Gelelektrophorese nach der DNS-Verdünnungsreihe mit markierter und unmarkierter DNS

Die Verdünnungsstufe 10^3 entspricht 1000 Genomen oder 33 pg *Aspergillus fumigatus* DNS.

Der Array zeigte schon nach der Hybridisierung der Lösung, in die nur 10 Genome eingesetzt worden waren, ein eindeutiges Signal der Sonde Afum-ter1AS, die auch bei der Konidienverdünnung das stärkste Signale aufwies (2421 ± 362 absolute Signalintensität bzw. $7,47 \pm 1,12\%$ von PK6AS). Der Einsatz von 3,3 pg DNS (100 Genome) ergab bereits ein Signal dieser Sonde von $40,35 \pm 2,66\%$ von PK6AS. 33 pg DNS wurden in der PCR zu soviel DNS amplifiziert, dass für die Hybridisierung 100 ng abgemessen werden konnten.

330 fg ($3,3 \times 10^{-4}$ ng oder 10 Kopien des Genoms) *A.fumigatus*-DNS reichten also aus, um auf dem Array ein speziesspezifisches Signal zu erzielen (siehe Abbildung 31).

Ergebnisse

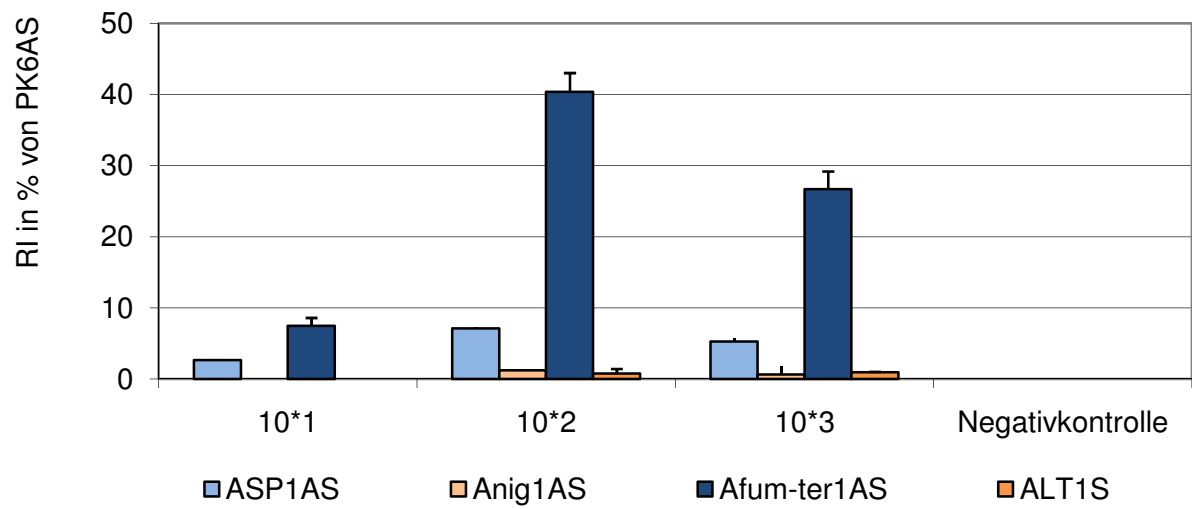


Abbildung 31: DNS-Verdünnungsreihe

Aspergillus fumigatus, Intensität relativ zu PK6AS in % dargestellt, für die Abbildung wurden die stärkste Gruppensonde, die stärkste speziesspezifische Sonde und alle Kreuzhybridisierungen ausgewählt

4 Diskussion

4.1 Etablierung

4.1.1 Isolierung der DNS

Die DNS-Isolierung aus Pilzzellen ist arbeitsintensiver, langwieriger und weniger ergiebig als die Isolierung menschlicher, viraler oder bakterieller DNS (Löffler, 1997a). Durch die DNS-Extraktion nach einem Protokoll von Löffler (unveröffentlicht) konnte, gegenüber der bisher in Tübingen verwendeten Methode (Leinberger, 2004), auf eine Inkubation über Nacht verzichtet werden und auch die weitere Arbeitszeit für die DNS-Isolierung wurde von vier Stunden auf eine Stunde verkürzt. Die dabei erreichte DNS-Konzentration von etwa zehn bis einhundert Nanogramm pro Mikroliter erwies sich als gut geeignet für die weitere Verwendung in der PCR. Die Sensitivitätstestung mittels Konidienverdünnung zeigte in der Gelelektrophorese nach PCR eine Bande bei 10 Konidien/ml, der kleinsten Verdünnungsstufe. Damit lieferte das verwendete Extraktionsprotokoll, im Vergleich mit anderen beschriebenen Methoden (Löffler, 1997a; Huang, 2006), deutlich schnellere Ergebnisse bei vergleichbarer Sensitivität. Schwierigkeiten bei der DNS-Extraktion aus *Aspergillus niger* Zellen sind ein bekanntes Problem (Löffler, 1997a).

In dieser Arbeit wurde auf Versuche zur Pilz-DNS-Extraktion aus Blutproben verzichtet. In verschiedenen Artikeln wurde aber bereits über erfolgreiche Versuche berichtet. Während bei Huang (Huang, 2006) lediglich die Extraktion aus präparierten Proben erfolgreich war, zeigte Löffler (Löffler, 1997a) bereits 1997 positive Ergebnisse bei der DNS-Extraktion aus Blutproben von neutropenischen Patienten mit Fieber und Verdacht auf eine Pilzinfektion.

4.1.2 Optimierung der Markierungs-PCR

Neben der Isolierung der DNS aus den Pilzzellen stellen die Sensitivität der Vervielfältigungsmethode und die Effizienz der DNS-Markierung die entscheidenden Schritte für die Sensitivität des gesamten Systems dar. Aufgrund des hohen GC-Gehaltes der ITS-Region wurde vermutet, dass die Verwendung eines speziell auf dieses Problem ausgerichteten PCR Systems, wie der Advantage GC-Genomic PCR (Clontech, Mountain View, USA) oder der GC-Rich PCR (Roche, Mannheim, Deutschland), die Sensitivität der Markierungs-PCR erhöht. Dies konnte nicht bestätigt werden, denn die höchste Amplifizierungsrate zeigte die zur Kontrolle eingesetzte Taq-DNA-Polymerase (Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

Einige Arbeitsgruppen führten Amplifizierung und Markierung der DNS in zwei getrennten Reaktionen durch (Booth, 2003, Volokhov, 2003). Sie arbeiteten außerdem mit ssDNS, was sich jedoch negativ auf die Sensitivität auswirkte (Booth, 2003).

In dieser Arbeit wurde, wie auch bei Leinberger beschrieben (Leinberger, 2004), dsDNS verwendet, die in einem Arbeitsschritt gleichzeitig amplifiziert und markiert wurde.

Die dadurch erreichte Sensitivität und Markierungseffizienz (Einbaurate) waren ausreichend, um bei der Validierung mit Referenzstämmen und klinischen Isolaten in jedem Fall die, im Hybridisierungsprotokoll festgelegte, Menge von 0,3pmol DNS auf dem Microarray nachweisen zu können. Die Nachweisgrenze wird in Kapitel 4.2.2 beschrieben.

4.1.3 Optimierung der Hybridisierungsbedingungen

4.1.3.1 Vergleich von Denaturierung und Fragmentierung

Das Produkt der in dieser Arbeit durchgeführten Markierungs- und Amplifizierungs-PCR ist doppelsträngige DNS (dsDNS). Um die Hybridisierung mit den Sonden zu effektivieren, kann diese zu einzelsträngiger DNS (ssDNS) denatu-

Diskussion

riert werden. Je länger jedoch ein einzelsträngiges DNS-Fragment ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Sekundärstrukturen, wie Haarnadelstrukturen, innerhalb des Stranges, die die Effizienz der Hybridisierung und damit die Sensitivität herabsetzen könnten.

Bei der enzymatischen Fragmentierung schneidet ein Enzym, in diesem Fall DNase I, die DNS in kleinere Fragmente wodurch diese Gefahr vermindert und die Sensitivität der Hybridisierung verbessert werden soll (Ahrendt, 1999; Gentry, 2006).

In der Arbeit von Leinberger (Leinberger, 2004) zeigte sich jedoch nach der Fragmentierung eine deutliche Verminderung der Sensitivität gegenüber der Denaturierung, weshalb die Denaturierung als Standardverfahren gewählt wurde. In dieser Arbeit wurde die Auswirkung der Fragmentierung an folgenden Spezies überprüft: *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus oryzae* und *Rhodosporidium sphaerocarpum*.

Auch dieser Test ergab für alle getesteten Spezies eine verminderte Sensitivität und Spezifität der Signale nach Fragmentierung im Vergleich zu den denaturierten Proben, die Denaturierung wurde also als Standard beibehalten.

4.1.3.2 SSPE-Konzentration

Die von Leinberger (2004) verwendete Hybridisierungslösung enthielt sechsfach konzentrierten SSPE-Puffer. Inzwischen hatte sich aber in weiteren Experimenten der Arbeitsgruppe am ITB in Stuttgart gezeigt, dass der Einsatz von zweifach konzentriertem SSPE und zusätzlich 0,001% SDS zu stärkerer Stringenz, d.h. höherer Spezifität, führt. Da stringente Bedingungen für jedes System, das auf dem Prinzip der Hybridisierung beruht, ein entscheidender Faktor sind (Gentry, 2006), wurden diese beiden Zusammensetzungen im Rahmen der Optimierung der Hybridisierungsbedingungen einander gegenübergestellt. Die Verbesserung der Spezifität konnte bestätigt werden. Sie überwog die gleich-

Diskussion

zeitig beobachtete leichte Abnahme der Sensitivität und führte zur Aufnahme von 2x SSPE und 0,001% SDS in das Hybridisierungsprotokoll.

4.1.3.3 Hybridisierungstemperatur

Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung der Hybridisierungsbedingungen war die Variation der Hybridisierungstemperatur. Ziel war es, bei möglichst hoher Sensitivität die bestmögliche Spezies-Diskriminierung zu erreichen. Dazu sollte die Hybridisierungstemperatur im Bereich der Schmelztemperatur der Sonden liegen, in dieser Arbeit also zwischen 49°C und 55°C. Bei niedrigeren Temperaturen war zu erwarten, dass die Sonden leichter Bindungen eingehen würden und damit zwar die Sensitivität stiege aber auch nicht perfekt passende DNS binden würde, was zu einem Anstieg falsch positiver Signale führen würde. Bei höheren Temperaturen sollte es dagegen zu einem Abfall der Sensitivität kommen, da die Sonden dann auch perfekt passende DNS schlechter binden könnten.

In dieser Arbeit wurde der Temperaturbereich von 49°C bis 55°C an drei Spezies überprüft. Bei 55°C zeigte sich der zu erwartende Abfall der Sensitivität, bei 49°C traten verstärkt Kreuzhybridisierungen auf. Da zwischen 51°C und 53°C keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten, wurde unter Berücksichtigung der vorausgegangenen Arbeit (Leinberger, 2004), welche die optimale Hybridisierungstemperatur bei 53°C sah, die Temperatur von 53°C auch in dieser Arbeit als Standard festgelegt.

4.1.3.4 SDS-Konzentration

Durch das Herabsetzen der SSPE Konzentration und die Versuche zur Hybridisierungstemperatur wurden ausreichend stringente Hybridisierungsbedingungen gefunden. In einer weiteren Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob eine Erhöhung der Konzentration des neu eingeführten SDS die Sensitivität verbessern, das heißt zu höheren absoluten Signalen führen würde, ohne im Gegenzug die Spezies-Diskriminierung wieder zu verschlechtern.

Diskussion

Exemplarisch wurden die Spezies *Fusarium oxysporum* und *Acremonium strictum* ausgewählt.

Fusarium oxysporum wurde ausgewählt, um den Einfluss des SDS auf die Sensitivität zu untersuchen, da er in den bisherigen Versuchen relativ niedrige spezifische Signale gezeigt hatte.

Acremonium strictum hatte in vorangegangenen Versuchen relativ starke Kreuzhybridisierungen gezeigt. Deshalb sollte an dieser Spezies der Einfluss einer SDS-Erhöhung auf die Spezies-Diskriminierung, also die Spezifität, untersucht werden.

Da die Erhöhung des SDS Anteils von 0,001% auf 0,1% zu einem deutlichen Anstieg der absoluten Signale ohne Einbußen bei der Spezifität führte und eine weitere Erhöhung wieder einen Abfall der Signale bewirkte (siehe Abbildung 11 in Kapitel 3.1.3.4), wurde für alle weiteren Experimente ein SDS-Anteil von 0,1% festgelegt.

4.1.3.5 Hybridisierungsdauer

Beim Einsatz von 0,3 pmol DNS und Einbauraten des Fluoreszenzfarbstoffes zwischen 62 und 150 führte eine Hybridisierung über zwei Stunden zu ausreichend hohen Signalintensitäten für eine eindeutige Speziesidentifizierung. Verschiedene Arbeiten deuten darauf hin, dass diese Dauer ohne relevante Einbußen bei der Sensitivität auf deutlich unter eine Stunde verkürzt werden kann (Grimm, 2004; Yu, 2004).

Aufgrund von Material- und Zeitmangel wurde der Schwerpunkt in dieser Arbeit auf Versuche zur Optimierung der Sensitivität und Spezifität des Microarrays gelegt und auf eine Optimierung der Hybridisierungsdauer verzichtet.

4.1.4 Sondendesign

Ziel war es, die Sonden so zu entwerfen, dass alle Spezies und Gruppen zuverlässig erkannt und voneinander unterschieden werden konnten. Um dieses

Diskussion

Ziel zu erreichen, musste das bei Behr (2000) beschriebene Mehrsondenkonzept angewandt werden. Eine Spezies oder Gruppe konnte also oft nicht durch eine Sonde repräsentiert werden, sondern wurde durch ein spezifisches Hybridisierungsmuster an reagierenden und nicht reagierenden Sonden von anderen Spezies oder Gruppen abgegrenzt.

Die Sequenzdatenbank *Genbank* enthielt für jede Zielspezies, bis auf *Cunninghamella blakesleeana*, mehrere Sequenzen, die ein robustes Speziessondendesign ermöglichten. Dies galt auch für die meisten Nicht-Zielspezies aus den Zielgruppen, so dass der Entwurf von Gruppensonden ebenfalls gut möglich war.

Die Auswahl der Bereiche ITS1 und ITS2 aus der ribosomalen RNS als Zielregion hat sich bewährt, da in dieser Region sowohl hochkonservierte als auch variable Sequenzen vorkommen, die eine Identifizierung auf verschiedenen Ebenen ermöglichen. Während für die Detektion vieler Pilze die Betrachtung der ITS2 Region ausreicht (Huang, 2006), müssen für die Unterscheidung zwischen sehr eng verwandten Spezies oder Gruppen, wie z.B. zwischen *Aspergillus sp.* und *Penicillium sp.* Die ITS1- und die ITS2-Region herangezogen werden (Henry, 2000).

Das Design der in dieser Arbeit verwendeten Sonden ist bei Neugebauer (Neugebauer, 2007) genau beschrieben.

4.1.5 Interner Standard

Die bereits vorhandenen Kontrollsonden konnten anzeigen, ob das Drucken der Sonden auf den Array (Druckkontrolle, SC) und die Hybridisierung (positive Hybridisierungskontrolle, PC) erfolgreich waren. Die Prozesskontrolle (PK) entsprach einer, über alle Pilz-Spezies hinweg, konservierten Genomregion und reagierte daher mit der DNS jeder Spezies. Ein Signal dieser Sonde bestätigte, dass bindungsfähige, fluoreszierende Pilz DNS auf den Array gegeben wurde (Leinberger, 2004).

Diskussion

Der Interne Standard sollte folgende Aufgaben erfüllen: Es sollten relative Signale gebildet werden können, indem die absoluten Signale anderer Sonden auf das Signal der Standardsonde bezogen werden. Desweiteren sollte der Einsatz eines Internen Standards die Abgrenzung falsch positiver Reaktionen von signifikanten Signalen durch einen cutoff bei einer bestimmten relativen Signalintensität ermöglichen.

Da der Microarray auch Mischinfektionen erkennen sollte, war die Prozesskontrolle als Interner Standard nicht mehr geeignet. Die Signale der verschiedenen Spezies hätten sich an der Prozesskontrolle addiert, während die absoluten Signale an den speziesspezifischen Sonden gleich geblieben wären. Somit wären, insbesondere bei Pilzmischungen, die relativen Signale der einzelnen Spezies nicht mehr mit denen anderer Experimente vergleichbar gewesen. Es hätte auch passieren können, dass das Signal der Prozesskontrolle gesättigt vorgelegen hätte, während die absoluten Signale einzelner Spezies gerade erkennbar gewesen wären, wodurch sich keine sinnvollen relativen Signale mehr hätten bilden lassen.

Ziel war es daher, einen Internen Standard zu finden, dessen Signalstärke unabhängig von der Anzahl der hybridisierten Spezies und deren Mischungsverhältnis war. Die Sonden des Internen Standards durften also nicht mit der Ziel-DNS hybridisieren sondern mussten spezifisch für eine neu einzuführende Spezies sein, deren gelabelte DNS jeder Hybridisierung in einer definierten Menge zugegeben werden sollte. Diese Spezies sollte einerseits in GC-Gehalt und Fragmentlänge (und damit in ihrem Hybridisierungsverhalten) den Zielspezies möglichst ähnlich sein, andererseits durfte sie aber mit keiner gruppen- oder speziesspezifischen Sonde kreuzhybridisieren wie auch keine Ziel-DNS mit der neuen Standardsonde reagieren durfte.

Die ITS1- und ITS2-Region der Spezies *Rhodosporidium sphaerocarpum*, einer Hefe aus der antarktischen Tiefsee, erfüllte diese Bedingungen: Der Pilz spielt in der hiesigen Umwelt und der klinischen Mikrobiologie keine Rolle und ist ta-

Diskussion

onomisch nur entfernt verwandt mit den Zielspezies des Arrays, während die Fragmentlänge seiner ITS-Region mit 650bp im Durchschnitt der Zielspezies liegt.

Die auf diese Weise aus Mischungen gewonnenen relativen Signalintensitäten können mit den relativen Signalen verglichen werden, die die Referenzstämme der einzelnen Spezies bei einer definierten Menge eingesetzter DNS (0,3 pmol) erzielt haben. Dies erlaubt eine gewisse Aussage über die bei der Hybridisierung vorhandenen Mengen DNS der verschiedenen Mischungsbestandteile.

Sie geben jedoch keine Auskunft über das Mengenverhältnis der verschiedenen Spezies der Mischinfektion, wie zum Beispiel die Konzentration der einzelnen Pilze in Blut oder Gewebe, da auch mit dieser Methode nicht untersucht werden kann, wie das Vorhandensein der einen Spezies das Verhalten der anderen bei der DNS-Isolierung und in der Markierungs-PCR beeinflusst. Dieses Problem würde auch nicht behoben werden, wenn bereits zur DNS-Isolierung *Rhodospodium sphaerocarpum* zugegeben würde, da sich auch der Einfluss dieses Pilzes auf die erwähnten Vorgänge einer Untersuchung entzieht.

Über die Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen mit einem Internen Standard dieser Art wurden bisher keine Vergleichsdaten veröffentlicht.

4.2 Validierung

4.2.1 Hybridisierung von Pilzproben

4.2.1.1 Referenzstämme

Ziel der Zusammenstellung war es, auf einem Microarray neben allen klinisch relevanten Verursachern invasiver Mykosen auch solche Pilze abzubilden, die in der Umwelt weit verbreitet sind. Diese können als potente Allergene oder Mykotoxinproduzenten (Bush, 2006; Hope, 2007), aber auch als Schädlinge, z.B. in der Landwirtschaft (Nicolaison, 2005) oder durch den Befall von Baustoffen und Kunstwerken Probleme bereiten (Frössel, 2003). Oder aber sie

Diskussion

treten als Kontamination in Patientenproben auf und müssen von einer invasiven Infektion unterschieden werden.

Häufigste Verursacher invasiver Mykosen sind Vertreter der Gruppen *Candida* und *Aspergillus*, gefolgt von *Penicillium*. Immer häufiger werden aber auch Infektionen mit selteneren Erregern wie *Fusarium oxysporum* und *-solani* oder aus der Gruppe der Zygomyceten, wie *Absidia*-, *Rhizopus*- oder *Rhizomucor* *sp.*, beobachtet, besonders bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen (Shao, 2007). Dagegen spricht ein Nachweis von *Saccharomyces cerevisiae* (Backhefe) für eine Kontamination. Neben den Genannten wurden einige Spezies, wie *Aspergillus versicolor*, aufgrund ihrer Relevanz in der Denkmalpflege oder als Umweltkeime aufgenommen. Dadurch wird dieser Microarray auch für Anwender außerhalb der Medizin interessant, zum Beispiel zur Untersuchung der Raumbelastung mit Schimmelpilzen.

Der erste veröffentlichte Microarray zur Pilzdiagnostik (Leinberger, 2004) war in der Lage, vier *Candida*- und acht *Aspergillus*-Spezies zu unterscheiden. Huang und Kollegen (Huang, 2006) stellten 2006 ein Modell vor, dass neben acht Spezies von Leinberger zwölf weitere identifizieren konnte. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Microarray ist mit Sonden für die zwölf Spezies von Leinberger und 28 weitere Spezies ausgestattet, wobei sich diese 28 nur in der Spezies *Cryptococcus neoformans* mit den bei Huang neu hinzugekommenen Stämmen überschneiden. Nicolaisen et al. (Nicolaisen, 2005) entwickelten einen Microarray zur Identifizierung verschiedener *Fusarium*-Spezies, darunter auch die beiden in dieser Arbeit erfassten. Zusätzlich können dank der Identifikation über Spezies- und Gruppensonden auch alle weiteren Vertreter aus 15 Pilzgruppen auf Gruppenebene bestimmt werden.

Für jede Spezies wurde ein Referenzstamm aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen (DSMZ) ausgewählt und getestet. Die Versuche mit diesen Proben sollten zeigen, ob die Spezies durch die Sonden erkannt werden, bei welchen Spezies und in welchem Ausmaß es zu Kreuzhybridisierungen kommt

Diskussion

und in welcher Höhe ein zweiter cutoff gesetzt werden sollte, um Kreuzhybridisierungen und spezifische Signale voneinander zu trennen. Außerdem sollte für jeden Pilz ein spezifisches Signalmuster gewonnen werden, mit dem später die verblindeten Proben verglichen und so identifiziert werden sollten.

Das Ergebnis der Hybridisierung der Referenzstämme lässt sich folgendermaßen zusammenfassen: Einige Spezies bildeten Kreuzhybridisierungen oder konnten nicht eindeutig durch eine einzige Sonde definiert werden. Mit Hilfe des bereits beschriebenen Mehrsondenkonzeptes (Behr, 2000) und der Einführung eines zweiten cutoffs, der alle relativen Signale unter 15% als nicht signifikant einstuft und auf Null setzte (der erste cutoff löschte bereits alle Signale unter 300 Einheiten als Hintergrundrauschen aus der Auswertung) wurde es aber möglich, jeder Spezies ein spezifisches Muster aus reagierenden Sonden zuzuordnen und sie damit eindeutig von allen anderen Referenzstämmen abzugrenzen.

Das Ziel, alle ausgewählten Spezies mit Hilfe des Microarrays erkennen und voneinander unterscheiden zu können, wurde erreicht.

4.2.1.2 Vergleich der Microarray-basierten Diagnostik mit den Referenzverfahren anhand klinischer Isolate

Da alle Zielspezies durch ein spezifisches Sondenset beschrieben werden konnten, sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob anhand dieser Informationen auch verblindete Proben erkannt werden konnten.

Dazu wurden 48 klinische Isolate in der gleichen Weise wie die Referenzstämme hybridisiert. Parallel wurde jedes Isolat auch morphologisch und mittels Sequenzierung auf seine Spezies untersucht.

Mit Hilfe der morphologischen Diagnostik, zurzeit Standarduntersuchungsmethode in der klinischen Mykologie, konnten alle Isolate auf Gruppenebene, aber nur 52 % auf Speziesebene bestimmt werden. Hinzu kommen Anzuchtzeiten von Tagen bis vereinzelt Wochen (Larone, 2002) und die Tatsache, dass schon

Diskussion

dieses Ergebnis nur dank des Fachwissens der mykologischen Abteilung eines Universitätsklinikums möglich war. Außerdem stellt die Anzucht von humanpathogenen Pilzen eine Gesundheitsgefahr für das Personal dar und muss in einem speziell ausgestatteten Labor stattfinden. Kleinere Labors können also mit dieser kulturbasierten Methode kaum arbeiten.

Die Sequenzierung wurde als Goldstandard zur Bestimmung der Proben verwendet. Durch sie konnten 46 der 48 (96%) Proben auf Speziesebene identifiziert werden. In zwei Fällen ergab sie jedoch kein verwertbares Ergebnis. Die Sequenzierung lieferte damit das genaueste Ergebnis, auch bei seltenen Spezies. Sie offenbarte aber auch Nachteile: diese Methode konnte weder im Tübinger noch im Stuttgarter Labor durchgeführt werden. Die isolierte DNS musste deshalb in einer bestimmten Konzentration an ein auswärtiges Labor weitergeleitet werden. Dies führte zu einer Verzögerung der Diagnosestellung um etwa 5 Tage. Sehr geringe Mengen DNS konnten nicht analysiert werden. Außerdem konnten mittels Sequenzierung nur reine DNS-Lösungen einer Spezies ausgewertet werden. Schon kleine Verunreinigungen durch eine zweite Spezies machten die Lösung unbrauchbar. Die Sequenzierung war also zur Bestimmung von Mischinfektionen nicht geeignet.

Der Microarray kann nur Spezies erkennen, für die er mit den entsprechenden Sonden ausgestattet ist. Deshalb konnten die 5 Nicht-Zielspezies unter den klinischen Proben nicht bestimmt werden. Dass 12 Isolate nur auf Gruppenebene identifiziert werden konnten, hatte einen ähnlichen Grund: Für diese Spezies, wie zum Beispiel *Aspergillus nidulans*, *Penicillium glabrum* oder *Mucor circinelloides*, waren zwar Gruppensonden aber keine speziesspezifischen Sonden auf dem Microarray vorhanden. Ein wichtiges Ergebnis der Hybridisierung dieser 17 Isolate war, dass keine falsch positiven Signale auftraten.

Die 31 Isolate, die bei der Sequenzierung als Zielspezies bestimmt wurden, konnten zu 100% durch den Microarray auf Speziesebene identifiziert werden.

Diskussion

Die Vorteile gegenüber der Morphologie lagen in der wesentlich kürzeren Bearbeitungszeit von etwa sechs Stunden (nach kurzer Anzucht), der erhöhten Genauigkeit der Diagnose und der Möglichkeit der Automatisierung. Die Microarray-basierte Diagnostik wird derzeit in vielen Bereichen der Medizin, neben der Mikrobiologie, etabliert, zum Beispiel in der Virologie (Müller, 2008), der Genetik (Garbarine, 2008) und der Onkologie (Skotheim, 2009). Daher könnte sich die Anschaffung der benötigten Technik bald auch für kleinere Kliniken lohnen. Gegenüber der Sequenzierung bestand der Vorteil hauptsächlich in einer höheren Robustheit der Methode bei geringer DNS-Menge (siehe Kapitel 3.2.2), Verunreinigung der Probe oder Mischinfektionen.

Die Abbildungen 32-34 geben einen Überblick über die Ergebnisse von Morphologie, Sequenzierung und Microarray.

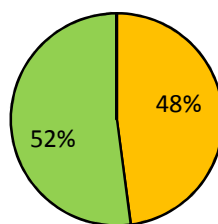
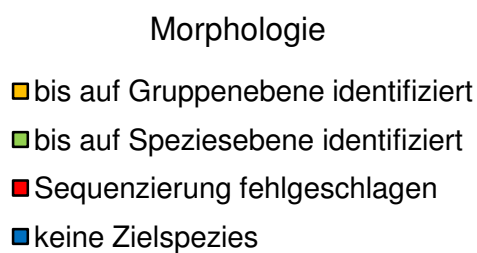


Abbildung 32: Ergebnis der morphologischen Diagnostik

Diskussion

Sequenzierung

- bis auf Gruppenebene identifiziert
- bis auf Speziesebene identifiziert
- Sequenzierung fehlgeschlagen
- keine Zielspezies

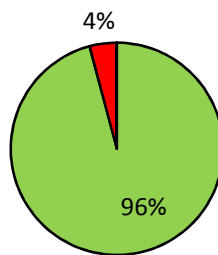


Abbildung 33: Ergebnis der Diagnostik mittels Sequenzierung

Microarray

- bis auf Gruppenebene identifiziert
- bis auf Speziesebene identifiziert
- Sequenzierung fehlgeschlagen
- keine Zielspezies

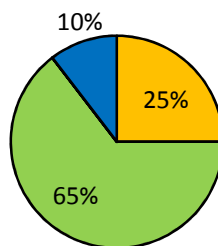


Abbildung 34: Ergebnis der Microarray-basierten Diagnostik

Diskussion

4.2.1.3 Mischungen

Nachdem sich gezeigt hatte, dass mit Hilfe des Arrays jede Zielspezies eindeutig identifiziert werden konnte, sollte nun überprüft werden, ob auch die einzelnen Bestandteile von Mischungen erkannt werden konnten.

Dazu wurde die markierte DNS zweier Zielspezies in definierten Mischungsverhältnissen eingesetzt. Als Spezies wurden *Trichoderma viride* und *Fusarium solani* ausgewählt, da *Trichoderma viride* relativ starke Kreuzhybridisierungen mit der *Fusarium*-Gruppensonde FUS1S und der *Fusarium-solani*-Spezies-sonde FUSsol1S aufwies. *Fusarium solani* andererseits zeigte im Vergleich zu *Trichoderma viride* eine geringere Hybridisierungseffizienz, also niedrigere relative Signale bei gleicher Menge eingesetzte DNS.

Für diesen Versuch wurde bewusst das Speziespaar gewählt, dass in den vorangegangenen Versuchen die stärksten Interaktionen gezeigt hatte. Trotz dieser erschwerten Ausgangsbedingungen wurden die Bestandteile der Mischung, zumindest auf Gruppenebene, erkannt. Auch das Mischungsverhältnis wurde gut erfasst, so dass auf weitere Versuche mit weniger problematischen Spezies verzichtet werden konnte.

Die hiermit belegte Fähigkeit des Microarrays, Mischungen zu diagnostizieren, zeichnet ihn vor allem gegenüber der Diagnostik mittels Sequenzierung aus.

4.2.2 Sensitivität

4.2.2.1 Konidienverdünnung

Trotz der, im Ergebnisteil genauer beschriebenen, Verunreinigung mit *Rhizomucor*-DNS blieb diese Versuchsreihe aussagekräftig. 100 eingesetzte Konidien erzeugten ein relatives Signal von 4,5%, 1000 bereits ein Signal von 39,6% des Internen Standards. Dabei muss beachtet werden, dass aufgrund des festgelegten Arbeitsprotokolls nur 15% der isolierten DNS für die PCR zur Verfügung standen. Die Sensitivität des Systems kann also möglicherweise

Diskussion

durch ein verändertes Isolierungsprotokoll (Lösen der DNS in weniger Elutionspuffer) weiter verbessert werden.

4.2.2.2 DNS-Verdünnung

Bei der Verdünnung der Konidien konnte nicht überprüft werden, welche Menge DNS letztendlich für die Markierungs-PCR verwendet wurde. Um die Sensitivität der PCR und der anschließenden Hybridisierung unabhängig von der DNS-Extraktion genauer beurteilen zu können, wurde in einer zweiten Versuchsreihe die bereits extrahierte DNS verdünnt. Auf diese Weise sollte untersucht werden, welche Menge an DNS im Blut nötig wäre, um bei optimalen Extraktionsbedingungen später ein Signal auf dem Microarray zu erhalten.

Die einzelnen Verdünnungsstufen sollten dabei DNS enthalten, die der Masse von 10^0 bis 10^6 Genomen entspricht. Ein Genom der Spezies *Aspergillus fumigatus* besteht aus etwa 30 Megabasen (Niermann, 2005). Bei einem durchschnittlichen Molargewicht der Nukleotide von 330 g/mol ergibt sich für ein doppelsträngiges Genom von 30 Mb das Molargewicht 19800 g/mol. Dividiert man das Molargewicht durch die Avogadro-Konstante so erhält man als Masse eines *Aspergillus fumigatus* Genoms 33 fg.

Die Vermutung, dass fluoreszenzmarkierte Nukleotide die Sensitivität der PCR negativ beeinflussen (Chizhikov, 2002), konnte nicht bestätigt werden: In der Agarose-Gelelektrophorese war in beiden Fällen bis zu einer Konzentration von 33 pg (1000 Genomen) eine eindeutige Bande zu erkennen, während 3,3 pg (100 Genome) in beiden Fällen keine Bande mehr erzeugen konnten.

Auf dem Microarray ergab die Verdünnungsstufe 3,3 pg bereits ein Signal von 40 % des internen Standards. Auch der Einsatz von 330 fg (10 Genomen) lieferte mit 7,5 % noch ein deutliches Signal. Die Sensitivität des DNS Nachweises mittels Microarray liegt also etwa 100fach über der Sensitivität der Agarose-Gelelektrophorese.

Diskussion

Huang und Kollegen veröffentlichten für den von ihnen entwickelten Microarray eine untere Nachweisgrenze für *Aspergillus fumigatus* von 15 pg DNS/ml nach Extraktion (Huang, 2006). Da sie 2 µl von dieser Lösung, also 330 fg DNS, in der PCR verwendet hatten, entspricht diese Nachweisgrenze dem Ergebnis dieser Arbeit von zehn Genomen.

Ob der Microarray in der Lage gewesen wäre, die DNS eines einzelnen Genoms zu detektieren, konnte leider aufgrund eines Fehlers im Versuchsaufbau nicht untersucht werden. Hierzu wäre eine Wiederholung der Versuchsreihe nötig gewesen, für die aber weder Material noch Zeit zur Verfügung standen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Der 2004 am ITB Stuttgart entwickelte Oligonukleotid-Microarray zur Detektion von humanpathogenen Pilzen (Leinberger, 2004), wurde in dieser Arbeit von 12 Spezies aus 2 Gruppen auf 40 Spezies aus 15 Gruppen erweitert. Ein besonderer Schwerpunkt lag dabei auf den, klinisch immer bedeutsamer werdenden, Zygomyceten, von denen folgende Vertreter aufgenommen wurden: *Absidia corymbifera* und *Absidia glauca*, *Mucor hiemalis*, *Rhizomucor pusillus*, und *Rhizopus oryzae*.

Für die DNS-Extraktion aus den Pilzzellen wurde ein neues Protokoll verwendet, dass die Arbeitszeit von vier auf eine Stunde verkürzte. Das Extraktionsergebnis wurde dadurch nicht beeinträchtigt: Aus allen Spezies konnte DNS in ausreichender Menge isoliert werden. Sollte sich in weiteren Versuchen herausstellen, dass die Sensitivität des gesamten Systems für den direkten Pilznachweis aus Blut- oder Gewebeprobe nicht ausreicht, kann versucht werden, den DNS-Gehalt des Extraktionsproduktes durch den Einsatz einer geringeren Menge Elutionspuffer oder nachträgliche Konzentrierung zu steigern. Nach dem bisherigen Protokoll können nur 15% der isolierten DNS in der PCR verwendet werden.

Um den optimalen Versuchsaufbau zu finden, wurden alle wichtigen Größen variiert: das PCR-Kit, die Konzentration der Hybridisierungspuffer SSPE und SDS, die Hybridisierungstemperatur und die Vorbereitung der DNS auf die Hybridisierung durch Denaturierung oder Fragmentierung. Aufgrund der Ergebnisse dieser Versuche wurden folgende Standardbedingungen für diese Arbeit formuliert: Die Markierungs- und Amplifizierungs-PCR wurde mit der Taq DNA-Polymerase (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Anschließend wurde das PCR Produkt aufgereinigt, denaturiert und bei 53 °C für zwei Stunden hybridisiert. Die Hybridisierungsdauer wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht unter-

Zusammenfassung und Ausblick

sucht. Sollte die weitere Verkürzung der Arbeitszeit aber in Zukunft relevant werden, weisen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (Grimm, 2004; Yu, 2004) darauf hin, dass eine Verkürzung der Hybridisierungsdauer ohne Abstriche bei der Sensitivität möglich ist.

Der Microarray wurde mit Referenzstämmen für alle Zielspezies und zusätzlich 48 klinischen Isolaten validiert. Dabei wurden alle Zielspezies auf Speziesebene identifiziert. War das Isolat keine Zielspezies aber aus einer Zielgruppe des Microarrays, so wurde es auf Gruppenebene erkannt. Nicht-Zielspezies erzeugten keine relevanten Kreuzhybridisierungen.

Die Einführung der Tiefseehefe *Rhodospiridium sphaerocarpum* als Internen Standard ermöglichte es, Mischungen zu identifizieren, relative Signale der einzelnen Spezies zu berechnen und eine näherungsweise Aussage über das Mischungsverhältnis zu treffen.

Die Versuche zur Sensitivität des Microarrays zeigten, dass er in der Lage ist, DNS in der Menge von 10 Genomen zu detektieren. Ob mit dieser Methode der Nachweis eines einzelnen Genoms möglich ist, sollte in weiteren Versuchen überprüft werden.

Eine weitere Validierung des Systems mit Blut- oder Gewebeproben war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Dennoch hat sich der Microarray durch die Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten (Leinberger, 2004; Hsiao, 2005; Huang, 2006) als zuverlässige, schnelle und anpassungsfähige Methode für die mykologische Diagnostik empfohlen.

6 Anhang

6.1 Tabellen

6.1.1 Einbauraten der Referenzstämme

Tabelle 18: Cy3-Einbauraten der Referenzstämme

| Name | DSM / Labornummer | Einbaurate |
|-------------------------------------|-------------------|------------|
| <i>Absidia corymbifera</i> | 1144 | 79 |
| <i>Absidia glauca</i> | 811 | 118 |
| <i>Acremonium chrysogenum</i> | 880 | 131 |
| <i>Acremonium strictum</i> | 3567 | 138 |
| <i>Alternaria alternata</i> | 1102 | 118 |
| <i>Aspergillus flavus</i> | 818 | 135 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | 819 | 62 |
| <i>Aspergillus niger</i> | | 133 |
| <i>Aspergillus terreus</i> | 826 | 102 |
| <i>Aspergillus versicolor</i> | 1943 | 42 |
| <i>Aureobasidium pullulans</i> | 2404 | 63 |
| <i>Candida albicans</i> | 1386 | 111 |
| <i>Candida dubliensis</i> | - | 134 |
| <i>Candida glabrata</i> | - | 110 |
| <i>Candida krusei</i> | 3433 | 86 |
| <i>Candida parapsilosis</i> | 5784 | 176 |
| <i>Candida tropicalis</i> | - | 161 |
| <i>Candida guilliermondi</i> | 6381 | 157 |
| <i>Candida lusitaniae</i> | - | 154 |
| <i>Chaetomium globosum</i> | 1962 | 52 |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> | 62121 | 101 |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 11959 | 114 |
| <i>Cunninghamella blakesleeana</i> | 1906 | 182 |

Anhang

| Name | DSM / Labornummer | Einbaurate |
|-------------------------------------|--------------------------|-------------------|
| <i>Fusarium oxysporum</i> | VB 9293 | 136 |
| <i>Fusarium solani</i> | 1164 | 106 |
| <i>Malassezia furfur</i> | 6170 | 126 |
| <i>Mucor hiemalis</i> | ST 2608/05 | 120 |
| <i>Paecilomyces lilacinus</i> | 846 | 129 |
| <i>Paecilomyces variotii</i> | 1961 | 101 |
| <i>Penicillium aurantiogriseum</i> | 1250 | 88 |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | 844 | 150 |
| <i>Penicillium citrinum</i> | 1179 | 90 |
| <i>Penicillium expansum</i> | 1282 | 87 |
| <i>Rhizomucor pusillus</i> | VA 18415 | 135 |
| <i>Rhizopus oryzae</i> | 905 | 80 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 70449 | 123 |
| <i>Trichoderma longibrachiatum</i> | 768 | 166 |
| <i>Trichoderma viride</i> | 63065 | 117 |
| <i>Rhodosporidium sphaerocarpum</i> | 4628 | 133 |

6.1.2 Übersicht über die klinischen Isolate

Tabelle 19: Übersicht über die Ergebnisse der Analyse klinischer Isolate mit Hilfe der verschiedenen diagnostischen Methoden

| Labornummer | morphologische Diagnose | Diagnose Sequenzierung | Diagnose Microarray | Ziel- spezies |
|---------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------|
| VA 18105/06 | <i>Absidia sp.</i> | <i>Absidia corymbifera</i> | <i>Absidia corymbifera</i> | Ja |
| VB 12570/06 | <i>Aspergillus flavus</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | Ja |
| VB 17921/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 17900/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 17787.3/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 17868.1/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 17786.1/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 17834/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 18339.2/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 16433/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 18812/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 19112/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 19327.1/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 18702/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 18586/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VA 23061/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 18789/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |
| VB 19326.2/06 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Ja |

| Labornummer | morphologische Diagnose | Diagnose Sequenzierung | Diagnose Microarray | Ziel- spezies |
|---------------|----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|------------------|
| ST 4670/06 | <i>Aspergillus niger</i> | Sequenzierung fehlgeschlagen | <i>Aspergillus niger</i> | Ja |
| VB 9904/06 | <i>Aspergillus terreus</i> | <i>Aspergillus terreus</i> | <i>Aspergillus terreus</i> | Ja |
| VB 19559/06 | <i>Aspergillus terreus</i> | <i>Aspergillus terreus</i> | <i>Aspergillus terreus</i> | Ja |
| VB 16083/06 | <i>Aspergillus sp.</i> | <i>Aspergillus terreus</i> | <i>Aspergillus terreus</i> | Ja |
| VB 8765/06 | <i>Aspergillus sp.</i> | <i>Aspergillus nidulans</i> | <i>Aspergillus sp.</i> | Ja |
| VB 1478/06 | <i>Aspergillus sp.</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | <i>Aspergillus flavus</i> | Ja |
| VA 103469/04 | <i>Candida dubliensis</i> | DNS übernommen von Dirk Leinberger | <i>Candida dubliensis</i> | Ja |
| VB 9293/06 | <i>Fusarium sp.</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> | Ja |
| VB 23074/06 | <i>Fusarium sp.</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> | Ja |
| VA 25572/06 | <i>Fusarium sp.</i> | <i>Fusarium solani</i> | <i>Fusarium solani</i> | Ja |
| VA 23926.1/06 | <i>Mucor sp.</i> | <i>Mucor circinelloides</i> | <i>Mucor sp.</i> | Ja |
| ST 2608/05 | <i>Mucor sp.</i> | <i>Mucor circinelloides</i> | <i>Mucor sp.</i> | Ja |
| ST 3572/05 | <i>Mucor sp.</i> | <i>Mucor circinelloides</i> | <i>Mucor sp.</i> | Ja |
| ST 985/05 | <i>Mucor sp.</i> | <i>Mucor circinelloides</i> | <i>Mucor sp.</i> | Ja |
| ST 16193/06 | <i>Paecilomyces sp.</i> | <i>Paecilomyces variotii</i> | <i>Paecilomyces sp.</i> | Ja |
| VB 17787.2/06 | <i>Penicillium sp.</i> | <i>Penicillium citrinum</i> | <i>Penicillium citrinum</i> | Ja |
| VA 21270/06 | <i>Penicillium sp.</i> | <i>Penicillium glabrum</i> | <i>Penicillium sp.</i> | Ja |
| VA 21587/06 | <i>Rhizopus sp.</i> | <i>Rhizopus oryzae</i> | <i>Rhizopus sp.</i> | Ja |
| VA 21546/06 | <i>Rhizopus sp.</i> | <i>Rhizopus oryzae</i> | <i>Rhizopus sp.</i> | Ja |

| Labornummer | morphologische Diagnose | Diagnose Sequenzierung | Diagnose Microarray | Ziel- spezies |
|--------------|----------------------------|---------------------------------------|----------------------------|------------------|
| ST 6043/06 | <i>Rhizopus sp.</i> | <i>Rhizopus oryzae</i> | <i>Rhizopus sp.</i> | Ja |
| VA 20441/06 | <i>Rhizopus sp.</i> | <i>Rhizopus oryzae</i> | <i>Rhizopus sp.</i> | Ja |
| VA 18415/06 | <i>Rhizomucor sp.</i> | <i>Rhizomucor pusillus</i> | <i>Rhizomucor pusillus</i> | Ja |
| VA 28047/00 | <i>Rhizomucor sp.</i> | <i>Rhizomucor pusillus</i> | <i>Rhizomucor pusillus</i> | Ja |
| VA 102986/04 | <i>Rhizomucor sp.</i> | <i>Rhizomucor pusillus</i> | <i>Rhizomucor pusillus</i> | Ja |
| ST 3352/03 | <i>Saccharomyces cer.</i> | Sequenzierung fehlgeschlagen | <i>Saccharomyces sp.</i> | Ja |
| ST 3481/03 | <i>Candida norvegensis</i> | DNS übernommen von Dirk Leinberger | kein Signal | Nein |
| ST 3852/03 | <i>Candida pelliculosa</i> | DNS übernommen von Dirk Leinberger | kein Signal | Nein |
| VA 116042/03 | <i>Candida kefyr</i> | DNS übernommen von Dirk Leinberger | kein Signal | Nein |
| VB 14421/06 | <i>Wangiella sp.</i> | <i>Wangiella heteromorpha</i> | kein Signal | Nein |
| ST 3771/06 | <i>Syncephalastrumsp.</i> | <i>Syncephalastrum racemosum</i> | kein Signal | Nein |

6.1.3 Sonden

Tabelle 20: Übersicht über alle Sonden auf dem Microarray
(dargestellt wurde jeweils nur die Sequenz der sense-Sonde)

| Pilzspezies | Sequenz (5'→3') | Name | Länge | T _m | Hairpin | Self-dimer |
|------------------------------|----------------------------|--------------|-------|----------------|---------|------------|
| Absidia corymbifera | TTGGTTAGTGAGTTCAATAATTCC | ABScor1S | 24 | 51.1 | 0.22 | -5.36 |
| | TTGGTTAGTGAGTTCATAATTCCA | ABScor2S | 24 | 52.1 | 0.4 | -5.36 |
| Absidia glauca | CCCAAATCTCTATTCTGTGCAC | ABSgla1S | 22 | 53.6 | 0.84 | -9.73 |
| | CCCAAAATCTCTATTCTGTGCA | ABSgla2S | 22 | 52.9 | 0.84 | -7.05 |
| | CCCAAATCTTTATTCTGTGCA | ABSgla3S | 21 | 51 | 0.84 | -7.05 |
| Acremonium chrysogenum | TTGTTTCATTTTGGATACTCTGAG | ACRchr1S | 24 | 51.3 | 0.91 | -3.53 |
| Acremonium strictum | | | | | | |
| Genogroup I | AACCCATTGTGAACTTACCAA | ACRstrIS | 22 | 52.8 | 0.45 | -3.9 |
| Genogroup II | TCTTGTCTTTTAGTGTATTTCTGA | ACRstrIIS | 24 | 49.9 | 0.79 | -1.6 |
| Genogroup III | ATTTTATTGTGAATCTCTGAGGG | ACRstrIIIS | 23 | 50.7 | 0.75 | -3.42 |
| Genogroup IV | TTATCTACCTGTTTCGTTGCTTC | ACRstrIVS | 23 | 52.9 | 1.56 | -3.61 |
| (Alternaria alternata) | Keine Speziessonde möglich | | | | | |
| Aureobasidium pullulans | | | | | | |
| Aureobasidium pullulans var. | GCTCTTTGGGTCGGTAC | AURpul_pul1S | 17 | 52.8 | 0.86 | -3.65 |
| Pullulans | | | | | | |
| Aureobasidium pullulans var. | TATTGGGTGCCGTCCTT | AURpul_mel1S | 17 | 53.6 | -0.07 | -3.61 |
| melanginum | | | | | | |
| Aspergillus flavus | (GGAGACACCACGAACTCTGT) | Afla1S | 20 | 56.6 | -0.62 | -3.61 |

| Pilzspezies | Sequenz (5'→3') | Name | Länge | T _m | Hairpin | Self-dimer |
|------------------------|----------------------------|----------------|-------|----------------|---------|------------|
| Aspergillus fumigatus | (CGAACGCAAATCAATCTT) | Afla2S | 18 | 48.4 | 0.92 | -3.61 |
| | (CCGACACCCAACCTTTATTT) | Afum1S | 19 | 50.3 | 1.48 | -3.61 |
| | TTTGTACCTGCTCTGTAG | Afum-fla-nig1S | 19 | 51.8 | 0.84 | -3.14 |
| Aspergillus niger | CCCAACATGAACGCTGTT | Afum-ter1S | 18 | 53.4 | -0.07 | -5.38 |
| | GTGTCTATTGTACCCTGTTGC | Anig3S | 21 | 53.4 | 1.32 | -3.65 |
| | (ACCCCAACACGAACACTG) | Anig1S | 18 | 55.3 | 1.53 | -3.61 |
| Aspergillus terreus | (CCAACACGAACACTGTCTGA) | Anig2S | 20 | 55 | -0.23 | -3.61 |
| | (AGTCTGAGTGTGATTCTTTGC) | Ater1S | 21 | 52.8 | 1.15 | -3.14 |
| | (GTCTGAGTTGTGATTCTTTGC) | Ater2S | 21 | 51.9 | 1.15 | -3.14 |
| Aspergillus versicolor | GGGACTACTGAACTTCATGC | Aversydnid1S | 20 | 53 | 0.52 | -5.47 |
| Candida albicans | (AACTTGTCACACCAGATTATTACT) | Calb1S | 24 | 52.1 | 0.79 | -3.3 |
| | (CTTGAAAGACGGTAGTGGTAA) | Calb2S | 21 | 52 | -0.1 | -3.61 |
| Candida dubliensis | (AACTTGTCACGAGATTATTTTTA) | Cdub1S | 23 | 48.3 | -0.3 | -3.61 |
| | (TTGCTAAGGCGGTCTCTG) | Cdub2S | 18 | 54.6 | -0.54 | -3.61 |
| Candida glabrata | (TACTACACACAGTGGAGTTTACT) | Cgla1S | 24 | 53.4 | -2.05 | -3.3 |
| | ATT CTT TTG TTC GTT GGG G | Cgla2S | 19 | 50.9 | 1.23 | -3.61 |
| Candida krusei | (CGAAAACAACAACACCTAAAA) | Ckru1s | 21 | 49.6 | ? | -3.61 |
| | AACTAGACTTTTTTTCAGGGACG | Ckru2S | 23 | 53.1 | 1.17 | -4.16 |
| Candida parapsilosis | (GCGGAGTATAAACTAATGGATA) | Cpar1S | 22 | 49.4 | -0.56 | -3.61 |
| Candida tropicalis | (AAACCAAACCTTTTTATTACAGT) | Ctro1S | 23 | 47.3 | 0.76 | -3.89 |

| Pilzspezies | Sequenz (5'→3') | Name | Länge | T _m | Hairpin | Self-dimer |
|---|--|--------------|-------|----------------|---------|------------|
| | AAT TTC TTT GGT GGC GGG | Ctro2S | 18 | 53.6 | 1.5 | -5.36 |
| Candida guilliermondi | (CTTTTTGATACAGAACTCTTGCT) | Cgui1S | 23 | 51.2 | 0.88 | -3.17 |
| Candida lusitanae | (CGTTGCTCCGAAATATCA) | Clus1S | 18 | 49.8 | 0.15 | -3.91 |
| Chaetomium globosum | AACCACCTTTTAACCCAAG | CHAglo1S | 19 | 50.3 | 1.14 | -4.85 |
| Cladosporium cladosporioides | GATCATTACAAGTGACCCCG | CLAcla1S | 20 | 53 | -0.05 | -4.62 |
| Cladosporium herbarum | ATCATTACAAGAACGCCCG | CLAher1S | 19 | 52.8 | 1.36 | -3.61 |
| Cryptococcus neoformans (Cunninghamella blakesleeana) | TTGCTGATAACAACCATCTCTTTT Keine Speziessonde möglich | CRYneo-bac1S | 24 | 53 | 0.45 | -3.9 |
| Fusarium oxysporum species complex | TTGGGACTCGCGTTAATT | FUSoxy1S | 18 | 51.6 | 0.94 | -10.36 |
| | GCGTTCCCCAAATTGATT | FUSoxy3S | 18 | 51 | 0.67 | -5.36 |
| | GCGTTCCTCAAATTGATTG | FUSoxy4S | 19 | 49.7 | -0.51 | -5.47 |
| | AAAACCCTCGTTACTGGTAATC | FUSoxy2S | 22 | 52.5 | -0.28 | -4.41 |
| | CGTAGTAGTAAAACCCTCGTTA | FUSoxy5S | 22 | 51.5 | 0 | -3.61 |
| Fusarium solani species complex | GTAGTAGCTAACACCTCGC | FUSsol1S | 19 | 52.2 | -0.28 | -8.26 |
| Malassezia furfur | TCTCCAATCCATTTCTACCAA | MALfur1S | 22 | 51.7 | 0.78 | -3.89 |
| Mucor hiemalis | | | | | | |

Anhang

| Pilzspezies | Sequenz (5'→3') | Name | Länge | T _m | Hairpin | Self-dimer |
|------------------------------|----------------------------|----------------|-------|----------------|---------|------------|
| Mucor hiemalis f. Corticola | CTTGTTCTAGTTAGGTTTCATTCTT | MUChie_cor1S | 24 | 50.6 | 0.43 | -4.16 |
| Mucor hiemalis f. Hiemalis | AAATGAGAGTTTCGGCTTTATTG | MUChie_hie1S | 23 | 50.6 | 0.73 | -3.89 |
| Mucor hiemalis f. Luteus | GGGTCACGCTCTTCTATAATTTA | MUChie_lut1S | 23 | 52.1 | 1.06 | -5.36 |
| Mucor hiemalis f. Silvaticus | AGGGATGCTTGAGGACTATAT | MUChie_sil1S | 21 | 52.5 | 0.55 | -3.91 |
| Paecilomyces lilacinus | AACCTTACCTCAGTTGCCT | PAElil-nos1S | 19 | 53.5 | 0.46 | -3.29 |
| Paecilomyces variotii | AAGGTTGCCGTCTGAGTAT | PAEvarspesin1S | 19 | 53.5 | 1.07 | -3.61 |
| Penicillium aurantiogriseum | GAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAAT | PENaur1S | 24 | 51.3 | 0.06 | -3.42 |
| Penicillium chrysogenum | GAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAAT | PENchr1S | 24 | 50.8 | 0.06 | -3.42 |
| | TTGCCGATCAACCCAAATT | PENaurchr1S | 19 | 52.8 | 0.17 | -5.36 |
| Penicillium citrinum | GCAGTCTGAGACCTATAACGAA | PENcit1S | 22 | 53.8 | -0.17 | -4.52 |
| Penicillium expansum | TCTGCCTGAAGATTGTCGT | PENexp1S | 19 | 53.7 | 0.65 | -3.61 |
| Rhizomucor pusillus | TTGTTGACCCTTGATATTTCTT | RHlpus1S | 23 | 52.4 | 0.8 | -3.91 |
| Rhizopus oryzae | TCGCATCGCTGTTTTATTACA | RHIP3S | 21 | 52.6 | 0.3 | -3.61 |
| (Saccharomyces cerevisiae) | Keine Speziessonde möglich | | | | | |
| Trichoderma longibrachiatum | CTCTGTTTTATTTTTGCTCTGAG | TRlIon1S | 23 | 50.2 | 1.2 | -3.17 |
| Trichoderma viride | CTTACTCTGAGCAAAAATTCAAAA | TRlVir1S | 24 | 50.3 | 0.84 | -5.36 |
| Rhodosporidium | GCATTTGTTTGGGATAGTAGC | PK4S | 21 | 51.8 | 1.09 | -3.14 |
| sphaerocarpum | CCCTCCTCTTTTCTAGTGAA | PK5S | 20 | 51 | 0.24 | -4.16 |

Anhang

6.2 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|---|
| ΔG | Gibbs'sche freie Energie |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| bp | Basenpaare |
| Cy | Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff |
| dCTP | 3'Desoxycytosin-5'Triophosphat |
| ddH ₂ O | doppelt deionisiertes Wasser |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | desoxyribonucleic acid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| dsDNS | doppelsträngige DNS |
| | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und |
| DSMZ | Zellkulturen |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| h | Stunde |
| HPLC | high performance liquid chromatography |
| I | gemittelte absolute Intensität |
| ITB | Institut für Technische Biochemie |
| ITS | internal transcribed spacer-region |
| kb | Kilobase |
| min | Minute |
| NK | negative Hybridisierungskontrolle |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PHK | positive Hybridisierungskontrolle |
| PK | Prozesskontrolle |
| PMT | Photo Multiplier Tube |
| rDNS | ribosomale DNS |

Anhang

| | |
|-------|---|
| RI | gemittelte relative Intensität |
| RNA | ribonucleic acid |
| RNS | Ribonukleinsäure |
| rpm | rounds per minute |
| RSI | relative Spotintensität |
| SC | Druckkontrolle (von engl. spotting-control) |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| sp. | Spezies |
| SSC | Natriumchlorid-Natriumcitrat |
| ssDNS | einzelsträngige DNS |
| SSPE | Natriumchlorid-Natriumphosphat EDTA |
| STABW | Standardabweichung |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| Tm | Schmelztemperatur |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Unit (Einheit für Enzymaktivität) |

6.3 Literaturverzeichnis

Ahrendt SA, Halachmi S, Chow JT, Wu L, Halachmi N, Yang SC, Wehage S, Jen J, Sidransky D. Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 June 22;96(13):7382-7.

Behr T, Koob C, Schedl M, Mehlen A, Meier H, Knopp D, Frahm E, Obst U, Schleifer K, Niessner R, Ludwig W. A nested array of rRNA targeted probes for the detection and identification of enterococci by reverse hybridization. *Syst Appl Microbiol* 2000 December;23(4):563-72.

Booth SA, Drebot MA, Martin IE, Ng LK. Design of oligonucleotide arrays to detect point mutations: molecular typing of antibiotic resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* and hantavirus infected deer mice. *Mol Cell Probes* 2003 April;17(2-3):77-84.

Bush RK, Portnoy JM, Saxon A, Terr AI, Wood RA. The medical effects of mold exposure. *J Allergy Clin Immunol* 2006 February;117(2):326-33.

Chizhikov V, Wagner M, Ivshina A, Hoshino Y, Kapikian AZ, Chumakov K. Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J Clin Microbiol* 2002 July;40(7):2398-407.

Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Müller CA, Bowden RA, van BJ, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997 June;35(6):1353-60.

Foy PC, van Burik JA, Weisdorf DJ. Galactomannan antigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007 April;13(4):440-3.

Frössel F. Schimmelpilze und andere Innenraumbelastungen. Fraunhofer IRB Verlag, Stuttgart . 2003.

Ref Type: Magazine Article

Fujita S, Lasker BA, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ. Microtitration plate enzyme immunoassay to detect PCR-amplified DNA from *Candida* species in blood. *J Clin Microbiol* 1995 April;33(4):962-7.

Anhang

Fukushima M, Kakinuma K, Hayashi H, Nagai H, Ito K, Kawaguchi R. Detection and identification of Mycobacterium species isolates by DNA microarray. *J Clin Microbiol* 2003 June;41(6):2605-15.

Garbarine E, Rosen G. An information theoretic method of microarray probe design for genome classification. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2008;1:3779-82.

Gaskell GJ, Carter DA, Britton WJ, Tovey ER, Benyon FH, Lovborg U. Analysis of the internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA in common airborne allergenic fungi. *Electrophoresis* 1997 August;18(9):1567-9.

Gentry TJ, Wickham GS, Schadt CW, He Z, Zhou J. Microarray applications in microbial ecology research. *Microb Ecol* 2006 August;52(2):159-75.

Grimm V, Ezaki S, Susa M, Knabbe C, Schmid RD, Bachmann TT. Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM beta-lactamases that confer resistance. *J Clin Microbiol* 2004 August;42(8):3766-74.

Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH. Identification of Aspergillus species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J Clin Microbiol* 2000 April;38(4):1510-5.

Hope AP, Simon RA. Excess dampness and mold growth in homes: an evidence-based review of the aeroirritant effect and its potential causes. *Allergy Asthma Proc* 2007 May;28(3):262-70.

Huang A, Li JW, Shen ZQ, Wang XW, Jin M. High-throughput identification of clinical pathogenic fungi by hybridization to an oligonucleotide microarray. *J Clin Microbiol* 2006 September;44(9):3299-305.

Kakinuma K, Fukushima M, Kawaguchi R. Detection and identification of Escherichia coli, Shigella, and Salmonella by microarrays using the gyrB gene. *Biotechnol Bioeng* 2003 September 20;83(6):721-8.

Kim CJ, Jeong JK, Park M, Park TS, Park TC, Namkoong SE, Park JS. HPV oligonucleotide microarray-based detection of HPV genotypes in cervical neoplastic lesions. *Gynecol Oncol* 2003 May;89(2):210-7.

Leinberger D., Entwicklung eines DNS-Microarrays zur Detektion und Identifikation humanpathogener Pilze. Universität Stuttgart . 2004.

Lionakis MS, Samonis G, Kontoyiannis DP. Endocrine and metabolic manifestations of invasive fungal infections and systemic antifungal treatment. *Mayo Clin Proc* 2008 September;83(9):1046-60.

Anhang

Löffler J, Hebart H, Schumacher U, Reitze H, Einsele H. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J Clin Microbiol* 1997 December;35(12):3311-2.

Löffler J, Kelly SL, Hebart H, Schumacher U, Lass-Flörl C, Einsele H. Molecular analysis of *cyp51* from fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *FEMS Microbiol Lett* 1997 June 15;151(2):263-8.

Martin C, Roberts D, van Der WM, Rossau R, Jannes G, Smith T, Maher M. Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. *J Clin Microbiol* 2000 October;38(10):3735-42.

Müller R, Ditzen A, Hille K, Stichling M, Ehrlich R, Illmer T, Ehninger G, Rohayem J. Detection of herpesvirus and adenovirus co-infections with diagnostic DNA-microarrays. *J Virol Methods* 2009 February;155(2):161-6.

Neugebauer W, Entwicklung eines DNA-Microarrays zur Identifikation von Schimmelpilzen auf Kunst- und Kulturgut. Staatliche Akademie der Bildenden Künste Stuttgart . 2007.

Nicolaisen M, Justesen AF, Thrane U, Skouboe P, Holmstrom K. An oligonucleotide microarray for the identification and differentiation of trichothecene producing and non-producing *Fusarium* species occurring on cereal grain. *J Microbiol Methods* 2005 July;62(1):57-69.

Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, Arroyo J, Berriman M, Abe K, Archer DB, Bermejo C, Bennett J, Bowyer P, Chen D, Collins M, Coulsen R, Davies R, Dyer PS, Farman M, Fedorova N, Fedorova N, Feldblyum TV, Fischer R, Fosker N, Fraser A, Garcia JL et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 2005 December 22;438(7071):1151-6.

Randhawa HS. Respiratory and systemic mycoses: an overview. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 2000 October;42(4):207-19.

Sessitsch A, Hackl E, Wenzl P, Kilian A, Kostic T, Stralis-Pavese N, Sandjong BT, Bodrossy L. Diagnostic microbial microarrays in soil ecology. *New Phytol* 2006;171(4):719-35.

Shao PL, Huang LM, Hsueh PR. Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. *Int J Antimicrob Agents* 2007 December;30(6):487-95.

Anhang

Skotheim RI, Thomassen GO, Eken M, Lind GE, Micci F, Ribeiro FR, Cerveira N, Teixeira MR, Heim S, Rognes T, Lothe RA. A universal assay for detection of oncogenic fusion transcripts by oligo microarray analysis. *Mol Cancer* 2009;8:5.

Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975 November 5;98(3):503-17.

Sugita T, Nakajima M, Ikeda R, Matsushima T, Shinoda T. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. *J Clin Microbiol* 2002 May;40(5):1826-30.

Ullmann AJ. Nephrotoxicity in the setting of invasive fungal diseases. *Mycoses* 2008;51 Suppl 1:25-30.

Volokhov D, Chizhikov V, Chumakov K, Rasooly A. Microarray-based identification of thermophilic *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *J Clin Microbiol* 2003 September;41(9):4071-80.

Walsh TJ, Chanock SJ. Diagnosis of invasive fungal infections: advances in nonculture systems. *Curr Clin Top Infect Dis* 1998;18:101-53.

Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2007;48(1):1-12.

Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 2002 July;15(3):465-84.

Yu X, Susa M, Knabbe C, Schmid RD, Bachmann TT. Development and validation of a diagnostic DNA microarray to detect quinolone-resistant *Escherichia coli* among clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2004 September;42(9):4083-91.

Zwart G, van Hannen EJ, Kamst-van Agterveld MP, Van der GK, Lindstrom ES, Van WJ, Lauridsen T, Crump BC, Han SK, Declerck S. Rapid screening for freshwater bacterial groups by using reverse line blot hybridization. *Appl Environ Microbiol* 2003 October;69(10):5875-83.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., White, T. (eds.), *PCR protocols: a guide to methods and application*. Academic Press, San Diego, pp. 315-322

Danksagung

7 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen folgenden Personen bedanken:

Bei PD Dr. Ulrike Schumacher für das Überlassen dieses interessanten und vielseitigen Themas und für die umfassende und freundschaftliche Betreuung während der gesamten Promotion.

Bei Dirk Leinberger für die viele Zeit, die er für die Einführung in das Thema und die geduldige Betreuung der Experimente am Institut für technische Biochemie der Universität Stuttgart investiert hat.

Bei Wibke Neugebauer, mit der ich einen Großteil der Experimente gemeinsam durchführen durfte. Durch sie habe ich nebenbei auch einen Einblick in die Arbeit eines Restaurators erhalten und ohne sie hätte ich es nicht geschafft.

Bei Prof. Ingo B. Autenrieth und Prof. Rolf Schmid für die Möglichkeit an ihrem Institut arbeiten zu können.

Bei den Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen, insbesondere bei Monika Treiber für die Hilfe beim Sammeln und bei der Vorbereitung der Pilzproben, bei Steffi Richt und Conny Lüth aus dem PCR-Labor für die Einführung in die PCR-Technik und bei allen drei außerdem dafür, mir einen Platz in ihrem Reich eingeräumt zu haben.

Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „analytische Biotechnologie“ am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart, insbesondere bei PD Dr. Till Bachmann, Kristina Knösche und Susanne Münch.

Bei meinen Eltern für die Unterstützung während meines gesamten Studiums, das Überlassen des Autos für viele Fahrten zwischen Stuttgart und Tübingen, das Korrekturlesen und viele Stunden Kinderbetreuung.

Bei Christian für die Geduld und das Verständnis, auch wenn es mal wieder später wurde, für die Hilfe bei den verschiedensten Computerpannen und für noch viel mehr.

Danksagung

Bei all denen, die neben den bereits genannten zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, egal ob durch Spaziergehen mit Jakob, aufmunternde Worte oder auf sonstige Art.

Lebenslauf

8 Lebenslauf

Name: Ulrike Strandhagen

Geburtsname: Baumgärtel

Geburtsdatum: 28.08.1983

Geburtsort: Weimar

Schulbildung: 1990-92: Louis Fürnberg Schule, Weimar
1992-94: Grundschule Hohenstange, Tamm
1994-2003: Friedrich-List-Gymnasium, Asperg
06/2003: Abitur

Universitätsausbildung: Seit 04/2004: Studium der Humanmedizin an der
Eberhard-Karls-Universität Tübingen

10/2003-01/2004: Krankenpflegepraktikum im
Katharinenhospital Stuttgart (Chirurgie)

03/2006: Physikum

09/2006: Famulatur im Institut für Mikrobiologie und
Hygiene, Tübingen

03-04/2007: Famulatur auf einer internistischen
Station, Klinikum Bietigheim-Bissingen

08/2007: Famulatur in der Gynäkologie, Klinikum
Weimar

03/2008: Famulatur in der Anästhesie, Hôpital Saint
Roch, Nizza

Lebenslauf

08/2008: Famulatur in der pädiatrischen
Hämatookologie, Olgahospital, Stuttgart

02/2009 – 06/2010: Praktisches Jahr am
Universitätsklinikum Tübingen in den Bereichen Innere
Medizin, Allgemein- und Viszeralchirurgie,
Neurochirurgie sowie Gynäkologie und Geburtshilfe

17.11.2010: Ärztliche Prüfung (2. Staatsexamen)