Aus dem Institut für Tropenmedizin
der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. J. Knobloch

Aufbau und Evaluation eines diagnostischen PCR-Verfahrens zum Nachweis von spezifischer *Paracoccidioides brasiliensis*-DNA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Aida Ibricevic
aus
Banjaluka, Bosnien und Herzegowina

2006

Dekan:	Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter:	Professor Dr. J. Knobloch
2. Berichterstatter:	Frau Privatdozentin Dr. U. Schumacher

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 4

1.1 Geschichte 4

1.2 Eigenschaften des Erregers 4

1.3 Epidemiologie 5

1.4 Pathogenese und Klinik 7

1.5 Diagnostik 9

1.5.1 Mikroskopie 9

1.5.2 Kultur 9

1.5.3 Histopathologie 10

1.5.4 Hauttest 10

1.5.5 Röntgen-Thorax 10

1.5.6 Immunodiagnostik 11

1.5.7 PCR 12

1.6 Therapie 12

1.7 Ziel der Arbeit 13

2. Materialien und Methoden 14

Material

2.1 Mikroorganismen 14

2.2 Gewebeproben 14

2.3 Komerzielle Kits 14

2.4 Reagenzien für PCR, Sequenzierung und Klonierung 15

2.5 Chemikalien 17

2.6 Verbrauchsmateralien 17

2.7 Technische Geräte 18

Methoden

2.8 Vorbereitung der Mikroorganismen 20

2.9 Vorbereitung der Gewebeproben 20

2.10 DNA-Extraktion 21

2.11 PCR-Methoden 24
2.11.1 Primerdesign 24
2.11.2 Erster Schritt spezifischer *P. brasiliensis*-PCR und 18S rDNA *P. brasiliensis*-PCR 26
2.11.3 *P. brasiliensis* spezifische nested-PCR 27
2.11.4 Kontrollen 29
2.12 Klonierung 31
2.12.1 Aufreinigung der PCR Amplifikate 31
2.12.2 Ligation 31
2.12.3 Transformation 32
2.12.4 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* 33
2.13 Sequenzierung der Amplifikate 33
2.13.1 Identifizierung von PCR-Produkten 33
2.13.2 Sequenzierungs-PCR 34
2.13.3 Centri-Sep Reinigung 35
2.13.4 Gelelektophorese und Sequenzanalyse 35
2.14 Phylogenetische Analyse 36
2.14.1 Neighbor Joining 38
2.14.2 Maximum Parsimony 38
2.14.3 Maximum Likelihood 39
2.14.4 Kishino-Hasegawa Test 39

3. Ergebnisse 40
3.1 Nachweis von *P. brasiliensis* mittels PCR mit der Zielregion in gp43 40
3.1.1 Spezifität 40
3.1.2 Nachweisgrenze des Verfahrens 42
3.2 Amplifikation und phylogenetische analyse der kleinen Untereinheit (18S) der ribosomalen DNA von *P. brasiliensis* 42
3.2.1 *P. brasiliensis* 18S rDNA 42
3.2.2 Phylogenetische Analyse 44
3.2.2.1 Neighbor Joining 44
3.2.2.2 Maximum Parsimony 44

3.2.2.3 Maximum Likelihood 45
3.2.2.4 Kishino-Hasegawa Test 48

4. Diskussion 49
4.1 Diagnostische PCR zum Nachweis von *P. brasiliensis* 49
4.2 Phylogenetische Analyse der kleinen Untereinheit (18S) der ribosomalen DNA von *P. brasiliensis* 55

5. Zusammenfassung 59

6. Abkürzungsverzeichnis 61

7. Literaturverzeichnis 64

8. Anhang 72
Danksagung 72
Veröffentlichung der eigenen Daten 73
Lebenslauf 74

1. Einleitung

1.1 Geschichte

Die Parakokzidioidomykose (PCM) wurde früher als Südamerikanische Blastomykose oder Lutz-Splendore-Almeida Krankheit bezeichnet.

Adolpho Lutz hat erstmals 1908 ausgedehnte oropharyngeale Läsionen im Zusammenhang mit zervikaler Lymphadenitis bei zwei Patienten beschrieben, als erster den Pilz erfolgreich isoliert und bei Raumtemperatur in verschiedenen Medien kultiviert. Dabei erkannte er dessen dimorphe Natur. Die beschriebene Erkrankung nannte er Hyphoblastomycosis, den Pilz „Hyphoblastomicose pseudococcica".

Zwischen 1909 und 1912 charakterisierte Alfonso Splendore weitere Eigenschaften des Pilzes sowie die klinischen und histopathologischen Merkmale der Erkrankung in detallierterer Form. Er war der Meinung, dass der Pilz zu den Askomyzeten gehöre und gab ihm daher den Namen *Zymonema brasiliense*.

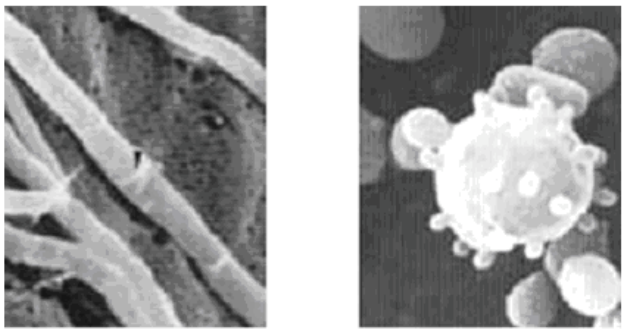
Zwei Jahrzehnte später hat Almeida (1930) den Pilz und die durch ihn hervorgerufene Erkrankung noch genauer charakterisiert und den Pilz *Paracoccidioides brasiliensis* genannt.

Nach dem ersten Pan-American Symposium über Parakokzidioidomykose 1971 wurde dieser Name zunehmend als einzig gültige Bezeichnung angesehen und propagiert (Wanke und Londero, 1998).

1.2 Eigenschaften des Erregers

Die Parakokzidioidomykose wird durch *Paracoccidioides brasiliensis*, einen temperaturabhängig dimorphen Pilz verursacht. Bei Zimmertemperatur (ca. 25ºC) wächst der Pilz langsam (20-30 Tage) als Konidien-bildendes Myzel (Abb. 1). Mikroskopisch lassen sich verschiedene Formen von Konidien wie Mikrokonidien, Chlamidokonidien und Arthrokonidien unterscheiden. Der Pilz kann aber auch über einen längeren Zeitraum wachsen, ohne Konidien zu produzieren. Keines dieser Merkmale ist charakteristisch für *P. brasiliensis*. Die Transformation der Myzel- in die

Hefeform kann schon bei 28ºC beginnen. Bei Temperaturen von 35-37ºC sind dann meist die Hefezellen zu sehen, welche ein schnelleres Wachstum (10-15 Tage) zeigen. Charakteristisches Merkmal ist die „Steuerradform“, eine groβe Mutterzelle (≥ 30 µm), die von kleinen, ausknospenden Tochterzellen (2-10 µm) bedeckt ist (Abb. 1).



Myzelform (25ºC) Hefeform (37ºC)

Abbildung 1: Temperaturabhängige Formen von *P. brasiliensis*

1.3 Epidemiologie

Endemiegebiete

Die Parakokzidioidomykose ist ausschlieβlich auf dem amerikanischen Kontinent und dort von Mexiko (23º nördlicher Breite) bis Argentinien (35º südlicher Breite) endemisch. Die Mehrzahl der Erkrankten stammen aus Brasilien (ca. 80%), Kolumbien und Venezuela (Abb. 2).

Abbildung 2: Endemiegebiet der PCM in Nord-, Zentral- und Südamerika

Die Endemiegebiete sind waldreich, besitzen Wasserläufe und sind durch milde Temperaturen (17-24ºC), ausreichende Niederschläge (900-1800 mm/Jahr), kurze Winter und regenreiche Sommer charakterisiert (Brummer et al., 1993).

Vorkommen

Der natürliche Lebensraum des Pilzes sowie die Verbreitung des Erregers sind weitgehend unbekannt.

Die Kultivierung gelang nur in Einzelfällen aus Bodenproben. Auf venezolanischen Kaffeeplantagen waren 3 von 83 Proben positiv (Albornoz, 1971). Ein Erregernachweis wurde in Brasilien in Hundefutter, das sehr wahrscheinlich mit Erde kontaminiert war (Ferreira et al., 1990), im Intestinaltrakt von Fledermäusen in Kolumbien (Grose und Tamsitt, 1965) sowie in Leber und Darm eines aus Bolivien importierten Affen (Johnson und Lang, 1977) beschrieben. Nachgewiesen wurde *P. brasiliensis* auch mehrfach in Armadillos („Gepanzerten"), den Neunbinden-Gürteltieren (*Dasypus novemcinctus*), die in den südlichen USA und in fast ganz Süd- und Mittelamerika leben. Deshalb gelten diese Tiere als Wirte (Bagagli et al., 1998).

Risikofaktoren

Als Risikofaktoren für eine Erkrankung werden Alter über 30 Jahre, männliches Geschlecht sowie die humanen leukozytären Antigenen HLA-A9, HLA-B13 und HLA-B40 angesehen (Restrepo et al., 1983; Lacerda et al., 1988; Goldani et al., 1991). Zudem tritt sie häufiger im Zusammenhang mit fortgeschrittener HIV-Infektion, Tuberkulose (10-25% koexistent) und Alkoholkonsum auf.

Spezifische Antikörper als Ausdruck einer durchgemachten Infektion sind bei beiden Geschlechtern gleichermaβen vorhanden, aber bei den Erkrankten beträgt das Geschlechterverhältnis Männer zu Frauen 13 bis 78 zu 1. Das bei Frauen im gebärfähigen Alter in höherer Konzentration vorkommende Östradiol hemmt die Transformation von inhalierten Konidien zu Hefen, so dass es nicht zu einer intrapulmonalen Vermehrung kommt (Brummer et al., 1993; Aristizabal et al., 1998; Borges-Walmsley et al., 2002).

Die Mehrzahl der Erkrankten (70 %) arbeitet in der Landwirtschaft und gehört unteren Gesellschaftsschichten an (Brummer et al., 1993).

Erkrankte sind überzufällig häufig Träger der Antigene HLA-A9 und HLA-B13. Eine Assoziation von HLA-A9 zu progressiven pulmonalen Verlaufsformen wurde ebenfalls beschrieben (Restrepo et al., 1983). Träger des HLA-B40 haben ein 4,3 mal höheres Erkrankungsrisiko (Lacerda et al., 1988; Goldani et al., 1991). Studien über den Einfluss der Blutgruppen ABO und der Rh-Faktoren ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen an PCM Erkrankten und Kontrollgruppen (Restrepo et al., 1983).
PCM gehört nicht zu den AIDS-definierenden Erkrankungen. In der Literatur sind bis 1999 nur 79 HIV-Infizierte mit PCM beschrieben worden. In 73 Fällen, bei denen die klinische und epidemiologische Daten teilweise erhältlich waren, lag das durchschnittliche Alter bei 33,5 Jahren. Bei HIV-infizierten Erkrankten war die Haut wesentlich öfter betroffen (61%) als bei HIV-Negativen (10-15%). Klinisch wird bei diesen Patienten die akute Form der PCM vermutet, die bei fortgeschrittener HIV-Infektion durch Reaktivierung einer latenten Infektion entsteht (Benard und Duarte, 2000).

Prävalenz, Inzidenz und Mortalität

Wirkliche Prävalenz und Inzidenz der Parakokzidioidomykose sind nicht genau bekannt. Aufgrund der gemeldeten Erkrankungsfälle wurde eine jährliche Inzidenz von ein bis drei pro 100 000 Einwohner in endemischen Gebieten berechnet. Auf der Basis von Hauttestungen wird geschätzt, dass ungefähr 10% der in Brasilien, Kolumbien und Venezuela lebenden Population infiziert sind (Wanke und Londero 1998).
In Endemiegebieten ist die Mortalität hoch (16-25%) (Boxwalla, 2002). In Ländern, in denen nicht alle Regionen gleichermaßen betroffen sind, liegt die Mortalität umgelegt auf die Gesamtbevölkerung niedriger. Beispielsweise wurde in Brasilien in einer Studie von 1980-1995 eine Mortalität von lediglich 1,45 pro eine Million Einwohner berechnet. Es waren überwiegend Männer betroffen (84,75%) (Coutinho et al., 2002).

1.4 Pathogenese und Klinik

Menschen infizieren sich meist in den ersten 20 Lebensjahren, jedoch kommen keine Übertragungen von Mensch zu Mensch vor. Die natürliche Eintrittspforte ist wie bei allen dimorphen humanpathogenen Pilzspezies die Lunge. Zwischen Infektion und klinischer Manifestation vergehen oft Jahre bis Jahrzehnte.

Es werden die subklinische, die akute oder subakute juvenile und die chronisch adulte Verlaufsform der Erkrankung unterschieden.

Subklinische Verlaufsformen

Nach Inhalation der Konidien bilden diese Hefezellen in den distalen Teilen der Lunge aus. Es entsteht ein Granulom, der Primärherd, welcher kalzifiziert. Diese Läsionen, in denen vitale Hefezellen nachweisbar bleiben, verlaufen meist asymptomatisch (*asymptomatische primär pulmonale Form*) (Londero und Melo 1983).

Akute oder subakute juvenile Verlaufsform

Diese Verlaufsform ist meist bei Kindern, seltener bei jungen Erwachsenen zu sehen. Bei vorhandenen Symptomen (Fieber, Husten, Dyspnoe, Erbrechen und Gewichtsverlust) spricht man von akuter oder symptomatischer Verlaufsform in der Lunge. Diese Läsonen sind meist regressiv und können abheilen oder latent bestehen bleiben (*Residualform*) (Londero und Melo, 1983).

In bis zu 10% der Infektionen können primäre Läsionen progressiv werden mit hämatogener Aussat der Hefezellen in andere Organe. Da die Erreger das Monozyten-Makrophagen-System befallen, sind insbesondere Milz, Knochenmark aber auch Leber betroffen (*akute disseminierte juvenile Verlaufsform*). Von 32 beschriebenen Fällen bei Kindern hatten 28 Patienten eine akute oder subakute juvenile disseminierte Form, ein Patient eine akute pulmonale Form, ein anderer eine subakute juvenile disseminierte Form mit intestinaler Lokalisation und die anderen zwei eine chronisch disseminierte Form. Bei Kindern unter 10 Jahren sind gastrointestinale Beschwerden und osteoartikuläre Manifestationen häufiger, während bei Älteren eine Lymphadenopathie und Hautläsionen im Vordergrund stehen. (Londero und Melo, 1983).

Chronisch adulte Verlaufsform

Bei 90% der Patienten wird die chronisch adulte Verlaufsform beobachtet, die überwiegend bei Männern über 30 Jahren vorkommt. Sie entwickelt sich über Monate bis Jahre als Resultat einer Reaktivierung der latenten residualen Läsionen. Bei Befall nur eines einzigen Organsystems, in der Regel der Lunge, selten anderer Organe, spricht man von der *unifokalen Form*. In manchen dieser Fälle bleiben die Patienten subjektiv

beschwerdefrei. Hier kann es durch Ausbleiben der Therapie gehäuft zur extrapulmonalen Disseminierung von Erregern kommen (*multifokale Form*) (Brummer et al., 1993).

1.5 Diagnostik

Die Diagnose wird durch Erregeranzucht aus Körperflüssigkeiten, durch den histologischen Nachweis von typischen Pilzelementen in Biopsien oder durch den Nachweis spezifischer Antikörper im Serum gestellt.

1.5.1 Mikroskopie

Man weist den Erreger mittels Mikroskopie ggf. nach Zugabe von 10% KOH in Hautschuppen, in Abstrichen von Hautläsionen oder in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit nach (Abb. 3).

Abbildung 3: Hefezellen von *P. brasiliensis*, sogenannte „Steuerradform“, im KOH Präparat

Mikroskopisch kann *P. brasiliensis* mit Hefezellen von *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, *Cryptococcus neoformans* und *Coccidioides immitis* verwechselt werden (Wanke und Londero, 1998).

1.5.2 Kultur

Die Erreger wachsen auf Sabouraud-Agar oder auf Agar aus Pilzextrakten (yeast extract Agar) mit Chloramphenicol und Cyclohexamid bei Zimmertemperatur. In 20-30 Tagen wächst das Myzel, das nicht charakteristisch ist, so dass zur Identifizierung die temperaturabhängige Transformation zur Hefephase nötig ist. Dazu wird eine Subkultur bei 35-37º C für 8-10 Tage inkubiert (Wanke und Londero, 1998).

1.5.3 Histopathologie

Mit Hilfe der Hematoxylin- und Eosin (H&E)-Färbung können Granulome, die gut oder schlecht formiert, isoliert oder konfluent sein können, sichtbar gemacht werden. Die Granulome zeigen teilweise wie bei der Tuberkulose eine zentrale Nekrose oder kommen wie bei der Sarkoidose einzeln vor. Zum Verwechseln ähnlich sehen die kleinen Zellen *H. capsulatum*, die mittelgroβen *B. dermatitidis*, die kapsellosen *C. neoformans* und die groβen leeren Zellen *C. immitis* (Wanke und Londero, 1998).
Die Färbung mit Gomori's Methenamin Silber (GMS) färbt insbesondere pilzspezifische Strukturen (De Araujo et al., 2001) und gilt daher als sensitiver zur Diagnostik der PCM als die H&E-Färbung.

1.5.4 Hauttest

Es werden verschiedene *P. brasiliensis* Antigene (Paracoccidioidine) zur kutanen Diagnostik verwendet. Das traditionelle Fava Netto Polysacharid Antigen (intrazellulär und zytoplasmatisch) reagierte positiv sowohl bei 67% der PCM Patieten als auch bei 87% der Patienten mit anderen Erkrankungen und Gesunden (Brummer et al., 1993). Bei Patienten mit akuter PCM zeigte das aus Hefezellen gewonnene zytoplasmatische Antigen mit 62% eine höhere Sensitivität als das aus Myzelzellen gewonnene mit 24%, jedoch treten mit diesen beiden Antigenen Kreuzreaktionen auf, insbesondere bei Histoplasmose Patienten (Restrepo et al., 1983). Da zudem zwischen früherer Infektion und Erkrankung nicht differenziert werden kann, hat die Hauttestung keinen wesentlichen Wert in der individuellen Diagnostik und ist höchstens zu Prävalenzsstudien geeignet.

1.5.5 Röntgen-Thorax

Bei pulmonaler Erkrankung sind radiologisch Lungeninfiltrate nachweisbar, die meist bilateral und symmetrisch sind und bevorzugt im Mittel- und Unterlappen liegen. Zudem werden häufig kavitäre und seltener hiläre Adenopathien im Röntgenbild des Thorax beschrieben. Bei lang anhaltender Krankheit kommt es zu fibrösen, bullösen oder emphysematösen Veränderungen mit chronischem Cor pulmonale und konsekutiver rechtsventrikulärer Hypertrophie (Boxwalla, 2002).

1.5.6 Immundiagnostik

Etwa 90% der Patienten mit klinisch symptomatischer Verlaufsform haben spezifische Antikörper gegen diesen Pilz gebildet (Brummer et al., 1993). Die Sensitivität und Spezifität der Serodiagnostik hängt von den Methoden und Antigenen ab, die verwendet wurden.

In der Arbeit von Del Negro et al. (1991) wurden vier verschiedenen Methoden (**Gegenstromelektrophorese oder Counterimmunoelektrophorese (CIE), Doppel-Immundiffusion (IDD), indirekte Immunfluoreszenz (IIF)** und **Komplement-bindungsreaktion)** in der Serodiagnostik von PCM miteinander verglichen. Das hier verwendete Antigen stammte aus Hefezellen. Dabei zeigten **Counterimmunoelektrophorese und Doppel-Immundiffusiontest** die größte Sensitivität (CIE: 95,6%, IDD: 91,3%) sowie eine 100%ige Spezifität. Der **indirekte Immunfluoreszenztest** zeigt eine hohe Spezifität (über 90%), aber eine geringere Sensitivität (65.2%). Kreuzreaktionen bei Patienten mit Histoplasmose und Aspergillose wurden berichtet. Die **Komplementbindungsreaktion** war weniger sensitiv (71%), zeigte aber hohe Spezifität (95%). Negative immundiagnostische Befunde wurden bei Patienten mit juveniler Verlaufsform und bei HIV-Infizierten mit PCM beobachtet. Auch Kreuzreaktionen bei Patienten mit Histoplasmose wurden beschrieben.

In Seren von PCM Patienten wurden spezifische IgG Antikörper mittels **Enzymimmuntest-ELISA** (84%) und **Western-blot** (96%) nachgewiesen. Die besten Ergebnisse wurden mit Antigenen eines Molekulargewichts von 27, 33 und 43 kDa erreicht (Martins et al., 1997).

Als wichigstes Antigen in der Serodiagnostik gilt das Glykoprotein gp43 (Camargo et al., 1994; Taborda et al. 1993). Das gp43 befindet sich auf der Oberfläche des *P. brasiliensis* und stellt die Hauptkomponente des Pilzsekrets in der Hefephase dar. Dieses Molekül bindet spezifisch das extrazelluläre Matrix-Protein Laminin, was zu einer erhöhten Adhäsion an epithelialen Zellen führt und so die Penetration und Destruktion des infizierten Gewebes ermöglicht (Gesztesi et al., 1996). Der Nachweis des gp43 Antigens im Serum kann auch zur Therapiekontrolle genutzt werden, da gp43 sowohl bei akuten als auch bei chronischen Formen der PCM vor der Therapie

nachweisbar ist, sein Titer während der Behandlung abfällt und bei einem Rückfall der Krankheit wieder ansteigt (Mendes-Giannini et al., 1989; Salina et al., 1998).

1.5.7 PCR

Die Spezifität einer PCR-Methode ist im wesentlichen von der gewählten Zielsequenz abhängig. Bei Wahl einer Region in einem konservativen Gen, das typischerweise als Mehrfachkopie im Genom vorliegt, weist man viele Pilze mit hoher Sensitivität aber nur geringer Spezifität nach.

Es wurden PCR-Methoden zum Nachweis spezifischer DNA von Viren, Bakterien und Pilzen (Guatelli et al., 1989; Thierry et al., 1990; Niesters et al., 1993; Kan, 1993; Van Burik et al., 1998) sowie eine *P. brasiliensis*-PCR beschrieben (Goldani und Sugar, 1998; Diez et al., 1999).

1.6 Therapie

Bereits in den 40er Jahren wurde die Erkrankung mit Sulfonamiden behandelt, es kam jedoch in bis zu 25% der Fälle zu Resistenzentwicklungen. Alle Sulfonamidderivate können therapeutisch eingesetzt werden, am besten aber wirkt Sulfadiazin (Co-trimazin) (Brummer et al., 1993; Wanke und Londero, 1998).

Bei lebensbedrohlicher Erkrankung, also meist bei der juvenilen Verlaufsform ist Amphotericin B zu verabreichen (Wanke und Londero, 1998).

Itraconazol ist 10 mal effektiver gegen *P. brasiliensis* als Ketoconazol und zeigt keine endokrinen Nebenwirkungen. Eine tägliche Dosis vom 100 mg Itraconazol für 6 Monate wird empfohlen, und vermindert die Rezidivrate auf 3-5%. Itraconazol ist das Medikament der Wahl und wird auch bei schwereren Verlaufsformen der Erkrankung angewandt (Brummer et al., 1993; Wanke und Londero, 1998).

Bei in vitro Versuchen zeigte das Medikament Terbinafine gute Ergebnisse. In klinischen Studien muss die Wirksamkeit der Allylamine weiter getestet werden (Hahn et al., 2002).

Impfung

In den Tierstudien wurde Plasmid-DNA von *P. brasiliensis*, die das Antigen gp43 trägt, intramuskulär und intradermal appliziert. Dabei wurde eine gesteigerte Reaktion des humoralen und zellulären Systems beobachtet. Bei Infektion der Mäuse mit *P. brasiliensis* kam es nach Impfung nicht zu der sonst üblichen Disseminierung mit Befall von Milz und Leber, und die Konzentration der Kolonie-bildenden Einheiten des Erregers in den Lungen war im Vergleich zur ungeimpften Kontrollgruppe signifikant vermindert (Pinto, 2000).

Ein Impfstoff für die Anwendung beim Menschen existiert nicht.

1.7 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines diagnostischen PCR-Verfahrens, das zunächst zum Nachweis von *P. brasiliensis* spezifischer DNA in Lungenhomogenisaten infizierter Mäuse getestet werden sollte.

Nach dem Vorbild anderer PCR-Verfahren zum Nachweis fungaler DNA wurde die Zielsequenz in einem in vielen Kopien pro Genom vorkommenden Gen gewählt, das für die kleine Untereinheit der ribosomalen DNA (18S rDNA) kodiert. Zur Identifizierung einer für *P. brasiliensis* spezifischen Genregion wurde zunächst die bis dahin nicht veröffentliche Sequenz des gesamten 18S rDNA Gens bestimmt. Beim Vergleich der Sequenz mit jenen der 18S rDNA verwandter Pilze fiel eine ausgesprochen hohe Homologie auf. Daher wurde das Gen, das für das als sehr spezifisch angesehene Glykoprotein gp43 kodiert, als neue Zielsequenz ausgewählt und die PCR im Tiermodell evaluiert.

2. Material und Methoden

Material

2.1 Mikroorganismen

Folgende Pilzstämme wurden in dieser Arbeit verwendet: *P. brasiliensis* R-2878 bis R-2883, ATCC 60885 des Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, USA. Des Weiteren wurde ein Referenzstamm der American Type Culture Collection (ATCC 60885) verwendet, sowie klinische Isolate (Anzahl in Klammern) von *Aspergillus fumigatus* (1), *Blastomyces dermatitidis* (3), *Candida krusei* (1), *Cryptococcus neoformans* (2) und *Histoplasma capsulatum* (3).

2.2 Gewebeproben

Lungenhomogenisate von 23 mit *P. brasiliensis* intranasal infizierten und zwei nicht infizierten BALB/c Mäusen (Audie L. Murphy Memorial Veterans Hospital, San Antonio, Texas, USA) wurden in dieser Studie untersucht sowie Lungenhomogenisate von 20 mit *H. capsulatum* (Stamm 93/255; M. G. Rinaldi, Fungus Testing Laboratory, University of Texas Health Science Center, San Antonio, USA) intravenös infizierten Institute-for-Cancer-Research (ICR)-Mäusen.

2.3 Kommerzielle Kits

QIAamp® Tissue Kit QIAGEN Plasmid Maxi-Kit QIAquick™ PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
ABI PRISM®BigDye™Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Foster City, USA

AmpliTaq®DNA-Kit	Perkin Elmer, Foster City, USA
TA Cloning® Kit mit Plasmid	Invitrogen, Groningen, Niederlande

2.4 Reagenzien für PCR, Sequenzierung und Klonierung

Plasmidvektoren

Vector: pCR®2.1-TOPO®

Eigenschaften: Ampicillin-Resistenz,

überhängende dTTP-Enden nach Spaltung mit EcoRI

Escherichia coli-Plasmide	Invitrogen, Groningen, Niederlande

Enzyme

AmpliTaq® Polymerase	Perkin Elmer, Foster City, USA
Proteinase K	Qiagen, Hilden

Nukleotide

Desoxynukleosid-Triphosphat Set	Promega, Medison, WI, USA

Oligonukleotide

Primer	Roth, Karlsruhe
(Sequenzen im Methodenteil)	

Molekulargewichtsmarker

DNA Standard VIII	Boehringer, Mannheim

Puffer und Lösungen

50x TAE-Puffer:	2 M Tris-HCl, pH 8
	0.1 M EDTA
	1M Essigsäure

Lösung für Agarose Gel:	1.5% Agarose
	1x TAE-Puffer
	0.6 µg/ml Ethidiumbromid
5x Bromphenolblau-Ladepuffer (BPB-Puffer):	50 mM Tris, pH 7,6
	50 mM EDTA
	0,5% SDS
	0,1% BPB
	18% (w/v) Ficoll 400 ad Aqua
5x Dextran-Ladepuffer:	10 mM EDTA
	0,4% Blue Dextran
	40% (w/v) Glycerin ad Aqua

Medien

LB-Medium (nach Lauria-Bertani):	10,0 g Trypton
	5,0 g Hefeextrakt
	5,0 g NaCl
Soc-Medium (für die Transformation):	2,0% Bacto Trypton
	0.5% Hefeextrakt
	20 mM Glukose
	10 mM NaCl
	10 mM MgCl2
	10 mM MgSO4
	2 mM KCl
X-gal-Substrat (Endkonzentration: 40 mg/ml):	400 mg in 10 ml Dimethylformamid

2.5 Chemikalien

Agar	Merck, Darmstadt
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Aqua ad iniciectabila Mini-Plasco	Braun, Melsungen
Aqua bidest.	Eigenproduktion
Blue Dextran	Pharmacia, Uppsala, Sweden
Bromphenolblau (BPB)	Sigma, Deisenhofen
Ethylen-Diamin Essigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Pharmacia, Uppsala, Sweden
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Pharmacia, Uppsala, Sweden
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl2)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO4)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Tris-Hydochlorid (Tris-HCL)	Sigma, Deisenhofen
Trypton	Difco, Detroit, USA

2.6 Verbrauchsmaterialien

Einmalküvetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Biozym Diagnostik, Oldendorf
Rotilabo Reaktionsgefäßständer	Roth, Karlsruhe
Sekuroka Cryogloves® mit Stulpen	Roth, Karlsruhe
Schutzbrille GSF DIN 27 R	Universitätsapotheke Tübingen
CentriSep™ Spin Colomns	Princeton Sep., Adelphia, USA

Reaktionsgefäße:	
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße Mikrotubes 0,5 ml	Sarstedt, Numbrecht
Reagenzröhrchen steril 12 ml	Greiner, Frickenhausen
Reagenzröhrchen, Falcon 50 ml	Greiner, Frickenhausen

2.7 Technische Geräte

Sequenziergerät:	
373A Automated DNA Sequencer mit ABI PRISM™ System	Applied Biosystems, Perkin Elmer, Foster City, CA, USA
Computer zur Sequenzauswertung:	
MacIntosh Quadra 650	
Power MacIntosh G3	
Thermocycler:	
Primus PCR Thermocycler Tc 9600	MWG Biotech, Ebersberg
UV Transluminator	Bachhofer GmbH, Reutlingen
Spektrophotometer:	
Ultrospec III	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Gelkammern (horizontal)	
Stratagene®10x10cm, 16 Taschen	Stratagene, La Jolla, CA, USA Paqlab, Erlangen MWG Biotech, Ebersberg
Videosystem:	
Video Copy Processor	Mitsubishi Electric, Ratingen

Zentrifugen:	
Biofuge 13	Heraeus, Wiesloch
Vacum Concentrator	Bachhofer GmbH, Reutlingen
Sorvall® RC 5B Plus	Sorvall, Bad Homburg
Kleinschüttler:	
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Vortexer IKA® MS1	Roth, Karlsruhe
Heizplatte/Magnetrührer:	
Ikamaq®RH	IKA, Works, Wilmington, USA
Pipetten:	
Carl Roth-Pipetten	
Elektronische 1-Kanal-Pipette 20-500µl	Roth, Karlsruhe
Eppendorf Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Gilson Pipetten	Abimed, Langenfeld
Sterilisator:	
Variakov 400, Dampfsterilisator	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Inkubator, T5042 (37ºC)	Heraeus, Wiesloch
Sterilbank antair BSK	W. H. Mahl, Kaarst

Methoden

2.8 Vorbereitung der Mikroorganismen

Sechs Isolate von *P. brasiliensis* R-2878 bis R-2883, welche von A. Restrepo in Kolumbien stammen, und der ATCC 60885-Stamm wurden auf Potatoe Flakes Agar bei 30°C zwei Wochen lang gezüchtet. Die Identität als *P. brasiliensis* wurde durch das Fungus Testing Lab, San Antonio, Texas, USA bestätigt. Die Kolonien wurden vom Agar abgekratzt und in sterilem Wasser gelöst, gefroren und bei –20°C aufbewahrt. Nach dem Auftauen wurden 2 x 200 µl von jeder Lösung für die DNA Extraktion benutzt.

Ein Isolat von *Aspergillus fumigatus*, drei von *Blastomyces dermatitides*, eines von *Candida krusei*, zwei von *Cryptococcus neoformans* und drei von *Histoplasma capsulatum* wurden auf Blut- oder Sabouraud-Agar gezüchtet, als solche identifiziert und wie oben beschrieben bearbeitet.

2.9 Vorbereitung der Gewebeproben

Es wurden 6-8 Wochen alte BALB/c Mäuse mit 3 x 10^6 Konidien *Paracoccidioides brasiliensis* intranasal infiziert (Audie L. Murphy Memorial Veterans Hospital, San Antonio, Texas, USA). An den Tagen 1, 2, 3 und 4 Tagen sowie 1, 2, 4, 8, 12, 16 und 20 Wochen post infectionem wurden mittels einer Barbiturat-Überdosis jeweils sechs Tiere zum jeweiligen Zeitpunkt getötet und untersucht. Unter aseptischen Bedingungen wurden die Lungen entnommen, gewogen, in steriler 0.9%iger NaCl-Lösung homogenisiert und eine Verdünnungsreihe hergestellt. Von jeder Verdünnungsreihe wurden jeweils zwei Sabouraud Agar Platten ausgestrichen und 30 Tage lang kultiviert. Die pro Platte gewachsenen, *P. brasiliensis* typischen Kolonien wurden als Kolonie-bildende Einheit (CFU-colony forming units) gezählt. Es wurden die CFU pro 100 µl und Verdünnungsstufe gezählt und so die CFU pro Gramm Organ oder pro ml Flüssigkeit ermittelt. Die Lungenhomogenisate wurden bei –70°C für fünf Jahre gelagert. Bei unter den gleichen Bedingungen gehaltenen Kontrolltieren wurde die Inhalation mit 0,06 ml Kochsalzlösung durchgeführt.

Es wurden Kontrollproben aus 20 ICR Mäusen gewonnen, die intravenös mit 8 x 10^3 CFU von *Histoplasma capsulatum* infiziert und an den Tagen 1, 5 und 11 post infectionem getötet wurden. Diese Lungenhomogenisate, deren quantitative Kultur im Bereich von 1 x 10^3 bis 7 x 10^6 CFU pro Gramm Organ beträgt, zeigten mittels *H. capsulatum*-PCR ein positives Ergebnis für alle Proben (Bialek et al., 2001).
Die Tierversuche waren genehmigt und wurden entsprechend den amerikanischen Richtlinien zum Tierschutz durchgeführt. Die Tierversuche wurden nicht extra für diese Studie durchgeführt, sondern es wurden hier nur Tierproben aus anderen Studien verwendet.

2.10 DNA-Extraktion

Es wurde das kommerzielle DNA-Extraktionssystem QIAamp®Tissue Kit verwendet.
In ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß wurden 200 µl eines Lungenhomogenisats, 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml pipettiert. Die Proben wurden dann für mindestens drei Stunden oder über Nacht auf einem Thermoshaker bei 55 °C und 1000 Rotations per Minute (rpm) inkubiert.
Um die Zellwand zu zerstören, wurden die Proben in Eppendorfgefäßen, von einem Ständer gehalten, für 5 Minuten gekocht und anschließend etwa eine Minute lang in flüssigem Stickstoff eingefroren. Durch anschließendes Eintauchen in kochendes Wasser wurde die Flüssigkeit in den Reaktionsgefäßen innerhalb von zwei Minuten schnell aufgetaut und wieder zum Kochen gebracht. Nach drei Zyklen Einfrieren und Kochen wurde dieser Prozess mit fünfminütigem Kochen abgeschlossen. Die Proben wurden im Kühlschrank abgekühlt und bei 2000 rpm für eine Minute lang zentrifugiert, um kondensierten Wasserdampf mit der übrigen Lösung zu vereinen. Erneut wurden 20 µl Proteinase K hinzupipettiert und auf dem Thermoshaker bei 55°C und 1000 rpm eine Stunde lang inkubiert. Danach wurden in jedes Reaktionsgefäß 200 µl hypertoner AL-Puffer gegeben und auf dem Thermoshaker bei 70°C für 10 Minuten lang inkubiert. Anschließend wurden in jedes Reaktionsgefäß 210 µl reines Ethanol gegeben. Parallel wurde der AE-Puffer protokollgemäß auf dem Thermoshaker auf 70°C vorgewärmt.
Die gesamte Suspension wurde auf Qiagensäulen pipettiert, die in ein 2 ml Auffanggefäß gesteckt und bei 9000 rpm eine Minute lang zentrifugiert wurden.

Während dieses kurzen Zentrifugationsschrittes wurde die DNA an die Silica-Membran der Qiagensäulen gebunden. Die abgetrennte Flüssigkeit wurde zusammen mit den benutzten Auffanggefäßen verworfen.

Nach dem Auswechseln der Auffanggefäße wurden die Silica-Membran in den Qiagensäulen zweimal mit je 500 µl AW-Puffer gewaschen und bei 9000 rpm eine Minute lang zentrifugiert. Die Proteine und andere Kontaminanten aus der Silica-Membran, die die PCR hemmen könnten, wurden ausgewaschen, ohne die DNA-Bindung zu beeinflussen. Um möglichst alle Reste abzuzentrifugieren, wurde abschließend bei 9000 rpm zwei Minute lang zentrifugiert.

Die Qiagensäulen wurden dann in die beschrifteten 1,5 ml Reaktionsgefäße umgesetzt, und 75 µl des auf 70°C vorgewärmten AE-Puffers zupipettiert. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für wenigstens 1 Minute wurde bei 9000 rpm eine Minute lang zentrifugiert. Zur Erhöhung der DNA-Ausbeute wurde dieser Schritt mit weiteren 75 µl AE-Puffer wiederholt. Die in insgesamt 150 µl AE-Puffer eluierte DNA konnte direkt für die PCR eingesetzt oder portioniert bei –20°C gelagert werden.

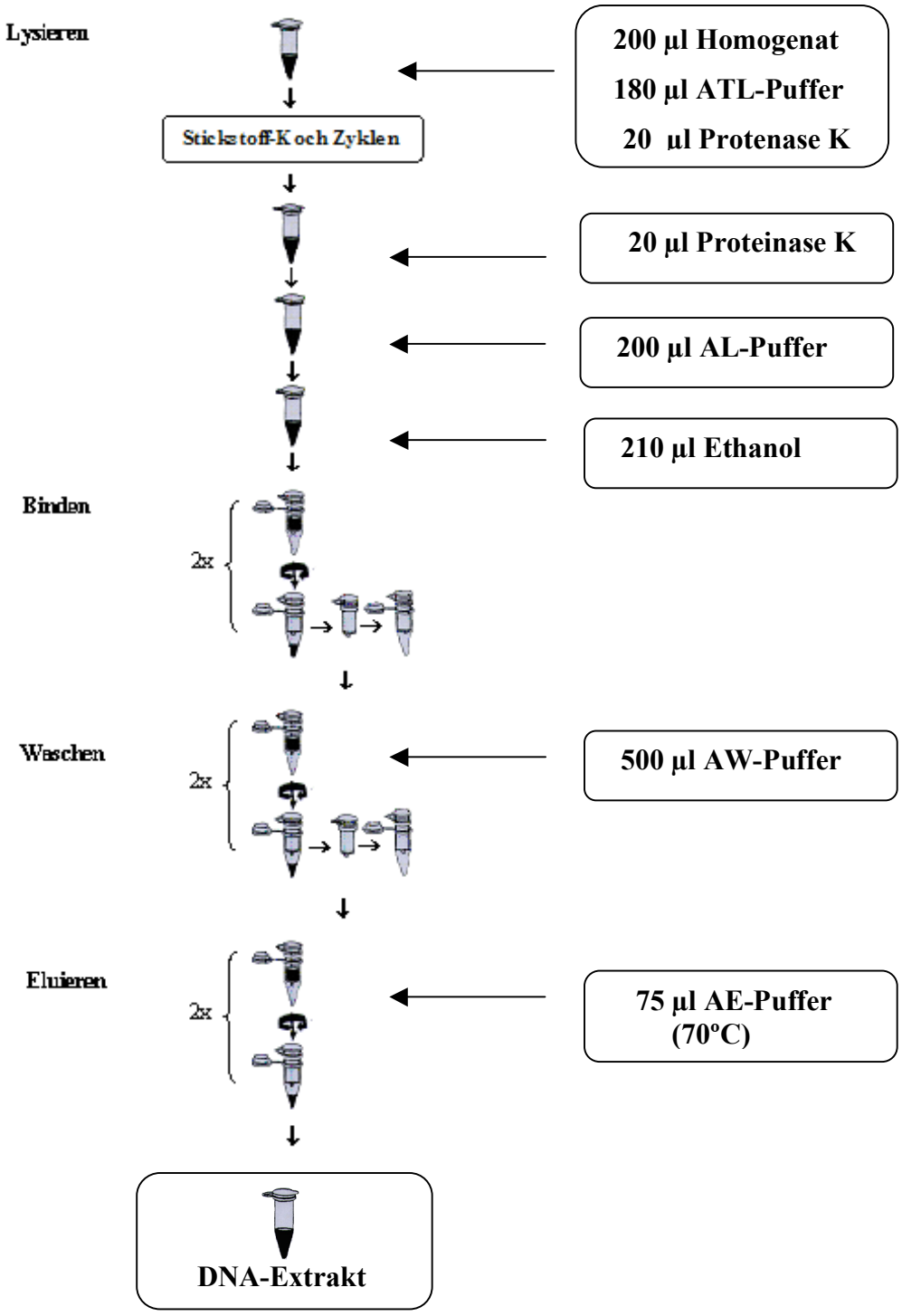


Abbildung 4: Schema der modifizierten DNA-Extraktion mittels QIAamp®Tissue Kit

: Zentrifugieren

2.11 PCR-Methoden

2.11.1 Primerdesign

Primer der spezifischer *P. brasiliensis*-PCR

Die gp43 Sequenz von *P. brasiliensis* (Gen-Bank U26160) wurde auf geeignete Primer untersucht. Mit den äußeren Primern, bezeichnet als Para I (5´-AAC TAG AAT ATC TCA CTC CCA GTC C-3`) und Para II (5‘-TGT AGA CGT TCT TGT ATG TCT TGG G-3‘), die zu den Positionen 846-870 und 1200-1176 komplementär sind, wurde ein 355 Basenpaare langes Fragment amplifiziert. Mittels innerer Primer Para III (5‘-GAT CGC CAT CCA TAC TCT CGC AAT C-3‘) und Para IV (5‘-GGG CAG AGA AGC ATC CGA AAT TGC G-3‘), die zu den Positionen 953-978 und 1148-1124 komplementär sind, wurde ein Fragment von 196 Basenpaaren amplifiziert (Tab. 1).

Tabelle 1: Primersequenz der *P. brasiliensis*-PCR mit Zielregion im gp43 Gen

Primersequenz geschrieben vom 5‘-3‘ Ende		Länge des PCR-Amplifikats (bp) im gp43 Gen
Para I	AAC TAG AAT ATC TCA CTC CCA GTC C	355
Para II	TGT AGA CGT TCT TGT ATG TCT TGG G	
Para III	GAT CGC CAT CCA TAC TCT CGC AAT C	196
Para IV	GGG CAG AGA AGC ATC CGA AAT TGC G	

Primer für die Amplifikation der kleinen Untereinheit (18S) der ribosomalen DNA von *P. brasiliensis*

Für die Sequenzierung des 18S rRNA-Gens werden die von White et al. (1990) beschriebenen universellen Pilz-Primer NS1-NS8 verwendet (Tab. 2). Damit wurde die gesamte kleine Untereinheit (18S) der ribosomalen DNA amplifiziert und analysiert.

Tabelle 2: Universelle „Pilzprimer“ für die Amplifikation der 18S rDNA mittels PCR nach White et al. (1990)

Primersequenz geschrieben vom 5‘-3‘ Ende		Länge des PCR-Amplifikats (bp)	Tm (°C)
NS 1	TA GTC ATA TGC TTG TCT C	555	56
NS 2	GGC TGC TGG CAC CAG ACT TGC		68
NS3	GCA AGT CTG GTG CCA GCA GCC	597	68
NS 4	CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG		56
NS 5	AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G	310	57
NS 6	GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC		65
NS 7	GAG GCA ATA ACA GGT CTG TGA TGC	377	65
NS 8	TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA		65

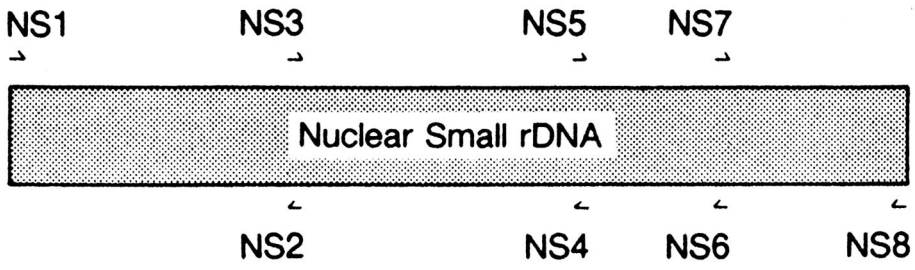


Abbildung 5 : Schematische Lokalisation der Primer NS 1-8 in der kleinen Einheit der ribosomalen DNA (Nuclear Smal rDNA nach White et al., 1990)

2.11.2 Erster Schritt spezifischer *P. brasiliensis*-PCR und 18S rDNA *P. brasiliensis*-PCR

Sowohl bei der PCR zur Amplifikation der Sequenz des gp43 Gens als auch zur Amplifikation der kleinen Untereinheit (18S) der ribosomalen DNA von *P. brasiliensis* betrug das Gesamtvolumen 50 µl, welches aus 10 µl DNA Extrakt und 40 µl Ansatzvolumen bestand und folgende Endkonzentrationen hatte: 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 2,5 mM $MgCl_2$, 1 µM eines jeden Primers, 1,5 U Ampli Taq® DNA Polymerase und 100 µM von jedem Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP's) (siehe Tab. 3).

Für die Amplifikation der 18S rDNA mittels PCR wurden die Primer NS1-8 und für die Amplifikation der Sequenz des gp43 Gens die Primer ParaI/ParaII benutzt.

Die PCR wurde im Primus PCR-Thermo-Cycler Tc 9600 (MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Die verwendeten Programme sind in den Tabellen 4 und 5 dargestellt.

Tabelle 3: Reaktionsansatz für spezifische *P. brasiliensis*-PCR mit den äußeren Primern und für die 18S rDNA-PCR

Reaktionsmix der ersten PCR:

Reagenzien	Endkonzentration		
H_2O			
10x Puffer	10 mM Tris-HCl 50 mM KCl		
$MgCl_2$-Lösung	2,5 mM $MgCl_2$		
Primer	1µM Primer	Ansatzvolumen	40 µl
Primer	1µM Primer		
dNTP's	100µM dNTP		
Taq- Polymerase	1,5 U Taq		
		+ DNA Extrakt, H_2O	10 µl
		Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 4 und 5: Darstellung des Temperaturprofile der spezifischen *P. brasiliensis*-PCR mit äußeren Primern und der PCR zur Amplifikation der 18S rDNA mit dem Primer NS1-8

PCR Programm mit ParaI/ParaII Primer		
Pre-treatment:	5 min 94°C	
Denaturierung:	30 sec. 94°C	35x
Annealing:	30 sec. 50°C	
Synthese:	60 sec 72°C	
Post-treatment:	5 min 72°C	

PCR Programm mit NS1-8 Primer		
Pre-treatment:	5 min 94°C	
Denaturierung:	30 sec. 94°C	30x
Annealing:*	30 sec. 55°C	
Synthese:	60 sec 72°C	
Post-treatment:	5 min 72°C	

* Bei PCR mit Primer NS7/NS8 wurde die Annealing Temperatur auf 60 °C erhöht

2.11.3 *P. brasiliensis* spezifische nested-PCR

Um die Sensitivität der spezifischen *P. brasiliensis*-PCR zu erhöhen, wurde eine nested-PCR durchgeführt. Die dafür verwendeten Primer ParaIII/ParaIV (inneres Primerpaar) haben ihre Bindungsstelle innerhalb des Reaktionsproduktes der ersten PCR.

Im Unterschied zu der ersten PCR betrug das Ansatzvolumen 49 µl bei einem Gesamtvolumen von 50 µl. Der Reaktionsmix der nested-PCR war weitgehend identisch mit dem der ersten PCR, jedoch betrug die Endkonzentration von jedem Desoxynukleosid-Triphosphat 50 µM und die inneren Primer ParaIII/ParaIV wurden eingesetzt (Tab. 6).

Tabelle 6: Reaktionsansatz für die nested-PCR

Reaktionsmix der nested-PCR:

Reagenzien	Endkonzentation	
H_2O		
10x Puffer	10 mM Tris-HCl	
	50 mM KCl	
$MgCl_2$-Lösung	2,5 mM $MgCl_2$	
Primer	1 µM Primer	Ansatzvolumen 49 µl
Primer	1 µM Primer	
dNTP's	50 µM dNTP	
Taq- Polymerase	1,5 U Taq	
		+ Amplifikat der ersten PCR 1 µl
		Gesamtvolumen 50 µl

Die nested-PCR wurde im gleichen Thermo-Cycler wie die erste PCR durchgeführt. Zur Erhöhung der Spezifität wurde aufgrund der hohen Schmelztemperaturen der inneren Primer eine Annealing-Temperatur von 72ºC gewählt, so dass eine so genannte two-step-PCR etabiliert werden konnte (Tab. 7).

Tabelle 7: Temperaturprofil der nested-PCR

P. brasiliensis-spezifische nested PCR

Pre-Treatment:	5 min. 94°C	
Denaturierung:	30 sec 94°C	30x
Annealing & Elongation:	60 sec 72°C	
Post-treatment:	5 min. 72°C	

2.11.4 Kontrollen

Positivkontrolle

Bei jedem PCR Ansatz wurden 100 fg klonierte *P. brasiliensis* Plasmid-DNA als Positivkontrolle mitgeführt.

Negativkontolle

Als Negativkontrolle dienten DNA-Extrakte aus Lungen von Kontrolltieren, zwei BALB/c Mäusen, die unter gleichen Bedingungen wie die infizierten Mäuse gehalten wurden, aber anstatt Konidien des *P. brasiliensis* Kochsalzlösung inhalierten. Auch menschliche DNA, die aus dem Blut von gesunden Freiwilligen stammte, wurde als Negativkontrolle benutzt. Um Kreuzreaktionen auszuschließen, wurden die DNA von *Aspergillus fumigatus*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* und *Blastomyces dermatitidis* getestet.

Kontaminationskontrolle

Zur Kontrolle von Kontaminationen während der Extraktion und der PCR wurde bei jeder DNA-Extraktion und bei jeder PCR je eine Probe mit H_2O statt DNA mitgeführt.

Inhibitorkontrolle

Alle Proben ohne PCR-Produkt wurden erneut nach Zugabe von 2 µl der klonierten *P. brasiliensi*s DNA zu 8 µl DNA-Extrakt getestet. Bei Nachweis eines PCR-Produktes konnten Inhibitoren aussgeschlossen werden, anderfalls konnte das negative Ergebnis der spezifischen PCR bei Verdacht auf PCR-Inhibitoren nicht gewertet werden.

Extraktionskontrolle

Zum Nachweis einer erfolgreichen DNA-Extraktion wurde die Maus-Aktin-PCR durchgeführt. Dabei wurde mit dem Primer Set Aktin 4: 5‘ –AGC CAT GTA CGT AGC CAT CCA GGC T-3‘ und Aktin 5: 5´-GGA TGT CAA CGT CAC ACT TCA TGA TGG-3‘ ein 450 Basenpaare langer Abschnitt des Aktin-Gens von Mäusen (NCBI, Gen Accesion Nº X03765) mittels PCR amplifiziert. Der Reaktionsansatz enthielt eine Endkonzentration von 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 1 µM von

jedem Primer, 1,5 U Ampli Taq® DNA Polymerase und 100 µM von jedem Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP's) (Tab. 8). Die PCR wurde im Thermo-Cycler mit dem in Tabelle 9 dargestelltem Programm durchgeführt.

Tabelle 8: Reaktionsansatz der Maus-Aktin-PCR

Reaktionsmix der Maus-Aktin-PCR:

Reagenzien	Endkonzentation		
H_2O			
10x Puffer	10 mM Tris-HCl		
	50 mM KCl		
$MgCl_2$-Lösung	3 mM $MgCl_2$	Ansatzvolumen	45 µl
Primer-Aktin 4	1 µM Primer		
Primer-Aktin 5	1 µM Primer		
dNTP's	100 µM dNTP		
Taq- Polymerase	1,5 U Taq		
		+ DNA-Extrakt, H_2O	5 µl
		Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 9: Temperaturprofil der Maus-Aktin-PCR

Maus-Aktin PCR Programm

Pre-treatment:	5 min 94°C	
Denaturierung:	30 sec 94°C	35x
Annealing:	30 sec 57°C	
Synthese:	60 sec 72°C	
Post-treatment:	5 min 72°C	

2.12 Klonierung

2.12.1 Aufreinigung der PCR Amplifikate

Zuerst wurde das PCR Amplifikat mittels QIAquick™ PCR Purification Kit aufgereinigt. Damit wurden die Reste der Primer, Salze, Proteine, dNTP's, Polymerase und anderer Reagenzien, die die Sequenzierungs-PCR behindern könnten, entfernt. Die Qiagensäulen wurden in beschriftete 2 ml Auffanggefäße gesteckt und anschließend mit dem Mix aus 40 µl des PCR Amplifikats und 200 PB-Puffer (Bind/Wash Puffer) befüllt. Das Volumen des PB-Puffers sollte fünf mal so groß wie das PCR Produkt-Volumen sein. Danach wurde bei 13000 rpm für eine Minute zentrifugiert, die Auffanggefäße mit deren Inhalt verworfen und die Qiagensäulen in neue Auffangefäße gesteckt. Anschließend wurde die an der Silica-Membran der Qiagensäulen gebundene DNA mit 750 µl PE-Puffer gewaschen, nochmals für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert und die Qiagensäulen in neue Auffanggefäße gesteckt. Nun wurde ein weiteres Mal bei 13000 rpm eine Minute lang zentrifugiert, um Ethanolreste aus dem PE-Puffer vollständig zu entfernen. Anschließend wurden die Qiagensäulen in beschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße umgesetzt und mit 50 µl H_2O_{bidest} in das Zentrum der Säule gefüllt. Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde wieder für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurden die Qiagensäulen verworfen. Am Ende befanden sich 50 µl gereinigtes PCR-Produkt im Reaktionsgefäß.

2.12.2 Ligation

Mit dem TOPO®TA Cloning Kit wurden die gereinigten PCR-Amplifikate in den pCR®2.1-TOPO®Vektor eingebunden (ligiert). Dieser ist schon geschnitten und durch eine Topoisomerase an der Religation gehindert. Bei der Ligation löst sich die Topoisomerase innerhalb von fünf Minuten und das PCR Fragment ligiert mit dem Vektor. Da die Taq-Polymerase am 3'-Ende eines jeden PCR-Amplifikats noch ein zusätzliches Adenosinnukleotid anhängt, ist es nötig, die „sticky ends" (Überhänge) aufzufüllen oder abzuschneiden und damit in einen „blunt end" (ohne Überhänge) geschnitten Vektor zu klonieren. Der im Kit erhaltene Vektor pCR 2.1/pCRII besitzt jeweils 3'-Thymidin-Überhänge, die dann mit überstehenden Adenosinnukleotiden hybridisieren.

Ligationsansatz:
3µl PCR-Produkt
1µl pCR®2.1-TOPO®Vektor
1µl H_2O

Nach 5 minütiger Inkubation des Ligationsansatz bei Raumtemperatur wurde dieser kurz abzentrifugiert und bis zum Einsatz in die Transformation auf Eis gestellt.

2.12.3 Transformation

Die kompetenten *Escherichia coli* „TOP10 One Shot®Zellen“ des TOPO TA Cloning® Kits wurden mit der ligierten Plasmid-DNA transformiert. 2 µl des Ligationsprodukts wurden zu 50 µl kompetenten *E. coli* Zellen pipettiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach anschließendem Hitzeschock für 30 sek. bei 42ºC wurden die Zellen auf Eis abgekühlt. Danach wurden 250 µl SOC-Medium hinzugefügt und unter Schütteln für 30-60 Minuten bei 37ºC inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf LB-Amp-Platte (Ampicillin-Konzentration: 50 µg/ml) ausplattiert, die zuvor mit X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indoly-β-D-galactopyranosid) bestrichen wurde, und über Nacht bei 37ºC inkubiert.
Der pCR®2.1-TOPO® Plasmidvektor enthält ein Gen für Ampicillinresistenz, welches ermöglicht, dass nur die erfolgreich transformierten Bakterien auf ampicillinhaltigen LB-Agar-Platten wachsen können. Neben einem Gen für Ampicillinresistenz besitzt der Vektor ein lasc'-Gen für β-Galaktosidase, welches durch Insertion in das Plasmid den Leserahmen des lasc'-Gens zerstört, so dass keine funktionsfähige β-Galaktosidase produziert werden kann. Diese Kolonien bleiben ungefärbt, da sie die im Agar enthaltenen X-Gal nicht spalten können. Die Kolonien, die keine Rekombination enthalten, sind blau gefärbt, da die β-Galaktosidase das Galaktosid am X-Gal und IPTG (Isopropylthio-β-D-Galactosid) abspaltet und diese Zellen blau verfärbt. Damit ist die sogenannte Blauweiß-Selektion nach Plattenkultur der Zellen möglich. Die ungefärbten Kolonien wurden entnommen und in LB-Medium für 24 Stunden bei 37ºC inkubiert.

2.12.4 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Am nächsten Tag konnte die Plasmid-DNA aus den Bakterienzellen isoliert und gereinigt werden. Zur Herstellung einer größeren Menge Plasmid-DNA wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit von Qiagen verwendet.

Die Übernachtkulturen der *E. coli*-Bakterien in LB-Medium wurden 15 Minuten bei 6000 rpm und 4ºC abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml P2-Puffer zur Lyse der Zellen wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 ml P3-Puffer zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 20 Minuten auf Eis gestellt.

Nach zweimaliger Zentrifugation wurde der Überstand auf eine mit 10 ml QBT-Puffer äquilibrierte Säule (QIAGEN-tip 500) gegeben. Diese Säulen (Anionenaustausch-harzsäulen, „anion exchange resin“) binden die Plasmid-DNA. Die Bindung basiert auf der Interaktion zwischen negativen Phosphatgruppen der DNA und der stationären Phase (resin), die positive Ladung trägt. Nach Waschen der Säule mit 2 x 30 ml QC-Puffer wurde die DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert.

Anschließend wurde 0,7 vol. 100%iges Isopropanol zugegeben und abzentrifugiert. Danach wurde das DNA Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, eine Stunde unter der Sterilbank getrocknet und mit 500µl H_2O_{bidest} resuspendiert..

2.13 Sequenzierung der Amplifikate

Die Amplifikate der ersten PCR wurden entsprechend den unter 2.12.1 beschriebenen Methoden gereinigt.

2.13.1 Identifizierung von PCR-Produkten

Die PCR Amplifikate wurden in 1,5%igem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel aufgetrennt und anhand des Standard VIII die Fragmentlänge bestimmt. Nach einer Laufzeit von 30-60 min. bei einer Spannung von 80 bis max. 120V wurden die Ergebnisse mittels UV-Bestrahlung sichtbar gemacht, mit digitaler Video-Fotoanlage fotografiert und dokumentiert.

2.13.2 Sequenzierungs-PCR

Für die Sequenzierung wurde das ABI PRISM®BigDye™Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit benutzt. Der Terminator Ready Reaction Mix beinhaltet:

- A-Dye Terminator, dichloro [R6G]
- C-Dye Terminator, dichloro [ROX]
- G-Dye Terminator, dichloro [R110]
- T-Dye Terminator, dichloro [TAMRA]
- Desoxynukleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dITP, dUTP)
- Enzyme: Ampli Taq®DNA Polymerase, FS
- $MgCl_2$
- Tris-Hcl Puffer, pH 9,0

Mit Dye Terminatoren, die fluoreszenzmarkierte 2‘,3‘Didesoxynukleosid-5‘Triphosphate enthalten, wurden die Amplifikate mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert.

Bei dem Desoxynukleosidtriphosphat Mix wurde dGTP durch dITP ersetzt, um Bandkompressionen zu minimalisieren, sowie dTTP durch dUTP, wodurch eine bessere Eingliederung des T-Terminators und T-Musters zu sehen war.

Der Reaktionsmix wurde aus dem Terminator Ready Reaction Mix, vorwärts oder rückwärts Primer, Aqua dest. und gereinigtem PCR Amplifikat auf ein Gesamtvolumen von 20 µl zusammengestellt (Tab. 10) und gemäß dem Schema der Sequenzierungs-PCR amplifiziert (Tab. 11).

Tab. 10: Reaktionsansatz der Sequenzierungs-PCR

Reaktionsmix für Sequenzierungs-PCR			
H_2O	10,7-12,7 µl*		
Terminator Ready Reaction Mix	4 µl	Ansatzvolumen	17 µl
Primer	0,3 µl		
		+ gereinigtes nested-PCR Amplifikat	3-5 µl*
		Gesamtvolumen	20 µl

* Je nachdem wie stark die Banden im Gel zu sehen waren, wurden 3-5 µl PCR Amplifikat sowie zwischen 12,7 – 10,7 µl Aqua dest. zugegeben.

Tab. 11: Temperaturprofil der Sequenzierungs-PCR

Sequenz-PCR Programm		
Pre-treatment:	5 min 96°C	
Denaturierung:	30 sec 96°C	25x
Annealing:	15 sec 50°C	
Synthese:	4 min 60°C	
Post-treatment:	5 min 60°C	

2.13.3 Centri-Sep Reinigung

Vor der weiteren Analyse der Sequenzprodukte wurden mittels Centri-Sep Säulen die überschüssigen Primer und fluoreszenzmarkierten Dye Terminatoren, die bei der elektrophoretischen Auftrennung im Polyacrylamidgel und somit beim Ablesen der DNA-Sequenz stören könnten, entfernt.

In den Centri-Sep Säulen befand sich trockenes Gel, das sich durch Beklopfen der Säulen auf dem Boden absetzt. Pro Reaktionsgefäß wurde trockenes Gel mit 800 µl H_2O_{bidest} hydriert, geschüttelt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurden die Säulen in 2 ml Auffanggefäße gesteckt, bei 3000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert und der Inhalt mit den Auffanggefäßen verworfen. Die Säulen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße umgesetzt, 20 µl aus der Sequenzierungs-PCR hinzupipettiert und wieder bei 3000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Die Centri-Sep Säulen wurden verworfen. In den 1,5 ml Reaktionsgefäßen befand sich nun das DNA-Eluat. Mittels Vakuum-Zentrifugation in einer Speedvac wurde das Eluat eingeengt, getrocknet und anschließend bis zum Ansatz in der Gelelektrophorese bei –20°C aufbewahrt.

2.13.4 Gelelektrophorese und Sequenzanalyse

Das getrocknete Amplifikat wurde mit deionisiertem Formamid und 25 mM EDTA (pH 8,0) mit Blue Dextran im Verhältnis 5:1 resuspendiert. Die Sequenzierungsproben wurden 2 Min. lang bei 90°C denaturiert, gleich danach auf Eis gestellt und anschließend wurden 3 µl pro Ansatz auf ein 6 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach abgeschlossener Gelelektrophorese wurde eine Sequenzanalyse mittels ABI 373 DNA Sequencer durchgeführt. Es wurde computergestützt (Macintosch Quadra 650) ein

Chromatogramm aus Basensequenzen der Ziel-DNA dargestellt und die Sequenzen mit Hilfe der Programme Datacollection 1.2.1 und Analysis 2.1. bearbeitet. Dann wurden die bearbeiteten DNA-Sequenzen unter Verwendung des BLAST-Programmes (Basic Local Alignment Search Tool) auf bestehende Homologien mit bekannten, in der GenBank aufgeführten Sequenzen untersucht und identifiziert.

Nukleotid Sequenz Zugangsnummer

Die ermittelte Sequenz der 18 Untereinheit der ribosomalen DNA von *P. brasiliensis* wurde in der GenBank in National Center for Biotechnology Information, Washington, D.C. eingereicht und befindet sich dort unter der Zugangsnummer AF 227151.

2.14 Phylogenetische Analyse

Die ermittelte Sequenz der 18S rDNA von fünf *P. brasiliensis* Isolaten wurde mit den bekannten Sequenzen anderer Pilze verglichen (Tab. 12).

Tab. 12: Namen und GenBank Zugangsnummern von Pilzarten, die für die Verwandtschaftsanalyse der ermittelten 18S rDNA *P. brasiliensis* benutzt wurden

Namen und GenBank Zugangsnummern von Spezies die analysiert wurden	
Spezies	Zugangnummer
Paracocidioides brasiliensis (Splendore) Almeida	AF227151
Blastomyces dermatitidis Gilchchrist et Stokes	M55624
Emmonsia parva (Emmons et Ashburn) Cifferri et Montemartini	U29390
Histoplasma capsulatum var. *duboisii* (Vanbreuseghem) Kwon-Chung	Z75306
Histoplasma capsulatum var. *farciminosum* Rivolta et Micelloni	Z75307
Malbranchea dendritica Sigler et Carmichael	L28064
Auxarthron zuffianum (Morini) Orr et Kuehn	L28062
Coccidioides immitis Rixford et Gilchrist	X58571
Onygena equina Persoon ex Fries	U45442
Renispora flavissima Sigler, Gaur, Lichtwardt & Carmichael	U29393
Uncinocarpus reesii Sigler et Orr	U29394
Malbranchea albolutea Sigler et Carmichael	L28063
Arthroderma benhamiae Ajello et Cheng	Z34927
Trichophyton rubrum (Castellani) Sabouraud	Z34928
Microsporum audouinii Gruby	Z34924
Epidermophyton floccosum (Harz) Langeron et Milochevitch	Z34923
Ctenomyces serratus Eidam	U29391
Gymnoascus petalosporus (Orr, Roy et Ghosh) von Arx	U29392
Aspergillus fumigatus Fresenius	M55626
Eurotium rubrum König, Spieckermann et Bremer	U00970

Um die Sequenzen der 18S rDNA den phylogenetischen Gruppen zuzuordnen wurden Alignments benötigt. In einem solchen Alignment stehen die homologen Nukleotide für jede zu untersuchende Spezies in Spalten untereinander. Das Alignment von 1,699

Basenpaaren wurde mittels des Programms Megalign (Lasergene; DNASTAR Inc.) durchgeführt und visuell optimiert. Die Sequenzen von *Arthroderma*, *Trichophyton*, *Microsporum* und *Epidermophyton* waren nur von den Positionen 518 bis 1365 verfügbar. Die Auswertung wurde mit dem Programm PAUP, Version 4.0b3a, Software (Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods; D. Swofford, Sinauer Associates) am Computer durchgeführt.
Zur Erstellung phylogenetischer Bäume aus Sequenzdaten wurden im allgemeinen distanzbasierte (Neighbor Joining) und merkmalbasierte (Maximum Parsimony und Maximum Likelihood) Methoden verwendet.

2.14.1 Neighbor Joining

Bei den distanzbasierten Methoden wird für alle Sequenzpaare eine evolutionäre Distanz berechnet und in eine Matrix überführt. Mittels der Neighbor Joining Methode wurde die Distanz mit allen erhältlichen Modellen berechnet.

2.14.2 Maximum Parsimony

Um einen genaueren Stammbaum zu bekommen, wurde in verschiedenen Analysen mit der Maximum Parsimony („sparsamen") Methode gearbeitet. Sparsam bedeutet, dass aus allen möglichen Stammbäumen derjenige ermittelt wird, der die geringste Anzahl an Nukleotidveränderungen aufweist. Es wurden die Stammbäume gesucht, in denen die Anzahl der Merkmalsveränderungen im Laufe der vermuteten Evolution, d.h. die Länge des Baums, möglichst gering ist. Die durch dieses Verfahren berechneten kürzesten Stammbäume, die als wahrscheinlichster Ablauf der Evolution angesehen werden, galten als Ausgangswert für Modifikationsverfahren.
Im ersten Schritt wird ein Ausgangsbaum gebildet. Dabei werden die im Alignment verwendeten Sequenzen in eine zufällige Reihenfolge gebracht und schrittweise zu dem Baum addiert („random addition"), wobei man diese immer an der Stelle einfügt, an der man einen optimalen (Teil)Baum erhält. Bei der „random addition" wurden 10 000 Replikate verwendet.
Im zweiten Schritt wurde der Ausgangsbaum modifiziert, um mögliche bessere Bäume zu finden. Das Modifikationsverfahren wird als „branch swapping" bezeichnet. Als Variante des „branch swapping" haben wir die „tree bisection and reconnection"

benutzt. Diese Variante deckt die meisten möglichen Stammbäume ab und besitzt somit die höchste Wahrscheinlichkeit, die kürzesten Bäume zu ermitteln. Unter Verwendung von „tree bisection and reconnection“ als Methode für „branch swapping“ wurden die acht besten Stammbäume optimiert.

In dem **Bootstrap Verfahren** werden die erhaltenen Stammbäume auf deren statistische Signifikanz überprüft. Die Bootstrapwerte wurden aus 10.000 Replikaten berechnet.

2.14.3 Maximum Likelihood

Im Maximum-Likelihood Verfahren wird computergestützt derjenige Stammbaum errechnet, der mit größter Wahrscheinlichkeit (‚likelihood“) in Abhängigkeit von den vorhandenen Daten (also den aufgelisteten und gegenübergestellten Sequenzen) am besten die Entstehung der terminalen Arten erklärt.

2.14.4 Kishino-Hasegawa Test

Am Ende haben wir den **Kishino-Hasegawa Test** zum Vergleich der unterschiedlichen Stammbäume angewendet. Dieser Test berechnet den Standardfehler sowie die Zuverlässigkeit des Intervalls für die Differenz in log-likelihoods zwischen zwei topologisch entfernten phylogenetischen Bäumen (meistens wird der beste Stammbaum mit allen anderen verglichen).

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis von P. brasiliensis spezifischer DNA

Mit der nested-PCR konnte spezifische DNA aus 21 der 23 Lungenhomogenisate, aus denen *P. brasiliensis* kultiviert wurde, amplifiziert werden. Die zwei PCR negativen Lungenhomogenisate wurden auf das Vorhandensein von Inhibitoren getestet. Eins von denen wies (BALB/c Maus 5) spezifische Inhibitoren der *P. brasiliensis* nested-PCR auf, denn die PCR blieb nach Zugabe der Zielsequenz negativ (Tab. 13). Eine zweite Extraktion konnte nicht durchgeführt werden, da kein weiteres Material mehr zur Verfügung stand. Die erfolgreiche DNA-Extraktion wurde durch den Nachweis einer Sequenz des Maus-Aktin-Gens für alle 23 Proben demonstriert (Tab. 13).
Da alle Positivkontrollen der Maus-Aktin-PCR und der spezifischen *P. brasiliensis*-PCR ein Amplifikat aufwiesen, können optimale Reaktionsbedingungen der PCR angenommen werden. Die negativen Ergebnisse der mitgeführten Leerwertkontrollen schließen Kontaminationen während der Extraktion und der PCR weitgehend aus.

3.1.1 Spezifität

Die Lungenhomogenisate von zwei BALB/c Kontrollmäusen zeigten übereinstimmend mit den negativen Kulturergebnissen ein negatives Resultat in der *P. brasiliensis* nested-PCR (Tab. 13). Es konnte weder DNA aus Lungenhomogenisaten von 20 mit *H. capsulatum* intravenös infizierten Institute-for-Cancer-Research (ICR)-Mäusen amplifiziert werden noch aus Suspensionen von *Aspergillus fumigatus*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans* und *Blastomyces dermatitidis*. Kreuzamplifikationen können damit weitgehend ausgeschlossen werden. Die zu erwartende hohe Spezifität der Primer mit Zielsequenz in einem Gen, das für ein *P. brasiliensis* spezifisches Protein kodiert, konnte damit experimentell bestätigt werden.
Die Sequenzierung aller nested-PCR Produkte aus Lungenhomogenisaten und der sieben Isolate ergab in allen Fällen eine 100%ige Übereinstimmung mit den

Nukleotidpositionen 953 bis 1148 des gp43 Gens von *P. brasiliensis* in der GenBank (accession number U26160).

Tabelle 13: Ergebnisse der *P. brasiliensis*-PCR aus Lungenhomogenisaten

Lungenhomogenisat Maus Nummer	***P.brasiliensis* CFU/gLunge**	***P. brasiliensis* nested-PCR**	**Maus-Aktin PCR**	**Inhibitor Kontroll-PCR**
BALB/c Maus 1	0.1×10^4	pos.	pos.	nd
BALB/c Maus 2	1.1×10^4	pos.	pos.	nd
BALB/c Maus 3	1.3×10^4	pos.	pos.	nd
BALB/c Maus 4	1.3×10^4	pos.	pos.	nd
BALB/c Maus 5	1.4×10^4	neg.	pos.	neg.
BALB/c Maus 6	3.2×10^4	pos.	pos.	nd
BALB/c Maus 7	3.4×10^4	neg.	pos.	pos.
BALB/c Maus 8	3.7×10^4	pos.	pos.	nd
BALB/c Maus 9	6.2×10^4	pos.	pos.	nd
BALB/c Maus 10	7.8×10^4	pos.	pos.	nd
BALB/c Maus 11	8.5×10^4	pos.	pos.	nd
BALB/c Maus 12	9.4×10^5	pos.	pos.	nd
BALB/c Maus 13	1.0×10^5	pos.	pos.	nd
BALB/c Maus 14	1.7×10^5	pos.	pos.	nd
BALB/c Maus 15	2.6×10^5	pos.	pos.	nd
BALB/c Maus 16	2.8×10^5	pos.	pos.	nd
BALB/c Maus 17	3.5×10	pos.	pos.	nd
BALB/c Maus 18	3.8×10^5	pos.	pos.	nd
BALB/c Maus 19	7.0×10^5	pos.	pos.	nd
BALB/c Maus 20	7.3×10^5	pos.	pos.	nd
BALB/c Maus 21	1.3×10^6	pos.	pos.	nd
BALB/c Maus 22	3.6×10^6	pos.	pos.	nd
BALB/c Maus 23	1.3×10^7	pos.	pos.	nd
BALB/c Maus 24	0 (Kontrolle)	neg.	pos.	nd
BALB/c Maus 25	0 (Kontrolle)	neg.	pos.	Nd
20 mit *H. capsulatum* infizierte ICR-Mäuse	20 x neg.	20 x pos.	20 x pos.	20 x pos.

Abkürzungen:
ICR – Institute for Cancer Research
nd – nicht durchgeführt
Pos. – positiv
Neg. - negativ

3.1.2 Nachweisgrenze des Verfahrens

Mit der nested-PCR konnte spezifische *P. brasiliensis* DNA aus Lungenhomogenisaten mit einer Konzentration von 1 x 10^3 bis 1.3 x 10^7 Kolonie-bildenden Einheiten von *P. brasiliensis* pro Gramm Lunge amplifiziert werden. Bei Einsatz klonierter *P. brasiliensis* DNA in Mengen von 0,5 fg (welche etwa 100 Genkopien entsprechen) bis zu 100 pg konnte ein PCR-Produkt amplifiziert werden. Diese Ergebnisse waren bei wiederholten Versuchen reproduzierbar.

Die Lungen der BALB/c Mäuse haben im Durchschnitt ein Gewicht von 100 mg, die zuerst in 2 ml Kochsalzlösung homogenisiert wurden. Nur 200 µl (10%) dieser Suspensionen wurden für die DNA-Extraktion verwendet. Die extrahierte DNA wurde in 150 µl eluiert, und nur 10 µl davon wurden in der PCR eingesetzt. Ausgehend von der geringsten Pilzkonzentration 1 x 10^3 *P. brasiliensis* CFU pro g Lunge (BALB/c Maus 1), kann mit rechnerisch weniger als 1 CFU in der Probe ein positives PCR-Ergebnis erzielt werden. Damit konnte die mittels klonierter DNA ermittelte Nachweisgrenze der Methode im Tierexperiment bestätigt werden.

3.2 Amplifikation der kleinen Untereinheit (18S) der ribosomalen DNA von *P. brasiliensis* und phylogenetische Analyse

3.2.1 *P. brasiliensis* 18S rDNA

Es wurde die gesamte 18S rDNA aus fünf *P. brasiliensis* Isolaten amplifiziert und sequenziert. Die in Abbildung 6 dargestellte Sequenz war in bei allen fünf Proben komplett identisch.

BASE COUNT 451 a 379 c 483 g 446 t

```
1    gctgtctcaa agattaagcc atgcatgtct aagtataagc aaactatacg gtgaaactgc
61   gaatggctca ttaaatcagt tatcgtttat ttgatagtac cttactactt ggatacccgt
121  ggtaattcta gagctaatac atgctaaaaa cctcgacttc ggaaggggtg tatttattag
181  ataaaaaacc aatgcccttc ggggctcctt ggtgattcat agtaacttat cgaatcgcat
241  ggccttgcgc cggcgatggt tcattcaaat ttctgcccta tcaactttcg atggtaggat
301  agtggcctac catggtggca acgggtaacg gggaattagg gttcgattcc ggagagggag
361  cctgagaaac ggctaccaca tccaaggaag gcagcaggcg cgcaaattac ccaatcccga
421  tacggggagg tagtgacaat aaatactgat acagggctct ttcgggtctt gtaattggaa
481  tgagaacaat ctaaatccct taacgaggaa caattggagg gcaagtctgt gccagcagcc
541  gcggtaattc cagctccaat agcgtatatt aaagttgttg cagttaaaaa gctcgtagtt
601  gaaccttggg tctggctggc cggtccgcct caccgcgtgc actggtccgg ccggaccttt
661  ccttctggga agccccatgg ccttcactgg ctgtgggggg aaccaggact tttactgtga
721  aaaaattaga gtgttcaaag caggcctttg ctcggataca ttagcatgga ataatagaat
781  aggacgtgtg gttctatttt gttggtttct aggaccgccg taatgattaa tagggatggt
841  cgggggcgtc agtattcggc tgtcagaggt gaaattcttg gatttgctga agactaacta
901  ctgcgaaagc attcgccaag gatgttttca ttaatcagtg aacgaaagtt aggggatcga
961  agacgatcag ataccgtcgt agtcttaacc ataaactatg ccgactaggg atcggacggg
1021 gttcatatga tgacccgttc ggcaccttac gagaaatcaa agtttttggg ttctgggggg
1081 agtatggtcg caaggctgaa cttaaggaat tgacggaagg gcaccacaag gcgtggagcc
1141 tgcggcttaa tttgactcaa cacggggaaa ctcaccaggt ccagacaaaa taaggattga
1201 cagattgaga gctctttctt gatcttttgg atggtggtgc atggccgttc ttagttggtg
1261 gagtgatttg tctgcttaat tgcgataacg aacgagacct taacctgcta aatagcccgg
1321 cccgcgtctg cgggccgctg gcttcttaga gggactatcg gctcaagccg atggaagttt
1381 gaggcaataa caggtctgtg atgcccttag atgttctggg ccgcacgcgc gctacactga
1441 cagggccagc gagtacatca ccttggccga gaggtctggg taatcttgtt aaaccctgtc
1501 gtgctgggga tagagcattg caattattgc tcttcaacga ggaatgccta gtaggcacaa
1561 gtcatcagct tgtgccgatt acgtccctgc cctttgtaca caccgcccgt cgctactacc
1621 gattgaatgg ctcagtgagg ccttcggact ggctcaggga ggttggcaac gaccgcccag
1681 agccggaaag ttggtcaaac ttggtcattt agaggaagta aaagtcgtaa caaggtttcc
1741 gtaggtgaac ctgcggaaa
```

Abbildung 6: Darstellung der kompletten Nukleotidsequenz der 18S Untereinheit der ribosomalen DNA von *P. brasiliensis*

3.2.2 Phylogenetische Analyse

Die erstmalig ermittelte Nukleotidsequenz der 18S rDNA von *P. brasiliensis* (Abb. 6), wurde mit bekannten 18S rDNA Sequenzen verwandter Pilze der Familien *Gymnoascaceae, Arthrodermaceae* und *Onygenaceae* verglichen (Tabelle 12) unter Verwendung dreier, dafür üblicherweise eingesetzter Methoden: Neighbor Joining, Maximum Parsimony und Maximum Likelihood. Die Analyse ergab eine eindeutige Zuordnung von *P. brasiliensis* zur Familie der *Onygenaceae*.

3.2.2.1 Neighbor Joining

Mit dem Neighbor Joining Verfahren (Distanz-Matrix-Programm) wurden die Distanzparameter mit verschiedenen Modellen berechnet. Die im Neighbor Joining Baum dargestellte Topologie (Abb. 7) demonstriert die verwandtschaftliche Beziehung zwischen *P. brasiliensis* und der Familie *Onygenaceae*. Die aus 10.000 Replikationen berechneten Bootstrap-Werte zeigen zwei mit 98% deutliche Verzweigungen innerhalb der *Onygenaceae*. Der eine besteht aus *Paracoccidioides brasiliensis, Blastomyces dermatitidis, Emmonsia parva, Histoplasma capsulatum var. dubiosii* und *Histoplasma capsulatum var. farciminosum* und der andere beinhaltet *Malbranchea albolutea, Malbranchea dentritica, Auxarthron zuffianum, Coccidioides immitis, Uncinocarpus reesii, Onygena equina, Renispora flavissima*. In der Abb. 7 sind nur die Bootstrap-Werte aufgeführt, die größer als 50 % sind. In dem ersten Zweig ist eine sehr geringe Distanz zwischen *H. capsulatum var. dubiosii* und *H. capsulatum var. farciminosum* zu sehen, und diese zwei sind deutlich von *P. brasiliensis* getrennt.

3.2.2.2 Maximum Parsimony

Im Maximum Parsimony Verfahren wurde aus 10.000 Replikaten zuerst ein Ausgangsbaum gebildet, und danach wurden unter Verwendung von „tree bisection and reconnection“ als Methode für „branch swapping“ die acht besten Stammbäume optimiert. Alle diese Stammbäume hatten die gleiche Baumlänge von 255 Schritten. Nach 21.284 Rearrangements in diesen acht Bäumen konnte kein kürzerer Baum erstellt werden. Der beste Baum der acht Stammbäume, der Baum Nummer drei ist in Abb. 7 auf der rechten Seite dargestellt.

Die unter Maximum Parsimony Kriterien entwickelte Topologie gleicht der durch die Neighboor Joining Methode erhaltenen Topologie. Auch letztere ergibt innerhalb der *Onygenaceae* Familie ein klares Verwandtschaftsverhältnis von *P. brasiliensis* zu *Blastomyces dermatitidis, Emmonsia parva* und *Histoplasma capsulatum* (Abb. 7).
Die mittels Neighbor Joining und Maximum Parsimony Analyse ermittelten Daten weisen auf eine monophyletische Abstammung der Familie *Onygenaceae* hin, konnten aber wegen des niedrigen Bootstrap Werts (< 50 %) nicht bestätigt werden.

3.2.2.3 Maximum Likelihood

Eine weitere Möglichkeit zur Rekonstruktion von Stammbäumen nutzt die Kriterien der Maximum Likelihood Methode. Dabei werden Merkmale einer Sequenz miteinander verglichen und ein Baum konstruiert, der die vorliegenden Daten mit größter Wahrscheinlichkeit („likelihood“) erklärt.
Bei Verwendung der Maximum Likelihood Kriterien (Basenfrequenz von A = 0,25317, C = 0,21747, G = 0,27070 und T = 0,25866; vier Substitutionstypen; invariable Seiten 0,767166; Gamma-Verteilungs-Kurvenparameter (Gamma distribution shape parameter) = 0,638474) wurde eine Topologie ermittelt, die der der Neighboor Joining Methode enstpricht (Abb. 8).

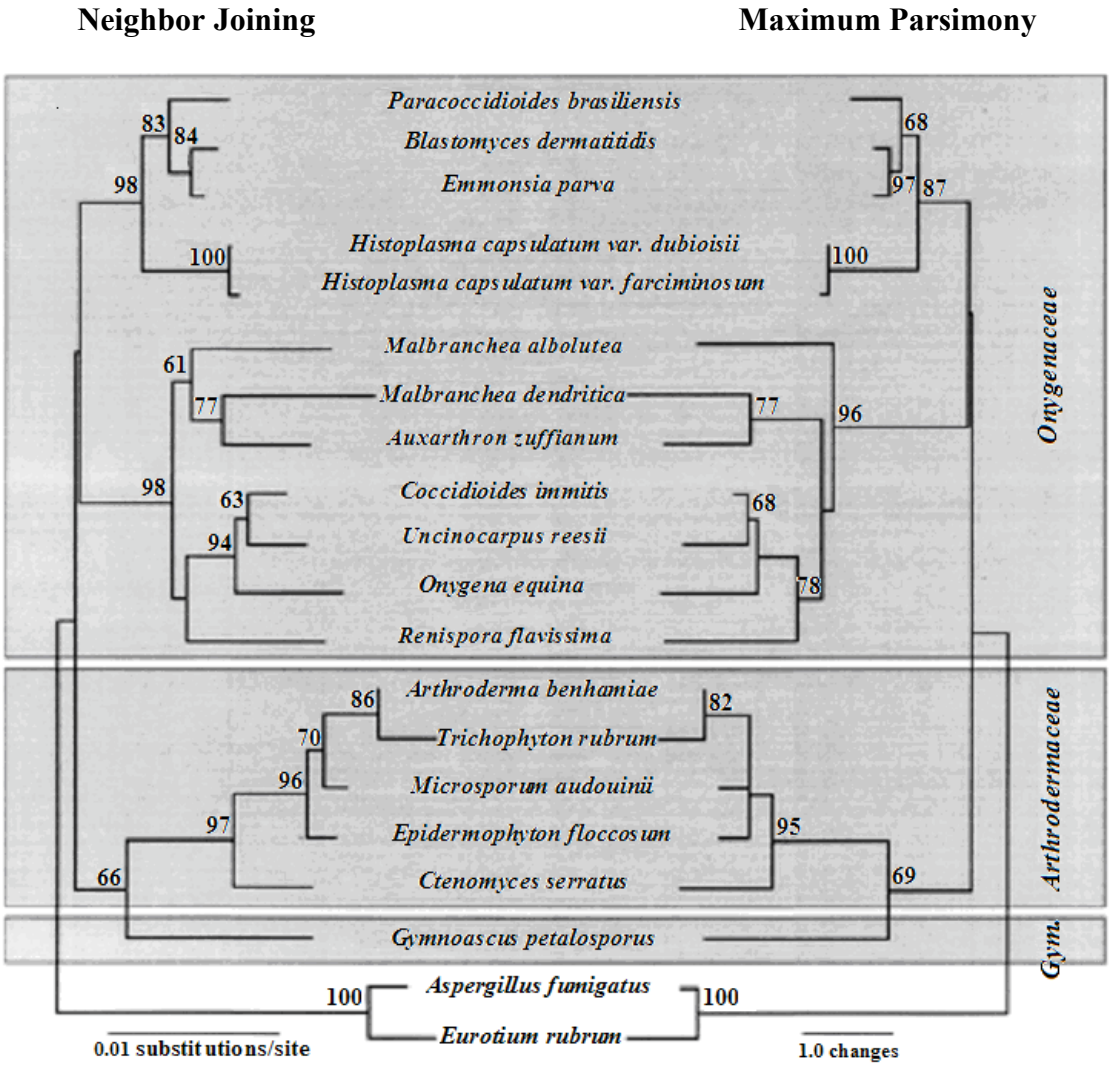


Abbildung 7: Die Topologie nach den Neighbor Joining Kriterien ist links dargestellt. Rechts ist der nach der Maximum Parsimony beste Baum der acht Stammbäume, Baum Nummer drei, dargestellt. Die phylogenetische Hypothese basiert auf dem Vergleich von 1.699 Basenpaaren der 18S rDNA von 18 Spezies der Ordnung Onygenales. Die Sequenzanordnungen wurden im Vergleich mit denen von *Aspergillus fumigatus* und *Eurotim rubrum* ermittelt. Die Bootstrapwerte, die niedriger als 50% waren, sind nicht dargestellt.

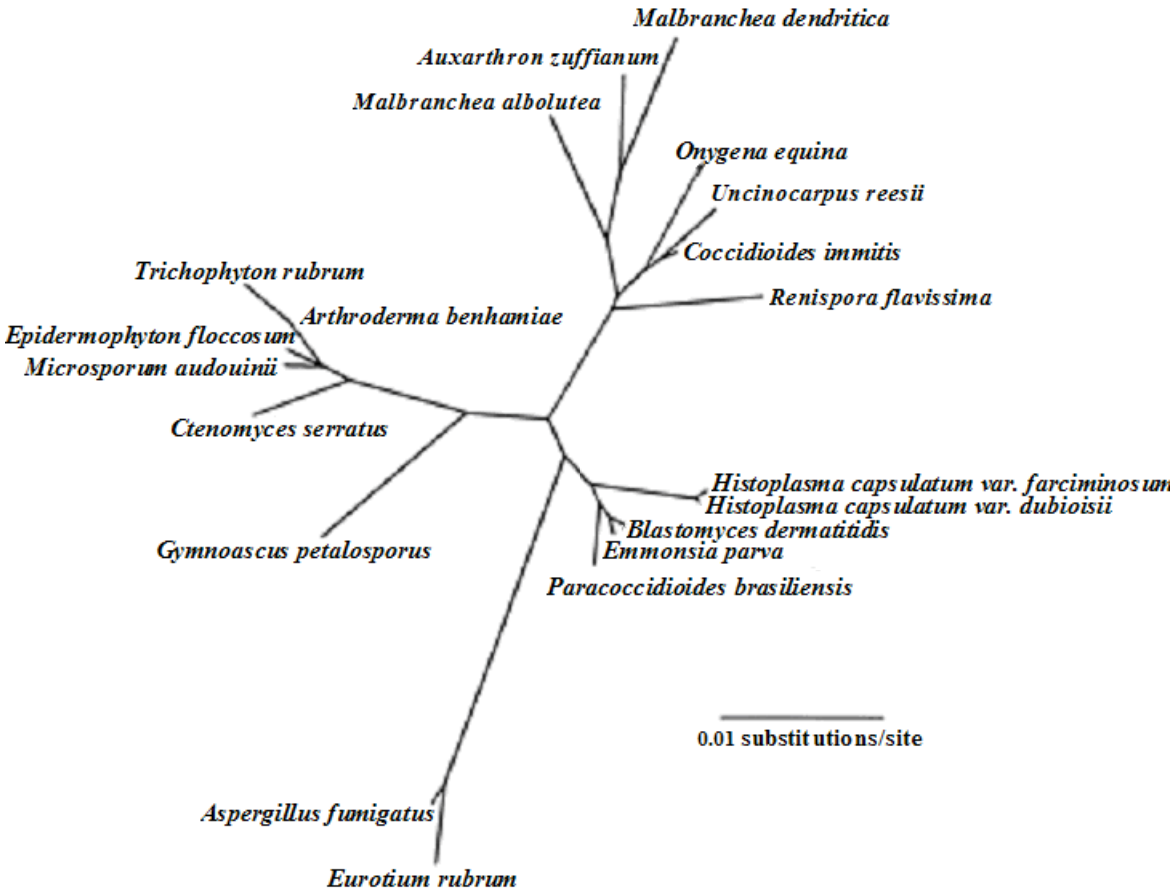


Abbildung 8: Die Topologie nach der Maximum Likelihood Analyse anhand der 18S rDNA. Die Hypothese basiert auf dem Vergleich von 1.699 Basenpaaren der 18S rDNA von 18 Spezies der Ordnung *Onygenales* zusammen mit *Aspergillus fumigatus* und *Eurotium rubrum.*

3.2.2.4 Kishino-Hasegawa Test

Die ermittelten Topologien („Verwandtschaftsbäume“) wurden mittels Kishino-Hasegawa Test verglichen. Die Klassifizierung aus elf Bäumen zeigte kein signifikant schlechteres Ergebnis als die anderen Methoden (Tab. 14).

Tabelle 14: Ergebnisse des Kishino-Hasegawa Test

Test	Tree	−ln L	Diff −ln L	SD (diff)	*t*	P^{b}
MP	1	3916.53730	7.23457	5.62549	1.2860	0.1986
MP	2	3915.63369	6.33096	5.98081	1.0585	0.2900
MP(Fig. 1, right)	3	3914.72430	5.42156	5.07218	1.0689	0.2853
MP	4	3914.72430	5.42156	5.07217	1.0689	0.2853
MP	5	3916.53730	7.23457	5.62549	1.2860	0.1986
MP	6	3915.63369	6.33096	5.98080	1.0585	0.2900
MP	7	3914.72430	5.42156	5.07218	1.0689	0.2853
MP	8	3915.63369	6.33096	5.98079	1.0585	0.2900
ML (Fig. 2)	9	3909.30274	Best			
NJ (K2P) (Fig. 1, left)	10	3912.88252	3.57979	3.82639	0.9356	0.3496
NJ (ML)	11	3910.80561	1.50287	2.12592	0.7069	0.4797

Abkürzungen:
MP: Maximum Parsimony
ML: Maximum Likelihood
NJ: Neighbor Joining
Diff.: Differenz
L: likelihood

[b] Wahrscheinlichkeit, einen grösseren *t* Wert zu bekommen unter der Null Hypothese, dass kein Unterschied zwischen zwei Bäumen besteht

4. Diskussion

4.1 Diagnostische PCR zum Nachweis von *P. brasiliensis* DNA

Die kleine Untereinheit der ribosomalen DNA (18S rDNA) von *Paracoccidioides brasiliensis* wurde in dieser Arbeit erstmalig komplett sequenziert. Der Vergleich dieses 1759 Basenpaare langen Gens von *P. brasiliensis* (GenBank accession number AF227151) mit der 18S rDNA von *Histoplasma capsulatum* (acces.no. X58572) und *Blastomyces dermatitidis* (access.no. M55624) ergab Unterschiede an lediglich 18 bzw. 15 Nukleotidpositionen. Der Plan, eine spezifische *P. brasiliensis*-PCR mit Zielsequenz in der 18S rDNA zu etablieren, musste damit aufgegeben werden.
Als alternative Zielsequenz bot sich das immundominante Glykoprotein gp43 an. Dieses extrazelluläre Glykoprotein wird erfolgreich in der Serodiagnostik zum Nachweis spezifischer Antikörper mittels verschiedener Methoden bei Patienten mit Parakokzidioidomykose eingesetzt (Puccia et al., 1986; Taborda et al., 1993; Diniz et al., 2002). Es wurden weder unspezifisch reagierende noch kreuzreagierende Antikörper bei Gesunden oder bei Patienten mit anderen Systemmykosen nachgewiesen. Ausser im Serum wurde das gp43 Antigen auch in zerebrospinaler Flüssigkeit von 14 Patienten mit Neuroparakokzidioidomykose und in bronchoalveolärer Lavage von 13 Patienten mit PCM der Lunge mittels Inhibition-ELISA nachgewiesen (Marques da Silva et al. 2003). Sensitivität und Spezifität lagen bei 100 %. Auβerdem wurde eine Kombination der Antigene gp43 und gp70 zum Nachweis mittels Immunoblot im Urin von insgesamt 12 Patienten beschrieben (Salina et al. 1998). Dabei wurde eine Sensitivität von 91% und eine Spezifität von 100 % erreicht.

Die Gensequenz von gp43 wurde von Cisalpino et al. (1996) publiziert und in der Datenbank GenBank unter der Nummer U26160 abgelegt. Die anhand dieser Sequenz bestimmten Primerpaare zeigten bei einer Suche in der Datenbank (BLAST) keine Homologien zu Gensequenzen anderer dimorpher Pilze von Mäusen oder des Menschen. Erwartungsgemäß amplifizierte die in dieser Arbeit etablierte nested-PCR mit Zielsequenz im gp43 Gen ausschließlich DNA von *P. brasiliensis* Isolaten und aus

Lungenhomogenaten von mit *P. brasiliensis* infizierten Mäusen. Im Tiermodell zeigte sich eine ausgezeichnete Sensitivität. Zudem konnte die mittels klonierter DNA bestimmte Nachweisgrenze von 0,5 fg, welche etwa 100 Genkopien entsprechen, im Tiermodell bestätigt werden, d.h. die DNA von 1 CFU im Reaktionsansatz führte zum Nachweis eines spezifischen Amplifikats.

Aus zwei der 23 Lungenhomogenate von infizierten Mäusen konnte keine spezifische *P. brasiliensis* DNA amplifiziert werden. In einem Fall zeigte die Kontrolle die Anwesenheit von spezifischen Inhibitoren an. Die zweite Probe wies eine nur geringe Pilzkonzentration von 1,4 x 10^4 auf, so dass eine unzureichende Extraktion oder eine unzureichende Konzentration spezifischer DNA im Reaktionsansatz als Ursache anzusehen ist. Wesentlich für die erfolgreiche Amplifikation pilzspezifischer DNA ist der Aufschluss von Pilzzellen und die Freisetzung von DNA zur Extraktion. In dieser Arbeit wurde der physikalische Aufschluss, bestehend aus jeweils dreimaligem Einfrieren in Flüssigstickstoff und nachfolgendem Kochen, ergänzend zur kommerziellen Extraktionsmethode, erfolgreich eingesetzt. Die frühere Verwendung von Zymoliase hatte zur Kontamination der Proben mit DNA von *Saccharomyces cerevisiae* geführt, so dass eine Alternative erforderlich wurde (Löffler et al., 1999; Rimek et al., 1999). Die erreichte Nachweisgrenze im Tiermodell bestätigt die Wirksamkeit dieser Extraktionsmethode.

Es kann davon ausgegangen werden, dass diese nested-PCR zur Diagnostik beim Menschen eingesetzt werden kann. Kurz nach Veröffentlichung der vorliegenden Daten wurde eine weitere nested-PCR mit Zielsequenz im gp43-Gen beschrieben, die zum Nachweis von *P. brasiliensis* DNA im Sputum von 11 infizierten Patienten erfolgreich eingesetzt wurde (Gomes et al., 2000). Die Autoren fanden eine vergleichbare Nachweisgrenze von 10 *P. brasiliensis* Hefezellen pro ml Sputum. Sie wiesen darauf hin, dass die Hefezellen multinukleär (4 bis 8 Kerne pro Zelle) sind, wodurch die Sensitivität der Methode erhöht wird.

Dieselbe Arbeitsgruppe beschrieb Polymorphismen im gp43 Gen. Sie verglichen die Gensequenz von zwei PCR-Produkten von 17 *P. brasiliensis* Isolaten mit der Sequenz

in der GenBank (U26160). Dabei fanden sie mehrere Punktmutationen und erstellten mit der Maximum Likelihood Methode einen phylogenetischen Baum, der drei verschiedene Gruppen, sogenannte „clades“ unterschied (Morais et al., 2000). Einige dieser Punktmutationen liegen im Bindungsbereich der in dieser Arbeit verwendeten Primer, so dass San-Blas et al. (2002) vermuteten, dass nicht alle *P. brasiliensis*-Isolate erkannt werden können. Es wurden insgesamt sechs Mutationen in der Bindungsregion des äußeren Primer Para II (5’-**T**G**T** AGA CGT TC*T* TGT A*T*G **T**CT T**G**G G-3’) beobachtet. Pro Isolat treten aber maximal zwei Mutationen auf, was die Bindungskapazität und damit die Nachweisbarkeit nicht wesentlich beeinträchtigen dürfte. Bei einer vergleichbaren PCR-Methode zum Nachweis von *Cryptococcus neoformans* DNA konnten bis zu vier Mutationen („mismatches“) in einer Primerregion die Amplifikation der DNA verwandter Spezies nicht verhindern, obwohl eine Annealing-Temperatur von 72º C gewählt wurde (Bialek et al., 2002). Dennoch sollten möglichst viele Isolate untersucht werden, um eventuellen diagnostischen Lücken durch Veränderungen der Primer zu begegnen.

In neuesten Studien haben Endo et al. (2004) das gp43 als Zielsequenz zum Nachweis von *P. brasiliensis* DNA in 22 klinischen und 7 Armadillo Isolaten eingesetzt und zwar mit Hilfe einer neuen Methode, der sogenannten loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Mit der LAMP Methode wurden die gleiche Sensitivität und Spezifität wie mit der PCR-Methode erreicht. Der Vorteil der LAMP Methode liegt in der Zeit (nur 3 Stunden), die notwendig ist, um *P. brasiliensis* DNA nachzuweisen.

Außer dem gp43 kDa Antigen wurden weitere Antigene von *P. brasiliensis* beschrieben und als potenziell für diagnostische Zwecke einsetzbar dargestellt. Das Hauptproblem in der PCM Serodiagnostik ist der Nachweis von kreuzreagierenden Antikörpern in Seren von Patienten mit anderen Systemmykosen, meist Seren von Patienten mit Histoplasmose.

So wurden von Gomez et al. (1997) beim Nachweis des 87 kDa Antigens in Seren von Patienten mit Parakokzidioidomykose (46 Patienten) Kreuzreaktionen zu Seren von Patienten mit Aspergillose und Histoplasmose beobachtet. Als mögliche Erklärung

dafür, dass auch ein positives Ergebnis in Seren von Patienten mit Tuberkulose beobachtet wurde, vermuteten die Autoren eine Koinfektion von Tuberkulose und PCM. Der Nachweis wurde erbracht mit Hilfe eines Inhibition-ELISA. Im ganzen wurde in dieser Studie eine Spezifität von 81,4 % und eine Sensitivität von 80,4 % erreicht. Diez et al. (2002) haben das 87 kDa Antigen purifiziert, weiter charakterisiert, als Hitzeschockprotein (hsp) identifiziert und in der Immundiagnostik der Parakokzidioidomykose eingesetzt. Dabei wurde in Biopsieproben mittels Western Blot eine Kreuzreaktion zwischen monoklonalen Antikörpern, die zum Nachweis von *H. capsulatum* 80-kDa hsp dienen, und purifiziertem 87 kDa Antigen nachgewiesen.

Da Silva et al. (1999) charakterisierten das 70 kDa Hitzeschockprotein (hsp 70) von *P. brasiliensis*. Da die Autoren eine hohe Homologie zu Hitzeschockproteinen anderer Pilze beschrieben (z. B. *H. capsulatum* 89,2 %), wurde das kodierende Gen nicht als Zielsequenz einer diagnostischen PCR-Methode in Betracht gezogen.

Vor kurzem wurde ein anderes Hitzeschockprotein (hsp 60) von *P. brasiliensis* kloniert und identifiziert (Izacc et al., 2001). Das hsp 60 wurde von Cunha et al. (2002) purifiziert und im Westernblot zum Antikörpernachweis in Seren von 75 Patienten mit PCM eingesetzt. Die Senstitivität dieser Methode lag bei 97,3 %, die Spezifität bei 92,5 %. Falsch positive Ergebnisse wurden in Seren von Gesunden (9,52 %) sowie in Seren von Patienten mit Histoplasmose (11,5 %) beschrieben. In Seren von Patienten mit Aspergillose, Kryptokokkose, Sporotrichose und Tuberkulose wurden keine kreuzreagierenden Antikörper beobachtet.

Sandhu et al. (1997) sequenzierten ein 800 Basenpaare langes Amplifikat aus der großen Untereinheit (28S) des ribosomalen Gens von *P. brasiliensis*. Sie entwickelten eine 14 Basen lange Hybridisierungssonde, um *P. brasiliensis* Stämme unter 48 verschiedenen Pilzarten zu identifizieren. Diese Methode wurde von De Brito et al. (1999) zum Nachweis von *P. brasiliensis* spezifischer DNA in Biopsieproben der Mundhöhle von sieben Patienten und in Hoden von Meerschweinchen verwendet. Dabei zeigten sich positive Ergebnisse in Anwesenheit von Candida spp. Hefezellen. Die Hybridisierungsmethode wurde in Kombination mit der Gridley Farbmethode, die zum

Nachweis von Pilzzellenwand dient, verwendet. Dabei wurden nur 2-3 % der in den Untersuchungsmaterialien enthaltenen *P. brasiliensis* Hefezellen nachgewiessen, so dass sich diese Nachweismethode also nicht für die Routinediagnostik eignet.

Die PCR-Methode hat den Vorteil, dass sie wenig Zeit benötigt, einfach durchzuführen ist, sensitiv ist und sich deswegen sehr gut zur Routinediagnostik eignet. Die erste PCR, die zum Nachweis von *P. brasiliensis* DNA diente, wurde von Goldani et al. (1995); Goldani und Sugar, (1998) beschrieben. Die Autoren klonierten und sequenzierten ein 110 Basenpaare langes Fragment von *P. brasiliensis* und verglichen dieses mit anderen Gensequenzen in der GenBank. Dabei wurde eine 60%ige Homologie zum Exon eines Oberflächenglykoproteins von *Pneumocystis carinii* und zu einem Fragment mit unbekannter Funktion im *Saccharomyces cerevisiae* Chromosom VIII festgestellt. Um die Spezifität dieses 110 bp langen DNA Fragments zu bestimmen, wurde DNA von *P. brasiliensis*, DNA von Ratten und Menschen sowie DNA von *C. albicans, B. dermatitidis, H. capsulatum, C. neoformans, A. fumigatus, S. cerevisiae* und *P. carinii* mittels der Southern Hybridization Methode analysiert. In der Southernblot-Analyse detektierte das ^{32}P-markierte 110bp Fragment nur 1.0 und 1.9 kb Restriktionsfragmente innerhalb der DNA von *P. brasiliensis*, die mit HindIII und PstI verdaut worden war, nicht jedoch in der DNA von anderen Pilzen, Ratten- und Menschengewebe. Daraufhin wurden Primer für dieses *P. brasiliensis* spezifische Fragment definiert und zur Diagnostik von Untersuchungsmaterial von Mäusen verwendet. In dieser Studie wurde die Sensitivität der PCR zum Nachweis von *P. brasiliensis* DNA im Serum mit Blutkulturen und die Anzahl kultivierter Pilzkolonien (CFU) aus infizierten Lungen der Mäuse verglichen. Mittels PCR war es möglich, *P. brasiliensis* DNA in allen fünf Serumproben nachzuweisen. Die niedrigste nachweisbare Menge an *P. brasiliensis* DNA betrug 10 pg. Von den fünf Blutkulturen waren lediglich zwei positiv, was auf eine bessere Sensitivität der PCR-Methode deutet. Die Serumproben der drei nichtinfizierten Mäuse zeigten mittels beider Methoden ein negatives Ergebnis. Es wurde jedoch mit dieser PCR nicht die DNA anderer Pilze in Seren von Tieren bzw. humane Proben mit anderen Pilzinfektionen untersucht, so dass die Effizienz der PCR mittels dieser Methode weiter beurteilt werden sollte.

In mehreren Studien wurde das 27 kDa Protein von *P. brasiliensis* untersucht und später als Zielsequenz für die Entwicklung einer PCR genutzt. Das 27 kDa Protein von *P. brasiliensis* wurde von McEwen et al. (1996) kloniert, sequenziert und charakterisiert. Zunächst wurden von Ortiz et al. (1996) Antikörper gegen dieses Protein bei 91 % der insgesamt 44 Patienten mit Parakokzidioidomykose im Immunoblot gefunden, jedoch bei keinem Patienten mit Histoplasmose, Aspergillose, Kryptokokkose, Sporotrichose, Chromoblastomykose oder Tuberkulose. Später wurden von Ortiz et al. (1998) 160 Seren in einem Elisa mit dem 27 kDa Protein als Antigen untersucht, und dabei zeigten Seren von Patienten mit Aspergillose (73,3 %) und Histoplasmose (40 %) positive Reaktionen. Eine PCR mit Zielsequenz im Gen dieses Proteins wurde von Diez et al. (1999) zum Nachweis von *P. brasiliensis* spezifischer DNA in Erdproben und Armadillos eingesetzt, deren Nachweisgrenze mit 3 pg angegeben wurde. Die DNA von *Histoplasma* und *Aspergillus* spp. wie auch von anderen Pilzen (*B. dermatitidis, S. cerevisiae, C. albicans, C. neoformans, S. schenckii*) wurde nicht amplifiziert. Auch hier wurde im Vergleich zur Kultur eine höhere Sensitivität mit der PCR-Methode erreicht. Bis jetzt wurde noch keine diagnostische PCR mit Zielsequenz in diesem Gen in menschlichen Proben beschrieben. Der Antikörpernachweis gegen die 27 kDa und 87 kDa Antigene separat oder in Kombination wurde mittels ELISA von Diez et al. (2003) in Seren von 37 Patienten durchgeführt. Antikörper gegen das 27 kDa Antigen wurden nur in Seren von 18 Patienten (49 %), gegen das 87 kDa Antigen in Seren von 30 Patienten (81 %) und gegen die Kombination von beiden Antigenen in Seren von 34 der insgesamt 37 Patienten (92 %) nachgewiesen. Außerdem wurden mit diesen beiden Antigenen falsch-positive Ergebnisse in Seren von Gesunden sowie Kreuzreaktionen zu Seren von Patienten mit Aspergillose und Histoplasmose beobachtet.

Gleichzeitig mit der Veröffentlichung der vorliegenden Arbeit wurde von Motoyama et al. (2000) eine weitere PCR Methode zum Nachweis von *P. brasiliensis* beschrieben. Dort wurde zunächst mittels PCR und Primer ITS1 and ITS4 (White et al., 1990) die komplette Sequenz aus der Region 5.8S, Teile der 28S und 18S rDNA Sequenz sowie ihre Zwischenabschnitte („intergenic region“) amplifiziert und sequenziert. Zusätzlich wurde der spezifische Rückwärts-Primer OL5 für *P. brasiliensis* mit der Zielsequenz in der 5.8S rDNA ausgesucht. Mit Hilfe der PCR und dem Set der Primer OL5 und ITS1

wurde das 469 Baasenpaare lange Amplifikat von *P. brasiliensis* vervielfältigt. In dieser PCR kam es zur Kreuzreaktion mit der DNA von *H. capsulatum,* nicht aber mit der DNA von *A. fumigatus, C. albicans, C. immitis* und *S. cervisiae*. Um dieses Problem zu lösen, wurde zuerst mittels PCR und den universalen Primern UNI-F und UNI-R (Haynes et al., 1995) das 617 bp lange Fragment von *P. brasiliensis* in der 28S rDNA Region amplifiziert und kloniert sowie ein für *P. brasiliensis* spezifischer Primer OL3 in dieser Region ausgesucht. In der PCR und dem Set der Primer OL3 und UNI-R wurde nur die *P. brasiliensis* DNA, nicht aber die *H. capsulatum* DNA amplifiziert. Jedoch wurde weder die Nachweisgrenze dieser PCR beschrieben, noch wurde sie in menschlichen Proben evaluiert.

Im Gegensatz zu den anderen erwähnten Arbeiten wurde in dieser auf Grundlage des gp43 Antigens eine hervorragende Sensitivität sowie eine 100%ige Spezifität der PCR bewiesen. Es wurde keine DNA anderer nahe verwandter dimorpher Pilze, insbesondere keine DNA aus Gewebeproben *H. capsulatum* infizierter Mäuse oder DNA aus Gewebeproben von Kontrolltieren amplifiziert.

4.2 Phylogenetische Analyse der kleinen Untereinheit (18S) der ribosomalen DNA von *P. brasiliensis*

Der mittels 18S rDNA Sequenz erstellte phylogenetische Stammbaum (Abb. 7) zeigt eine Trennung der Gattungen *Blastomyces, Histoplasma, Paracoccidioides* und *Emmonsia* von anderen Mitgliedern der Familie *Onygenace*ae. Ein vergleichbarer Stammbaum auf der Basis der 18S rDNA jedoch ohne *P. brasiliensis* wurde von Bowman et al. (1992) publiziert. Im Unterschied dazu ergab die phylogenetische Analyse anhand einer partiellen 26S rDNA-Sequenz einen Stammbaum, in dem *P. brasiliensis* zusammen mit *Histoplasma spp*., aber separat von *Emmonsia* und *Blastomyces dermatitidis* zu finden ist (Gueho et al., 1997). Dieses Ergebnis konnte aber nicht durch entsprechende Bootsrap-Werte abgesichert werden. Leclerc et al. (1994) analysierten die große Untereinheit der 25S rDNA Sequenz phylogenetisch und ordneten *P. brasiliensis* zusammen mit *B. dermatitidis* und *H. capsulatum* ein.

In einem weiteren Stammbaum basierend auf den Sequenzen der ITS 1 und 2 (internal transcribed spacer), den 5.8S rDNA-Regionen und den Domänen D1 und D2 der großen Untereinheit der rDNA ist *P. brasiliensis* zwischen *Emmonsia crescens* einerseits und *B. dermatitidis* und *Emmonsia parva* andererseits eingeordnet, aber deutlich getrennt von *H. capsulatum* (Peterson und Sigler, 1998). Die in unserer Arbeit ermittelten Ergebnisse bezüglich der 18S rDNA Sequenz stimmen mit letzterem überein.

Aufgrund der Gesamtheit der bis hierher gewonnenen phylogenetischen Ergebnisse kann *P. brasiliensis* der Familie Onygenaceae in der Ordnung Onygenales and Phylum Ascomycota zugeordnet werden. Der Teleomorph (sexuelle Entwicklungsphase der Pilze) von *P. brasiliensis* ist nicht bekannt. Mittels der Neighbor Joining, Maximum Parsimony und maximum Likelihood Methoden sowie des Kishino-Hasegawa Tests wurde *P. brasiliensis* zusammen mit *B. dermatitidis* und *H. capsulatum* eingeordnet, bei welchen sich das Teleomorph im Genus Ajellomyces befindet. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass wenn einmal das Teleomorph von *P. brasiliensis* gefunden wird, es dem Genus der Ajellomyces angehören wird.

Die Hypothese einer Monophylie (alle Abkömmlinge eines Taxons stammen von einer einzigen Stammart ab) der Familie *Onygenaceae,* die sich aus dem mittels Neighbor Joining und Maximum Parsimony Methode erstelltem Baum ergibt, kann wegen der niedrigen Bootstrap-Werte nicht bestätigt werden. Die Maximum Likelihood Analyse spricht eher für paraphyletische (ein Taxon, das nicht alle Nachfahren einer Stammart beinhaltet) Abstammung. Es werden zwei Vorfahren für die Familie der Onygenaceae angenommen, einer für die Gruppe der überwiegend humanpathogenen Arten der Gattungen *Paracoccidioides, Emmonsia, Blastomyces* und *Histoplasma* sowie einer für die übrigen Mitglieder der Familie Onygenaceae. Dennoch bleiben beide Gruppen eng mit einander verwandt.

Aufgrund der 18S rDNA-Sequenz vermutet man in *Lacazia loboi* das Schwestertaxon von *P. brasiliensis* (Herr, 2001). Allerdings weist der Stammbaum sowohl eine Distanz zwischen zwei *L. loboi* Isolaten als auch eine deutliche Distanz zu *P. brasiliensis* auf. Die Ähnlichkeit zwischen den zwei *L. loboi*-Isolaten betrug nur 98 % und war damit

kleiner als die Homologien der 18S rDNA von *P. brasiliensis* und *B. dermatitidis* (99 %). In der gleichen Studie wurde auch das Chitin Synthese (CHS) Gen untersucht. Beim Vergleich des CHS2 Gens (Chitin Synthese-2 partial) von *L. loboi* mit mehreren in der GenBank abgelagert CHS2 Gensequenzen der Familie *Onygenaceae* sowie acht anderen Pilzen wurde das verwandtschatliche Verhältnis von *L. loboi* mit *P. brasiliensis* bestätigt (Herr, 2001).

Eine Gruppenunterteilung kann hilfreich sein beim Aussuchen einer spezifischen Zielsequenz, die dem diagnostischen Erregernachweis dient. Deswegen ist es wichtig, bei der Entwickung einer spezifischen PCR die Zielregion der Primer auf nahe verwandten humanpathogenen Pilzen zu untersuchen, um mögliche Kreuzreaktionenen zu vermeiden.

Schlussfolgerungen

Der humanpathogene dimorphe Pilz *Paracoccidioides brasiliensis* konnte taxonomisch auch anhand der 18S rDNA-Sequenz in die Familie der Onygenaceae eingeordnet werden. Die gefundenen Sequenzhomologien sprachen gegen den Aufbau einer diagnostischen PCR mit Zielsequenz in diesem sogenannten multicopy Gen. Als hervorragende Alternative konnte die Gensequenz eines immundominanten und spezifischen Glykoproteins (gp43) verwendet werden. Die hier ermittelte Sensitivität, Nachweisgrenze und Spezifität stellen eine ausgezeichnete Basis dar, um die neu etablierte nested-PCR Methode in der Diagnostik der Parakokzidioidomykose des Menschen zu evaluieren.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war der Aufbau einer PCR-Methode zum Nachweis von DNA des dimorphen humanpathogenen Pilzes *Paracoccidioides brasiliensis*. Es wurde zuerst erwogen die Zielsequenz in die kleine Untereinheit der ribosomalen DNA (18S rDNA) zu legen, da die Anwesenheit multipler Kopien pro Genom eine hohe Sensitivität der Methode gewährleistet. Die erstmalig durchgeführte Sequenzierung des Gens zeigte jedoch eine ausgesprochene Homologie zu nahe verwandten Pilzarten. Da eine diagnostische PCR eine Unterscheidung der DNA insbesondere zu anderen dimorphen Pilzen leisten sollte, wurde als Alternative das Gen des *P. brasiliensis* spezifischen Glykoproteins gp43 gewählt.

Die nested-PCR amplifizierte DNA ausschließlich von *P. brasiliensis* Isolaten, so dass sie zur Stammidentifizierung verwendet werden konnte. Aus 21 von 23 Lungenhomogenaten infizierter Mäuse konnte *P. brasiliensis* spezifische DNA amplifiziert werden, jedoch weder aus Lungenhomogenaten von 20 mit *H. capsulatum* intravenös infizierten Mäusen noch aus denen von zwei Kontrolltieren. Die Nachweisgrenze von 0,5 fg wurde mit klonierter Plasmid-DNA ermittelt. Diese konnte im Tiermodell mit Nachweis spezifischer DNA aus Lungenhomogenaten mit mindestens 1 x 10^3 bis maximal 1,3 x 10^7 Kolonie-bildenden Einheiten pro Gramm Gewebe bestätigt werden. Die Sequenzierung aller nested-PCR Produkte aus Lungenhomogenaten und von sieben Isolaten ergab in allen Fällen eine 100%ige Übereinstimmung mit dem gp43-Gen von *P. brasiliensis* in der Datenbank GenBank.

Die erstmalig ermittelte Nukleotidsequenz der 18S rDNA von fünf *P. brasiliensis* Isolaten wurde mit den bekannten 18S rDNA-Sequenzen verwandter Pilze der Familien *Gymnoascaceae, Arthrodermaceae* und *Onygenaceae* in der Ordnung *Onygenales* verglichen. Unter Verwendung von drei dafür üblicherweise eingesetzten Methoden (Neighbor Joining, Maximum Parsimony und Maximum Likelihood) sowie unter Anwendung des Kishino-Hasegawa Tests wurde gezeigt, dass *P. brasiliensis* näher mit *B. dermatitidis* und *E. parva* verwandt ist als *B. dermatitidis* mit *H. capsulatum*, deren beide teleomorphen Formen zur Gattung *Ajellomyces* zählen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Autoren wurde eine eindeutige Zuordnung von *P. brasiliensis* zur

Familie der *Onygenaceae* festgestellt. Es finden sich Hinweise in der phylogenetischen Analyse, dass die Gruppe der Gattungen mit humanpathogenen Spezies, also *Paracoccidioides, Emmonsia, Blastomyces* und *Histoplasma* einen getrennten evolutionären Hintergrund haben. Dennoch sind die anderen Gattungen *Auxarthron, Coccidioides, Malbranchea*, *Onygena*, *Renispora* und *Uncinocarpus*, der Familie Onygenaceae nahe verwandt mit der ersten Gruppe.

Nachdem *P. brasiliensis* auch anhand seiner 18S rDNA Sequenz taxonomisch in der Familie der Onygenaceae eingeordnet werden konnte, wurde eine spezifische und sensitive nested-PCR mit Zielsequenz im Gen des immundominanten gp43 Glykoproteins aufgebaut. Diese soll in der Diagnostik der Parakokzidiodomykose und zur Differenzialdiagnostik anderer endemischer Systemmykosen des Menschen in weiteren Studien evaluiert werden.

6. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
A. fumigatus	*Aspergillus fumigatus*
AIDS	Acquired Immuno Deficiency Syndrome (Erworbenes Immun- (oder Abwehr-) schwäche-Syndrom)
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BPB-Puffer	Bromphenolblau-Ladepuffer
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
B. dermatitidis	*Blastomyces dermatitidis*
BPB	Bromphenolblau
C	Cytosin
C. albicans	*Candida albicans*
CFU	Colony forming units, Kolonie-bildende Einheit
CHS	Chitin Synthese
CIE	Gegenstromelektrophorese, Counterimmunoelectrophorese
C. immitis	*Coccidioides immitis*
C. neoformans	*Cryptococcus neoformans*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E. coli	*Escherichia coli*
E. crescens	*Emmonsia crescens*
ELISA	Enzym linked Immunosorbent Assay
E. parva	*Emmonsia parva*
F	Fluoresceinmarkierung

fg	femtogramm
G	Guanin
GMS- Färbung	Gomori's Methenamin Silber – Färbung
Gp43	Glycoprotein 43
GTP	Guanosintriphosphat
H. capsulatum	*Histoplasma capsulatum*
H_2O bidest	doppelt destiliert
H&E-Färbung	Hematoxylin und Eosin - Färbung
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human leukozytäre Antigen
Hsp	Hitzeschockprotein
IB	Immunoblottest
ICR	Institute-for-Cancer-Research
IDD	Doppel-Immundiffusion
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
inh-ELISA	Inhibition enzyme-linked immunosorbent assay
IPTG	Isopropylthio-β-D-galactosid
ITS	Internal transcribed spacer
kb	kilobase
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
LAMP	Loop-mediated isothermal amplifikation
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
L. loboi	*Lacazia loboi*
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
mm	Millimeter
mM	Millimol
ml	Milliliter
ML	Maximum Likelihood
MP	Maximum Parsimony

N-Terminus	Aminoterminus, aminständiger Aminosäure Rest
NJ	Neighbor Joining
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
ODC	Ornithin-Decarboxylase
P. brasiliensis	*Paracoccidioides brasiliensis*
P. carinii	*Pneumocystis carinii*
PCM	Parakokzidioidomykose
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pg	picogramm
rDNA	ribosomale DNA
Rh-Faktor	Rhesusfaktor bei Blutgruppen
rpm	Rotations per minute, Umdrehungen pro Minute
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
spp.	Spezies
S. schenckii	*Sporothrix schenckii*
T	Thymin
TAE-Puffer	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
Taq	*Thermus aquaticus*
U	Unit (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indoly-β-D-galactopyranosid

7. Literaturverzeichnis

1. Albornoz, M.B. (1971)
   Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela.
   Sabouraudia, 2, 248-252

2. Aristizabal, B.H., Clemons, K.V., Stevens, D.A., Restrepo, A. (1998)
   Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females.
   Infect Immun, 66, 5587-5591

3. Bagagli, E., Sano A., Coelho, K.I., Alquati, S., Miyaji, M., de Camargo, Z.P., Gomes, G.M., Franco, M., Montenegro, M.R. (1998)
   Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (Dasypus noveminctus) captured in endemic area of paracoccidioidomycosis.
   Am J Trop Med Hyg, 58, 505-512

4. Benard, G., Duarte, J.S. (2000)
   Paracoccidioidomycosis: A Model for Evaluation of the Effect of Human Immunodeficiency Virus Infection on the Natural History of Endemic Tropical Diseases.
   Clinical Infectious Diseases, 31, 1032-1039

5. Bialek, R., Weiss, M., Bekure-Nemariam, K., Najvar, L.K., Alberdi, M.B., Graybill, J. R., Reischl, U. (2002)
   Detection of *Cryptococcus neoformans* DNA in tissue samples by nested and real time PCR assays.
   Clin Diagn Lab Immunol, 9, 461-469

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

7. Borges-Walmsley, M.I., Chen, D., Shu, X., Walmsley, A.R. (2002)
   The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*.
   Trends Microbiol, 10, 80-87

8. Bowman, B.H., Taylor, J.W., White T.J. (1992)
   Molecular evolution of the fungi: human pathogens.
   Mol Biol Evol, 9, 893-904

9. Boxwalla, A.A. (2002)
   Paracoccidioidomycosis
   eMedicine Journal Artikel
   Online: http://www.emedicine.com/med/topic1731.htm

10. Brummer, E., Castaneda, E., Restrepo, A. (1993)
Paracoccidioidomycosis: an Update
Clin Microbiol Rev, 6, 89-117

11. Camargo Z.P., Gesztesi J.L., Saraiva E.C., Taborda C.P., Vicentini A.P., Lopes J.D. (1994)
Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis.
J Clin Microbiol, 32, 2377-2381

12. Cisalpino, P.S., Puccia, R., Yamauchi, L.M., Cano, M.I., da Silveira, J.F., Travassos, L.R. (1996)
Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*.
J Biol Chem, 271, 4553-4560

13. Coutinho, Z.F., Silva, D., Lazera, M., Petri, V., Oliveira, R.M., Sabroza, P.C., Wanke, B. (2002)
Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995).
Cad Saude Publica, 18, 1441-1454

14. Cunha, D.A., Zancope-Oliveira, R.M., Sueli, M., Felipe, S., Salem-Izacc, S.M., Deepe, G.S. Jr., Soares, C.M. (2002)
Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*.
Clin Diagn Lab Immunol, 9, 374-377

15. DaSilva, S.P., Borges-Walmsley, M.I., Pereira, I.S., Soares, C.M., Walmsley, A.R., Felipe, M.S. (1999)
Differential expression of an hsp70 gene during trasition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*.
Mol Microbiol 31, 1039-1050

16. De Araujo, M.S., Mesquita, R.A., Correa, L., de Sousa, S.O. (2001)
Oral exfoliative cytology in the diagnosis of paracoccidioidomycosis.
Acta Cytol, 3, 360-364

17. De Brito, T., Sandhu, G.S., Kline, B.C., Aleff, R.A., Sandoval, M.P., Santos, R.T., Brandao, A.A., Lacaz, C.S. (1999)
In situ hybridization in paracoccidioidomycosis.
Med Micol, 37, 207-211

18. Del Negro, G.M., Garcia, N.M., Rodrigues, E.G., Cano, M.I., de Aguiar, M.S., Lirio, Vde S., Lacaz, Cda S. (1991)
The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of Paracoccidioidomycosis.
Rev Inst Med Trop Sao Paulo 33, 277-280

19. Diez, S., Gomez, B.L., Restrepo, A., Hay, R.J., Hamilton, A.J. (2003)
Combined use of Paracoccidioides brasiliensis recombinant 27-kilodalton and purified 87-kilodalton antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis.
J Clin Microbiol, 41, 1536-1542

20. Diez, S., Gomez, B.L., Restrepo, A., Hay, R.J., Hamilton, A.J. (2002)
Paracoccidioides brasiliensis 87-kilodalton antigen, a heat shock protein useful in diagnosis: characterization, purification, and detection in biopsy material via immunohistochemistry.
J Clin Microbiol, 40, 359-365

21. Diez, S., Garcia, E.A., Pino, P.A., Botero, S., Corredor, G.G., Peralta, L.A., Castano, J.H., Restrepo, A., McEwen, J.G. (1999)
PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies.
Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 41, 351-358

22. Diniz, S.N., Carvalho, K.C., Cisalpino, P.S., Silveira, J.F., Travassos, L.R., Puccia, R. (2002)
Expression in bacteria of the gene encoding the gp43 antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*: immunological reactivity of the recombinant fusion proteins.
Clin Diagn Lab Immunol, 9, 1200-1204

23. Endo, S., Komori, T., Ricci, G., Sano, A., Yokoyama, K., Ohori, A., Kamei, K., Franco, M., Miyaji, M., Nishimura, K. (2004)
Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method.
FEMS Microbiol Lett, 234, 93-97

24. Ferreira, M. S., Freitas, L.H., Lacaz, Cda S., Del Negro, G.M., Melo, N.T., Garcia, N.M., de Assis, C.M., Salebian, A., Heins-Vaccari, E.M. (1990)
Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dog food contaminated with soil in Uberlandia, Brazil.
J Med Vet Mycol, 28, 253-256

25. Gesztesi, J.L., Puccia, R., Travassos, L.R., Vicentini, A.P., de Moraes, J.Z., Franco, M.F., Lopes, J.D. (1996)
Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis.
Hybridoma, 15, 415-422

26. Goldani, L.Z., Sugar, A.M. (1998)
Short report: use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis.
Am J Trop Med Hyg, 58, 152-153

27. Goldani, L.Z., Maia, A. L., Sugar, A.M. (1995)
Cloning and nucleotide sequence of a specific DNA fragment from *Paracoccidioides brasiliensis*.
J Clin Microbiol, 33, 1652-1654

28. Goldani, L.Z., Montero, C.M., Donadi, E.A., Martinez, R., Voltarelli, J.C. (1991)
HLA antigens in Brazilien patients with paracoccidioidomycosis.
Mycopathologia 114, 89-91

29. Gomes, G.M., Ciasalpino, P.S., Taborda, C.P., Camargo, Z.P. (2000)
PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis.
J Clin Microbiol, 38, 3478-3480

30. Gomez B.L., Figueroa, J.I., Hamilton, A.J., Ortiz, B., Robledo, M.A., Hay, R.J., Restrepo, A. (1997)
Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens.
J Clin Microbiol, 35, 3278-3283

31. Grose, E., Tamitt, J.R. (1965)
Paracoccidioides brasiliensis recovered from the interstinal tract of three bats (Artibeus lituratus) in Columbia, S.A.
Sabouradia, 4, 124-125

32. Guatelli, J.C., Gingeras, T.R., Richman, D.D. (1989)
Nucleic acid amplification in vitro: detection of sequences with low copy numbers and application to diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection.
Clin Microbiol Rev, 2, 217-226

33. Gueho, E., Leclerc, M.C., de Hoog, G.S., Dupont, B. (1997)
Molecular taxonomy and epidemiology of Blastomyces and Histoplasma species.
Mycoses, 40, 69-81

34. Hahn, R.C., Fontes, C.J., Batista, R.D., Hamdan, J.S. (2002)
In vitro comparisation of activities of terbinafine and itraconazole against *Paracoccidioides brasiliensis*.
J Clin Microbiol, 40, 2828-2831

35. Haynes, K.A., Westerneng, T.J., Fell, J.W., Moens, W. (1995)
Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain reaction amplification of large subunit ribosomal DNA.
J Med Vet Mycol, 33, 319-325

36. Herr, R.A., Tarcha, E.J., Taborda, P.R., Taylor, J.W., Ajello, L., Mendoza, L. (2001)
Phylogenetic analysis of Lacazia loboi places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic Onygenales
J Clin Microbiol, 39, 309-314

37. Izacc, S.M., Gomez, F.J., Jesuino, R.S., Fonseca, C.A., Felipe, M.S., Deepe, G.S., Soares, C.M. (2001)
Molecular cloning, characterization and expression of the heat shock protein 60 gane from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*.
Med Mycol. 39, 445-455

38. Johnson, W.D., Lang, C.M. (1977)
Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) in a Squirrel Monkey (Saimiri sciureus).
Vet Pathol, 14, 368-371

39. Kan, V.L. (1993)
Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia.
J Infect Dis, 168, 779-783

40. Lacerda, G.B., Arce-Gomez, B., Telles Filho, F.Q. (1988)
Increased frequency of HLA-B40 in patients with paracoccidioidomycosis.
J Med Vet Mycol 26, 253-256

41. Leclerc, M.C., Philippe, H., Gueho, E. (1994)
Phylogeny of dermathophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons.
J Med Vet Mycol, 32, 331-341

42. Loeffler, J., Hebart, H., Bialek, R., Hagmeyer, L., Schmidt, D., Serey, F.P., Hartmann, M., Eucker, J., Einsele, H. (1999)
Contamination occuring in fungal PCR assays.
J Clin Microbiol, 37, 1200-1202

43. Londero, A.T., Melo, I.S. (1983)
Paracoccidioidomycosis in childhood.
Mycopathologia, 82, 49-55

44. Marques da Silva, S.H., Colombo, A.L., Blotta, M. H., Lopes, J. D., Queiroz-Telles, F., Pires de Camargo, Z. (2003)
Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis
J Clin Microbiol, 41, 3675-3680

45. Martins, R., Marques, S., Alves, M, Fecchio, D., de Franco, M.F. (1997)
Serological follow-up of patients with paracoccidioidomycosis treated with itraconazole using Dot-blot, ELISA and western-blot.
Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 39, 261-269.

46. McEwen, J.G., Ortiz, B.L., Garcia, A.M., Florez, A.M., Botero, S., Restrepo, A. (1996)
Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*.
Fungal Genet Biol, 20, 125-131

47. Mendes-Giannini, M.J., Bueno, J.P., Shikanai-Yasuda, M.A., Ferreira, A.W., Masuda, A (1989)
Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis.
J Clin Micrrobiol, 27, 2842-2845

48. Morais, F.V., Barros, T.F., Fukada M.K., Cisalpino, P.S., Puccia, R. (2000)
Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*.
J Clin Microbiol, 38, 3960-3966

49. Motoyama, A.B., Venancio, E.J., Brandao, G.O., Petrofeza-Silva, S., Pereira, I.S., Soares, C.M., Filipe, M.S. (2000)
Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA.
J Clin Microbiol, 38, 3106-3109

50. Niesters, H.G., Goessens, W.H., Meis, J.F., Quint, W.G. (1993)
Rapid, polymerase chain reaction-based identification assays for Candida species.
J Clin Microbiol, 31, 904-910.

51. Ortiz, B.L., Diez, S., Uran, M.E., Rivas, J.M., Romero, M., Caicedo, V., Restrepo, A., McEwen, J.G. (1998)
Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis.
Clin Diag Lab Immunol, 5, 826-830

52. Ortiz, B.L., Garcia, A.M., Restrepo, A., McEwen, J.G. (1996)
Immunological characterization of a recombinant 27-kilodalton antigenic protein from *Paracoccidioides brsiliensis*.
Clin Diagn Lab Immunol, 3, 239-241

53. Peterson, S.W., Sigler, L. (1998)
Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis (Ajellomyces dermatitidis)* and other systemic fungal pathogens.
J Clin Microbiol, 36, 2918-2925

54. Pinto, A.R., Puccia, R., Diniz, S.N., Franco, M.F., Travassos, L.R. (2000)
DNA-based vaccination against murine paracoccidioidomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidioides brasiliensis*.
Vaccine, 18, 3050-3058

55. Puccia, R., Shenkman, S., Gorin, P.A., Travassos, L.R. (1986)
Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen.
Infect Immun, 53, 199-206

56. Restrepo, A., Cano, L.E., Tabares, A.M. (1983)
A comparison of mycelial filtrate – and yeast lysate – paracoccidioidin in patients with paracoccidioidomycosis.
Mycopathologia, 84, 49-54

57. Restrepo, F.M., Restrepo, M., Restrepo, A. (1983)
Blood groups and HLA antigens in paracoccidioidomycosis.
Sabouraudia, 21, 35-39

58. Rimek, D., Garg, A.P., Haas, W.H., Kappe, R. (1999)
Identification of contaminating fungal DNA sequence in Zymolise.
J Clin Microbiol, 37, 830-831

59. Salina, M.A., Shikanai-Yasuda, M.A., Mendes, R.P., Barraviera, B., Mendes Giannini, M.J. (1998)
Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment.
J Clin Microbiol, 36, 1723-1728

60. San-Blas, G., Nino-Vega, G., Iturriaga, T. (2002)
Paracoccidioides brasiliensis and paracoccidioidomycosis: Molecular approach to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics.
Med Mycol, 40, 225-242

61. Sandhu, G.S., Aleff, R.A., Kline, B.C., da Silva Lacaz, C. (1997)
Molecular detection and identification of *Paracoccidioides brasiliensis*.
J Clin Microbiol, 35, 1894-1896

62. Taborda, C.P., Camargo, Z.P. (1993)
Diagnosis of paracoccidioidomycosis by passive haemaglutination assay of antibody using a purified and specific antigen-gp43.
J Med Vet Mycol, 31, 155-160

63. Thierry, D., Brisson-Noel, A., Vincent-Levy-Frebault, V., Nguyen, S., Guesdon, J.L., Gicquel, B. (1990)
Characterization of a Mycobacterium tuberculosis insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis.
J Clin Microbiol, 28, 2668-2673

64. Van Burik, J.A., Myerson, D., Schreckhise, R.W., Bowden, R.A. (1998)
Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens.
J Clin Microbiol, 36, 1169-1175

65. Wanke, B., Londero, A.T. (1998)
Chapter 21 - *Paracoccidioides brasiliensis*, 395-407
In Ajello, L., Hay, R.J. (eds.): Topley & Wilson's microbiology and microbial infections.
9th ed., vol. 4, Medical mycology. Arnold, London

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

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Knobloch, der es mir ermöglichte, in einem hochinteressanten Gebiet zu promovieren.

Herrn PD Dr. med. Ralf Bialek für die hervorragende und engagierte Betreuung bei der Planung, Durchführung und Verfassung dieser Arbeit. Ihm verdanke ich einen wesentlichen Teil meiner wissenschaftlichen Ausbildung.

Herrn PD Dr. rer. nat. Dominik Begerow für die phylogenetische Analyse und Herrn Dr. med. Christian Äpinus für die Klonierung.

Herrn Dipl. Biol. Walter Deschle für die wertvolle technische Unterstützung.

Allen Mitarbeitern des Labors des Tropeninstitutes für die Hilfsbereitschaft und gute Arbeitsatmosphäre.

Meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Freunden für die vielseitige Unterstützung.

Veröffentlichung der eigenen Daten

Bialek, R., Ibricevic, A., Fothergill, A., and Begerow, D. (2000)
Small subunit ribosomal DNA sequence shows Paracoccidioides brasiliensis closely related to Blastomycis dermatitidis.
Journal of Clinical Microbiology, 38, 3190-3193.

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

Ibricevic, A., Pekosz, A.S., Brody, S.L.
TNF-α in ciliated cells directs an innate host response to inhibit influenza virus.
Presented, Annual Meeting, American Thoracic Society, Orlando, FL, May 2004.

Ibricevic, A, Huang, T., Pekosz, A.S., Brody, S.L.
TNF-Receptor I is required for early inhibition of respiratory virus processing in airway epithelial cells.
Presented, Annual Meeting, American Thoracic Society, San Diego, CA, May 2005.

Ibricevic, A., Pekosz, A., Walter, M.J., Newby, C., Battaile, J.T. Brown, E.G., Holtzman, M.J., Brody, S.L. (2006)
Influenza virus receptor specificity and cell tropism in mouse and human airway epithelial cells
Journal of Virology, 80, 7469-7480.

Ibricevic, A., Huang, T., Walter, M.J., Holtzman, M.J., Brody, S.L.
TNF-α inhibits early viral replication via TNF-Receptor I, by activation of the IFN-β/Stat1 signaling pathway in airway epithelial cells
Manuscript in progress

Lebenslauf

Name: Aida Ibricevic
Geboren in: Banjaluka, Bosnia und Herzegowina

Ausbildung:

01/03- heute	*Washington University School of Medicine,* St. Louis, MO, USA **Postdoctoral Research Scholar**, Dept. of Internal Medicine, Division of Pulmonary and Critical Care Medicine (NIH Training Grant Position)
1999-2006	*Eberhard Karls Universität*, Tübingen **Dissertation** bei Prof. Dr. med. J. Knobloch am Institut für Tropenmedizin, Universitätsklinikum Tübingen
1994-2002	*Eberhard Karls Universität*, Tübingen **Studium der Medizin**
16.05.02	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/01-03/02	Praktisches Jahr: *Tulane University,* New Orleans, LA, USA Innere Medizin *Yale University,* New Haven, CT, USA *Tulane University,* New Orleans, LA, USA Gynäkologie *Krankenhaus Bad Cannstatt*, Stuttgart Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen Chirurgie
09/00	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/98	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/96	Ärztliche Vorprüfung