

Boris Hügler
Dr. med.

Die Helix 54 der 23S-ribosomalen Ribonukleinsäure - Eine diagnostische Zielsequenz zur molekulargenetischen Differenzierung coryneformer Bakterien

Geboren am 18.8.1972 in Reutlingen
Reifeprüfung am 11.6.1991 in Tübingen
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1991/1992 bis WS 1997/1998
Physikum am 2.9.1993 an der Universität Tübingen
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Heidelberg/Trinity College Dublin
Staatsexamen am 27.5.1998 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Labormedizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. H. Schmidt-Gayk

Mycobacteriaceae, d.h. Corynebakterien und ihre Verwandten, haben in den letzten zwanzig Jahren dieses Jahrhunderts einen starken Bedeutungswechsel erfahren. Mit Ausnahme von *Corynebacterium diphtheriae* als Erreger der Diphtherie wurden Vertreter dieser Gruppe im großen und ganzen als harmlose Kommensalen angesehen. Die allgemeine Zunahme opportunistischer Infektionen von immunkompromittierten Patienten sowie die Verbreitung molekulargenetischer Techniken, die eine Identifikation auch seltener und schwer zu kultivierender Mikroorganismen ermöglichen, haben die Gruppe der coryneformen Bakterien - die *Mycobacteriaceae* - stärker in die Aufmerksamkeit der klinischen Forschung gerückt. Neben den durch die gut abgegrenzte Gruppe der Mykobakterien verursachten Infektionsbildern erweiterte sich das pathologische Spektrum dieser Gruppe insgesamt auf eine Vielfalt von Krankheitsbildern, von lokalen Hautinfektionen bis hin zur lebensbedrohlichen Meningitis.

Trotz aller Fortschritte in der molekularen Biologie sind coryneforme Bakterien immer noch extrem schwierig zu identifizierende Organismen. Nicht nur die starke morphologische und biochemische Ähnlichkeit der Bakterien untereinander, auch die im konstanten Fluß befindliche Taxonomie machen es einem klinischen Routinelabor beinahe unmöglich, Erreger dieser Gruppe auf Speziesebene zu identifizieren. Bei den Corynebakterien wird dieses Problem durch die stark wechselnde Antibiotikaempfindlichkeit der einzelnen Spezies noch verschärft.

Die bisherige Diagnostik der Corynebakterien beruht immer noch weitestgehend auf der Grundlage der von Hollis und Weaver 1981 aufgestellten Richtlinien. Derzeitiger 'Goldstandard' ist die Identifizierung dieser Mikroorganismen mit der Technik der direkten Sequenzierung der 16S-ribosomalen RNS, ganz oder in Teilen. Ribosomale RNS ist ein vergleichsweise konserviertes, ubiquitär vorhandenes Biomolekül, in dessen verschiedenen Abschnitten sich abwechselnd hoch- und niedrigkonservierte Abschnitte finden, eine für die Verwendung als diagnostischer und taxonomischer Marker wichtige Voraussetzung. Die 16S rRNS wurde bisher schon erfolgreich eingesetzt, um phylogenetische Stammbäume der Bakterien zu erstellen.

Ziel dieser Arbeit war es die Helix 54 der Domäne III der größeren und noch wenig untersuchten 23S rRNS auf ihre Eignung zu diagnostischen Zwecken zu prüfen. Roller und Schleifer beschrieben 1992 den o.g. Bereich als die größte zusammenhängende Insertion in der ribosomalen RNS, die ausschließlich 'gram-positiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt' vorbehalten ist. Dieser Abschnitt ist durch seine hohe Variabilität und durch konservierte

laterale Sequenzabschnitte an den Enden für die Konstruktion speziesspezifischer Sonden besonders geeignet.

In dieser Arbeit wurde die Primärstruktur der Insertion für verschiedene Vertreter der *Mycobacteriaceae* ermittelt mit dem Ziel der Erarbeitung geeigneter Sondenstellen. Insgesamt wurden die Insertionssequenzen von 14 verschiedenen Spezies erstellt, darunter 11 humanpathogene Vertreter des Genus *Corynebacterium*. Bei Vergleichssequenzierungen stellte sich jedoch heraus, daß die Insertion einer Spezies erhebliche Variabilität aufweist. Um diese Varianzen näher zu untersuchen, wurden von 8 der untersuchten *Corynebacterium*-Spezies weitere Isolate herangezogen und deren Insertion sequenziert. Die so gefundenen Varianzen wurden im Rahmen eines Sequenzalignments dargestellt und analysiert.

Bei Betrachtung der Verteilung dieser Varianzen wurde ein charakteristisches Muster erkennbar: bei nahezu allen untersuchten Spezies stieg die Häufigkeit der Varianzen zur Mitte der Insertion hin an. Ein Großteil gruppierte sich in einem kleinen Bereich rund um die zentrale Haarnadelkurve. Der Rest der Insertion zeigte dagegen nur geringe Variabilität innerhalb einer Spezies. Trotzdem ließen sich zwischen verschiedenen Spezies ausreichende Unterschiede in den Insertionssequenzen ausmachen, um die Konstruktion speziesspezifischer Sonden möglich erscheinen zu lassen.

Es ist festzustellen, daß die Insertion in der Helix 54 wegen der oben beschriebenen Varianzen für Hybridisierungs sonden nicht uneingeschränkt nutzbar ist. Das Wissen um die Verteilung der beobachteten Variabilitäten sollte es allerdings dennoch ermöglichen, das beträchtliche diagnostische Potential dieser biologischen Besonderheit zu nutzen. Damit ist ein einfacher Weg aufgezeigt, wie die schwierig zu identifizierende Gruppe der *Mycobacteriaceae* über molekularbiologische Methoden erfaßt und damit zielsicher therapiert werden kann.