

Katja Christine Benz  
Dr. med.

## **Reverse Dot-Blot-Hybridisierung zur schnellen Identifizierung von Mykobakterienspezies**

Geboren am 13.01.1970 in Stuttgart  
Reifeprüfung am 25.05.1989 in Ludwigsburg  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1990 bis WS 1997  
Physikum im März 1992 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg/Mannheim  
Praktisches Jahr im Diakonissenkrankenhaus in Mannheim  
Staatsexamen am 04.11.1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Chirurgie  
Doktorvater Prof. Dr. med. Schmidt-Gayk

Die Zahl der Tuberkuloseerkrankungen und Erkrankungen, die durch „Mycobacteria Other Than Tuberculosis“ (MOTT) verursacht sind, hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Diese Entwicklung hängt eng mit dem drastischen Ansteigen von Krankheiten wie AIDS oder Tumorerkrankungen und Therapien, die mit einer Schwächung des Immunsystems einhergehen, zusammen.

Im Gegensatz zu *Mycobacterium (M.) tuberculosis* kommen die MOTT-Erreger, zu denen alle Mykobakterienspezies außer *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum* und *M.leprae* zählen, ubiquitär in der Umwelt vor und stellen über Wasser, Staub oder Tiere überall potentielle Infektionsquellen dar.

Die Diagnosestellung einer Mykobakteriose ist schwierig. Die klinischen Symptome sind unspezifisch und zeigen oft einen schleichenden Verlauf. Auch der bei der Tuberkulose als Screeningmethode verwendete Tuberkulinhauttest und die bei anderen Infektionen weit verbreiteten serologischen Verfahren erwiesen sich bei Infektionen durch MOTT als wenig befriedigend. Um eine Mykobakteriose diagnostizieren zu können, ist der direkte Nachweis der verursachenden Mykobakterienspezies erforderlich.

Die am weitesten verbreitete traditionelle Methode des Mykobakteriennachweises ist die Anzucht von Bakterienkulturen mit nachfolgender Interpretation der morphologischen und biochemischen Eigenschaften. Das Kulturwachstum benötigt bei den langsam wachsenden Mykobakterien einen Zeitraum von 3-6 Wochen und die zur Identifikation notwendigen biochemischen Tests sind aufwendig und oft nur wenigen Speziallabors vorbehalten. Auch bedeuten sie einen zusätzlichen Zeitaufwand von 2-4 Wochen.

Die Grundlage der konventionellen Diagnostikverfahren sind die bei Mikroorganismen vergleichsweise wenig variablen phänotypischen Eigenschaften, die von vielen verschiedenen Nukleotidsequenzen codiert sein können.

Einen anderen Ansatzpunkt bieten daher molekulargenetische Diagnostikmethoden. Eine dieser Methoden ist die Sondentechnik, bei der für die verschiedenen Mykobakterienspezies charakteristische Sequenzen, sogenannte Sequenzsignaturen, ausgewählt werden. Gegen diese Sequenzsignaturen werden komplementäre Oligonukleotidsonden konstruiert.

Ein ideales Molekül als Zielsequenz dieser Sonden ist die rRNS und die sie codierende rDNS. Sie kommt universell bei allen Organismen vor, und besitzt neben konservierten Regionen auch hochvariable Bereiche. Diese eignen sich optimal für die Konstruktion spezies-spezifischer Sonden, während die konservativen Abschnitte als Bindungsstelle der Oligonukleotidprimer für die Amplifikation definierter DNS-Abschnitte *in vitro* mit Hilfe der

PCR genutzt werden. Unter Einbeziehung der PCR in die Sondentechnik ist schon ein kurzes Kulturwachstum von 4-6 Tagen bis zur DNS-Isolierung ausreichend.

Ein zur Sondenkonstruktion und Speziesdifferenzierung optimal geeigneter rDNS-Abschnitt ist die hochvariable Insertion der 23S rDNS in Helix 54 der Domäne III, die spezifisch für grampositive Bakterien mit hohem G+C-Gehalt ihrer DNS ist. Diese Insertion ermöglicht eine Differenzierung einer großen Anzahl von Mykobakterienstämmen auf einem DNS-Fragment von nur 100 Basenpaaren Länge.

In dieser Arbeit wurde die bisher unbekannte Primärstruktur der 23S rDNS-Insertion von fünf Mykobakterienstämmen erstellt und einige bereits bekannte Sequenzen korrigiert. Für die am häufigsten isolierten oder klinisch relevanten Mykobakterienspezies wurden über ein Sequenzalignement im Vergleich mit 29 verschiedenen Mykobakterienspezies Oligonukleotidsonden konstruiert. Davon waren acht Gensonden neu entwickelt und wurden zusammen mit acht bereits bekannten Oligonukleotidsonden auf Kreuzreaktivität getestet. Als ein für klinische Routinediagnostik zur Differenzierung von Mykobakterien hervorragend geeignetes Verfahren erwies sich die Reverse Dot-Blot-Hybridisierung. Bei dieser Methode wurden die Spezies-spezifischen Oligonukleotidsonden, die gegen die 23S rDNS-Insertion gerichtet waren, kovalent an eine Membran gebunden. Das Kulturmaterial wurde *in vitro* amplifiziert, mit Digoxigenin-dUTP markiert und nachfolgend in einem einzigen Hybridisierungsvorgang mit der Membran identifiziert.

Auf diese Weise kann bei Nachweis säurefester Stäbchen in der Flüssigkultur nach kurzem Kulturwachstum die Identifikation der Mykobakterienspezies innerhalb eines einzigen Tages erfolgen. Das bedeutet gegenüber traditionellen Verfahren eine Zeitersparnis von 2-6 Wochen.