

Aus dem Forschungszentrum Kubus
der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

**Detektion bakterieller Nukleinsäuren im Atemkondensat
am Beispiel von Pseudomonas aeruginosa bei CF-Patienten**

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Lisa Wenzel

aus

München

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Joseph Rosenecker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Rainald Fischer

Prof. Dr. Angela Schuh

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Kai Michaelis

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.12.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	8
1.1 Atemkondensat	8
1.2 Cystische Fibrose und die Rolle der Frühdetektion von <i>P. aeruginosa</i>	16
1.3 Methodisches Vorgehen	19
1.4 Zielsetzung der Dissertation	21
2 Patienten, Material und Methoden.....	22
2.1 Patienten und Kontrollprobanden	22
2.2 Probengewinnung, -verarbeitung und -lagerung	23
2.2.1 Gewinnung von Sputum	23
2.2.2 Gewinnung von EBC	23
2.3 Versuchsdurchführung	28
2.3.1 Nachweis von Nukleasen in Atemwegssekreten	28
2.3.1.1 Besondere Vorkehrungen beim Arbeiten mit RNasen und DNasen	28
2.3.1.2 Entwicklung und Definition von Standardprozeduren	29
2.3.1.3 Versuchsansätze	34
2.3.1.4 Gelelektrophorese	35
2.3.2 Nachweis von Nukleinsäuren in Atemwegssekreten	35
2.3.2.1 Entwicklung und Definition von Standardprozeduren	35
2.3.2.2 Nachweis von <i>P. aeruginosa</i> -RNA in Atemwegssekreten	39
2.3.2.3 Nachweis von <i>P. aeruginosa</i> -DNA in Atemwegssekreten	42
2.3.2.4 Gelelektrophorese	44
2.3.3 Auswertung mittels Geldokumentation	44
3 Ergebnisse	45
3.1 Nachweis von Nukleasen in Atemwegssekreten	45
3.1.1 Nukleasen im Sputum	45
3.1.2 Nukleasen im EBC	49
3.1.3 Zusammenfassung	51
3.2 Nachweis von Nukleinsäuren in Atemwegssekreten	51
3.2.1 Nukleinsäuren im EBC	52
3.2.4 Nachweisgrenze des RNA- und DNA-Nachweises	56
3.2.5 Detektion von Inhibitoren des Nukleinsäurenachweises	59
3.2.6 Nukleinsäuren im Sputum	62
3.2.7 Zusammenfassung	64

4	Diskussion	65
4.1	Zusammenfassung und Interpretation der wesentlichen Ergebnisse	65
4.1.1	EBC-Probengewinnung	65
4.1.2	Nukleasen im Sputum	67
4.1.3	Nukleasen im EBC	68
4.1.4	Nukleinsäuren im EBC	69
4.1.4	Nukleinsäuren im Sputum	72
4.2	Ausblick: Diagnose- und Therapieansätze der CF	72
	Zusammenfassung	76
	Anhang	78
	Material 78	78
	Tabelle 19 bis Tabelle 23: Nachweis von RNasen und DNasen in Atemwegssekreten	78
	Tabelle 24 bis Tabelle 26: Nukleinsäurenachweis in Atemwegssekreten	80
	Tabelle 27: Gelelektrophorese	81
	Ethikantrag	82
	Literaturverzeichnis	100
	Danksagung	108
	Eidesstattliche Versicherung	109

Abkürzungsverzeichnis

b	Basen
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
bp	Basenpaare
CF	Cystische Fibrose oder Mukoviszidose
DEPC-Wasser	Diethylpyrocarbonate-Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DPBS	Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung
EBC	Exhaled breath condensate (Atemkondensat)
M	Größenmarker
mEpo	Maus-Erythropoetin
mRNA	Messenger RNA (Boten-RNA)
NK	Negativkontrolle
NO	Stickstoffmonoxid
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PK	Positivkontrolle
rhDNase	rekombinante humane Deoxyribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
SE ¹ DNA	Standardeinheit ¹ DNA (entspricht 1 µl 0,41 µg/µl <i>P. aeruginosa</i> -DNA)
SE ¹ RNA	Standardeinheit ¹ RNA (entspricht 1 µl 0,22 µg/µl mEpo mRNA)
SE ² DNA	Standardeinheit ² DNA (entspricht 1 µl 1,5 ng/µl <i>P. aeruginosa</i> -DNA)
SE ² RNA	Standardeinheit ² RNA (entspricht 1 µl 107 ng/µl <i>P. aeruginosa</i> -RNA)
TEA-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Vor- und Nachteile verschiedener Atemwegssekrete in der Lungeninfektionsdiagnostik.	11
Tabelle 2:	Verlaufsstadien bei CF-Patienten mit einem positiven P. aeruginosa Keimnachweis.	18
Tabelle 3:	Reaktionsansatz für den RNase-Nachweis in Atemwegssekreten.	34
Tabelle 4:	Reaktionsansatz für den DNase-Nachweis in Atemwegssekreten.	35
Tabelle 5:	Basisreaktionsansatz für die PCR.	37
Tabelle 6:	Reaktionsansatz für eine Probe der Gradienten-PCR.	38
Tabelle 7:	Reaktionsansatz für den P. aeruginosa-RNA-Nachweis im EBC.	40
Tabelle 8:	Reaktionsansatz für die Bestimmung der Nachweisgrenze der RT-PCR.	40
Tabelle 9:	Reaktionsansatz für die Detektion von Inhibitoren der RT-PCR im EBC.	40
Tabelle 10:	Reaktionsansatz für den P. aeruginosa-RNA-Nachweis im Sputum.	41
Tabelle 11:	Reaktionsansatz für die RT-Proben.	41
Tabelle 12:	Reaktionsansatz für die RT-Kontrollen.	41
Tabelle 13:	Reaktionsansatz für die PCR der RT-Proben.	42
Tabelle 14:	Reaktionsansatz für den P. aeruginosa-DNA-Nachweis im EBC.	43
Tabelle 15:	Reaktionsansatz für die Bestimmung der Nachweisgrenze der PCR.	43
Tabelle 16:	Reaktionsansatz für die Detektion von Inhibitoren der PCR im EBC.	43
Tabelle 17:	Reaktionsansatz für den P. aeruginosa-DNA-Nachweis im Sputum.	44
Tabelle 18:	Charakteristika der Probengewinnung und -lagerung im Vergleich.	66
Tabelle 19:	Materialien für die Sputumverarbeitung.	78
Tabelle 20:	Materialien für die EBC-Probengewinnung und -verarbeitung.	78
Tabelle 21:	Materialien für den RNase-Nachweis.	79
Tabelle 22:	Materialien für den DNase-Nachweis.	79
Tabelle 23:	Verbrauchsmaterial und weitere Geräte für den Nachweis von RNasen und DNasen in Atemwegssekreten.	79
Tabelle 24:	Verwendete Nukleinsäuren und Primer.	80
Tabelle 25:	Verwendete Kits.	80
Tabelle 26:	Verbrauchsmaterial und weitere Geräte für den Nukleinsäurenachweis im EBC.	80
Tabelle 27:	Verbrauchsmaterial und Geräte für die Gelelektrophorese.	81

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Bestandteile der Ausatemluft und deren Aggregatzustand.....	9
Abbildung 2:	Vorgehen beim Nukleinsäurenachweis zur Differenzierung von RNA und DNA.....	20
Abbildung 3:	Bestandteile des RTube® EBC-Sammelsystems.....	24
Abbildung 4:	Aufbau des Sammelrohrs und Luftfluss.	25
Abbildung 5:	Sicherstellung der Funktionsfähigkeit des Entenschnabel-Ventils.	26
Abbildung 6:	Aufbau des einsatzbereiten RTube®.	27
Abbildung 7:	Probenvereinigung mit Hilfe des Kolbens.....	27
Abbildung 8:	RNase A Verdünnungsreihe (Inkubationszeit: 15 Minuten).	32
Abbildung 9:	DNase I Verdünnungsreihe (Inkubationszeit: 15 Minuten).	32
Abbildung 10:	Schema des Ablaufs des RNase- und DNase-Nachweises.....	33
Abbildung 11:	Gradienten-PCR mit dem Ps. ae.-Primerpaar.	38
Abbildung 12:	Gradienten-PCR mit dem Ps. sp.-Primerpaar.	39
Abbildung 13:	Endogener RNA- und DNA-Gehalt im Sputum.....	46
Abbildung 14:	RNase-Detektion im Sputum (Inkubationszeit: 15 Minuten).	46
Abbildung 15:	DNase-Detektion im Sputum (Inkubationszeit: 2 Stunden).....	48
Abbildung 16:	DNase-Detektion im Sputum (Inkubationszeit: 20 Stunden).....	48
Abbildung 17:	RNase-Detektion im EBC (Inkubationszeit: 20 Stunden).....	50
Abbildung 18:	DNase-Detektion im EBC (Inkubationszeit: 20 Stunden).....	50
Abbildung 19:	Überblick der RNase- und DNase-Aktivität im Sputum und EBC.	51
Abbildung 20:	Detektion von P. aeruginosa-RNA im EBC mit dem Ps. ae.-Primerpaar.....	53
Abbildung 21:	RT-Kontrollen der Detektion von P. aeruginosa-RNA im EBC mit dem Ps. ae.-Primerpaar.	53
Abbildung 22:	Detektion von P. aeruginosa-DNA im EBC mit dem Ps. ae.-Primerpaar.....	54
Abbildung 23:	Detektion von P. aeruginosa-RNA im EBC mit dem Ps. sp.-Primerpaar.....	55
Abbildung 24:	RT-Kontrollen der Detektion von P. aeruginosa-RNA im EBC mit dem Ps. sp.-Primerpaar.	55
Abbildung 25:	Detektion von P. aeruginosa-DNA im EBC mit dem Ps. sp.-Primerpaar.....	56
Abbildung 26:	Nachweisgrenze des P. aeruginosa-RNA-Nachweises mit dem Ps. ae.-Primerpaar.....	57
Abbildung 27:	RT-Kontrollen der Nachweisgrenze des P. aeruginosa-RNA- Nachweises mit dem Ps. ae.-Primerpaar.	58
Abbildung 28:	Nachweisgrenze des P. aeruginosa-DNA-Nachweises mit dem Ps. ae.-Primerpaar.....	59
Abbildung 29:	Detektion von Inhibitoren des P. aeruginosa-RNA-Nachweises mit dem Ps. ae.-Primerpaar.	60
Abbildung 30:	RT-Kontrollen der Detektion von Inhibitoren des P. aeruginosa-RNA- Nachweises mit dem Ps. ae.-Primerpaar.	61
Abbildung 31:	Detektion von Inhibitoren des P. aeruginosa-DNA-Nachweises mit dem Ps. ae.-Primerpaar.	61

Abbildung 32: Detektion von <i>P. aeruginosa</i> -RNA im Sputum mit dem Ps. ae.-Primerpaar.....	62
Abbildung 33: Kontrollen der Detektion von <i>P. aeruginosa</i> -RNA im Sputum mit dem Ps. ae.-Primerpaar.....	63
Abbildung 34: Detektion von <i>P. aeruginosa</i> -DNA im Sputum mit dem Ps. ae.-Primerpaar.....	64

1 Einleitung

1.1 Atemkondensat

Für einen besseren Lesefluss wird der Terminus ‚Atemkondensat‘ im Folgenden durch die Abkürzung ‚EBC‘ ersetzt. EBC steht für ‚exhaled breath condensate‘.

Der erste Artikel zum Thema EBC wurde 1980 im russischen Sprachraum publiziert. (Sidorenko GI et al., 1980) In den darauffolgenden Jahren schienen sich weiterhin ausschließlich russischsprachige Arbeitsgruppen mit dieser neuen Art von Atemwegsekret zu befassen. Sie publizierten zu Krankheiten wie chronische Bronchitis (Kurik MV et al., 1987) und Asthma (Goncharova VA et al., 1989) und beschäftigten sich mit dem Surfactantsystem (Aleksandrov OV et al., 1992).

1992 erschien die erste nicht-russischsprachige Veröffentlichung vom Department für Anästhesie der Universität Kalifornien. Diese hatte die Einflüsse der Allgemeinanästhesie auf die Lungenfunktion an Hand der Messung von Wasserstoffperoxid in EBC zum Thema. (Wilson WC et al., 1992) Bis heute stieg die Publikationsrate stetig an. Anfang des Jahres 2015 wurden circa eintausend Veröffentlichungen bei PubMed unter dem Schlagwort ‚EBC‘ registriert. Jüngere Arbeiten beschäftigen sich mit einer ganzen Bandbreite von Diagnostikmethoden am Kondensat. Dazu gehören beispielsweise die Erforschung von non-invasiver Lungenkrebsdiagnostik (Gessner C et al., 2004), die Auswirkungen von Umwelteinflüssen und Rauchen auf den pH-Wert (Lima TM et al., 2013) und insbesondere die Detektion von Entzündungsmarkern wie Stickstoffoxiden bei Asthma- und COPD-Patienten (Chérot-Kornobis N et al., 2011; Liu J et al., 2007).

Definition und Quelle von Atemkondensat

Ausatemluft besteht aus den zwei Komponenten Dampfphase und Aerosolphase, getragen vom Luftgemisch (siehe Abbildung 1). Die Begriffe Dampf und Aerosol werden hier im physikalisch-chemischen Sinn verwendet. EBC ist definiert als die mit Hilfe einer Kühlapparatur auskondensierte Dampfphase und den mit abgeschiedenen Aerosolteilchen. Das erhaltene EBC besteht dann zu > 99% aus reinem Wasserdampfkondensat und zu einem geringen Teil aus nichtflüchtigen Stoffen, die aus den Aerosolteilchen aus den kleinsten Atemwegen stammen. Diese Aerosolteilchen entstammen dem die Atemwege auskleidenden Flüssigkeitsfilm (Horváth I et al., 2005; Montuschi P, 2007).

Es gibt verschiedene Theorien zur Entstehung dieses Aerosols. Eine identifiziert die beim Inhalations- und Exhalationsvorgang entstehenden Turbulenzen als Ursache für die Herauslösung von Tröpfchen aus dem Flüssigkeitsfilm (Kubáň P u. Foret F, 2013). Ein weiterer Erklärungsansatz wird als „bronchiole fluid film burst“ betitelt und wurde von Johnson GR und Morawska L 2009 entwickelt. Er besagt, dass es bei der Öffnung verschlossener Bronchiolen bei der Expiration zum Aufbrechen des auskleidenden Flüssigkeitsfilms und eventuell zu einer Blasenbildung kommt. Das dabei entstehende

Aerosol wird dann mit der Ausatemluft nach außen abtransportiert und ergibt kondensiert zusammen mit dem Wasserdampf das EBC.

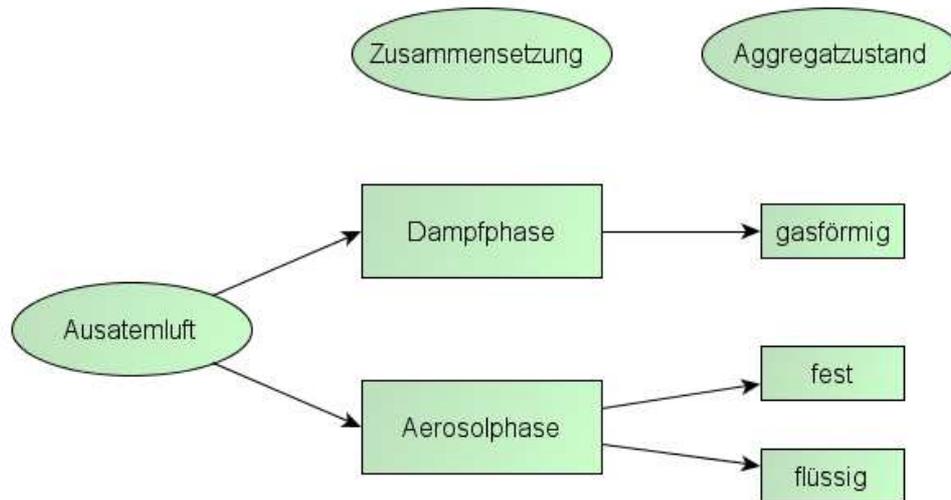


Abbildung 1: Bestandteile der Ausatemluft und deren Aggregatzustand.

Devices zur Gewinnung von Atemkondensat

Es stehen verschiedene Devices zur Gewinnung von EBC zur Verfügung. 2005 erschien eine umfassende Publikation von der American Thoracic Society zusammen mit der European Respiratory Society, welche mit Empfehlungen zum methodischen Vorgehen bei wissenschaftlichen Arbeiten mit EBC aufwartet (Horváth I et al., 2005). Alle Systeme sollten nach diesen Richtlinien aus einem Mundstück, einem Einwegventil und einer Speichelfalle bestehen. Das Einwegventil gewährleistet, dass nur Ausatemluft durch die Kondensationskammer strömt. Die Speichelfalle beugt einer Kontamination der Probe durch Speichelteilchen vor. Zur Vermeidung von Veränderungen an den EBC-Proben und den darin enthaltenen zu untersuchenden Substanzen sollte die Innenwandung der Sammelkammer aus reaktionsträgem Material bestehen.

Häufig verwendete kommerziell hergestellte Systeme sind zum einen der EcoScreen® der Firma Jaeger Tonnie (Hoechberg, Deutschland), welcher den Vorteil bietet, dass die Proben sofort eingefroren werden können, was eine wichtige Rolle bei der Untersuchung instabiler Substanzen, wie zum Beispiel Wasserstoffperoxid, spielt. Zum anderen gibt es das transportable RTube® der Firma Respiratory Research, Inc. (Charlottesville, VA, USA). Es setzt sich aus einem Sammelrohr mit aufgestecktem Mundstück, einer Aluminiumhülle, einem Isolationsschutz und einem Kolben zusammen. Das Gerät ist unkompliziert in der Handhabung und einfach zu transportieren und wurde deshalb für diese Studie ausgewählt. (Horváth I et al., 2005; Montuschi P, 2007)

Vergleich: Atemwegssekrete in der Lungeninfektionsdiagnostik

Zur Diagnostik der unteren Atemwege wird eine Reihe von Atemwegssekreten genutzt. Dabei haben sich für infektiologische Untersuchungen folgende Sekrete als geeignet erwiesen:

- Brochoalveoläre Lavage (BAL)
- Sputum
- Tiefer Rachenabstrich

Die Gewinnung und Analyse dieser Sekrete bringt einige Probleme mit sich, insbesondere bei Kindern. Deshalb ist es zweckmäßig, in die Erforschung von einfach, kostengünstig und ohne große Risiken gewinnbares EBC zu investieren. Einen Überblick über die Vor- und Nachteile der vorher aufgezählten Methoden sowie die EBC-Gewinnung liefert Tabelle 1. Zu erwähnen sind daneben noch die Bronchial- oder Tracheallavage, das Rachenspülwasser, der nasale Abstrich, die nasale Lavage und einige weitere Sekrete, welche bei speziellen diagnostischen Fragestellungen genutzt werden können. Wegen deren geringerer Relevanz wird auf eine eingehende Ausführung verzichtet.

➤ Brochoalveoläre Lavage (BAL)

Der Goldstandard in der Diagnostik von Lungeninfektionen bei Kindern ist die BAL. (Blau H et al., 2014) Dabei werden bei der Bronchoskopie circa 20 ml 0,9%ige Kochsalzlösung installiert und durch das Bronchoskop wieder aspiriert. Die Prozedur wird mehrmals wiederholt. (Meyer KC et al., 2012) Das gewonnene Aspirat wird dann einer mikrobiologischen Untersuchung unterzogen.

Vorteile dieser Methode sind sowohl diagnostischer als auch therapeutischer Natur. Denn bei der Bronchoskopie kann zäher Schleim abgesaugt und es können eventuell bestehende Blutungen gestillt werden. Diagnostisch lässt sich nicht nur die gewonnene Lavage verwerten, sondern es können im selben Eingriff auch Gewebeproben entnommen und untersucht werden. (Meyer KC et al., 2012)

Komplikationen treten in 1 - 2% der Fälle auf. Neben den Risiken wie Arrhythmien, Hypoxämie, Übersedierung, Hämorrhagien und die Ausbildung eines Pneumothorax ist die Untersuchung sehr teuer und zeitaufwändig. Darüber hinaus ist für die Festlegung des weiteren therapeutischen Vorgehens zum Beispiel bei jungen Patienten mit Cystischer Fibrose (CF) eine häufige Wiederholung der infektiologischen Diagnostik notwendig. Invasive Maßnahmen wie die BAL eignen sich hierfür wenig. Des Weiteren werden oftmals nur Proben aus ein oder zwei Lungensegmenten gewonnen, was die Aussagekraft der Diagnostik einschränkt. (Darwiche K et al., 2009)

Tabelle 1: Vor- und Nachteile verschiedener Atemwegssekrete in der Lungeninfektionsdiagnostik.

Sekret	Vorteile	Nachteile
BAL	<ul style="list-style-type: none"> - Goldstandard¹ - Therapeutische Intervention (z.B. Stillen einer Blutung)² - Diagnostische Verfahren (z.B. Biopsie)² 	<ul style="list-style-type: none"> - Invasivität (Komplikationen, Belastung für den Patienten)³ - Teuer und zeitaufwändig³ - Keine häufige Wiederholung³ - Eventuell Gewinnung einer Probe von nur ein oder zwei Lungensegmenten³
Sputum	<ul style="list-style-type: none"> - Nicht-invasiv¹ - Einfache Durchführung¹ - Wiederholung möglich¹ 	<ul style="list-style-type: none"> - Bei kleinen Kindern und Säuglingen Problem des Schluckens von Sputum - Mögliche Kontamination durch die oropharyngeale Flora⁴ - Nachgewiesenes Keimspektrum kann von Tag zu Tag variieren⁴
Tiefer Rachenabstrich	<ul style="list-style-type: none"> - Nicht-invasiv - Einfache Durchführung - Wiederholung möglich - Bei kleinen Kindern und Säuglingen problemlos möglich 	<ul style="list-style-type: none"> - Risiko der fehlerhaften Durchführung - Eingeschränkte Aussagekraft⁵
EBC	<ul style="list-style-type: none"> - Nicht-invasiv - Einfache Durchführung⁶ - Wiederholung möglich - Bei kleinen Kindern und Säuglingen problemlos möglich^{6,7} - Bei Tracheostoma und beeinträchtigten respiratorischem Status möglich^{8,9} 	<ul style="list-style-type: none"> - Forschungsstadium -> keine etablierten diagnostischen Verfahren
1 Blau H et al., 2014 2 Meyer KC et al., 2012 3 Darwiche K et al., 2009	4 Goddard AF et al., 2012 5 Ramsey BW et al., 1991 und Jung A et al., 2002 6 Antus B et al., 2012	7 Vogelberg C et al., 2007 8 Marteus H et al., 2005 9 Vogelberg C et al., 2003

➤ Sputum

Eine andere Form eines Atemwegssekrets ist spontan ausgehustetes Sputum oder induziertes Sputum.

Die Produktion von spontanem Sputum ist morgens leichter. Der Mund wird zunächst mit klarem Leitungswasser ausgespült. Um das Abhusten von Sputum zu erleichtern, kann der Patient mehrmals tief ein- und ausatmen und nach jeder Inspiration den Atem kurze Zeit anhalten, damit sich die Lunge gut entfaltet. Anschließend wird das Sputum abgehustet und expektoriert.

Ist ein Patient nicht in der Lage spontan Sputum abzugeben, kann induziertes Sputum gewonnen werden. Hierzu wird mit iso- oder hypertoner Kochsalzlösung inhaliert. Die Kochsalzkonzentration, die Inhalationsdauer und die Anzahl der Zyklen können variieren. Meist wird eine Kochsalzkonzentration von 3 - 7% gewählt. Vor der Inhalation wird in den überwiegenden Fällen mit einem kurz wirksamen β_2 -Agonist inhaliert, um eine Bronchokonstriktion durch die Kochsalzinhalation zu verhindern. (Pizzichini E et al., 2002)

Sowohl die Gewinnung von Sputum als auch die von induziertem Sputum ist nicht-invasiv und lässt sich meist einfach durchführen. Eine wiederholte Probengewinnung ist problemlos möglich. (Blau H et al., 2014)

Nachteil ist, dass es zu einer Kontamination durch die oropharyngeale Flora und durch Speichelbeimengungen kommen kann. Außerdem kann die im Sputum nachgewiesene bakterielle Flora von Tag zu Tag variieren (Goddard AF et al., 2012).

Bei kleinen Kindern und Säuglingen besteht außerdem das Problem, dass sie Sputum verschlucken und es nicht expektorieren können, was die diagnostischen Möglichkeiten einschränkt. Hier wird häufig ein tiefer Rachenabstrich durchgeführt.

➤ Tiefer Rachenabstrich (= Hustenabstrich)

Können Patienten nicht spontan oder nach Induktion Sputum produzieren und abhusten, wird meist ein tiefer Rachenabstrich durchgeführt. Die Methode ist nicht-invasiv und kann in regelmäßigen Abständen wiederholt werden. Sie eignet sich insbesondere zur Anwendung bei kleinen Kindern und Säuglingen.

Beim tiefen Rachenabstrich sollte genau auf die richtige Durchführung geachtet werden, um die Sensitivität des Erregernachweises zu optimieren. Der tiefe Rachenabstrich wird auch als Hustenabstrich bezeichnet, da die Patienten bei der Durchführung mindestens einmal husten sollten. Dies geschieht entweder nach Aufforderung oder durch Auslösen des Hustenreflexes beim Abstreichen des Rachens. Nur auf diese Weise kann Sekret aus den tieferen Atemwegen gewonnen und ein realistisches Testergebnis erhalten werden.

In einer Studie zeigte sich beim Vergleich von Rachenabstrichen mit bronchialen Kulturen bei nicht-expektorierenden Patienten ein positiver Vorhersagewert für eine Infektion mit *P. aeruginosa* von 83%. Der negative Vorhersagewert lag bei 70%. Diese Ergebnisse lassen erkennen, dass ein negatives Testergebnis eine Infektion mit *P. aeruginosa* nicht sicher ausschließen kann, da bei 30% der Patienten eine Infektion mit diesem Keim übersehen wird. (Ramsey BW et al., 1991)

2002 konnte Jung A et al. die eingeschränkte Aussagekraft des tiefen Rachenabstrichs bestätigen. Es wurden die Ergebnisse der sequentiellen Genotypisierung von *Pseudomonas aeruginosa* aus Sputum, BAL und tiefem Rachenabstrich bei CF-Patienten verglichen. Heraus kam dabei eine gute Übereinstimmung der erzielten Resultate von Sputum- und BAL-Proben, wobei jedoch die Kultur des tiefen Rachenab-

strichs die Kolonisation der Lunge nur unzureichend widerspiegelte. Der negative Vorhersagewert ähnelte der Untersuchung von Ramsey BW et al.. (Jung A et al., 2002)

➤ EBC

Neben Sputum hat EBC das Potential als Alternative von nicht-invasiver Diagnostik von Infektionen des unteren Respirationstrakts. Die Methodik der EBC-Sammlung wird unter „2.2.2 Gewinnung von EBC“ beschrieben. Sie ist für den Patienten wenig belastend und hat keinen Einfluss auf eine vorliegende Erkrankung. Im Gegensatz zum Sputum kann EBC auch problemlos bei Kindern (Antus B et al., 2012) und Säuglingen (Vogelberg C et al., 2007) gewonnen werden. Diese Methodik ist sogar für Patienten mit Tracheostoma und einem beeinträchtigten respiratorischen Status geeignet. (Marteus H et al., 2005; Vogelberg C et al., 2003) Weitere Vorteile des EBC-Verfahrens ist die Option einer häufigen Wiederholung und die Benutzung von Systemen wie dem RTube[®] auch zu Hause. Das RTube[®] ist sehr einfach handhabbar, so dass auch eine eigenständige Nutzung durch den Patienten vorstellbar ist. (Antus B et al., 2012) Die klinische Anwendung von EBC ist noch nicht etabliert und befindet sich im Forschungsstadium.

Bestandteile von Atemkondensat und diagnostische Möglichkeiten

EBC enthält verschiedene mit modernen wissenschaftlichen Methoden nachweisbare Mediatoren. Allerdings stellen die geringen Konzentrationen der relevanten Substanzen eine große Herausforderung dar, da der Hauptanteil an Wasserdampf sehr stark verdünnend wirkt (Bikov A et al., 2012).

Zu den untersuchten Substanzen zählen unter anderem:

- Wasserstoffionen (Carraro S et al., 2005)
- Zytokine (Brussino L et al., 2014)
- Leukotriene (Corhay J et al., 2014)
- 8-Isoprostan (Tasliyurt T et al., 2014)
- Adenosin (Esther CR et al., 2013)
- Wasserstoffperoxid (Murata K et al., 2014)
- Stickstoffoxide (Chérot-Kornobis N et al.)
- Nukleinsäuren (Zakharkina T et al., 2011).

Asthma als die häufigste chronische respiratorische Erkrankung von Kindern ist gerade bei den ganz jungen Patienten schwierig zu diagnostizieren. Etablierte Verfahren wie die Spirometrie greifen hier nicht. Mithin ist Asthma ein beliebtes Forschungsthema im Zusammenhang mit EBC. (Thomas PS et al., 2013)

Stickstoffmonoxid (NO) ist einer der bekanntesten Marker in der Atemluft für eine Entzündung der Atemwege. NO wird durch die Stickstoffmonoxidsynthese des Atemweg-

epithels hergestellt. Dieses Enzym wird im Entzündungsprozess hochreguliert und führt somit zur vermehrten Produktion von NO. Etablierte Verfahren erlauben die NO-Messung als Fe_{NO} (Fraction of exhaled NO) in der Ausatemluft. Diese Methode wird unter anderem zur Primärdiagnostik bei Asthmapatienten angewandt. Der Schwerpunkt liegt aber insbesondere bei der Bestimmung des Ansprechens auf eine Therapie mit Steroiden (Chiappori A et al., 2015).

Auch EBC wurde auf das Vorhandensein von Stickstoffoxiden und daraus entstehende Markern wie Nitrite und Nitrate untersucht. (Thomas PS et al., 2013) Formanek W et al. (2002) wies signifikant höhere Nitritniveaus bei Asthmapatienten im Vergleich zu gesunden Probanden oder Probanden mit Husten nach. Cunningham S et al. (2000) konnte darüber hinaus erhöhte Nitritniveaus bei CF-Patienten im Vergleich zu Kontrollprobanden zeigen.

Die Untersuchungen von EBC auf vorliegende Nitrationen kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Fila L et al. (2013) stellten beispielsweise fest, dass bei CF-Patienten EBC-Nitratniveaus mit der Krankheitsschwere korrelieren und im Vergleich mit gesunden Probanden niedriger sind. Dagegen fanden Caballero S et al (2013) keine Unterschiede der Nitratniveaus bei Kindern mit rekurrenden Episoden pfeifender Atmung und gesunden Kontrollprobanden.

Auch die Diskrepanz von Stickstoffmonoxid und Nitrit in EBC von CF-Patienten verlangt nach Studien, welche Klarheit in die biochemischen Veränderungen der Lunge bei einer Entzündungsreaktion bringen. (Horváth I et al., 2005)

Eine Bestimmung des EBC-pH-Wertes konnte in mehreren Studien erfolgreich zwischen Asthma und gesunden Kontrollprobanden unterscheiden. Der pH-Wert ist bei Asthmatikern signifikant niedriger. (Thomas PS et al., 2013)

Eine Erhöhung von Entzündungsmarkern wie Leukotrien B₄ und Lipoxin A₄ wiesen ebenfalls auf eine Asthmaerkrankung hin, wobei mit zunehmendem Asthmaschweregrad ein starker Abfall des Lipoxin-A₄/Leukotrien-B₄-Verhältnisses beobachtet wurde. Ein steigender Gehalt von Eotaxin-1, ein Zytokin aus der Gruppe der Chemokine, korrelierte ebenfalls mit der Asthmaschwere. (Chiappori A et al., 2015)

Vielversprechende Ergebnisse für eine Differenzierung von allergischem zu nicht-allergischem Asthma lieferte die Analyse von Interleukinen in EBC. In allen fünf Studien war Interleukin 4 bei Asthmatikern im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht, wobei atopische Asthmatiker höhere Niveaus aufwiesen als Probanden mit nicht-allergischem Asthma. (Thomas PS et al., 2013)

Die Analyse des EBC-pH-Wertes konnte auch zwischen CF-Patienten (niedrigerer pH-Wert) und gesunden Kontrollprobanden (höherer pH-Wert) unterscheiden. Es gelang jedoch keine Abgrenzung von CF-Patienten mit und ohne *P. aeruginosa*-Kolonisation. Diese konnte aber durch die Bestimmung von Leukotrien B₄ und Interleukin 8 realisiert werden, indem bei CF-Patienten mit *P. aeruginosa*-Kolonisation höhere Werte gefunden wurden. (Bodini A et al., 2005)

Diese Ergebnisse zeigen, dass EBC-Marker sowohl für diagnostische als auch für therapeutische Entscheidungen wegweisend sein könnten. CF ist neben Asthma ein wichtiges Thema, wobei die Studienlage bei CF-Patienten weniger weitreichend ist. Insgesamt besteht bei beiden Erkrankungen weiterer Forschungsbedarf bei der Analyse von EBC-Mediatoren, um entsprechende Techniken etablieren zu können. Für die Festlegung von Grenzwerten und einer Standardisierung von Analyseverfahren, mittels derer eine Kategorisierung stattfinden könnte und exogene Einflussfaktoren weniger ins Gewicht fallen würden, ist die Datenbasis noch zu schmal, so dass umfangreichere Studien erwünscht sind, auch im Hinblick auf endogene Auswirkungen. Und gerade für sehr junge Kinder stellt der EBC-Test eine neuartige und vielversprechende Untersuchungsmethode dar.

Virale und bakterielle Nukleinsäuren sind kaum untersuchte Marker im EBC. In einer außergewöhnlich großen belgischen Studie wurden neunundneunzig EBC-Proben von Patienten mit oberem Atemwegsinfekt auf respiratorische Viren mittels RT-PCR gescreent. Die virale Detektionsrate lag dabei mit 7% unbefriedigend niedrig verglichen mit einer Rate von 46,8% mittels Nasenabstrich. (Houspie L et al., 2011) Andere Arbeiten zur Diagnostik von Influenzaviren und Herpesviren erbrachten ebenfalls keine ausreichenden Detektionsraten. (Costa C et al., 2012; St George K et al, 2010)

Auch der Nachweis von bakteriellen Nukleinsäuren liefert kein eindeutiges Ergebnis. Jain R et al (2007) konnten bei zehn in der Sputumkultur positiv getesteten Tuberkulosepatienten keinen positiven DNA-Nachweis in EBC liefern. Dabei ist in den Entwicklungsländern die Tuberkulose eine der häufigsten Infektionskrankheiten und eine frühe und definitive Diagnostik ist nach wie vor ein wichtiges und unerreichtes Ziel der Tuberkuloseforschung. Bisherige Verfahren sind teils invasiv und aufwändig und benötigen bis zu einem Testergebnis sehr viel Zeit. Deshalb wäre eine einfache Diagnostik mittels EBC sehr willkommen.

2011 konnte die Arbeitsgruppe um Zakharkina T bakterielle DNA in EBC von COPD-Patienten nachweisen, wobei sie versuchten, verschiedene Bakterien in Atemwegssekreten zu detektieren. 50% der EBC-Proben und 80% der parallel untersuchten Sputumproben ergaben einen positiven Nachweis. Die Ergebnisse der beiden Sekrete wiesen jedoch eine große Diskrepanz für den Nachweis der Bakterienart auf.

Wie auch bei der COPD spielen Infektionen bei CF-Patienten eine große Rolle. Insbesondere ein Befall der Lunge durch *P. aeruginosa* beeinflusst die Prognose entscheidend (Gilligan PH., 2014). Meist kann das therapeutische Eingreifen nur im frühen Stadium der Kolonisation eine vollständige Erregereradikation gewährleisten und deshalb kommt der Frühdiagnostik einer *P. aeruginosa*-Infektion eine große Bedeutung zu. (Højby N u. Koch C., 1990; Döring G et al., 2000)

2003 scheiterten jedoch Vogelberg C et al. bei dem Versuch, *P. aeruginosa*- und *Burkholderia cepacia*-DNA in zweiunddreißig EBC-Proben von CF-Patienten nachzuweisen. So blieb der Wunsch nach einer einfachen Diagnostik einer *P. aeruginosa*-Kolonisation bei jungen CF-Patienten bisher offen.

In all diesen Studien mit dem Ziel, bakterielle Nukleinsäuren zu detektieren, wurde nur DNA untersucht. Eine Testung auf bakterienspezifische RNA fand nicht statt und wurde nur beim Versuch der Detektion einer viralen Infektion durchgeführt.

1.2 Cystische Fibrose und die Rolle der Frühdetektion von *P. aeruginosa*

Cystische Fibrose oder auch Mukoviszidose ist ein autosomal-rezessives Erbleiden mit einer Inzidenz von etwa 1:2000 - 1:2500. Damit ist die CF die häufigste schwere angeborene Stoffwechselstörung der kaukasischen Bevölkerung. Eine Genmutation führt zur Produktion eines defekten CFTR-Proteins (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), welches für den Chloridtransport durch die Zellmembran verantwortlich ist. Als Folge davon kommt es zu einer abnormen Zusammensetzung der Sekrete der exokrinen Drüsen mit einer erhöhten Viskosität. In der Lunge führt dies zu einer eingeschränkten mukoziliären Clearance. Die dadurch verbleibenden zellulären und bakteriellen Bestandteile sowie hochmolekulare DNA bilden einen idealen Nährboden für Keime. (Brennan AL u. Geddes DM, 2002)

Aus der erhöhten Viskosität der Sekrete der exokrinen Drüsen resultieren die typischen Krankheitsmanifestationen wie Entzündungen und häufige Infektionen der Lunge, eine exokrine Pankreasinsuffizienz mit daraus resultierender Gedeihstörung sowie vielfältige sekundäre Erkrankungen wie zum Beispiel Diabetes mellitus.

Im Jahre 2012 lag die mittlere Überlebenschance von CF-Patienten bei mindestens 39 Jahren (Sens B. u. Stern M., 2013). Die Todesursache ist in erster Linie die chronische Infektion der Lunge. Die zwei wichtigsten Pathogene hierbei sind *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* (Gilligan PH., 2014; Döring G et al., 2000).

In der Vergangenheit hat die chronische Infektion mit mukoiden Stämmen von *P. aeruginosa* die Infektion mit *Staphylococcus aureus* als Hauptinfektionsproblem bei CF abgelöst (Høiby N., 1982). Ein weiterer Keim, *Burkholderia cepacia*, führt bei einer chronischen Besiedelung zu einer Reduktion des Lungenvolumens. *P. aeruginosa* hingegen scheint vermehrt zur Obstruktion der kleinen Atemwege zu führen (Lopes AJ et al., 2012).

Der Therapie von CF-Patienten liegt ein multimodales Behandlungskonzept zu Grunde, welches in einem spezialisierten Zentrum überwacht werden sollte. Zu den wichtigsten Therapiepfählern gehören:

- Physiotherapie zur autogenen Drainage und Atemgymnastik zur Sekretmobilisation und Sekretolyse.
- Hyperkalorische Ernährung mit einer Substitution von Pankreasenzymen und fettlöslichen Vitaminen.
- Inhalationstherapie mit Kochsalz, DNase, Bronchodilatoren und Antibiotika (Tobramycin, Colistin, Amikacin).

Neuere Studien geben einen Ausblick auf eine mögliche Gentherapie mit viralen und nicht-viralen Vektoren (Armstrong DK et al., 2014) und eine mRNA-Transfektionstherapie (Bangel-Ruland N et al., 2013; Kormann MS et al., 2011). Siehe hierzu auch „4.2 Ausblick: Diagnose- und Therapieansätze der CF“.

Da *P. aeruginosa* eine herausragende Rolle im Krankheitsprozess der CF spielt, soll hier näher auf diesen Keim eingegangen werden. *P. aeruginosa* ist ein stäbchenförmiges, bewegliches, gramnegatives Bakterium, welches ubiquitär vorhanden ist. Es zeigt ein aerobes Wachstum und findet sich vorwiegend auf feuchten Oberflächen wie Waschbecken und Inhalatoren oder den Atemwegen von infizierten Patienten. Er ist auch als „Pfützenkeim“ bekannt. (Döring G et al., 2000)

Das veränderte Oberflächenepithel und der zähe Schleim der Lunge von CF-Patienten erlauben eine fortschreitende Kolonisation der Lunge mit diesem Bakterium (Goldberg JB u. Pier GB., 2000). Davies JC et al. (1997) zeigte, dass bei CF-Patienten das Fehlen von normalen CFTR eine erhöhte Bindung von *P. aeruginosa* an das respiratorische Epithel zur Folge hat und dass dieser Effekt in-vitro durch eine Wiederherstellung der CFTR-Funktion rückgängig gemacht werden kann.

Neuere Studien geben Hinweise darauf, dass CFTR-Genmutationen auch Auswirkungen auf die Funktion von nicht-epithelialen Zellen wie zum Beispiel Monozyten haben. Hier war die Phagozytose und Vernichtung von *P. aeruginosa* in CF-Monozyten eingeschränkt und dies konnte auf die komplement-abhängige Opsonierung von *P. aeruginosa* zurückgeführt werden. (Van de Weert-van Leeuwen PB et al., 2013)

Daten des Patientenregisters 2012 der Cystic Fibrosis Foundation, USA, stellen dar, dass Patienten mit einem Alter zwischen 2 und 5 Jahren in 22% der Fälle mit *P. aeruginosa* infiziert sind. Dieser Anteil gipfelt mit 76% im Alter von 25 - 34 Jahren. Im Gegensatz dazu ist die Prävalenz der Infektionen mit *Staphylococcus aureus* ab einem Lebensalter von 17 Jahren rückläufig. Das Register schließt Informationen von mehr als 27.000 CF-Patienten ein.

Aus dem Berichtsband Qualitätssicherung Mukoviszidose 2012 vom Zentrum für Qualität und Management im Gesundheitswesen geht hervor, dass in Deutschland 14,7% der CF-Patienten im Alter unter 6 Jahren einen positiven *P. aeruginosa* Keimnachweis aufweisen. Darin wurden die Daten von annähernd neuntausend Patienten ausgewertet. Die Prävalenz einer *P. aeruginosa*-Infektion bei CF-Patienten war 2012 in Deutschland also deutlich geringer als in den USA.

Der *P. aeruginosa*-Befall bei CF-Patienten zeichnet sich durch einen phasenhaften Verlauf aus (siehe Tabelle 2). Zunächst kommt es zur Kolonisation der Lunge und im weiteren Verlauf kann sich daraus eine Infektion entwickeln. Beide Stadien können dann in einen chronischen Zustand übergehen (Döring G et al., 2000).

Tabelle 2: Verlaufsstadien bei CF-Patienten mit einem positiven *P. aeruginosa* Keimnachweis.

Stadium	Charakteristikum	Therapieziel
Kolonisation	Keine Infektzeichen	Eradikation
Chronische Kolonisation	Über mindestens 6 Monate bestehend, basierend auf mindestens dreimaligem Nachweis in der Kultur im Abstand von mindestens einem Monat. Zwischenzeitlich keine direkten (Inflammation, Fieber etc.) oder indirekten (spezifische Antikörperantwort) Zeichen einer Infektion oder Gewebsschädigung.	Suppression
Infektion	Mit Infektzeichen	Stadium der „chronischen Kolonisation“
Chronische Infektion	Über mindestens 6 Monate bestehend, basierend auf mindestens dreimaligem Nachweis in der Kultur im Abstand von mindestens einem Monat. Zwischenzeitlich mit direkten (Inflammation, Fieber etc.) oder indirekten (spezifische Antikörperantwort) Zeichen einer Infektion oder Gewebsschädigung. ODER Positiver Antikörpernachweis in zwei verschiedenen Untersuchungen bei Patienten welche kein Sputum expektorieren oder negative Kulturen zeigen.	Stadium der „chronischen Kolonisation“
Döring G et al., 2000		

Zum Zeitpunkt der Kolonisation der Lunge ist eine Eradikation von *P. aeruginosa* oftmals noch möglich, obwohl sie auf Grund der hohen antibiotischen Resistenzen erschwert ist. Deshalb kommt der Frühdiagnostik und einer umgehenden Therapieeinleitung bei CF-Patienten eine große Bedeutung zu. (Stover CK et al., 2000; Høiby N u. Koch C., 1990; Döring G et al., 2000)

Bei der Frühinfektion der Lunge werden zumeist nicht-mukoide *P. aeruginosa*-Stämme gefunden. Im weiteren Verlauf von einigen Monaten kommt es zur Umwandlung in einen mukoiden Stamm, welcher durch die Ausbildung eines Biofilms gekennzeichnet ist. Die Bakterien bilden einen aus Exopolysacchariden bestehenden sogenannten Alginatmantel (Høiby N., 1982). Diese Schicht schützt die Pseudomonaden vor einer Phagozytose (Cabral DA et al., 1987), einer antibiotischen Therapie und damit vor einer Eradikation (Valerius NH et al., 1991). Ohne Anwendung eines Antibiotikums

kommt es häufig zu einer chronischen Infektion der Lunge, welche über Jahre letztendlich zur Gewebsdestruktion und zum Tod führen kann. (Høiby N u. Koch C., 1990) Somit ist klar, wie schwerwiegend die Folgen einer übersehenen Frühinfektion mit *P. aeruginosa* sind und wie wichtig eine frühzeitige Diagnostik und Therapie bei CF-Patienten ist.

1.3 Methodisches Vorgehen

Ziel der vorliegenden Studie war es, *P. aeruginosa* in EBC von CF-Patienten mittels PCR und RT-PCR nachzuweisen, um eine Frühdiagnostik von *P. aeruginosa* zu etablieren.

Vor Beginn der eigentlichen Arbeit war generell abzuklären, ob störende endogene Nukleasen in den Sputum- und EBC-Proben zu finden sind. Nukleasen sind Enzyme, welche ubiquitär vorkommen, von vielen Zellen produziert und auch sezerniert werden. Sie degradieren Nukleinsäuren durch Spalten der Phosphodiesterbindungen und könnten so einen negativen Nukleinsäurenachweis vortäuschen. Zu den Nukleasen zählen RNasen und DNasen. Es ist anzunehmen, dass auch in Atemwegssekreten eine Enzymaktivität vorhanden ist.

Gezielte Untersuchungen zur Nukleaseaktivität in Sputum existieren nicht. Arbeiten mit nicht-viraler Genvektorthherapie zum Inhalt stoßen jedoch wiederholt auf das Problem der Vektordegradation im extra- und intrazellulären Milieu des Atemwegepithels (de Semir D et al., 2002). Dies legt nahe, dass es sich hierbei ursächlich um Nukleasen handelt. Harder J (2002) wies eine RNase 7- und Rosenberg HF u. Dyer KD (1995) eine RNase 4-mRNA-Genexpression im respiratorischen Epithel nach. Sie untersuchten jedoch nicht, ob tatsächlich Nukleasen vorhanden und auch aktiv waren.

Zur Nukleaseaktivität in EBC existiert bisher nur eine einzige Untersuchung, die den Nachweis von DNasen zum Inhalt hat. Darin standen vier Proben zur Verfügung, die parallel mit Magnesiumchlorid inkubiert wurden in der Absicht, dass dies zu einer Aktivierung der endogenen DNasen führt. Zwei der Proben stammten von gesunden Erwachsenen und zeigten im Ergebnis keine DNase-Aktivität. Eine der zwei CF-Patientenproben wies nach Magnesiumchloridinkubation eine leichte DNase-Aktivität auf, ohne Magnesiumchloridinkubation jedoch nicht. (Rosenecker J et al., 2009)

Eine hohe Nukleaseaktivität im Atemwegssekret würde den Nukleinsäurenachweis sehr erschweren bzw. unmöglich machen und könnte ein Grund für die bisherige dünne Studienlage beim Nukleinsäurenachweis in EBC sein. Die Kenntnis über die Nukleaseaktivität könnte für auf DNA- oder RNA-Inhalation basierende Therapieverfahren relevant sein. Auch Therapieansätze wie die Inhalation von rekombinanter humaner Deoxyribonuklease (rhDNase) zur Verflüssigung von zähem Sputum könnten von dieser Information profitieren (Jones AP u. Wallis CE., 2003).

Beim Nachweis von Nukleinsäuren unterscheidet man zwischen DNA und RNA. Deshalb wurden zwei verschiedene Vorgehensweisen gewählt (siehe Abbildung 2). Für

den DNA-Nachweis wurde das gewonnene EBC direkt in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) untersucht, wohingegen der RNA-Nachweis per Reverser Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchgeführt wurde. Bei der Reversen Transkription lässt sich RNA in DNA umwandeln. Dieser Schritt ist nötig, da nur DNA in der PCR vervielfältigt und im Anschluss in der Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden kann. Vor Beginn der RNA-Umwandlung wurde vorhandene unerwünschte DNA in den Proben zur Entfernung einem DNase-Verdau unterzogen. Zum Ausschluss einer DNA-Verunreinigung wurden parallel zum RNA-Nachweis Kontrollproben mitgeführt.

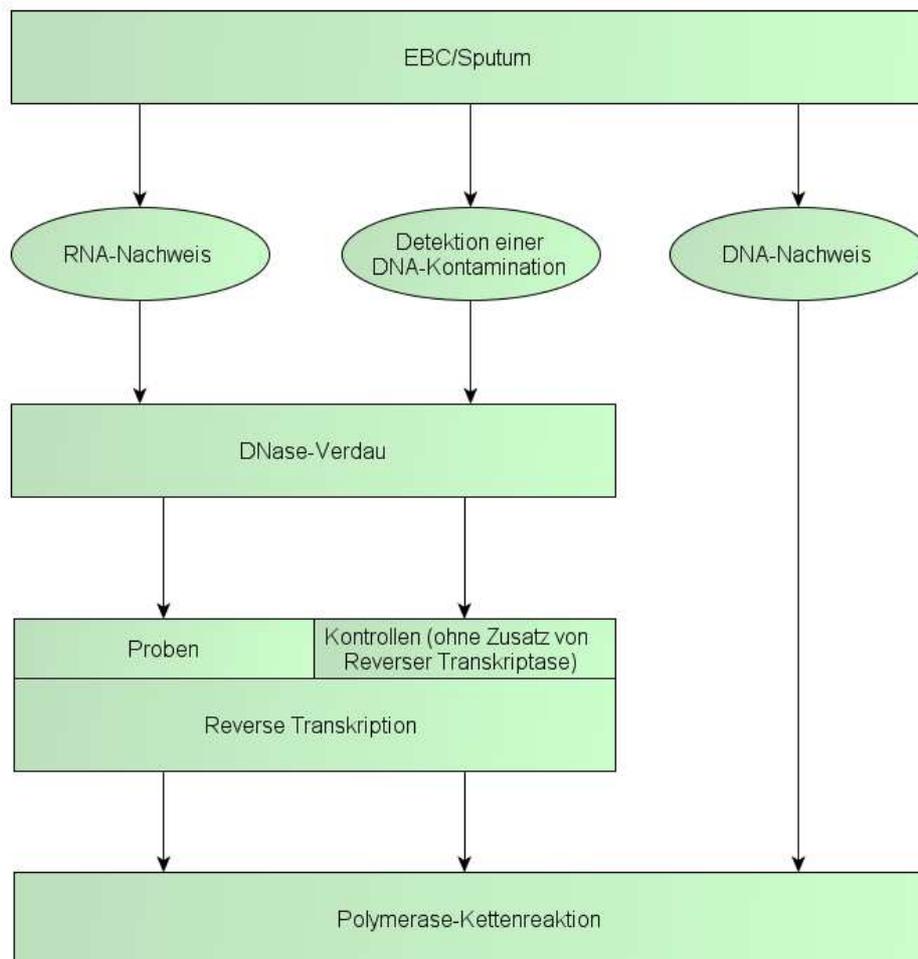


Abbildung 2: Vorgehen beim Nukleinsäurenachweis zur Differenzierung von RNA und DNA.

1.4 Zielsetzung der Dissertation

Die Fragestellung dieser Arbeit war, ob *P. aeruginosa* in EBC von CF-Patienten mittels PCR und RT-PCR nachzuweisen ist. Eine bakterielle Frühdiagnostik eines *P. aeruginosa*-Befalles der Lunge von CF-Patienten ermöglicht eine gezielte antibiotische Therapie mit der Aussicht auf eine vollständige Eradikation des Erregers. Auf Grund der schwerwiegenden Auswirkungen einer länger bestehenden Infektion sollte die Frühdiagnostik und -behandlung ein wichtiges Ziel beim Management von CF-Patienten sein. Bisherige diagnostische Methoden kommen nur eingeschränkt hierfür in Frage. Denn die BAL ist sehr invasiv und belastend für den Patienten und kann nicht regelmäßig durchgeführt werden. Ein zeitlich festgesetztes Screening von CF-Patienten auf einen *P. aeruginosa*-Befall wäre jedoch wünschenswert, um rechtzeitig therapeutisch eingreifen zu können. Sputum kann nicht von jedem Patienten gewonnen werden, denn gerade Säuglinge und kleine Kinder verschlucken das Sputum und können es nicht expektorieren. Bei tiefen Rachenabstrichen ist auf eine korrekte Durchführung zu achten. Die nicht zu vernachlässigende falsch-negativ Rate kann bei CF-Patienten zum Übersehen einer *P. aeruginosa*-Infektion mit schweren Folgen führen. Die EBC-Gewinnung als ein nicht-invasives Verfahren bietet sich hervorragend zur Diagnostik an, ist in der Durchführung sehr einfach und kann von den Patienten auch zu Hause durchgeführt werden. Außerdem kann EBC auch problemlos bei kleinen Kindern und Säuglingen gewonnen werden.

Ziel der Arbeit war es, folgende Fragen zu beantworten:

1. Sind im Sputum endogene RNasen und DNasen enthalten?
2. Sind in EBC endogene RNasen und DNasen enthalten?
3. Kann DNA von *P. aeruginosa* in EBC nachgewiesen werden?
4. Kann RNA von *P. aeruginosa* in EBC nachgewiesen werden?

2 Patienten, Material und Methoden

Eine ausführliche Übersicht über die verwendeten Materialien findet sich in tabellarischer Form im Anhang.

2.1 Patienten und Kontrollprobanden

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt. Der Ethikantrag ist mit der Projektnummer 176-12 gekennzeichnet.

Von jedem Probanden wurde vor der Probengewinnung eine Einverständniserklärung sowie eine Erklärung zum Datenschutz unterzeichnet. Die gewonnenen Daten wurden pseudonymisiert.

Sputumproben

Das Sputum wurde von Patienten der Christiane-Herzog-Ambulanz des Dr. von Haunerschen Kinderspitals gewonnen. Die an CF erkrankten Patienten mussten in der Lage sein, spontan Sputum abzugeben. Patienten mit Lungentransplantation sowie Pulmozym-Inhalation wurden ausgeschlossen. Insgesamt wurden vierzehn Sputumproben von Patienten im Alter von 14 - 52 Jahren gesammelt. Unterschiede ergaben sich in der Besiedelung mit *P. aeruginosa*, bei den Lungenfunktionswerten und der der CF zugrunde liegenden Genmutation. Einige Proben wurden von Mitarbeitern des Kubus Forschungszentrums des Dr. von Haunerschen Kinderspitals aufgearbeitet und bereitgestellt. Alle Sputumproben wurden nach dem unter „2.2.1 Gewinnung von Sputum“ beschriebenen Prinzip gewonnen und behandelt.

EBC-Proben

Das EBC wurde von Patienten der Mukoviszidoseambulanz der Abteilung Pneumologie der Medizinischen Klinik Innenstadt (Poliklinik V) der Ludwig-Maximilians-Universität München gewonnen.

Insgesamt wurden einundzwanzig Proben gesammelt. Alle Patienten waren an Mukoviszidose erkrankt und zwischen 23 und 57 Jahren alt.

Von den einundzwanzig Probanden wiesen in der aktuellsten mikrobiologischen Sputumuntersuchung zwölf einen positiven Nachweis von *P. aeruginosa* auf und fungierten als Positivkontrollen. Neun Patienten waren in der letzten Sputumuntersuchung oder im Rachenabstrich *P. aeruginosa* negativ getestet worden.

Als Negativkontrollen dienten Proben von Labormitarbeitern des Kubus Forschungszentrums des Dr. von Haunerschen Kinderspitals. Bei diesen galten aktives Rauchen und Erkrankungen der Lunge als Ausschlusskriterien. Es wurden fünf Proben von Mitarbeitern im Alter von 24 - 47 Jahren gewonnen.

2.2 Probengewinnung, -verarbeitung und -lagerung

2.2.1 Gewinnung von Sputum

Die Patienten husteten spontan auf die für sie am besten geeignete und akzeptable Weise das Sputum in ein steriles Gefäß. Die Proben wurden gekühlt umgehend ins Labor transportiert und auf Eis weiterverarbeitet. Danach erfolgte die Aufbereitung nach dem modifizierten Protokoll von Hector A et al. (2010). Zentrifugiert wurde anstatt bei 4°C bei 6°C und die erste Zentrifugation fand mit 280 g anstelle von 300 g statt. Diese Schritte waren notwendig, um das Sputum zu homogenisieren, störende Partikel herauszufiltern und eine einfache Handhabung wie zum Beispiel das Pipettieren zu erlauben.

Nach Übertragung auf eine sterile Schale wurde das Sputum mittels zweier steriler Pinzetten von Speichelresten getrennt. Nach Herstellung von Teilproben mit circa 0,7 mm Durchmesser wurden diese in 2,0 ml Reaktionsgefäße überführt und gewogen. Das jeweilige Eigengewicht des Reaktionsgefäßes wurde berücksichtigt.

Nur Teilproben mit einem Gewicht von 50 – 200 mg wurden weiterverarbeitet. Nach Addition von jeweils der neunfachen Menge eisgekühlte DPBS erfolgte mit Hilfe einer 2 ml Spritze mit einer 18 G Nadel die Homogenisierung, indem das Gemisch zwanzigmal auf- und abgezogen wurde. Diese Teilproben wurden dann zusammen auf ein 100 µm und ein 40 µm Zellsieb gegeben und in ein gemeinsames 50 ml Gefäß filtriert. Die so gewonnene Suspension wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt und auf 2,0 ml Reaktionsgefäße verteilt. Die Proben wurden danach bei 280 g und 6°C für 10 Minuten zentrifugiert, der entstandene Überstand erneut in 2,0 ml Reaktionsgefäße pipettiert und anschließend noch einmal bei 10.000 g und 6°C für 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden in einem 50 ml Gefäß gesammelt, kurz vermischt, in 2,0 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und sofort bei -20°C gelagert.

2.2.2 Gewinnung von EBC

Das EBC wurde durch Auskondensation von der in der ausgeatmeten Luft vorhandenen Feuchtigkeit und der im Luftstrom dispergierten Flüssigkeitströpfchen gewonnen. Hierfür wurde das speziell für diesen Zweck entwickelte RTube[®] der Firma Respiratory Research, Inc., Charlottesville, VA, USA, verwendet und nach deren Anleitung durchgeführt.

Funktionsprinzip des RTube[®]

Das Grundprinzip besteht darin, dass durch das Gerät der Ein- und Ausatemvorgang geschieht und die beiden Luftströme über ein Rückschlagventil separiert werden. Die ausgeatmete Luft strömt durch eine gekühlte Kondensationskammer, in welcher Feuchtigkeit und Atemtröpfchen auskondensieren. Aus der Kondensationskammer kann dann mittels eines Stempels und eines Kolbens das Kondensat ausgeschoben werden.

Das System besteht aus einem Sammelrohr mit aufgestecktem Mundstück, einer Aluminiumhülle, einem Isolationsschutz und einem Kolben (siehe Abbildung 3).



Abbildung 3: Bestandteile des RTube® EBC-Sammelsystems.

Sammelrohr und Mundstück sind Einmalprodukte, die nach jedem Patientenkontakt zur Minimierung der Ansteckungsgefahr ausgetauscht werden. Die übrigen Teile sind wieder verwendbar.

Das Sammelrohr setzt sich aus drei Teilen zusammen: Dem Mundstück, der Kondensationskammer und dem diese beiden Teile verbindenden blauen T-Stück. Das T-Stück ist nach unten hin offen. Darin befindet sich - unterhalb des Ansatzes für das Mundstück - ein Scheibenventil. Die Kondensationskammer hat eine Öffnung nach oben. Das Ende zum T-Stück hin wird durch ein Entenschnabel-Ventil abgegrenzt. Beide Ventile sind Einweg-Ventile und sichern getrennte Wege von Ein- und Ausatemluft (siehe Abbildung 4).

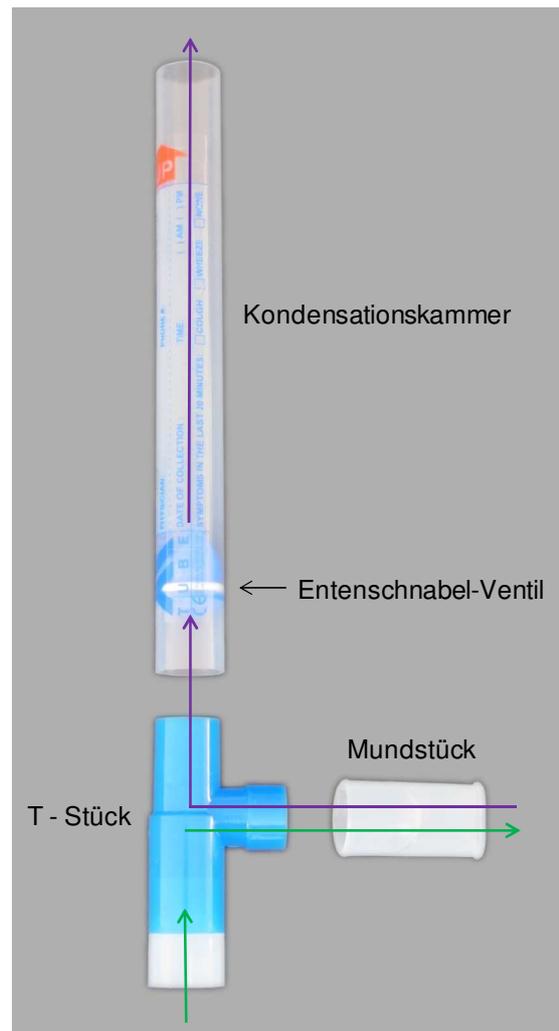


Abbildung 4: Aufbau des Sammelrohrs und Luftfluss.

Farbschema:

grün - Weg der Einatemluft mit Passage des Scheiben-Ventils

lila - Weg der Ausatemluft mit Passage des Entenschnabel-Ventils.

Vor der Nutzung des RTube[®] muss sichergestellt werden, dass es zu keiner lagerungsbedingten Verklebung des Entenschnabel-Ventils gekommen ist. Deshalb wird das RTube[®] ausgepackt und ein Funktionstest durchgeführt, indem mit Daumen und Zeigefinger das Ventil seitlich zusammengedrückt wird. Dabei sollen sich die beiden Lippen des Ventils voneinander lösen (siehe Abbildung 5).

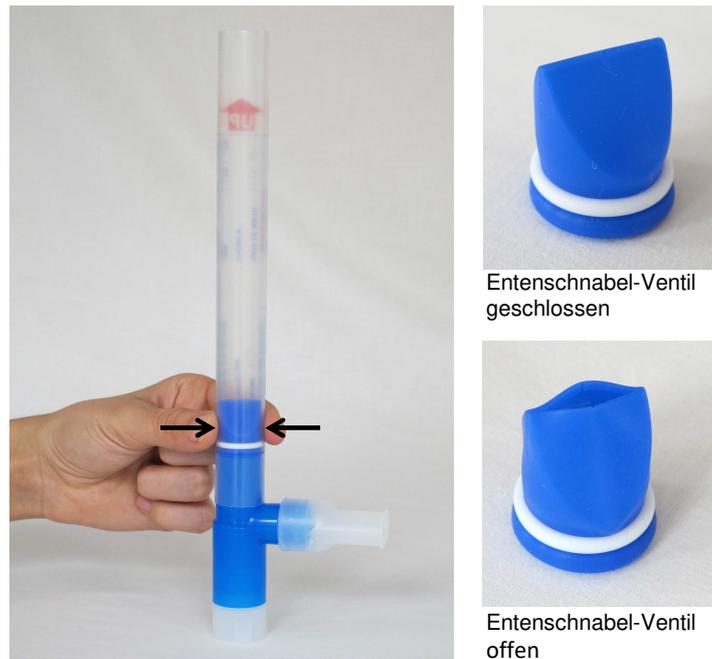


Abbildung 5: Sicherstellung der Funktionsfähigkeit des Entenschnabel-Ventils.

Bild links: Zusammendrücken des Sammelrohres auf Höhe des Entenschnabel-Ventils mit Daumen und Zeigefinger

Bild rechts oben: Entenschnabel-Ventil in Ruheposition = geschlossen

Bild rechts unten: Entenschnabel-Ventil geöffnet.

Bevor Proben gesammelt werden können, muss die Aluminiumhülle in einem Gefrierschrank gekühlt werden. Das RTube[®] ist einsatzbereit, wenn die Aluminiumhülle auf die gewünschte Temperatur abgekühlt ist und der Isolationsschutz angebracht worden ist (siehe Abbildung 6).

Mit dem so vorbereiteten Gerät erfolgt nun die Probensammlung. Der Patient nimmt das Mundstück in den Mund und beginnt in das Sammelrohr zu atmen. Dabei muss das RTube[®] senkrecht gehalten werden.

Beim Einatmen gelangt die Luft von unten durch das T-Stück, passiert das Scheiben-Ventil und wird über das Mundstück zum Patienten geleitet. Die Ausatemluft strömt durch das Mundstück zum Entenschnabel-Ventil und erreicht nach Passage des Ventils die Kondensationskammer (siehe Abbildung 4). Speichel wird, der Schwerkraft folgend, im blauen T-Stück nach unten durch das Scheiben-Ventil nach außen geleitet. Das Strömen der Atemluft durch das Entenschnabel-Ventil als auch der Wechsel der Strömungsrichtung durch Aus- und Einatmen verursachen Luftverwirbelungen, welche die Kontaktwahrscheinlichkeit der Atemluft mit der kalten Innenwandung des RTubes[®] erhöhen und die Kondensation der Feuchte und der Partikel der Ausatemluft begünstigen.

Nach Beendigung der Prozedur wird für den sicheren Transport das T-Stück mit dem Mundstück abgezogen und an jedes Ende der Kondensationskammer eine Kappe angebracht.

Um das Kondensat zu einer Probe zusammenzuführen, werden vom senkrecht gehaltenen RTube® die Kappen wieder entfernt und mit Hilfe des Kolbens wird das Entenschnabel-Ventil von unten nach oben geschoben. Dieser Arbeitsschritt sollte sehr langsam vorgenommen werden, da ein plötzlich nachlassender Widerstand zum Abrutschen und zum Verlust der Probe führen kann (siehe Abbildung 7).

Bei diesem Vorgang sammelt sich das Kondensat oberhalb des Ventils und wird nun mit einer Pipette aufgenommen und falls gewünscht, in ein anderes Behältnis überführt.



Abbildung 6: Aufbau des ein-satzbereiten RTube®.

Die gekühlte Aluminiumhülle wird mit dem Isolationsschutz versehen und dann auf das Sammelrohr geschoben.

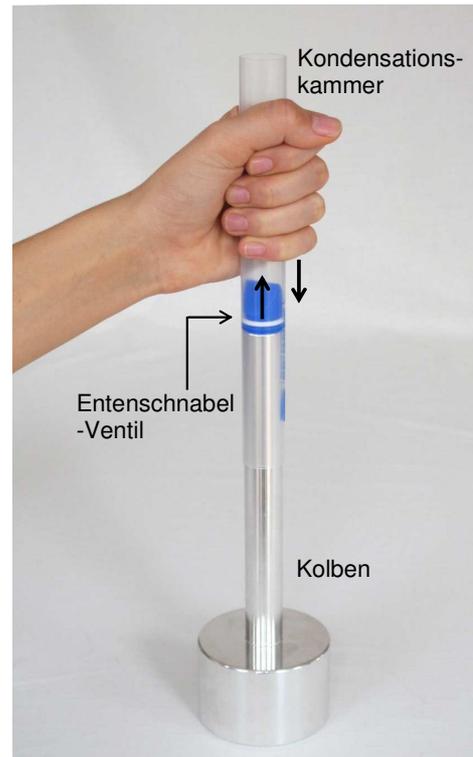


Abbildung 7: Probenvereinigung mit Hilfe des Kolbens.

Die Kondensationskammer wird mit der unteren Öffnung auf den Kolben aufgesetzt. Das Entenschnabel-Ventil wird mit leichtem Druck nach oben geschoben. Bei diesem Vorgang sammelt sich das EBC oberhalb des Entenschnabel-Ventils.

Durchführung und Lagerung

Die Aluminiumhülle wurde vor den Probennahmen auf -20°C gekühlt und beim Transport zum Patienten in einem mit Eis gefüllten Isoliergefäß aufbewahrt. Eisbildung und Kontamination der Aluminiumhülle wurde durch Lagern in einem verschließbaren Plastikbeutel verhindert. Damit der Arbeitsablauf in der Mukoviszidoseambulanz nicht

gestört wurde, mussten unterschiedliche Wartezeiten bis zur Probengewinnung in Kauf genommen werden. Vor der Nutzung des RTube[®] wurde die Funktion des Entenschnabelventils sichergestellt. Die Patienten nahmen eine angenehme Sitzposition ein und atmeten 7 Minuten lang in ruhigen Zügen in das RTube[®] durch den Mund in das Mundstück ein und aus, ohne eine Nasenklammer zu tragen. Die Kondensationskammer wurde im Anschluss im Isoliergefäß auf Eis gelagert und in das Labor transportiert, wo die Probe dann entnommen wurde. Pro Patient konnten auf diese Weise 0,62 g – 2,16 g EBC gewonnen werden, welches für die folgenden Untersuchungen bei -20°C gelagert wurde.

2.3 Versuchsdurchführung

2.3.1 Nachweis von Nukleasen in Atemwegssekreten

Für den Nachweis von RNasen wurde Maus-Erythropoetin-mRNA (mEpo mRNA) eingesetzt. Diese RNA ist gekennzeichnet durch den Austausch eines Teils ihrer Basen, welche eine höhere Stabilität und geringere Immunogenität gewährleisten. 25% des Uridin und Cytidin wurden modifiziert mit 2-Thiouridin-5'-Triphosphat und 5-Methylcytidin-5'-Triphosphat. (Kormann MS et al., 2011)

Für den DNase-Nachweis wurde lineare *P. aeruginosa*-DNA verwendet. Diese wurde mit Hilfe des *Ps. sp.*-Primerpaares hergestellt und hat eine Länge von 618 bp. (Spilker T et al., 2004)

2.3.1.1 Besondere Vorkehrungen beim Arbeiten mit RNasen und DNasen

RNasen und DNasen werden von allen Organismen produziert und sind folglich weit verbreitet. Deshalb wurden beim Arbeiten mit RNA und DNA zur Vermeidung von Kontamination besondere Vorsichtsmaßnahmen ergriffen. Insbesondere RNasen haben eine hohe Aktivität und eine beeindruckende Überlebensfähigkeit. Schon eine geringe Kontamination mit der sehr aktiven RNase reicht daher aus, die zu untersuchende RNA wirkungsvoll zu zerstören.

Für das zeitgleiche Arbeiten mit RNA und RNasen sind deshalb spezielle Vorkehrungen getroffen worden, die auch für die Arbeit mit DNA und DNasen galten:

- Einrichtung eines eigenen Laborplatzes.
- Dekontamination des Laborplatzes, aller verwendeten Materialien und Geräte mit einem speziellen RNase-Reinigungsmittel (RNase Exitus, AppliChem GmbH, Darmstadt).
- Nutzung von gestopften Pipettenspitzen.
- Ausschließliche Verwendung von speziell als RNase- und DNase-frei ausgezeichneten Materialien wie zum Beispiel Reaktionsgefäße und Lösungen.

- Bei allen Arbeitsschritten wurden Einmalhandschuhe und ein Laborkittel getragen.

2.3.1.2 Entwicklung und Definition von Standardprozeduren

Für die Entwicklung eines geeigneten Versuchsprotokolls waren einige Experimente zur Festlegung von Definitionen im Vorfeld notwendig. Im Einzelnen handelte es sich um:

- Verdünnung von Nukleinsäuren
- Definition der Reaktionszeit
- Zeitpunkt der Ladepufferzugabe
- Entwicklung der Positivkontrolle und Bestimmung der Nachweisgrenze für die Detektion von RNasen
- Definition der Negativkontrolle für den RNase-Nachweis
- Entwicklung der Positivkontrolle und Bestimmung der Nachweisgrenze für die Detektion von DNasen
- Definition der Negativkontrolle für den DNase-Nachweis

Alle Mengenangaben wurden auf 0,01 µg gerundet.

Verdünnung der Nukleinsäuren

Das Pipettieren exakter Mengen von Nukleinsäuren wurde optimiert, indem mit RNase freiem Wasser verdünnt und anschließend die erzielte Konzentration mit dem Spektrophotometer kontrolliert wurde. Die Verdünnungen wurden so gewählt, dass sich in der Elektrophorese jeweils eine deutliche Bande abbildete.

Folgende Nukleinsäurestandardkonzentrationen wurden dabei gemessen:

- mEpo mRNA: 0,22 µg/µl
- P. aeruginosa-DNA: 0,41 µg/µl

Die mEpo mRNA wurde freundlicherweise von Dr. Kai Michaelis bereitgestellt.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurden folgende Standardeinheiten definiert:

- Eine Standardeinheit¹ RNA (SE¹ RNA): 1 µl 0,22 µg/µl mEpo mRNA
- Eine Standardeinheit¹ DNA (SE¹ DNA): 1 µl 0,41 µg/µl P. aeruginosa-DNA

Definition der Reaktionszeit

Der Beginn der Reaktionszeit wurde als der Zeitpunkt definiert, zu welchem dem Reaktionsansatz mEpo mRNA bzw. *P. aeruginosa*-DNA hinzupipettiert wurde. Die Nukleinsäuren wurden jeweils zuletzt beigegeben. Beendet wurde die Reaktionszeit durch Übertragung in die Gelelektrophorese. Es wurde davon ausgegangen, dass sich die Reagenzien durch Diffusion im Gel und Puffer verteilen und so stark verdünnen, dass keine für das Ergebnis relevanten Reaktionen mehr stattgefunden haben würden.

Zeitpunkt der Ladepufferzugabe

Ladepuffer dient dem ‚Beschweren‘ und Anfärben der Proben. Damit können Nukleinsäuren leichter in die gewünschten Geltaschen pipettiert werden.

Der Einfluss des Zeitpunktes der Ladepufferzugabe auf die Reaktion wurde durch Herstellung zweier identischer Reaktionsansätze aus einer SE¹ RNA, 1 µl Sputum und 3 µl RNase freiem Wasser untersucht. Einem dieser Ansätze wurde zu Beginn der Reaktionszeit 3 µl Ladepuffer beigegeben, dem anderen erst kurz vor Ablauf der 15-minütigen Inkubationszeit. Bei der Auswertung mittels Gelelektrophorese zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Proben. Um einen dennoch möglicherweise vorhandenen Einfluss auf die Reaktion zu minimieren, wurde der Ladepuffer in den folgenden Tests erst kurz vor Ablauf der Inkubationszeit der Probe zugesetzt.

Entwicklung der Positivkontrolle und Bestimmung der Nachweisgrenze für die Detektion von RNasen

In Vorversuchen zeigte sich, dass bei Verwendung einer Positivkontrolle (PK) aus 1 µl synthetischer RNase A mit einer Aktivität von 7 U/µl und einer SE¹ RNA zum Teil eine Degradation der benachbarten Proben im Gel stattfand. Offenbar war die Konzentration der RNase A zu hoch.

Zur Bestimmung der minimalen RNase-Konzentration zur Degradation einer SE¹ RNA, wurde eine Konzentrationsreihe mit 10-facher bis 10⁵-facher Verdünnung aus RNase A hergestellt. Dazu wurden für jeden Verdünnungsschritt 9 µl RNase freies Wasser vorgelegt und mit 1 µl der nächst höheren Konzentration gemischt. 1 µl einer 10³-fach verdünnten RNase A degradierte vollständig eine SE¹ RNA innerhalb von 15 Minuten (siehe Abbildung 8, Bande 3). Das entspricht 0,1 µg RNase mit einer Aktivität von 7×10^{-3} U. Bei einer 10⁴-fachen Verdünnung konnte eine abgeschwächte Degradation bei teils erhaltener RNA-Bande durch Schmierbildung nachgewiesen werden (siehe Abbildung 8, Bande 2). Auf Basis dieser Ergebnisse wurde die Nachweisgrenze für die RNase A auf einen Wert zwischen 1 µl einer 10³- und einer 10⁴-fachen Verdünnung festgelegt. Das entspricht 0,1 bis 0,01 µg RNase A mit einer Aktivität von 7×10^{-3} bis 7×10^{-4} U.

Für die PK bei den weiteren RNase-Nachweisversuchen wurde jeweils 1 µl mit 10³-facher Verdünnung gewählt. Eine zusätzliche Testung mit dieser RNase A-Menge zeigte keinen sichtbaren Einfluss auf die benachbarten Banden.

Definition der Negativkontrolle für den RNase-Nachweis

Die Negativkontrolle (NK) bestand aus einer SE¹ RNA und 1 µl RNase freiem Wasser. Sie diente dem Ausschluss einer RNasen-Kontamination.

Entwicklung der Positivkontrolle und Bestimmung der Nachweisgrenze für die Detektion von DNasen

Bei der Detektion von DNasen in Atemwegssekreten sollte die synthetische DNase I mit einer Aktivität von 1 U/µl als PK dienen. Über die enthaltene DNase-Menge waren vom Hersteller keine Angaben erhältlich.

Die Bestimmung der DNase PK wurde ebenfalls mittels einer Konzentrationsreihe durchgeführt. Zum Auffinden der für die PK minimalen DNase-Konzentration wurde eine Konzentrationsreihe von 10-facher bis 10²-facher Verdünnung analog dem Prinzip der oben beschriebenen RNase-Verdünnungsreihe hergestellt und unter Zugabe von jeweils 0,5 µl Reaktionspuffer für DNase I getestet. 1 µl 10-fach verdünnte Lösung degradierte eine SE¹ DNA vollständig innerhalb von 15 Minuten, wobei bei einer 10²-fachen Verdünnung keine sichtbare Degradation mehr stattfand. Die Nachweisgrenze wurde somit bei einer 10-fachen Verdünnung festgelegt mit einer daraus resultierenden Aktivität von 0,1 U. Diese Lösung wurde als DNase-PK eingesetzt. Eine sichtbare Degradation benachbarter Banden bei dieser Konzentration fand nicht statt (siehe Abbildung 9).

Definition der Negativkontrolle für den DNase-Nachweis

Die NK setzte sich aus einer SE¹ DNA und 1 µl RNase freiem Wasser zusammen. Sie diente dem Ausschluss einer Kontamination mit DNasen.

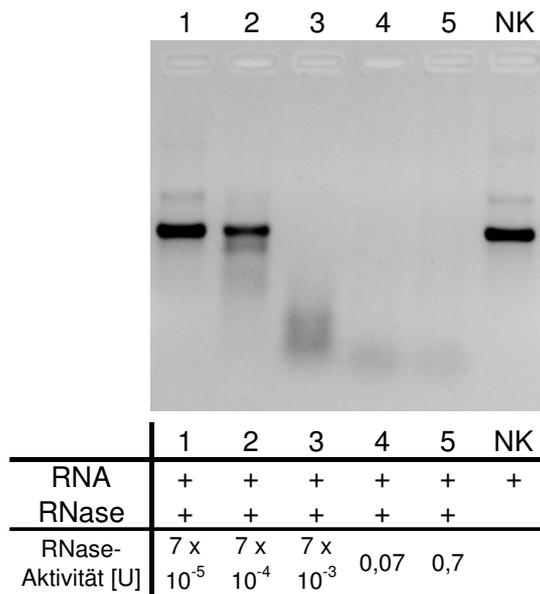


Abbildung 8: RNase A Verdünnungsreihe (Inkubationszeit: 15 Minuten).

Schema der Gelelektrophorese:
 Bahn 1 - 5: Jeweils eine SE¹ RNA und 1 µl entsprechend verdünnte RNase A
 Bahn 1: 10⁵-fach Bahn 2: 10⁴-fach
 Bahn 3: 10³-fach Bahn 4: 10²-fach
 Bahn 5: 10-fach
 NK: Negativkontrolle aus einer SE¹ RNA und 1 µl RNase freiem Wasser.

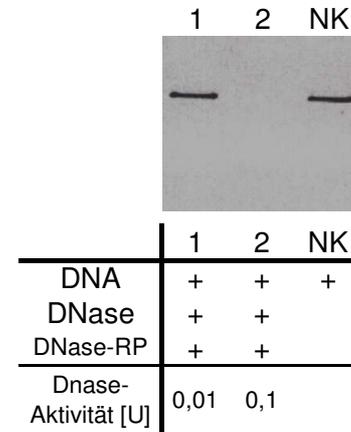


Abbildung 9: DNase I Verdünnungsreihe (Inkubationszeit: 15 Minuten).

Schema der Gelelektrophorese:
 Bahn 1: Eine SE¹ DNA und 1 µl DNase I 10²-fach verdünnt
 Bahn 2: Eine SE¹ DNA und 1 µl DNase I 10-fach verdünnt
 NK: Negativkontrolle aus einer SE¹ DNA und 1 µl RNase freiem Wasser.

Standardprotokoll für den Nachweis von RNasen und DNasen in Atemwegssekreten

Zum Homogenisieren der Sputum- und EBC-Proben wurden diese zu Beginn des jeweiligen Versuches mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers gemischt und anschließend kurz abzentrifugiert. Nach Zugabe aller notwendigen Reagenzien wurde erneut gemischt und abzentrifugiert.

Alle Proben wurden mit RNase freiem Wasser auf 5 µl aufgefüllt und bei Raumtemperatur (21°C) inkubiert.

Ein Schema des RNase- und DNase-Nachweises findet sich in Abbildung 10.

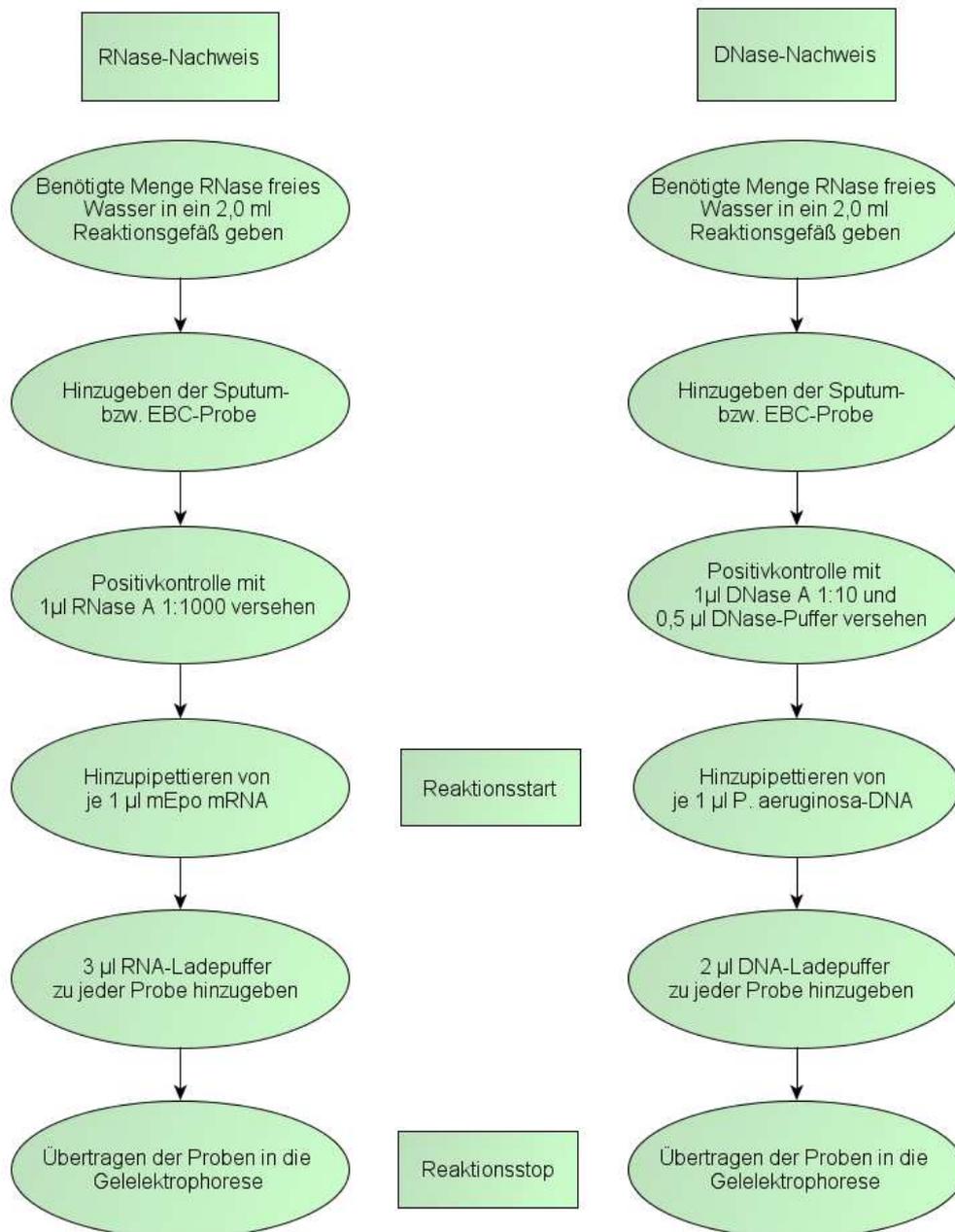


Abbildung 10: Schema des Ablaufs des RNase- und DNase-Nachweises.

2.3.1.3 Versuchsansätze

Es wurden je vierzehn verschiedene Sputumproben und je fünfzehn verschiedene EBC-Proben untersucht.

Endogener RNA- und DNA-Gehalt im Sputum

Um den endogenen Gehalt an RNA und DNA im Sputum zu zeigen, wurde reines Sputum in die Gelelektrophorese eingesetzt. Je Probe wurden 5 µl Sputum verwendet und zusammen mit 3 µl RNA-Ladepuffer aufgetrennt. Es wurde sowohl ein RNA-Größenmarker als auch ein DNA-Größenmarker aufgetragen.

RNase-Nachweis

Für den Nachweis von RNasen im Sputum bzw. EBC wurde jeweils eine SE¹ RNA mit 1 µl aufbereitetem Sputum bzw. EBC inkubiert.

Kurz vor Ablauf der Inkubationszeit wurden jeder Probe 3 µl RNA-Ladepuffer zugegeben. Tabelle 3 zeigt einen Überblick der Probenansätze.

Bei der Untersuchung der Sputumproben betrug die Reaktionszeit 15 Minuten. Die EBC-Proben inkubierten 20 Stunden.

Tabelle 3: Reaktionsansatz für den RNase-Nachweis in Atemwegssekreten.

Reagenz	Probe	PK	NK
SE ¹ RNA	1 Einheit	1 Einheit	1 Einheit
Sputum/EBC	1 µl	-	-
RNase A 1:1000 (0,7 x 10 ⁻² U/µl)	-	1 µl	-
RNase freies Wasser	3 µl	3 µl	4 µl
RNA-Ladepuffer	3 µl		
Gesamtvolumen	8 µl		

DNase-Nachweis

Bei der Untersuchung der DNase-Aktivität wurde lineare P. aeruginosa-DNA verwendet. Jede Probe setzte sich aus einer SE¹ DNA und 1 µl Sputum bzw. EBC zusammen. Die Proben wurden 20 Stunden inkubiert. Ein weiterer Versuchsansatz mit EBC wurde 2 Stunden inkubiert. Kurz vor Ablauf der Inkubationszeit wurden jeder Probe 3 µl DNA-Ladepuffer zugegeben.

Tabelle 4 zeigt einen Überblick der Probenansätze.

Tabelle 4: Reaktionsansatz für den DNase-Nachweis in Atemwegssekreten.

Reagenz	Probe	PK	NK
SE ¹ DNA	1 Einheit	1 Einheit	1 Einheit
Sputum/EBC	1 µl	-	-
DNase I 1:10 (0,1 U/µl)	-	1 µl	-
RNase freies Wasser	3 µl	3 µl	4 µl
DNA-Ladepuffer	3 µl		
Gesamtvolumen	8 µl		

2.3.1.4 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden 2%ige Gele aus 100 ml TAE-Puffer und 2 g Agarose mit einer Ethidiumbromidkonzentration von 0,8 µg/ml hergestellt. Nach dem Auftragen der Proben wurden diese bei 90 V in TAE-Puffer aufgetrennt. Die Laufzeit betrug 60 Minuten. Es wurde jeweils das gesamte Reaktionsvolumen in die Geltaschen übertragen.

Handelte es sich um einen RNase-Nachweis, wurden in die erste Tasche 8 µl eines nach Anleitung hergestellten RNA-Größenmarkers gegeben. Beim Nachweis von DNase wurden 6 µl eines 100 bp Größenmarkers in die erste Tasche pipettiert. Mit Hilfe der Größenmarker erfolgte bei einer Bandenbildung die Abschätzung der RNA- bzw. DNA-Länge.

2.3.2 Nachweis von Nukleinsäuren in Atemwegssekreten

Abbildung 2, Absatz 1.3 zeigt einen Überblick zum Vorgehen bei den Versuchen zur Detektion von Nukleinsäuren in EBC. Für den DNA-Nachweis wurden die EBC-Proben unmittelbar in die PCR eingesetzt. Der RNA-Nachweis mittels Reverser Transkription und PCR fand erst nach Durchführung eines DNase-Verdaus statt. Um eine Verunreinigung mit DNA auszuschließen, wurden parallel zum RNA-Nachweis Kontrollproben mitgeführt. Zwölf EBC-Proben wurden mit einem *P. aeruginosa*-spezifischen Primer getestet und mit einem Primer zur Detektion der *Pseudomonas* Spezies. Diese Primer entwickelte die Arbeitsgruppe von Spilker T (2004) mit dem Ziel einer exakten Differenzierung der bakteriellen Zugehörigkeit zur *P. aeruginosa*-Gattung oder der *Pseudomonas* Spezies. Sie kodieren für einen Abschnitt der 16S ribosomalen DNA von *P. aeruginosa*. Die Primer zeigten in dieser Studie mit dem entsprechend entwickelten PCR-Protokoll eine Sensitivität und Spezifität von 100%.

2.3.2.1 Entwicklung und Definition von Standardprozeduren

Alle Mengenangaben wurden auf 0,1 ng gerundet.

Untersucht wurden die EBC-Proben der zwölf *P. aeruginosa*-positiv getesteten Patienten. Die einzelnen Proben wurden nach Zugabe des letzten Reagens durch Auf- und

Abpipettieren gemischt. Die Bearbeitung aller Versuchsschritte fand, soweit im Text nicht anders erwähnt, auf Eis statt.

Verdünnung der Nukleinsäuren

Als PK und zur Bestimmung der Nachweisgrenze sowie Detektion von Inhibitoren der Reversen Transkription bzw. PCR dienten *P. aeruginosa*-DNA und -RNA. Diese wurde freundlicherweise von Dr. Kai Michaelis zur Verfügung gestellt. Die *P. aeruginosa*-DNA wurde auf 1,5 ng/μl, die -RNA auf 107 ng/μl verdünnt (gemessen mit dem Spektrophotometer).

Auf Basis dieser Ergebnisse wurden folgende Standardeinheiten definiert:

- Eine Standardeinheit² RNA (SE² RNA): 2 μl 107 ng/μl *P. aeruginosa*-RNA (entspricht 214 ng)
- Eine Standardeinheit² DNA (SE² DNA): 1 μl 1,5 ng/μl *P. aeruginosa*-DNA

Positiv- und Negativkontrolle der RT

Die PK bestanden aus einer SE² RNA. Beim Versuch zur Detektion von Inhibitoren wurde eine SE² RNA 1:10 verdünnt und davon 2 μl eingesetzt.

Für die NK der RT wurde RNase freies Wasser verwendet.

RT-Kontrollen

Alle Proben wurden doppelt angesetzt und in der RT getrennt behandelt, wobei die zusätzlichen Proben als RT-Kontrollen fungierten. Bei diesen Proben wurde mit RNase freiem Wasser anstatt von Reverser Transkriptase gearbeitet und sie dienten dem Ausschluss verbleibender DNA-Kontaminationen nach dem DNase-Verdau.

Positiv- und Negativkontrolle der PCR

Als PK diene eine SE² DNA. Bei der Untersuchung auf PCR-Inhibitoren wurde eine SE² DNA 1:10 verdünnt und jeweils 1 μl zu den Proben zugegeben. Für die NK der PCR wurde RNase freies Wasser eingesetzt.

Erstellung eines Mastermixes

Um Arbeitsschritte einzusparen, wurde für den DNase-Verdau, die Reverse Transkription und die PCR jeweils ein Mastermix erstellt. Für je zehn Proben wurde eine Probe zusätzlich angesetzt, um den Pipettierverlust auszugleichen. Nach Vereinigung aller Reagenzien des Mastermixes wurde dieser mit Hilfe des Vortex-Schüttlers gemischt und kurz abzentrifugiert.

Entwicklung des PCR-Protokolls

Für die PCR wurde das Kit ‚AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity‘ von Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt genutzt. Unterschiedliche Primer- und Taq-Polymerasemengen wurden in Vorversuchen getestet, um das PCR-Protokoll zu optimieren. Tabelle 5 zeigt den Basisansatz für alle folgenden Versuche.

Weitere Versuche dienten der Optimierung der Zyklenzahl und der Reaktionszeiten, wobei das von Spilker T et al. (2004) entwickelte PCR-Programm als Vorlage diente. Modifikationen der Elongationszeit (1 Minute anstatt 40 Sekunden) und Zyklenzahl (30 anstatt 25 Zyklen) wurden vorgenommen. Für beide Primerpaare wurde das folgende PCR- Programm erstellt:

29 x	1. Initiale Denaturierung	95°C	2 min
	2. Denaturierung	94°C	20 s
	3. Annealing	54°C	20 s
	4. Elongation	72°C	1 min
	5. Finale Elongation	72°C	1 min
	6. Lagerung	12°C	bis Ende

Zyklen: Ein Zyklus bestand aus den Schritten 2., 3. und 4.

Zyklenzahl gesamt: 30

Temperatur Heizdeckel: 97°C

Für die verwendeten Primerpaare wurde im Vorfeld eine Gradienten-PCR durchgeführt, um die optimale Annealingtemperatur zu finden. Hierfür wurde das zuvor beschriebene PCR-Programm genutzt. Zwölf Proben wurden mit Annealingtemperaturen von 51 - 60,8°C getestet. Tabelle 6 zeigt den verwendeten Probenansatz.

Tabelle 5: Basisreaktionsansatz für die PCR.

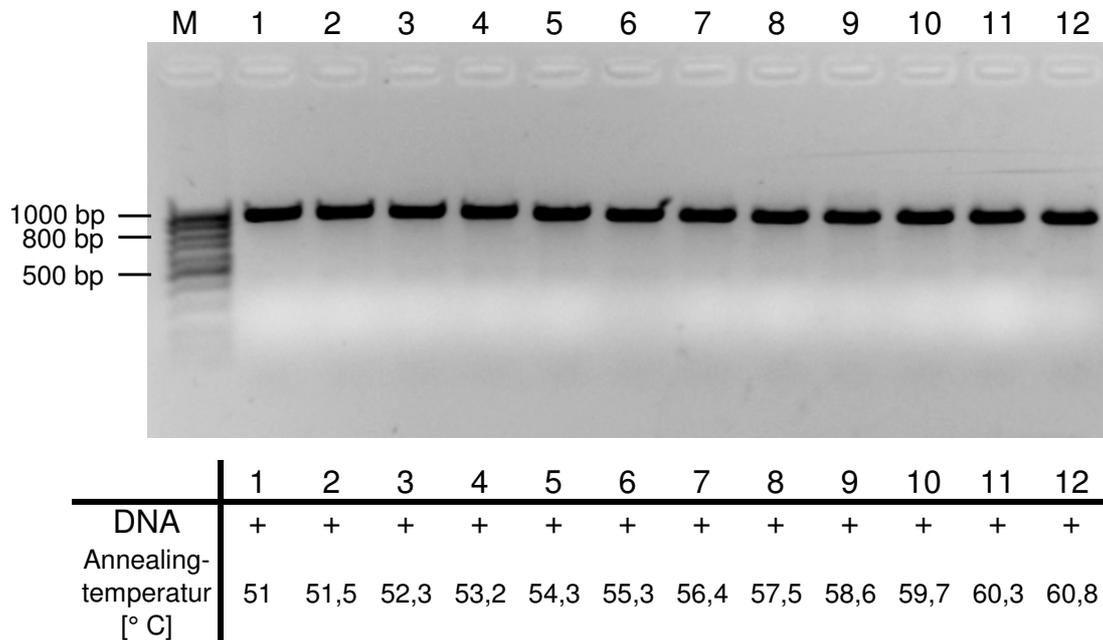
	Reagenz	Menge
1 x Mastermix	Puffer 1	2 µl
	Taq-Polymerase	0,25 µl
	Vorwärtsprimer	0,1 µl
	Rückwärtsprimer	0,1 µl
	RNase freies Wasser	auf 20 µl
	Probe	bis zu 17,55 µl
	Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 6: Reaktionsansatz für eine Probe der Gradienten-PCR.

	Reagenz	Menge
1 x Mastermix	Puffer 1	2 µl
	Taq-Polymerase	0,25 µl
	Vorwärtsprimer	0,1 µl
	Rückwärtsprimer	0,1 µl
	RNase freies Wasser	16,55 µl
	SE ² DNA	1 Einheit
	Gesamtvolumen	20 µl

Beide Primerpaare zeigten bei Annealingtemperaturen von 51 - 60,8°C eine deutliche Bandenbildung (siehe Abbildung 11 und Abbildung 12). Bei Verwendung des Ps. ae.-Primerpaares zeigten sich Banden mit etwa 1000 bp Länge. Spilker T et al. (2004) bestimmten die Produktgröße in der Sequenzierung auf 956 bp.

Das Produkt des Ps. sp.-Primerpaares zeigt in der Gelelektrophorese eine Größe von 600 - 700 bp. Die von Spilker T et al. (2004) in der Sequenzierung untersuchte Größe beträgt 618 bp.

**Abbildung 11:** Gradienten-PCR mit dem Ps. ae.-Primerpaar.

Schema der Gelelektrophorese:

M: DNA-Größenmarker

Bahnen 1 - 12: Jeweils eine SE² DNA mit unterschiedlichen Annealingtemperaturen von 51 - 60,8°C.

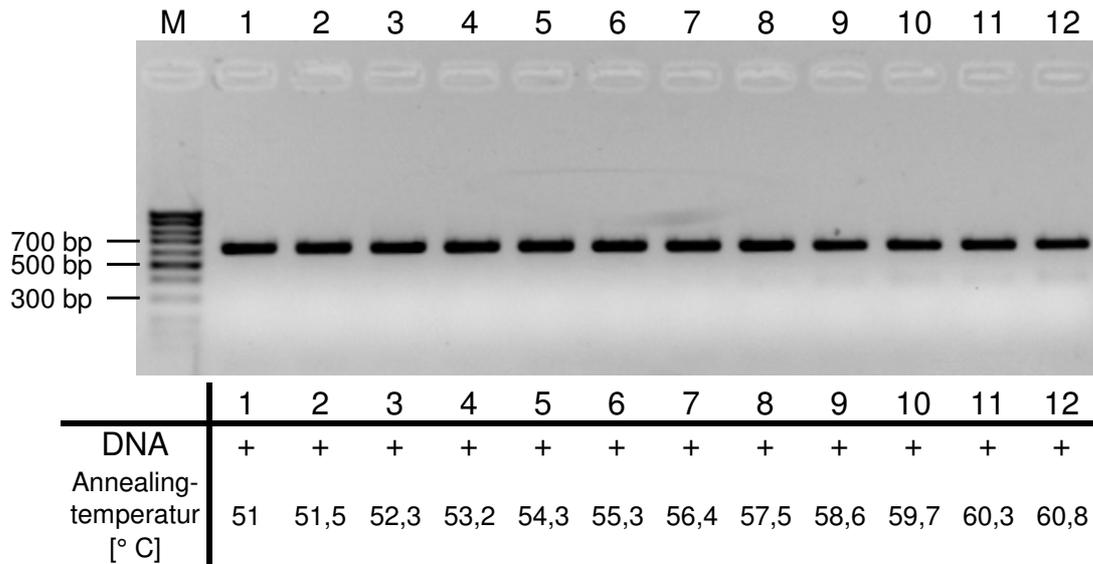


Abbildung 12: Gradienten-PCR mit dem *Ps. sp.*-Primerpaar.

Schema der Gelelektrophorese:

M: DNA-Größenmarker

Bahnen 1 - 12: Jeweils eine SE² DNA bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen von 51 - 60,8°C.

Bei zu niedrigen Annealingtemperaturen besteht das Risiko einer unspezifischen Bindung der Primer an die DNA und führt damit zur Entstehung unerwünschter Nebenprodukte, wohingegen zu hohe Temperaturen den DNA-Nachweis erschweren. Für die weiteren Versuche wurde die Annealingtemperatur deshalb für beide Primerpaare auf einen mittleren Wert von 54°C festgelegt. Spilker T et al. (2004) wählte für das *Ps. sp.*-Primerpaar ebenfalls 54°C, für das *Ps. ae.*-Primerpaar jedoch 58°C als Annealingtemperatur.

2.3.2.2 Nachweis von *P. aeruginosa*-RNA in Atemwegssekreten

DNase-Verdau

Zum Ausschluss eines positiven Nachweises durch DNA-Kontamination in der PCR wurden alle Proben vor der RT einem DNase-Verdau unterzogen. Dazu wurden die Komponenten und das Protokoll des QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen GmbH, Hilden verwendet.

Der Verdau fand in einem Gesamtvolumen von 14 µl statt. Jede Probe wurde mit 2 µl gDNA Wipeout Puffer 7x versehen und anschließend mit RNase freiem Wasser auf ein Endvolumen von 14 µl aufgefüllt.

Zum Nachweis von *P. aeruginosa*-RNA wurden je 5 µl EBC zum Reaktionsansatz hinzugefügt. Insgesamt zwölf verschiedene EBCs von *P. aeruginosa*-positiven Patienten wurden untersucht. Die Proben wurden wie in Tabelle 7 beschrieben angesetzt.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der RT-PCR wurden acht Proben mit je 2 µl SE² RNA in Verdünnungen von 1:10 bis 1:10⁸ in 10er-Schritten getestet. Die Verdünnungsreihe wurde nach dem unter „2.3.1.2 Entwicklung und Definition von Standardprozeduren“ beschriebenen Prinzip hergestellt. Tabelle 8 zeigt den verwendeten Probenansatz.

Für die Detektion von Inhibitoren der RT-PCR wurden je 5 µl EBC und eine SE² RNA 1:10 verdünnt in den DNase-Verdau eingesetzt. Alle zwölf EBC-Proben von P. aeruginosa-positiven Patienten wurden mittels dieser Methode untersucht. Die Proben wurden wie unter Tabelle 9 beschrieben angesetzt.

Ein weiterer Versuchsansatz sollte die RT-PCR an Hand von vierzehn Sputumproben überprüfen. Es wurden je 2 µl Sputum in den DNase-Verdau eingesetzt (siehe Tabelle 10). Alle Proben wurden für zwei Minuten bei 42°C inkubiert und danach auf Eis transferiert.

Tabelle 7: Reaktionsansatz für den P. aeruginosa-RNA-Nachweis im EBC.

	Reagenz	Menge
1 x Mastermix	gDNA-Wipeout Puffer 7 x	2 µl
	RNase freies Wasser	10 µl
	EBC	2 µl
	Gesamtvolumen	14 µl

Tabelle 8: Reaktionsansatz für die Bestimmung der Nachweisgrenze der RT-PCR.

	Reagenz	Menge
1 x Mastermix	gDNA-Wipeout Puffer 7 x	2 µl
	RNase freies Wasser	10 µl
	SE ² RNA 1:10 bis 1:10 ⁸ (in 10er Schritten)	Jeweils 1 Einheit
	Gesamtvolumen	14 µl

Tabelle 9: Reaktionsansatz für die Detektion von Inhibitoren der RT-PCR im EBC.

	Reagenz	Menge
1 x Mastermix	gDNA-Wipeout Puffer 7 x	2 µl
	RNase freies Wasser	5 µl
	EBC	5 µl
	SE ² RNA 1:10 verdünnt	1 Einheit
	Gesamtvolumen	14 µl

Tabelle 10: Reaktionsansatz für den *P. aeruginosa*-RNA-Nachweis im Sputum.

	Reagenz	Menge
1 x Mastermix	gDNA-Wipeout Puffer 7 x	2 µl
	RNase freies Wasser	10 µl
	Sputum	2 µl
	Gesamtvolumen	14 µl

Reverse Transkription

Es wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen GmbH, Hilden verwendet. Das Protokoll der RT war für alle Versuche identisch. Der Probenansatz ist in der Tabelle 11 dargestellt. Je 1 x Mastermix wurde zu einer Probe aus dem abgeschlossenen DNase-Verdau hinzugefügt. Das Gesamtreaktionsvolumen der RT betrug somit 20 µl.

Für die Kontrollen wurde ein eigener Ansatz ohne Reverse Transkriptase zusammengestellt (siehe Tabelle 12).

Alle Proben wurden für 30 Minuten bei 42°C inkubiert und die Reaktion durch dreiminütiges Erhitzen auf 95°C gestoppt. Danach wurden die Proben sofort auf Eis gelegt.

Tabelle 11: Reaktionsansatz für die RT-Proben.

	Reagenz	Menge
1 x Mastermix	Quantiscript RT Puffer 5x	4 µl
	Primermix	1 µl
	Quantiscript RT	1 µl
	Probe aus dem DNase-Verdau	14 µl
	Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 12: Reaktionsansatz für die RT-Kontrollen.

	Reagenz	Menge
1 x Mastermix	Quantiscript RT Puffer 5x	4 µl
	Primermix	1 µl
	RNase freies Wasser	1 µl
	Probe aus dem DNase-Verdau	14 µl
	Gesamtvolumen	20 µl

PCR der RT-Proben

Folgender PCR-Ansatz wurde für das weitere Verfahren mit den Proben nach Abschluss der Reversen Transkription verwendet (Tabelle 13).

Tabelle 13: Reaktionsansatz für die PCR der RT-Proben.

	Reagenz	Menge
1 x Mastermix	Puffer 1	2 µl
	Taq-Polymerase	0,25 µl
	Vorwärtsprimer	0,1 µl
	Rückwärtsprimer	0,1 µl
	RNase freies Wasser	12,55 µl
	Probe aus der RT	5 µl
	Gesamtvolumen	20 µl

1 x Mastermix reagierte mit 5 µl der jeweiligen Probe nach abgeschlossener Reverser Transkription. Es ergab sich ein Gesamtreaktionsvolumen von 20 µl.

Alle Proben mit Ausnahme der Sputumproben wurden je einmal mit dem Ps. sp.- und einmal mit dem Ps. ae.-Primerpaar getestet. Für die Detektion der Nachweisgrenze, das Auffinden von Reaktionsinhibitoren und den P. aeruginosa-RNA Nachweis im Sputum wurde das Ps. ae.-Primerpaar verwendet.

2.3.2.3 Nachweis von P. aeruginosa-DNA in Atemwegssekreten

Um DNA im EBC mit dem Ps. ae.- und Ps. sp.-Primerpaar nachzuweisen, wurden jeweils 5 µl EBC der zwölf P. aeruginosa-positiv getesteten Patienten in die PCR eingesetzt. Je Probe wurde folgender Versuchsansatz zusammenpipettiert und mit RNase freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt (siehe Tabelle 14).

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden Verdünnungen der SE² DNA in 10er-Schritten hergestellt. Je 1 µl von SE² DNA-Verdünnungen von 1:10 bis 1:10⁶ wurden verwendet (siehe Tabelle 15). Die Verdünnungsreihe wurde nach dem unter „2.3.1.2 Entwicklung und Definition von Standardprozeduren“ beschriebenen Prinzip angesetzt.

Für den Nachweis von PCR-Inhibitoren wurden je 5 µl EBC und 1 µl der 1:10 verdünnten SE² DNA zusammengegeben (siehe Tabelle 16).

Für den Nachweis von P. aeruginosa-DNA wurden vierzehn Sputumproben mittels PCR untersucht (siehe Tabelle 17).

Die Versuche zur Detektion der Nachweisgrenze, das Auffinden von Reaktionsinhibitoren und den P. aeruginosa-RNA Nachweis im Sputum wurden mit Hilfe des Ps. ae.-Primerpaares durchgeführt. Bei allen anderen Testungen wurde je einmal das Ps. sp.- und einmal das Ps. ae.-Primerpaar angewendet.

Tabelle 14: Reaktionsansatz für den *P. aeruginosa*-DNA-Nachweis im EBC.

	Reagenz	Menge
1 x Mastermix	Puffer 1	2 µl
	Taq-Polymerase	0,25 µl
	Vorwärtsprimer	0,1 µl
	Rückwärtsprimer	0,1 µl
	RNase freies Wasser	12,55 µl
	EBC	5 µl
	Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 15: Reaktionsansatz für die Bestimmung der Nachweisgrenze der PCR.

	Reagenz	Menge
1 x Mastermix	Puffer 1	2 µl
	Taq-Polymerase	0,25 µl
	Vorwärtsprimer	0,1 µl
	Rückwärtsprimer	0,1 µl
	RNase freies Wasser	16,55 µl
	SE ² RNA 1:10 bis 1:10 ⁸ (in 10er Schritten)	Jeweils 1 Einheit
	Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 16: Reaktionsansatz für die Detektion von Inhibitoren der PCR im EBC.

	Reagenz	Menge
1 x Mastermix	Puffer 1	2 µl
	Taq-Polymerase	0,25 µl
	Vorwärtsprimer	0,1 µl
	Rückwärtsprimer	0,1 µl
	RNase freies Wasser	11,55 µl
	SE ² DNA 1:10 verdünnt	1 Einheit
	EBC	5 µl
	Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 17: Reaktionsansatz für den *P. aeruginosa*-DNA-Nachweis im Sputum.

	Reagenz	Menge
1 x Mastermix	Puffer 1	2 µl
	Taq-Polymerase	0,25 µl
	Vorwärtsprimer	0,1 µl
	Rückwärtsprimer	0,1 µl
	RNase freies Wasser	15,55 µl
	Sputum	2 µl
	Gesamtvolumen	20 µl

2.3.2.4 Gelelektrophorese

Das Vorgehen bei der Gelelektrophorese wurde wie unter „2.3.1.4 Gelelektrophorese“ beschrieben durchgeführt. Folgende Änderungen wurden vorgenommen:

Es wurden jeweils 5 µl der entsprechenden Probe mit 1 µl DNA-Ladepuffer versehen und in das Gel übertragen. In die erste Tasche wurden jeweils 6 µl eines 100 bp Größenmarkers gegeben.

2.3.3 Auswertung mittels Geldokumentation

Durch den Zusatz von 8 µl Ethidiumbromid im Agarosegel konnten entstandene DNA- bzw. RNA-Banden mit einer UV-Licht-Kamera sichtbar gemacht und aufgenommen werden konnten.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis von Nukleasen in Atemwegssekreten

Bevor die aufwändigen Schritte für einen Nukleinsäurenachweis im EBC unternommen wurden, war es zunächst erforderlich, Atemwegssekrete auf das Vorhandensein von Nukleasen zu untersuchen. Begonnen wurde mit der Analyse der Sputumproben, da diese zum Teil schon vorhanden waren. Darauffolgend wurden EBC-Proben gesammelt und getestet.

Für den Nachweis von Nukleasen wurden die Proben mit RNA beziehungsweise DNA inkubiert. Anhand der RNA- und DNA-Banden in der Gelelektrophorese wurde beurteilt, ob Nukleasen im Atemwegssekret enthalten waren. Eine vollständig erhaltene RNA- bzw. DNA-Bande im Gel wurde so gedeutet, dass keine oder nur eine geringe Nukleaseaktivität im Atemwegssekret vorhanden war. Die NK, welche nur Wasser und kein Atemwegssekret enthielten, wiesen eine solche Bande auf. War im Gel keine Bande mehr auszumachen - vergleiche hierzu die PK, welchen synthetische RNase bzw. DNase zugesetzt wurde - so wurde von einer Degradation durch Nukleasen ausgegangen.

Die erste Bahn eines Gels zeigt den verwendeten RNA- bzw. DNA-Größenmarker. Daneben befindet sich die PK, gefolgt von den einzelnen Sputum- bzw. EBC-Proben. Die jeweilige Sputum- bzw. EBC-Probennummer ist identisch mit der Bahnnummer. Die letzte Bahn ist die NK, bestehend aus einer SE¹ DNA und 1 µl RNase freiem Wasser.

3.1.1 Nukleasen im Sputum

Endogener RNA- und DNA-Gehalt im Sputum

Zur Veranschaulichung des RNA- und DNA-Gehalts wurde reines Sputum in die Gelelektrophorese eingesetzt (siehe Abbildung 13). Bei allen vierzehn Sputumproben lässt sich so eine Schmierbildung darstellen. Besonders stark ausgeprägt ist diese bei Probe 2 und 13. Der Schmier ist kurz nach der Geltasche am intensivsten.

Detektion von RNasen im Sputum

Um die RNase-Aktivität im Sputum von CF-Patienten zu untersuchen, wurde mEpo mRNA mit Sputum wie unter „2.3.1.3 Versuchsansätze“ beschrieben 15 Minuten inkubiert und in der Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe Abbildung 14).

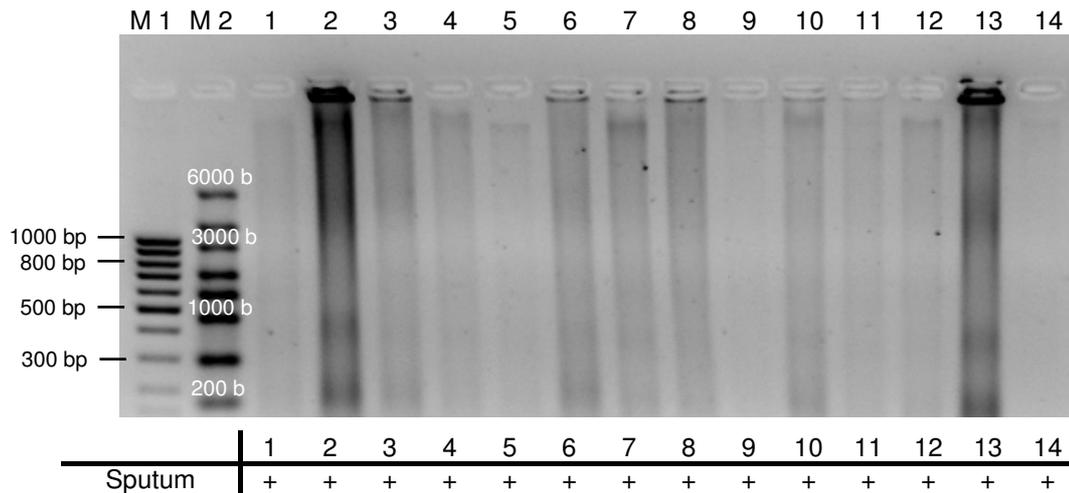


Abbildung 13: Endogener RNA- und DNA-Gehalt im Sputum.

Der Gehalt an Nukleinsäuren ist in den einzelnen Sputumproben sehr unterschiedlich. Dies ist an der Intensität der Banden und des Schmiere ersichtlich.

Schema der Gelelektrophorese:

M1: DNA-Größenmarker

M2: RNA-Größenmarker

Bahnen 1 - 14: Jeweils 5 µl Sputumprobe 1 - 14.

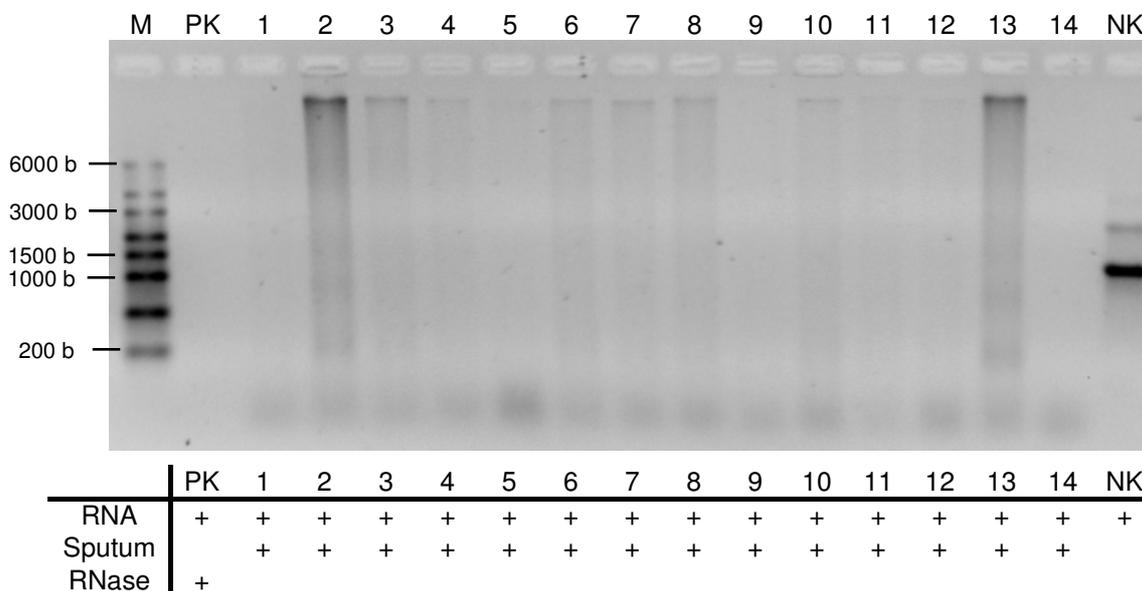


Abbildung 14: RNase-Detektion im Sputum (Inkubationszeit: 15 Minuten).

Schema der Gelelektrophorese:

M: RNA-Größenmarker

PK: Positivkontrolle aus einer SE¹ RNA und 7 x 10⁻³ U RNase A

Bahnen 1 - 14: Jeweils eine SE¹ RNA und 1 µl Sputumprobe 1 - 14

NK: Negativkontrolle aus einer SE¹ RNA und 1 µl RNase freiem Wasser.

Mit Hilfe des RNA-Größenmarkers (M) konnte die mEpo mRNA-Länge im Bereich von 1000 - 1500 b liegend bestimmt werden. Es ließ sich eine zweite weniger intensive Bande mit 2000 - 3000 b Länge erkennen. Vergleiche hierzu die NK. Die PK bewirkte einen kompletten Verdau der eingesetzten mEpo mRNA. Die Bahnen 1 - 14 spiegeln die Degradation der mEpo mRNA-Banden durch die vierzehn verschiedenen untersuchten Sputumproben wieder. In einem Vorversuch wurde die Nachweisgrenze für die Degradation von mEpo mRNA durch die RNase A auf einen Bereich von 7×10^{-3} bis 7×10^{-4} U festgelegt (siehe Abbildung 8). Daraus lässt sich folgern, dass alle Sputumproben eine RNase-Aktivität $\geq 7 \times 10^{-4}$ U hatten. Die Bahnen 2 - 4, 6 - 8, 10 und 13 weisen einen Schmier auf, welcher ein kurzes Stück von der Geltasche entfernt am intensivsten ist und in Laufrichtung schwächer wird. Besonders deutlich hebt sich die Schmierbildung bei den Bahnen 2 und 13 hervor.

Ergebnis:

Alle Sputumproben wiesen eine RNase-Aktivität auf.

Detektion von DNasen im Sputum

Für den Nachweis einer DNase-Aktivität in vierzehn verschiedenen Sputumproben wurden diese mit *P. aeruginosa*-DNA jeweils für 2 Stunden und 20 Stunden inkubiert (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16). Der Versuchsansatz ist unter „2.3.1.3 Versuchsansätze“ erläutert. Der DNA-Größenmarker (M) zeigte, dass die *P. aeruginosa*-DNA circa 1000 bp lang ist. Vergleiche hierzu die NK.

Die PK bilden eine vollständige Degradation der eingesetzten DNA ab.

Nach 2 Stunden findet sich eine unvollständige Degradation einiger DNA-Banden (Bahnen 2, 3, 6, 8, 9, 10, 13). Keine eindeutige Degradation lässt sich in den Bahnen 1, 4, 5, 7, 11, 12, 14 erkennen. Anhand der PK kann geschätzt werden, dass die DNase-Aktivität in allen Sputumproben $< 0,1$ U war. Bahn 2 und 13 weisen eine Schmierbildung und Rückstände in der Geltasche auf.

Eine 20-stündige Inkubation bewirkte bei fast allen Proben eine Teildegradation. Ausgenommen Probe 5 und 14, welche nahezu mit der NK vergleichbare DNA-Banden zum Ergebnis hatten. Eine vollständige Degradation der *P. aeruginosa*-DNA ist nur in der Bahn 1 und 9 zu sehen. Bahn 2 und 13 weisen einen Schmier und deutlichere Rückstände in der Geltasche als nach 2-stündiger Inkubation auf.

Ergebnis:

Zwei der vierzehn Sputumproben zeigten nach 20-stündiger Inkubation eine vollständige Degradation der DNA, zehn eine Teildegradation und zwei eine sehr geringe DNase-Aktivität.

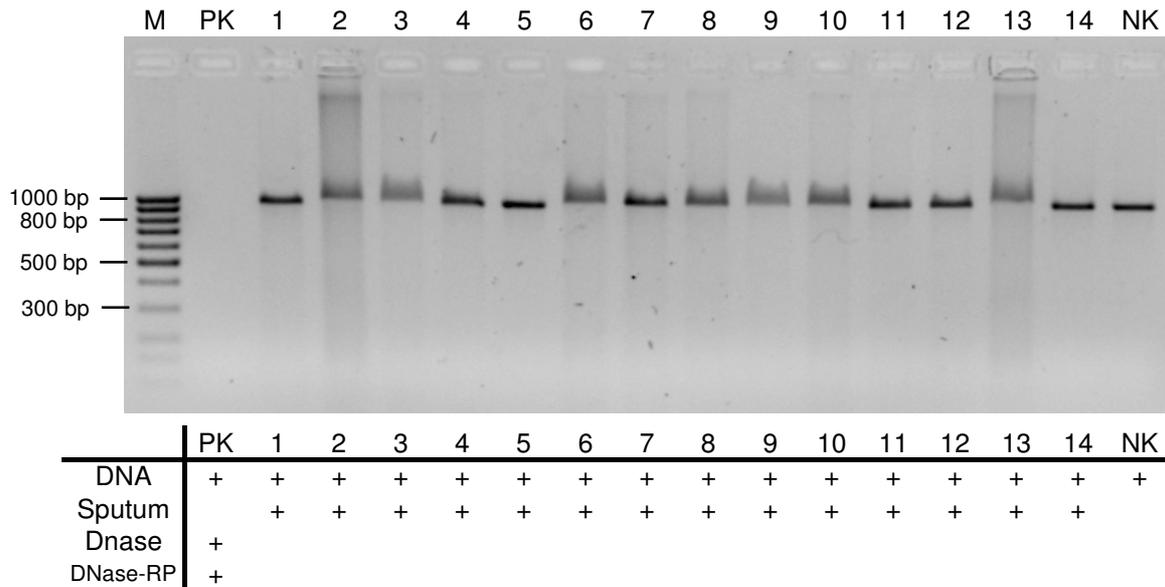


Abbildung 15: DNase-Detektion im Sputum (Inkubationszeit: 2 Stunden).

Schema der Gelelektrophorese:

M: DNA-Größenmarker

PK: Positivkontrolle aus einer SE¹ DNA, 1 U DNase I und 0,5 µl Reaktionspuffer für DNase I

Bahnen 1 - 14: Jeweils eine SE¹ DNA und 1 µl Sputumprobe 1 - 14

NK: Negativkontrolle aus einer SE¹ DNA und 1 µl RNase freiem Wasser.

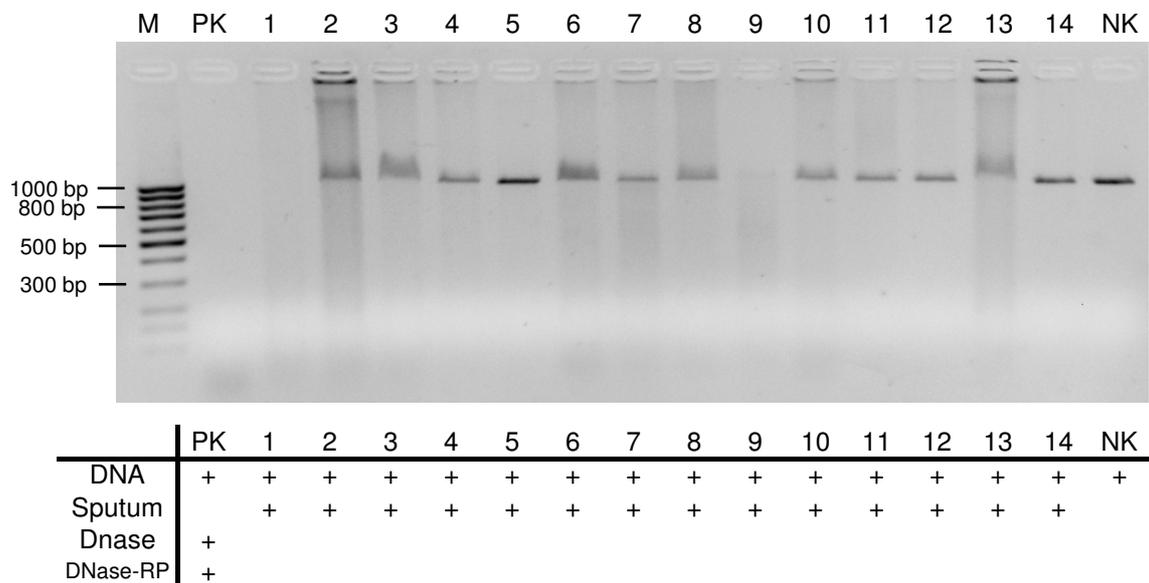


Abbildung 16: DNase-Detektion im Sputum (Inkubationszeit: 20 Stunden).

Schema der Gelelektrophorese:

M: DNA-Größenmarker

PK: Positivkontrolle aus einer SE¹ DNA, 0,1 U DNase I und 0,5 µl Reaktionspuffer für DNase I

Bahnen 1 - 14: Jeweils eine SE¹ DNA und 1 µl Sputumprobe 1 - 14

NK: Negativkontrolle aus einer SE¹ DNA und 1 µl RNase freiem Wasser.

3.1.2 Nukleasen im EBC

Nach der vollständigen Analyse der Sputumproben wurden im nächsten Schritt die EBC-Proben gewonnen und untersucht. Die Testung diente dem Nachweis einer Nukleaseaktivität im EBC.

Detektion von RNasen im EBC

Zur Untersuchung der RNase-Aktivität im EBC wurde dieses 20 Stunden mit einer SE¹ RNA inkubiert (siehe Abbildung 17). Die Beschreibung des Versuchsansatzes findet sich unter „2.3.1.3 Versuchsansätze“.

Mit Hilfe des RNA-Größenmarkers (M) lässt sich die mEpo mRNA-Länge auf 1000 - 1500 b bestimmen. Vergleiche hierzu die NK. Teilweise ist eine zweite, weniger intensive Bande mit 2000 - 3000 b Länge zu sehen. Die PK zeichnet sich durch eine vollständige Degradation der eingesetzten mEpo mRNA aus.

Fünfzehn verschiedene EBCs dienen dem Test auf das Vorhandensein von RNasen. In den Bahnen 1 - 5 wurden EBC-Proben von *P. aeruginosa*-positiven CF-Patienten, in den Bahnen 6 - 10 EBC-Proben von *P. aeruginosa*-negativen CF-Patienten und in den Bahnen 11 - 15 EBC-Proben der Kontrollprobanden eingesetzt.

Keine der untersuchten EBC-Proben bewirkte eine ausgeprägte Degradation der mEpo mRNA. Die Bahnen 1 - 15 weisen deutliche RNA-Banden mit allenfalls sehr leichter Degradation auf. Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden.

Ergebnis:

In den fünfzehn untersuchten EBC-Proben konnte eine sehr leichte Degradation von einer SE¹ RNA durch RNasen nachgewiesen werden.

Detektion von DNasen im EBC

Die 20-stündige Inkubation von *P. aeruginosa*-DNA mit fünfzehn verschiedenen EBC-Proben hatte den Nachweis von DNasen im EBC zum Ziel (siehe Abbildung 18). Es wurden die gleichen EBC-Proben in der gleichen Reihenfolge wie beim RNase-Nachweis verwendet (Siehe auch „2.3.1.3 Versuchsansätze“).

Anhand des DNA-Größenmarkers (M) kann die Länge der *P. aeruginosa*-DNA auf 1000 bp geschätzt werden. Vergleiche hierzu die NK. Die PK zeigt eine vollständige Degradation der eingesetzten DNA. In keinem EBC kann eine DNase-Aktivität nachgewiesen werden, denn in den Bahnen 1 - 15 sind deutliche DNA-Banden zu sehen. Die Resultate der verschiedenen Probandengruppen differierten nicht.

Ergebnis:

Keines der untersuchten EBCs zeigte eine DNase-Aktivität durch Degradation von einer SE¹ DNA.

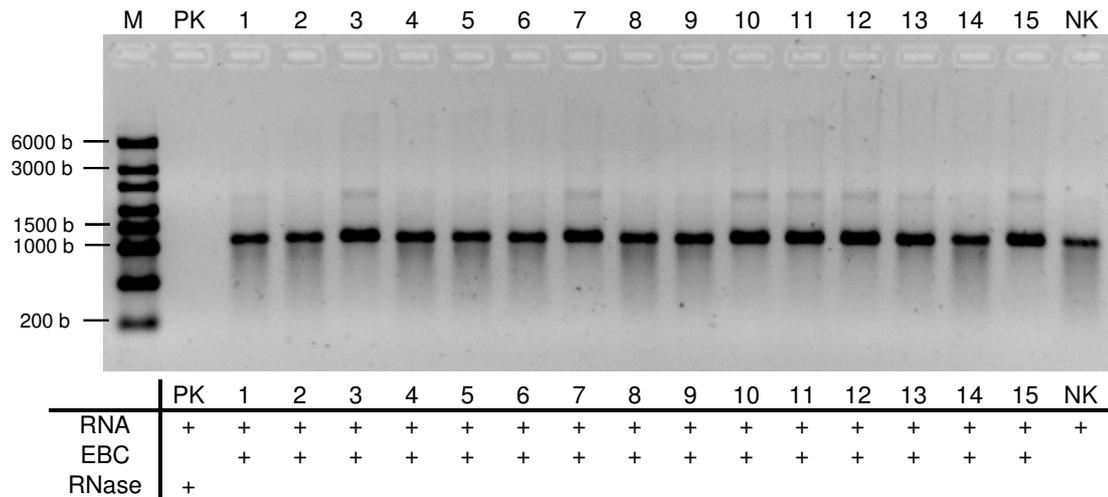


Abbildung 17: RNase-Detektion im EBC (Inkubationszeit: 20 Stunden).

Schema der Gelelektrophorese:

M: RNA-Größenmarker

PK: Positivkontrolle aus einer SE¹ RNA und 7×10^{-3} U RNase A

Bahnen 1 - 15: Jeweils eine SE¹ RNA und 1 μ l EBC-Probe 1 - 15

NK: Negativkontrolle aus einer SE¹ RNA und 1 μ l RNase freiem Wasser.

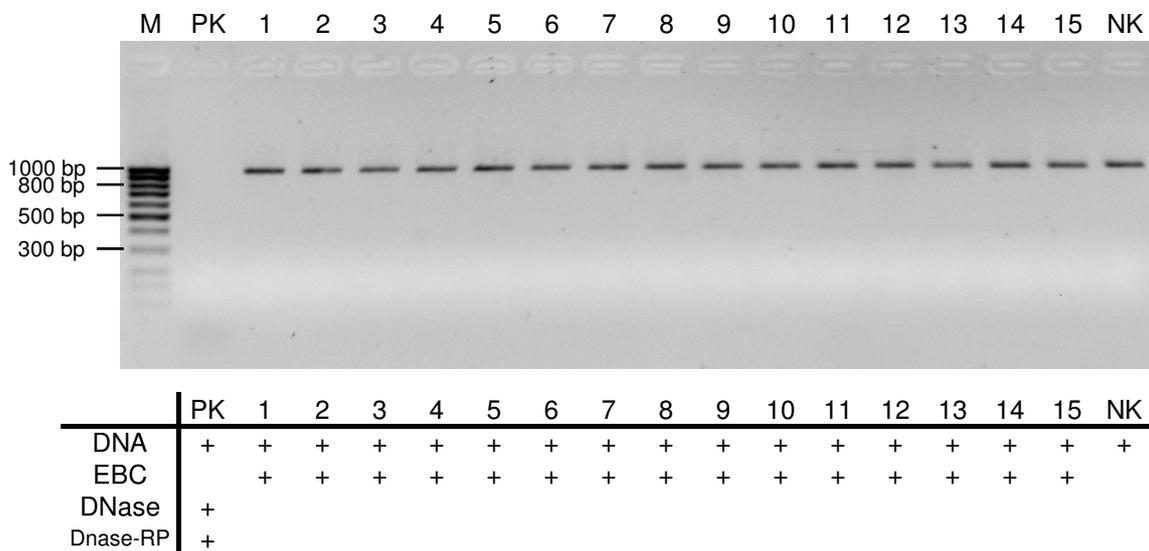


Abbildung 18: DNase-Detektion im EBC (Inkubationszeit: 20 Stunden).

Schema der Gelelektrophorese:

M: DNA-Größenmarker

PK: Positivkontrolle aus einer SE¹ DNA, 0,1 U DNase I und 0,5 μ l Reaktionspuffer für DNase I

Bahnen 1 - 15: Jeweils einer SE¹ DNA und 1 μ l EBC-Probe 1 - 15

NK: Negativkontrolle aus einer SE¹ DNA und 1 μ l RNase freiem Wasser.

3.1.3 Zusammenfassung

Die PK und NK weisen stets das erwartete Ergebnis auf.

Abbildung 19 gibt einen Überblick über die Nuklease-Aktivität in Atemwegssekreten.

Alle vierzehn Sputumproben ergaben nach 15 Minuten Reaktionszeit eine starke RNase-Aktivität mit vollständiger RNA-Degradation. In den EBC-Proben hingegen konnte nach 20-stündiger Inkubation nur eine sehr geringe RNase-Aktivität festgestellt werden.

Zwei der vierzehn Sputumproben zeigten eine starke (vollständige Degradation der DNA), zehn eine mittlere (Teildegradation der DNA) und zwei eine sehr geringe DNase-Aktivität bei 20-stündiger Inkubationszeit. Die EBC-Proben waren nach 20 Stunden Reaktionszeit frei von DNase-Aktivität.

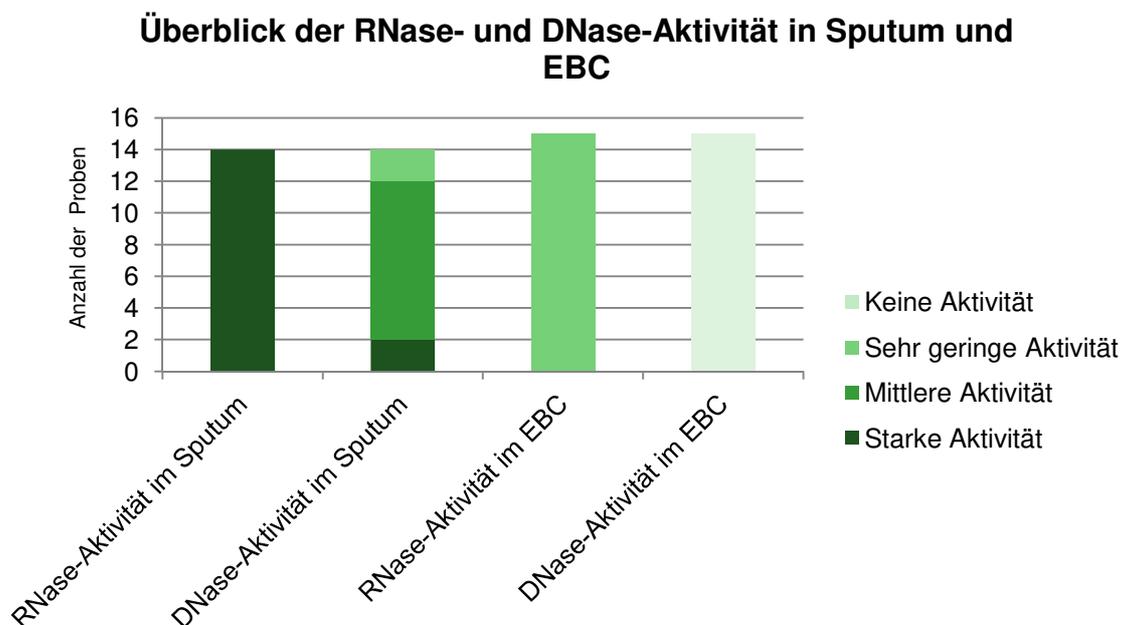


Abbildung 19: Überblick der RNase- und DNase-Aktivität im Sputum und EBC.

Keine Aktivität: Keine sichtbare Degradation der Nukleinsäurebanden im Gel

Sehr geringe Aktivität: Geringe Unruhe der Nukleinsäurebande im Gel

Mittlere Aktivität: Teildegradation der Nukleinsäurebanden im Gel

Starke Aktivität: Vollständige Degradation der Nukleinsäurebanden im Gel.

3.2 Nachweis von Nukleinsäuren in Atemwegssekreten

Auf Grund der nicht oder nur gering vorhandenen RNase- und DNase-Aktivität im EBC, wurde im nächsten Schritt der Nachweis von bakterieller RNA und DNA mittels RT-PCR und PCR unternommen. Dabei wurden zwei verschiedene Primer in der PCR getestet. Außerdem fand ein Experiment zur Bestimmung der Nachweisgrenze und

von RT-/PCR-Inhibitoren statt. Nach Abschluss der PCR wurden alle Proben mittels Gelelektrophorese ausgewertet. Das Schema der Abbildungen ist für alle Versuche gleich. Die erste Bahn zeigt jeweils den verwendeten DNA-Größenmarker (M). Daneben befindet sich die Bande der PK, gefolgt von der NK, welche keine Bande aufweist. Neben der NK wurden die Proben aufgetragen, welche dieselbe Nummerierung wie die Bahnen aufweisen.

3.2.1 Nukleinsäuren im EBC

Beim Nukleinsäurenachweis wurden die zwölf EBC-Proben von *P. aeruginosa*-positiven CF-Patienten getestet.

Um *P. aeruginosa*-RNA im EBC zu detektieren, wurden die Proben wie unter „2.3.2 Nachweis von Nukleinsäuren in Atemwegsekreten“ beschrieben einem DNase-Verdau, einer RT und einer PCR unterzogen. Alle Proben wurden doppelt angesetzt, wobei die zusätzlichen Proben als RT-Kontrollen dem Ausschluss von DNA-Kontamination dienen.

Für den *P. aeruginosa*-DNA-Nachweis durchliefen die Proben die PCR.

Die detaillierten Versuchsansätze werden unter „2.3.2.2 Nachweis von *P. aeruginosa*-RNA in Atemwegssekreten“ und „2.3.2.3 Nachweis von *P. aeruginosa*-DNA in Atemwegssekreten“ wiedergegeben.

Tests mit dem Ps. ae.-Primerpaar

Zunächst wurden die Proben mit dem *P. aeruginosa*-spezifischen Primerpaar getestet. In keinem der EBC-Proben konnte *P. aeruginosa*-RNA detektiert werden (siehe Abbildung 20, Bahnen 1 - 12). Die RT-Kontrollen waren negativ und schlossen somit Verunreinigungen aus (siehe Abbildung 21). Die PK zeigt eine deutliche Bande mit circa 1000 bp Länge.

Auch beim DNA-Nachweis kam es bei keiner der Proben zu einer Bandenbildung (siehe Abbildung 22, Bahnen 1 - 12). Es wurde keine *P. aeruginosa*-DNA im EBC nachgewiesen. PK und NK ergaben das gewünschte Ergebnis.

Ergebnis:

In keiner der zwölf EBC-Proben von *P. aeruginosa*-positiven CF-Patienten konnte mit Hilfe des *Ps. ae.*-Primerpaares *P. aeruginosa*-RNA oder -DNA nachgewiesen werden.

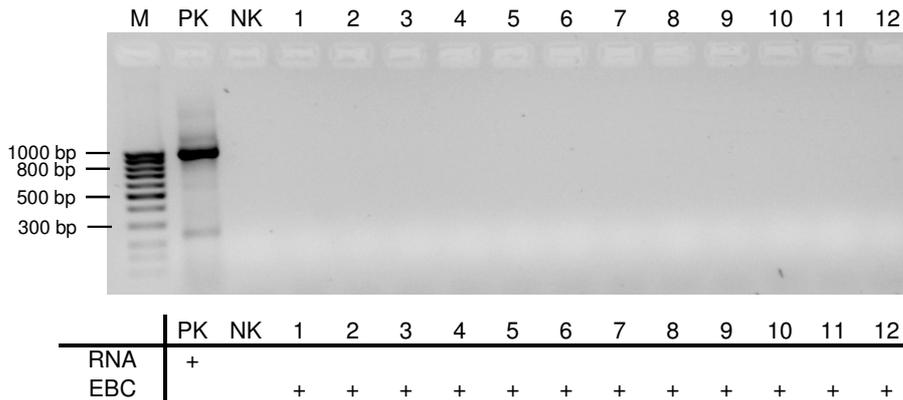


Abbildung 20: Detektion von *P. aeruginosa*-RNA im EBC mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar.

Schema der Gelelektrophorese:

M: DNA-Größenmarker

PK: Positivkontrolle aus einer SE² RNA

Bahnen 1 - 12: EBC-Probe 1 - 12

NK: Negativkontrolle aus 1 µl RNase freiem Wasser.

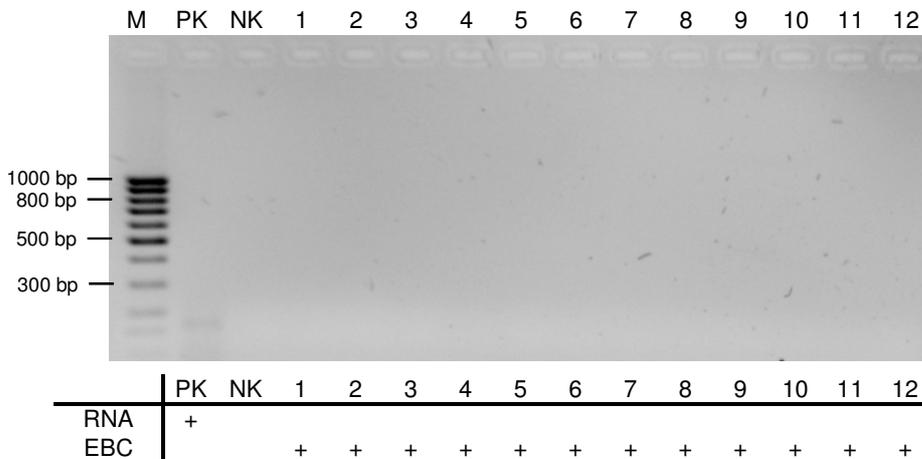


Abbildung 21: RT-Kontrollen der Detektion von *P. aeruginosa*-RNA im EBC mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar.

Schema der Gelelektrophorese:

M: DNA-Größenmarker

PK: Positivkontrolle aus einer SE² RNA

Bahnen 1 - 12: EBC-Probe 1 - 12

NK: Negativkontrolle aus 1 µl RNase freiem Wasser.

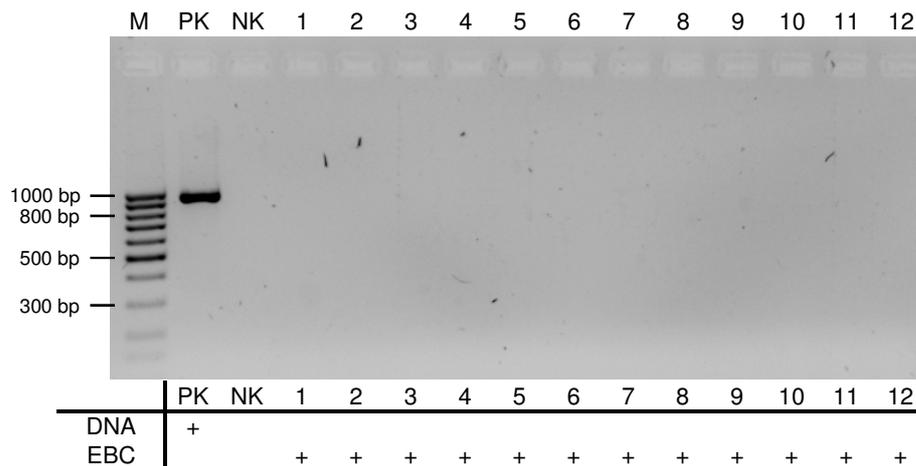


Abbildung 22: Detektion von *P. aeruginosa*-DNA im EBC mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar.

Schema der Gelelektrophorese:

M: DNA-Größenmarker

PK: Positivkontrolle aus einer SE² DNA

Bahnen 1 - 12: EBC-Probe 1 - 12

NK: Negativkontrolle aus 1 µl RNase freiem Wasser.

Tests mit dem Ps. sp.-Primerpaar

Um die Chancen auf einen positiven RNA- oder DNA-Nachweis im EBC zu erhöhen, wurde im nächsten Schritt ein weniger spezifisches Primerpaar eingesetzt. Die Verwendung des *Ps. sp.*-Primerpaares erzielte bei keiner der getesteten EBC-Proben einen positiven Nachweis von *P. aeruginosa*-RNA oder -DNA (siehe Abbildung 23 und Abbildung 25). Die PK zeigt eine deutliche Bande mit einer Länge von circa 600 - 700 bp, die NK hingegen nicht. Die RT-Kontrollen waren negativ (siehe Abbildung 24).

Ergebnis:

In keiner der zwölf EBC-Proben von *P. aeruginosa*-positiven CF-Patienten konnte mit Hilfe des *Ps. sp.*-Primerpaares *P. aeruginosa*-RNA oder -DNA detektiert werden.

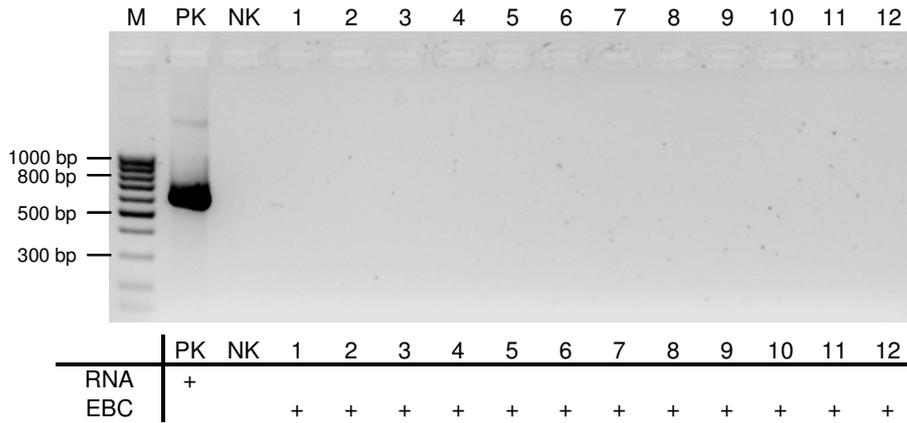


Abbildung 23: Detektion von *P. aeruginosa*-RNA im EBC mit dem *Ps. sp.*-Primerpaar.

Schema der Gelelektrophorese:

M: DNA-Größenmarker

PK: Positivkontrolle aus einer SE² RNA

Bahnen 1 - 12: EBC-Probe 1 - 12

NK: Negativkontrolle aus 1 µl RNase freiem Wasser.

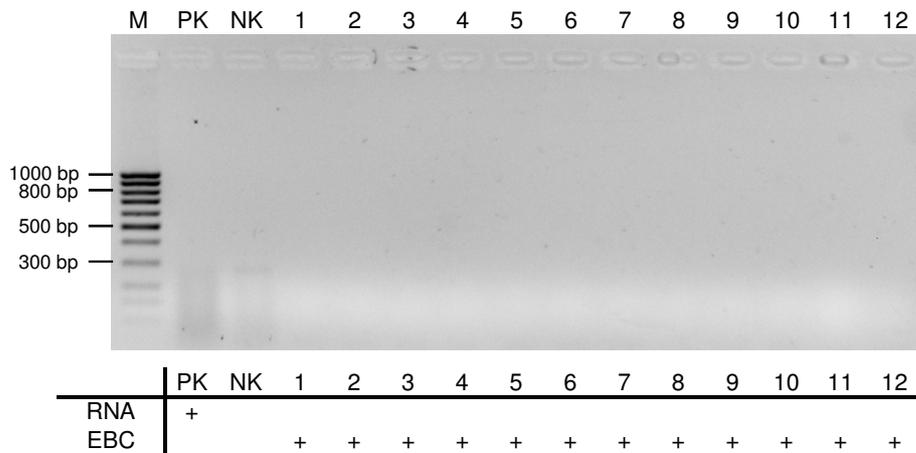


Abbildung 24: RT-Kontrollen der Detektion von *P. aeruginosa*-RNA im EBC mit dem *Ps. sp.*-Primerpaar.

Schema der Gelelektrophorese:

M: DNA-Größenmarker

PK: Positivkontrolle aus einer SE² RNA

Bahnen 1 - 12: EBC-Probe 1 - 12

NK: Negativkontrolle aus 1 µl RNase freiem Wasser.

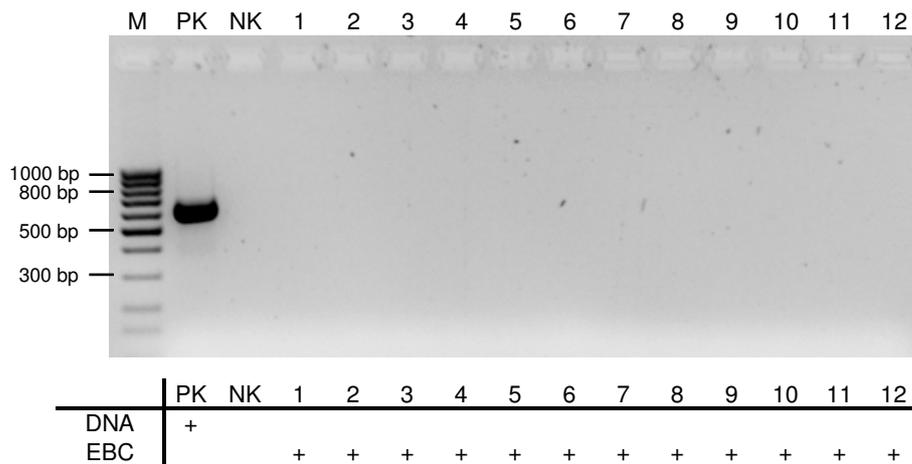


Abbildung 25: Detektion von *P. aeruginosa*-DNA im EBC mit dem *Ps. sp.*-Primerpaar.

Schema der Gelelektrophorese:

M: DNA-Größenmarker

PK: Positivkontrolle aus einer SE² DNA

Bahnen 1 - 12: EBC-Probe 1 - 12

NK: Negativkontrolle aus 1 µl RNase freiem Wasser.

3.2.4 Nachweisgrenze des RNA- und DNA-Nachweises

Um eine Aussage über die Sensitivität des RNA- und DNA-Nachweises treffen zu können, wurde untersucht, wo die Nachweisgrenze für diese Nukleinsäuren unter den gegebenen Bedingungen liegt. Die Proben zur Detektion der Nachweisgrenze wurden, wie unter „2.3.2.2 Nachweis von *P. aeruginosa*-RNA in Atemwegssekreten“ und „2.3.2.3 Nachweis von *P. aeruginosa*-DNA in Atemwegssekreten“ beschrieben angesetzt.

RNA-Nachweisgrenze

Zur Detektion der RNA-Nachweisgrenze mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar wurden je 2 µl der Verdünnungen von einer SE2 RNA von 1:10 bis 1:108 in 10er-Schritten getestet (siehe Abbildung 26). Die Intensität der Bahnen 1 – 4 nimmt mit geringer werdender RNA-Konzentration ab. Die Proben 5 - 8 führten zu keiner Bandenbildung und waren somit negativ. Hieraus folgend wurde die RNA-Nachweisgrenze auf 2,14 ng *P. aeruginosa*-RNA festgelegt. Das entspricht der hier eindeutig erkennbaren Bande in Bahn 2. Die mitgeführten RT-Kontrollen wiesen keine Banden in der Gelelektrophorese auf und waren somit negativ (siehe Abbildung 27).

Ergebnis:

Die Nachweisgrenze für die Detektion von *P. aeruginosa*-RNA mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar wurde auf 2,14 ng festgelegt.

DNA-Nachweisgrenze

Zur Bestimmung der DNA-Nachweisgrenze mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar wurde je 1 μ l einer Verdünnungsreihe von SE² DNA von 1:10 bis 1:10⁶ in 10er-Schritten getestet (siehe Abbildung 28). Die Bahnen 1 und 2 lieferten einen positiven DNA-Nachweis durch Bandenbildung. Die Intensität der Bande in Bahn 2 ist sehr schwach. Die Bahnen 3 - 6 zeigten keine Banden und sind somit negativ.

Somit wurde die DNA-Nachweisgrenze auf 0,15 ng *P. aeruginosa*-DNA festgelegt (siehe Abbildung 28, Bahn 1).

Ergebnis:

Die Nachweisgrenze für die Detektion von *P. aeruginosa*-DNA mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar wurde auf einen Wert von 0,15 ng festgelegt.

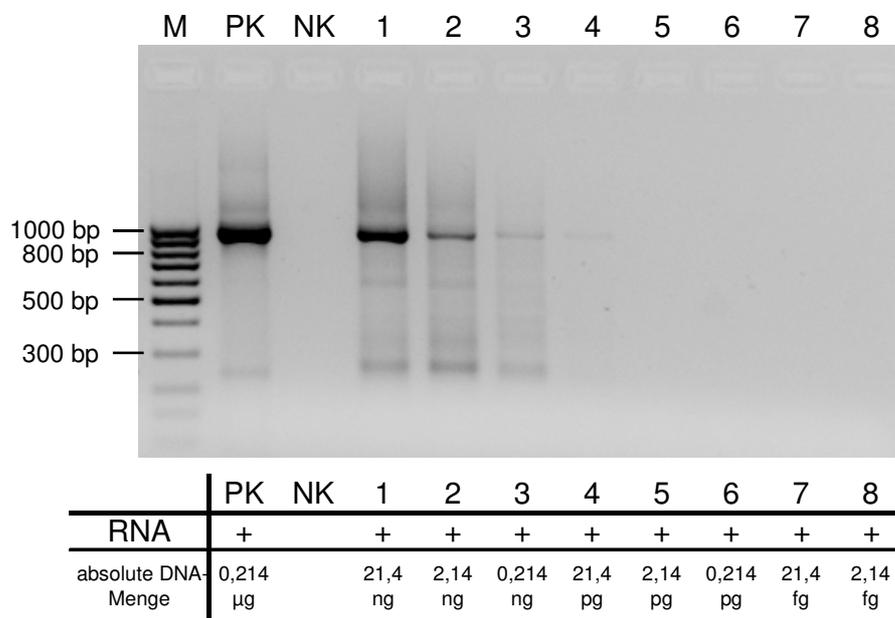


Abbildung 26: Nachweisgrenze des *P. aeruginosa*-RNA-Nachweises mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar.

Schema der Gelelektrophorese:

M: DNA-Größenmarker

PK: Positivkontrolle aus einer SE² RNA

Bahnen 1 - 8: Jeweils 2 μ l der Verdünnungen von 1:10 - 1:10⁸ der SE² RNA

NK: Negativkontrolle aus 1 μ l RNase freiem Wasser.

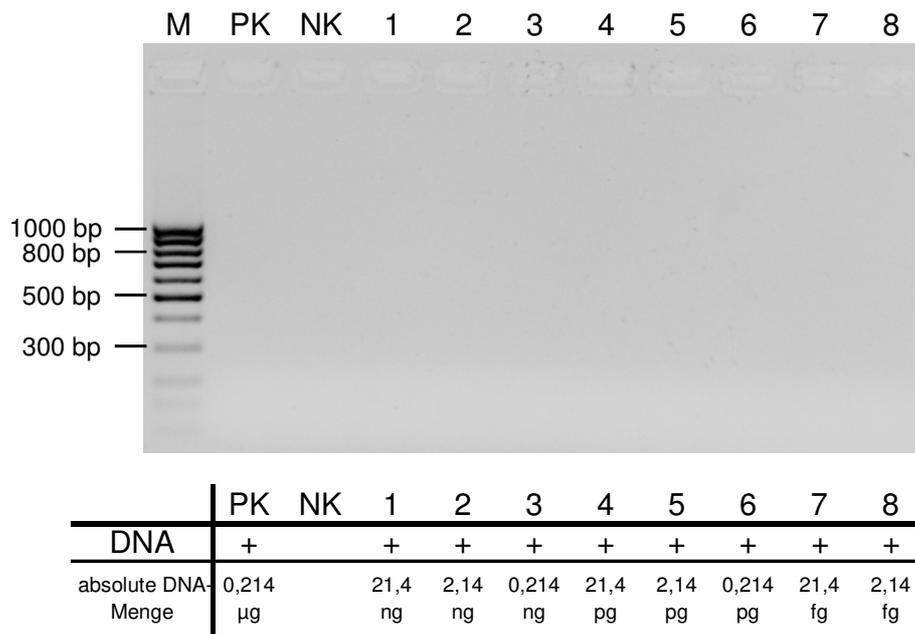


Abbildung 27: RT-Kontrollen der Nachweisgrenze des *P. aeruginosa*-RNA-Nachweises mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar.

Schema der Gelelektrophorese:

M: DNA-Größenmarker

PK: Positivkontrolle aus einer SE² RNA

Bahnen 1 - 8: Jeweils 2 µl der Verdünnungen von 1:10 - 1:10⁸ der SE² RNA

NK: Negativkontrolle aus 1 µl RNase freiem Wasser.

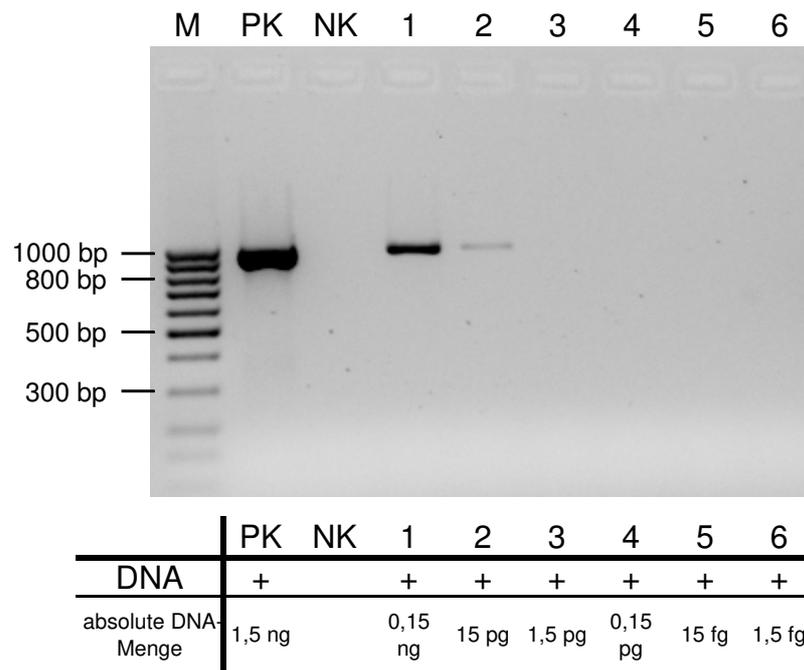


Abbildung 28: Nachweisgrenze des *P. aeruginosa*-DNA-Nachweises mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar.

Schema der Gelelektrophorese:

M: DNA-Größenmarker

PK: Positivkontrolle aus einer SE² DNA

Bahnen 1 - 6: Jeweils 1 µl der Verdünnungen von 1:10 - 1:10⁶ der SE² DNA

NK: Negativkontrolle aus 1 µl RNase freiem Wasser.

3.2.5 Detektion von Inhibitoren des Nukleinsäurenachweises

Zum Ausschluss der Anwesenheit von RT-PCR und PCR Inhibitoren, welche zu einem negativen RNA- und DNA-Nachweis geführt hätten, wurde ein eigener Versuch durchgeführt. Zur Detektion von Inhibitoren wurden die zwölf mit den Primern getesteten EBCs mit *P. aeruginosa*-RNA bzw. DNA versetzt und wie unter „2.3.2.2 Nachweis von *P. aeruginosa*-RNA in Atemwegssekreten“ und „2.3.2.3 Nachweis von *P. aeruginosa*-DNA in Atemwegssekreten“ getestet. Es wurde jeweils die Nukleinsäuremenge eingesetzt, welche zuvor als Nachweisgrenze bestimmt worden war.

Inhibitoren der RT-PCR

Abbildung 29 gibt die Detektion von Inhibitoren des *P. aeruginosa*-RNA-Nachweises mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar wieder. In den Bahnen 1 - 12 bilden sich deutliche Banden ab. Der Nachweis von *P. aeruginosa*-RNA wurde folglich nicht durch die Zugabe von EBC inhibiert. Verglichen mit der PK sind die Banden der Proben 1 - 12 stärker ausgeprägt. Die RT-Kontrollen waren alle negativ (siehe Abbildung 30).

Ergebnis:

In keinem der zwölf getesteten EBCs wurden Inhibitoren der RT-PCR detektiert.

Inhibitoren der PCR

Abbildung 31 gibt die Detektion von Inhibitoren des *P. aeruginosa*-DNA-Nachweises mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar wieder. Die Bahnen 1 - 12 zeigen eine deutliche Bandenbildung bei einer Länge von circa 1000 bp. Der Nachweis von *P. aeruginosa*-DNA wurde durch die Zugabe von EBC folglich nicht inhibiert. Die Bahnen weisen unterschiedlich dicke Banden auf. Bahnen 1 - 3, 7, 9 und 10 haben eine mit der PK vergleichbare Bandendicke. Die übrigen Bahnen (4 - 6, 8, 11 - 12) ergaben Banden, die etwas stärker ausgeprägt sind als jene der PK.

Ergebnis:

In keinem der zwölf getesteten EBCs wurden Inhibitoren der PCR detektiert.

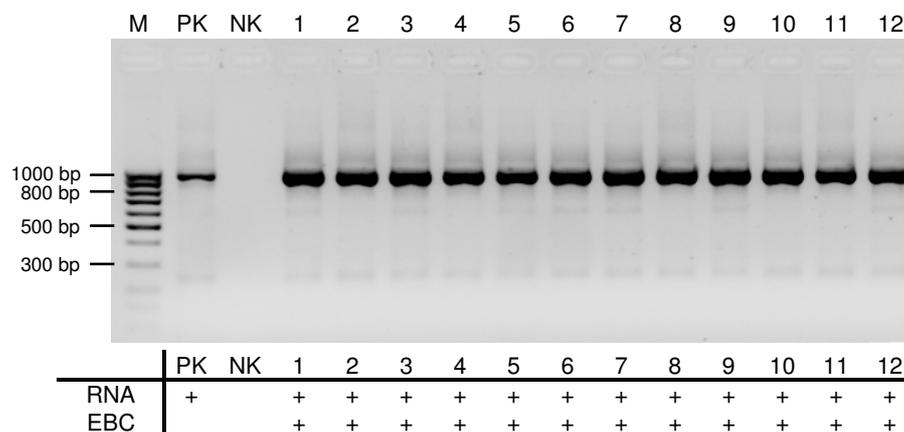


Abbildung 29: Detektion von Inhibitoren des *P. aeruginosa*-RNA-Nachweises mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar.

Schema der Gelelektrophorese:

M: DNA-Größenmarker

PK: Positivkontrolle aus 2 µl einer 1:10 verdünnten SE² RNA

Bahnen 1 - 12: Jeweils 2 µl einer 1:10 verdünnten SE² RNA und je 5 µl EBC-Probe 1 - 12

NK: Negativkontrolle aus 1 µl RNase freiem Wasser.

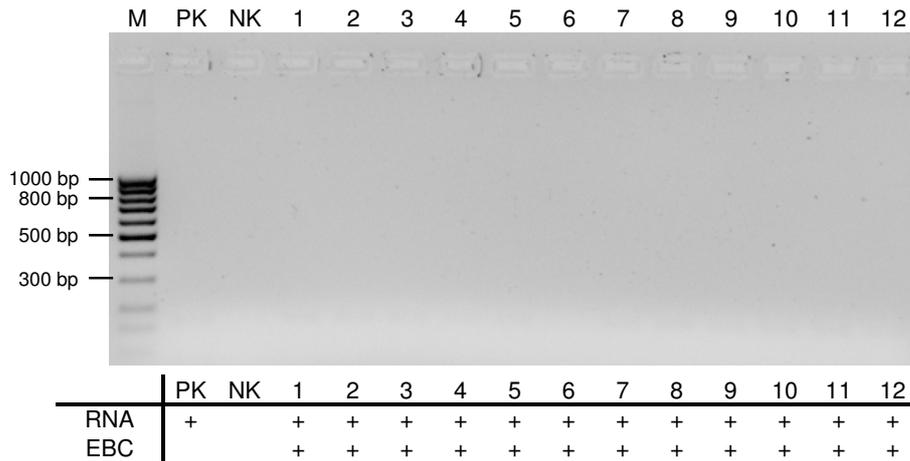


Abbildung 30: RT-Kontrollen der Detektion von Inhibitoren des *P. aeruginosa*-RNA-Nachweises mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar.

Schema der Gelelektrophorese:

M: DNA-Größenmarker

PK: Positivkontrolle aus 2 µl einer 1:10 verdünnten SE² RNA

Bahnen 1 - 12: Jeweils 2 µl einer 1:10 verdünnten SE² RNA und je 5 µl EBC-Probe 1 - 12

NK: Negativkontrolle aus 1 µl RNase freiem Wasser.

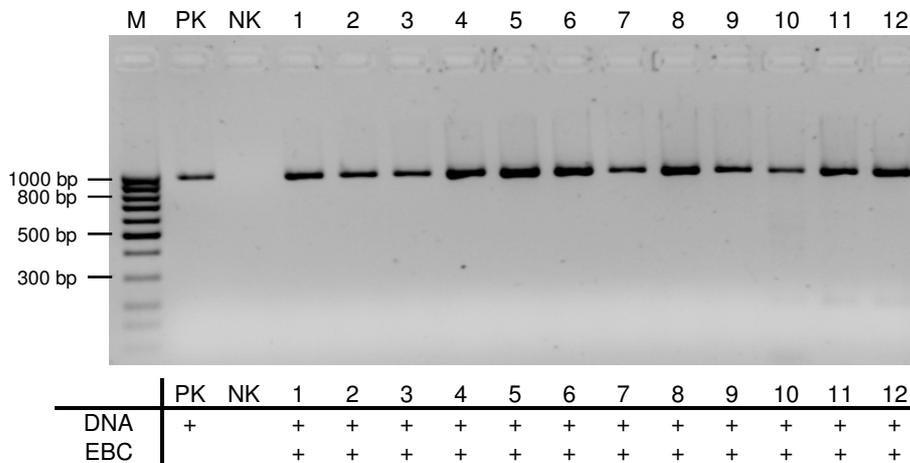


Abbildung 31: Detektion von Inhibitoren des *P. aeruginosa*-DNA-Nachweises mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar.

Schema der Gelelektrophorese:

M: DNA-Größenmarker

PK: Positivkontrolle aus 1 µl einer 1:10 verdünnten SE² DNA

Bahnen 1 - 12: Jeweils 1 µl einer 1:10 verdünnten SE² DNA und je 5 µl EBC-Probe 1 - 12

NK: Negativkontrolle aus 1 µl RNase freiem Wasser.

3.2.6 Nukleinsäuren im Sputum

Vierzehn Sputumproben wurden auf das Vorhandensein von *P. aeruginosa*-Nukleinsäuren untersucht. Die detaillierten Versuchsansätze werden unter „2.3.2.2 Nachweis von *P. aeruginosa*-RNA in Atemwegssekreten“ und „2.3.2.3 Nachweis von *P. aeruginosa*-DNA in Atemwegssekreten“ wiedergegeben.

Für den *P. aeruginosa*-DNA-Nachweis durchliefen die Proben die PCR.

Die Proben wurden mit dem *P. aeruginosa*-spezifischen Primerpaar getestet.

In keiner der Sputum-Proben konnte *P. aeruginosa*-RNA nachgewiesen werden (siehe Abbildung 32). Die RT-Kontrollen zeigten keine Bandenbildung und schließen somit Verunreinigungen aus (siehe Abbildung 33). Die PK ergab eine deutliche Bande mit circa 1000 bp Länge.

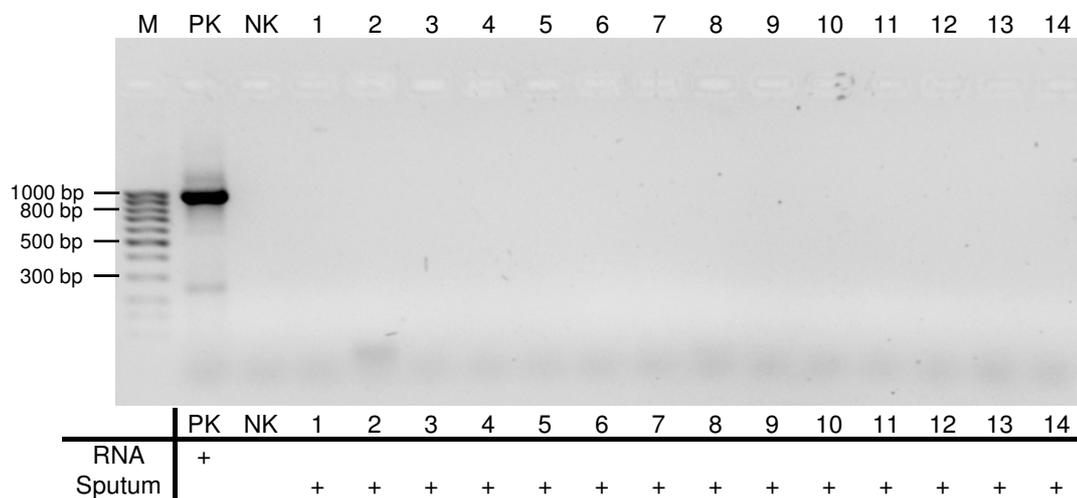


Abbildung 32: Detektion von *P. aeruginosa*-RNA im Sputum mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar.

Schema der Gelelektrophorese:

M: DNA-Größenmarker

PK: Positivkontrolle aus einer SE² RNA

Bahnen 1 - 14: Sputum-Probe 1 - 14

NK: Negativkontrolle aus 1 µl RNase freiem Wasser.

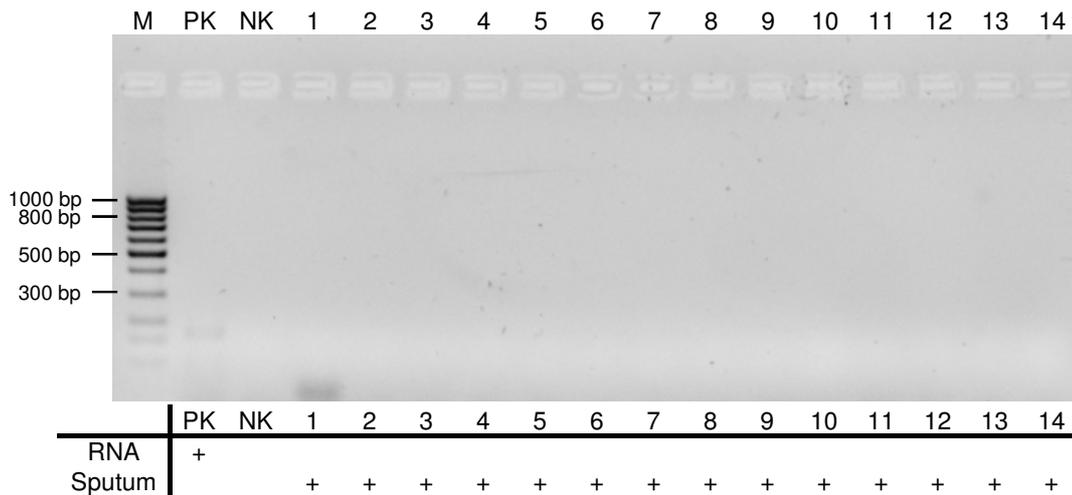


Abbildung 33: Kontrollen der Detektion von *P. aeruginosa*-RNA im Sputum mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar.

Schema der Gelelektrophorese:

M: DNA-Größenmarker

PK: Positivkontrolle aus einer SE² RNA

Bahnen 1 - 14: Sputumprobe 1 - 14

NK: Negativkontrolle aus 1 µl RNase freiem Wasser.

Beim DNA-Nachweis im Sputum kam es bei einem Teil der Proben zu einer Bandenbildung mit einer Länge von 1000 bp (siehe Abbildung 34, Bahnen 1, 3, 6, 7, 10, 12 und 14). Die Banden der Proben 1, 3, 6, 7 und 10 waren deutlicher als die von den Proben 12 und 14. Somit war bei insgesamt sieben Sputumproben der DNA-Nachweis positiv. In den Bahnen 1 - 4, 6, 7, 10 und 13 lässt sich ein Nebenprodukt mit einer Länge von 200 - 300 bp erkennen. Die PK und NK zeigten das erwartete Bild. Kulturergebnisse der Sputumproben im Hinblick auf eine *P. aeruginosa*-Besiedelung lagen nicht vor. Deshalb kann kein Vergleich mit den in der PCR erhaltenen Resultaten erfolgen.

Ergebnis:

In keiner der vierzehn Sputum-Proben von CF-Patienten wurde mit Hilfe des *Ps. ae.*-Primerpaares *P. aeruginosa*-RNA nachgewiesen. In sieben Sputumproben wurde mit Hilfe des *Ps. ae.*-Primerpaares *P. aeruginosa*-DNA detektiert.

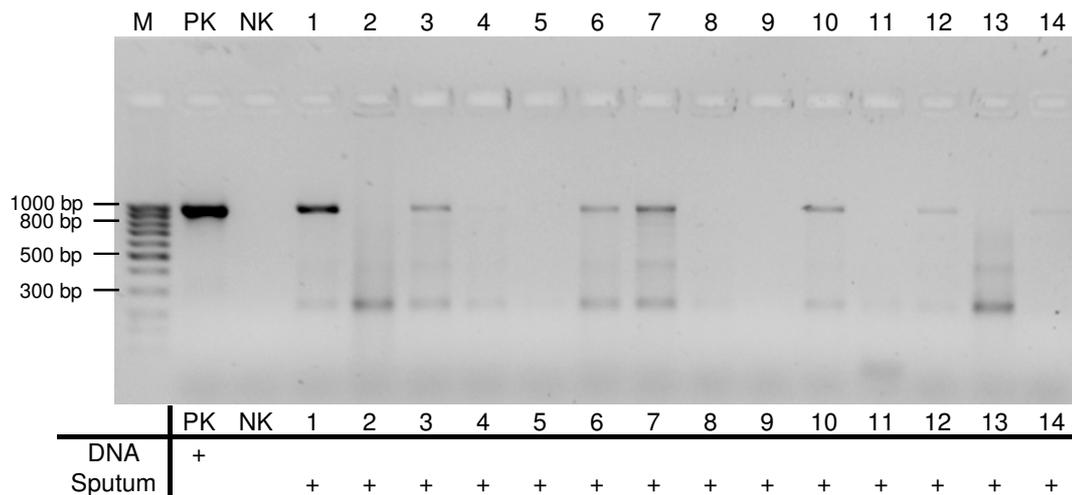


Abbildung 34: Detektion von *P. aeruginosa*-DNA im Sputum mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar.

Schema der Gelelektrophorese:

M: DNA-Größenmarker

PK: Positivkontrolle aus einer SE² DNA

Bahnen 1 - 14: Sputumprobe 1 - 14

NK: Negativkontrolle aus 1 µl RNase freiem Wasser.

3.2.7 Zusammenfassung

Weder mit dem *Ps. ae.*- noch mit dem *Ps. sp.*-Primerpaar wurde in den zwölf EBC-Proben von *P. aeruginosa*-positiven CF-Patienten RNA oder DNA nachgewiesen.

Die Nachweisgrenze für die Detektion von *P. aeruginosa*-RNA mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar wurde auf 2,14 ng festgelegt. Bei *P. aeruginosa*-DNA lag die Nachweisgrenze bei 0,15 ng.

In keinem der zwölf getesteten EBCs wurden Inhibitoren der RT-PCR oder PCR aufgedeckt.

Keine der vierzehn Sputum-Proben von CF-Patienten wies einen positiven *P. aeruginosa*-RNA-Nachweis mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar auf. In sieben Sputumproben konnte mit Hilfe des *Ps. ae.*-Primerpaares *P. aeruginosa*-DNA detektiert werden.

4 Diskussion

Vorliegende Studie hatte zum Ziel zu ermitteln, ob RNasen und DNasen in Sputum und EBC vorhanden sind. Außerdem wurde untersucht, ob in EBC RNA oder DNA von *P. aeruginosa* mittels RT-PCR und PCR nachgewiesen werden kann. Die erhaltenen Resultate geben entscheidende Hinweise für die Therapie und Diagnostik bei CF-Patienten. Aus den neu gewonnenen Erkenntnissen lassen sich außerdem auch wichtige Informationen für die Forschung an anderen Erkrankungen ableiten.

4.1 Zusammenfassung und Interpretation der wesentlichen Ergebnisse

4.1.1 EBC-Probengewinnung

Zunächst sollen die Einflüsse der Probengewinnung und -lagerung auf die erlangten Ergebnisse diskutiert werden.

Kondensertemperatur

Vor der Probengewinnung mit dem RTube[®] wurde die Aluminiumhülle auf -20°C gekühlt und beim Transport auf Eis gelagert. Auf Grund unterschiedlich langer Wartezeiten bis zur Probengewinnung ist anzunehmen, dass die Temperatur der Aluminiumhülle bei den einzelnen Patienten divergierte. Dies musste in Kauf genommen werden, um den Ablauf der Patientenbehandlung nicht zu stören. Die Auswirkungen der Kondensertemperatur auf den Nukleinsäuregehalt im EBC sind bisher nicht untersucht und der Einfluss auf die vorliegende Untersuchung ist unklar.

Nasenklammer

In vorliegender Untersuchung trugen die Patienten bei der EBC-Gewinnung keine Nasenklammer. Es gibt keine Studien, die einen Einfluss der Verwendung einer Nasenklammer auf Mediatoren im EBC analysiert. Zwei Gründe für das Tragen einer Nasenklammer werden von Horváth I et al. 2005 angegeben. Zum einen soll die Nasenklammer verhindern, dass nasale Sekrete in den Atemstrom gelangen und zum anderen soll sichergestellt werden, dass die Ausatmung durch den Mund geschieht. Da es sich bei den Probanden der EBC-Sammlung ausschließlich um Erwachsene handelte, wurde eine kontrollierte Aus- und Einatmung über den Mund gemäß der erteilten Anweisung erwartet. Gegenteiliges wurde bei der Probengewinnung nicht beobachtet. Somit war auch eine Verunreinigung durch Nasalsekret unwahrscheinlich, welches durch Beimengung darin enthaltener bakterieller Nukleinsäuren entweder einen falsch-positiven Nachweis oder durch Verunreinigung mit Nukleasen einen falsch-negativen Nachweis zur Folge gehabt hätte.

Lagerung

In dieser Studie wurden die EBC-Proben nach der Gewinnung für den Transport in das Labor auf Eis gelagert und anschließend bei -20°C aufbewahrt. Mit den Sputumproben wurde ebenso verfahren. Bei dieser Temperatur ist von einer weitgehenden Inaktivierung von eventuell vorhandenen Enzymen auszugehen. Nukleinsäuren können auf diese Art stabil gelagert werden.

Devices

Es ist bisher noch unklar, welchen Einfluss die verschiedenen Geräte zur Gewinnung von EBC auf dessen Inhaltsstoffe haben. Die Empfehlungen von Horváth I et al. (2005) wurden durch die Verwendung des RTube® vollständig berücksichtigt.

Vergleich: Probengewinnung in anderen Studien

Tabelle 18 fasst die Charakteristika der Probengewinnung und -lagerung aller Studien, welche einen bakteriellen Nukleinsäurenachweis in EBC versuchten, zusammen.

Tabelle 18: Charakteristika der Probengewinnung und -lagerung im Vergleich.

Charakteristikum	Zakharkina T et al. (2011)	Jain R et al. (2007)	Vogelberg C et al. (2003)	Vorliegende Studie
Sammeldevice	RTube® ¹	Tygon tube® ²	Eco Screen® ³	RTube® ¹
Verwendung einer Nasenklammer	Ja	Nein	Ja	Nein
Kondensertemperatur	-20°C	keine Angabe	-20°C	-20°C
Dauer der Probengewinnung	10 Minuten	Bis 1 ml EBC gewonnen wurde	15 Minuten	7 Minuten
Lagerungstemperatur	4°C	4°C	-70°C	-20°C

1: Respiratory Research, Inc., Charlottesville, VA, USA
 2: Nalgene 890 FEP tubing, Nalge Nunc International, Naperville, Ill., USA
 3: Jaeger Tonnies, Hoechberg, Deutschland

Der erfolgreiche Nachweis von Nukleinsäuren von Zakharkina T et al. (2011), lässt vermuten, dass die praktizierte Probengewinnung und -lagerung wahrscheinlich keinen Einfluss auf den negativen Nukleinsäurenachweis hatte, da dasselbe Device und die gleiche Kondensertemperatur zur Anwendung kamen. Beim Weglassen der Nasenklammer sind wie weiter oben erwähnt bei erwachsenen Probanden keine Auswirkungen zu erwarten. Es gibt auch keine Hinweise darauf, dass die um 3 Minuten kürzere Probengewinnung einen entscheidenden Einfluss hätte. Die Probenlagerung bei -20°C anstatt bei 4°C hat durch die dadurch bedingte Senkung der Nukleaseaktivität wahrscheinlich einen protektiven Effekt.

4.1.2 Nukleasen im Sputum

In allen vierzehn Sputumproben wurde eine RNase-Aktivität nachgewiesen. In den Bahnen 2 - 4, 6 - 8, 10 und 13 war ein Schmier zu sehen, welcher besonders deutlich in Bahn 2 und 13 auffiel (siehe Abbildung 14). Zur Aufklärung wurde jede Sputumprobe ohne Zusätze in der Gelelektrophorese aufgetragen (siehe Abbildung 13). Hier bildete sich ein mindestens leichter Schmier bei allen Sputumproben. Probe 2 und 13 wiesen wie auch beim RNase-Nachweis die stärkste Schmierbildung auf. Der Schmier ist kurz nach der Geltasche am intensivsten. Vermutlich handelt es sich hierbei um im Sputum enthaltene endogene DNA. Das Vorliegen endogener RNA ist unwahrscheinlich, da die zugesetzte RNA vollständig degradiert wurde.

Beim Nachweis von DNasen in Sputum ergab sich ein ähnliches Bild, insbesondere durch die Sputumproben 2 und 13 (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16). Sieben der vierzehn Sputumproben wiesen eine DNase-Aktivität auf. Jedoch kam es bei keiner Probe zu einer vollständigen Degradation der zugegebenen *P. aeruginosa*-DNA. Es liegt der Schluss nahe, dass die DNase-Aktivität ebenfalls nicht ausreichend war, um die endogene DNA der Sputumproben zu degradieren. In zehn von vierzehn Sputumproben wurde nach längerer Inkubation eine Teildegradation von einer SE¹ DNA durch DNasen nachgewiesen. Zwei Sputumproben ergaben eine vollständige Degradation der untersuchten DNA. Zwei Sputumproben wiesen allenfalls eine sehr geringe DNase-Aktivität auf.

Alle Sputumproben hatten im Vergleich zu einer kommerziell hergestellten RNase A eine Aktivität $\geq 7 \times 10^{-4}$ U. Es wurden 0,22 μ g mEpo mRNA von allen Sputumproben vollständig degradiert. Beim DNase-Nachweis kann hierüber keine Aussage getroffen werden, da der Hersteller eine Auskunft über die DNase-Aktivität ablehnte. Eine vollständige Degradation von 0,41 μ g *P. aeruginosa*-DNA ist jedoch nach 20-stündiger Inkubation nur bei zwei der vierzehn Proben zu sehen. Auch wenn 0,91 μ g mehr DNA im Versuch eingesetzt wurden als RNA beim RNase-Nachweis, ist davon auszugehen, dass die endogene RNase-Aktivität des Sputums höher ist als die DNase-Aktivität. 15 Minuten Inkubation reichten aus, um die RNA in allen Proben zu degradieren. Im Gegensatz dazu waren 20 Stunden nicht ausreichend, um die DNA zu verdauen. Die entsprechenden Nukleinsäuremengen wurden so gewählt, dass sich in der Elektrophorese eindeutige Banden zeigten. Der Unterschied der Nukleinsäuremenge zwischen dem RNA- und DNA-Nachweis wurde deshalb in Kauf genommen.

Hieraus lässt sich ableiten, dass eine Inhalation mit rhDNase (Jones AP u. Wallis CE., 2003) oder Magnesium (Rosenecker J et al., 2009) sinnvoll sein könnte, um den Abbau endogener DNA im Sputum zu beschleunigen, da die endogene DNase-Aktivität nachweislich nicht ausreichend ist. Fuchs HJ et al. (1996) konnte zeigen, dass im Vergleich zum Placebo eine rhDNase-Inhalation zweimal täglich das altersadjustierte Risiko einer respiratorischen Exazerbation um 37% ($P < 0,01$) senken konnte. Jedoch gibt es immer wieder Patienten, bei welchen eine rhDNase-Inhalation keinen positiven Effekt hat. Die Studie von Sanders NN et al. (2006) gab entscheidende Hinweise darauf, dass eine zu niedrige Magnesiumkonzentration im Sputum für das fehlende Ansprechverhal-

ten verantwortlich ist. Rosenecker J et al. (2009) fand, dass in-vitro eine Magnesiumzugabe zu Atemwegssekreten eine DNase-Aktivität induzieren kann. Jedoch sind weitere Studien nötig um zu klären, ob zum Beispiel eine kombinierte rhDNase- und Magnesiuminhalation noch bessere Effekte erzielen könnte als eine alleinige DNase-Inhalation. Es ist außerdem zu ergründen, ob durch eine derartige Kombination die Rate der Non-Responder reduziert werden könnte.

Ein Therapieansatz im Sinne einer RNase-Inhalation ist wahrscheinlich nicht sinnvoll, da die endogene RNase-Aktivität im Sputum als ausreichend hoch einzuschätzen ist. In kürzester Zeit wurde eine SE¹-RNA vollständig degradiert. Es ist davon auszugehen, dass auch endogene RNA umgehend abgebaut wird und somit nicht zur zähen Konsistenz des Sputums beiträgt.

4.1.3 Nukleasen im EBC

In den fünfzehn untersuchten EBC-Proben konnte keine Degradation von einer SE¹ DNA nachgewiesen werden. Es erfolgte keine Schmierbildung (siehe Abbildung 18). Dieselben Proben wiesen allenfalls eine sehr leichte RNase-Aktivität auf (Abbildung 17).

Daraus lässt sich folgern, dass im EBC keine oder nur eine sehr geringe RNase- und DNase-Aktivität vorliegt. Dies könnte entweder daran liegen, dass EBC keine/wenig RNasen und DNasen enthält oder es an den nötigen Cofaktoren mangelt. Das Vorliegen von Inhibitoren dieser Enzyme wurde nicht ermittelt.

Die Größe der bisher im EBC nachgewiesenen Moleküle spricht für die Möglichkeit eines Gehalts an endogenen Nukleasen in EBC. Rozy A et al. (2006) konnten im EBC mitunter Mediatoren mit einem Molekulargewicht von 45 kDa nachweisen. Andere Autoren geben sogar eine Größe von bis zu 100 kDa an (zitiert in Rozy A et al., 2006). RNase 4, welche auch in der Lunge sezerniert wird, hat beispielsweise ein Molekulargewicht von 16 kDa und könnte folglich in EBC enthalten sein (Rosenberg HF u. Dyer KD, 1995).

Nukleasen benötigen für eine enzymatische Aktivität ausreichend Cofaktoren, welche im EBC eventuell nicht vorhanden sind. So kommt es bei der RNase A bei sehr niedrigen Konzentrationen von kleinen Anionen zu einer Inaktivierung (Park C u. Raines RT, 2000). Dieser Effekt wird auch durch die Untersuchungen von Rosenecker J et al. (2009) unterstützt. Dabei wurden insgesamt vier EBC-Proben auf endogene DNasen mittels Zugabe von Plasmid-DNA und Beurteilung der Degradation in der Gelelektrophorese untersucht. Aber im nativen EBC konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Jedoch reagierte eine der Proben nach Magnesiumchloridinkubation mit einer leichten DNase-Aktivität. Es ist also möglich, dass im EBC endogene Nukleasen vorhanden sind, aber die nötigen Cofaktoren nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stehen.

Es ist bekannt, dass Nukleasen eine wichtige Rolle bei Inflammationsprozessen spielen. Gaudreault E u. Gosselin J (2008) fanden, dass es bei Mäusen Leukotrien B₄-

vermittelt zu einer Hochregulation der endogenen RNasen in der Lunge kommt. Leukotriene sind Mediatoren, welche bei Entzündungsprozessen zum Beispiel von Granulozyten gebildet werden. Die Ergebnisse von Rosenecker J et al. (2009) deuten darauf hin, dass die Inflammation bei CF auch zu einer erhöhten Freisetzung von endogenen DNasen führt. Es ist davon auszugehen, dass es auch bei CF-Patienten, welche eine fortschreitende Inflammation der Lunge aufweisen, zu einer vermehrten Produktion von Nukleasen kommt. Diese Überlegungen sollten bei der Entwicklung und Anwendung antientzündlicher Therapeutika, wie zum Beispiel Leukotrienrezeptor-Antagonisten, berücksichtigt werden. Denn die Hemmung der Leukotrienwirkung könnte zu einer Eindickung des Sputums durch verminderte RNase und DNase-Sekretion und damit zu einem verringerten Abbau von endogener RNA und DNA führen.

4.1.4 Nukleinsäuren im EBC

In keiner der zwölf EBC-Proben von *P. aeruginosa*-positiven CF-Patienten konnte mit Hilfe des *Ps. ae.*-Primerpaares oder des *Ps. sp.*-Primerpaares *P. aeruginosa*-RNA oder -DNA nachgewiesen werden (siehe Abbildung 20, Abbildung 22, Abbildung 23 und Abbildung 25).

Eine Ursache für den negativen Nukleinsäurenachweis könnte eine nicht ausreichende Sensitivität der RT-PCR bzw. der PCR sein. Die Nachweisgrenze für die Detektion von *P. aeruginosa*-RNA mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar wurde auf 2,14 ng und für die Detektion von *P. aeruginosa*-DNA auf 0,15 ng festgelegt (siehe Abbildung 26 und Abbildung 28). Zakharkina T et al. (2011) untersuchte fünfundzwanzig EBC-Proben auf den Gehalt an RNA und DNA und fand, dass in den Proben bis zu etwa 20 ng/ μ l Nukleinsäuren enthalten waren. Diese Nukleinsäuren stammen jedoch wahrscheinlich nicht nur von Bakterien, sondern auch von körpereigenen Zellen. Es stellt sich die Frage, ob eine vorherige Extraktion der Nukleinsäuren zur Konzentrationserhöhung für einen positiven Nachweis notwendig wäre. Denn Zakharkina T et al. (2011) erhielt einen positiven bakterienspezifischen DNA-Nachweis nach Anwendung einer Phenol/Chloroform Extraktion. Jain R et al. (2007) jedoch blieb mit einer Konzentrierung mittels Zentrifugation und 10 minütigem Erhitzen der Probe auf den Siedepunkt erfolglos. Chikasue K et al. (2012) wandten erfolgreich eine weitere Möglichkeit der Konzentrierung an, bei der sie die Proben einer Gefriertrocknung unterzogen und anschließend einen Proteinverdau mit Enzyminaktivierung bei 95°C durchführten. Mit einer semi-nested PCR wiesen sie dann DNA von Torque-Teno-Virus nach. Auch hier bleibt die Frage offen, welcher Aufbereitungsschritt entscheidend für den positiven Nukleinsäurenachweis war. War es der Konzentrierungsschritt, die Aufreinigung zur Entfernung der enthaltenden Proteine oder die Enzyminaktivierung?

Es ist unklar, ob es zum Beispiel bei der Gefriertrocknung oder bei der Phenol/Chloroform-Behandlung zu einem Aufschluss von im EBC enthaltenden Bakterien kommt oder freie DNA extrahiert wird. Nur wenige Studien sind bisher der Frage nachgegangen, ob im EBC Mikroorganismen mittels Bakterienkultur nachgewiesen werden können. Jain et al., welche einen Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis*-DNA ver-

suchten, testeten zehn EBC-Proben parallel in zwei verschiedenen Bakterienkulturen zusätzlich zur PCR. Weder in der Lowenstein-Jensen-Kultur noch im Bactec Middlebrook 12B-Medium konnte nach 6 Wochen Inkubation ein Bakterienwachstum nachgewiesen werden. Eine weitere Studie untersuchte EBC von vierundzwanzig Probanden mit ebenfalls aktiver Tuberkulose und erhielt negative Kulturergebnisse (Kawada H et al., 2008 (nur Abstract erhältlich)). Doch Schlussfolgerungen bei einer so geringen Fallzahl sind nicht sehr belastbar. Die vergleichbare Größe von *Mycobacterium tuberculosis* und *Pseudomonas aeruginosa* könnte zu dem Glauben verleiten, dass Bakterien dieser Größe im EBC wahrscheinlich nicht zu finden sind. Hierzu fehlt es jedoch an weiterführenden Studien, welche EBC in Bakterienkulturen untersuchen. Influenzaviren, deutlich kleiner als Bakterien, konnten in achtzehn EBC-Proben nicht nachgewiesen werden (St George K et al., 2010). Wogegen ein pulmonaler Pilzbefall in EBC positive Kulturen von zum Beispiel *Aspergillus niger* bildete, dessen Sporendurchmesser mit der Größe des Tuberkulose- bzw. *Pseudomonas aeruginosa*-Bakteriums vergleichbar ist (Carpagnano GE et al., 2014). Die widerstandsfähigen und stabilen Pilzsporen entziehen sich nicht so leicht der Nachweisprozedur und erleichtern so eine kulturelle Anzucht. Die Größe alleine scheint deshalb nicht die entscheidende Hürde für einen erfolgreichen Nachweis zu sein.

Neben dem Denkansatz, bei der Aufbereitung Mikroorganismen in EBC aufzuschließen, könnten auch frei vorhandene Nukleinsäuren in Frage kommen. Für die Anwesenheit von freien Nukleinsäuren spricht, dass diese in dieser Studie im aufbereiteten und zellgefilterten Sputum in Form von *Pseudomonas*-DNA mittels PCR nachgewiesen werden konnten. Daraus könnte man rückschließen, dass im Flüssigkeitsfilm, der die Atemwege auskleidet, freie DNA von *Pseudomonas* vorkommt und theoretisch auch im EBC nachweisbar sein müsste. Allerdings könnte der Übertritt von Nukleinsäuren in das EBC durch den von mukoiden *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen gebildete Biofilm behindert werden. Dieser Film schützt die Bakterien vor der mukoziliären Clearance und schafft ein optimales Milieu für das Bakterienwachstum. Des Weiteren führt das durch die chronische Entzündung angegriffene Epithel zu einer vermehrten Bindung von *Pseudomonas aeruginosa*. Dieser Effekt wird durch die vermehrte Expression von asialo-Ganglioside M1 an der Oberfläche der Epithelzellen des Respirationstrakts verstärkt. (de Bentzmann S et al., 1996) Auf diese Weise mag es zu einer Verringerung des Bakterientods und damit auch der Freisetzung von bakteriellen Nukleinsäuren kommen.

Nukleinsäuren im Biofilm werden durch die spezielle Zusammensetzung eventuell weniger verdunstet oder durch Nukleasen degradiert und gelangen dadurch in geringeren Mengen in das EBC. Durch diese dicke und zähe, die Lunge auskleidende Schicht, verringert sich außerdem die Verdunstungsfläche, was weiterhin hinderlich für den RNA- und DNA-Übertritt sein dürfte. Eine Untersuchung der freigesetzten Nukleinsäuremengen in Atemwegssekreten zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion und unter antibiotischer Therapie würde weitere Einblicke erbringen. Inhibitoren der RT-PCR oder PCR kommen als Ursache für den negativen Nukleinsäurenachweis

nicht in Frage, da in keinem der zwölf getesteten EBCs Inhibitoren der RT-PCR oder PCR detektiert werden konnten (siehe Abbildung 29 und Abbildung 31). In zwei anderen Studien zum bakteriellen DNA-Nachweis in EBC konnten ebenfalls keine Inhibitoren der PCR gefunden werden (Vogelberg C et al., 2003; Jain R et al., 2007).

Grund für einen fehlenden Nukleinsäurenachweis könnte die Wahl eines unpassenden Primerpaares sein. Dagegen spricht jedoch die Tatsache, dass alle Positivkontrollen einwandfreie Ergebnisse lieferten und der *Ps. ae.*-Primer einen positiven Nachweis in Sputumproben liefern konnte. Außerdem demonstrierte Spilker T et al. (2004) eine 100%ige Sensitivität und Spezifität an den beiden verwendeten Primern. Die Primer entsprechen Abschnitten auf der 16S ribosomalen DNA von *P. aeruginosa* bzw. der *Pseudomonas* Spezies. 16S ribosomale DNA ist schon seit langem der Goldstandard bei der Bestimmung der phylogenetischen Zugehörigkeit von Bakterien (Woese CR., 1987).

Auch wenn bei der Inkubation von EBC mit RNA und DNA keine Degradation stattfand, könnte es bei den Schritten der RT-PCR und PCR dazu gekommen sein. Allein das Erhitzen der Proben könnte eine Enzymaktivität induziert haben oder aber auch die Zugabe von verschiedenen Puffern, welche beispielsweise Magnesiumsulfat enthalten. So führte die Zugabe von Magnesiumchlorid zu EBC in einer Studie zur Degradation der zugesetzten DNA in einer von vier Proben (Rosenecker J et al., 2009). Untersuchungen an Sputum zeigten sowohl bei Magnesiumchlorid- als auch Magnesiumsulfatzugabe eine Aktivierung der endogenen DNasen. Die Wirkung der beiden Substanzen unterschied sich dabei nicht. (unpublizierte Daten) Folglich könnte man annehmen, dass Magnesium als Cofaktor für enthaltene DNasen dient und dass die Addition von RNase- und DNase-Inhibitoren direkt nach der EBC-Gewinnung eine Degradation der bakteriellen RNA und DNA verhindert und damit die Chancen auf einen positiven Nukleinsäurenachweis erhöhen könnte. Dagegen spricht, dass in der vorliegenden Untersuchung bei Zugabe von RNA oder DNA zum EBC keine Degradation der Nukleinsäuren stattgefunden hat und mittels RT-PCR und PCR RNA beziehungsweise DNA nachgewiesen werden konnten.

Die Methode der EBC-Probengewinnung scheint eher nicht für den negativen Nukleinsäurenachweis verantwortlich zu sein. Details finden sich unter „4.1.1 EBC-Probengewinnung“. Schwerwiegende Unterschiede, speziell im Vergleich zur Vorgehensweise von Zakharkina T et al. (2011), welcher einen positiven DNA-Nachweis im EBC erlangte, sind nicht auszumachen (siehe Tabelle 18).

Insbesondere zwei Faktoren wirken sich nachteilig auf einen erfolgreichen Nukleinsäurenachweis aus und sollten untersucht werden. Zum einen sollte zur Verhinderung der durch endogene RNasen und DNasen ausgelösten Degradation der Nukleinsäuren die Zugabe von Nukleaseinhibitoren erwogen werden. Zum anderen ist ein Konzentrierungsschritt zu entwickeln, so dass die Sensitivität der PCR bzw. RT-PCR für den Nachweis von Nukleinsäuren ausreichend ist. Danach sollten vergleichende Untersuchungen klären, welcher der beiden Faktoren entscheidend ist oder ob nur die Kombination beider zum erfolgreichen Nukleinsäurenachweis führt.

4.1.4 Nukleinsäuren im Sputum

Keine der vierzehn Sputum-Proben von CF-Patienten wies einen positiven *P. aeruginosa*-RNA-Nachweis mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar auf (siehe Abbildung 32). In sieben Sputumproben konnte mit Hilfe des *Ps. ae.*-Primerpaares *P. aeruginosa*-DNA detektiert werden (siehe Abbildung 34). Die Kulturergebnisse der Sputumproben in Bezug auf eine *P. aeruginosa*-Besiedelung lagen nicht vor, so dass kein Vergleich der Resultate in der PCR erfolgen konnte.

Aus dem positiven DNA-Nachweis im Sputum lässt sich folgern, dass die ausgewählten Primer und die PCR nicht nur an in der PCR selbst hergestellter DNA funktionieren, sondern auch an reinen Patientenproben. Ein falsch-positiver Nachweis kann nicht ausgeschlossen werden.

Die Ursache des negativen RNA-Nachweises könnte bei den im Sputum vorhandenen endogenen RNasen liegen. Es ist vorstellbar, dass jegliche RNA sofort durch die RNasen degradiert wird und somit nicht mehr mittels RT-PCR nachgewiesen werden kann. Insbesondere das Erwärmen auf 42°C beim DNase-Verdau und bei der RT könnte die RNase-Aktivität verstärkt haben und zu einer vollständigen Degradation der RNA geführt haben.

4.2 Ausblick: Diagnose- und Therapieansätze der CF

Neue wissenschaftliche Arbeiten liefern vielversprechende Ergebnisse für die Diagnose- und Therapiemöglichkeiten bei CF. Eine große Rolle spielen dabei gentherapeutische Verfahren mit dem Ziel der Produktion von gesundem CFTR-Protein. Andere Ansätze finden sich in der Analyse der Ausatemluft mittels sogenannter elektronischer Nasen.

Gentherapie und verwandte Verfahren

CF ist eine Erkrankung, welche durch eine Mutation des CFTR-Gens ausgelöst wird. Mit der Entdeckung dieses Gens im Jahr 1989 eröffnete sich die Möglichkeit von gentherapeutischen Behandlungsmethoden (Riordan JR et al., 1989). Zunächst wurden Applikationen mit viralen Vektoren mit hoher Effektivität bei der Transfektion untersucht (Knight S et al., 2013). Problematisch hierbei sind auftretende Immunreaktionen (Rosenecker J et al., 1996) und das Risiko der insertionalen Mutagenese (Knight S et al., 2013). Darauf folgende Studien beschäftigten sich mit dem Einsatz von nicht-viralen Vektoren mit dem Ziel, Plasmid-DNA in respiratorische Zellen zu transfizieren. Dieses Verfahren bietet eine konstante Effektivität ohne Antikörperbildung, auch bei wiederholter Applikation (Hyde SC et al., 2000). Ungünstig sind jedoch die hier vergleichsweise sehr viel geringeren Transfektionsraten, deren Ursachen wahrscheinlich beim erschwerten Transport der Plasmid-DNA über die Zellkernmembran und die Degradation durch Endosomen zu suchen sind. (Tate S u. Elborn S., 2005, Sanders N et al., 2009)

Von der Gentherapie mit viralen und nicht-viralen Vektoren ist die mRNA-Applikation abzugrenzen. Gemeinsames Ziel all dieser Verfahren ist die Einschleusung von genetischen Informationen in Zellen mit dem Ziel der Expression von Wildtyp-CFTR-Proteinen. Die mRNA-Therapie als Transkript-Therapie zeichnet sich durch entscheidende Vorteile aus. Die Zellkernmembran muss als Hindernis nicht überwunden werden, da die mRNA im Zytoplasma der Zielzelle translatiert wird und somit ihre Funktion ausüben kann. Das ist auch der Grund dafür, dass kein Risiko für eine Insertionsmutagenese besteht und keine Promoter benötigt werden. Eine mRNA-Applikation ist wiederholt möglich und die Wirkung ist unabhängig vom Zellzyklus. (Yamamoto A et al., 2009) Jedoch treten wie auch bei der Gentherapie Immunreaktionen auf. Diesen kann zum Beispiel durch die Verwendung von modifizierten Nukleotiden oder durch das Einfügen von GC-reichen Regionen in das Codon entgegen getreten werden. (Weissman D und Karikó K, 2015) Kormann MS et al. gelang 2011 die erfolgreiche Transfektion mittels mEpo mRNA im Mausmodell. mEpo mRNA ist eine chemisch modifizierte RNA, bei der 25% des Uridin und Cytidin mit 2-Thiouridin-5'-Triphosphat und 5-Methylcytidin-5'-Triphosphat modifiziert sind. Solcherart modifizierte RNA ist stabiler und verhindert Interaktionen mit Toll-like Rezeptoren, was eine geringere Immunogenität zur Folge hat. Die getesteten Mäuse waren gesund oder litten an einem Surfactantprotein B-Mangel. Sowohl die intramuskuläre Injektion als auch die Inhalation dieser RNA führte in diesem Modell zu einer erfolgreichen Transfektion mit effektiver Proteinexpression. Dasselbe RNA wurde in vorliegender Studie beim Nukleasenachweis in Sputum und EBC verwendet. Es zeigte sich, dass die mEpo mRNA sehr schnell im Sputum von CF-Patienten durch endogene RNasen degradiert wird. Der Schluss liegt nahe, dass die Inflammation der Lunge bei CF-Patienten zu einer erhöhten Sekretion von RNasen führen könnte und damit ein Hindernis bei einer RNA-Inhalationstherapie ist. Eine Testung der mEpo mRNA in einem CF-Mausmodell könnte diese These bestätigen.

2013 schloss eine Studie erfolgreich die in-vitro-Transfektion von Wildtyp-CFTR-mRNA in humane nasale und bronchiale Epithelzellen ab (Bangel-Ruland N et al., 2013). Auch hier muss in in-vivo-Studien bei einer mRNA-Aerosolapplikation in CF-Patienten mit einer raschen Degradation der RNA gerechnet werden.

Beim ex-vivo mRNA-Transfer stehen Hilfsmittel wie die Elektroporation und die Verwendung von RNase-freien Puffern zur Verfügung. In-vivo fehlt es jedoch noch an wirkungsvollen Methoden. Derzeit steht die Verwendung von komplexbildenden Agentien im Vordergrund. (Sahin U et al., 2014)

Für einen kleinen Anteil der Patienten mit Cystischer Fibrose, welche eine G551D-Mutation aufweisen, steht seit 2012 mit Ivacaftor zum ersten Mal ein Medikament mit ursächlicher Wirkung zur Verfügung. 2014 fand eine Zulassungserweiterung auf acht weitere CFTR-Mutationen statt.

Ivacaftor ist ein CFTR-Potentiator und steigert die Öffnungswahrscheinlichkeit des CFTR-Kanals und erhöht damit den Chloridtransport über die Zellmembran. Über diesen Mechanismus verbessert es signifikant die Lungenfunktion im Vergleich zum

Placebo. Weiterhin senkt es das pulmonale Exazerbationsrisiko, steigert das Körpergewicht und die gesundheitsbezogene Lebensqualität. (Deeks ED., 2013)

Die Behandlung mit diesem Medikament konnte die Anzahl an Pseudomonas aeruginos-positiven Kulturergebnissen senken, jedoch nicht die von Aspergillus und Staphylococcus aureus. (Heltshe SL et al., 2015)

Eine aktuelle Studie, welche 2015 im „The New England Journal of Medicine“ erschien, wies einen positiven Effekt einer Kombinationsbehandlung aus Lumacaftor und Ivacaftor im Vergleich zum Placebo bei CF-Patienten mit der häufigen Phe508del-Genmutation nach. Es konnte eine Verbesserung der FEV₁ um 4,3 - 6,7%, eine Reduktion der pulmonalen Exazerbationen um 30 - 39% und eine Senkung der Hospitalisierungsrate im Vergleich zur Placebogruppe verwirklicht werden. Bei ähnlich hoher Inzidenz von Nebenwirkungen war die Therapieabbruchquote in der Lumacaftor-Ivacaftor-Gruppe um 2,6% höher als in der Placebogruppe. Ursächlich war meistens auftretende Atemnot. (Wainwright CE et al., 2015) Ivacaftor allein wird gut vertragen. Als Nebenwirkungen treten Kopfschmerzen, oropharyngeale Schmerzen, obere Atemwegsinfekte und eine verstopfte Nase auf. (Deeks ED., 2013)

Analytische Ansätze der Ausatemluft

Neben der Analyse von EBC spielt in der modernen Forschung auch die Untersuchung der Ausatemluft eine entscheidende Rolle. Untersucht werden sowohl volatile als auch nicht-volatile organische Komponenten als Marker für das Auftreten einer Infektion oder einer Erkrankung sowie deren entzündliches Voranschreiten.

Hervorzuheben sind physikalische und physikochemische Verfahren, die als "elektronische Nasen" die Ausatemluft analysieren können. Zur Anwendung kommen die Gaschromatographie, die Ionenmobilitäts-Spektrometrie sowie die Polymersensitometrie. (Koczulla AR et al., 2011)

In einer Studie konnten durch Analyse des Atemprofils unter Verwendung einer elektronischen Nase (Polymersensor) CF-Patienten und Patienten mit primärer Ziliendyskinesie von gesunden Probanden unterschieden werden. Außerdem gelang es, CF-Patienten mit einer chronischen P. aeruginosa-Infektion von Patienten ohne einer chronischen Infektion abzugrenzen. Dasselbe gelang aber nicht bei CF-Patienten (mit und ohne einer chronischen Infektion) und Patienten mit einer primären Ziliendyskinesie. (Joensen O et al., 2014) Diese Methode könnte sich also zur Detektion einer pulmonalen Erkrankung eignen, wobei sie bisher nicht zwischen CF und primärer Ziliendyskinesie zu unterscheiden vermag.

Elektronische Nasen könnten weiterhin als regelmäßiges Screening zur Erkennung einer P. aeruginosa-Infektion bei CF-Patienten nützlich sein. Cox CD u. Parker J stellten 1979 als erste fest, dass 2-Aminoacetophenone für den typischen trauben- oder lindenblütenähnlichen Geruch von P. aeruginosa verantwortlich sind. Mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie konnte Scott-Thomas AJ et al. 2010 2-Aminoacetophenone als Biomarker für die Detektion einer P. aeruginosa-Infektion bei CF-

Patienten nutzen. Es gibt Überlegungen, dass der 2-Aminoacetophenonegehalt von der Wachstumsphase von *P. aeruginosa* abhängig ist. Die Analyse von 2-Aminoacetophenonen hätte folglich das Potential, zwischen einer frühen Kolonisation und einer Infektion der Lunge zu unterscheiden.

Neben den Anwendungsmöglichkeiten bei CF-Patienten ist der Einsatz von elektronischen Nasen auch für die Diagnostik von aktiven Tuberkuloseinfektionen ein interessanter Forschungsansatz. Kolka A et al. erzielte 2010 bei der Analyse von Sputumproben schon eine Sensitivität von 75% und eine Spezifität von 67% und konnte somit zwischen gesunden Probanden und solchen mit einer aktiven Tuberkuloseinfektion unterscheiden.

So sind Atemanalysen eine verlockende Perspektive für die Detektion von spezifischen Atemwegsinfektionen. Zur Entwicklung einer ausreichenden hohen Sensitivität und Spezifität der elektronischen Nasen sind jedoch weitere Studien nötig. (Chambers ST et al., 2012)

Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, in EBC von an CF erkrankten Patienten Nukleinsäuren von *P. aeruginosa* mit Hilfe biochemischer Methoden zu detektieren. Hierzu wurde zuerst untersucht, ob im Sputum und EBC endogene Nukleasen enthalten sind.

Zunächst wurden vierzehn Sputumproben von CF-Patienten nach einem standardisierten Protokoll gesammelt und aufbereitet. Darauffolgend wurden einundzwanzig EBC-Proben von einem anderen CF-Patientenkollektiv gewonnen. Von diesen wiesen zwölf Patienten einen positiven *P. aeruginosa*-Nachweis in der zuletzt durchgeführten Sputumkultur auf.

Zur Untersuchung von RNasen bzw. DNasen im Sputum oder EBC wurde den Atemwegssekreten RNA bzw. DNA zugesetzt und inkubiert. Für den Nachweis von *P. aeruginosa*-DNA in EBC und Sputum wurde eine PCR durchgeführt. Zur Detektion von *P. aeruginosa*-RNA erfolgte vor der PCR ein DNase-Verdau sowie eine RT. Es wurde jeweils die Nachweisgrenze ermittelt. Außerdem fand ein Test auf Inhibitoren der PCR und RT-PCR statt.

Beim Nukleasenachweis wiesen alle vierzehn Sputumproben nach 15 Minuten Reaktionszeit eine starke RNase-Aktivität auf. In fünfzehn EBC-Proben hingegen konnte nach 20-stündiger Inkubation allenfalls eine geringe RNase-Aktivität festgestellt werden, unabhängig davon, ob es sich um Proben gesunder Labormitarbeiter oder CF-Patienten mit und ohne *P. aeruginosa*-Besiedelung handelte. Zwei der vierzehn Sputumproben zeigten eine starke, zehn eine mittlere und zwei keine DNase-Aktivität (20-stündige Inkubationszeit). Die EBC-Proben waren nach 20 Stunden Reaktionszeit frei von DNase-Aktivität. Es ergab sich kein Unterschied zwischen gesunden und CF-Probanden.

Der Nukleinsäurenachweis mittels RT-PCR und PCR ergab in zwölf EBC-Proben weder mit dem *Ps. ae.*- noch mit dem *Ps. sp.*-Primerpaar einen positiven Nachweis von *P. aeruginosa*-RNA oder -DNA bei *P. aeruginosa*-positiven CF-Patienten. Die Nachweisgrenze für die Detektion von *P. aeruginosa*-RNA mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar wurde mittels einer Verdünnungsreihe auf 2,14 ng festgelegt. Beim Nachweis von *P. aeruginosa*-DNA lag sie bei einem Wert von 0,15 ng. In keinem der zwölf getesteten EBCs konnten Inhibitoren der RT-PCR oder PCR detektiert werden. Keine der vierzehn Sputum-Proben von CF-Patienten wies einen positiven *P. aeruginosa*-RNA-Nachweis mit dem *Ps. ae.*-Primerpaar auf. In sieben Sputumproben wurde mit Hilfe des *Ps. ae.*-Primerpaares *P. aeruginosa*-DNA detektiert.

Die hohe RNase-Aktivität im Sputum von CF-Patienten stellt ein entscheidendes Hindernis für die pulmonale Applikation von In-vitro-Transfektions-RNA dar. Bei Kindern wäre die Inhalationstherapie gegenüber einer Verabreichung mittels Spritze vorzuziehen. Für eine effektive Transfektion müssten deshalb zusätzliche Vorkehrungen wie die Zugabe von komplexbildenden Agentien getroffen werden.

Die Resultate der RT-PCR und PCR unterstützen in Zusammenschau mit den Ergebnissen anderer Studien die These, dass für einen positiven Nukleinsäurenachweis im EBC zwei Schritte entscheidend sind. Zum einen ist das die Zugabe von Nukleaseinhibitoren direkt nach der Probengewinnung und zum anderen die Extraktion der im EBC enthaltenen DNA.

Auf diese Weise könnte sich die EBC-Analyse zu einem interessanten diagnostischen Werkzeug entwickeln, welches die nicht-invasive Frühdetektion von Infektionen der Lunge ermöglichen würde. Insbesondere Kinder, welche häufig kein Sputum abgeben können, da sie es hinunterschlucken, würden von diesem Verfahren profitieren. Ein ebenso bedeutender Anwendungsbereich stellt die Diagnostik der Tuberkulose dar. Es ist denkbar, dass eine einfach und schnell durchzuführende EBC-Diagnostik die langen Wartezeiten bei der Anzucht von Sputumkulturen ablösen könnte.

Anhang

Material

Tabelle 19 bis Tabelle 23: Nachweis von RNasen und DNasen in Atemwegssekreten

Tabelle 19: Materialien für die Sputumverarbeitung

Reagenz/Gerät	Charakteristika	Bezugsquelle
DPBS	10 x, ohne Magnesium und ohne Calcium	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Einmalkanüle	Neolus Sonderkanülen 18 G, NN1850, Rosa 18 G x 2" 1,20 x 50 mm	Terumo Deutschland GmbH, Eschborn
Petrischale	Culture Dish Cellbind, Surface 100 x 20 mm	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Reaktionsgefäß 2 ml	Safe-seal, PP, mit anhängenden Stopfen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß 50 ml	Cellstar Tube PP, conical bottom, 30 X 115 mm, with blue screw cap, Natural, blue graduation, with writing area, with skirt	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Spritze 2 ml	Discardit	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zellsieb	Falcon, Nylon, 40 µm und 100 µm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zentrifuge	5417 R	Eppendorf AG, Hamburg

Tabelle 20: Materialien für die EBC-Probengewinnung und -verarbeitung

Gerät	Charakteristika	Bezugsquelle
RTube®	---	Respiratory Research, Inc., Charlottesville, VA, USA
Waage	Analysenwaage, Electronic Balance, Typ: ABJ 80-4M	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern

Tabelle 21: Materialien für den RNase-Nachweis

Reagenz	Charakteristika	Bezugsquelle
mEpo mRNA	25% des Uridin und Cytidin waren modifiziert mit 2-Thiouridin-5'-Triphosphat und 5-Methylcytidin-5'-Triphosphat	Dr. Kai Michaelis, Forschungszentrum der Kinderklinik und Poliklinik des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der LMU
RNA-Ladepuffer	2x, RiboRuler	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
RNase A	100 mg/ml, 7 U/µl (Eine Kunitz-Unit entspricht der Enzymmenge, welche bei 25°C und pH 5,0 die Hydrolyse von Hefe-RNA mit einer Kinetik erster Ordnung von 1,0 katalysiert.)	Qiagen GmbH, Hilden

Tabelle 22: Materialien für den DNase-Nachweis

Reagenz	Charakteristika	Bezugsquelle
DNA-Ladepuffer	---	Dr. Kai Michaelis, Forschungszentrum der Kinderklinik und Poliklinik des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der LMU
DNase I	RQ1, RNase frei, 1U/µl (Eine Unit entspricht der Enzymmenge, welche 1 µg lambda DNA in 10 Minuten bei 37°C in 50 µl Puffer, aus 40mM Tris-HCl (pH 7.9 at 25°C), 10mM NaCl, 6mM MgCl ₂ , 10mM CaCl ₂ , vollständig degradiert.)	Promega, Madison, USA
lineare P. aeruginosa-DNA	Mit dem Ps. sp.-Primerpaar hergestellt. Die DNA hat eine Länge von 618 bp. (Spilker T et al., 2004)	In eigener PCR erzeugt (siehe „2.3.2.1 Entwicklung und Definition von Standardprozeduren“)
Reaktionspuffer für DNase I	10 x mit MgCl ₂	Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Tabelle 23: Verbrauchsmaterial und weitere Geräte für den Nachweis von RNasen und DNasen in Atemwegssekreten

Material/Gerät	Charakteristika	Bezugsquelle
Pipettenspitzen	Professional, Safe-seal, steril, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäß 1,5 ml	PreFill Tube, farblos, DNA, DNase, RNase frei	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
RNase-Reinigungsmittel	RNase-Exitus	AppliChem GmbH, Darmstadt
RNase freies Wasser	DEPC-Wasser	Peq Lab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Spektrophotometer	Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Vortex-Schüttler	MS2 Minishaker	IKA – Werke GmbH & Co. KG, Staufen

Tabelle 24 bis Tabelle 26: Nukleinsäurenachweis in Atemwegssekreten

Tabelle 24: Verwendete Nukleinsäuren und Primer

Nukleinsäure/Primer	Charakteristika	Bezugsquelle
Ps. ae.-Vorwärtsprimer (Spilker T et al., 2004)	Sequenz 5'-3': GGGGGATCTTCGGACCTCA	Metabion International AG, Martinsried
Ps. ae.-Rückwärtsprimer (Spilker T et al., 2004)	Sequenz 5'-3': TCCTTAGAGTGCCCACCCG	
Ps. sp.-Vorwärtsprimer (Spilker T et al., 2004)	Sequenz 5'-3': GACGGGTGAGTAATGCCTA	Metabion International AG, Martinsried
Ps. sp.-Rückwärtsprimer (Spilker T et al., 2004)	Sequenz 5'-3': CACTGGTGTTCTTCCTATA	
P. aeruginosa-DNA	---	Dr. Kai Michaelis, Forschungszentrum der Kinderklinik und Poliklinik des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der LMU
P. aeruginosa-RNA	---	Dr. Kai Michaelis, Forschungszentrum der Kinderklinik und Poliklinik des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der LMU

Tabelle 25: Verwendete Kits

Kit	Charakteristika	Bezugsquelle
PCR-Kit	AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity	Invitrogen, Life Technologies GmbH Darmstadt
RT-Kit (inclusive DNase-Verdau)	QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen GmbH, Hilden

Tabelle 26: Verbrauchsmaterial und weitere Geräte für den Nukleinsäurenachweis im EBC

Verbrauchsmaterial/Gerät	Charakteristika	Bezugsquelle
PCR-Reaktionsgefäße	0,2 ml 8-fach-PCR-Set, PP, farblos, Einzeldeckel	Brand GmbH, Wertheim
DNA-Ladepuffer	---	Dr. Kai Michaelis, Forschungszentrum der Kinderklinik und Poliklinik des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der LMU
Thermocycler	Tpersonal	Biometra GmbH, Göttingen
Pipettenspitzen	Professional, Safe-seal, steril, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf

Tabelle 27: Gelelektrophorese

Tabelle 27: Verbrauchsmaterial und Geräte für die Gelelektrophorese

Reagenz/Gerät	Charakteristika	Bezugsquelle
Agarose	---	Peq Lab Biotechnologie GmbH, Erlangen
destilliertes Wasser	Hergestellt mit dem Milli-Q Integral Water Purification System, Elix water	EMD Millipore Corporation, Darmstadt
DNA-Größenmarker	100 bp	Plasmid Factory GmbH & Co. KG, Bielefeld
Elektrophoresekammer	Easy-cast	AGS GmbH, Heidelberg
Elektrophorese-Netzgerät	Electrophoresis Power Supply E312	Hölzel, Dorfen
Ethidiumbromid	1%ige Lösung in Wasser	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
RNA-Größenmarker	RiboRuler High Range ready-to-use	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
TAE Puffer	50x	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Geldokumentations-System	Intas Gel iX Imager	Intas, Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen

Ethikantrag

ANTRAG AN DIE ETHIKKOMMISSION

AUF

BEURTEILUNG EINES FORSCHUNGSVORHABENS

1. Antragsteller bzw. verantwortlicher Studienleiter**Prof. Dr. med. Joseph Rosenecker**

*21.10.1959

Facharzt für Kinder und Jugendmedizin

Dr. von Haunersches Kinderspital, Ludwig-Maximilians-Universität München

Lindwurmstrasse 4

80337 München

Tel.: 089-5160-7524, Fax: 089-5160-4421

E-mail: Joseph.Rosenecker@med.uni-muenchen.de

Und:

Alpenklinik Santa Maria, Fachklinik für Kinder und Jugendliche

Riedlesweg 9

87541 Bad Hindelang/Oberjoch

Tel.: 08324-78121, Fax: 08324-78128

Privatadresse:

Graf-Pocci-Weg 3

82541 Ammerland

Mitantragsteller bzw. stellvertretende Studienleiterin

Stefanie Immler

*14.09.1983

Assistenzärztin

Dr. von Haunersches Kinderspital, Ludwig-Maximilians-Universität München

Lindwurmstrasse 4

80337 München

Tel.: 089-5160-7524, Fax: 089-5160-4421

E-mail: Stefanie.Immler@med.uni-muenchen.de

2. Titel des Forschungsvorhabens

**GEWINNUNG UND LABORCHEMISCHE UNTERSUCHUNG VON BLUTPROBEN,
SPUTUM UND EXHALED BREATH CONDENSATE (EBC) VON PATIENTEN
MIT HYPER-IGE-SYNDROM (HIES) ODER CYSTISCHER FIBROSE (CF)**

3. Ausbildungsdaten und Prüferfahrung

Siehe beiliegende Lebensläufe

4. Verantwortliche Leiter der klinischen Einrichtungen

Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

Direktor des Dr. von Haunerschen Kinderspitals

Kinderklinik und Kinderpoliklinik der Universität München

Prof. Dr. med. Joseph Rosenecker

Chefarzt der Alpenklinik Santa Maria

Bad Hindelang/Oberjoch

5. Erklärung der berücksichtigten Grundsätze der Deklaration von Helsinki mit ihrer Novellierung von Somerset West, 1996

Die Grundsätze der Deklaration von Helsinki mit ihrer Novellierung von Somerset West von 1996 wurden in der Antragsstellung berücksichtigt.

6. Bei studienbedingten Strahlenbelastungen

Im Rahmen der Studie entsteht keine studienbedingte Strahlenbelastung für die Studienteilnehmer.

7. Wissenschaftliche Angaben zum Forschungsvorhaben

7.1. Fragestellung

7.1.1. Hypothesen

DNase-Aktivität:

- Patienten, die an einer chronischen Lungenerkrankung leiden, wie HIES- oder CF- Patienten, benötigen eine hohe körpereigene DNase-Aktivität um bei Inflammation anfallende DNA aus Abwehrzellen, aus abgeschilferten oder zu-

grunde gegangenen Parenchymzellen und aus Erregerorganismen, zu spalten. Dies ist notwendig, um das Sekret zu verflüssigen, damit es in der Folge besser transportiert werden kann, womit wiederum die Ventilation in den Alveolen suffizient bleibt.

- Es gibt bereits gut etablierte, erfolgreiche Behandlungsverfahren in der Therapie der CF, die eine Inhalation, also exogene Zufuhr von körperfremder humaner rekombinanter DNase (Pulmozyme, rhDNase), beinhaltet. [1, 2]
- Durch Untersuchungen an Lungenerkrankungen wie CF und Asthma gibt es Hinweise darauf, dass die körpereigene DNase-Aktivität durch bestimmte Ionen gesteigert und die klinischen Symptome gebessert werden können. [2-5]
- Unsere Versuchshypothese beinhaltet den Vergleich der DNase-Aktivität im Sputum und EBC von HIES- und CF-Patienten mit und ohne Zusatz von Magnesiumionen. Im Falle eines signifikanten Unterschiedes zwischen den Proben könnte dies einen wichtigen Baustein für das Verständnis und insbesondere für die pathogenetischen Ähnlichkeiten der beiden Erkrankungen liefern. Außerdem erhofft man sich große Bedeutung für die Etablierung von neuen Inhalationsmedikamenten zur Behandlung von Patienten mit Lungenerkrankungen mit chronischen und rezidivierenden Infektionen.
- Die Interaktion von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten mit den Bakterien, die bei den genannten Krankheiten die Atemwege besiedeln, kann durch die DNase-Aktivität beeinflusst werden. Um diese Effekte auf die immunkompetenten Zellen untersuchen zu können, soll auch den Probanden Blut abgenommen werden.

Bakterielle DNA und RNA

- EBC und Sputum geben Auskunft über die momentane pulmonale, mikrobiologische Situation. Durch deren Gehalt an spezifischen Nukleinsäuren tragen sie Information über die individuelle Keimbesiedelung. Diese ändert sich mit den Verläufen der Erkrankungen und während Exazerbationen.
- Mittels PCR und rtPCR lassen sich durch die Wahl des Primers gezielt bakterielle oder virale DNA bzw. RNA detektieren. Bisher ist unklar, inwiefern der Nachweis von Erregernukleinsäuren zwischen den unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien korreliert und welche Stabilitätsunterschiede zwischen den Makromolekülen bestehen, die den jeweiligen Nachweis beeinflussen.[6]
- Eine weitere Versuchshypothese beinhaltet den Nachweis erregerspezifischer DNA bzw. RNA mittels PCR bzw. rtPCR zur Korrelation der Nachweissicherheit zwischen den gewonnenen Materialien einerseits und zum Vergleich der Er-

gebnisse mit vorliegenden, mikrobiologischen Ergebnissen des Patienten andererseits. Dies erlaubt in Folge Rückschluss auf die Sensitivität der Materialgewinnungsmethoden bezüglich verschiedener Keime und die diagnostische Relevanz der Methoden. Die Ergebnisse sollen zur Weiterentwicklung diagnostischer Möglichkeiten beitragen.

7.1.2. Ziel

Ziel ist die Erfassung von Aktivitätsunterschieden der körpereigenen DNAse in vitro im Sputum und EBC von HIES- und CF-Patienten durch die Beimpfung mit Magnesiumionen in unterschiedlicher Zusammensetzung und Konzentration und damit die Erhebung neuer Datengrundlagen zur Etablierung neuer Behandlungskonzepte für Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen. Zudem werden Unterschiede in der Nachweissensitivität und -spezifität von bakteriellen Nukleinsäuren in den genannten Materialien aufgezeigt, um diese zur Weiterentwicklung der Erregerdiagnostik nutzen zu können.

7.1.3. Bedeutung

Die CF ist mit einer Frequenz von 1:2000 bis 1:3000 Lebendgeborenen die häufigste, schwere, autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung unter Kaukasiern. In Deutschland sind etwa acht- bis zehntausend Menschen erkrankt. Von dem selteneren primären Immundefekt des HIES sind wahrscheinlich weitaus weniger Menschen betroffen, die genaue Inzidenz ist nicht bekannt. An der Dr. von Haunerschen Kinderklinik werden derzeit etwa 40 Patienten betreut, in der Literatur sind bisher etwa 300 Fälle beschrieben. Betrachtet man die Lungenerkrankung der beiden genetischen Erkrankungen, scheinen sie sich in vielen Aspekten zu ähneln. Beide sind sie geprägt durch chronische Infektionen der Lunge, verknüpft mit intermittierenden akuten Exazerbationen. Diese führen zu chronischen Lungenveränderungen durch Gewebeumbau wie Atelektasen, Bronchiektasen, Überblähung und speziell beim HIES zur Pneumatozelenbildung. Die Patienten verbringen viel Zeit in stationärer Behandlung aufgrund akuter Infektionen der Lunge und verpassen hierdurch Arbeits- oder Schulzeit, was sowohl eine ökonomische Belastung der Gesamtwirtschaft, als auch des Gesundheitssystems, sowie einen Verlust an Lebensqualität für die Betroffenen und ihre Familien bedeutet. [7-11]

Zäher Schleim bildet sich in den Atemwegen durch den Circulus vitiosus aus rezidivierenden Infektionen, Sekretretention, Schleimhautschwellung und -schädigung und Bronchospasmus und -kollaps. DNasen zerkleinern intrapulmonale Nukleinsäuren aus unterschiedlichen Zellen, sie können vom Körper als Teil des Abwehr-

prozesses selbst gebildet werden. Nucleinsäuren fallen im Zuge der Inflammation durch Erreger, zugrunde gegangener Parenchymzellen und Abwehrzellen an. Durch den Abbau der DNA verflüssigt sich das intrapulmonale, zähe Sekret, der Abtransport wird erleichtert und in der Folge verbessern sich die mukoziliäre Clearance, die Obstruktion und somit die Lungenfunktionswerte. [7, 12-15]

Die körpereigene DNase-Aktivität ist interindividuell verschieden und könnte von der vorliegenden Grunderkrankung abhängig sein. Es gibt Anzeichen dafür, dass ihre Aktivität durch Salzionen gesteigert werden kann. [4, 16, 17] In diesem Forschungsvorhaben soll der Effekt der Salze zunächst in vitro, an Patientensputum und EBC getestet werden. In der Praxis könnten diese Ionen in Zukunft durch das leicht anwendbare, schnelle, günstige und wenig belastende Verfahren der Inhalation topisch angewendet werden. Im Falle positiver Ergebnisse kann dieses Verfahren zukünftig therapeutische und prophylaktische Anwendung bei Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen finden. Durch die Verbesserung rheologischer Eigenschaften des Mukus trügen sie zur Verbesserung der Prognose und der Lebensqualität der Patienten bei, was auch für weitere Lungenerkrankungen in Zukunft positive Effekte erzielen könnte.

Die Sekrete EBC und Sputum lassen aber nicht nur eine Untersuchung der enthaltenen Enzyme zu, auch das Erregererbgut selbst kann untersucht werden und enthält wichtige Informationen zum individuellen Besiedelungsmilieu jedes einzelnen Patienten.

Speziell für CF-Patienten, um ein konkretes Beispiel aufzugreifen, ist es wichtig ihre Besiedelung mit *Pseudomonas aeruginosa* zu kennen. Diese kann sich jedoch schnell durch Infektion mit diesem fakultativ pathogenen Keim ändern. Da er prognostisch entscheidend für den Erkrankungsverlauf und die Lebenserwartung der Patienten ist, ist die Kenntnis um die Besiedelung mit diesem Keim von hoher individueller Bedeutung für den Patienten und rechtlicher Bedeutung für die Klinik. Im Falle einer Besiedelung sinkt die Lebenserwartung signifikant, weshalb jeder Patient so gut wie möglich vor einer Infektion geschützt werden sollte. Ein Screeningverfahren, welches es bisher nicht gibt, würde hier Erleichterung verschaffen. [18, 19]

Mikrobiologische Nachweisverfahren bestehen meist in der Anzucht des Bakteriums, was bis zum Erhalt eines Ergebnisses eine Woche oder länger dauern kann. In den pulmologischen Spezialambulanzen besteht aber beispielsweise dringender Bedarf einer schnellen Erregerdiagnostik, um Patienten screenen zu können. Dies würde helfen, Patienten mit unterschiedlicher Besiedelung kohortieren und vor An-

steckung schützen zu können. Gerade das einfache, schnelle, günstige und wenig belastende Verfahren des EBC oder des Sputums könnten sich für die Entwicklung von Schnelltestverfahren sehr gut eignen.

Hierfür ist eine Erweiterung der Datenlage zur Aussagekraft der Materialien dringend notwendig, um in weiterer Konsequenz einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung von diagnostischen Schnelltests, die der langwierigen mikrobiologischen Anzucht von Erregern überlegen sind, zu leisten.

Die Datenlage zur DNase-Aktivität bei Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen ist bisher dünn und bedarf der weiteren Untersuchung, denn das Potential der Aktivitätssteigerung der DNase für die prophylaktischen und therapeutischen Maßnahmen ist noch nicht ausgeschöpft. Es besteht außerdem dringender Bedarf zur Entwicklung schneller, einfacher, günstiger und für den Patienten wenig belastender Nachweisverfahren von Lungenproblemkeimen, um Patienten z.B. im hospitalen Umfeld vor gegenseitiger Ansteckung zu schützen. Hierzu könnte der zuverlässige Nachweis von erregerspezifischer DNA oder RNA in den bereits bei Kindern einfach und schnell zu gewinnenden Materialien, Sputum oder EBC, einen entscheidenden Beitrag leisten.

7.1.4. Methodische Grundlagen

Die Sputumgewinnung:

Verwendung findet Sputum hauptsächlich zur bakteriologischen Diagnostik. Sputum ist Schleim aus den tiefen Atemwegen. Gewonnen wird es durch kräftiges Abhusten nach tiefer Einatmung. Es spiegelt deshalb das pulmonale Besiedelungsmilieu und nicht allein die oropharyngeale Keimlast wieder. Um die Kontamination mit dieser zu vermeiden, sollte der Mund zuvor mehrfach mit Wasser ausgespült werden. Zur täglichen Hygiene des chronisch erkrankten Lungenpatienten sollte das mehrmalige Abhusten von tiefem Sputum als Reinigungsmaßnahme, zur Schleim- und Keimreduktion und damit zur besseren Ventilation und Perfusion gehören. In diesem Sinne stellt Sputum ein Abfallprodukt für den Patienten dar.

Das Exhaled Breath Condensate (EBC):

EBC wird durch Atmung in ein Mundstück gewonnen, welches mit einem gekühlten Kondensatorbehälter verbunden ist. Geatmet wird durch dieses Mundstück in Ruhe im Sitzen für zehn Minuten. Das sich bildende Kondensat wird in einem dafür vorgesehenen Behälter gesammelt. Die Flüssigkeit enthält Partikel aus tiefen Lungenregionen, die sonst nur durch Lavage gewonnen werden können. Da es die Zu-

sammensetzung des alveolären Flüssigkeitsfilms wiedergibt, dient es (ebenfalls) zur Informationsgewinnung über die Zustände in der Lunge. Es enthält in verdünnter Version die gleichen Substanzen wie ein Lavage, hierunter Ionen, Proteine und DNA aus Körper- und Erregerzellen. [6, 20, 21]

Erregerübertragung zwischen Patienten wird durch die Verwendung von entsprechenden Filtern oder Einmalgeräten verhindert.

In den letzten Jahren konnten wir in unserer Arbeitsgruppe zahlreiche Ergebnisse durch die Untersuchung von Sputum und EBC von Patienten gewinnen und die Methoden weiterentwickeln, wodurch ein großer Erfahrungsschatz entstand, auf den wir aufbauen können. [3] Die Methoden stellen einfache und erfolgreiche Verfahren zur Materialgewinnung mit hoher Aussagekraft dar.

Transport:

Frisches Sputum oder EBC wird direkt beim Patienten während eines Routinetermins oder eines stationären Aufenthaltes gewonnen und sofort auf Eis gelagert und transportiert. Die Probe erhält die zugewiesene Studiennummer. Im Anschluss erfolgt die Aufbereitung im Labor (Kubus, Dr. von Haunersches Kinderspital der LMU München, AG Rosenecker/Rudolph).

Aufbereitung, Inkubation, Gelelektrophorese:

Die Sputen werden mit Zugabe von D-PBS homogenisiert, filtriert und zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand nach Zugabe von Plasmid-DNA mit unterschiedlichen Mengen von Magnesiumionen, wie z.B. Magnesium-Chlorid oder Magnesium-Sulfat, bei verschiedenen Temperaturen und für unterschiedliche Zeitintervalle inkubiert. Die Reaktionsansätze werden auf Agarosegel aufgetragen, die DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese getrennt und das Gel im Anschluss zu definierten Zeitpunkten fotodokumentiert.

PCR/rtPCR, Gelelektrophorese:

Mittels PCR/rtPCR und erregerdefinierendem Primer werden die Nukleinsäuren aus nativem Sputum und EBC vervielfältigt. Erfolg und Misserfolg zeigen sich ebenfalls in der anschließenden Gelelektrophorese mit spezifischem Bandennachweis.

Lagerung:

Aufbereitetes Sputum und EBC wird aliquotiert und bei -20°C tiefgefroren aufbewahrt.

Auswertung/Statistik:

Die Daten werden durch visuelle Analyse des aufgezeichneten Bildmaterials gewonnen. Teils werden die Daten in numerische Form überführt und statistisch analysiert. Mit den Datensammlungen wird ein Abgleich zu klinisch gewonnenen Daten des Patienten aus dessen Krankenakte und eine statistische Aufarbeitung stattfinden. Zum Beispiel ein Vergleich zum mikrobiologischen Keimnachweis mit nachfolgender Korrelationsbestimmung zwischen den Verfahren.

Es wird lediglich Erregererbgut untersucht und keinerlei Testung mit menschlichen Zellen und deren Genom durchgeführt.

7.2. Studiendesign

Es handelt sich um eine offene Studie zur Erhebung medizinisch-wissenschaftlicher Daten. Diese könnten zukünftig Grundlage für Diagnosedifferenzierung, Therapieentwicklung und -optimierung und Prävention darstellen.

7.2.1. Studie mit oder ohne Kontrollgruppe:

Es ist ein Vergleich der erhobenen Daten bei Patienten mit verschiedenen chronischen Lungenerkrankungen vorgesehen. Es findet kein Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden statt.

7.2.2. Forschungsvorhaben mit potentiellm Nutzen für den Teilnehmer

Ein direkter, individueller Nutzen durch die Sputum- oder EBC-Gewinnung, oder die gewonnenen Daten leitet sich für die Teilnehmer nicht ab. Ein indirekter Nutzen aus dem Forschungsvorhaben leitet sich aus folgenden Punkten ab: s. 7.2.3.

7.2.3. Forschungsvorhaben ohne potentiellen Nutzen für den Teilnehmer

Die Teilnehmer werden im Rahmen der Materialgewinnung zur Sekrethygiene animiert. Jedes Abhusten und Befördern von angesammeltem Mukus trägt zur Gesundheitsförderung des Patienten bei. Das Verfahren ist den Patienten vertraut. Die Ergebnisse der Untersuchungen werden auf Wunsch mit dem Studienteilnehmer bzw. den Erziehungsberechtigten besprochen, was einen pädagogischen Effekt durch die Auseinandersetzung mit der Erkrankung haben kann und möglicherweise das Bewusstsein des Patienten für seine Erkrankung schult und so die Compliance verbessert. Der Patient hat die Möglichkeit etwas über das Atemsystem und die Pathophysiologie der Erkrankung zu lernen. Zudem macht er die persönliche Erfahrung, einen wichtigen Beitrag zur Erforschung von Erkrankungen,

Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten leisten zu können. Nebenbei erhalten der Patient und seine Familie einen Zugang zu den Themen Naturwissenschaft und Medizin und diese erfahren etwas über den Ablauf und Aufbau klinischer Studien im Krankenhaus.

7.2.4. Forschung an körpereigenen Materialien

Sputum ist ein ohnehin anfallendes Material, welches die Patienten bei gutem Verständnis für ihre Erkrankung und guter Compliance mehrmals täglich abhusten und verwerfen sollten. Es stellt abgesehen vom diagnostischen Wert ein Abfallprodukt dar. Für die wissenschaftlichen Untersuchungen wird es nur mit entsprechender Aufklärung und unterzeichneter Einverständniserklärung verwendet. Der Patient darf bei Interesse Informationen zum Verwendungszweck des Materials erfahren und erhält Auskunft über den Schutz seiner erhobenen Daten.

EBC ist ein über den hygienischen Zweck hinausreichendes diagnostisches Verfahren. Das gewonnene Material enthält Partikel aus tiefen Lungenarealen, die sonst ausschließlich über invasive Methoden wie Bronchoskopie mit Lavage gewonnen werden können. Es spiegelt also das Milieu tiefer Lungenareale wieder und ist folglich ein wertvolles, aussagekräftiges Instrument der Pneumologie.

7.2.5. Einschlusskriterien, Ausschlusskriterien und Rekrutierungsvorhaben

Einschlusskriterien:

HIES Patienten: Träger des Immundefekts, Erfüllung der Kriterien zur Diagnosestellung des HIES [22], schriftliche Einverständniserklärung, keine Einschränkung bezüglich Alter und Geschlecht, ausreichendes Sprachverständnis.

CF Patienten: Nachgewiesene CF, schriftliche Einverständniserklärung, keine Einschränkung bezüglich Alter und Geschlecht, ausreichendes Sprachverständnis.

Ausschlusskriterien:

Alle: Nicht gegebene schriftliche Einwilligung zur Studienteilnahme. Nichtvorliegen der Einschlusskriterien. Schlechter Allgemeinzustand des Patienten, bei dem die Gewinnung des Materials eine unzumutbare Belastung darstellen würde.

Rekrutierungsvorhaben:

Zur Studienteilnahme befragt werden Patienten beider Erkrankungsgruppen, die in den entsprechenden Ambulanzen des Dr. von Haunerschen Kinderspitals betreut werden (Christiane-Herzog-Ambulanz, bzw. Immundefektambulanz). Materialgewinnung fände im Rahmen eines solchen Ambulanztermins oder eines

stationären Aufenthaltes statt, so dass kein zusätzlicher zeitlicher Aufwand oder Anfahrtskosten für den Patienten entstehen.

7.2.6. Biometrie

- 1) n= ca. 75 HIES-Patienten
- 2) n= ca. 75 CF-Patienten

7.2.7. Untersuchungsprotokoll mit Beginn, Dauer und Abbruchkriterien

- 1) Ausführliche Aufklärung des Teilnehmers und ggf. der Erziehungsberechtigten
- 2) Gewinnung von Material (Sputum/EBC)
- 3) Transport des Materials und direkte Aufarbeitung im Labor
- 4) Inkubation und Analyse oder Aufbewahrung des aufbereiteten und nativen Materials mit späterer Inkubation und Analyse
- 5) Theoretische Datenerhebung aus den vorliegenden Krankenakten
- 6) Auswertung

Beginn:

03/2012; das gesamte Vorhaben ist für einen Zeitraum von 5 Jahren ausgelegt.

Abbruchkriterien:

Jede Untersuchung wird sofort abgebrochen und das konservierte Material verworfen und ggf. erhobene Daten aus der Datenbank gelöscht, sobald der Proband sein Einverständnis zurücknimmt. Schwerwiegende Ereignisse werden umgehend der Ethikkommission gemeldet.

Sollten sich nicht ausreichend freiwillige Teilnehmer (≥ 5 Probanden/Kollektiv) finden lassen, wird die Studie vorerst abgebrochen und das Studienprotokoll überarbeitet.

8. Diskussion der ethisch-rechtlich relevanten Probleme

8.1. Mögliche Nachteile/ Risiken/ Belastungen des Studienteilnehmers

Die hauptsächlich ethisch-rechtlich relevanten Bereiche im Rahmen der Studie sind:

1. Die Belastung des Patienten durch die Gewinnung des Materials
2. Datenschutzrechtliche Aspekte

Ad. 1) *Belastung des Patienten durch die Gewinnung des Materials:*

Die zu erwartende Belastung des Patienten durch die Gewinnung von Material ist äußerst gering. Sputum sollten die betroffenen Patienten ohnehin täglich zur Infektionsprophylaxe produzieren. Im Normalfall wird das Material verworfen. Die Gewinnung ist folglich ein routinierter Vorgang, der den Patienten nicht belastet. Die Gewinnung von EBC ist eine ebenso wenig belastende Methode zur Gewinnung von Material aus den Atemwegen, allerdings eine zusätzliche, über die Routine hinaus gehende Untersuchung. Dies entspricht der Atmung über ein Mundstück mit dem zeitlichen Aufwand von ca. 10 Minuten. Im Allgemeinen sind die Patienten mit dieser Aktion ebenfalls vertraut, da sie regelmäßig Lungenfunktionstestungen mit identischem Vorgehen durchführen müssen.

Falls der Allgemeinzustand des Patienten, z.B. aufgrund einer akuten Infektion, eines der beiden Verfahren unmöglich macht, oder es für den Patienten eine zu große Belastung darstellen sollte, wird von der Probengewinnung abgesehen werden. Ein Gesundheitsrisiko besteht durch die aufgeführten Verfahren nicht. Auch entsteht kein Nachteil, aber auch kein Nutzen für den Patienten durch die Teilnahme an der Studie gegenüber anderen Patienten.

Ad. 2) siehe 9.

8.2. Nicht- Einwilligungsfähigkeit, Forschung an Minderjährigen

Für Patienten und Probanden unter 18 Jahren wird eine schriftliche Zustimmung der Eltern bzw. der Erziehungsberechtigten nach ausführlicher mündlicher und schriftlicher Beratung eingeholt. Darüber hinaus wird die mündliche und schriftliche Zustimmung der Kinder und Jugendlichen eingeholt. Siehe Blatt zur Patientenin-formation und Einwilligungserklärungen in dreifacher Ausführung mit kindgerechter und elternadressierter Version. Dem Teilnehmer werden die Vorgänge und Untersuchungen mündlich und schriftlich in einer, dem Alter entsprechenden Weise, erklärt.

Aufgrund der geringen Fallzahl von HIES-Patienten muss zur validen Datenbestimmung auf die Untersuchung von Minderjährigen zurückgegriffen werden. Für einen aussagekräftigen Datenvergleich müssen CF-Patienten in gleichem Alter untersucht werden. Das verbundene Risiko und die verbundene Belastung sind für den Teilnehmer und die Familie minimal.

9. Datenschutz

Dem Datenschutz der Studienteilnehmer wird höchste Priorität zugemessen. Vorgesehen ist eine Pseudonymisierung vor Erhebung der Daten. Die gesamte Auswertung der Daten erfolgt ausschließlich pseudonymisiert.

9.1. Begründung für die Pseudonymisierung

In vorangehenden Studien hat sich gezeigt, dass sich im Laufe der Arbeit allgemeine, aber auch personenbezogene Fragen ergeben können, die einen erneuten Kontakt mit den Teilnehmern und ggf. Ergänzung der erhobenen Daten nötig machen. Dies betrifft wissenschaftliche Fragestellungen, die sich erst aus den Ergebnissen der geplanten Untersuchungen ergeben. Es kann aber auch zu inhaltlichen Rückfragen durch Gutachter von eventuell eingereichten wissenschaftlichen Arbeiten zu dieser Untersuchung kommen. So kann auf Wunsch des Gutachters z.B. nach zuvor nicht definierten Subgruppen oder Therapien gesucht und Daten nach bestimmten Gesichtspunkten nachgearbeitet werden. Die Möglichkeit, auf inhaltlich berechnete Fragen einzugehen, ist oftmals Voraussetzung für die Annahme von wissenschaftlichen Veröffentlichungen in Fachzeitschriften. Zudem ist die Wiederherstellung des Bezugs nötig, falls im Nachhinein nach möglichen Confoundern gesucht werden muss. Darüber hinaus sind beide Erkrankungen Inhalt permanenter Forschung, so dass sich anhand neuer Ergebnisse auch relevante Neuerungen bezüglich der eingeschlossenen Probanden ergeben können, die dann in die laufende Studie mit einbezogen werden müssen. Diese Gründe stehen einer irreversiblen Anonymisierung entgegen.

9.2. Vorgehen

a. Erhebung personenbezogener Daten

Es wird nur ein minimaler Datensatz an personenbezogenen Daten erhoben, der es ermöglicht, die Teilnehmer über die Klinik zukünftig ausfindig zu machen und ggf. zu kontaktieren (Name, Geburtsdatum). Hinzu kommen die gewonnenen Daten aus den Untersuchungen, sowie falls nötig, klinische Daten wie bakterielle Besiedelung und medikamentöse Therapie zum Zeitpunkt der Probenentnahme.

b. Pseudonymisierung der Daten

Bei Einschluss in die Studie wird jedem Teilnehmer ein ausreichend verwechslungssicherer Code zugewiesen. Aus dem gewonnenen Material und den Datenerhebungsbögen wird nur dieses Pseudonym verwendet. Der Zugang

zum Verschlüsselungscode ist auf die Projektleiter (Prof. Dr. med. J. Rosenecker und S. Immler), sowie die an der Durchführung unmittelbar beteiligten wissenschaftlichen Mitarbeiter beschränkt. Die Unterlagen werden während der Durchführung der Studie und nach Abschluss der Untersuchungen für weitere zwei Jahre im Laborbüro von der AG Rosenecker/ Rudolph am Dr. von Haunerschen Kinderspital aufbewahrt.

Der Verschlüsselungscode wird vor der Probengewinnung erstellt und zum frühestmöglichen Zeitpunkt nach Gewinnung auf der Materialprobe angebracht. Im Verschlüsselungscode erscheinen keine Initialen, das Geburtsdatum oder sonstige personenbezogene Merkmale. Er setzt sich aus der klinikinternen Labornummer und dem Untersuchungsdatum zusammen. Die Daten werden durch Lagerung auf einem Laborcomputer mit Passwort geschütztem Ordner vor dem Zugriff Unbefugter geschützt.

c. Entschlüsselung

Eine Entschlüsselung (d.h. Wiederherstellung des Personenbezugs) ist ausschließlich dann möglich, wenn:

- sich aus den Ergebnissen der Untersuchungen unmittelbare medizinisch relevante Konsequenzen für Studienteilnehmer ergeben,
- eine Überprüfung der Korrektheit oder Vollständigkeit der Daten erforderlich scheint,
- aus wissenschaftlichen Gründen nachträglich Daten eingegeben und ausgewertet werden müssen.
- die Einverständniserklärung durch den Studienteilnehmer oder seine Erziehungsberechtigten widerrufen wird.

Eine Entschlüsselung zu anderen Zwecken ist ausgeschlossen. Dies gilt auch für Anfragen des Studienteilnehmers bezüglich seiner eigenen Ergebnisse, sei es auf eigene Veranlassung oder auf Veranlassung Dritter. Die Entschlüsselung erfolgt lediglich kurzfristig und fragestellungsbezogen, die Pseudonymisierung wird unmittelbar nach der Klärung der Fragen wieder hergestellt. Alle Studienergebnisse stehen ausschließlich in der Verfügungsgewalt des Studienleiters.

Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten ebenfalls gewährleistet. Die Beachtung des Bundesdatenschutzgesetzes ist in vollem Umfang sichergestellt. Probanden werden über die mögliche Publikation der Ergebnisse unterrichtet. Dies erfolgt nach den Publikationsrichtlinien und erfolgt damit ohne namentliche Nennung der Probanden.

Die genannten Punkte werden in der Patienteninformation laienverständlich erläutert und es wird eine gesonderte datenschutzrechtliche Einverständniserklärung eingeholt.

10. Versicherung

Aufgrund des nicht erhöhten Risikos der Probanden ist ein Versicherungsschutz nicht vorgesehen.

11. Finanzierung

Für die Teilnehmer ist keine Aufwandentschädigung vorgesehen. Die Proben sollen im Rahmen von geplanten ambulanten Untersuchungsterminen oder stationären Aufenthalten stattfinden, so dass kein zusätzlicher zeitlicher oder finanzieller Aufwand für sie entsteht. Die Langzeitbetreuung der Patienten erfolgt durch andere Ärzte, wodurch ein Interessenkonflikt auf beiden Seiten vermieden wird. Ein Abbruch des Projektes wird sich so nicht negativ auf die Arzt-Patienten-Beziehung auswirken. Es besteht kein finanzielles Interesse der Arbeitsgruppe, welches das Ergebnis dieser Studie beeinflussen könnte. Studiendurchführende werden unabhängig vergütet und üben damit keinen Einfluss auf Erfolg oder Misserfolg der Studie aus.

Es wird hiermit bestätigt, dass die Verantwortlichkeit für das Forschungsvorhaben beim Antragsteller verbleibt.

München, den:

Prof. Dr. med. Joseph Rosenecker

27.03.16 S. Johler

i.A. Sarah Johler

Schriftliche Zustimmung der verantwortlichen Leiter:

Die Untersuchungen werden ausschließlich in dem Dr. von Haunerschen Kinderspital des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Die verantwortlichen Leiter des Dr. von Haunerschen Kinderspitals und der Alpenklinik Santa Maria stimmen mit ihrer Unterschrift in Form und Umfang dem Antrag zu der vorliegenden Studie zu.

München, den:

Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. C. Klein

Dr. von Haunersches Kinderspital

Ludwig-Maximilians-Universität München

München, den:

Prof. Dr. med. Joseph Rosenecker

Alpenklinik Santa Maria

27.03.16 S. Jöhler

i.A. Sarah Jöhler

*Zur besseren Lesbarkeit des Textes wurde die männliche Sprachform verwendet. Diese Formulierung lässt keinen Rückschluss auf das Geschlecht der Person zu, beide Geschlechter sind gleichermaßen angesprochen.

Referenzen:

1. Fuchs, H.J., et al., *Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group.* N Engl J Med, 1994. **331**(10): p. 637-42.
2. Sanders, N.N., et al., *Role of magnesium in the failure of rhDNase therapy in patients with cystic fibrosis.* Thorax, 2006. **61**(11): p. 962-8.
3. Rosenecker, J., S. Naundorf, and C. Rudolph, *Airway surface liquid contains endogenous DNase activity which can be activated by exogenous magnesium.* Eur J Med Res, 2009. **14**(7): p. 304-8.
4. Coates, A.L., et al., *Testing of nebulizers for delivering magnesium sulfate to pediatric asthma patients in the emergency department.* Respir Care, 2011. **56**(3): p. 314-8.
5. Mohammed, S. and S. Goodacre, *Intravenous and nebulised magnesium sulphate for acute asthma: systematic review and meta-analysis.* Emerg Med J, 2007. **24**(12): p. 823-30.
6. Zakharkina, T., et al., *Detection of microorganisms in exhaled breath condensate during acute exacerbations of COPD.* Respirology, 2011. **16**(6): p. 932-8.
7. Lindemann, H., B. Tümmler, and G. Dockter, *Mukoviszidose - Zystische Fibrose*, ed. Auflage. 2004.
8. Briesacher, B.A., et al., *Nationwide trends in the medical care costs of privately insured patients with cystic fibrosis (CF), 2001-2007.* Pediatr Pulmonol, 2011. **46**(8): p. 770-6.
9. Helmholtz Zentrum münchen, D.F.f.G.u.U. www.lungeninformationsdienst.de. 2012.
10. Grimbacher, B., et al., *Hyper-IgE syndrome with recurrent infections--an autosomal dominant multisystem disorder.* N Engl J Med, 1999. **340**(9): p. 692-702.
11. Renner, E.D., et al., *STAT3 mutation in the original patient with Job's syndrome.* N Engl J Med, 2007. **357**(16): p. 1667-8.
12. Konstan, M.W., et al., *Clinical use of dornase alpha is associated with a slower rate of FEV1 decline in cystic fibrosis.* Pediatr Pulmonol, 2011. **46**(6): p. 545-53.
13. Konstan, M.W., et al., *Trends in the use of routine therapies in cystic fibrosis: 1995-2005.* Pediatr Pulmonol, 2010. **45**(12): p. 1167-72.
14. Quan, J.M., et al., *A two-year randomized, placebo-controlled trial of dornase alfa in young patients with cystic fibrosis with mild lung function abnormalities.* J Pediatr, 2001. **139**(6): p. 813-20.
15. Konstan, M.W. and F. Ratjen, *Effect of dornase alfa on inflammation and lung function: Potential role in the early treatment of cystic fibrosis.* J Cyst Fibros, 2012. **11**(2): p. 78-83.
16. Gueroult, M., et al., *How cations can assist DNase I in DNA binding and hydrolysis.* PLoS Comput Biol, 2010. **6**(11): p. e1001000.

17. Das, S.K., et al., *Serum magnesium and stable asthma: Is there a link?* Lung India, 2010. **27**(4): p. 205-8.
18. Fothergill, J.L., M.J. Walshaw, and C. Winstanley, *Transmissible strains of Pseudomonas aeruginosa in Cystic Fibrosis lung infections.* Eur Respir J, 2012.
19. Emerson, J., et al., *Pseudomonas aeruginosa and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis.* Pediatr Pulmonol, 2002. **34**(2): p. 91-100.
20. Scheideler, L., et al., *Detection of nonvolatile macromolecules in breath. A possible diagnostic tool?* Am Rev Respir Dis, 1993. **148**(3): p. 778-84.
21. Griese, M., J. Noss, and C. von Bredow, *Protein pattern of exhaled breath condensate and saliva.* Proteomics, 2002. **2**(6): p. 690-6.
22. Schimke, L.F., et al., *Diagnostic approach to the hyper-IgE syndromes: immunologic and clinical key findings to differentiate hyper-IgE syndromes from atopic dermatitis.* J Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(3): p. 611-7 e1.

Literaturverzeichnis

1. **Aleksandrov OV, Dobrynina OV, Sevrunova OA, Ezhova IS, Grigor'ev SP.** (1992): A method for research on pulmonary surfactant in the vapor condensate of exhaled air. *Ter Arkh* 64(10):105-7.
2. **Anonymous.** (2013): Cystic fibrosis foundation patient registry 2012 annual data report. Bethesda, MD, USA. Cystic Fibrosis Foundation.
3. **Antus B, Barta I, Csiszer E, Kelemen K.** (2012): Exhaled breath condensate pH in patients with cystic fibrosis. *Inflamm Res* 61(10):1141-7.
4. **Armstrong DK, Cunningham S, Davies JC, Alton EW.** (2014): Gene therapy in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 99(5):465-8.
5. **Bangel-Ruland N, Tomczak K, Fernández Fernández E, Leier G, Leciejewski B, Rudolph C, Rosenecker J, Weber WM.** (2013): Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mRNA delivery: a novel alternative for cystic fibrosis gene therapy. *J Gene Med* 15(11-12):414-26.
6. **Bikov A, Galffy G, Tamasi L, Lazar Z, Losonczy G, Horvath I.** (2012): Exhaled breath condensate pH is influenced by respiratory droplet dilution. *J Breath Res* 6(4):46002.
7. **Blau H, Linnane B, Carzino R, Tannenbaum EL, Skoric B, Robinson PJ, Robertson C, Ranganathan SC.** (2014): Induced sputum compared to bronchoalveolar lavage in young, non-expectorating cystic fibrosis children. *J Cyst Fibros* 13(1):106-10.
8. **Bodini A, D'Orazio C, Peroni D, Corradi M, Folesani G, Baraldi E, Assael BM, Boner A, Piacentini GL.** (2005): Biomarkers of neutrophilic inflammation in exhaled air of cystic fibrosis children with bacterial airway infections. *Pediatr Pulmonol* 40(6):494-9.
9. **Brennan AL, Geddes DM.** (2002): Cystic fibrosis. *Curr Opin Infect Dis* 15(2):175-82.
10. **Caballero S, Martorell A, Escribano A, Belda J.** (2013): Markers of airway inflammation in the exhaled breath condensate of preschool wheezers. *J Investig Allergol Clin Immunol* 23(1):7-13.
11. **Cabral DA, Loh BA, Speert DP.** (1987): Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* resists nonopsonic phagocytosis by human neutrophils and macrophages. *Pediatr Res* 22(4):429-31.
12. **Carpagnano GE, Lacedonia D, Palladino GP, Logrieco G, Crisetti E, Susca A, Logrieco A, Foschino-Barbaro MP** (2014): *Aspergillus* spp. colonization in exhaled breath condensate of lung cancer patients from Puglia Region of Italy. *BMC Pulm Med* 14:22.
13. **Carraro S, Folesani G, Corradi M, Zanconato S, Gaston B, Baraldi E.** (2005): Acid-base equilibrium in exhaled breath condensate of allergic asth-

- matic children. *Allergy* 60(4):476–81.
14. **Chambers ST, Scott-Thomas A, Epton M.** (2012): Developments in novel breath tests for bacterial and fungal pulmonary infection. *Curr Opin Pulm Med* 18(3):228-32.
 15. **Chérot-Kornobis N, Hulo S, Edmé JL, de Broucker V, Matran R, Sobaszek A.** (2011): Analysis of nitrogen oxides (NO_x) in the exhaled breath condensate (EBC) of subjects with asthma as a complement to exhaled nitric oxide (FeNO) measurements: a cross-sectional study. *BMC Res Notes* 4:202.
 16. **Chikasue K, Kimura M, Ikeda K, Ohnishi T, Kawanishi S, Iio T, Kataoka M, Arao Y.** (2012): Detection of Torque teno virus DNA in exhaled breath by polymerase chain reaction. *Acta Med Okayama* 66(5):387-97.
 17. **Chiappori A, De Ferrari L, Folli C, Mauri P, Riccio AM, Canonica GW.** (2015): Biomarkers and severe asthma: a critical appraisal. *Clin Mol Allergy* 13:20, doi: 10.1186/s12948-015-0027-7.
 18. **Corhay J, Moermans C, Henket M, Nguyen Dang D, Duysinx B, Louis R.** (2014): Increased of exhaled breath condensate neutrophil chemotaxis in acute exacerbation of COPD. *Respir Res* 15:115.
 19. **Costa C, Bucca C, Bergallo M, Solidoro P, Rolla G, Cavallo R.** (2011): Unsuitability of exhaled breath condensate for the detection of Herpesviruses DNA in the respiratory tract. *J Virol Methods* 173(2):384-6.
 20. **Cox CD, Parker J.** (1979): Use of 2-aminoacetophenone production in identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 9(4):479-84.
 21. **Cunningham S, McColm JR, Ho LP, Greening AP, Marshall TG.** (2000): Measurement of inflammatory markers in the breath condensate of children with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 15(5):955-7.
 22. **Darwiche K, Hecker E, Volmerig J, Ewig S.** (2009): Erfolgreiches Risikomanagement bei der flexiblen Bronchoskopie. *Dtsch med Wochenschr* 134(46):2346-50.
 23. **Davies JC, Stern M, Dewar A, Caplen NJ, Munkonge FM, Pitt T, Sorgi F, Huang L, Bush A, Geddes DM, Alton EW.** (1997): CFTR gene transfer reduces the binding of *Pseudomonas aeruginosa* to cystic fibrosis respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16(6):657-63.
 24. **de Bentzmann S, Roger P, Puchelle E** (1996): *Pseudomonas aeruginosa* adherence to remodelling respiratory epithelium. *Eur Respir J* 9(10):2145-50.
 25. **Deeks ED.** (2013): Ivacaftor: a review of its use in patients with cystic fibrosis. *Drugs* 73(14):1595-604.
 26. **de Semir D, Petriz J, Avinyó A, Larriba S, Nunes V, Casals T, Estivill X, Aran JM.** (2002): Non-viral vector-mediated uptake, distribution, and stability of chimeroplasts in human airway epithelial cells. *J Gene Med* 4(3):308-22.
 27. **Döring G, Conway SP, Heijerman HG, Hodson ME, Høiby N, Smyth A,**

- Touw DJ.** (2000): Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J* 16(4):749-67.
28. **Esther CR, Olsen BM, Lin FC, Fine J, Boucher RC.** (2013): Exhaled breath condensate adenosine tracks lung function changes in cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 304(7):L504-9.
29. **Fila L, Chladek J, Maly M, Musil J.** (2013): Nitrites and nitrates in exhaled breath condensate in cystic fibrosis: relation to clinical parameters. *Bratisl Lek Listy* 114(9):503-7.
30. **Formanek W, Inci D, Lauener RP, Wildhaber JH, Frey U, Hall GL.** (2002): Elevated nitrite in breath condensates of children with respiratory disease. *Eur Respir J* 19(3):487-91.
31. **Fuchs HJ, Borowitz DS, Christiansen DH, Morris EM, Nash ML, Ramsey BW, Rosenstein BJ, Smith AL, Wohl ME.** (1994): Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N Engl J Med* 331(10):637-42.
32. **Gessner C, Kuhn H, Toepfer K, Hammerschmidt S, Schauer J, Wirtz H.** (2004): Detection of p53 gene mutations in exhaled breath condensate of non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 43(2):215-22.
33. **Gaudreault E, Gosselin J.** (2008): Leukotriene B4 induces release of antimicrobial peptides in lungs of virally infected mice. *J Immunol* 180(9):6211-21.
34. **Goncharova VA, Mamedov DT, Dotsenko EK.** (1989): Biologically active substance levels in exhaled air from patients with pre-asthma and bronchial asthma. *Sov Med* (5):22-4.
35. **Gilligan PH.** (2014): Infections in Patients with Cystic Fibrosis: diagnostic microbiology update. *Clin Lab Med* 34(2):197-217.
36. **Goddard AF, Staudinger BJ, Dowd SE, Joshi-Datar A, Wolcott RD, Aitken ML, Fligner CL, Singh PK.** (2012): Direct sampling of cystic fibrosis lungs indicates that DNA-based analyses of upper-airway specimens can misrepresent lung microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (34):13769-74.
37. **Goldberg JB, Pier GB.** (2000): The role of the CFTR in susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Trends Microbiol* 8(11):514-20.
38. **Harder J.** (2002): RNase 7, a Novel Innate Immune Defense Antimicrobial Protein of Healthy Human Skin. *J Biol Chem* 277(48):46779-84.
39. **Hector A, Jonas F, Kappler M, Feilcke M, Hartl D, Griese M.** (2010): Novel method to process cystic fibrosis sputum for determination of oxidative state. *Respiration* 80(5):393-400.
40. **Heltshe SL, Mayer-Hamblett N, Burns JL, Khan U, Baines A, Ramsey BW, Rowe SM; GOAL (the G551D Observation-AL) Investigators of the Cystic**

- Fibrosis Foundation Therapeutics Development Network.** (2015): *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients with G551D-CFTR treated with ivacaftor. *Clin Infect Dis.* 60(5):703-12.
41. **HØiby N, Koch C.** (1990): Cystic fibrosis 1. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis and its management. *Thorax* 45(11):881-4.
42. **HØiby N.** (1982): Microbiology of lung infections in cystic fibrosis patients. *Acta Paediatr* 71(s301):33-54.
43. **Horváth I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, Becher G, van Beurden WJ, Corradi M, Dekhuijzen R, Dweik RA, Dwyer T, Effros R, Erzurum S, Gaston B, Gessner C, Greening A, Ho LP, Hohlfeld J, Jöbsis Q, Laskowski D, Loukides S, Marlin D, Montuschi P, Olin AC, Redington AE, Reinhold P, van Rensen EL, Rubinstein I, Silkoff P, Toren K, Vass G, Vogelberg C, Wirtz H; ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate.** (2005): Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 26(3):523-48.
44. **Houspie L, De Coster S, Keyaerts E, Narongsack P, De Roy R, Talboom I, Sisk M, Maes P, Verbeeck J, Van Ranst M.** (2011): Exhaled breath condensate sampling is not a new method for detection of respiratory viruses. *Virol J* 8:98.
45. **Hyde SC, Southern KW, Gileadi U, Fitzjohn EM, Mofford KA, Waddell BE, Gooi HC, Goddard CA, Hannavy K, Smyth SE, Egan JJ, Sorgi FL, Huang L, Cuthbert AW, Evans MJ, Colledge WH, Higgins CF, Webb AK, Gill DR.** (2000): Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 7(13):1156-65.
46. **Jain R, Schriever CA, Danziger LH, Cho SH, Rubinstein I.** (2007): The IS6110 repetitive DNA element of *Mycobacterium tuberculosis* is not detected in exhaled breath condensate of patients with active pulmonary tuberculosis. *Respiration* 74(3):329-33.
47. **Joensen O, Paff T, Haarman EG, Skovgaard IM, Jensen PØ, Bjarnsholt T, Nielsen KG.** (2014): Exhaled breath analysis using electronic nose in cystic fibrosis and primary ciliary dyskinesia patients with chronic pulmonary infections. *PLoS One* 9(12):e115584.
48. **Johnson GR, Morawska L.** (2009): The mechanism of breath aerosol formation. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 22(3):229-37.
49. **Jones AP, Wallis CE.** (2003): Recombinant human deoxyribonuclease for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* (3):CD001127.
50. **Jung A, Kleinau I, Schönian G, Bauernfeind A, Chen C, Griese M, Döring G, Göbel U, Wahn U, Paul K.** (2002): Sequential genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* from upper and lower airways of cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 20(6):1457-63.
51. **Kawada H, Yamazato M, Shinozawa Y, Suzuki K, Otani S, Nemoto I,**

- Miyairi M.** (2008): Exhaled breath-generated aerosols of mycobacterium tuberculosis in patients with active pulmonary tuberculosis during normal breathing. *Kekkaku* 83(4):387-91.
52. **Knight S, Collins M, Takeuchi Y.** (2013): Insertional mutagenesis by retroviral vectors: current concepts and methods of analysis. *Curr Gene Ther* 13(3):211-27.
53. **Koczulla AR, Hattesoil A, Biller H, Hofbauer J, Hohlfeld J, Oeser C, Gessner C, Vogelmeier C, Baumbach JI, Wirtz H, Jörres RA.** (2011): Smelling diseases? A short review on electronic noses. *Pneumologie* 65(7):401-5.
54. **Kolk A, Hoelscher M, Maboko L, Jung J, Kuijper S, Cauchi M, Bessant C, van Beers S, Dutta R, Gibson T, Reither K.** (2010): Electronic-nose technology using sputum samples in diagnosis of patients with tuberculosis. *J Clin Microbiol* 48(11):4235-8.
55. **Kormann MS., Hasenpusch G, Aneja MK, Nica G, Flemmer AW, Herber-Jonat S, Huppmann M, Mays LE, Illenyi M, Schams A, Griese M, Bittmann I, Handgretinger R, Hartl D, Rosenecker J, Rudolph C.** (2011): Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nat Biotechnol* 29(2):154-7.
56. **Kubáň P, Foret F.** (2013): Exhaled breath condensate: Determination of non-volatile compounds and their potential for clinical diagnosis and monitoring. A review. *Anal Chim Acta* 805:1-18.
57. **Kurik MV, Rolik LV, Parkhomenko NV, Tarakhan LI, Savitskaia NV.** (1987): Physical properties of a condensate of exhaled air in chronic bronchitis patients. *Vrach Delo* (7):37-9.
58. **Lima TM, Kazama CM, Koczulla AR, Hiemstra PS, Macchione M, Fernandes AL, Santos Ude P, Bueno-Garcia ML, Zanetta DM, André CD, Saldiva PH, Nakagawa NK.** (2013): pH in exhaled breath condensate and nasal lavage as a biomarker of air pollution-related inflammation in street traffic-controllors and office-workers. *Clinics (Sao Paulo)* 68(12):1488-94.
59. **Liu J, Sandrini A, Thurston MC, Yates DH, Thomas PS.** (2007): Nitric oxide and exhaled breath nitrite/nitrates in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respiration* 74(6):617-23.
60. **Lopes AJ, Mafort TT, de Sá Ferreira A, Santos de Castro MC, Cássia de Firmida M, de Andrade Marques E.** (2012): Is the type of chronic pulmonary infection a determinant of lung function outcomes in adult patients with cystic fibrosis? *Monaldi Arch Chest Dis* 77(3-4):122-8.
61. **Martens H, Törnberg DC, Weitzberg E, Schedin U, Alving K.** (2005): Origin of nitrite and nitrate in nasal and exhaled breath condensate and relation to nitric oxide formation. *Thorax* 60(3):219-25.
62. **Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, Brown KK, Costabel U, du Bois RM, Drent M, Haslam PL, Kim DS, Nagai S, Rottoli P, Saltini C, Selman M,**

- Strange C, Wood B; American Thoracic Society Committee on BAL in Interstitial Lung Disease.** (2012): An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline: The Clinical Utility of Bronchoalveolar Lavage Cellular Analysis in Interstitial Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 185(9):1004-14.
63. **Montuschi P.** (2007): Review: Analysis of exhaled breath condensate in respiratory medicine: methodological aspects and potential clinical applications. *Ther Adv Respir Dis* 1(1):5-23.
64. **Murata K, Fujimoto K, Kitaguchi Y, Horiuchi T, Kubo K, Honda T.** (2014): Hydrogen Peroxide Content and pH of Expired Breath Condensate from Patients with Asthma and COPD. *COPD* 11(1):81-7.
65. **Park C, Raines RT.** (2000): Origin of the 'inactivation' of ribonuclease A at low salt concentration. *FEBS Lett* 468(2-3):199-202.
66. **Pizzichini E, Pizzichini MM, Leigh R, Djukanović R, Sterk PJ.** (2002): Safety of sputum induction. *Eur Respir J Suppl* 37:9s-18s.
67. **Ramsey BW, Wentz KR, Smith AL, Richardson M, Williams-Warren J, Hedges DL, Gibson R, Redding GJ, Lent K, Harris K.** (1991): Predictive Value of Oropharyngeal Cultures for Identifying Lower Airway Bacteria in Cystic Fibrosis Patients. *Am Rev Respir Dis* 144(2):331-7.
68. **Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC.** (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245(4922):1066-73.
69. **Rosenberg HF, Dyer KD.** (1995): Human ribonuclease 4 (RNase 4): coding sequence, chromosomal localization and identification of two distinct transcripts in human somatic tissues. *Nucl Acids Res* 23(21): 4290-5.
70. **Rosenecker J, Harms KH, Bertele RM, Pohl-Koppe A, v Mutius E, Adam D, Nicolai T.** (1996): Adenovirus infection in cystic fibrosis patients: implications for the use of adenoviral vectors for gene transfer. *Infection* 24(1):5-8.
71. **Rosenecker J, Naundorf S, Rudolph C.** (2009): Airway surface liquid contains endogenous DNase activity which can be activated by exogenous magnesium. *Eur J Med Res* 14(7):304-8.
72. **Rozy A, Czerniawska J, Stepniewska A, Woźbińska B, Goljan A, Puścińska E, Górecka D, Chorostowska-Wynimko J.** (2006): Inflammatory markers in the exhaled breath condensate of patients with pulmonary sarcoidosis. *J Physiol Pharmacol* 57 Suppl 4:335-40.
73. **Sahin U, Karikó K, Türeci Ö.** (2014): mRNA-based therapeutics--developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov* 13(10):759-80.
74. **Sanders NN, Franckx H, De Boeck K, Hastraete J, De Smedt SC, Demeester J.** (2006): Role of magnesium in the failure of rhDNase therapy in

- patients with cystic fibrosis. *Thorax* 61(11):962-8.
75. **Sanders N, Rudolph C, Braeckmans K, De Smedt SC, Demeester J.** (2009): Extracellular barriers in respiratory gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 61(2):115-27.
76. **Scott-Thomas AJ, Syhre M, Pattemore PK, Epton M, Laing R, Pearson J, Chambers ST.** (2010): 2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *BMC Pulm Med* 10:56. doi: 10.1186/1471-2466-10-56.
77. **Sens B., Stern M.** (2013): *Berichtsband Qualitätssicherung Mukoviszidose 2012, Zentrum für Qualität und Management im Gesundheitswesen, Köllen Druck + Verlag GmbH, ISBN: 978-3-88579-906-1.*
78. **Sidorenko GI, Zborovskii EI, Levina DI.** (1980): [Surface-active properties of the exhaled air condensate (a new method of studying lung function)]. *Ter Arkh* 52(3):65-8.
79. **Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ.** (2004): PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 42(5):2074-9.
80. **St George K, Fuschino ME, Mokhiber K, Triner W, Spivack SD.** (2010): Exhaled breath condensate appears to be an unsuitable specimen type for the detection of influenza viruses with nucleic acid-based methods. *J Virol Methods* 163(1):144-6.
81. **Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV.** (2000): Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406(6799):959-64.
82. **Tasliyurt T, Yelken BM, Sahin S, Kutluturk F, Koseoglu HI, Ozturk B, Yilmaz A, Sahin S.** (2014): Evaluation of oxidative stress using exhaled breath 8-isoprostane levels on chronic kidney disease. *Niger J Clin Pract* 17(3):356-60.
83. **Tate S, Elborn S.** (2005): Progress towards gene therapy for cystic fibrosis. *Expert Opin Drug Deliv* 2(2):269-80.
84. **Thomas PS, Lowe AJ, Samarasinghe P, Lodge CJ, Huang Y, Abramson MJ, Dharmage SC, Jaffe A.** (2013): Exhaled breath condensate in pediatric asthma: Promising new advance or pouring cold water on a lot of hot air? A systematic review. *Pediatr. Pulmonol* 48(5):419-42.
85. **Valerius NH, Koch C, Høiby N.** (1991): Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis by early treatment. *Lancet* 338(8769):725-6.
86. **Van de Weert-van Leeuwen PB, Van Meegen MA, Speirs JJ, Pals DJ,**

- Rooijackers SH, Van der Ent CK, Terheggen-Lagro SW, Arets HG, Beekman JM.** (2013): Optimal Complement-Mediated Phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by Monocytes Is Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Dependent. *Am J Respir Cell Mol Biol* 49(3):463-70.
87. **Vogelberg C, Hirsch T, Rösen-Wolff A, Kerkmann ML, Leupold W.** (2003): *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* cannot be detected by PCR in the breath condensate of patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 36(4):348-52.
88. **Vogelberg C, Würfel C, Knoetzsch A, Kahlert A, Range U, Leupold W.** (2007): Exhaled breath condensate pH in infants and children with acute and recurrent wheezy bronchitis. *Pediatr Pulmonol* 42(12):1166-72.
89. **Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, Cipolli M, Colombo C, Davies JC, De Boeck K, Flume PA, Konstan MW, McColley SA, McCoy K, McKone EF, Munck A, Ratjen F, Rowe SM, Waltz D, Boyle MP; TRAFFIC Study Group; TRANSPORT Study Group.** (2015): Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med* 373(3):220-31.
90. **Weissman D, Karikó K.** (2015): mRNA: Fulfilling the Promise of Gene Therapy. *Mol Ther* 23(9):1416-7.
91. **Wilson WC, Swetland JF, Benumof JL, Laborde P, Taylor R.** (1992): General anesthesia and exhaled breath hydrogen peroxide. *Anesthesiology* 76(5):703-10.
92. **Woese CR.** (1987): Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51(2):221-71.
93. **Yamamoto A, Kormann M, Rosenecker J, Rudolph C.** (2009): Current prospects for mRNA gene delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 71(3):484-9.
94. **Zakharkina T, Koczulla AR, Mardanov O, Hattesoehl A, Bals R.** (2011): Detection of microorganisms in exhaled breath condensate during acute exacerbations of COPD. *Respirology* 16 (6):932-8.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Joseph Rosenecker für die Überlassung des Themas und die gute Unterstützung beim Fortgang der Arbeit. Sein stets offenes Ohr und anhaltendes Interesse bei meinen Untersuchungen haben einen maßgeblichen Beitrag zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen. Seine Förderung als Mentor in meiner medizinischen Laufbahn ist von unschätzbarem Wert. Danke!

Herrn Dr. Kai Michaelis danke ich für die Einarbeitung in das Labor und die Betreuung und Unterstützung zu Beginn dieser Arbeit sowie der Bereitstellung von notwendigen Materialien.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei PD Dr. Matthias Kappler und Prof. Dr. Matthias Griese für die Ermöglichung der Gewinnung von Sputumproben im klinischen Alltag der Christiane-Herzog-Ambulanz des Dr. von Haunerschen Kinderspiitals sowie Frau Csilla Benus für die Aufbereitung eines Teiles dieser Proben.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. Rainald Fischer und Schwester Maria, welche mir die Sammlung von EBC-Proben in der Mukoviszidoseambulanz erlaubten.

Auch möchte ich allen, die sich als Probanden zur Verfügung gestellt haben, danken. Ohne sie wäre die Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich bedanke mich außerdem bei allen Mitarbeitern des Kubus Forschungszentrums und insbesondere bei der Arbeitsgruppe „Molekulare Pneumologie“, die dazu beigetragen haben, dass ich dieses Thema mit Vergnügen bearbeiten konnte.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Sarah Johler, die zum Ende meiner Experimente zur Arbeitsgruppe hinzustieß. Sie stand mit ihrer offenen Art und vielen amüsanten, aber auch fachlichen Gesprächen stets an meiner Seite.

Großer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester Mona. Durch ihre Unterstützung in allen Lebenslagen und ihr besonderes Interesse am Fortkommen meiner Arbeit ist sowohl meine Ausbildung als auch meine Dissertation erst möglich geworden. Diese Doktorarbeit sei ihnen gewidmet.

Meinen Freunden möchte ich für ihre Unterstützung und Ermutigung sowohl während des Studiums als auch darüber hinaus danken.

Eidesstattliche Versicherung

Wenzel Lisa

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Detektion bakterieller Nukleinsäuren im Atemkondensat
am Beispiel von Pseudomonas aeruginosa bei CF-Patienten**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Murnau, 21.01.2017

Ort, Datum

Lisa Wenzel

Unterschrift Doktorandin/Doktorand