

Medizinische Fakultät der Universität Rostock  
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin  
Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten

**Nachweis von *Pneumocystis jirovecii* in paraffinisierten Lungenbioptaten  
mittels Polymerase-Ketten-Reaktion**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

Vorgelegt 2008  
von Anne-Kathrin Munk-Hartig  
geboren in Stade

urn:nbn:de:gbv:28-diss2010-0008-1

**Tag der Verteidigung:** 16.12.2009

- Dekan:** Herr Prof. Dr. med. E. C. Reisinger
- 1. Gutachter:** Herr Prof. Dr. med. E. C. Reisinger, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten, Postfach 100888, 18055 Rostock
- 2. Gutachter:** Herr Prof. Dr. med. H. Nizze, Institut für Pathologie, Postfach 100888, 18055 Rostock
- 3. Gutachter:** Herr Prof. Dr. med. Th. Weinke, Klinikum Ernst von Bergmann, Abteilung Gastroenterologie, Pneumologie und Infektiologie, Charlottenstr. 72, 14467 Potsdam

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	S. 1
1.1 Geschichte	S. 1
1.2 Bedeutung und Stellenwert	S. 2
1.3 Lebenszyklus	S. 4
1.4 Prophylaxe	S. 5
1.5 Therapie	S. 6
1.6 Bildgebende Diagnostik bei einer PCP	S. 11
1.7 Labordiagnostische Nachweismethoden von <i>Pneumocystis jirovecii</i>	S. 11
1.8 Grundlagen der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	S. 13
1.9 Besonderheiten der nested PCR	S. 17
1.10 Die quantitative PCR	S. 17
1.11 PCR-Methoden zum Nachweis von <i>P. jirovecii</i>	S. 19
2. Fragestellungen und Hypothesen	S. 26
3. Material und Methoden	S. 28
3.1 Geräte und Chemikalien	S. 28
3.2 Software	S. 30
3.3 Entparaffinierung	S. 31
3.4 DNA-Isolierung	S. 31
3.5 mtLSU nested PCR	S. 32
3.6 Agarose-Gel-Elektrophorese	S. 33
3.7 DHPS nested PCR	S. 34
3.8 DNA Reinigung, Messung des DNA-Gehaltes und der Reinheit, Vorbereitung zur Sequenzierung	S. 36
3.9 Auswertung der DNA-Sequenzierung	S. 37
3.10 Maßnahmen zur Vermeidung einer Kontamination	S. 38
4. Ergebnisse	S. 40
4.1 Ergebnisse der mtLSU nPCR	S. 40
4.2 Ergebnisse der DHPS nPCR	S. 49

4.3 Auswertung der Labordaten	S. 51
5. Diskussion	S. 54
5.1 Sensitivität der PCR	S. 54
5.2 <i>Pneumocystis</i> -Nachweis in paraffin-fixierten Gewebeschnitten	S. 55
5.3 Pulmonale Verteilung von <i>P. jirovecii</i>	S. 57
5.4 Reinfektion oder Reaktivierung einer Infektion im Organismus	S. 59
5.5 Mögliche Zusammenhänge zwischen einer <i>P. jirovecii</i> Infektion und einem Karzinom	S. 62
5.6 Sequenzierung der DNA und Mutationen auf dem mtLSU rRNA Gen	S. 64
5.7 Mutationen auf dem DHPS Gen	S. 66
5.8 Möglichkeiten einer quantitativen PCR	S. 68
5.9 Evaluation der Labordaten	S. 70
5.10 Schlussfolgerung	S. 74
6. Zusammenfassung	S. 76
7. Literaturverzeichnis	S. 79

## Anhang

- Benötigte Puffer und Lösungen
- Verzeichnis der Abbildungen
- Verzeichnis der Tabellen
- Verzeichnis der Abkürzungen

## Thesen

- Danksagung
- Eidesstattliche Erklärung
- Lebenslauf

## **1. Einleitung**

### **1.1 Geschichte**

*Pneumocystis* sp. wurde 1909 von Carlos Chagas in Meerschweinchen und anschließend von Carini in Rattenlungen entdeckt und zunächst als Entwicklungsstufe des Protozoons *Trypanosoma* sp. beschrieben (Chagas 1909, Huang 2006). Im Jahre 1912 wurde er durch Delanoe und Delanoe als eigenständiger Organismus definiert (Delanoe 1912) und als Protozoon klassifiziert. Besondere Bedeutung erlangte *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*) im zweiten Weltkrieg, als viele unterernährte Soldaten an Pneumonien erkrankten. Diese wurden mit dem Erreger in Verbindung gebracht. Nach Kriegsende war die Anzahl an *Pneumocystis* Pneumonien (PCP) deutlich rückläufig. Bereits 1950 fand man heraus, dass Pentamidine und andere Medikamente, die zur Behandlung der Trypanosomiasis verwendet wurden, die Letalität der PCP deutlich senkten (Hanano 1998). Epidemiologische Daten zeigten, dass die Zahl der Erkrankungen bei Patienten mit malignen Geschehen relativ konstant blieb (Riebold 2003/2004).

Bereits 1952 und 1953 wurde eine Zugehörigkeit zu den Pilzen vermutet (Vanek und Jirovec 1952). Genomanalysen der rRNA und anderer Gene sowie morphologische Kriterien konnten diese nahe Verwandtschaft zunächst bestätigen (Hanano 1998). Derzeit wird der Organismus den Ascomyceten zugeordnet (Edman 1988). Selbst diese Zuordnung kann nicht als endgültig angesehen werden, da *Pneumocystis* sowohl Eigenschaften von Pilzen als auch Protozoen aufweist. Die Erkenntnisse betreffend Lebenszyklus, Proteinstruktur und Genomanalysen werden stetig ergänzt. Neuere Forschungsergebnisse postulieren eine eventuelle Zugehörigkeit zu den Pflanzen. Seit 1999 existiert das „*Pneumocystis* Genome Project“ (<http://Pneumocystis.uc.edu>) (Riebold 2003/2004). Mit der Entschlüsselung des *Pneumocystis* Genoms mag die endgültige Verwandtschaft des Organismus geklärt werden. Das *Pneumocystis* Genom der Ratte besitzt eine ungefähre Größe von 7,7 Megabasen (Mb) und setzt sich aus 13 bis 15 Chromosomen von jeweils 300 bis 700 Kilobasen (kb) Länge zusammen. Die meisten bereits identifizierten Gene besitzen mehrere kurze Introns (Huang 2006).

*Pneumocystis* sp. lässt sich nicht nur im Menschen sondern auch bei vielen Tieren nachweisen. Im Jahre 2002 bekam die *Pneumocystis* Subspezies des Menschen den Namen *Pneumocystis jirovecii*, um die humanpathogene von den tierpathogenen *Pneumocystis* sp. zu differenzieren (Stringer 2002). Dieser Name wurde zu Ehren des tschechischen Parasitologen Otto Jirovec, der diesen Organismus im Menschen beschrieb, vergeben. Andere tierpathogene *Pneumocystis* Subspezies werden mit dem lateinischen Artennamen ergänzt und somit als eigene Subspezies gekennzeichnet. Eine solche Differenzierung ist aufgrund der Unterschiede der *Pneumocystis* DNA bei den einzelnen Wirtstieren erforderlich. Studien haben gezeigt, dass *Pneumocystis* spezies-spezifisch ist. *Pneumocystis* Organismen wurden beispielsweise von einer Ratte in eine Maus übertragen. Daraufhin zeigte sich keine Vermehrung des Organismus und das infizierte Tier erkrankte nicht (Aliouat 1994). Eine Übertragung von *P. jirovecii* in Ratten zeigte ebenfalls eine Speziesspezifität (Atzori 1999). Andere Studien dagegen zeigen, dass eine Entwicklung des *P. jirovecii* in SCID Mäusen möglich ist (Sethi 1992). Eine vorübergehende Kolonisierung von immunsupprimierten Eulenaffen (*Aotus nancymai*) mit *P. jirovecii* wurde ebenfalls beschrieben (Beard 1999). Zum jetzigen Zeitpunkt geht man davon aus, dass es sich bei *Pneumocystis carinii* um eine heterogene Gruppe genetisch isolierter Populationen handelt, die sich unabhängig voneinander genetisch und funktionell an die jeweils zugehörige Spezies adaptiert haben (Demanche 2001).

## 1.2 Bedeutung und Stellenwert

Dem Erreger *P. jirovecii* kommt weltweit eine große Bedeutung als Auslöser der PCP hauptsächlich bei immunsupprimierten Patienten zu. Klassische Symptome einer PCP sind Fieber, Husten und Dyspnoe bei körperlicher Anstrengung (Huang 2006). Bis zum heutigen Zeitpunkt ist die PCP die häufigste opportunistische Infektion bei HIV-infizierten Patienten in Westeuropa (Serraino 2003) sowie den Vereinigten Staaten, obwohl sich die Anzahl der PCP-Fälle bei HIV-infizierten Patienten um 3,4% pro Jahr von 1992 bis 1995 und 21,5% pro Jahr von 1996 bis 1998 reduzierte (Morris 2004, Jones 1999). Ursachen für den Rückgang der PCP-Inzidenz liegen in der zunehmenden Verbreitung von HAART (highly active antiretroviral therapy) bei HIV und einer *Pneumocystis* Prophylaxe sowie Therapie mit Trimethoprim-

Sulfamethoxazol. Die Versagerquote der Therapie und Prophylaxe bei Patienten mit AIDS reicht von 1% bis 30% pro Jahr (Riebold 2006). Die Mortalität einer PCP bei Patienten mit AIDS liegt bei 21,5% (Azoulay 1999). Es wurden sieben Faktoren identifiziert, die bei einem PCP erkrankten AIDS Patienten die Mortalität innerhalb von 90 Tagen erhöhen. Dazu gehören ein  $pO_2 < 60$  mmHg (bei Ventilation in Raumluft), eine Laktatdehydrogenase  $> 1000$  IU/l, Albumin  $< 30$  g/l, neutrophile Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage  $> 10\%$ , eine nosokomiale Infektion, ein Pneumothorax und die Notwendigkeit einer mechanischen Ventilation (Azoulay 1999).

*P. jirovecii* verursacht in 10% der Herz-, Nieren- und Lebertransplantierten Patienten eine PCP in den ersten sechs Monaten nach erfolgter Transplantation (Patel 1997). In den USA erkranken 5% bis 25% der transplantierten Patienten und 1% bis 25% der Patienten mit einem malignen Geschehen an einer PCP (Morris 2004). Die PCP tritt mit einer höheren Inzidenz bei transplantierten Kindern als bei transplantierten Erwachsenen auf (Patel 1997). In seltenen Fällen verursacht *P. jirovecii* eine Pneumonie in Patienten ohne Immunsuppression (Vargas 2001, Riebold 2005).

Untersuchungen weisen darauf hin, dass ein Erstkontakt zwischen dem *Pneumocystis* Organismus und dem Menschen sehr häufig ist. Mehr als 90% der gesunden Kinder sind davon in den ersten zwei Jahren ihres Lebens betroffen (Chabé, Vargas 2004). Diese primäre Infektion führt in den seltensten Fällen zu einer *Pneumocystis* Pneumonie. Lediglich eine Besiedelung mit dem Organismus scheint bei Kindern stattzufinden. Mit dem Alter nimmt der Nachweis von *Pneumocystis* Antikörpern stetig zu. HIV-infizierte Säuglinge, die an einer PCP erkrankt sind, lassen darauf schließen, dass bereits frühzeitig ein Kontakt zwischen dem Organismus und dem Menschen vorhanden ist (Simonds 1993). Eine Besiedelung mit *P. jirovecii* ließ sich auch bei Kindern nachweisen, die am plötzlichen Kindstod verstorben sind (Vargas 1999). Die Übertragung der *Pneumocystis* Spezies erfolgt über die Luft und kann so zu nosokomialen PCP Fällen führen. Besonders gefährdet sind dabei immunsupprimierte Patienten (Chabé, Die-Cas 2004, Rabodonirina 2004). Bisher konnte kein anderes Reservoir als der Mensch für *P. jirovecii* gefunden werden. Zwar ließ sich der Organismus in Proben aus Teichwasser (Casanova-Cardiel 1997) und Luftproben (Wakefield 1996) nachweisen, die Anzahl an *P. jirovecii* Organismen in

der Umgebung gilt jedoch als sehr gering und ist vermutlich durch den Menschen selbst verursacht. Möglicherweise sind kleine Kinder ein Reservoir für *P. jirovecii* Infektionen in der Gesellschaft (Stringer 2002).

### 1.3 Lebenszyklus

Die Vermehrung der *Pneumocystis* Spezies findet nach heutigem Kenntnisstand fast ausschließlich in den Alveolen der Lunge statt (Hanano 1998), jedoch sind auch Fälle extrapulmonaler Pneumocystosen bekannt. Trophoziten, die als vegetative Form angesehen werden und 2 bis 8 µm groß sind, binden an Pneumozyten Typ 1 (Abb. 1). Dabei findet eine Interaktion zwischen polypeptischen Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche des Organismus und extrazellulären Matrixproteinen wie Fibronectin, Vitronectin und Laminin statt. Die dann folgende Exsudation eines honigwabenartigen Materials in die Alveolen ist charakteristisch für *Pneumocystis* Organismen (Hanano 1998). Eine massenhafte Vermehrung findet während des Vorganges der „binären Fission“ statt, bei der sich die initial haploiden Trophoziten teilen. Durch Fusion zweier haploider Trophoziten (reife Gameten) kommt es zur Zygogenbildung, die zu diploiden Trophoziten heranwachsen. Zusätzlich können sich sowohl die haploiden als auch die diploiden Trophoziten ungeschlechtlich durch Endogonie vermehren. Darunter versteht man eine innere Zerteilung in mehrere Einzelorganismen und die anschließende Freisetzung durch die geöffnete Außenhülle. Die diploiden Trophoziten vergrößern sich und entwickeln sich zu Präzysten, deren Größe zwischen 4 bis 7 µm liegt. Diese besitzen eine verdickte Zellmembran, die sich mikroskopisch mittels Grocott-Färbung nachweisen lässt. Während des folgenden Vorganges, der als Sporogonie bezeichnet wird, entwickeln sich die Präzysten nach Durchlaufen einer Meiose gefolgt von einer Mitose zu ausgereiften Zysten, die jeweils acht voneinander abgrenzbare, haploide Zellkerne enthalten. Diese 1 bis 2 µm großen Zellkerne bezeichnet man als Sporoziten. Sie lassen sich mittels einer modifizierten Giemsa-Färbung mikroskopisch darstellen. Die ausgereiften Zysten geben nach Sprengung der Zystenwand die Sporoziten frei, die als haploide Trophoziten den Zyklus von neuem beginnen. Sowohl die Zysten als auch die Trophoziten sind keine intrazellulären Krankheitserreger, obwohl man sie in Phagolysosomen der Makrophagen im Rahmen der Immunabwehr nachweisen kann (Dietrich 1989, Watts 1997).

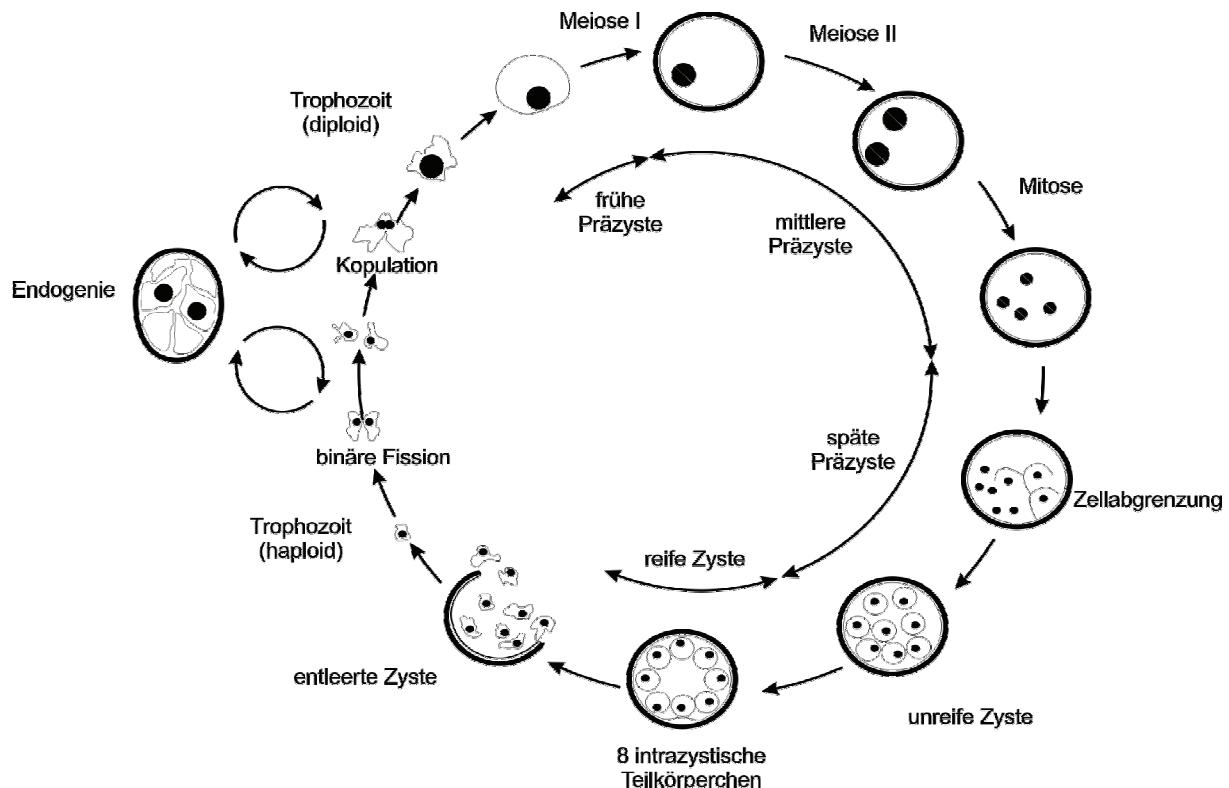


Abb. 1. Lebenszyklus von *Pneumocystis*

## 1.4 Prophylaxe

Eine PCP-Prophylaxe wird bei stark gefährdeten, immunsupprimierten Patienten durchgeführt. Dabei unterscheidet man zwischen einer primären und einer sekundären Prophylaxe. Letztere wird nach erfolgreich therapiertem *Pneumocystis* Pneumonie durchgeführt, um Rezidive zu vermeiden.

Die primäre Prophylaxe erfolgt bei HIV-infizierten Patienten, wenn die CD<sub>4</sub>-Zellzahl unter 200 Zellen/ $\mu$ l sinkt. Nach erfolgreicher Stabilisierung des Immunsystems mit CD<sub>4</sub>-Zellzahlen über 300 Zellen/ $\mu$ l über drei Monate kann die Prophylaxe beendet werden (Brodt 2000, Koletar 2001, Ledergerber 2001, Trikalinos 2001). Eine andauernde Immunsuppression, wie sie z.B. nach einer Organtransplantation medikamentös hervorgerufen wird, ist ebenfalls ein Kriterium für den Beginn einer Prophylaxe. In einer Studie konnte dabei gezeigt werden, dass Patienten unter immunsuppressiver Therapie mit einer CD<sub>4</sub>-Zellzahl unter 200 Zellen/ $\mu$ l an einer PCP erkrankt sind (Glück 2000). Das Risiko an einer PCP zu erkranken, scheint daher allgemein ab einer CD<sub>4</sub>-Zellzahl unter 200 Zellen/ $\mu$ l erhöht zu sein.

Die Prophylaxe erfolgt mit Co-trimoxazol (Trimethoprim-Sulfamethoxazol), welches oral dreimal pro Woche in einer Dosis von 960 mg eingenommen wird. Bei Kindern konnte bei deutlich geringeren Co-trimoxazol-Dosen als der vom Centers for Disease Control (CDC) empfohlenen Dosis von  $150 \text{ mg/m}^2$  Körperoberfläche eine gute Wirksamkeit nachgewiesen werden. Die Dosierung wurde in dieser Untersuchung nicht wie bisher an die Körperoberfläche ( $\text{m}^2$ ) sondern an das Gewicht des Kindes angepasst und lag bei 67% der Kinder zu zwei Dritteln unter oder an der empfohlenen Dosis (Fisher 2001). Andere Ergebnisse konnten zeigen, dass eine initiale orale Dosierung von 20 mg/kg und eine nach 6 Stunden folgende Dosierung von 5 mg/kg oder 10 mg/kg zur Prophylaxe bei Kindern mit einer stabilen HIV-Infektion ausreichend ist (Zar 2006). Zur Prophylaxe kann außerdem Dapson mit einer Dosierung von 100 mg zweimal pro Woche verwendet werden. Die Häufigkeit einer PCP und der Nebenwirkungen konnten deutlich verringert werden (Cruciani 1996). Eine randomisierte Studie zeigte eine vergleichbare Anzahl an PCP-Episoden unter einer Prophylaxe mit Atovaquon 1500 mg/Tag oder Dapson 100 mg/Tag und einer Prophylaxe mit Co-trimoxazol (El-Sadr 1998). Eine Prophylaxe mittels Pentamidin-Inhalation, die z.B. alle zwei bis drei Wochen mit 200 mg erfolgt, wird aufgrund einer im Vergleich erhöhten Anzahl an PCP-Fällen nicht mehr empfohlen. In einer Studie mit Patienten nach einer Knochenmarktransplantation lag die Versagerquote bei 9,1% im Vergleich zu 0% bei einer Prophylaxe mit Co-trimoxazol (Vasconcelles 2000).

## 1.5 Therapie

Die Therapie der *Pneumocystis* Pneumonie (PCP) richtet sich nach dem Schweregrad der Entzündung. Dafür wird eine Unterteilung in drei Schweregrade vorgenommen (Brodt 2000), denen eine spezifische Therapie der Wahl zukommt. Die leichte *Pneumocystis* Pneumonie (1. Schweregrad) ist charakterisiert durch einen  $\text{pO}_2 \geq 70 \text{ mm Hg}$ , eine Vitalkapazität von mindestens 50 % des Normalwertes und eine Atemfrequenz unter 22/min. Außerdem sind im Röntgenbild Infiltrationen sichtbar, die auf wenige Lungensegmente begrenzt sind. Bei der mittelschweren PCP (2. Schweregrad) liegt der  $\text{pO}_2$  zwischen 70 mm Hg und 55 mm Hg. Eine schwere PCP (3. Schweregrad) liegt bei einem  $\text{pO}_2$  unter 55 mm Hg vor.

Verschiedene Medikamente sind zur Therapie der PCP einsetzbar. Als Mittel der ersten Wahl gilt Co-trimoxazol, das sich aus den beiden Einzelsubstanzen Sulfamethoxazol und Trimethoprim zusammensetzt.

Sulfamethoxazol gehört zu den Sulfonamiden. Seine Wirkung beruht auf der engen chemischen Verwandtschaft mit p-Aminobenzoësäure, die von vielen Bakterien benötigt und durch die Dihydropteroatsynthase (DHPS) in das Molekül der Dihydrofolsäure eingebaut wird. Bei einer Therapie mit Co-trimoxazol werden die Reaktionsorte der DHPS aufgrund der engen chemischen Verwandtschaft nicht mit p-Aminobenzoësäure sondern mit Sulfonamiden besetzt. Folglich unterbleibt die Synthese von Dihydropteroat und im folgenden Schritt der Dihydrofolsäure, die normalerweise für die Synthese der Tetrahydrofolsäure erforderlich ist (Abb. 2). Durch den Mangel an Tetrahydrofolsäure kommt es zu einer verminderten Bildung von Purinen und Thymidin, die essentiell für die Bildung der DNA und RNA sind. Dieser bakteriostatische Effekt trifft ein breites Spektrum an Erregern. Bakterien, die keine Folsäure-Synthese betreiben, sind resistent gegen dieses Chemotherapeutikum. Von tierischen und menschlichen Zellen wird Folsäure nicht synthetisiert und stellt deshalb ein substitutionsbedürftiges Vitamin dar. Sulfamethoxazol ist ein mittellang wirksames Sulfonamid mit einer Halbwertszeit von elf Stunden. Sulfonamide werden vollständig durch die Nieren eliminiert. Teilweise werden sie unverändert und teilweise als Metabolite ausgeschieden. Neben der Filtration werden sie auch durch eine aktive tubuläre Sekretion eliminiert. Als Nebenwirkungen sind Nierenschäden, Überempfindlichkeitsreaktionen wie Leukopenie, Thrombozytopenie, Anämie, Serumkrankheit, Fieber und Hautreaktionen bis zur lebensbedrohlichen Dermatitis exfoliativa, Arzneimittelinterferenzen mit z.B. Sulfonylharnstoffen und Cumarin-Derivaten sowie ein Kernikterus beschrieben (Lüllmann 1999, Karow 2004). Sulfonamide sind kontraindiziert bei schwerer Nieren- oder Leberinsuffizienz, akuter Porphyrie, Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase Mangel, Sulfonamidallergie, in der Gravidität und Stillperiode sowie bei Früh- und Neugeborenen.

Trimethoprim, der zweite Bestandteil des Co-trimoxazols, gehört zu den 2,4-Diaminopyrimidin-Derivaten und ist einen Hemmstoff der Dihydrofolatreduktase (DHFR), welche die Dihydrofolsäure zur Tetrahydrofolsäure reduziert (Abb. 2). Die

gehemmte Tetrahydrofolsäure-Bildung führt zu den gleichen, bereits beschriebenen antibakteriellen Wirkungen wie sie durch die Sulfonamide hervorgerufen werden. Auch im menschlichen Organismus findet sich die lebensnotwendige Dihydrofolatreduktase. Das bakterielle Enzym besitzt jedoch eine wesentlich höhere Empfindlichkeit gegen diese Hemmstoffe im Vergleich zum menschlichen Enzym. Trimethoprim wird überwiegend renal, teilweise in Form von Metaboliten ausgeschieden. Die Eliminationshalbwertszeit liegt bei zehn bis zwölf Stunden. Als Nebenwirkungen sind gelegentlich Magen-Darm-Störungen, juckende Exantheme und Störungen der Blutzellbildung im Knochenmark beschrieben (Lüllmann 1999, Karow 2004).

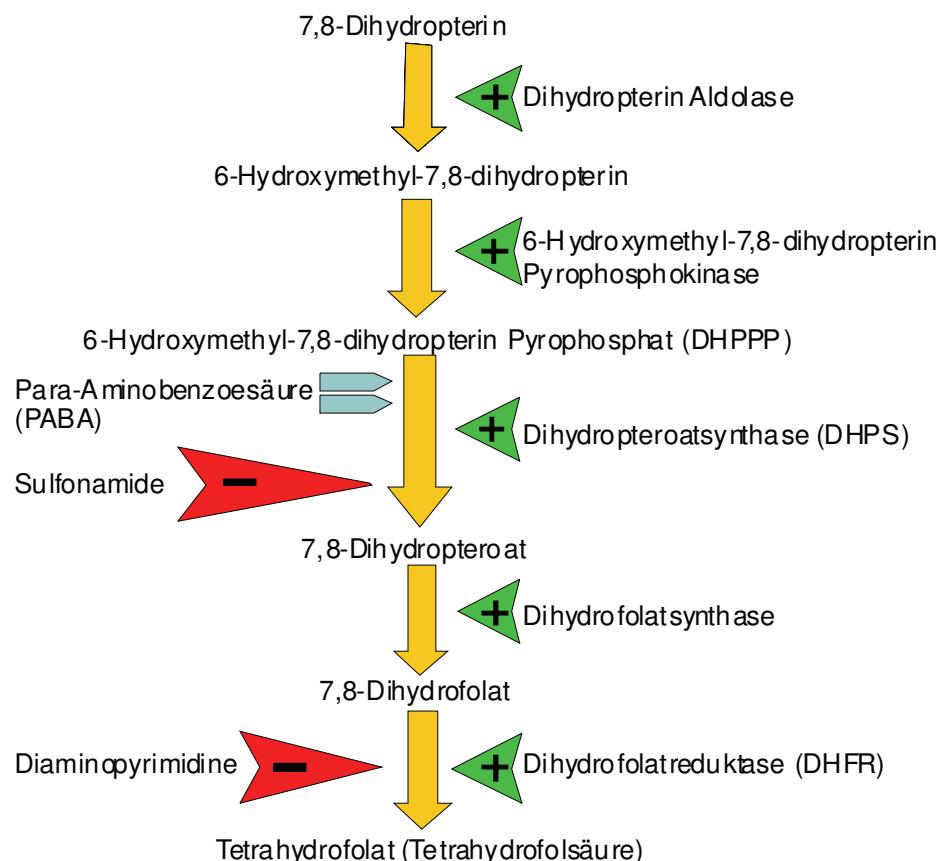


Abb. 2. Folsäuresynthese

Die beiden genannten Substanzen werden üblicherweise in einer fixen Kombination verabreicht, wodurch eine hintereinandergeschaltete Hemmung der Tetrahydrofolsäure-Synthese (Sequentialeffekt) möglich ist. Die sequentielle Hemmung ist wirksamer als eine isolierte Hemmung. Die beiden Einzelkomponenten besitzen jeweils bakteriostatische Eigenschaften, wogegen die Kombination

bakterizid wirksam ist. Außerdem wird die Resistenzentwicklung erschwert. Ältere Studien haben postuliert, dass das Trimethoprim in Kombinationspräparaten kaum im Rahmen der Resistenzentwicklung einen Einfluß hat (Kazanjian 1998, Walzer 1992). Neuere Daten zeigen, dass Resistenzmutationen relativ häufig nachweisbar sind und eine Funktion bei der Resistenzbildung vermutet werden muss (Nahimana 2004). Folglich muss dessen Bedeutung neu diskutiert werden. Eine generelle fungizide Wirkung wurde beim Co-trimoxazol bisher nicht beschrieben. Die Verwendung in der Prophylaxe und Therapie gegen *P. jirovecii* beruht eher darauf, dass die für bakterielle Infektionen entwickelte Substanz zum damaligen Zeitpunkt verfügbar war und die Wirksamkeit bei Infektionen von Tier und Mensch gezeigt werden konnte (Ma 1999). Bei dem zur Therapie der PCP verwendeten Co-trimoxazol sind die gleichen Nebenwirkungen wie die der Einzelsubstanzen beschrieben worden. Bei stationären Patienten sind Fälle von Hyperkaliämien berichtet worden (Lüllmann 1999). Die Kontraindikationen entsprechen denen der Einzelsubstanzen. Co-trimoxazol darf nicht in Kombination mit Hemmstoffen der Dihydrofolatreduktase, wie z.B. Methotrexat, verwendet werden (Lüllmann 1999, Karow 2004).

Weitere Reservemedikamente sind Clindamycin, Atovaquon und Primaquin, die eine höhere Versagerquote und Rezidivrate als die bereits genannten Medikamente aufweisen. Die Kombination von Clindamycin mit einer Dosis von viermal 600-900 mg/Tag und Primaquin mit einer Dosis von 15-30 mg/Tag zeigt eine Heilungsrate von 75% bei Patienten, die unter einer vorangegangenen Therapie mit einer konventionellen Medikation gegen eine PCP erfolglos therapiert worden sind (Smego 2001). Diese Kombination oder die gleichzeitige Gabe von Clindamycin und Primaquin sollten alternativ beim Versagen der Therapie der ersten Wahl verwendet werden (Gonzalez-Garcia 1998). Atovaquon sollte aufgrund der mangelnden antibakteriellen Wirksamkeit nur in Kombination mit anderen Substanzen verwendet werden. Trotz einer guten Verträglichkeit ist es nach oraler Gabe von dreimal 750 mg/Tag schlechter wirksam als Co-trimoxazol, was durch die mangelnde Resorption der Substanz begründet wird (Hughes 1993, Toma 1993). Die Versagerquote des Atovaquons lag in einer Studie bei 20% im Vergleich zu einer Quote von 7% bei der Verwendung des Co-trimoxazols. Die Verträglichkeit dieser Substanz gegenüber Co-trimoxazol ist jedoch deutlich höher (Hughes 1993). Die gleichzeitige Aufnahme von Atovaquon mit einer nach Möglichkeit fettreichen Mahlzeit führt zu einer Erhöhung

des Plasmaspiegels (Rodriguez 2004). Mutationen auf dem mitochondrialen Cytochrom b von *P. jirovecii* gehen mit einer Resistenz gegen Atovaquon einher (Meneau 2004).

Zur Therapie der leichten PCP stellt Co-trimoxazol das Mittel der ersten Wahl dar. Es kann zur ambulanten Therapie mit einer Tagesdosis von 100 mg/kg KG Sulfamethoxazol und 20 mg/kg KG Trimethoprim auf drei Dosen täglich verteilt oral verabreicht werden. Als Alternative kann Trimethoprim (20 mg/kg KG/Tag) mit Dapson (100 mg/Tag) kombiniert und oral gegeben werden. Beschriebene Nebenwirkungen bei der Dapsontherapie sind eine Methämoglobinämie, Hämolyse bei Glukose-5-phosphat-Dehydrogenase Mangel sowie allergische Reaktionen. Eine Therapie mittels Pentamidininhaltung (200 mg/Tag) ist heute aufgrund einer höheren Versagerquote trotz einer geringen Toxizität obsolet (Montgomery 1995).

Bei der schweren und mittelschweren PCP wird Co-trimoxazol intravenös verabreicht (Sulfamethoxazol 100 mg/kg KG plus Trimethoprim 20 mg/kg KG täglich in drei Dosen). Die Heilungsrate liegt bei der ersten Episode bei über 95%. Bei einer Unverträglichkeit wird als Alternative Clindamycin in einer Dosierung von 3 mal 600 mg plus Primaquin in der Dosierung von 30 mg pro Tag oder Pentamidin in der Dosierung 4 mg/kg KG über 4 Stunden pro Tag in 5%-iger Glucoselösung intravenös verabreicht. Die im Vergleich zum Co-trimoxazol bei Pentamidin häufiger auftretenden schwereren Nebenwirkungen wie Niereninsuffizienz, Transaminasenanstieg, Hypotension, Pankreatitis und Blutzuckerentgleisungen bei geringeren Ansprechraten erklären die sekundäre Bedeutung dieses Medikamentes. Bei der Therapie der mittelschweren bis schweren PCP wird zur Senkung der Nebenwirkungsrate eine frühzeitige Steroidgabe diskutiert, bei der die Letalität um 57% gesenkt wird (Brodt 2000, Gagnon 1990, Montaner 1989). Dagegen wurde in einer Multicenter-Studie kein statistisch signifikanter Unterschied bei der Gabe von Corticosteroiden in Kombination mit Co-trimoxazol im Vergleich zur alleinigen Co-trimoxazolgabe festgestellt (Walmsley 1995).

Die Therapie der PCP sollte standardmäßig für 21 Tage durchgeführt werden. Eine klinische Besserung ist dabei nach spätestens fünf Tagen zu erwarten. Eine kürzere Therapiedauer erhöht die Rezidivrate.

## **1.6 Bildgebende Diagnostik bei einer PCP**

Bei den meisten Patienten mit einer PCP ist die körperliche Untersuchung inklusive Auskultation unauffällig. Im Anfangsstadium weist das konventionelle Röntgenbild des Thorax häufig keine Veränderungen auf. Im Verlauf sind symmetrische retikulonoduläre Verdichtungen des Interstitiums und eventuell milchglasartige Trübungen mit einem perihilären Beginn und folgender Ausbreitung in der gesamten Lunge oder den basalen Lungenfeldern erkennbar (DeLorenzo 1987, Herold 2002). Aber auch homogene und grobknotige Infiltrate sowie Pneumatozelen können im Röntgenbild auffällig sein. Ungefähr 10% der Patienten weisen honigwabenartige Strukturen, lokalisierte Infiltrate sowie hiläre Erweiterungen auf. Ein Spontanpneumothorax trat bei 6% der Patienten mit einer PCP auf (DeLorenzo 1987). Bei schweren Erkrankungen findet sich typischerweise das Bild einer bilateralen interstitiellen Pneumonie (Siegenthaler 2005). Die röntgenologisch erkennbaren Veränderungen bilden sich meist innerhalb von zwei Monaten, abnorme Befunde zum Teil jedoch erst nach fünf Monaten zurück (DeLorenzo 1987). In der Computertomographie (CT) lässt sich als Merkmal ein sogenanntes „crazy-paving“ (verrückter Belag) diagnostizieren. Beschrieben werden damit diffuse oder vereinzelte Verschattungen mit einer aufgelagerten interlobulären septalen Verdickung und intralobulären Streifen (Rossi 2003). Die Kombination der vorliegenden Symptome und der radiologischen Diagnostik reicht meist nicht zur Diagnosestellung einer PCP aus (Huang 2006). Die Diagnose beruht in der Regel auf mikrobiologischen Nachweismethoden, die in den nachfolgenden Abschnitten dargelegt werden.

## **1.7 Labordiagnostische Nachweismethoden von *Pneumocystis jirovecii***

Als Untersuchungsmaterial für verschiedene Färbe- und molekularbiologische Methoden eignen sich bronchoalveolare Lavage (BAL), Trachealsekret und induziertes Sputum. Induziertes Sputum wird mittels Inhalation von 20 ml 3%-iger Kochsalzlösung für mindestens 20 min und anschließendem tiefem Abhusten gewonnen. Am sensitivsten ist das aus der BAL oder aus nativem oder paraffinfixierten Lungenbiopsien gewonnene Material (Tamburini 1993). Die Sensitivität der Nachweismethoden hängt stark von der Qualität und Quantität des jeweiligen Untersuchungsmaterials ab. Von der BAL benötigt man mindestens 3 ml, vom

Trachealsekret oder induziertem Sputum mindestens 5 ml oder 1 g Gewebe (Riebold 2005).

Bei der Grocott-Färbung handelt es sich um eine Methaminsilberfärbung. Die mit Silberchlorid angefärbten verdickten Zellmembranen der Zysten stellen sich hell- bis dunkelgrau dar. Die Kerne der intrazystischen Körper sind nicht sichtbar. In einigen Fällen sind auf der Zystenoberfläche zwei „microdots“ erkennbar. Dabei handelt es sich um umschriebene Verdickungen der Zellmembran. Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei 1000 Zysten pro ml Untersuchungsmaterial. Die Sensitivität dieser Methode ist mit 60-80%, die Spezifität mit 80-99% beschrieben (Procop 2004, Tiley 1994).

Eine modifizierte Giemsa-Färbung ermöglicht den mikroskopischen Nachweis der Zellkerne, d.h. der intrazystischen Körper oder Trophoziten. Die Membranen der Zysten sind nur als heller Umriss zu erkennen. Nicht in jedem Präparat sind Trophoziten oder kernhaltige Präzytzen vorhanden, so dass der Erreger leicht übersehen werden kann. Die Sensitivität dieser Färbemethode liegt bei 79%, die Spezifität bei 99% (Armbruster 1998). In anderen Quellen der Literatur wird die Sensitivität der beiden Färbemethoden zum Erregernachweis in einer bronchoalveolären Lavage oder Sputum zwischen 81% und 92% angegeben (Cregan 1990, Leibovitz 1995). Wenn beide Färbemethoden parallel durchgeführt werden, steigt die Sensitivität. Daneben gibt es unter anderem noch die Toluidinblau-Färbung, die die Zystenwand anfärbt und eine Sensitivität von 40% und 80% und Spezifität von 60% und 80% aufweist, sowie eine Calcufluor white Färbung und Färbung nach Papanicolaou (Riebold 2005).

Der direkte Fluoreszenztest (DFT) bewirkt eine Anfärbung der Zysten und hat eine Sensitivität von 80-92% und eine Spezifität von ca. 80% (Lautenschlager 1996). Unterschiedliche Methoden sind dabei in der Praxis vertreten. Man hat u.a. die Möglichkeit mit Fluorescein markierte monoklonale Antikörper gegen *Pneumocystis* spezies zu verwenden. Bei einer anderen Methode wird *Pneumocystis* nach Papanicolaou angefärbt. Dabei werden Hämatoxylin, Orange G und Polychromfarbstoffe wie z.B. Eosin-Azur verwendet. Unter dem Lichtmikroskop zeigen sich graue bis hellblaue Zysten in schaumigem Debris mit honigwabenartigen

Strukturen („honeycombs“). Unter UV-Licht fluoreszieren die Erreger gelblichgrün, oft ins orangerote biphasisch brechend (induzierte Fluoreszenz) (Riebold 2006). Wichtig bei der Auswertung dieses Verfahrens ist, dass zwischen *Pneumocystis* Organismen und anderen Organismen, insbesondere Hefen, die auch fluoreszieren können, unterschieden wird. Morphologische Merkmale müssen dabei für die Differenzierung angewandt werden. Beispielsweise lassen sich bei Hefen Sprosszellen erkennen. Für die Auswertung ist demnach erfahrenes Personal notwendig.

Neben den klassischen Färbemethoden bietet die Molekularbiologie neue Möglichkeiten zum Nachweis dieses Erregers. Im Laufe der letzten Jahre wurden unterschiedliche Methoden zum Nachweis von *Pneumocystis* DNA entwickelt. Dabei spielt die Entwicklung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) eine entscheidende Rolle. In den folgenden Abschnitten werden diese Verfahren näher erläutert.

## **1.8 Grundlagen der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) stellt eine *in vitro* Methode für eine enzymatische Synthese definierter DNA Sequenzen dar und wurde im April 1983 von Kary Mullis während einer nächtlichen Autofahrt entwickelt. Seine Entdeckung wurde erstmalig 1985 veröffentlicht und 1993 mit dem Nobelpreis der Chemie geehrt (Newton 1994).

Bei der PCR markieren zwei Oligonukleotidprimer auf gegenüber liegenden DNA-Strängen ein zu replizierendes DNA-Fragment. Die Elongation des DNA-Stückes wird mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase (z.B. Taq Polymerase) katalysiert. Die mehrmalige Wiederholung des Zyklus bestehend aus Spaltung der DNA, Anbindung der Primer und Elongation der DNA führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Fragmentes. Die Fragmentenden sind begrenzt von dem 5'-Ende der Primer. Die während des ersten Zyklus gebildeten neuen DNA-Stränge haben noch keine definierte Länge, da die DNA-Polymerase so lange DNA synthetisiert, bis sie entweder von alleine anhält oder vom Beginn einer neuen Vermehrungsrunde unterbrochen wird. Im folgenden zweiten Zyklus ist die Länge der Negativkopien ebenfalls noch nicht festgelegt. Erst ab dem dritten Zyklus ist die zu replizierende Sequenz durch die Position der Primer in der Originalmatrixe

definiert. Ab dem vierten Zyklus findet demnach eine exponentielle Vermehrung des DNA-Fragmentes statt. Die Kopienzahl lässt sich nach Abschluss der Reaktion mit der Gleichung  $(2^n - 2n)x$  berechnen ( $n$  = Anzahl der Zyklen,  $2n$  = Produkte der ersten beiden Zyklen, deren Länge nicht definiert ist,  $x$  = Anzahl der Kopien der ursprünglichen DNA-Matrize). Da die Produkte eines jeden Zyklus als Vorlage für den nächsten Zyklus verwendet werden können, verdoppelt sich die Anzahl an DNA Kopien bei einer 100-prozentigen Ausbeute annähernd in jedem Zyklus. Bei einer PCR mit 20 Zyklen sollten beispielsweise ungefähr eine Million Kopien ( $2^{20}$ ) des DNA-Fragmentes entstehen. Jedoch verläuft die PCR nicht völlig exponentiell. Bei einer Anzahl von ungefähr  $10^8$  Amplikongopien wird ein Plateau erreicht. Die Effizienz der PCR hängt unter anderem von der Matrize und der Optimierung der Methode ab. Eine 100-prozentige Ausbeute wird durch verschiedene Faktoren, die sich in späteren Zyklen noch verstärken, verhindert. Beispielsweise vermindert sich die Enzymaktivität im Laufe der Reaktion, da die Hitze das Enzym allmählich denaturiert. Häufig begrenzt die Enzymmenge bei einem molaren Überschuss der Ziel-DNA die PCR (Newton 1994).

Zur Durchführung der PCR werden die verwendeten Primer, die Taq Polymerase, Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ ), Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) sowie 10x PCR-Puffer und Aqua destillata (Aqua dest.) vermischt und stellen den sogenannten Mastermix dar. Der Mastermix wird in einem bestimmten Mischungsverhältnis, welches von der jeweils verwendeten PCR-Methode abhängt, zu der zu untersuchenden Probe gegeben. Die darin nachzuweisenden DNA-Fragmente werden in einem PCR-Gerät (Thermocycler) repliziert. Dabei wird das Gemisch initial für ein bis zwei Minuten auf 95°C erhitzt, um die enthaltene DNA komplett in ihre Einzelstrände zu spalten. Falls keine vollständige Spaltung erreicht werden konnte, werden sich die DNA-Strände beim Abkühlen wieder miteinander verbinden und sich somit der PCR entziehen. Auf der anderen Seite verhindert eine zu lang gewählte Denaturierungszeit die Aktivität der Taq Polymerase. Vor jedem Zyklus wird bei 94 bis 95°C eine Denaturierung für 20 bis 30 Sekunden durchgeführt. Durch das anschließende Abkühlen auf 55 bis 60°C können sich nun die Primer an den jeweiligen komplementären DNA-Strang binden. Das erneute Erwärmen auf 72°C bewirkt eine Verlängerung der DNA ausgehend vom jeweiligen Primer durch die enzymatische Wirkung der Taq Polymerase. Die Taq Polymerase kann ungefähr 60

Basen pro Sekunde bei 72°C an den Strang anfügen. Die Anzahl der zu durchlaufenden Zyklen muss individuell abgestimmt werden. Eine hohe Zyklusanzahl könnte dazu führen, dass unspezifische Produkte entstehen. Meistens werden 25 bis 35 Zyklen durchlaufen. Am Ende der PCR findet nach dem letzten Zyklus eine finale Verlängerung (final extension) statt, bei der für 5 bis 15 Minuten die Temperatur bei 72°C gehalten wird. Dadurch können sich noch nicht fertige DNA-Fragmente verlängern und vorhandene Einzelstränge zu Doppelsträngen verbinden.

Um gute PCR-Ergebnisse erzielen zu können, sollten nur spezielle PCR-Tubes verwendet und unter möglichst sterilen Bedingungen gearbeitet werden, um Kontaminationen zu vermeiden. Nach Möglichkeit sollte gereinigte DNA, die mittels eines Aufreinigungs-Kits aus der Probe separiert wird, verwendet werden.

Die verwendeten Primer sollten 18 bis 24 Basen lang sein, keine Sekundärstruktur besitzen und zu 40 bis 60% aus Guanin und Cytosin (G/C) bestehen. Außerdem sollte eine gleichmäßige Verteilung G/C- und A/T-reicher Domänen vorhanden sein sowie die Basen am 3'- Ende nicht inter- und intramolekular komplementär zueinander sein. Ansonsten könnten die Primer Schlaufen, sogenannte „Loops“, bilden, die eine Anlagerung an die DNA verhindern. Primer sollten eine Schmelztemperatur haben, die eine Anlagerung an die DNA bei 55 bis 65°C erlaubt und bei beiden Primern möglichst identisch ist. Die Schmelztemperatur eines PCR-Primers lässt sich annähernd mit der Gleichung (Anzahl von A+T) x 2°C + (Anzahl von G+C) x 4°C berechnen. Die Schmelztemperatur dient lediglich als Anhaltspunkt, um die geeignete Bindungstemperatur für die Primer zu berechnen. Die Anlagerungstemperatur muss im Verlauf der Experimente optimiert werden. Im Mastermix sollte eine Primerkonzentration von 0,1 bis 0,6 µM vorliegen. Eine geringere Konzentration könnte zu einer Erschöpfung des Primervorrates noch während der laufenden PCR führen. Eine höhere Konzentration könnte ein fehlerhaftes Anlagern und eine Anreicherung unspezifischer Produkte bewirken.

Bei den meisten Routine-PCRs wird die Taq Polymerase, ein hitzestabiles Enzym aus *Thermus aquaticus*, der aus einer heißen Quelle des Yellowstone Nationalparks isoliert wurde, verwendet. Die optimale Menge an Taq Polymerase liegt zwischen 0,5 und 2,5 Einheiten in einem 50 µl Reaktionsvolumen. Eine höhere Konzentration

könnte eine verminderte Spezifität bewirken. Die Taq Polymerase hat ein Molekulargewicht von 94 kDa und besitzt eine 5'→3'-Exonukleaseaktivität, die Nukleotide vor der Polymerase abbaut. Das Gen für die Taq-DNA-Polymerase wurde kloniert und modifiziert in *E. coli* exprimiert. Das daraus entstandene AmpliTaq® (AmpliTaq®, P.E. Applied Biosystems) hat die gleichen Eigenschaften wie die Taq Polymerase, lässt sich jedoch leichter in reiner Form isolieren. Folglich ist AmpliTaq® für die PCR das Enzym der Wahl (Newton 1994).

Im Mastermix ist außerdem MgCl<sub>2</sub> enthalten. Das Mg<sup>2+</sup> bildet mit den dNTPs lösliche Komplexe, die als eigentliches Substrat von der Polymerase erkannt werden. Die Konzentration an freiem Mg<sup>2+</sup> hängt von den Konzentrationen anderer Bestandteile ab, die dieses Ion binden können, z.B. dNTP, freie Pyrophosphate (PP<sub>i</sub>) und Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA). Mg<sup>2+</sup> beeinflusst die Enzymaktivität und erhöht den Schmelzpunkt der Doppelstrang-DNA. Eine zu hohe Konzentration dieses Ions kann die nicht-spezifische Primerbindung erhöhen und eine unspezifische Hintergrundstörung bewirken. Normalerweise wird eine MgCl<sub>2</sub> Konzentration von 1,5 mM bei einer dNTP Konzentration von jeweils 200 µM gewählt.

Der verwendete dNTP Mix sollte immer aus gleichen Anteilen der vier dNTPs bestehen, da sonst die Genauigkeit der Taq Polymerase abnimmt. Bei einer Erhöhung der dNTP Konzentration muss ebenfalls die Mg<sup>2+</sup> Konzentration erhöht werden. Ansonsten würde es zu einer Abnahme der freien Mg<sup>2+</sup> Ionen kommen, wodurch die Aktivität der Polymerase verändert und die Primerbindung verminder werden könnte. Die dNTP Konzentration sollte jeweils zwischen 50 und 500 µM liegen. Meist wird eine Konzentration von 200 µM pro dNTP gewählt. Die optimale dNTP-Konzentration hängt neben der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von der Primerkonzentration, der Länge der DNA-Kopien, der Zyklenanzahl und der Stringenz der Reaktion ab.

Der pH-Wert des Mastermixes wird bestimmt durch den verwendeten Puffer und liegt meistens zwischen einem pH von 8,3 und 9,0. Für die Taq- oder AmpliTaq®-DNA-Polymerase wird meist ein zehnfach konzentrierter Puffer verwendet, der vor Gebrauch im Verhältnis 1:10 verdünnt werden muss. Er besteht aus 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,1 % (w/v) Gelatine.

## **1.9 Besonderheiten der nested PCR**

Das nested PCR-Verfahren (nPCR) wird zur Steigerung der Sensitivität und Spezifität sowie der DNA-Ausbeute eingesetzt. Dabei werden zur Replikation eines Produktes zwei PCRs in Folge eingesetzt. Diese werden als erste und zweite Stufe bezeichnet. Nach Abschluss der ersten PCR-Stufe werden dem Produkt in einer angemessenen Verdünnung zwei weitere Primer, die ebenfalls spezifisch einen Erreger nachweisen und innerhalb des Amplifikats der ersten PCR ansetzen, zugeführt. In der nun folgenden zweiten Stufe der PCR wird ein kleineres DNA-Fragment amplifiziert. Man spricht deshalb von einer „geschachtelten“ (engl. nested) PCR. Für die zweite Stufe der PCR kann auch ein Primer aus der ersten Stufe mit einem neuen Primer kombiniert werden. Man spricht dann von einer semi- (hemi-) nested PCR.

## **1.10 Die quantitative PCR**

Die bisher beschriebenen PCR-Verfahren sind qualitative Nachweisverfahren. Diese lassen unter anderem die Frage offen, wie viele Amplikkopien für einen positiven Nachweis des gesuchten DNA-Fragments erforderlich sind oder wie hoch die ursprüngliche Konzentration des nachgewiesenen DNA-Fragments in der untersuchten Probe ist. Diese Probleme können mit Hilfe einer quantitativen PCR gelöst werden.

Entwicklungen führten zu einer Methode, die im Vergleich zu den ersten verwendeten Methoden keiner hohen Fehlerquote unterliegt. Die heute verbreitete Real-time quantitative PCR beruht auf dem Prinzip der Ausnutzung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (fluorescence resonance energy transfer, FRET) (Cardullo 1988). Ein Fluoreszenzfarbstoff lässt sich durch Licht einer bestimmten Wellenlänge anregen und gibt die aufgenommene Energie in Form von Licht einer anderen Wellenlänge ab. Anregungs- und Emissionsspektrum sind dabei für den Fluoreszenzfarbstoff charakteristisch. Bei der Quantifizierung verwendet man einen kurzen Primer mit einem gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff. Liegt dieser Farbstoff ungekoppelt in Lösung vor, fluoresziert er nicht. Wenn die DNA einsträngig ist, bindet dieser Primer an die DNA und fluoresziert. Die Taq Polymerase verlängert

gleichzeitig die DNA vom Anfang und schiebt den Quantifizerungsprimer von der DNA herunter, wenn sie seine Lokalisation auf dem DNA-Strang erreicht hat. Bei jedem Elongationsschritt wird dieser Vorgang wiederholt.

Aus diesem Prinzip haben sich verschiedene Nachweismethoden in der Forschung etabliert. Zur Quantifizierung dieser Methoden nimmt man die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund abhebt ( $C_T$ -Wert). Verschiedene Ausgangs-DNA-Mengen liefern dabei auch verschiedene  $C_T$ -Werte (Abb. 3). Daraus lässt sich mittels Logarithmus eine Standardkurve erstellen, aus der man umgekehrt aus einem  $C_T$ -Wert auf die Templatemenge schließen kann (Abb. 4).

Generell besteht die Möglichkeit, mehrere Fragmente in Form einer multiplex PCR im gleichen Tube zu amplifizieren und getrennt nachzuweisen. Die Emissionsspektren der gemessenen Fluoreszenzstoffe dürfen sich dabei jedoch möglichst wenig überlappen. In der Praxis werden bis zu acht Fragmente gleichzeitig in einer PCR nachgewiesen, was sich oft als schwierig gestaltet. Die jeweiligen Fragmente müssen sich dabei immer in bestimmten Bereichen unterscheiden und trotzdem die gleiche Annealing-Temperatur besitzen.

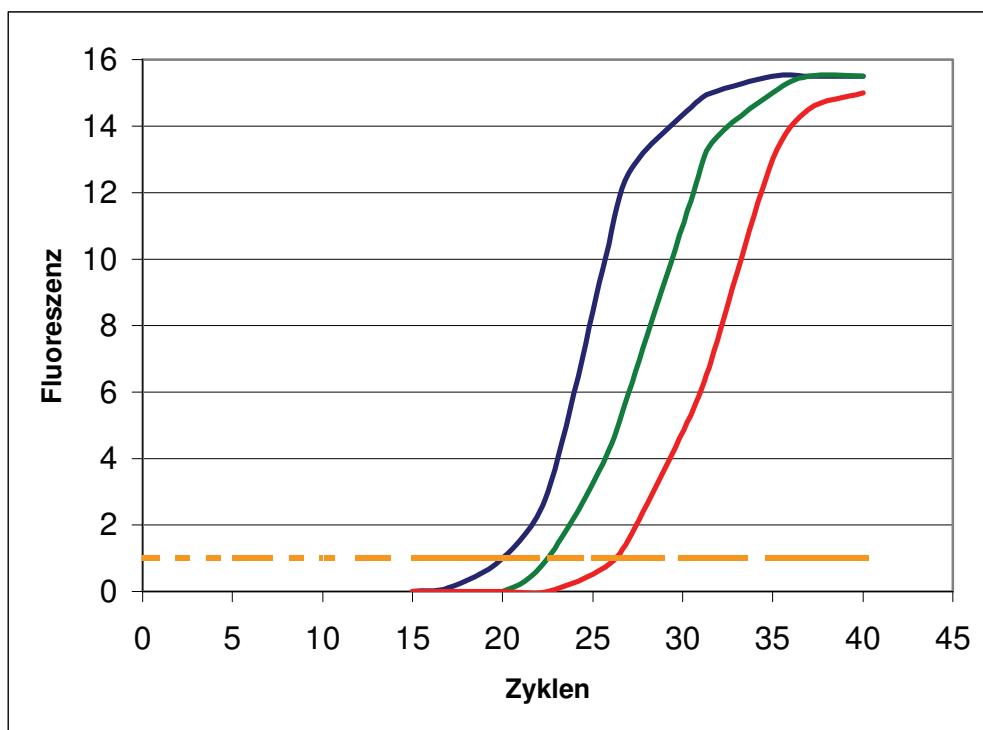


Abb. 3. Fluoreszenzkurven für drei Amplifikationen mit unterschiedlichen Template-DNA-Mengen (gestrichelte Kurve entspricht  $C_T$ -Werten).

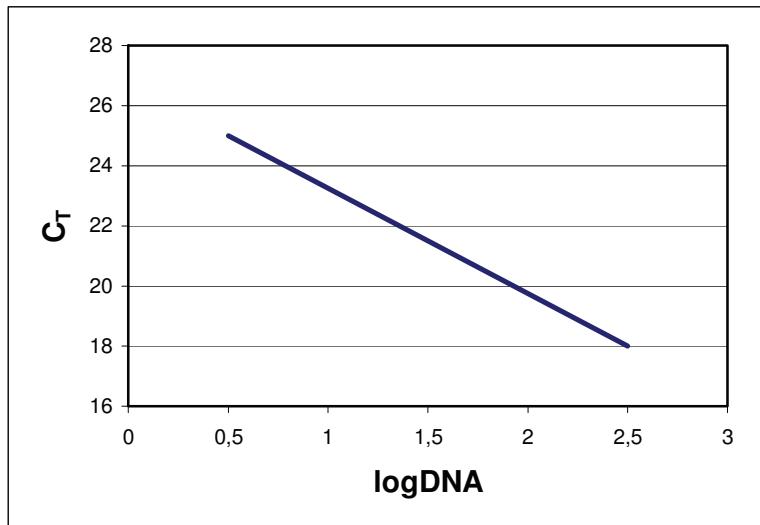


Abb. 4. Standardkurve zur Ermittlung der DNA-Menge.

### **1.11 PCR-Methoden zum Nachweis von *P. jirovecii***

Organismen sind am spezifischsten über ihre DNA-Sequenz charakterisiert. Die Entwicklung verschiedener PCR-Methoden ermöglicht die Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Unterschiedliche PCR-Methoden wurden für den Nachweis von *P. jirovecii* entwickelt. Dazu gehören die mtLSU rRNA, DHPS, ITS und arom Gen PCR. Weitere PCR-Methoden sind die mtSSU rRNA, TS, 5S rRNA, DHFR sowie Cytochrom b PCR. Die Aussagekraft der PCR hängt jedoch auch von der gewonnenen Materialmenge und der Art der Materialgewinnung ab. Dabei eignen sich in abfallender Tendenz mittels Bronchiallavage gewonnenes Material, Trachealsekret und induziertes Sputum. Außerdem beeinflussen der Zeitpunkt der Materialgewinnung, die Qualität und die Menge des Materials die Diagnostik mittels PCR (Sing 2000).

#### **mtLSU rRNA PCR**

Die mtLSU rRNA PCR repliziert ein konserviertes und für *P. jirovecii* spezifisches Fragment des mitochondrial transcribed large subunit rRNA Gens. Durch die Lokalisation des Gens in der mitochondrialen DNA liegen entsprechend der Anzahl der Mitochondrien in jeder *P. jirovecii*-Zyste mehrere tausend Kopien vor (Riebold 2005). Die mtLSU rRNA PCR wird sowohl als einfache als auch als nested PCR durchgeführt. In der ersten Stufe der nested PCR wird ein etwa 340 Basenpaare langes und in der zweiten Stufe ein 205 Basenpaare langes Nukleinsäurefragment

vervielfältigt (Abb.5). Die nPCR hat eine Sensitivität von 99% und eine Spezifität von 95% (Tamburrini 1993, Wakefield 1998). Beide Methoden werden in der Routinediagnostik verwendet. Dabei besteht bei der nPCR zusätzlich die Möglichkeit einer groben Quantifizierung, die am Klinikum der Universität Rostock wie folgt angewandt wird: Ein positiver Nachweis von *P. jirovecii* DNA in der ersten und zweiten Stufe in Zusammenhang mit einer vorhandenen Klinik des Patienten wird als *Pneumocystis* Pneumonie interpretiert. Ein alleiniger Nachweis in der zweiten Stufe bei einem asymptomatischen Träger gilt lediglich als Besiedelung. Es kann sich aber auch um eine beginnende Pneumonie handeln. In solchen Fällen sollte die PCR wiederholt werden. Diese Unterscheidung wird allerdings stark von der Quantität als auch Qualität des verwendeten Materials (BAL, Trachealsekret, Biopsat, Sputum) beeinflußt. Auf dem replizierbaren Fragment des mtLSU rRNA Gens sind bisher wenige Mutationen detektiert worden. Die geringe Anzahl an Mutationen lässt sich dadurch erklären, dass es sich bei dem mtLSU rRNA Gen um eine hoch konservierte Region handelt. Die Bedeutung dieser Variationen ist bisher unklar.

1	Primer pAZ102-H	GTGATTGTGT ACGTTGCAAA GTACTCAGAA GAATTGTGGT AAGTAGTGAA
51	Primer P1	ATACAAATCG GGCTAGGATA TAGCTGGTT TCTGCGAAAA TTGTTTTGGC
101		AAATTGTTA TTCCTCTAAA AAATAGTAGG TATAGCAC TG AATATCTCGA
151		GGGAGTATGA AAATATTAT CTCAGATATT TAATCTCAA ATAACATT
201	Primer P2	CTTAAATAA ATAATCAGAC TATGTGCGAT AAGCTAGATA GTCGAAGGG
251		AAACAGCCCA GAACAGTAAT TAAAGCTCCC CAATTAA TAT TAAGTGAAAT
301	Primer pAZ102-E	AAAAGTTGTT GGATATCTAA AACAGTTAAG AAGTGGGCTT GGAAACAGCC
351	ATC	

Primer der 1. PCR-Stufe ■

Primer der 2. PCR-Stufe ■

Abb. 5. mtLSU-Gensequenz mit nested PCR-Primern

### DHPS nested PCR

Mit Hilfe der DHPS nested PCR wird ein Abschnitt des Dihydropteroatsynthase Gens nachgewiesen. Das replizierte DNA-Fragment der ersten Stufe ist 771 Basenpaare und das der zweiten Stufe 449 Basenpaare lang. Im Gegensatz zum mtLSU rRNA

Gen, welches sich in den im Zytoplasma lokalisierten Mitochondrien befindet, ist das DHPS Gen als „single copy“ im Zellkern lokalisiert. Die Dihydropteroatsynthase ist für die Bildung der Folsäure im Organismus essentiell. Mehrere Mutationen wurden bisher bereits nachgewiesen und sind an den Aminosäurepositionen 13, 16, 23, 26, 55, 57, 60, 111, 171 und 248 lokalisiert (Lane 1997, Takahashi 2000, Riebold 2006) (Abb.6). Eine mögliche Folge der Mutationen auf diesem Gen könnte eine Resistenz gegen das in der Therapie und Prophylaxe der *Pneumocystis* Infektion verwendete Sulfamethoxazol, einem Bestandteil des Co-trimoxazols, sein. Bei den Mutationen an den Aminosäuresequenzen Nr. 55 (M1) und 57 (M2) oder bei einer Kombination beider Mutationen (M3) wird aufgrund von Studienergebnissen von einer Korrelation zwischen Mutation und Sulfamethoxazol-Resistenz ausgegangen (Kazanjian 2000). Als Wildtyp wird Threonin an der Aminosäuresequenz Nr. 55 und Prolin an Nr. 57 angesehen. Es wird vermutet, dass die Mutation an Position Nr. 55 von Threonin zu Alanin die Bindung der Sulfonamidmedikamente am Arginin an Position Nr. 56 beeinflusst. Die an Position Nr. 57 beobachtete Mutation von Prolin zu Serin kann möglicherweise aufgrund der engen Beziehung zu Arginin an Position Nr. 56 in gleicher Weise die Argininwirkung beeinflussen. Diese Vermutung begründet sich damit, dass, basierend auf einer Übereinstimmung mit der dreidimensionalen Struktur der *Escherichia coli* DHPS, sich die Mutationen in der hoch konservierten aktiven Gegend des Proteins befinden (Meneau 2004). Außerdem konnte bei anderen pathogenen Mikroorganismen gezeigt werden, dass Mutationen in der aktiven Region der DHPS mit einer Resistenz gegen Sulfonamide einhergehen (Meneau 2004). Die Mutation M3 geht mit der höchsten Rate eines Versagens der Prophylaxe in Studien, in denen Sulfamethoxazol und Dapson zur Prophylaxe verwendet wurden, einher (Meneau 2004, Kazanjian 2000, Navin 2001). Es wurde weiterhin festgestellt, dass bei dieser Mutation eine geringere Affinität der Paraaminobenzoesäure (PABA), einem Substrat bei der Folsäuresynthese, zur DHPS besteht. Diese Affinitätsminderung ist jedoch geringer als die der Sulfonamide (Meneau 2004). Ein weiterer Grund für die Vermutung, dass diese Mutationen eine Sulfamethoxazol-Resistenz bewirken, besteht darin, dass sie nicht gleichzeitig vorkommen und somit auf einen positiven Evolutionsdruck schließen lassen (Kazanjian 1998). Studien haben gezeigt, dass eine Korrelation zwischen der Dauer einer Sulfonamid-Prophylaxe und dem Auftreten von Mutationen in der DHPS Aminosäuresequenz besteht (Kazanjian 2000).

1 AAACCACTTT GCGAGTAAGT ATATATAAAAT AGAA TAATTA TTTTTAATT  
 51 ACAAATTAGC GTATCGAA TG ACCTTGTTCA TCCT ATTACT GGATTAC CTA  
 Primer PK95

101 TAGT TTCTTA TCTTAAGAAA ATTGTAAATC CTGGTATTAA ACCAGTT TTG  
 151 CCAT TTTTAT ATAAAAATAG AAGTATAAAAT TTTAGTTCTG AATTTTAA  
 201 AGCG CCTACA CATATTATGG CCATTTAA 13 16 TCTTACTCCT GATTCTTT  
 251 TCGA TGGGGG 23 26 GTTCATTCA TATGATTCTA TATTAATGGA TGTGGAGAAT  
 301 TTTA TAAATG CAGGGCGAC GATAATTGAT ATTGGTGGGC AGTCT 55 ACACG  
 351 GCCTGGTTCA 57 60 CAT GTTGT TT CTATAGAGGA AGAGATTCT CGAGTTA TTC  
 401 CTGC TATAAA ATATCTCTA AAAGTATATC CTGATTTT AGTAAGT GTA  
 451 GATACTTTG GTTCTGAGGT TGCGAACAA GCAA TTAAGG CTGGTGC TAG  
 501 TCTT GTTAAT GAT 111 ATAAG TG GGGGAAGGTA TGATCCAAA ATGCTTAATG  
 Primer B<sub>nest</sub>  
 551 TGGT TGCCAA GTTGAAAG TT CCAATATGTA TAATGCATAT GAGAGGT GAT  
 601 TTTT TAACTA TGGACAATT AACTGATTAT GGTACCGATA TTATAAAACA  
 651 AATT ACTAAA GAATTAGAAG AATTGCTTGT TTTT GCTGAA AGT 171 TCAG GTA  
 701 TTTT TAGGTG GAATATTATT TTAGATCCTG GGTTAGGATT TGCTAAA ACT  
 751 TCCTATCAAA ATATAGAA TT GTTAAGAAGA TTTAATGAAT TAAAATCTCA  
 Primer PS634  
 801 GCAT TGCTTT AATGGTTGC CTGGTTGC 248 TGGTCCAAGT CGCAAAAGAT  
 851 TTACAGGGTG TCTTACAGGT GATGTTATGC CAAAAGATAG GATTGGGGC  
 901 ACTGCTGCTT CGGTTGCCGC ATCT GTT 248 TTA GGAGGCTGTG ATATTATACG  
 951 GGTTCATGAT GTTTATGAAA TGTATAAGT TTCAAGAACT TTGGATG CTA  
 1001 TTTGGAAAGG AGTTTATTGA ATTGTTATTA TTTATTTGTA AACTATAATA  
 1051 TACA TAA TAC TTTGGTTGAT TGTAAATTG CAAT TTATAT TTAAATA TT

Primer der 1. PCR-Stufe ■

Primer der 2. PCR-Stufe □

Mutationsstellen im DHPS-Gen (mit Angabe des Codons) □

Abb. 6. DHPS-Gensequenz mit nested PCR-Primern und bekannten Mutationen

### DHFR PCR

Eine weitere PCR-Methode existiert zur Replikation der Dihydrofolatreduktase (DHFR). Dieses Enzym wird durch den Wirkstoff Trimethoprim bei der Reduktion von

7,8-Dihydrofolsäure zu 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure inhibiert. Das DHFR-Gen zeigte bisher bei 33 Patienten mit PCP und vorangegangener Prophylaxe Punktmutationen, die auf eine Resistenzentwicklung gegen Trimethoprim hindeutet (Nahimana 2003). Die klinische Relevanz dieser Mutationen ist noch nicht restlos geklärt.

## ITS PCR

Wie bei den meisten eukaryotischen Zellen kodieren die *P. jirovecii* rRNA Gene für die 18S, 5.8S und 26S rRNAs. Diese Gene sind in Gruppen lokalisiert und nicht aneinander grenzend. Die beiden vorhandenen Stellen zwischen den rRNA Genen werden als internal transcribed spacers (ITSs) bezeichnet (Lu 1995). Die erste Region (ITS1) ist zwischen dem 18S und 5.8S rRNA Gen und die zweite Region (ITS2) zwischen dem 5.8S und 26S rRNA Gen lokalisiert. ITS1 ist 161 Basenpaare lang, ITS2 dagegen 192 Basenpaare (Lee 1998).

Eine nested PCR-Methode, die den internal transcribed spacer (ITS) des rRNA Gens von *P. jirovecii* repliziert, wurde initial entwickelt, um eine Typisierung der im Menschen nachgewiesenen *Pneumocystis* Organismen durchzuführen. Die Nukleotidsequenzen der ITS-Regionen variieren in den verschiedenen Sequenzen der menschlichen *Pneumocystis* Spezies. Diese Variation kann zur Typisierung der verschiedenen humanen Organismen und damit zur Aufklärung von Infektionsketten verwendet werden. Die Typen des ITS1- und ITS2-Gens kommen unabhängig voneinander vor.

Sequenzvariationen der ITS1-Region, die für die Typisierung bedeutsam sind, sind an den Stellen 6, 12, 15, 21, 23, 24, 28, 34, 42, 53, 54, 80, 81 und 115 bis 118 lokalisiert. Anhand der Variationen an diesen Lokalisationen wurden die ITS1-Sequenzen in 15 verschiedene Typen unterteilt, die als Typ A bis O bezeichnet werden. Einander ähnliche Typen sind mit aufeinander folgenden Buchstaben benannt (Lee 1998). In der ITS2-Region finden sich Variationen der Nukleotidsequenz an den Positionen 48, 49, 52, 57, 62 bis 70, 72, 76, 122, 160, 166 bis 171, 173 und 178 bis 184. Es werden 14 Typen der ITS2-Region anhand dieser Variationen unterschieden: Typ a bis n (Lee 1998). In verschiedenen Studien konnten bisher 59 Kombinationsmöglichkeiten zwischen den beiden ITS-Typen bei *P.*

*jirovecii* nachgewiesen werden (Lu 1994, Lee 1998). Die Sensitivität und Spezifität dieser nested PCRs sind mit denen der mtLSU nPCR vergleichbar (Riebold 2005).

### Arom Gen PCR

Das arom Gen kodiert in einem Teil für die 5-Enolpyruylshikimate-3-Phosphat-Synthase. Dieses Enzym wird für die Biosynthese aromatischer Aminosäuren benötigt (Tsolaki 1998). Das bei dieser nested PCR replizierte Fragment ist 237 Basenpaare lang. Mit Hilfe der Typisierung dieses Enzyms konnte unter anderem nachgewiesen werden, dass in einer Lunge mehrere *Pneumocystis jirovecii* Typen vorhanden sein können (Banerji 1995).

### mtSSU rRNA PCR

Bei dieser nested PCR-Methode wird ein Teil des mitochondrial transcribed small subunit rRNA Gens vervielfältigt. Das DNA-Fragment der humanen *Pneumocystis* Spezies ist 388 Basenpaare lang (Hunter 1996). Einzelne Punktmutationen ließen sich in der DNA-Sequenz nachweisen und sind an den Basenpaaren 160 und 196 lokalisiert (Tsolaki 1998, Wakefield 1998).

### TS PCR

Eine weitere PCR-Methode dient dem Nachweis des Thymidylat-Synthase Gens. Das dabei replizierte Fragment ist 398 Basenpaare lang. Das Nukleinsäurenfragment entspricht zwei kleinen Introns und mehreren Exons (Latouche 1997). Als Exon bezeichnet man ein synthesekodierendes DNA-Segment. Dagegen benennt ein Intron eine nicht kodierende Sequenz innerhalb des Gens. Exons sind durch Introns unterbrochen und werden erst während der Transkription miteinander verbunden. Die Introns werden dabei aus der Messenger-RNA (mRNA) entfernt.

### Cytochrom-b-Gen PCR

Diese PCR-Methode und anschließende Sequenzierung des DNA-Fragmentes des Cytochrom-b-Gens von *P. jirovecii* dient dem Nachweis möglicher Resistenzen gegenüber dem Medikament Atovaquon (Riebold 2005). Diese Resistenzen treten jedoch sehr selten auf. Atovaquon inhibiert die Bindung von Ubiquinon an Cytochrom b, wodurch der Elektronentransport der Mitochondrien beeinflusst wird (Rodriguez 2004).

## **5S rRNA PCR**

Bei der 5S rRNA PCR wird ein 120 Basenpaare langes Nukleinsäurefragment des 5S rRNA Gens repliziert. Neben der Prototypsequenz sind mehrere variante Sequenzen bekannt.

Bei Mutationen auf dem mtLSU rRNA Gen, dem mtSSU rRNA Gen und dem ITS Gen geht man bisher davon aus, dass sie unter keinem bis wenig Selektionsdruck entstehen und lediglich als Grundlage genetischer Unterschiede ohne Bedeutung für den Phenotyp dienen. Mutationen auf dem arom Gen gelten ebenfalls als neutral, da sie zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz des daraus synthetisierten Enzyms führen (Stringer 2002). Im Vergleich zum DHPS Gen scheint das DHFR Gen unter einem geringeren Selektionsdruck zu stehen. Als mögliche Ursache wird die fehlende Wirkung des Trimethoprim im Co-trimoxazol vermutet (Ma 1999). DNA-Analysen in verschiedenen Studien haben gezeigt, dass es durch die Zunahme der PCP-Inzidenz im Laufe der Jahre nicht zu einer großen Verschiebung in der Art oder Häufigkeit des Genoms von *P. jirovecii* gekommen ist (Tsolaki 1998).

## **2. Fragestellungen und Hypothesen**

Eine besondere Bedeutung kommt *Pneumocystis jirovecii* als Erreger der PCP bei immunsupprimierten Patienten zu. Dies beruht unter anderem auf der Schwierigkeit, den Erreger nachzuweisen und zu kultivieren, auf den noch ungeklärten Fragen bezüglich seines Lebenszyklus und der Übertragung sowie der Komplexität der Therapie. Die PCP ist bis zum jetzigen Zeitpunkt die häufigste opportunistische Infektion bei HIV-infizierten Patienten in Westeuropa (Serraino 2003). Außerdem tritt diese Erkrankung mit einer erhöhten Inzidenz bei Patienten auf, die in Folge einer Organtransplantation oder anderer Erkrankungen immunsupprimiert sind (Morris 2004). Als bisher ungeklärte Frage stellt sich, ob es sich bei einem positiven Nachweis von *P. jirovecii* um eine Reinfektion oder Reaktivierung des Organismus im Wirt handelt. Untersuchungen haben gezeigt, dass mehr als 90% der gesunden Kinder in den ersten zwei Jahren ihres Lebens Kontakt mit dem *Pneumocystis* Organismus haben (Chabé, Vargas 2004). Eine Erkrankung tritt jedoch nicht auf. Daraus wird postuliert, dass möglicherweise kleine Kinder ein Reservoir für *P. jirovecii* Infektionen in der Gesellschaft darstellen (Stringer 2002).

Zum Nachweis des Erregers werden als Untersuchungsmaterial die bronchoalveolare Lavage, das Trachealsekret und das induzierte Sputum für verschiedene Färbe- und molekularbiologische Methoden verwendet. Die unterschiedlichen Methoden unterscheiden sich sowohl in ihrer Sensitivität als auch Spezifität. Die Sensitivität der Nachweismethoden hängt außerdem stark von der Qualität und Quantität des jeweiligen Untersuchungsmaterials ab. Die Polymerase-Ketten-Reaktion stellt eine *in vitro* Methode für eine enzymatische Synthese definierter DNA Sequenzen dar. Ein zu replizierendes DNA-Fragment wird mittels zweier Oligonukleotidprimer auf gegenüber liegenden DNA-Strängen markiert und anschließend mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase repliziert. Durch die mehrmalige Wiederholung des Zyklus kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung eines DNA-Fragments. Durch die DNA-Sequenzierung des *Pneumocystis* Genoms konnten Punktmutationen detektiert werden, deren Bedeutung zum Teil unklar ist. Auf der anderen Seite konnten bestimmte Mutationen für Resistenzen gegen Medikamente, die in der PCP Therapie verwendet werden, gefunden werden.

In dieser Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob die Möglichkeit besteht, *P. jirovecii* in paraffinisiertem Gewebe mittels PCR nachzuweisen. Es stellte sich daraus die Frage, ob es durch den Vorgang der Entparaffinisierung zu einer Zerstörung der *Pneumocystis* DNA kommt oder diese für die anschließend erfolgende nested PCR erhalten blieb. Es wurden zwei verschiedene nested PCR Methoden verwendet, die verschiedene DNA-Fragmente des *Pneumocystis* Genoms nachweisen. Eine abschließend erfolgte Sequenzierung des nachgewiesenen DNA-Fragmentes sollte zeigen, ob es sich tatsächlich um den Erreger *P. jirovecii* handelt. Außerdem wurden die erhaltenen DNA-Sequenzen im Hinblick auf eventuell vorhandene Punktmutationen untersucht und mit bereits bekannten Punktmutationen verglichen.

In einem weiteren Schritt wurden anschließend die Proben den jeweiligen Patientendaten zugeordnet. Eine Auswertung hinsichtlich der vorhandenen Erkrankungen und durchgeführten Therapie sowie der Laborparameter erfolgte. Mögliche Zusammenhänge aus den Untersuchungsergebnissen und zugrunde liegenden Daten wurden erstellt und diskutiert.

Aus den Fragestellungen und Zielen dieser Untersuchung lassen sich folgende Hypothesen ableiten.

1. Der Nachweis von *P. jirovecii* aus paraffinisiertem pulmonalem Gewebe mittels verschiedener nested PCR-Methoden ist möglich.
2. Eine Sequenzierung der nachgewiesenen DNA bestätigt das Vorliegen des *P. jirovecii* Genoms.
3. Durch die Sequenzierung können Punktmutationen der *P. jirovecii* DNA nachgewiesen werden.
4. Die Auswertung der Patientendaten im Hinblick auf vorliegende Erkrankungen und laborchemische Veränderungen gibt Hinweise auf das Vorhandensein des Erregers *P. jirovecii*.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Geräte und Chemikalien**

Für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden folgende Geräte und Chemikalien verwendet:

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
Flowbox Herasafe II	Heraeus
Kühlschrank -20 °C	Liebherr
Biofuge fresco Tischzentrifuge für 1,5 ml Tubes	Heraeus
Heiz-, Rührplatte MR3100	Heidolph
Vortexer	NeoLab
Pipetten 1-10, 2-20, 20-100, 100-1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen und Aufbewahrungsboxen	Greiner
Tubes 1,5 und 2,2 ml	Eppendorf
PCR-Thermocycler 1: Mastercycler gradient (96 Proben)	Eppendorf
PCR-Thermocycler 2: Mastercycler personal (25 Proben)	Eppendorf
Thermoschüttler 1: Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermoschüttler 2: Thermomixer compact	Eppendorf
Horizontale Elektrophoresekammer 1: für Gele 10 x 8 cm	Owl Scientifics
Horizontale Elektrophoresekammer 2: für Gele 20 x 16 cm	Owl Scientifics
Elektrophorese Stromversorgung E835	Consort
Erlenmeyerkolben	Schott Duran
Messzylinder	Schott Duran
PCR-Tubes 0,2 ml	Eppendorf
Kühlakku	Eppendorf
Polaroidplattenkamera	Polaroid
Polaroidfilm 667	Polaroid
UV-Bank	Vilber Lourmat
Paraffinschneide (Pathologie)	
Photometer: GeneQuant II mit Küvette 40-00-8455 Ultrospec	Pharmacia Biotech
Autoklav 3150 EL	Systec

Tab. 1. Geräte

<b>Chemikalie</b>	<b>Firma</b>	<b>Bestellnummer / Bemerkung</b>
Xylol (98,5%)	Baker	0135110013
Ethanol (99,8%)	Merck	1.08543.0250
Agarose (reinst) für DNA Elektrophorese	Serva	11404
Aqua ad injectabilia, 10 ml Ampullen	Braun	2351544
Borsäure	Merck	11.00165.1000
TRIS (Tris(hydroxymethyl)- aminomethan)	Serva	37180
EDTA	Merck	1.08418.1000
Ethidiumbromid	Merck	1.11615.0010
Desoxynukleosidtriphosphat-Set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Roche	1976273
Primer mtLSU nPCR 1. Stufe: pAZ102-E (5'-GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA-3')	MWG Biotech	Individuelle Synthesierung
Primer mtLSU nPCR 1. Stufe: pAZ102-H (5'-GTG TAC GTT GCA AAG TAC TC-3')	MWG Biotech	Individuelle Synthesierung
Primer mtLSU nPCR 2. Stufe: P1 (5'- CTA GGA TAT AGC TGG TTT TC- 3')	MWG Biotech	Individuelle Synthesierung
Primer mtLSU nPCR 2. Stufe: P2 (5'- TCG ACT ATC TAG CTT ATC GC- 3')	MWG Biotech	Individuelle Synthesierung
Primer DHPS nPCR 1. Stufe: PK95 (5'- GCG TAT CGA ATG ACC TTG TTC ATC CT – 3')	MWG Biotech	Individuelle Synthesierung
Primer DHPS nPCR 1. Stufe: PS634 (5'- GCA ACC AAG GCA AAC CAT TAA AGC – 3')	MWG Biotech	Individuelle Synthesierung
Primer DHPS nPCR 2. Stufe: PK160 (5'- GTT AAT CCT GGT ATT AAA	MWG Biotech	Individuelle Synthesierung

CCA GTT TTG CCA TT -3')		
Primer DHPS nPCR 2. Stufe: B <sub>nest</sub> (5'- GGA ACT TTC AAC TTG GCA ACC AC – 3')	MWG Biotech	Individuelle Synthesierung
ReadyAmp® Genomic DNA Purification Kit	Promega	A7710
Taq DNA Polymerase Kit (incl. 10x PCR-Puffer, MgCl <sub>2</sub> )	Qiagen	201203
Positiv-Kontrolle		Entstammt aus konserviertem Material bereits diagnostizierter PCP-Patienten
QIAquick® PCR Purification kit	Qiagen	28106

Tab. 2. Chemikalien

### 3.2 Software

Für die Auswertung der aus den Untersuchungen hervorgegangenen Daten wurden folgende Programme verwendet:

Programm	Firma	Homepage (Programm-Download)
BLAST Version 2.2.9		<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
NCBI		<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi">www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi</a>
PDRAW32 Version 1.1.74	Acaclone Software	<a href="http://www.geocities.com/acaclone">www.geocities.com/acaclone</a>

Tab. 3. DNA-Sequenzanalysen

Programm	Firma
Prism Version 4.0	GraphPad Software, Inc.
Microsoft Excel 2002	Microsoft Corporation
CorelDRAW (TM) Select Edition Version 7.468	Corel Graphics

Tab. 4. Statistik und graphische Darstellung

<b>Programm</b>	<b>Homepage (Programm-Download)</b>
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez</a>
PubMed Taxonomy	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&amp;DB=taxonomy">www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&amp;DB=taxo nomy</a>

Tab. 5. Literaturrecherche

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen ist im Anhang zusammengefasst.

### **3.3 Entparaffinisierung**

In autoklavierte 1,5 ml Tubes werden pro Probe 10 Schnitte mit einer Dicke von jeweils 10 µm gefüllt. Das paraffinierte Gewebe wird für 5 Sekunden auf den Boden des Tubes zentrifugiert. Anschließend wird 1 ml Xylol (98,5%) hinzugefügt und das Tube gevortext bis sich das Gewebe vom Boden gelöst hat. Dem folgt eine Inkubation im Thermoschüttler bei 500 rpm und 21°C für 20 Minuten bis sich das paraffinierte Gewebe überwiegend gelöst hat. Das Tube wird dann für 5 Minuten bei 16060 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette entfernt. Falls dabei Gewebe mit angesaugt wurde, muß alles zurück in das Tube pipettiert und die Zentrifugation wiederholt werden. Um das gesamte Paraffin entfernen zu können, werden die durchgeführten Schritte dreimal wiederholt. Anschließend werden 0,5 ml 99,8%-iges Ethanol vorsichtig in das Tube pipettiert und für 30 Sekunden gevortext. Das Ethanol bewirkt eine Fällung der DNA (Newton 1994). Das Gemisch wird erneut für 5 Minuten bei 16060 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Die geöffneten Tubes werden bei 55°C im Thermoschüttler bei 400 rpm über Nacht getrocknet. Die Tubes werden nach der Trocknung vorsichtig geschlossen, da statische Aufladungen das Gewebe aus dem Tube springen lassen können.

### **3.4 DNA-Isolierung**

Je nach Materialmenge werden 60 bis 240 µl des ReadyAmp® Genomic DNA Purification Kits zu dem getrockneten Gewebe hinzugefügt bis das Gewebe vollständig bedeckt ist. Anschließend wird gevortext bis das Gewebe gleichmäßig

vermischt ist und für 20 Minuten bei 56°C in einem Thermoschüttler unter leichtem Schütteln inkubiert. Dem folgt eine Inkubationsphase von 10 Minuten bei 99°C ebenfalls unter leichtem Schütteln in einem Thermoschüttler. Das Tube wird dann für 2 Minuten bei 16060 g und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand mit der darin enthaltenen DNA in ein neues Tube überführt. Dieses wird bis zur PCR bei -20°C aufbewahrt.

### **3.5 mtLSU nested PCR**

Bei jedem PCR-Ansatz werden zwei Negativ- und eine Positiv-Kontrolle mitgeführt. Pro Probenansatz wird ein Mastermix mit 31,75 µl Aqua dest., 5 µl 10x PCR-Puffer, 2 µl MgCl<sub>2</sub>, jeweils 1 µl der Primer pAZ102-E (5'-GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA-3') und pAZ102-H (5'-GTG TAC GTT GCA AAG TAC TC-3') (Tab. 6), 5 µl dNTP's und 0,25 µl Taq Polymerase in einem 1,5 ml Tube angesetzt (Tab. 7). Anschließend wird der Mastermix kurz gemixt. 45 µl Mastermix und 10 µl Probe werden in jedes vorbereitete 0,2 ml PCR-Tube pipettiert, gut vermischt und fest verschlossen. Als Negativ-Kontrollen werden jeweils 10 µl Aqua dest. und als Positiv-Kontrolle werden 10 µl einer bekannten positiven Probe, die von einem PCP-Patienten stammt, verwendet. Die 0,2 ml PCR-Tubes werden in einen Thermocycler gestellt. Das PCR-Programm dauert drei Stunden und zehn Minuten und beginnt mit fünf Minuten bei 94°C. Dem folgen 40 Zyklen von 30 Sekunden bei 94°C, 30 Sekunden bei 55°C und 30 Sekunden bei 72°C. Das PCR-Programm endet mit einer terminalen Extension von fünf Minuten bei 72°C. Bei 4°C werden die PCR- Tubes in dem Thermocycler bis zur Agarose-Gel-Elektrophorese aufbewahrt.

Für die zweite Stufe der mtLSU nested PCR werden die Primer P1 (5'- CTA GGA TAT AGC TGG TTT TC -3') und P2 (5'- TCG ACT ATC TAG CTT ATC GC -3') verwendet (Tab. 6). Der Mastermix-Ansatz ist bis auf die verwendeten Primer mit dem der ersten Stufe identisch (Tab. 7). Anschließend werden 45 µl des Mastermixes und 1 µl des Amplifikates aus der ersten Stufe der mtLSU nPCR in ein vorbereitetes 0,2 ml PCR-Tube pipettiert. Die Proben werden gut gemischt und in einen PCR-Cycler gestellt. Das PCR-Programm für die zweite Stufe der mtLSU nPCR dauert eine Stunde und 40 Minuten und beginnt mit einer Minute bei 94°C. Danach werden 30 Zyklen von jeweils einer Minute 20 Sekunden bei 94°C, einer

Minute 20 Sekunden bei 55°C und einer Minute 20 Sekunden bei 72°C durchlaufen. Abschließend folgt eine terminale Extension von fünf Minuten bei 72°C. Die Aufbewahrung im Gerät bis zur Agarose-Gel-Elektrophorese findet bei 4°C statt.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Literatur</b>
pAZ102-E	1. Stufe der mtLSU nPCR	5'- GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA -3'	Wakefield 1990
pAZ102-H	1. Stufe der mtLSU nPCR	5'- GTG TAC GTT GCA AAG TAC TC -3'	Wakefield 1990
P1	2. Stufe der mtLSU nPCR	5'- CTA GGA TAT AGC TGG TTT TC -3'	
P2	2. Stufe der mtLSU nPCR	5'- TCG ACT ATC TAG CTT ATC GC -3'	

Tab. 6. Primer der mtLSU nPCR zum Nachweis von *P. jirovecii*

<b>Material</b>	<b>Menge (<math>\mu</math>l)</b>
Aqua dest.	31,75
10x PCR-Puffer	5
MgCl <sub>2</sub>	2
Primer 1: pAZ 102-E / P1	1
Primer 2: pAZ 102-H / P2	1
dNTP's	5
Taq Polymerase	0,25
Probe 1. Stufe / 2. Stufe	10 / 1

Tab. 7. Zusammensetzung des mtLSU nPCR-Reaktionsansatzes pro Probe

### 3.6 Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Herstellung des Agarosegels werden 2 g Agarose und 200 ml 1x TBE-Puffer verwendet. Zur Herstellung des 1x TBE-Puffers werden 100 ml einer 10x TBE-Stammlösung mit einem pH 8,3 auf 1000 ml mit Aqua dest. ergänzt. Die Stammlösung setzt sich aus einem Gemisch von 121,4 g Tris (100 mM), 61,8 g

Borsäure (100 mM) und 7,3 g EDTA (2,5 mM), das mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt wird, zusammen. Die Agarose und der 1x TBE-Puffer werden in einer Mikrowelle unter zwischenzeitlichem leichtem Schwenken bis zur vollständigen Aufklärung geschmolzen. Danach werden 10 µl Ethidiumbromid-Stocklösung hinzugegeben und vermischt. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA eindringt. Die Stocklösung setzt sich zusammen aus 10 mg Ethidiumbromid, das auf 1 ml mit Aqua dest. ergänzt wird.

Das flüssige Agarosegel wird in eine Gelkammer gegossen und entsprechend der Größe der Kammer ein passender Kamm eingesetzt. Das Gel lässt man nun vollständig erkalten und entfernt danach den Kamm. Mit den Geltaschen in Richtung Kathode wird das Gel in eine Elektrophoresekammer gesetzt und mit 1x TBE-Puffer bedeckt. Für die Elektrophorese wird ein Probenbeladungspuffer (GEBS) benötigt, der sich aus 250 mg Bromphenolblau und 250 mg Xylencyanol zusammensetzt, die in 33 ml einer 150 mM Tris-Lösung (pH 7,6) gelöst werden. Anschließend werden 60 ml Glycerol und 7 ml Aqua dest. dazu gegeben. Anschließend werden in einer Mikrotiterplatte je 2,6 µl GEBS mit jeweils 10 µl PCR-Amplifikat vermischt. 10 µl dieses Gemisches werden in eine Geltasche pipettiert und die Position der einzelnen Proben notiert. In die erste Tasche werden 2,6 µl eines 100 Basenpaar-Standards pipettiert. Die Elektrophorese wird bei 200 V für 20 Minuten durchgeführt und das Gel anschließend unter UV-Licht fotografiert. Wenn unter einer UV-Bank bei ca. 350 bp eine Bande sichtbar wird, dann konnte *P. jirovecii* in der ersten Stufe der mtLSU nPCR nachgewiesen werden. In der zweiten Stufe gilt eine Bande bei ca. 205 bp als Nachweis des Erregers. Zur Überprüfung müssen in der jeweiligen Stufe die Positiv-Kontrolle positiv und die Negativ-Kontrollen negativ sein. Andernfalls darf das PCR-Ergebnis nicht verwendet werden.

### 3.7 DHPS nested PCR

Die aus der mtLSU nPCR hervorgegangenen positiven Proben werden mittels einer zweiten nPCR im Hinblick auf Sulfamethoxazolresistenzen untersucht. Dafür wird eine Teilsequenz des Gens, welches für die Dihydropteroatsynthase kodiert, repliziert. Mutationen auf diesem Gen sollen, wie bereits beschrieben, zum Teil für Resistenzen gegen das Medikament Sulfamethoxazol verantwortlich sein.

Der Mastermix setzt sich in der ersten Stufe aus 31,75 µl Aqua dest., 5 µl 10x PCR-Puffer, 4 µl MgCl<sub>2</sub>, 5 µl dNTP's, jeweils 1 µl des Primers PK95 (5'- GCG TAT CGA ATG ACC TTG TTC ATC CT -3') und PS634 (5'- GCA ACC AAG GCA AAC CAT TAA AGC -3') (Tab. 8) und 0,25 µl Taq Polymerase pro Probe zusammen. Anschließend wird der Mastermix kurz gemischt und 45 µl mit 10 µl der jeweiligen Probe in jedes 0,2 ml PCR-Tube pipettiert (Tab. 9). Bei diesem PCR-Ansatz werden zwei Negativ-Kontrollen und eine Positiv-Kontrolle mitgeführt. Die fest verschlossenen PCR-Tubes werden in einen Thermocycler gestellt. Das nun folgende PCR-Programm mit einer Dauer von fünf Stunden beginnt mit neun Minuten bei 95 °C. Dem folgen 45 Zyklen von einer Minute bei 94 °C, zwei Minuten bei 63 °C und drei Minuten bei 72 °C. Das Programm endet mit einer terminalen Extension von zehn Minuten bei 72 °C. Anschließend werden die Proben bei 4 °C im Thermocycler bis zur weiteren Verwendung gekühlt.

Für den Mastermix der zweiten Stufe der DHPS nPCR werden die Primer PK160 (5'- GTT AAT CCT GGT ATT AAA CCA GTT TTG CCA TT -3') und B<sub>nest</sub> (5'- GGA ACT TTC AAC TTG GCA ACC AC -3') verwendet (Tab. 8). Der Mastermix wird entsprechend der Zusammensetzung der ersten Stufe der DHPS nPCR mit den neuen Primern hergestellt (Tab. 9). Anschließend werden 45 µl des Mastermixes und 10 µl des Amplifikates aus der ersten DHPS nPCR Stufe in ein 0,2 ml PCR-Tube pipettiert und vermischt. Eine Positiv- und zwei Negativ-Kontrollen werden wie bisher mitgeführt. Die PCR-Tubes werden fest verschlossen in den Thermocycler gestellt. Das dort ablaufende PCR-Programm entspricht dem PCR-Programm der ersten Stufe der DHPS nPCR.

Die Proben der ersten und zweiten Stufe werden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese nach dem bereits bei der mtLSU nPCR beschriebenen Schema aufgetrennt und unter einer UV-Bank sichtbar gemacht. Wenn bei ca. 750 bp eine Bande sichtbar ist, wurde *P. jirovecii* in der ersten Stufe nachgewiesen. Eine Bande bei ca. 400 bp spricht für den Nachweis des Erregers in der zweiten Stufe. Bei der verwendeten Positiv-Kontrolle muss jeweils an der genannten Stelle eine Bande und bei den Negativ-Kontrollen keine Bande nachweisbar sein.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Literatur</b>
PK95	1. Stufe der DHPS nPCR	5'- GCG TAT CGA ATG ACC TTG TTC ATC CT -3'	Riebold 2005
PS634	1. Stufe der DHPS nPCR	5'- GCA ACC AAG GCA AAC CAT TAA AGC -3'	Riebold 2005
PK160	2. Stufe der DHPS nPCR	5'- GTT AAT CCT GGT ATT AAA CCA GTT TTG CCA TT -3'	Riebold 2005
B <sub>nest</sub>	2. Stufe der DHPS nPCR	5'- GGA ACT TTC AAC TTG GCA ACC AC -3'	Riebold 2005

Tab. 8. Primer der DHPS nPCR zum Nachweis von *P. jirovecii*

<b>Material</b>	<b>Menge (<math>\mu</math>l)</b>
Aqua dest.	31,75
10x PCR-Puffer	5
MgCl <sub>2</sub>	4
Primer 1: PK95 / PK160	1
Primer 2: PS634 / B <sub>nest</sub>	1
dNTP's	5
Taq Polymerase	0,25
Probe 1. Stufe / 2. Stufe	10 / 10

Tab. 9. Zusammensetzung des DHPS nPCR-Reaktionsansatzes pro Probe

### **3.8 DNA Reinigung, Messung des DNA-Gehaltes und der Reinheit, Vorbereitung zur Sequenzierung**

Um die aus beiden PCR-Methoden hervorgegangenen positiven Proben zur Bestätigung des PCR-Ergebnisses sequenzieren lassen zu können, müssen diese Proben aufgereinigt und verdünnt werden. Für die Aufbereitung wird ein QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Dabei werden zu Beginn 35  $\mu$ l DNA-Amplifikat in ein 1,5 ml Tube pipettiert und mit 175  $\mu$ l PB Puffer vermischt. Das Gemisch wird auf eine Säule des Kits pipettiert, für eine Minute inkubiert und eine Minute bei 16000 g zentrifugiert. Das Zentrifugat wird verworfen

und das Auffangtube getrocknet. Anschließend werden 750 µl PE Puffer auf die Säule gegeben und erneut für eine Minute mit 16000 g zentrifugiert. Das Zentrifugat wird erneut verworfen und das Auffangtube erneut getrocknet. Dem folgt eine erneute Zentrifugation für eine Minute bei 16000 g. Das Zentrifugat und das Auffangtube werden verworfen und die Säule in ein neues 1,5 ml Tube gestellt. Im folgenden Schritt werden 30 µl Aqua dest. auf die Säule pipettiert, wiederum für eine Minute inkubiert und eine Minute lang bei 16000 g zentrifugiert. Dieser letzte Schritt wird einmal wiederholt. Die nun aufgereinigte DNA ist in dem Zentrifugat enthalten, so dass die Säule verworfen werden kann. Die DNA kann bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C aufbewahrt oder direkt nach der Reinigung weiter verwendet werden.

Der DNA-Gehalt (µg/ml) und die Ratio jeder Probe werden mittels Photometer bestimmt. Dabei werden 10 µl der aufgereinigten DNA in eine Küvette aus Quarzglas pipettiert und die Extinktion der Lösung bei 260 und 280 nm im Photometer gemessen.

Die für die DNA-Sequenzierung erforderliche Probenmenge richtet sich nach der Länge des Amplifikates. Es werden in dieser Studie 120 ng DNA in 20 µl Aqua dest. benötigt. Zur Berechnung werden 120 ng DNA durch den DNA-Gehalt (µg/ml) der jeweiligen Probe dividiert. Das Ergebnis (in µl) wird auf 20 µl mit Aqua dest. aufgefüllt. Bis zum Versand werden die Proben bei -20°C gelagert. Pro Sequenzierungsversand werden ebenfalls 20 µl des jeweiligen Sequenzierungsprimers in ein 1,5 ml Tube gefüllt und zusammen mit den vorbereiteten Proben an den MWG Genotech sequencing service (Ansbach, Deutschland) verschickt. Für die mtLSU nPCR werden die Primer pAZ 102-H und P1 benötigt sowie die Primer PK95 und PK160 für die DHPS nPCR.

### **3.9 Auswertung der DNA-Sequenzierung**

Die Analyse der Nukleinsäuresequenzen erfolgt unter Verwendung der Datenbank des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) und des National Center of Biotechnology Information (NCBI), welche die meisten bisher veröffentlichten DNA- und RNA-Sequenzen archivieren. Die Datenbanksuche wird

mittels des Programms BLASTN durchgeführt. Dabei erfolgt ein paarweiser Sequenzvergleich zwischen Suchsequenz und Datenbankbeständen. Die kongruentesten DNA-Sequenzen der Datenbank werden als Ergebnis übermittelt. Anschließend werden die eigenen mit den von der Datenbank ermittelten Sequenzen zusätzlich per Hand verglichen, um eventuell vorhandene Abweichungen zu charakterisieren.

Da bisher noch nicht das gesamte mtLSU rRNA Gen mit dem zur Aminosäure-Sequenz-Auswertung nötigen Start-Codon bekannt ist, konnten Abweichungen der DNA-Sequenzen nicht im Hinblick auf Veränderungen in der Aminosäuresequenz verglichen werden. Veränderungen in der Sequenz des DHPS Gens wurden mit der bereits bekannten kompletten DHPS Sequenz mittels PDRAW32 verglichen und in Bezug auf einen Aminosäureaustausch untersucht. Die Folgen des Aminosäureaustausches im Hinblick auf eventuelle Veränderungen der daraus resultierenden Proteinstruktur konnten nicht evaluiert werden.

### **3.10 Maßnahmen zur Vermeidung einer Kontamination**

Die hohe Sensitivität macht die PCR als molekularbiologisches, diagnostisches Verfahren anfällig für Kontaminationen mit Fremd-DNA und andere Störfaktoren. Aus diesem Grund wurden die in dieser Studie durchgeführten einzelnen Versuchsschritte in getrennten Räumen durchgeführt. Außerdem wurde eine strikte räumliche Trennung von anderweitigen diagnostischen Maßnahmen (z.B. Mikroskopie, ELISA) eingehalten. Die bei allen Versuchsschritten verwendeten technischen Materialien wurden vor dem Gebrauch autoklaviert und verschlossen aufbewahrt. Die benutzten Geräte wurden vor und nach dem Gebrauch desinfiziert. Außerdem wurden Einmalhandschuhe getragen, um die Verschleppung von an den Händen haftenden Nukleasen zu minimieren.

Die Herstellung des Mastermixes für die PCR und die Aufteilung auf die einzelnen Proben wurden in einer Flowbox durchgeführt. Die dabei verwendeten Geräte, wie z.B. Pipetten, Pipettenspitzen, PCR-Tubes, wurden nach der Autoklavierung in geschlossenen Behältern in der Flowbox gelagert und nur innerhalb der Flowbox verwendet. Nach Beendigung der Arbeit in der Flowbox wurde sie desinfiziert und für

ca. 20 Minuten mit UV-Licht bestrahlt, um noch vorhandene DNA- und RNA-Reste zu zerstören. Zusätzlich wurden in jeder PCR je eine Positiv- sowie zwei Negativkontrollen mitgeführt. Eine Negativkontrolle der ersten Stufe der PCR wurde in der zweiten Stufe der PCR zusätzlich zu einer neuen Negativkontrolle reamplifiziert.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Ergebnisse der mtLSU nPCR**

Im Rahmen der Untersuchungen zum Nachweis von *P. jirovecii* DNA wurden 192 paraffinierte Proben von 122 Patienten untersucht. Jede Probe bestand aus insgesamt 10 Paraffinschnitten mit einer Dicke von jeweils 10 µm. Die Auswahl der Proben erfolgte zufällig und wurde durch das Institut der Pathologie der Universität Rostock durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Versuche waren keinerlei Angaben bezüglich der Patientenzahl, ihrer Daten, ihrer zugrunde liegenden Erkrankung, etc. bekannt. Demnach wurde eine doppel-blinde Versuchsreihe durchgeführt. Die Zuordnung der Patientendaten zur jeweiligen Probe erfolgte erst nach Abschluss der Untersuchungen. Dabei konnten drei von 192 Proben nicht eindeutig identifiziert werden. Als mögliche Ursache ist ein Übertragungsfehler der Probennummer während der Versuchsreihe zu sehen.

Nach Entblindung der 192 Proben stellte sich heraus, dass von einigen Patienten mehrere Proben untersucht worden waren. Insgesamt wurden bei 25 von 122 Patienten mehrere Proben (n=95) untersucht (Tab. 10). Insgesamt konnte bei 14 von 122 Patienten (11,5%) *P. jirovecii* DNA in der zweiten Stufe der mtLSU nPCR nachgewiesen werden. Bei keinem Patienten konnte *P. jirovecii* DNA in der 1. Stufe der mtLSU nPCR detektiert werden. Von den 25 Patienten mit mehreren untersuchten Proben waren fünf (20%) in der zweiten Stufe der mtLSU nPCR positiv. Jedoch war bei diesen fünf Patienten nur jeweils in einer der untersuchten Proben *P. jirovecii* DNA nachweisbar. Daraus folgt, dass bei fünf von 14 in der mtLSU nPCR positiven Patienten mehr als eine Probe untersucht wurde. Es konnte also bei 14 von 192 Proben (7,3%) *P. jirovecii* DNA nachgewiesen werden.

<b>Patient Nr.</b>	<b>Anzahl mtLSU nPCR positive Proben / Probenanzahl</b>	<b>Diagnose</b>
10	1 / 2	Neoplasie
18	1 / 3	Neoplasie
46	1 / 2	Neoplasie
74	0 / 2	Neoplasie

84	0 / 2	Neoplasie
85	0 / 3	Neoplasie
101	0 / 10	Neoplasie
114	0 / 7	Neoplasie
41	1 / 10	5x Neoplasie, 5x organtypischer Befund
66	0 / 2	1x Neoplasie, 1x Entzündung
72	0 / 2	1x Neoplasie, 1x Entzündung
76	1 / 8	5x Neoplasie, 3x Narbenknötchen
86	0 / 2	1x Neoplasie, 1x uncharakteristisch
9	0 / 3	Entzündung
17	0 / 5	Entzündung
32	0 / 2	Entzündung
57	0 / 2	Entzündung
64	0 / 2	Entzündung
68	0 / 2	Entzündung
69	0 / 2	Entzündung
80	0 / 3	Entzündung
45	0 / 3	2x Entzündung, 1x Tumorverdacht
40	0 / 5	Andere
77	0 / 9	Metabolisch
124	0 / 2	Tumorfrei

Tab. 10. Aufschlüsselung der Patienten mit mehreren Proben

Um eine objektive Auswertung der den Proben zugrunde liegenden histologischen Diagnosen zu ermöglichen, wurden die Diagnosen in neoplastische, entzündliche, metabolische, andere und fehlende Erkrankung aufgeteilt. Bei Patienten, bei denen mehrere Proben untersucht wurden, galt die Diagnose mit der größten

Behandlungskonsequenz als ausschlaggebend für die Zuordnung. Wenn z.B. bei einem Patienten sowohl die Diagnose einer Neoplasie als auch die eines organotypischen Befundes genannt wurde, wurde der Patient in die Gruppe der Neoplasien eingeordnet.

Die Aufschlüsselung der Patientendaten in Bezug auf die zugrunde liegenden histologischen Diagnosen zeigte, dass bei 59 von 122 Patienten (48,4%) eine Neoplasie, bei 44 (36,1%) eine Entzündung, bei einem (0,8%) eine metabolische Erkrankung, bei elf (9%) andere Erkrankungen, bei vier (3,3%) keine pathologische Diagnose vorlagen und bei drei Patienten (2,5%) die Histologie nicht eruierbar war.

13 von 59 Patienten (22%) mit einer Neoplasie waren in der zweiten Stufe der mtLSU nPCR positiv. Außerdem ließ sich bei einem von vier Patienten (25%) ohne pathologische Diagnose *P. jirovecii* DNA nachweisen. Folglich lag bei 13 von 14 Patienten (92,9%), die in der zweiten Stufe der mtLSU nPCR positiv waren, eine Neoplasie vor. Dabei waren sechs Patienten an einem Plattenepithelkarzinom, zwei an einem kleinzelligen Bronchialkarzinom, einer an einem Adenokarzinom, einer an einem Karzinoid und drei an pulmonalen Metastasen eines anderen extrapulmonalen Tumors erkrankt. Bei einem von 14 in der mtLSU nPCR positiven Patienten (7,1%) lag ein organotypischer Befund vor.

Die genaue Aufschlüsselung der Diagnosen in Bezug auf die Patientenanzahl sowie das Ergebnis der mtLSU nPCR sind in der Tabelle 11 dargestellt. Dabei lässt sich erkennen, dass bei 59 von 122 Patienten (48,4%) eine neoplastische Erkrankung und bei 63 von 122 Patienten (51,6%) keine Neoplasie als Grunderkrankung vorlag. Folglich war bei 13 von 59 Patienten (22%) mit bestehender Neoplasie und bei 1 von 63 (1,6%) Patienten ohne maligne Grunderkrankung *P. jirovecii* DNA nachweisbar ( $p<0,004$ ; Fisher's exact test). Das relative Risiko einer Kolonisation mit *P. jirovecii* ist demnach für Patienten mit einer malignen Grunderkrankung um das 13,9-fache höher als bei Patienten ohne Malignom, die Odds Ratio liegt bei 17,5 (Tab. 12).

<b>Diagnose</b>	<b>Patienten-anzahl</b>	<b>mtLSU nPCR Ergebnis (positiv / negativ)</b>
<b>Neoplastische Erkrankung:</b>		
Plattenepithelkarzinom	20	6 / 14
Adenokarzinom	5	1 / 4
Kleinzelliges Bronchialkarzinom	5	2 / 3
Karzinoid	2	1 / 1
Großzellig, neuroendokrines	1	0 / 1
Karzinom		
Nicht näher differenziertes	11	0 / 11
Bronchialkarzinom		
Metastase eines	13	3 / 10
extrapulmonalen Malignoms		
Malignes / zentroblastisches	1	0 / 1
Lymphom		
Verdacht auf ein	1	0 / 1
Plattenepithelkarzinom		
<b>Entzündliche Erkrankung:</b>		
Bronchitis	20	0 / 20
Sarkoidose	6	0 / 6
Pneumonie	5	0 / 5
Fibrose	3	0 / 3
Tuberkulose	2	0 / 2
Unspezifische Entzündung	8	0 / 8
<b>Metabolische Erkrankung:</b>		
Emphysem, Pneumothorax	1	0 / 1
<b>Sonstige Erkrankung:</b>		
Normalbefund	4	1 / 3
Unklarer Befund	8	0 / 8
Nekrose	2	0 / 2
Narbenknötchen	1	0 / 1
Fehlende Histologie	3	0 / 3

Tab. 11. Auswertung der Diagnosen

	<b>2. Stufe mtLSU nPCR positiv</b>	<b>2. Stufe mtLSU nPCR negativ</b>	<b>Summe</b>
<b>Patienten mit Neoplasie</b>	13	46	59
<b>Patienten ohne Neoplasie</b>	1	62	63
<b>Summe</b>	14	108	122

Tab. 12. Vierfeldertafel der *P. jirovecii* nPCR Ergebnisse

Bei 46 der 108 Patienten (42,6%) mit einem negativen mtLSU nPCR Ergebnis lag eine Neoplasie als Grunderkrankung vor. Bei den übrigen 62 von 108 Patienten lag bei 44 Patienten eine entzündliche und bei 15 eine nicht-entzündliche Erkrankung vor. Drei Diagnosen waren nicht eruierbar.

Einer der 108 negativen Patienten war an einer PCP, die histologisch mittels einer Grocott-Silberfärbung diagnostiziert worden war, erkrankt. In der mtLSU nPCR konnte jedoch *P. jirovecii* nicht detektiert werden.

In der Studie wurden insgesamt 85 Männer (69,7%), 34 Frauen (27,9%) und drei Patienten unbekannten Geschlechts untersucht. Acht von 14 (57,1%) in der mtLSU nPCR positiven Patienten waren männlichen und sechs weiblichen Geschlechts. Folglich waren 77 der 108 (71,3%) mtLSU nPCR negativen Patienten männlich, 28 (25,9%) weiblich und drei (2,8%) unbekannten Geschlechts. Das mittlere Alter der 119 untersuchten Patienten lag bei  $62,2 \text{ Jahren} \pm 13,8$  ( $x \pm SD$ ). Da von drei Patienten die Daten nicht eruierbar waren, können sie bei dieser Auswertung nicht berücksichtigt werden. Die 14 in der mtLSU nPCR positiven Patienten waren  $60,7 \text{ Jahre} \pm 15,6$  ( $x \pm SD$ ) alt. Das mittlere Alter der 105 Patienten ohne *P. jirovecii* DNA Nachweis lag bei  $62,4 \text{ Jahren} \pm 13,6$  ( $x \pm SD$ ) (Abb. 7).

Insgesamt konnten 12 der 14 in der zweiten Stufe der mtLSU nPCR positiven Proben sequenziert werden. Bei zwei Proben war die Sequenzierung wiederholt nicht erfolgreich. Es wurden bereits mehrere mtLSU rRNA Gen-Sequenzen beschrieben, die sich durch Nukleotid-Polymorphismen an Position 81, 85 und 248 unterscheiden (Chabé, Vargas 2004; Sinclair 1991, Gen Bank accession no. M58605, Lee 1993, Gen Bank accession no. Z19053). Bei den 12 Sequenzen dieser Studie wurden bei

sechs Patienten vier bisher nicht veröffentlichte Punktmutationen auf dem mtLSU rRNA Gen nachgewiesen (Abb. 8). Dabei war eine der Punktmutationen bei drei verschiedenen Patienten nachweisbar.

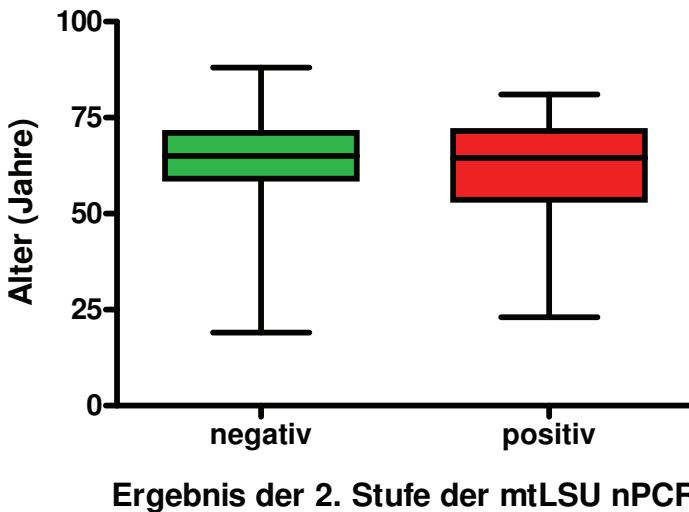


Abb. 7. Altersverteilung in Abhängigkeit vom mtLSU nPCR Ergebnis

mtLSU Sequenz	1	GTGATTGTGT ACGTTGCAAA GTACTCAGAA GAATTGTGGT AAGTAGTGAA	
mtLSU Sequenz	51	ATACAAATCG GGCTAGGATA TAGCTGGTT TCTGCGAAAA TTGTTTGGC	
Mutante Nr. 1			.....
Mutante Nr. 2			.....
Mutante Nr. 3			.....
Mutante Nr. 4			.....
mtLSU Sequenz	101	AAATTGTTTA TTCCTCTAAA AAATAGTAGG TATAGCACTG AATATCTGA	
Mutante Nr. 1			.....
Mutante Nr. 2			.....
Mutante Nr. 3			.....
Mutante Nr. 4			.....
mtLSU Sequenz	151	GGGAGTATGA AAATATTTAT CTCAGATATT TAATCTCAA ATAACATATT	
Mutante Nr. 1			.....
Mutante Nr. 2	.	A.....	.....
Mutante Nr. 3			.....
Mutante Nr. 4		G.....	.....
mtLSU Sequenz	201	CTTAAAATAA ATAATCAGAC TATGTGCGAT AAGGTAGATA GTCGAAAGGG	
Mutante Nr. 1			C.....
Mutante Nr. 2			.....
Mutante Nr. 3		.C.....	.....
Mutante Nr. 4			.....
mtLSU Sequenz	251	AAACAGCCCA GAACAGTAAT TAAAGCTCCC CAATTAATAT TAAGTGAAAT	

Abb. 8. *P. jirovecii* mtLSU rRNA Gensequenzen unserer Patienten im Vergleich zu einer Referenzsequenz (NCBI Accession Number AF 337535)

Eine der Punktmutationen wurde im mtLSU-Amplifikat bei Basenpaar 234 nachgewiesen. Diese Mutante ist durch einen Austausch von Guanin zu Cytosin gekennzeichnet und konnte parallel bei drei Patienten nachgewiesen werden. Alle drei Patienten waren an einer Neoplasie erkrankt. Bei einem dieser Patienten mit einem kleinzelligem Bronchialkarzinom konnte neben der Punktmutation auch der Wildtyp des mtLSU rRNA Gens nachgewiesen werden. Das Karzinom war am oberen Hiluspol rechts lokalisiert. Außerdem bestand eine prävertebrale Lymphknotenmetastasierung rechts des Ösophagus sowie eine Pankreasschwanz- und multiple Lebermetastasen. Ein weiterer Patient war an einer chronisch idiopathischen thrombozytopenischen Purpura (M. Werlhoff), in deren Rahmen bereits zwei Jahre vor dieser Probenentnahme eine Splenektomie durchgeführt worden war, und einer Lungenmetastase eines Plattenepithalkarzinoms erkrankt. Die Lungenmetastase stammt vermutlich von einem Kehlkopfkarzinom (Stimmbandkarzinom), welches bereits fünf Jahre zuvor mittels Chordektomie und Tracheotomie therapiert worden war. Zu diesem Zeitpunkt wurde außerdem eine bereits vorhandene Metastase im Zwischenbronchus diagnostiziert und therapiert. Nach der erneuten Diagnose einer pulmonalen Metastase wurde bei dem Patienten eine Pneumektomie durchgeführt. Im Verlauf wurden bei einer kurz darauf durchgeführten bronchoalveolären Lavage (BAL) Pseudomonaden nachgewiesen, die antibiotisch mit Gentamicin und Imipenem behandelt wurden. Bei dem dritten Patienten lag ein Plattenepithelkarzinom mit einer poststenotischen Pneumonie vor.

Eine weitere Punktmutation wurde im mtLSU-Amplifikat beim Basenpaar 152 nachgewiesen und zeigte einen Austausch von Guanin zu Adenin. Der Patient mit dieser Mutation war an einem Rezidiv eines Adenokarzinoms erkrankt, welches bereits mittels partieller Lungenresektion und Bestrahlung vor drei Jahren therapiert worden war. Anamnestisch sind außerdem eine therapierte Tuberkulose vor 40 Jahren, eine Strumektomie bei einem kalten Knoten vor 20 Jahren sowie eine 2/3-Resektion des Magens aufgrund eines Ulcus vor 20 Jahren bekannt. Im Rahmen der Tumortherapie vor drei Jahren ist eine antibiotische Behandlung mit Trimethoprim und Sulfamethoxazol (160 mg + 800 mg, zweimal täglich) durchgeführt worden.

Ein Austausch von Thymin zu Cytosin auf Basenpaar 212 war bei einem Patienten mit einem Bronchialkarzinoid im linken Oberlappenbronchus und einer zwei Monate

zuvor mit Moxifloxacin therapierten poststenotischen Pneumonie mit Pleurabeteiligung nachweisbar. Histologisch lagen keine Zeichen einer beginnenden Malignität vor. Es zeigte sich lediglich eine chronisch fort dauernde granulierende und lymphozytäre Entzündung der umgebenden Bronchialschleimhaut. Aus der Vorgeschichte gehen bei diesem Patienten eine bereits sechs Jahre zuvor therapierte poststenotische Pneumonie sowie ein seit dieser Zeit fast monatliches Auftreten von Hämoptysen hervor.

Eine weitere Punktmutation mit einem Austausch von Adenin zu Guanin am Basenpaar 162 sowie der Wildtyp des mtLSU rRNA Gens wurden bei einem Patienten gefunden, der an einem Plattenepithelkarzinom und einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) erkrankt war. Weiterhin war der Patient an einer arteriellen Hypertonie, einer koronaren Herzkrankheit, einer Hyperlipidämie und einer Polyarthrose erkrankt. Die Polyarthrose bestand aus einer Spondylochondrose der Lendenwirbelsäule, einer Arthrose der rechten Schulter und rechten Hüfte, die mit einer Totalendoprothese vier Jahre zuvor versorgt worden war (Tab. 13).

Patient Nr.	Alter	Geschlecht	Grunderkrankung	Lokalisation der Mutation	Austausch der Base	Vermutete Schlussfolgerung
10	48	Männlich	Lungenmetastase eines Plattenepithelkarzinoms, M. Werlhoff	234 m	G zu C	
53	63	Männlich	Plattenepithelkarzinom mit poststenotischer Pneumonie	234 m	G zu C	
50	66	Männlich	Kleinzeliges Bronchialkarzinom	234 m 234 wt	G zu C G	Zwei Genotypen
46	71	Männlich	Rezidiv eines Adenokarzinoms	152 m	G zu A	
34	23	Männlich	Karzinoid mit poststenotischer Pneumonie	212 m	T zu C	
87	72	Weiblich	Plattenepithelkarzinom, COPD	162 m 162 wt	A zu G A	Zwei Genotypen

Tab. 13. Nachgewiesene Punktmutationen des mtLSU rRNA Gens  
m = Mutation, wt = Wildtyp

## 4.2 Ergebnisse der DHPS nPCR

Die insgesamt 14 aus der zweiten Stufe der mtLSU nPCR hervorgegangenen positiven Proben wurden anschließend mittels DHPS nPCR untersucht. Bei zwei von 14 Proben (14,3%) konnte *P. jirovecii* DNA mittels DHPS nPCR nachgewiesen werden. Eine der Proben war sowohl in der ersten als auch der zweiten Stufe der DHPS nPCR positiv. Die andere Probe war nur in der zweiten Stufe der nPCR positiv.

Die DNA Sequenzierung dieser beiden Proben zeigte keine der bereits bekannten, mit einer eventuellen Resistenz gegen Sulfamethoxazol einhergehenden Punktmutationen auf dem DHPS Gen, die auf Codon 13, 16, 23, 26, 55, 57, 60, 111, 171 oder 248 beschrieben worden sind (Abb. 9) (Lane 1997, Takahashi 2000, Riebold 2006).

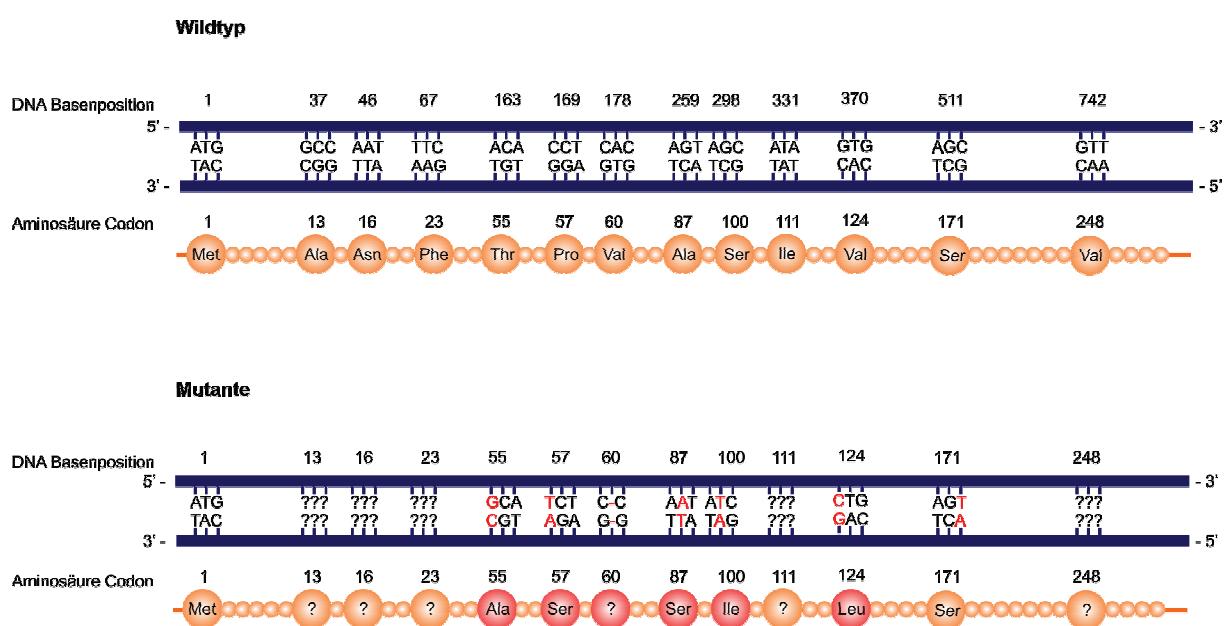


Abb. 9. Schematische Darstellung des DHPS Gens (blau) und der daraus resultierenden Dihydropteroatsynthase (orange) mit allen bekannten Punktmutationsstellen und den daraus resultierenden Aminosäure-Austauschen in der Dihydropteroatsynthase

Bei einem der Patienten wurde jedoch eine Koinfektion mit dem Wildtyp und einer bisher nicht bekannten Mutante des DHPS Gens gefunden. Die mutante *P. jirovecii*

DNA zeigte zwei Punktmutationen (Abb. 10). In Basenpaar 442 wurde dabei Guanin zu Adenin getauscht, was zu einem Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin auf Codon 87 des Enzyms Dihydropteroatsynthase führt. Bei der zweiten Punktmutation in Basenpaar 481 wurde Guanin zu Thymin gewechselt. Diese Sequenzveränderung führt zu einem Austausch der Aminosäure Alanin zu Serin auf Codon 100. Die Punktmutationen des DHPS Gens wurden bei einem Patienten gefunden, der an einer Neuroborreliose Stadium 3, einer *Helicobacter pylori*-Gastritis, einer Kachexie unbekannten Ursprungs sowie einem Vitamin B12 Mangel erkrankt war. Die Histologie zeigte einen organtypischen Befund und konnte den Verdacht auf das Vorliegen einer Sarkoidose nicht bestätigen.

DHPS Sequenz	1	AAACCACCTT GCGAGTAAGT ATATATAAAT AGAATAATTA TTTTTAATT
DHPS Sequenz	51	ACAAATTAGC GTATCGAATG ACCTTGTCA TCCTATTACT GGATTACCTA
DHPS Sequenz	101	TAGTTCTTA TCTTAAGAAA ATTGTTAAC CTGGTATTAA ACCAGTTTG
DHPS Sequenz	151	CCATTTTAT ATAAAAATAG AAGTATAAAT TTTAGTTCTG AATTTATAAA
DHPS Sequenz	201	AGCGCCTACA CATATTATGG CCATTTAAA TCTTACTCCT GATTCTTTT
DHPS Sequenz	251	TCGATGGGG TGTTCATTCAT TATGATTCTA TATTAATGGA TGTGGAGAAT
DHPS Sequenz	301	TTTATAAATG CAGGGCGAC GATAATTGAT ATTGGTGGGC AGTCTACACG
DHPS Sequenz	351	GCCTGGTCA CATGTTGTT CTATAGAGGA AGAGATTCT CGAGTTATT
Mutante DHPS		.....
DHPS Sequenz	401	CTGCTATAAA ATATCTCTTA AAAGTATATC CTGATATTT AGTAAGTGTA
Mutante DHPS		..... .A.....
DHPS Sequenz	451	GATACTTTTC GTTCTGAGGT TGCAGAACAA GCAATTAAGG CTGGTGCTAG
Mutanten DHPS		..... T.....
DHPS Sequenz	501	TCTTGTAAAT GATATAAGTG GGGGAAGGTA TGATCCAAAA ATGCTTAATG
Mutante DHPS		.....
DHPS Sequenz	551	TGGTTGCCAA GTTGAAAGTT CCAATATGTA TAATGCATAT GAGAGGTGAT
Mutante DHPS		.....

Abb. 10. *P. jirovecii* DHPS Gensequenz unseres Patienten im Vergleich zu einer Referenzsequenz (NCBI Accession Number AF 139132)

Der zweite Patient, bei dem DHPS DNA nachgewiesen werden konnte, war an einem Plattenepithelkarzinom der Lunge erkrankt. Veränderungen am DHPS Genfragment konnten nicht festgestellt werden.

Eine gleichzeitige Veränderung der Sequenz des mtLSU rRNA Gens lag bei beiden Patienten mit einem positiven DHPS DNA Nachweis nicht vor.

#### **4.3 Auswertung der Labordaten**

Bei der Durchsicht der Patientenakten der 14 in der mtLSU nPCR positiven Patienten konnten von zehn Patienten Laborwerte evaluiert werden (Tab. 14).

Es zeigte sich bei fünf von zehn Patienten eine Erhöhung des C-reaktiven Proteins (CRP). Vier von fünf Patienten hatten lediglich eine leichte Erhöhung des CRPs von einem oberen Referenzwert von 5,0 mg/l auf 11,5 mg/l, 13,6 mg/l, 13,8 mg/l bzw. 15,4 mg/l, bei einem Patienten war der Wert deutlich auf 127 mg/l angestiegen. Als zugrunde liegende Erkrankung war bei diesem Patienten lediglich eine Neoplasie, aber keine Entzündung nachweisbar. Bei insgesamt zwei von zehn Patienten war eine leichte Erhöhung der Leukozyten vom oberen Referenzwert von 10,0 G/l auf 12,1 G/l und 12,4 G/l nachweisbar. Vier von sieben Patienten hatten eine Lymphopenie von 4,0%, 8,0%, 15,0% und 18,0% bei einem Referenzbereich von 20% bis 42%, und bei einem dieser sieben lagen die neutrophilen Granulozyten im oberen Normbereich (83%) bei einem Referenzbereich von 36% bis 84%. Bei dem Patienten waren neben malignen Zellen eines Kleinzelligen Bronchialkarzinoms histologisch auch Pilzfäden nachweisbar. Die in dieser Studie untersuchten lymphopenischen Patienten waren alle an einem Malignom erkrankt.

Patient Nr.	Leukozyten (G/l)	Lymphozyten (%)	Neutrophile Granulozyten (%)	Fibrinogen (g/l)	Hämoglobin (mmol/l)	LDH (U/l)	CRP (mg/l)
121	8,69	24,3	68,9	-	6,0	293	<2,0
53	-	-	-	-	-	-	-
94	7,12	-	-	-	7,1	305	15,4
41	-	-	-	-	-	-	-
10	7,98	33,8	50,1	3,0	8,2	282	2,1
50	5,94	18,0	66,0	5,8	10,0	471	11,5
75	6,78	8,0	74,0	-	6,2	253	127
46	6,73	15,0	74,5	3,2	8,2	406	3,5
33	-	-	-	-	-	-	-
18	8,28	-	-	7,2	8,2	453	13,8
38	12,4	4,0	83,0	-	8,3	390	3,8
60	-	-	-	-	-	-	-
87	12,1	-	-	-	9,1	352	13,6
34	6,0	1,3 (GPT/l)	4,2 (GPT/l)	-	9,1	234	5,0

Tab. 14. Auswertung der Labordaten der mtlSU nPCR positiven Patienten

Bei sieben von zehn Patienten war ein reduzierter Hämoglobinwert (Hb-Wert) messbar. Fünf von sieben Patienten hatten lediglich einen leicht verminderten Wert, bei einem Patienten auf 7,1 mmol/l bei einem Referenzbereich von 7,4 mmol/l bis 9,9 mmol/l, bei drei Patienten auf 8,2 mmol/l sowie einem Patienten auf 8,3 mmol/l bei einem Referenzbereich von 8,7 mmol/l bis 11,2 mmol/l. Bei zwei Patienten war ein deutlich reduzierter Hb-Wert auf 6,0 mmol/l bzw. 6,2 mmol/l bei einem Referenzbereich von 7,4 mmol/l bis 9,9 mmol/l nachweisbar. Bei einem dieser Patienten lag eine Lungenmetastase eines Nierenzellkarzinoms und beim zweiten ein Vitamin B12-Mangel bei bestehender Vitamin B12-Resorptionsstörung, eine Neuroborreliose Stadium 3, einer *Helicobacter pylori*-Gastritis sowie eine Kachexie unbekannten Ursprungs vor. Die fünf Patienten mit einem leicht verminderten Hb-Wert waren ebenfalls an einem Malignom erkrankt.

Die Laktatdehydrogenase (LDH) war bei keinem der Patienten erhöht. Der Referenzbereich liegt bei 0 U/l bis 480 U/l. Lediglich bei vier von zehn Patienten wurde der Fibrinogenwert bestimmt. Dabei war bei zwei Patienten eine leichte Erhöhung auf 5,8 g/l und 7,2 g/l bei einem Referenzbereich von 1,8 g/l bis 3,5 g/l nachweisbar. Bei allen vier Patienten lag eine maligne Erkrankung vor.

## 5. Diskussion

### 5.1 Sensitivität der PCR

Für den erfolgreichen Nachweis von DNA-Teilstücken eines Erregers mittels PCR haben die Anzahl der Organismen im Untersuchungsmaterial und die Materialmenge einen entscheidenden Einfluss. Aber auch die Anzahl der Kopien eines Gens in der DNA des Organismus kann eine entscheidende Rolle für die Sensitivität der PCR spielen. Bei *Peumocystis* sp. sind die mittels PCRs nachweisbare Dihydrofolatreduktase (DHFR) oder Dihydropteroatsynthase (DHPS) im Zellkern lokalisiert und liegen als single-copy-Gene vor. Daher sind bei reifen (achtkernigen) *Pneumocystis*-Zysten nur acht Kopien des Gens pro Zelle vorhanden. Das mtLSU rRNA Gen liegt ebenfalls nur als single-copy-Gen vor, ist aber in der Mitochondrien-DNA enthalten. Da in jeder Zelle mehrere tausend Mitochondrien vorhanden sind, liegt das mtLSU Gen in tausendfacher Anzahl pro Zelle vor. Daraus resultiert ein Vorteil für die Sensitivität der PCR (Chabé, Vargas 2004, Lane 1997).

In dieser Studie konnte bei 14 von 122 Patienten (11,5%) mittels mtLSU nPCR *P. jirovecii* DNA nachgewiesen werden. Mittels DHPS nPCR gelang dies dagegen nur bei zwei von diesen 14 Proben. Es konnten die Ergebnisse einer vorangegangenen Studie bestätigt werden, in der die mtLSU nPCR zum Nachweis von *P. jirovecii* aufgrund der höheren Sensitivität besser geeignet ist als die DHPS nPCR (Riebold Diss 2006).

In einer vergleichenden Studie wurde als Nachweismethode von *P. jirovecii* neben anderen PCR-Methoden die ITS nested PCR (ITS nPCR) verwendet und im Ergebnis als sensitivste Methodik postuliert (Lu 1995). Obwohl dabei für jede PCR-Methode 100 ng DNA der jeweiligen Probe zur Verfügung stand, wurde in diesen Experimenten als Vergleichsmethode zur ITS nPCR nicht die mtLSU nPCR sondern nur eine mtLSU single PCR verwendet. Da in einer nested PCR die DNA-Replikation in der zweiten Stufe erneut durchgeführt wird, scheinen der Vergleich einer single mit einer nested PCR nicht geeignet, um eine Aussage bezüglich der Sensitivität zu treffen. In der gleichen Studie wird die mtLSU PCR aber auch als sensitivste single PCR-Methode benannt. Da mit der zweiten Replikation in der nested PCR die DNA

nochmals exponentiell vervielfältigt wird, sollte man für eine Aussage bezüglich der Sensitivität nur nested PCR-Methoden miteinander vergleichen.

## **5.2 *Pneumocystis*-Nachweis in paraffin-fixierten Gewebeschnitten**

Ein Nachweis von Mikroorganismen aus in Paraffin eingebetteten Untersuchungsmaterialien ist bereits mehrfach für andere Organismen beschrieben worden (Lisby 1994, Scholte 1997). Dabei konnte sowohl in frischem als auch in paraffin-fixiertem intestinalem Gewebe DNA eines als multi-copy vorliegenden Elementes (IS900), das spezifisch für *Mycobacterium paratuberculosis* ist, mittels nested PCR nachgewiesen werden (Lisby 1994). Mittels PCR konnte ebenfalls ein 145 Basenpaare langes Fragment der 16S-rRNA von *Helicobacter pylori* in zuvor paraffin-fixiertem Gewebe nachgewiesen werden (Scholte 1997). Ob paraffinierte Untersuchungsmaterialien der Lunge auch für die *Pneumocystis*-Diagnostik verwendet werden können, ist bisher nicht ausreichend untersucht worden.

Mittels Formalinfixierung wird eine Konservierung der Morphologie des Gewebes erreicht. Es ist beschrieben, dass durch die Formalinfixierung und Paraffineinbettung die Bildung von Protein-DNA cross-links möglich ist, die die Analyse der Nukleinsäuren limitieren kann (Chabé, Vargas 2004; Wu 2002). Dabei scheint die Dauer der Formalinfixierung eine entscheidende Rolle zu spielen (Castiglione 2007). Eine zeitlich kurze Formalinfixierung führt nicht zu einer Zerstörung der zu untersuchenden DNA (Sano 2007). Eine lange Formalinfixierung beeinflusst die Länge des zu untersuchenden DNA-Fragmentes und die Bildung von Sekundärstrukturen (Castiglione 2007). Die Paraffineinbettung dagegen beeinflusst nicht den DNA-Gehalt des mittels PCR zu untersuchenden Gens in einem Gewebe. Es konnte gezeigt werden, dass kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen einer erfolgreichen DNA-Amplifizierung aus formalinfixiertem versus paraffinfixiertem Gewebe besteht (Castiglione 2007). Sowohl in frischen als auch in formalinfixierten und Paraffin eingebetteten Lymphknoten konnte nach der DNA-Isolierung *Mycobacterium tuberculosis* mittels PCR nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass es zu einem Auftreten von unspezifischen DNA-Banden auf dem Agarose-Gel bei den vorher fixierten Geweben kam. Bedingt ist dies möglicherweise durch die fehlerhafte Anwendung der Methoden, eine Zerstörung der DNA im Rahmen der

Formalinfixierung oder die zeitliche Verzögerung, die durch die Fixierung verursacht wird (Cataloluk 2003). Durch die Extraktion der DNA aus in Paraffin eingebettetem Gewebe kann es zu einer DNA-Fragmentierung kommen (Loeschke 2005). Es handelt sich bei der Entparaffinisierung um eine Methode, die wenig geschützte DNA zerstören kann. Bei den Mykobakterien schützt beispielsweise die rigide Zellwand die DNA vor einer möglichen Zerstörung durch externe Substanzen (Loeschke 2005).

Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass die *Pneumocystis*-DNA weder durch den Vorgang der Paraffinisierung noch bei der Aufbereitung durch die Entparaffinisierung zerstört wird. Das Auftreten unspezifischer DNA-Banden in der Gel-Elektrophorese konnte nicht beobachtet werden.

Somit bietet sich in der Diagnostik die Möglichkeit, *P. jirovecii* auch retrospektiv bei Patienten aus bereits konserviertem Material nachzuweisen. Bei einem Patienten kann beispielsweise das bereits in einer bronchialen Biopsie gewonnene und anschließend paraffinierte Material aufgearbeitet werden. Bei einem bestehenden PCP-Verdacht folgt anschließend eine Untersuchung der Probe mit den beschriebenen Methoden. Auch andere Erkrankungen können so mit Hilfe der entsprechenden Methoden retrospektiv diagnostiziert werden. Für den klinischen Alltag eröffnet diese Methodik einen neuen diagnostischen Rahmen.

Da in der Literatur eine Zerstörung der DNA mittels Formalinfixierung oder der Nachweis von unspezifischen DNA-Banden in der Elektrophorese beschrieben wurde, stellt sich die Frage, ob eventuell ein noch höherer Prozentsatz der in dieser Studie untersuchten Patienten mit *P. jirovecii* besiedelt war. Diese Frage ließe sich mittels einer weiteren Studie klären, in der man paraffinierte Schnitte mit nicht konserviertem und aus der gleichen Untersuchung stammendem frischem Lungenmaterial mittels PCR vergleicht. Falls sich dabei kein Unterschied in der Besiedelung zeigen würde, wäre eine Etablierung des *Pneumocystis*-DNA-Nachweises aus konserviertem Lungenmaterial in der Routine-Diagnostik möglich. Wenn sich jedoch ein Qualitäts- und / oder Quantitätsunterschied zwischen einer PCR-Untersuchung mit paraffiniertem und nativem pulmonalem Material zeigen würde, könnte das in der Sensitivität unterlegene Material als diagnostisches Mittel der zweiten Wahl beibehalten werden.

Bei dem in dieser Studie verwendeten pulmonalen Material standen nur geringe Materialmengen der für die histologische Diagnostik angefertigten Paraffinblöcke zur Verfügung. Aus diesen wurde mit Hilfe der beschriebenen Methoden die DNA isoliert und mittels PCR repliziert. Die Ergebnisse der PCR müssen deshalb immer vor diesem Hintergrund betrachtet werden. Bei der Verwendung eines quantitativ hochwertigeren Materials hätte *P. jirovecii* eventuell in einem höheren Prozentsatz bei den Patienten nachgewiesen werden können. Die Verwendung von Materialresten mag ebenfalls erklären, warum bei einem Patienten mit einer histologisch mittels Grocott-Färbung gesicherten PCP kein Nachweis in der mtLSU nPCR möglich war. Die zur Entparaffinisierung verwendeten Probenreste entstammten dem zur Färbung verwendeten Gewebeblock. Eine weitere Erklärung mag darin liegen, dass die *Pneumocystis* DNA bei diesem Patienten durch die Entparaffinisierung geschädigt und deshalb nicht repliziert wurde.

Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei der Formalinfixierung um ein Verfahren, dass zu einer Zerstörung der DNA führen kann. Gleichzeitig beeinflusst auch die Dicke der Paraffinschnitte vor der Entparaffinisierung das PCR-Ergebnis und somit den DNA-Nachweis eines Organismus. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine Reduktion der Schnittdicke auf 1 µm die Entparaffinisierung schonender wurde und weniger Zeit in Anspruch nahm. Eine mögliche Erklärung lag in der mechanischen Öffnung des schützenden, aziden Zellwalls der untersuchten Mykobakterien (Loeschke 2005). In unserer Untersuchung wurden Proben mit einer Schnittdicke von jeweils 10 µm verwendet. Die Verwendung dünnerer Schnitte könnte auch die angewandte Methode der Gewebeaufarbeitung sowohl zeitlich als auch im Hinblick auf die Sensitivität verbessern. In einer vergleichenden Studie könnte man unterschiedliche Schnittdicken des in Paraffin fixierten pulmonalen Gewebes und / oder eine unterschiedliche Anzahl an Entparaffinisierungsschritten mit einer anschließenden mtLSU nested PCR gegenüberstellen.

### **5.3 Pulmonale Verteilung von *P. jirovecii***

Die Ergebnisse dieser Arbeit ließen keine Verteilungsmuster in der pulmonalen Besiedelung mit *P. jirovecii* erkennen. Obwohl bereits beschrieben wurde, dass sich eine *Pneumocystis* Pneumonie beim Menschen primär in den apikalen Lappen oder

der Hilusregion lokalisiert (Walzer 1989), scheint eine subklinische Besiedelung diffus aufzutreten. Im Tierexperiment konnte bei Ratten kein Unterschied in der pulmonalen Ausbreitung der *Pneumocystis* Spezies gefunden werden. Mögliche Ursachen dafür könnten die geringe Größe einer Rattenlunge und die physiologischerweise horizontale Körperhaltung sein im Gegensatz zur aufrechten Haltung des Menschen (Hong 1994). Bei einigen Patienten wurden in dieser Studie mehrere Proben untersucht. Dabei zeigte sich jedoch, dass beim Nachweis von *P. jirovecii* DNA jeweils lediglich eine der untersuchten Proben in der 2. Stufe der mtLSU nPCR positiv war. Eine mögliche Ursache könnte dabei in der geringen Materialmenge liegen, die bei dieser Studie pro Probe zur Verfügung stand. Vorstellbar ist auch, dass sich der Erreger bei einer Besiedelung nicht gleichmäßig in der Lunge verteilt und daher nicht alle Proben aus unterschiedlichen pulmonalen Arealen positiv sind.

In einer Studie wurde gezeigt, dass beim kleinzelligen Bronchialkarzinom *P. jirovecii* DNA in allen fünf Lappen nachweisbar war, wogegen beim nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom nur eine begrenzte Verteilung des Pilzes in der Lunge erkennbar war (de la Horra 2004). Dagegen ließ sich bei der vorliegenden Arbeit kein pulmonales Verteilungsmuster von *P. jirovecii* finden. Eine Abhängigkeit zwischen pulmonaler Verteilung und Grunderkrankung, insbesondere bei Neoplasien, war nicht erkennbar. Folglich scheint die Art der zugrunde liegenden (malignen) Erkrankung keinen Einfluss auf die Verteilung von *P. jirovecii* in der Lunge zu haben. Die Besiedelung mit dem Pilz könnte jedoch durch z.B. stenosierend wachsende Tumoren beeinflusst werden. Die poststenotisch bestehende verminderte Ventilation kann die Entwicklung einer Pneumonie, insbesondere einer PCP beeinflussen und möglicherweise fördern. Vorstellbar ist ebenfalls ein in den einzelnen Lungenarealen differentes Ausmaß pulmonaler Erkrankungen als Ursache der asymmetrischen Verteilung des Erregers.

Bei einem in dieser Studie untersuchten Patienten konnte histologisch ein stenosierendes Karzinoid nachgewiesen werden. Im Vorfeld war der Patient bereits zweimal an einer poststenotischen Pneumonie erkrankt. Die zweite Pneumonie lag zwei Monate vor der histologischen Erstdiagnose des Karzinoids und wurde antibiotisch mit Moxifloxacin therapiert. Aufgrund der erhöhten entzündlichen Aktivität und der verminderten Ventilation in dem Areal hinter dem Tumor liegt ein reduzierter

Abwehrmechanismus vor, der eine Besiedelung mit *P. jirovecii* begünstigt haben könnte. Wenn bei diesem Patienten keine chirurgische Therapie durchgeführt worden wäre, hätte möglicherweise im weiteren Verlauf eine poststenotische PCP auftreten können. Bei der vorliegenden geringen Materialmenge lässt sich ebenfalls diskutieren, ob die nachgewiesene Besiedelung nicht auch einer PCP entsprechen könnte. Ein positiver DNA-Nachweis in der ersten Stufe der mtLSU nPCR wäre bei einer größeren Probe eventuell möglich gewesen.

#### **5.4 Reinfektion oder Reaktivierung einer Infektion im Organismus**

Es stellt sich die Frage, ob es sich bei einer *P. jirovecii* Infektion des Erwachsenen um eine Reinfektion oder Reaktivierung einer Besiedelung handelt. Eine Infektion mit dem Organismus während der Kindheit gilt als verbreitet. Bereits in den ersten beiden Lebensjahren lassen sich bei mehr als 90% der gesunden Kinder *P. jirovecii*-Antikörper nachweisen (Chabé, Vargas 2004). Wenn es sich bei einer PCP um eine Reaktivierung handeln sollte, lässt sich diese durch allgemeine Maßnahmen, wie z.B. eine Isolation des Patienten schlecht kontrollieren, da der Erreger unter Umständen schon Monate in der Lunge persistiert. Dann wäre eine Eradikationstherapie, ähnlich einer medikamentösen Eradikation von *Helicobacter pylori*, zu diskutieren. Handelt es sich dagegen um eine Reinfektion, könnten immunsupprimierte Personen durch eine räumliche Isolation von PCP-Patienten oder durch die Gabe einer PCP-Prophylaxe geschützt werden. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass der Genotyp von *P. jirovecii* bei einer Person, die ihren Lebensort nach der Geburt gewechselt hat, dem der neuen Umgebung gleicht und nicht dem am Geburtsort entspricht (Beard 2000). Damit würde die These der Reinfektion unterstützt werden. Es wurden dabei die einfache mtLSU PCR und die DHPS nPCR angewandt und Proben aus fünf amerikanischen Großstädten untersucht. Bei 324 Proben war die einfache mtLSU PCR und bei 220 Proben die DHPS nPCR positiv. Der Erreger *P. jirovecii* konnte ebenfalls bei 12 von 50 untersuchten gesunden Erwachsenen mittels mtLSU nPCR und bei 10 dieser 12 Proben mit einer anschließenden DNA-Sequenzierung nachgewiesen werden. Folglich gelang ein Nachweis dieses Organismus bei 20% der immunkompetenten Probanden (Medrano 2005). Sechs Monate später ließ sich der Erreger bei zwei von neun (22,2%) zuvor besiedelten Probanden nachweisen. Eine DNA-Sequenzierung war aufgrund einer mangelnden

Quantität des PCR-Produktes nicht möglich (Medrano 2005). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Replikation von *Pneumocystis* Organismen in immunkompetenten Wirten stattfindet und der Erreger infektiös bleibt (Chabé 2004). Bei einer zusätzlich auftretenden Schwäche der Immunabwehr scheint der Erreger dieses zu nutzen und sich zu replizieren, so dass der Patient an einer PCP erkrankt. Weitere Daten zeigen, dass in einem Patienten während verschiedener PCP-Episoden unterschiedliche *P. jirovecii* Genotypen nachweisbar waren (Keely 1997).

Für eine Reinfektion sprechen auch die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchungen. Bei einem der untersuchten Patienten, der drei Jahre zuvor mit Sulfamethoxazol (2x 800 mg/d) und Trimethoprim (2x 160 mg/d) behandelt worden ist, konnte *P. jirovecii* nachgewiesen werden. Wenn man von einer Reaktivierung einer bestehenden Infektion ausgeht, müßte der Erreger bei der vorangegangenen medikamentösen Therapie eliminiert worden sein. Daher scheint eine Reinfektion wahrscheinlicher. Leider gelang bei diesem Patienten kein Nachweis in der DHPS nPCR, die eine mögliche Aussage über eine Genmutation und daraus folgende Resistenzentwicklung hätte zeigen können. Lediglich eine nach bisheriger Meinung als unspezifisch geltende Mutation auf dem mtLSU Gen konnte hier nachgewiesen werden. Außerdem konnten bei zwei Patienten ein paralleles Vorkommen von jeweils zwei mtLSU rRNA Genotypen pro Patient nachgewiesen werden. Bei der einen Sequenz handelt es sich jeweils um den mtLSU Wildtyp und bei der zweiten Sequenz wurde eine Punktmutation auf dem mtLSU rRNA Gen nachgewiesen. Dies spricht für eine Besiedelung mit zwei Genotypen und unterstützt die These der Reinfektion. Möglicherweise lag bereits eine Besiedelung mit dem Erreger vor und ein zweiter Genotyp wurde zufällig übertragen. Andererseits könnte die Mutation durch einen positiven Selektionsdruck im Körper des Patienten entstanden sein. Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass eine Übertragung von *P. carinii* von besiedelten immunkompetenten Mäusen über die Luft auf immunsupprimierte Mäuse erfolgt ist (Dumoulin 2000). Diese Mäuse waren für 1, 5 oder 20 Tage mit infizierten Mäusen zusammen untergebracht. Der Erregernachweis mittels PCR war bei allen immunkompetenten Mäusen anschließend positiv unabhängig von der Dauer des Kontaktes. Zysten ließen sich bei keinem dieser Mäuse nachweisen. Diese immunkompetenten Mäuse wurden für 40 Tage mit severe combined immunodeficiency (SCID) Empfängermäusen zusammengebracht. Zysten ließen sich

nur bei SCID Mäusen nachweisen, die mit immunkompetenten Mäusen zusammen waren, die zuvor über 20 Tage Kontakt mit infizierten Mäusen hatten. Eine Reinfektion als Ursache einer PCP scheint damit sehr wahrscheinlich. Es ist aber mit den Ergebnissen der bisherigen Studien nicht bewiesen, ob eine Reinfektion mit *Pneumocystis* alleine vorherrscht oder ob sowohl eine Reaktivierung als auch eine Reinfektion vorkommen.

Bisher wurden in den meisten Studien Patienten untersucht, die klinisch an einer PCP erkrankt waren. In dieser Arbeit gelang es, den Erreger *P. jirovecii* bei Patienten, die klinisch nicht an einer PCP erkrankt waren, nachzuweisen. Die vorliegenden Daten unterstützen die bisherige Vermutung, dass der Mensch als Reservoir für diesen Organismus in Frage kommt (Stringer 2002). Aufgrund der klinisch bedingten Immunsuppression z.B. durch ein Karzinom oder eine Kachexie scheinen die Patienten dieser Studie neben HIV-Patienten ebenfalls ein mögliches Reservoir des Erregers zu bilden. In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch bei Patienten mit einer malignen Erkrankung eine PCP häufiger auftritt als bei Patienten ohne Malignom. Aus diesem Grund sollte eine medikamentöse primäre oder sekundäre Prophylaxe für dieses Patientenkollektiv in naher Zukunft diskutiert werden.

Die in der Literatur vermutete ubiquitäre Verbreitung von *P. jirovecii* (Totet 2003, Chabé, Vargas 2004) kann dadurch unterstützt werden, dass alle in der mtLSU nPCR positiven Patienten weder zum gleichen Zeitpunkt in der Klinik noch auf den gleichen Stationen der Klinik untergebracht waren. Der in dieser Untersuchung erfolgte Nachweis von *P. jirovecii* DNA bei einem Patienten ohne zugrunde liegende pulmonale Erkrankung unterstützt die Behauptung der ubiquitären Verbreitung dieses Organismus in der Bevölkerung. Zwar lag bei dem Patienten vermutlich eine Schwächung des Immunsystems durch ein kachektisches Syndrom unklaren Ursprungs, eine Neuroborreliose Stadium 3, einen Vitamin B12 Mangel und eine *Helicobacter pylori*-Gastritis vor. Dennoch lag keine pulmonale Vorschädigung vor, die eine verminderte lokale Abwehrreaktion und somit eine Prädisposition für eine pulmonale Infektion bedeuten würde. Die Schwächung des gesamten Organismus scheint für eine Besiedelung mit *P. jirovecii* ausreichend zu sein.

## **5.5 Mögliche Zusammenhänge zwischen einer *P. jirovecii* Infektion und einem Karzinom**

Bei 14 von 122 Patienten (11,5%) konnte in paraffinisierten Lungenbioptaten mittels mtLSU nPCR *P. jirovecii* DNA nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war ein Nachweis von *P. jirovecii* DNA in Lungenmaterial verstorbener Patienten mittels DNA-Amplifikation und anschließender Oligonucleotid-Hybridisierung nicht möglich (Peters 1992).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen im Gegensatz zu Untersuchungen, die mit BAL Material durchgeführt wurden (Maskell 2003), einen signifikanten Unterschied in der Besiedelung mit *P. jirovecii* zwischen Patienten mit einer malignen Grunderkrankung im Vergleich zu Patienten ohne maligne Grunderkrankung. Bei 13 von 59 Patienten (22%) mit einer Neoplasie und bei 1 von 63 Patienten (1,6%) ohne eine Neoplasie konnte der Erreger mittels mtLSU nPCR in der zweiten Stufe nachgewiesen werden ( $p<0,004$ ; Fisher's exact test). Es zeigt sich jedoch keine statistisch signifikante Häufung bei einem speziellen Karzinom. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu einer anderen Studien, bei der eine signifikante Korrelation zwischen einer *P. jirovecii*-Besiedelung und einem kleinzelligen Bronchialkarzinom beschrieben wurde (de la Horra 2004). Es wurde diskutiert, dass durch das bestehende Karzinom eine Immunsuppression hervorgerufen wird, die eine Besiedelung mit *P. jirovecii* ermöglicht oder erleichtert. Auf der anderen Seite wurde die These aufgestellt, dass eine subklinische Infektion mit diesem Pilz einen Lungentumor, speziell ein kleinzelliges Bronchialkarzinom, induzieren könnte. Die vorliegenden Ergebnisse können diese Behauptung nicht bestätigen.

Es ist bekannt, dass insbesondere bei hämatologischen und neurologischen Tumoren aber auch bei fortgeschrittenen Stadien der meisten anderen malignen Tumoren eine Immunsuppression vorherrscht (Kiessling 1999). Die Inzidenz einer PCP bei Patienten mit myeloproliferativen und lymphoproliferativen malignen Erkrankungen ist höher als bei Patienten mit soliden Tumoren (Varthalitis 1993). Diese Aussage lässt sich anhand der Ergebnisse dieser Arbeit nicht in Bezug auf die Subgruppen der malignen Tumoren bestätigen. Bei Patienten mit einer malignen Erkrankung liegt nach unseren Ergebnissen eine statistisch signifikant höhere

Besiedelung mit *P. jirovecii* vor als bei Patienten ohne Malignom. Karzinompatienten sterben meistens nicht an den Folgen des Tumors sondern an den Komplikationen der Immunsuppression. Dabei stehen Infektionen, insbesondere die Pneumonie, an erster Stelle (Skerrett 1994).

Im Rahmen einer Entzündungsreaktion bei einer PCP kommt es beim Menschen zu einer Infiltration des pulmonalen Parenchyms mit Makrophagen und Granulozyten, insbesondere neutrophilen Granulozyten (Benfield 1997, Hanano 1998). Die Erregerelimination findet hauptsächlich durch die Phagozytose durch Makrophagen, die zum Teil zu multinukleären Riesenzellen verschmelzen, statt. Als alleiniger Abwehrmechanismus reicht dieser Vorgang jedoch nicht aus. Der Mannoserezeptor (MR) der Makrophagen scheint für eine suffiziente Phagozytose von *Pneumocystis* erforderlich zu sein (Zhang 2005). Bei HIV-Patienten wurde eine verminderte MR-Expression auf alveolären Makrophagen und eine verminderte Phagozytose von *Pneumocystis* nachgewiesen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass es nach Substitution eines rekombinannten löslichen MR-Immunadhäsins zu einer 8,2fach erhöhten Aufnahme von *P. jirovecii* durch die phagozytierenden Zellen kam (Stehle 2000). Die neutrophilen Granulozyten sind ebenfalls an der Phagozytose beteiligt. Es wurde gezeigt, dass es durch den Erreger *P. jirovecii* im Menschen zu einer Stimulation der intra- aber nicht extrazellulären freien Radikalproduktion in den neutrophilen Granulozyten kommt (Jensen 1998). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass CD4-Zellen ebenfalls eine Hauptrolle im Abwehrmechanismus spielen und ein Mangel dieser Zellen zu schweren *Pneumocystis* Infektionen führt (Hanano 1998). Doch auch diese Zellen bilden nicht alleine einen effektiven Abwehrmechanismus gegen *Pneumocystis*. Bei einer Infektion scheint das Zusammenspiel zwischen CD4-Zellen, CD8-Zellen, B-Zellen, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, dem Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-8 (IL-8) und weiteren Faktoren für eine suffiziente Abwehrreaktion notwendig zu sein. Die Immunantwort des Wirtes spiegelt sich direkt in der pulmonalen Funktion und biochemischen Markern wieder (Qu 2000, Wright 1999). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an CD4-Zellen zu einer schweren pulmonalen Inflammation und Schädigung des Gewebes, einer verminderten Sauerstoffsättigung und Lungengcompliance sowie einer erhöhten Respiration durch die Präsenz aktiverer CD8-Zellen und neutrophiler Granulozyten

führt. Mäuse ohne CD4- und CD8-Zellen bekamen eine Infektion, zeigten aber keine atypische Lungengencompliance, erhöhte Respiration oder Schädigung des Lungengewebes (Wright 1999).

Durch die von den phagozytierenden Zellen freigesetzten Mediatoren (z.B. Zytokine, Interleukine) kommt es zu einer Zellschädigung und zu einer kontinuierlichen Aktivierung von Reparaturvorgängen. Dieses erhöhte Maß an Zellaktivität und die erhöhte Replikationsrate verschiedener Zellen führen dazu, dass ein erhöhtes Risiko für Mutationen besteht, die sich in folgenden Zellzyklen weiter replizieren können und somit möglicherweise Karzinogene aktivieren oder induzieren können (Kuper 2000). In Zusammenhang mit anderen karzinogenen Faktoren und im Rahmen einer solchen Entzündungsreaktion könnte *P. jirovecii* die Entstehung von Bronchialkarzinomen durchaus fördern. Dagegen spricht jedoch, dass bei den von uns untersuchten Patienten vermutlich lediglich eine Besiedelung mit dem Erreger vorlag. Außerdem wird in den histologischen Befunden keine massive inflammatorische Reaktion des pulmonalen Gewebes beschrieben. Diese könnte ansonsten auf die im vorangegangenen Abschnitt beschriebene entzündliche Pathogenese hinweisen. Lediglich bei einem Patienten zeigte sich eine chronische Entzündungsreaktion, die aber primär durch das vorliegende Karzinoid und nicht durch die Besiedelung mit *P. jirovecii* verursacht wurde. Es handelte sich dabei um eine primär lymphozytäre Infiltration und nicht - wie bei einer Infektion mit *Pneumocystis* - um einen Nachweis erhöhter Werte neutrophiler Granulozyten. Zusammenfassend scheint der Erreger *P. jirovecii* eine immunsupprimierte Umgebung zur Proliferation vorzuziehen. Diese kann durch einen malignen Tumor induziert werden und ist damit für *P. jirovecii* förderlich.

## **5.6 Sequenzierung der DNA und Mutationen auf dem mtLSU rRNA Gen**

Bei den in dieser Studie untersuchten Patienten konnten bei sechs von 14 in der mtLSU nPCR positiven Patienten vier bisher unbekannte Punktmutationen detektiert werden. Eine der Punktmutationen ließ sich bei insgesamt drei Patienten nachweisen. Bisher ist das mtLSU Gen nicht vollständig sequenziert und damit die Aminosäuresequenz des aus der transkribierten und translatierten DNA

resultierenden Proteins unbekannt. Über eine Veränderung der Aminosäuresequenz ist daher keine Auskunft möglich.

Das mittels mtLSU nPCR nachgewiesene DNA-Teilstück gilt als konserviertes und für *P. jirovecii* spezifisches Fragment des mitochondrial large subunit rRNA Gens. Die Tierspezies von *Pneumocystis* unterscheiden sich in ihrer DNA-Sequenz des mtLSU rRNA Gens deutlich von der des humanpathogenen *P. jirovecii*. Auf dem mtLSU rRNA Gen ist bereits vereinzelt ein Austausch der Basen an Position 81, 85 und 248 beschrieben worden (Chabé, Vargas 2004; Sinclair 1991, Gen Bank accession no. M58605, Lee 1993, Gen Bank accession no. Z19053). Die Bedeutung dieser Variationen ist bisher unklar, da das gesamte mtLSU rRNA Gen mit dem Startcodon noch nicht sequenziert und dadurch die Folge der Aminosäuresequenz nicht bekannt ist. Ein aus den Punktmutationen resultierender Austausch einer Aminosäure kann deshalb bisher nicht genannt werden.

Verunreinigte DNA-Abschnitte zeigen sich in der Sequenzierung durch längerstreckige Überlagerungen von zwei oder mehreren Basen. Die eigentliche Sequenz lässt sich dabei nicht mehr eindeutig zuordnen. Bei zwei Patienten war neben der Punktmutation auch der Wildtyp von *P. jirovecii* nachweisbar, die Sequenzen waren im PCR-Amplifikat aber nicht trennbar. Einen Nachweis, dass diese Patienten zwei Genotypen von *Pneumocystis* trugen, kann man nur mit der Klonierung der DNA-Fragmente und anschließendem Vergleich der DNA-Sequenzen der einzelnen Klone erbringen. Dabei müssten in einigen Sequenzen der Wildtyp und in anderen die Punktmutation nachweisbar sein. Andererseits könnte es sich bei diesen Sequenzveränderungen auch um Verunreinigungen handeln. Dies scheint unwahrscheinlich, da die Veränderung isoliert und nur an einer Base auftritt. Die gefundenen Punktmutationen stimmen nicht mit einer tierpathogenen *Pneumocystis*-Spezies überein. Die Veränderungen, die zwischen der humanen *Pneumocystis*-Spezies und den Tierspezies bestehen, sind an anderen Stellen der Sequenz lokalisiert und unterscheiden sich in mehr als einer Base.

Bei keinem der Patienten mit einer Mutation auf dem mtLSU Gen war die DHPS nPCR positiv. Es kann deshalb keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine Mutation auf dem DHPS Gen vorhanden ist.

Bei zwei Patienten ließen sich die in der 2. Stufe der mtLSU nPCR positiven Proben wiederholt nicht sequenzieren. Obwohl die beschriebenen Methoden der DNA-Aufarbeitung und Vorbereitung für die Sequenzierung bei jeder Probe regelrecht durchgeführt worden sind, mag eine mögliche Ursache in einer unzureichenden Reinheit der vorliegenden DNA liegen. Vielleicht wurde die gesuchte Gensequenz von anderen DNA-Abschnitten überlagert, so dass keine saubere Aufschlüsselung der mtLSU Sequenz durchführbar war. Eine andere mögliche Ursache könnte in einem zu geringen DNA-Gehalt der Probe liegen, der eine Sequenzierung unmöglich macht. Da nicht der eindeutige Nachweis erbracht werden konnte, dass es sich bei den betreffenden Proben wirklich um eine Replikation des mtLSU Gens handelt, muss auch eine Kontamination oder eine fehlerhafte nPCR mit einer Vermehrung eines unspezifischen DNA-Abschnittes diskutiert werden. Eine eindeutige Aussage über die nachgewiesene DNA-Sequenz könnte nur das Klonieren der DNA bringen.

## 5.7 Mutationen auf dem DHPS Gen

In dieser Arbeit konnten zwei bisher nicht bekannte Punktmutationen auf dem DHPS Gen auf Codon 87 und 100 bei einem Patienten parallel nachgewiesen werden. Bisher beschriebene und mit einer Resistenz gegen Sulfamethoxazol in Verbindung gebrachte Punktmutationen, die auf Codon 13, 16, 23, 26, 55, 57, 60, 111, 171 oder 248 nachweisbar sind, wurden nicht gefunden (Lane 1997, Takahashi 2000, Riebold 2006). Ein Versagen der Sulfamethoxazol-Prophylaxe und –Therapie wird, wie in der Einleitung bereits beschrieben, besonders mit den Mutationen auf Codon 55 und 57 oder der Kombination beider in Verbindung gebracht.

Die bei unserem Patienten nachgewiesenen neuen Punktmutationen führen jeweils zu einem Aminosäureaustausch an Codon 87 von Valin zu Isoleucin und an Codon 100 von Alanin zu Serin. Über eine mögliche Lokalisation dieser Mutationen in der aktiven Region des Enzyms kann bisher keine Aussage getroffen werden. Demnach ist auch keine Bewertung im Hinblick auf eine Resistenzentwicklung gegenüber Medikamenten möglich. Der Patient war an einer Neuroborreliose Stadium 3, einer *Helicobacter pylori*-Gastritis, einer Kachexie unbekannten Ursprungs sowie einem Vitamin B12 Mangel erkrankt. Eine pulmonale Vorschädigung bestand nicht. Die vorliegenden Erkrankungen lassen aber auf eine Immunsuppression schließen, die

eine Besiedelung mit *P. jirovecii* begünstigt haben. Weitere Fälle bei einer fehlenden HIV-Infektion wurden bei Vorliegen einer Sarkoidose, einer Cytomegalievirusinfektion oder bei einem Alkoholiker beschrieben (Krebs 2002, Riebold 2005). Bisher ist eine PCP in Patienten ohne eine Immunsuppression selten. Bei unserem Patienten liegt durchaus ein erhöhtes Risiko vor, an einer PCP zu erkranken. Durch die Begleiterkrankungen besteht eine reduzierte Immunabwehr, die eine PCP begünstigen könnte. Eine pulmonale Vorschädigung scheint dafür nicht zwingend erforderlich zu sein (Riebold 2005).

Aus der Anamnese des Patienten geht keine vorangegangene Exposition mit Medikamenten, die bei einer *Pneumocystis* Infektion eingesetzt werden, hervor. Das mag erklären, warum keine Mutationen an Codon 55 und / oder 57 vorhanden sind, die mit einer Resistenzentwicklung in Verbindung gebracht werden. Weitere Mutationen können gegebenenfalls durch eine Medikamenteneinnahme entstehen. Die Frage bleibt jedoch unbeantwortet, ob es durch die neuen Mutationen zu einer Resistenzbildung kommt. Bereits beschrieben ist der parallele Nachweis von Mutationen an Codon 55 und 57, die mit einer Resistenz gegen Co-Trimoxazol einhergeht. Der gleichzeitige Nachweis der neuen Punktmutationen an Codon 87 und 100 lässt sich damit vergleichen und mag die Wahrscheinlichkeit einer möglichen medikamentösen Resistenzbildung erhöhen. Vielleicht unterlag der in diesem Patienten nachgewiesenen *P. jirovecii* bereits in der Vorgeschichte einem Selektionsdruck und hat sich mit Hilfe dieser genetischen Veränderung erhalten können. Möglich ist auch, dass diese Selektion bei einem anderen Menschen stattgefunden und dieser den Erreger auf den Patienten übertragen hat. Die Übertragung von *P. jirovecii* erfolgt nach dem bisherigen Kenntnisstand über die Luft und Schmierinfektionen (Chabé, Dei-Cas 2004, Rabodonirina 2004). Zu diskutieren wäre außerdem die Frage, ob die Mutationen durch eine Ungenauigkeit in der Sequenzierung entstanden sein könnten. Da es sich bei den nachgewiesenen Mutationen um selektive Veränderungen der DNA-Sequenz an zwei voneinander entfernten Basen in einer sonst reinen Sequenzfolge handelt, scheint dies unwahrscheinlich zu sein. Die endgültige Bedeutung dieser neuen Mutationen muss in weiteren Studien bewertet werden.

## **5.8 Möglichkeiten einer quantitativen PCR**

Mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden gelingt der Nachweis von *P. jirovecii* in der Lunge des Patienten. Eine differenzierte Aussage über die Quantität ist damit aber nicht möglich. Eine grobe Unterscheidung zwischen einer Besiedelung und einer *Pneumocystis* Pneumonie wird mit der Labordiagnostik zwar vorgenommen, jedoch ist das Ergebnis der PCR unter anderem stark abhängig von der Qualität und Quantität des untersuchten Gewebes. Als alleinige Grundlage einer Therapieentscheidung für den Patienten sollte das Ergebnis der PCR nicht gelten und stets durch die Klinik, wie z.B. das subjektive Befinden des Patienten, die Symptomatik, weitere Begleiterkrankungen und Veränderungen diagnostischer Parameter, wie Bildgebung und Laborparameter, ergänzt werden.

Die Entwicklung einer quantitativen mtLSU PCR könnte hier gegebenenfalls einen Ansatzpunkt zur Unterscheidung zwischen einer Besiedelung und einer manifesten Pneumonie bieten. Bisher sind Methoden zum Nachweis des „major surface glycoprotein gene“ (MSG) mit einer Sensitivität und Spezifität von 88% und 85% (Larsen 2004), des DHPS-Gens mit einer Sensitivität und Spezifität von 94% und 96% (Alvarez-Martínez 2006) und DHFR-Gens (Kaiser 2001) beschrieben. Bei der quantitativen PCR zum Nachweis des MSG wird bei  $< 10^3$  DNA-Kopien pro PCR-Kapillare von einer *Pneumocystis* Besiedelung ausgegangen. Abhängig ist diese Ergebnis jedoch von der Menge des Ausgangsmaterials (Flori 2004). Für eine quantitative PCR ist die Herstellung von *Pneumocystis*-Standards erforderlich. Zur Gewinnung der Standards könnte man einerseits eine *Pneumocystis*-Kultur entwickeln. Es hat sich jedoch gezeigt, dass sich dieser Pilz sehr schwer anzüchten lässt. Für eine Kultur benötigt man unter anderem eine große *Pneumocystis* Inkulationsmenge, die sich nur über einen kurzen Zeitraum kultivieren lässt (Stringer 2002). Außerdem ist die Methode sehr kosten- und zeitintensiv und als Routine im Labor kaum durchführbar. Der Erreger hat zudem eine Verdopplungszeit von 10 Tagen und wächst daher nur sehr langsam zu verwertbaren Mengen heran (Riebold 2005). Eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung von Standards bietet das Klonieren von Genfragmenten in *Escherichia coli* (*E. coli*). Diese Methode ist in Verbindung mit einer quantitativen PCR bisher für das DHPS und DHFR Gen beschrieben worden (Ma 2000). Seit dem Jahr 2006 arbeiten wir in unserem Labor mit selbst hergestellten

mtLSU und DHPS Klonen, die als Positivkontrollen für die PCR verwendet werden. Die quantitative PCR zum Nachweis des mtLSU Gens wird vermutlich keine repräsentative Aussage über die genaue Anzahl der *P. jirovecii* Organismen machen können. Der Grund liegt darin, dass die genaue Anzahl der Mitochondrien pro Organismus unbekannt ist (Larsen 2002). Die Anzahl der Mitochondrien ist von Spezies zu Spezies unterschiedlich, aber von Organismus zu Organismus gleich. Die Quantifizierung eines mitochondrialen Gens würde also eine genaue Aussage machen, wenn bekannt ist, wie viele Mitochondrien vorhanden sind und ob das Gen als single-copy vorhanden ist. Die Differenzierung zwischen einer Besiedelung und einer Pneumonie könnte trotzdem unter Verwendung von Standardkurven möglich sein. Dabei könnte man jeweils einen Bereich angeben, durch den ein Bereich der Besiedelung und der Pneumonie markiert wird. Eine genaue Erregeranzahl lässt sich auch hierbei nur angeben, wenn die Anzahl in dem Organismus bekannt ist.

Bisher wird die Quantifizierung von *Pneumocystis* Spezies durch einerseits das Zählen der Zysten pro Quadratmillimeter ( $\text{mm}^2$ ) im histologischen Präparat und andererseits durch die Quantifizierung der Nuclei nach Entfernung der pulmonalen Zellen durchgeführt (Hong 1994). Bisher gilt die Anzahl der Zysten pro Areal als Korrelat für die schwere des Befalls mit *Pneumocystis*. Ein vermehrter Nachweis neutrophiler Granulozyten (>5% der Zellen) gilt als zusätzlicher Marker für die Schwere des Befalls (Sadaghdar 1992). Zysten sind frühzeitig nachweisbar. Deren Auffinden beim Mikroskopieren erfordert geschultes, erfahrenes Personal. Eine Detektion der Zysten ist im Tierexperiment bei Ratten erst beim Nachweis von  $10^7$  Nuclei im Homogenisat erfolgt (Hong 1994). Ein Zystennachweis legt daher nahe, dass bereits eine schwerere Infektion des Organismus vorliegt.

Mit Hilfe einer quantitativen PCR zum Nachweis von *P. jirovecii* eröffnen sich für die Zukunft eine Reihe von Möglichkeiten, beispielsweise zur genaueren Differenzierung zwischen einer Besiedelung und einer Erkrankung. Die labortechnische Entscheidung zwischen Erkrankung und Besiedelung kann dadurch genau definiert und allgemein vergleichbar gemacht werden. Die quantitative PCR bietet die Möglichkeit den Erfolg oder Misserfolg einer PCP-Therapie zu evaluieren. Der Erregerabfall kann unter einer adäquaten medikamentösen Therapie quantitativ erfasst werden und bei einem inadäquaten Abfall eine frühzeitige

Therapieumstellung erfolgen. Für diese Methode bietet sich das mtLSU Gen an. Die Reduktion der Organismen lässt sich anhand von Standardkurven registrieren. Nachfolgende Untersuchungen des DHPS-, DHFR- oder Cytochrom-b-Gens könnten dann in der Folge eine Genmutation zeigen und auf eine Resistenzentwicklung gegenüber dem verwendeten Medikament hinweisen.

## 5.9 Evaluation der Labordaten

Die von den in der mtLSU nPCR positiven Patienten erhobenen Labordaten, wie Hämoglobin, Laktatdehydrogenase, Fibrinogen, Leukozyten, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, CRP zeigten bei einigen Patienten Veränderungen, die sowohl im Rahmen von entzündlichen Geschehnissen als auch bei Malignomen im menschlichen Körper beobachtet werden können. Der spezifische Parameter Neopterin wurde bei den Patienten nicht bestimmt. Da lediglich unspezifische Parameter untersucht wurden, lassen sich keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Ursache der paraklinischen Veränderungen ziehen.

Eine Veränderung des Hämoglobingehaltes (Hb) im Blut kann viele Ursachen haben. Eine Verminderung kann bedingt sein durch eine verminderte Produktion oder einen erhöhten Abbau bzw. Verlust sowie die Kombination beider Möglichkeiten. Die klinische Relevanz hängt jedoch nicht nur vom gemessenen Wert sondern maßgeblich auch von der Klinik des Patienten ab. Ein leicht reduzierter Hb-Wert ist häufig klinisch nicht relevant und wird in Abhängigkeit des vom Patienten gewohnten Ausgangswertes nicht bemerkt. Die bei einem Patienten aufgefallene Hb-Wert-Verminderung ist am ehesten durch eine Vitamin B12-Resorptionsstörung und die daraus folgende megaloblastäre Anämie erklärbar. Bei diesem Patienten lag keine maligne Erkrankung vor. Die anderen in der mtLSU nPCR positiven Patienten waren alle an einem malignen Tumor erkrankt, der als mögliche Ursache des verminderten Hb-Wertes gesehen werden kann. Einer entzündlich oder neoplastisch bedingten Anämie liegt eine Eisenverwertungsstörung zu Grunde. Bei beiden Erkrankungen sind neben einem verminderten Hb-Wert ein reduzierter Eisen- und Transferrin-Wert (Eisenbindungskapazität) sowie ein erhöhter Ferritinwert (Eisenspeicher) nachweisbar.

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein unspezifisches Enzym, das in den Zellen von Leber, Niere, Malignomen, Herz- und Skelettmuskel, Erythrozyten, lymphatischem und hämatopoetischem Gewebe vorhanden ist. Bei Zerstörung dieser Zellen wird das Enzym frei und führt zu einer Konzentrationserhöhung im Blut. Bei malignen Erkrankungen ist der Zellumsatz aufgrund der Tumorzellproliferation erhöht, woraus ein LDH-Anstieg resultiert. Bei Patienten mit einer PCP ist ebenfalls eine Korrelation mit dem LDH-Spiegel im Serum bekannt (Butt 2002). Bei den in dieser Studie untersuchten Patienten lag jedoch lediglich eine Besiedelung mit *P. jirovecii* vor, so dass eine LDH-Erhöhung nach dem jetzigen Erkenntnisstand wahrscheinlich erst bei einer PCP auftritt. Im Rahmen eines Vitamin B12-Mangels kann es ebenfalls zu einer LDH-Erhöhung kommen. Begründet ist dies durch einen bereits im Knochenmark stattfindenden erhöhten Erythrozytenabbau. Bei dem Patienten mit einem Vitamin B12-Mangel war jedoch keine LDH-Erhöhung nachweisbar. Eine mögliche Ursache könnte man darin sehen, dass die Erkrankung kompensiert oder nicht so ausgeprägt vorhanden ist.

Ursachen einer Leukozytose können Entzündungen bakterieller oder anderer Genese, ausgedehnte Verbrennungen oder Erfrierungen, Leukosen, Stress, Sonnenstich, Medikamente (Kortikoide) oder ein Coma diabeticum sein. Aber auch maligne Erkrankungen können zu einer unspezifischen Veränderung dieses Laborparameters führen. Bei den in dieser Studie untersuchten Patienten lag lediglich bei zwei von zehn Patienten eine geringe Leukozytose vor, die am ehesten durch die bei beiden Patienten zugrunde liegende neoplastische Erkrankung erklärt wird. Ergänzend waren bei einem der beiden Patienten Pilzhypfen im histologischen Präparat erkennbar, die eine Entzündungsreaktion hervorrufen und dadurch eine Erhöhung der Leukozyten bewirken könnten. Bei einer ausgeprägten Pneumonie käme es in der Regel zu einem stärkeren Anstieg der Leukozyten im Blut in Abhängigkeit des Erregers. Virale Pneumonien führen nicht zu einem so massiven Anstieg der Leukozyten wie bakterielle Pneumonien. Bei einer Pneumonie kommt es im Rahmen der Entzündungsreaktion zu einer akuten inflammatorischen Infiltration des Lungenparenchyms. Inflammatorische Zellen, wie neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen sind dabei nachweisbar. Studien haben gezeigt, dass bei einer PCP der Nachweis einer hohen Anzahl neutrophiler Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage mit einer schlechten Prognose einhergeht (Azoulay

1999, Benfield 1997). Demnach kann die Neutrophilie als prognostischer Marker angesehen werden, um Patienten mit einem hohen Risiko zu identifizieren. Diese benötigen dann eine mechanische Ventilation (Bang 2001). In den histologischen Präparaten der in dieser Studie positiven Patienten wurde keine massive Infiltration mit neutrophilen Granulozyten beschrieben, so dass davon auszugehen ist, dass es sich um eine Besiedelung und nicht um eine Pneumonie handelt. Bei einer passageren Besiedelung mit *P. jirovecii* scheint es nicht zu einer massiven Infiltration mit Entzündungszellen zu kommen. Lediglich bei einem Patienten war in dem das Karzinoid umgebenden Gewebe im Rahmen einer chronischen granulierenden Entzündung eine Lymphozytenanreicherung nachweisbar. Die Gewebsveränderung ist am ehesten als Reaktion auf das Karzinoid und als Folge der zwei Monate zuvor durchlebten Pneumonie zu sehen.

Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten ist vorwiegend bei bakteriellen Infektionen und entzündlichen Prozessen erhöht. Lediglich bei einem von sieben Patienten war eine grenzwertige Erhöhung dieser Zellen auf 83% bei einem Referenzbereich von 36% bis 84% nachweisbar. Bei diesem Patienten waren neben dem metastasierten kleinzelligen Bronchialkarzinom im histologischen Präparat Pilzhypfen erkennbar, die zu einer Aspergillose passen und die erhöhte Zellzahl erklären könnten.

Eine Lymphopenie wird unter anderem bei Tuberkulose, Masern, Grippe sowie hämatologischen Erkrankungen beschrieben. Bei den Erkrankungen der untersuchten Patienten, die in dieser Studie eine Lymphopenie in den Laborparametern aufwiesen, handelt es sich um neoplastische Erkrankungen. Bei einem Patienten ließen sich im histologischen Präparat zusätzlich zu den Tumorzellen auch Pilzhypfen nachweisen. Die durch die neoplastische Erkrankung verursachte Immunschwäche erklärt den Pilzbefall und die Veränderung der Laborparameter. Bei einem anderen Patienten lagen multiple Metastasen eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms vor, die die tumorbedingte Veränderung der Lymphozytenzahl erklären können. Bei einem anderen Patienten wurde eine pulmonale Metastase eines Nierenzellkarzinoms operativ mittels Segmentresektion entfernt. Im Rahmen dieser Operation wurden die Laborparameter bestimmt und erklären neben der durch die Neoplasie verursachten reduzierten Immunabwehr die Abweichung im Rahmen einer perioperativen allgemeinen Entzündungsreaktion.

Fibrinogen gehört zu den Akute Phase Proteinen. Die Leber gilt als zentrales Syntheseorgan dieses Stoffes. Erhöhte Fibrinogenwerte sind bei entzündlichen Erkrankungen, Diabetes mellitus, Cholestase und Malignomen nachweisbar. Im Rahmen einer Entzündungsreaktion kommt es zu einer Erhöhung der zirkulierenden Fibrinogenkonzentration. Es wurde der Nachweis erbracht, dass die Alveolarepithelzellen Fibrinogen im Rahmen einer lokalen akuten Phase Reaktion bei einer *Pneumocystis* Infektion synthetisieren und sezernieren (Simpson-Haidaris 1998). Fibrinogen scheint somit in der Pathogenese der PCP ähnlich wie die Glykoproteine Fibronectin und Vitronectin eine Rolle zu spielen. Einer unserer Patienten mit einem leicht erhöhten Fibrinogenwert war an einem metastasierten kleinzelligen Bronchialkarzinom erkrankt. Die Erhöhung des Fibrinogenwertes ist am ehesten als Veränderung im Rahmen der fortgeschrittenen neoplastischen Erkrankung zu werten. Bei einem zweiten Patienten lag ein nodulär metastasiertes Bronchialkarzinom mit plattenepithelialer Differenzierung vor. In der Anamnese war dieser Patient sieben Jahre zuvor an einem Morbus Hodgkin erkrankt und mit sechs Zyklen Polychemotherapie sowie einer Radiatio therapiert worden. Demnach handelt es sich bei dem Bronchialkarzinom bereits um ein Zweitkarzinom. Die Tumorerkrankung ist auch bei diesem Patienten als wahrscheinlichste Ursache der paraklinischen Veränderung zu sehen.

Eine Erhöhung des C-reaktiven Proteins (CRP) war bei fünf von zehn Patienten nachweisbar. Dabei lag lediglich bei einem Patienten eine deutliche Erhöhung dieses Wertes vor. Bei diesem Patienten wurde eine pulmonale Segmentresektion zur Entfernung einer Metastase eines Nierenzellkarzinoms durchgeführt. Der erhöhte CRP-Wert ist im Rahmen dieses operativen Eingriffes und der zugrunde liegenden neoplastischen Erkrankung zu werten. Bei den anderen vier Patienten zeigte sich nur eine leichte Erhöhung des CRP-Wertes, die im Rahmen der Neoplasie auftreten kann.

Die Besiedelung mit *P. jirovecii* ist vermutlich nicht als Ursache der paraklinischen Veränderungen zu werten. Wahrscheinlicher scheint, dass die Neoplasie-bedingte Veränderung der Immunregulation, die sich auch in veränderten Laborparametern niederschlägt, eine mögliche Ursache für die signifikant erhöhte Besiedelung mit *P. jirovecii* bei Patienten mit maligner Grunderkrankung darstellt. Es gibt Hinweise auf

eine erhöhte immunologische Aktivität bei Patienten mit Neoplasien (Kiessling 1999). Aus dieser Aktivitätssteigerung leitet sich ein erhöhter Verbrauch von immunologisch tätigen Zellen ab, wodurch eine gewisse Immunsuppression induziert wird. Diese Abwehrminderung kann zu einer höheren *P. jirovecii*-Besiedelungsrate bei Patienten mit Malignom führen.

## 5.10 Schlussfolgerung

Mit dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Möglichkeit besteht, *P. jirovecii* aus paraffinisierten Lungenbioptaten mittels mtLSU nested PCR und DHPS nested PCR nachzuweisen. Die Sensitivität dieser Methodik sowie die Qualität und Quantität des verwendeten Materials müssen in weiteren Studien geprüft werden. Bei 14 von 122 Patienten (11,5%) konnte *P. jirovecii* in der 2. Stufe der mtLSU nPCR nachgewiesen werden. Der Nachweis mittels DHPS nPCR war bei einem von 14 Patienten in der 1. Stufe und bei zwei von 14 Patienten in der 2. Stufe positiv. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Patienten, die an einem Karzinom erkrankt sind, eine signifikant höhere Besiedelung mit *P. jirovecii* aufweisen als Patienten ohne eine maligne Erkrankung ( $p<0,004$ ). Das relative Risiko einer Kolonisation mit *P. jirovecii* ist für Patienten mit einer malignen Grunderkrankung um das 13,9-fache höher als bei Patienten ohne bestehendes Malignom. Als Ursache scheint die neoplasiebedingte Immunsuppression der Patienten am wahrscheinlichsten. Patienten mit einer malignen Erkrankung scheinen ein Reservoir für *P. jirovecii* zu bilden. Eine möglicherweise notwendige medikamentöse Prophylaxe für dieses Patientenkollektiv sollte in naher Zukunft diskutiert werden.

Bei sechs von 12 Patienten konnten auf dem spezies-spezifischen mtLSU rRNA Gen vier bisher unbekannte Punktmutationen detektiert werden. Die Bedeutung dieser muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Außerdem konnte bei einem Patienten auf dem DHPS Gen zwei neue Punktmutationen gefunden werden, die jeweils mit einer Veränderung der Aminosäuresequenz einhergehen. An Codon 87 kommt es zum Austausch von Valin zu Isoleucin und an Codon 100 von Alanin zu Serin. Die Bedeutung hinsichtlich einer möglichen Resistenzentwicklung gegen Sulfamethoxazol und / oder Veränderung der Proteinstruktur können mit den hier gewonnenen Ergebnissen nicht erklärt werden und bedürfen weiterer

Untersuchungen. Die bei den in der mtLSU nPCR positiven Patienten gefundenen Veränderungen der Laborparameter lassen sich am ehesten durch die zugrunde liegende neoplastische Erkrankung bzw. den Vitamin B12-Mangel, die Kachexie unbekannten Ursprungs, die Neuroborreliose Stadium 3 und die *Helicobacter pylori*-Gastritis erklären.

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit sollen einen Beitrag leisten, die bisherigen Erkenntnisse über den Erreger *P. jirovecii* zu ergänzen und einen Anstoß für weitere Forschungen und neue Ideen geben.

## **6. Zusammenfassung**

Dem Erreger *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*) kommt weltweit eine große Bedeutung als Auslöser der *Pneumocystis* Pneumonie (PCP) hauptsächlich bei immunsupprimierten Patienten zu. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist die PCP die häufigste opportunistische Infektion der HIV-infizierten Patienten in Westeuropa (Serraino 2003) sowie den Vereinigten Staaten, obwohl sich die Anzahl der PCP-Fälle bei HIV-infizierten Patienten um 3,4% pro Jahr von 1992 bis 1995 und 21,5% pro Jahr von 1996 bis 1998 reduzierte (Morris 2004, Jones 1999).

Der Organismus lässt sich mittels verschiedener Färbemethoden nachweisen. Als Untersuchungsmaterial eignen sich bronchoalveolare Lavage (BAL), Trachealsekret und induziertes Sputum. Neben den klassischen Färbemethoden bietet die Molekularbiologie neue Möglichkeiten zum Nachweis dieses Erregers. Dabei spielt die Entwicklung der Polymerase Ketten Reaktion (PCR) eine entscheidende Rolle. Die Sensitivität der Nachweismethoden hängt stark von der Qualität und Quantität des jeweiligen Untersuchungsmaterials ab. Zum Nachweis von *P. jirovecii* existieren verschiedene PCR-Methoden. In den von uns durchgeführten Untersuchungen wurden die mtLSU nested PCR zum Nachweis eines Abschnittes des mitochondrial transcribed large subunit rRNA Gens und die DHPS nested PCR zum Nachweis eines Abschnittes des Dihydropteroatsynthase-Gens aus paraffinisierten Lungenbiopsien verwendet.

Mit Hilfe der in dieser Studie angewandten Verfahren konnte in einer doppel-blinden Versuchsreihe bei 14 von 122 Patienten (11,5%) *P. jirovecii* DNA in paraffinisierten Lungenbiopsien mittels mtLSU nPCR nachgewiesen werden. Die Sequenzierung der lediglich in der 2. Stufe der mtLSU nPCR positiven Patienten war bei 12 von 14 Proben erfolgreich. Dabei zeigten sich bei sechs Patienten vier bisher nicht bekannte Punktmutationen auf dem mtLSU Gen. Eine der Punktmutationen war bei drei Patienten nachweisbar. Die 14 in der mtLSU nPCR positiven Patienten wurden im nächsten Schritt mittels DHPS nPCR im Hinblick auf mögliche Resistzenzen gegen Sulfamethoxazol untersucht. Lediglich bei zwei Patienten gelang der Nachweis von DHPS DNA. Einer der Patienten war in beiden Stufen, der zweite Patient nur in der zweiten Stufe der DHPS nPCR positiv. Die DNA-Sequenzierung zeigte bei einem

Patienten zwei neue Punktmutationen auf dem DHPS Gen, die beide jeweils eine Veränderung der Aminosäuresequenz bewirken. Die Mutation an Codon 87 führt zu einem Austausch von Valin zu Isoleucin, die an Codon 100 von Alanin zu Serin.

Die Aufschlüsselung der Patientendaten in Bezug auf die zugrunde liegenden histologischen Diagnosen zeigte, dass bei 59 von 122 Patienten (48,4%) eine neoplastische Erkrankung und bei 63 von 122 Patienten (51,6%) keine Neoplasie als Grunderkrankung vorlag. 13 von 59 Patienten (22%) mit einer Neoplasie sowie einer von vier Patienten (25%) ohne pathologische Diagnose waren in der zweiten Stufe der mtLSU nPCR positiv. Demnach war bei 13 von 59 Patienten (22%) mit bestehender Neoplasie und bei einem von 63 (1,6%) Patienten ohne maligne Grunderkrankung *P. jirovecii* DNA nachweisbar ( $p<0,004$ ; Fisher's exact test). Das relative Risiko einer Kolonisation mit *P. jirovecii* ist für Patienten mit einer malignen Grunderkrankung um das 13,9-fache höher als bei Patienten ohne bestehendes Malignom. Die Odds Ratio im Hinblick auf diese Fragestellung liegt bei 17,5.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass Patienten mit einer malignen Erkrankung statistisch signifikant häufiger mit *P. jirovecii* besiedelt sind als Patienten ohne Neoplasie. Die wahrscheinlichste Ursache liegt in einer tumorinduzierten Immunsuppression, die eine Infektion mit dem Erreger begünstigt und die Gefahr einer PCP für dieses Patientenkollektiv erhöht.

Mit den verwendeten Methoden und Materialien konnte gezeigt werden, dass ein Nachweis von *P. jirovecii* in paraffinisierten Lungenbioptaten mittels PCR möglich ist. Die beschriebenen Methoden eröffnen zusätzliche diagnostische Möglichkeiten, deren Qualität in weiteren Studien evaluiert werden muss. Aussagen bezüglich der Quantität könnten unter Verwendung einer quantitativen Real-Time PCR getroffen werden. Diese könnte genauere Angaben zur Unterscheidung zwischen einer Besiedelung und einer Pneumonie liefern. Bisher existiert diese Methode nur für das DHPS- und DHFR-Gen und nicht für das mtLSU rRNA Gen.

Die Bedeutung der auf dem mtLSU rRNA Gen gefundenen Punktmutationen muss ebenfalls in weiteren Studien geklärt werden. Eine genaue Aussage über mögliche Veränderungen der Aminosäuresequenz kann nicht getroffen werden, da das mtLSU

rRNA Gen bisher nicht vollständig sequenziert und die Aminosäuresequenz und Proteinstruktur nicht bekannt sind.

Auf dem DHPS Gen sind bisher Punktmutationen, die auf Codon 13, 16, 23, 26, 55, 57, 60, 111, 171 oder 248 nachweisbar sind, beschrieben worden. Besonders die Mutationen auf Codon 55 und 57 oder die Kombination der beiden werden mit einer Resistenz gegen Sulfamethoxazol in Verbindung gebracht wurden (Lane 1997, Takahashi 2000, Riebold 2006). Ob die bei dem Patienten dieser Studie nachgewiesenen Punktmutationen auf Codon 87 und 100 ebenfalls zu einer Resistenzbildung beitragen, kann mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden. Da sie bei einem Patienten nachweisbar waren, kann ihre Bedeutung eventuell wie die der kombinierten Mutation auf Codon 55 und 57 gesehen werden.

Die bei den Patienten gefundenen Veränderungen der Laborwerte lassen sich am ehesten durch die zugrunde liegende neoplastische Erkrankung erklären. Im Rahmen einer malignen Erkrankung erhöht sich die Aktivität der Immunabwehr, was zu einem gesteigerten Verbrauch an immunkompetenten Zellen führt. Außerdem steigen die laborchemischen Werte, die einen Hinweis auf eine erhöhte Zellaktivität und Zellumsatz liefern (z.B. Laktatdehydrogenase, Fibrinogen). Die laborchemischen Veränderungen, wie ein Anstieg der Anzahl der neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten, der Laktatdehydrogenase, des Fibrinogens, Neopterins sowie CRPs, die im Rahmen einer PCP auftreten, lassen zwar ebenfalls eine gesteigerte Immunabwehr und erhöhten Zellumsatz erkennen. Bei einer Besiedelung mit *P. jirovecii*, wie sie bei den in dieser Studie untersuchten Patienten vorliegt, sind die gefundenen Veränderungen der Laborwerte jedoch am ehesten auf eine Immunsuppression durch eine Neoplasie und eine allgemeine, ungeklärte Kachexie sowie weitere Begleiterkrankungen zurück zu führen.

In dieser Untersuchung ist es gelungen, mittels verschiedener PCR Methoden den Erreger *P. jirovecii* aus paraffinisiertem Lungengewebe nachzuweisen. Verschiedene Punktmutationen konnten dabei entdeckt werden, deren Bedeutung in weiteren Untersuchungen bewertet werden muss.

## 7. Literaturverzeichnis

Aliouat EM, Mazars E, Dei-Cas E, Delcourt P, Billaut P, Camus D. *Pneumocystis* cross infection experiments using SCID mice and nude rats as recipient host, showed strong host-species specificity. J Eukaryot Microbiol 1994; 41: 71S.

Alvarez-Martínez MJ, Miró JM, Valls ME, Moreno A, Rivas PV, Solé M, Benito N, Domingo P, Muñoz C, Rivera E, Zar HJ, Wissmann G, Diehl AR, Prolla JC, de Anta MT, Gatell JM, Wilson PE, Meshnick SR. Sensitivity and specificity of nested and real-time PCR for the detection of *Pneumocystis jiroveci* in clinical specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 56(2): 153-160.

Armbruster C, Hassl A, Kriwanek S. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS patients. Wien Klin Wochenschr 1998; 110(17): 604-607.

Atzori C, Agostoni F, Angeli E, Mainini A, Micheli V, Cargnel A. *Pneumocystis carinii* host specificity: attempt of cross infection with human derived strains in rats. J Eukaryot Microbiol 1999; 46: 112.

Azoulay E, Parrot A, Flahault A, Cesari D, Lecomte I, Roux P, Saidi F, Fartoukh M, Bernaudin JF, Cadranel J, Mayaud C. AIDS-related *Pneumocystis carinii* pneumonia in the era of adjunctive steroids: implication of BAL neutrophilia. Am J Respir Crit Care Med 1999; 160(2): 493-499.

Banerji S, Lugli EB, Miller RF, Wakefield AE. Analysis of genetic diversity at the arom locus in isolates of *Pneumocystis carinii*. J Eukaryot Microbiol 1995; 42: 675-679.

Bang D, Emborg J, Elkjaer J, Lundgren JD, Benfield TL. Independent risk of mechanical ventilation for AIDS-related *Pneumocystis carinii* pneumonia associated with bronchoalveolar lavage neutrophilia. Respir Med 2001; 95(8): 661-665.

Beard CB, Carter JL, Keely SP, Huang L, Pieniazek NJ, Moura IN, Roberts JM, Hightower AW, Bens MS, Freeman AR, Lee S, Stringer JR, Duchin JS, del Rio C, Rimland D, Baughman RP, Levy DA, Dietz VJ, Simon P, Navin TR. Genetic variation

in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg Infect Dis* 2000; 6(3): 265-72.

Beard BC, Jennings VM, Teague WG, Carter JL, Mabry J, Moura H, Visvesvara GS, Collins WE, Navin TR. Experimental inoculation of immunosuppressed owl monkeys with *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis . *J Eukaryot Microbiol* 1999; 46: 113-115.

Benfield TL, Kharazmi A, Larsen CG, Lundgren JD. Neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of patients with AIDS-associated *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Scand J Infect Dis* 1997; 29(4): 367-371.

Brodt HR, Helm EB, Kamps BS. AIDS 2000. Diagnostik und Therapie. 10. Auflage. Steinhäuser Verlag 2002; 175-189.

Butt AA, Michaels S, Kissinger P. The association of serum lactate dehydrogenase level with selected opportunistic infections and HIV progression. *Int J Infect Dis* 2002; 6(3): 178-181.

Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85: 8790-8794.

Casanova-Cardiel L, Leibowitz MJ. Presence of *Pneumocystis carinii* DNA in pond water. *J Eukaryot Microbiol* 1997; 44(6): 28.

Castiglione F, Degl'innocenti DR, Taddei A, Garbini F, Buccoliero AM, Raspollini MR, Pepi M, Paglierani M, Asirelli G, Freschi G, Bechi P, Taddei GL. Real-time PCR analysis of RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues: effects of the fixation on outcome reliability. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007; 15(3): 338-342.

Cataloluk O, Cakmak EA, Buyukberber N, Barlas O. Formalin fixing and paraffin embedding may lead to extra band development in PCR. *New Microbiol* 2003; 26(2): 193-198.

Chabé M, Dei-Cas E, Creusy C, Fleurisse L, Respaldiza N, Camus D, Durand-Joly I. Immunocompetent hosts as a reservoir of *Pneumocystis* organisms: histological and RT-PCR data demonstrate active replication. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23: 89-97.

Chabé M, Vargas SL, Eyzaguirre I, Aliouat EM, Follet-Dumoulin A, Creusy C, Fleurisse L, Recourt C, Camus D, Dei-Cas E, Durand-Joly I. Molecular typing of *Pneumocystis jirovecii* found in formalin-fixed paraffin-embedded lung tissue sections from sudden infant death victims. Microbiol 2004; 150: 1167-1172.

Chagas C. Über eine neue Trypanosomiasis des Menschen. Archiv für Schiffs- und Tropen-Hyg 1909; 13(11): 351.

Cregan P, Yamamoto A, Lum A, VanDerHeide T, MacDonald M, Pulliam L. Comparison of four methods for rapid detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. J Clin Microbiol 1990; 28: 2432-2436.

Cruciani M, Bertazzoni Minelli E, Mirandola M, Luzzati R, Merighi M, Lazzarini L, Gatti G, Vento S, Mazzi R, Malena M, Benini A, Cazzadori A, Piemonte G, Bassetti D, Concia E. Twice-weekly dapsone for primary prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-1 infection: efficacy, safety and pharmacokinetic data. Clin Microbiol Infect 1996; 2(1): 30-35.

Demanche C, Berthelemy M, Petit T, Polack B, Wakefield AE, Dei-Cas E, Guillot J. Phylogeny of *Pneumocystis carinii* from 18 primate species confirms host specificity and suggests coevolution. J Clin Microbiol 2001; 39: 2126-2133.

De la Horra C, Varela JM, Fernandez-Alonso J, Medrano FJ, Respaldiza N, Montes-Cano MA, Calderon EJ. Association between human-*Pneumocystis* infection and small-cell lung carcinoma. Eur J Clin Invest 2004; 34(3): 229-35.

DeLorenzo LJ, Huang CT, Maguire GP, Stone DJ. Roentgenographic patterns of *Pneumocystis carinii* pneumonia in 104 patients with AIDS. Chest 1987; 91(3): 323-327.

Dietrich M (Ed.). Die *Pneumocystis carinii* Pneumonie. Klinik, Diagnostik, Therapie, Prophylaxe. Springer Verlag, Berlin 1989.

Dumoulin A, Mazars E, Seguy N, Gargallo-Viola D, Vargas S, Cailliez JC, Aliouat EM, Wakefield AE, Dei-Cas E. Transmission of *Pneumocystis carinii* disease from immunocompetent contacts of infected hosts to susceptible hosts. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19: 671–678.

Edmann JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. Nature 1988; 334(6182): 519-22.

EI-Sadr WM, Murphy RL, Yurik TM, Luskin-Hawk R, Cheung TW, Balfour HH Jr, Eng R, Hooton TM, Kerkering TM, Schutz M, van der Horst C, Hafner R. Atovaquone compared with dapsone for the prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection who cannot tolerate trimethoprim, sulfonamides, or both. Community Program for Clinical Research on AIDS and the AIDS Clinical Trials Group. N Engl J Med 1998; 339(26): 1889-95.

Fisher RG, Nageswaran S, Valentine ME, McKinney RE Jr. Successful prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected children using smaller than recommended dosages of trimethoprim-sulfamethoxazole. AIDS Patient Care STDS 2001; 15(5): 263-9.

Flori P, Bellete B, Durand F, Raberin H, Cazorla C, Hafid J, Lucht F, Sung RT. Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jiroveci* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. J Med Microbiol 2004; 53: 603-607.

Gagnon S, Boota AM, Fischl MA, Baier H, Kirksey OW, La Voie L. Corticosteroids as adjunctive therapy for severe *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. A double-blind, placebo-controlled trial. N Engl J Med 1990; 323(21): 1444-50.

Gonzalez-Garcia J, Rubio Garcia R, Antela Lopez A, Garcia Alcaide F. *Pneumocystis carinii* pneumonia and HIV infection: diagnosis and treatment. Enferm Infect Microbiol Clin 1998; 16 Suppl 1: 36-44.

Glück T, Geerdes-Fenge HF, Straub RH, Raffenberg M, Lang B, Lode H, Schölmerich J. *Pneumocystis carinii* Pneumonia as a complication of immunosuppressive therapy. Infection 2000; 28(4): 227-30.

Hanano R, Kaufmann SHE. *Pneumocystis carinii* and the immune response in disease. Trends Microbiol 1998; 6(2): 71-75.

Herold G. Innere Medizin 2002. Köln; Gerd Herold: 312.

Hong ST, Yu JS, Lee M. Relation of cyst counts with numbers of total nuclei of *Pneumocystis carinii* in rats. Korean J Parasitol 1994; 32 (3): 171 – 176.

Huang L, Morris A, Limper AH, Beck JM. An official ATS Workshop summary: Recent advances and future directions in *Pneumocystis* pneumonia (PCP). Am Thorac Soc 2006; 3: 655-664.

Hughes W, Leoung G, Kramer F, Bozzette SA, Safrin S, Frame P, Clumeck N, Masur H, Lancaster D, Chan C. Comparison of atovaquone (566C80) with trimethoprim-sulfamethoxazole to treat *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS. N Engl J Med 1993; 328(21): 1521-7.

Hunter JA, Wakefield AE. Genetic divergence at the mitochondrial small subunit ribosomal RNA gene among isolates of *Pneumocystis carinii* from five mammalian host species. J Eukaryot Microbiol 1996; 43(5): 24S-25S.

Jensen T, Aliouat EM, Lundgren B, Settnes OP, Karlsson A, Dahlgren C, Dei-Cas E, Obel N. Cultured rat and purified human *Pneumocystis carinii* stimulate intra- but not extracellular free radical production in human neutrophils. J Eukaryot Microbiol 1998; 45(5); 544-547.

Kaiser K, Rabodonirina M, Picot S. Real time quantitative PCR and RT-PCR for analysis of *Pneumocystis carinii hominis*. J Microbiol Methods 2001; 45(2): 113-118.

Karow T, Lang-Roth R. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 2004; 12: 733-5.

Kazanjian P, Armstrong W, Hossler PA, Burman W, Richardson J, Lee CH, Crane L, Katz J, Meshnick SR. *Pneumocystis carinii* mutations are associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients. J Infect Dis 2000; 182(2): 551-7.

Kazanjian P, Locke AB, Hossler PA, Lane BR, Bartlett MS, Smith JW, Cannon M, Meshnick SR. *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in AIDS patients. AIDS 1998; 12(8): 873-8.

Keely SP, Stringer JR. Sequences of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* strains associated with recurrent pneumonia vary at multiple loci. J Clin Microbiol 1997; 35: 2745 – 2747.

Kiessling R, Wasserman K, Horiguchi S, Kono K, Sjoberg J, Pisa P et al. Tumor-induced immune dysfunction. Cancer Immunol Immunother 1999; 48: 353-62.

Koletar SL, Heald AE, Finkelstein D, Hafner R, Currier JS, McCutchan JA, Vallee M, Torriani FJ, Powderly WG, Fass RJ, Murphy RL. A prospective study of discontinuing primary and secondary *Pneumocystis carinii* pneumonia prophylaxis after CD4 cell count increase to > 200 x 10<sup>6</sup> /l. AIDS 2001; 15(12): 1509-15.

Krebs M, Watschinger B, Brunner C, Hassl A, Base W. *Pneumocystis carinii* in a patient with hypercalcaemia and renal failure secondary to sarcoidosis. Wien Klin Wochenschr 2002; 114: 785-788.

Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D. Infections as a major preventable cause of human cancer. J. Intern Med 2000; 248: 171-83.

Lane BR, Ast JC, Hossler PA, Mindell DP, Bartlett MS, Smith JW, Meshnick SR. Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. J Infect Dis 1997; 175: 482-485.

Larsen HH, Huang L, Kovacs JA, Crothers K, Silcott VA, Morris A, Turner JR, Beard CB, Masur H, Fischer SH. A prospective, blinded study of quantitative touch-down polymerase chain reaction using oral-wash samples for diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-infected patients. J Infect Dis 2004; 189(9): 1679-1683.

Larsen HH, Kovacs JA, Stock F, Vestereng VH, Lundgren B, Fischer SH, Gill VJ. Development of a rapid real-time PCR assay for quantitation of *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii*. J Clin Microbiol 2002; 40: 2989-2993.

Latouche S, Ortona E, Mazars E, Margutti P, Tamburrini E, Siracusano A, Guyot K, Nigou M, Roux P. Biodiversity of *Pneumocystis carinii hominis*: typing with different DNA regions. J Clin Microbiol 1997; 35(2): 383-7.

Lautenschlager I, Lyytikainen O, Jokipii L, Jokipii A, Maiche A, Ruutu T, Tukiainen P, Ruutu P. Immunodetection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens compared with methenamine silver stain. J Clin Microbiol 1996; 34(3): 728-730.

Ledergerber B, Mocroft A, Reiss P, Furrer H, Kirk O, Bickel M, Uberti-Foppa C, Pradier C, D'Arminio Monforte A, Schneider MM, Lundgren JD. Discontinuation of secondary prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection who have a response to antiretroviral therapy. Eight European Study Groups. N Engl J Med 2001; 344(3): 168-74.

Lee CH, Helweg-Larsen J, Tang X, Jin S, Li B, Bartlett MS, Lu JJ, Lundgren B, Lundgren JD, Olsson M, Lucas SB, Roux P, Cargnel A, Atzori C, Matos O, Smith JW. Update on *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis typing based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *J Clin Microbiol* 1998; 36(3): 734-41.

Lee CH, Lu JJ, Bartlett MS, Durkin MM, Liu TH, Wang J, Jiang B, Smith JW. Nucleotide sequence variation in *Pneumocystis carinii* strains that infect humans. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 754-757.

Leibovitz E, Pollack H, Moore T, Papellas J, Gallo L, Krasinski K, Borkowsky W. Comparison of PCR and standard cytological staining for detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens from patients with at high risk for infection by human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 1995; 33(11): 3004-7.

Lisby G, Andersen J, Engbaek K, Binder V. Mycobacterium paratuberculosis in intestinal tissue from patients with Crohn's disease demonstrated by a nested primer polymerase chain reaction. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29(10): 923-929.

Livak KL, Flood SJA, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications* 1995. 4; 357-362.

Loeschke S, Goldmann T, Vollmer E. Improved detection of mycobacterial DNA by PCR in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using thin sections. *Pathol Res Pract* 2005; 201(1): 37-40.

Lu JJ, Bartlett MS, Shaw MM, Smith JW, Ortiz-Rivera M, Leibowitz MJ, Lee CH. Typing of *Pneumocystis carinii* strains that infect humans based on nucleotide sequence variations of internal transcribed spacers of rRNA genes. *J. Clin. Microbiol* 1994. 32:2904–2912.

Lu JJ, Bartlett MS, Smith JW, Lee CH. Typing of *Pneumocystis carinii* strains with type-specific oligonucleotide probes derived from nucleotide sequences of internal transcribed spacers of rRNA genes. J Clin Microbiol 1995; 33(11): 2973-7.

Lüllmann H, Mohr K. Pharmakologie und Toxikologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart 1999; 14: 406-8.

Ma L, Borio L, Masur H, Kovacs JA. *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase but not dihydrofolate reductase gene mutations correlate with prior trimethoprim-sulfamethoxazole or dapsone use. J Infect Dis 1999; 180: 1969-1978.

Ma L, Kovacs JA. Expression and characterization of recombinant human-derived *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase. Antimicrob Agents Ch 2000; 44(11): 3092-96.

Maskell NA, Waine DJ, Lindley A, Pepperell JCT, Wakefield AE, Miller RF, Davies RJO. Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jiroveci* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. Thorax 2003; 58: 594-597.

Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M, de la Horra C, Respaldiza N, Gasch A, Perez-Lozano MJ, Varela JM, Calderon EJ. *Pneumocystis jirovecii* in general population. Emerg Infect Dis 2005; 11(2): 245-250.

Meneau I, Sanglard D, Bille J, Hauser PM. *Pneumocystis jiroveci* dihydropteroate synthase polymorphisms confer resistance to sulfadoxine and sulfanilamide in *Saccharomyces cerevisiae*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(7): 2610-6.

Montaner JS, Russell JA, Lawson L, Ruedy J. Acute respiratory failure secondary to *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. A potential role for systemic corticosteroids. Chest 1989; 95(4): 881-4.

Montgomery AB, Feigal DW Jr, Sattler F, Mason GR, Catanzaro A, Edison R, Markowitz N, Johnson E, Ogawa S, Royzar M et al. Pentamidine aerosol versus

trimethoprim-sulfamethoxazole for *Pneumocystis carinii* in acquired immune deficiency syndrome. Am J Respir Crit Care Med 1995; 151(4): 1068-1074.

Nahimana A, Rabodonirina M, Bille J, Francioli P, Hauser PM. Mutations of *Pneumocystis jirovecii* dihydrofolate reductase associated with failure of prophylaxis. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(11): 4301-4305.

Nahimana A, Rabodonirina M, Helweg-Larsen J, Meneau I, Francioli P, Bille J, Hause PM. Sulfa resistance and dihydropteroate synthase mutants in recurrent *Pneumocystis carinii* pneumonia. Emerg Infect Dis 2003; 9(7): 864-867.

Navin TR, Beard CB, Huang L, del Rio C, Lee S, Pieniazek NJ, Carter JL, Le T, Hightower A, Rimland D. Effect of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of *P. carinii* pneumonia in patients with HIV-1: a prospective study. Lancet 2001; 358(9281): 545-9.

Newton CR, Graham A. PCR, Second Edition. Spektrum Akademischer Verlag 1994.

Peters SE, Wakefield AE, Sinclair K, Millard PR, Hopkin JM. A search for *Pneumocystis carinii* in post-mortem lungs by DNA amplification. J Pathol 1992; 166(2): 195-8.

Procop GW, Haddad S, Quinn J, Wilson MI, Henshaw NG, Reller LB, Artymyshyn RI, Katanik MT, Weinstein MP. Detection of *Pneumocystis jiroveci* in respiratory specimens by four staining methods. J Clin Microbiol 2004; 42: 3333-3335.

Qu J, Rong Z, He L, Pan J, Chen X. Relationship between the burden of *Pneumocystis carinii*, the inflammatory reaction and lung injury in *Pneumocystis carinii* pneumonia. Chin Med J (Engl) 2000; 113(12): 1071-1074.

Rabodonirina M, Vanhems P, Couray-Targe S, Gillibert RP, Ganne C, Nizard N, Colin C, Fabry J, Touraine JL, van Melle G, Nahimana A, Francioli P, Hauser PM. Molecular evidence of interhuman transmission of *Pneumocystis* pneumonia among

renal transplant recipients hospitalized with HIV-infected patients. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(10): 1766-73.

Riebold D, Fritzsche C, Lademann M, Bier A, Reisinger EC. *Pneumocystis jiroveci* dihydropteroate synthase gene mutations at codon 171 but not at codons 55 or 57 detected in Germany. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 582-583.

Riebold D, Fritzsche C, Lademann M, Reisinger EC. Labor-Diagnostik der *Pneumocystis*-Pneumonie – neue Entwicklungen. *Dtsch Med Wochenschr* 2005; 130(22): 1377-1380.

Riebold D, Reisinger EC. Labor-Diagnostik der *Pneumocystis*-Pneumonie – neue Entwicklungen – Erwiderung. *Dtsch Med Wochenschr* 2006; 131(18): 1050-1052.

Riebold D, Hennig A, Loebermann M, Schareck W, Reisinger EC. *Pneumocystis* pneumonia in an alcoholic patient with prolonged mechanical ventilation. *Eur J Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 294-296.

Riebold D, Lademann M, Möller F-W, Dreßler M, Reisinger EC. *Pneumocystis jirovecii*. Infektiologie - Aktuelle Aspekte, Jahrbuch 2003/2004; 4. Auflage: 305-318.

Rodriguez M, Sifri CD, Fishman JA. Failure of low-dose atovaquone prophylaxis against *Pneumocystis jiroveci* infection in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 76-78.

Rossi SE, Erasmus JJ, Volpacchio M, Franquet T, Castiglioni T, McAdams HP. „Crazy-paving“ pattern at thin-section CT of the lungs: radiologic-pathologic overview. *Radiographics* 2003; 23(6): 1509-1519.

Sano M, Sugitani M, Ishige T, Homma T, Kikuchi K, Sunagawa K, Obana Y, Uehara Y, Kumasaka K, Uenogawa K, Kobayashi S, Hatta Y, Takeuchi J, Nemoto N. Supplemental utility of nested PCR for the pathological diagnosis of disseminated trichosporonosis. *Virchows Arch* 2007; Epub ahead of print.

Scholte GH, van Doorn LJ, Quint WG, Lindeman J. Polymerase chain reaction for the detection of *Helicobacter pylori* in formaldehyde-sublimate fixed, paraffin-embedded gastric biopsies. *Diagn Mol Pathol* 1997; 6(4): 238-243.

Sethi KK. Multiplication of human-derived *P. carinii* in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Experimentia* 1992; 48: 63-67.

Siegenthaler W. Siegenthalers Differenzialdiagnose. Georg Thieme Verlag 2005; 19. Auflage: 545.

Simonds RJ, Oxtoby MJ, Caldwell MB, Gwinn ML, Roger MF. *Pneumocystis carinii* pneumonia among US children with perinatally acquired HIV infection. *JAMA* 1993; 270 : 470 – 473.

Simpson-Haidaris PJ, Courtney MA, Wright TW, Goss R, Harmsen A, Gigliotti F. Induction of fibrinogen expression in the lung epithelium during *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Infect Immun* 1998; 66(9): 4431-4439.

Sinclair K, Wakefield AE, Banerji S, Hopkin JM. *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 45: 183-184.

Sing A, Trebesius K, Roggenkamp A, Rüssmann H, Tybus K, Pfaff F, Bogner JR, Emminger C, Heesemann J. Evaluation of diagnostic value and epidemiological implications of PCR for *Pneumocystis carinii* in different immunosuppressed and immunocompetent patient groups. *J Clin Microbiol* 2000; 38(4): 1461-1467.

Skerrett SJ. Host defenses against respiratory infection. *Med Clin N Am* 1994; 78: 941-66.

Smego RA Jr, Nagar S, Maloba B, Popara M. A meta-analysis of salvage therapy for *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Arch Intern Med* 2001; 161(12): 1529-33.

Steffen C (Ed). PCR applications manual. Roche Molecular Biochemicals 1999; 2nd Edition: 2-15.

Stehle SE, Rogers RA, Harmsen AG, Ezekowitz RA. A soluble mannose receptor immunoadhesin enhances phagocytosis of *Pneumocystis carinii* by human polymorphonuclear leukocytes in vitro. Scand J Immunol 2000; 52(2): 131-137.

Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. Emerg Infect Dis 2002; 8 (9): 891 – 896.

Takahashi T, Hosoya N, Endo T, Nakamura T, Sakashita H, Kimura K, Ohnishi K, Nakamura Y, Iwamoto A. Relationship between mutations in dihydropteroate synthase of *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis isolates in Japan and resistance to sulfonamide therapy. J Clin Microbiol 2000; 38(9): 3161-4.

Tamburini E, Mencarini P, De Luca A, Maiuro G, Ventura G, Antinori A, Ammassari A, Visconti E, Ortona L, Siracusano A. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: specificity and sensitivity of polymerase chain reaction in comparison with immunofluorescence in bronchoalveolar lavage specimens. J Med Microbiol 1993; 38(6): 449-453.

Tiley SM, Marriott DJ, Harkness JL. An evaluation of four methods for the detection of *Pneumocystis carinii* in clinical specimens. Pathology 1994; 26(3): 325-328.

Trikalinos TA, Ioannidis JP. Discontinuation of *Pneumocystis carinii* prophylaxis in patients infected with human immunodeficiency virus: a meta-analysis and decision analysis. Clin Infect Dis 2001; 33(11): 1901-1909.

Toma E, Fournier S, Dumont M, Bolduc P, Deschamps H. Clindamycin/primaquine versus trimethoprim-sulfamethoxazole as primary therapy for *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS: a randomized, double-blind pilot trial. Clin Infect Dis 1993; 17(2): 178-84.

Totet A, Latouche S, Duwat H, Magois E, Lacube P, Pautard JC, Schmit JL, Jounieaux V, Roux P, Raccurt C, Nevez G. Multilocus genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in patients developing diverse forms of parasitism: implication for a wide human reservoir for the fungus. *J Eukaryot Microbiol* 2003; 50 Suppl: 670-1.  
(Abstract vorhanden)

Tsolaki AG, Beckers P, Wakefield AE. Pre-AIDS era isolates of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*: high genotype similarity with contemporary isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36(1): 90-93.

Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 1996; 14(3): 303-308.

Vanek J, Jirovec O. Parasitäre Pneumonie „Interstitielle Plasmazellenpneumonie der Frühgeborenen, verursacht durch *Pneumocystis carinii*. *Zbl Bakt I Abt Orig* 1952; 158: 120-127.

Vargas SL, Huges WT, Santolaya ME, Ulloa AV, Ponce CA, Cabrera CE, Cumsille F, Gigliotti F. Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clin Infect Dis* 2001; 32(6): 855-61.

Vargas SL, Ponce CA, Hughes WT, Wakefield AE, Weitz JC, Donoso S, et al. Association of primary *Pneumocystis carinii* infection and sudden infant death syndrome. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 1489-1493.

Varthalitis I, Aoun M, Daneau D, Meunier F. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with cancer. An increasing incidence. *Cancer* 1993; 71: 481-5.

Vasconcelles MJ, Bernardo MV, King C, Weller EA, Antin JH. Aerosolized pentamidine as *Pneumocystis* prophylaxis after bone marrow transplantation is inferior to other regimens and is associated with decreased survival and an increased risk of other infections. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000; 6(1): 35-43.

Wakefield AE. DNA sequences identical to *Pneumocystis* carinii f. sp. carinii and *Pneumocystis* carinii f. sp. hominis in samples of air spora. J Clin Microbiol 1996; 34(7): 1754-9.

Wakefield AE, Stringer JR, Tamburini E, Dei-Cas E. Genetics, metabolism and host specificity of *Pneumocystis* carinii. Medical Mycology 1998; 36(1): 183-193.

Walmsley S, Levinton C, Brunton J, Muradali D, Rappaport D, Bast M, Spence D, Salit I. A multicenter randomized double-blind placebo-controlled trial of adjunctive corticosteroids in the treatment of *Pneumocystis* carinii pneumonia complicating the acquired immune deficiency syndrome. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 1995; 8(4): 348-57.

Walzer PD, Kim CK, Cushion MT. *Pneumocystis* carinii. In parasitic infections in the compromised hosts. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel 1989; pp83-178.

Walzer PD, Foy J, Steele P, et al. Activities of antifolate, antiviral, and other drugs in an immunosuppressed rat model of *Pneumocystis* carinii pneumonia. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 1935-42.

Watts JC, Chandler FW. Pneumocystosis. Pathology of Infectious Diseases 1997; Chapter 138: 1241-51.

Wright TW, Gigliotti F, Finkelstein JN, McBride JT, An CL, Harmsen AG. Immune-mediated inflammation directly impairs pulmonary function, contributing to the pathogenesis of *Pneumocystis* carinii pneumonia. J Clin Invest 1999; 104(9): 1307-1317.

Wu L, Patten N, Yamashiro CT, Chui B. Extraction and amplification of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2002; 10: 269-274.

Zar HJ, Langdon G, Apolles P, Eley B, Hussey G, Smith P. Oral trimethoprim-sulphamethoxazole levels in stable HIV-infected children. *S Afr Med J* 2006; 96(7): 627-629.

Zhang J, Tachado SD, Patel N, Zhu J, Imrich A, Manfruelli P, Cushion M, Kinane TB, Koziel H. Negative regulatory role of mannose receptors on human alveolar macrophage proinflammatory cytokine release invitro. *J Leukoc Biol* 2005; 78(3): 665-674.

## Anhang

### Benötigte Puffer und Lösungen

#### 10x TBE Stammlösung pH 8,3

- 121,4 g TRIS (100 mM), 61,8 g Borsäure (100 mM), 7,3 g EDTA (2,5 mM) abwiegen und in einem Gefäß vermischen
- mit Aqua dest. auf 1000 ml ergänzen

#### 1x TBE Laufpuffer

- 100 ml 10x TBE Stammlösung mit Aqua dest. auf 1000 ml ergänzen

#### Ethidiumbromid-Stocklösung

- 10 mg Ethidiumbromid mit Aqua dest. auf 1 ml ergänzen

#### 1%iges Agarosegel

- 2 g Agarose (reinst) in einem 300 ml Erlenmeyerkolben abwiegen
- 200 ml 1x TBE-Puffer hinzugeben
- in Mikrowelle bis zur vollständigen Aufklärung schmelzen, zwischendurch leicht schwenken und nicht kochen
- 10 µl Ethidiumbromid-Stocklösung hinzugeben, leicht schwenken

#### Desoxynukleosidtriphosphat-Set

- 4 Tubes mit den einzelnen dNTP's (25 µmol in 250 µl) auftauen
- jeweils 1250 µl Aqua dest. dazu geben
- in ein neues 1,5 ml Tube je 50 µl jedes dNTP pipettieren und leicht vortexen

#### Probenbeladungspuffer GEBS

- 250 mg Bromphenolblau und 250 mg Xylencyanol in 33 ml einer 150 mM Tris-Lösung (pH 7,6) lösen
- 60 ml Glycerol und 7 ml Aqua dest. dazugeben

## **Verzeichnis der Abbildungen**

Abb. 1.	Lebenszyklus von <i>Pneumocystis</i>	S. 5
Abb. 2.	Folsäuresynthese	S. 8
Abb. 3.	Fluoreszenzkurve für drei Amplifikationen mit unterschiedlichen Template-DNA-Mengen (gestrichelte Kurve entspricht C <sub>T</sub> -Werten)	S. 18
Abb. 4.	Standardkurve zur Ermittlung der DNA-Menge	S. 19
Abb. 5.	mtLSU-Gensequenz mit nested PCR-Primern	S. 20
Abb. 6.	DHPS-Gensequenz mit nested PCR-Primern und bekannten Mutationen	S. 22
Abb. 7.	Altersverteilung in Abhängigkeit vom mtLSU nPCR Ergebnis	S. 45
Abb. 8.	<i>P. jirovecii</i> mtLSU rRNA Gensequenzen unserer Patienten im Vergleich zu einer Referenzsequenz (NCBI Accession Number AF 337535)	S. 45
Abb. 9.	Schematische Darstellung des DHPS Gens (blau) und der daraus resultierenden Dihydropteroatsynthase (orange) mit allen bekannten Punktmutationsstellen und den daraus resultierenden Aminosäure-Austauschen in der Dihydropteroatsynthase	S. 49
Abb. 10.	<i>P. jirovecii</i> DHPS Gensequenz unseres Patienten im Vergleich zu einer Referenzsequenz (NCBI Accession Number AF 139132)	S. 50

## **Verzeichnis der Tabellen**

Tab. 1.	Geräte	S. 28
Tab. 2.	Chemikalien	S. 29
Tab. 3.	DNA-Sequenzanalysen	S. 30
Tab. 4.	Statistik und graphische Darstellung	S. 30
Tab. 5.	Literaturrecherche	S. 31
Tab. 6.	Primer der mtLSU nPCR zum Nachweis von <i>P. jirovecii</i>	S. 33
Tab. 7.	Zusammensetzung des mtLSU nPCR- Reaktionsansatzes pro Probe	S. 33
Tab. 8.	Primer der DHPS nPCR zum Nachweis von <i>P. jirovecii</i>	S. 36
Tab. 9.	Zusammensetzung des DHPS nPCR- Reaktionsansatzes pro Probe	S. 36
Tab. 10.	Aufschlüsselung der Patienten mit mehreren Proben	S. 40
Tab. 11.	Auswertung der Diagnosen	S. 43
Tab. 12.	Vierfeldertafel der <i>P. jirovecii</i> nPCR Ergebnisse	S. 44
Tab. 13.	Nachgewiesene Punktmutationen des mtLSU rRNA Gens	S. 48
Tab. 14.	Auswertung der Labordaten der mtLSU nPCR positiven Patienten	S. 52

## **Verzeichnis der Abkürzungen**

Abb.	Abbildung
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
Aqua dest.	Aqua distillata
CDC	Centers for Disease Control
CRP	C-reaktives Protein
DHPS	Dihydropteroatsyntase
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm
HAART	highly active antiretroviral therapy
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HIV	human immunodeficiency virus
IL-1	Interleukin-1
IL-8	Interleukin-8
ITS	internal transcribed spacers
kb	kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
LDH	Laktatdehydrogenase
m	Mutation
Mb	Megabasen
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ionen
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
µm	Mikrometer
µM	Mikromol

$\mu$ l	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimol
MR	Mannoserezeptor
MSG	major surface glycoprotein
mtLSU	mitochondrial transcribed large subunit
mtSSU	mitochondrial transcribe small subunit
mRNA	Messenger-RNA
M. Werlhoff	Morbus Werlhoff
NCBI	National Center of Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nPCR	nested Polymerase-Ketten-Reaktion
PABA	Paraaminobenzoësäure
PCP	<i>Pneumocystis</i> Pneumonie
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
<i>P. jirovecii</i>	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphate
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SCID	severe combined immunodeficiency
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TS	Thymidylat-Synthase
wt	Wildtyp

## **Thesen**

1. Im Rahmen der Untersuchungen zum Nachweis von *P. jirovecii* DNA aus paraffinisierten Lungenbiopsien wurden 192 paraffinierte Proben von 122 Patienten untersucht. Die Auswahl der Proben erfolgte zufällig und wurde durch das Institut der Pathologie der Universität Rostock durchgeführt. Es erfolgte demnach eine doppel-blinde Versuchsreihe. Die Zuordnung der Patientendaten zur jeweiligen Probe erfolgte erst nach Abschluss der Untersuchungen.
2. Nach Entblindung der 192 Proben stellte sich heraus, dass bei 25 von 122 Patienten mehrere Proben (n=95) untersucht worden waren.
3. Insgesamt konnte bei 14 von 122 Patienten (11,5%) *P. jirovecii* DNA in der zweiten Stufe der mtLSU nPCR nachgewiesen werden. In der 1. Stufe der mtLSU nPCR war der Nachweis bei allen Proben negativ. Der Nachweis von *P. jirovecii* DNA war bei 14 von 192 Proben (7,3%) in der zweiten Stufe der mtLSU nPCR positiv.
4. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen signifikanten Unterschied in der Besiedelung mit *P. jirovecii* zwischen Patienten mit einer malignen Grunderkrankung im Vergleich zu Patienten ohne maligne Grunderkrankung ( $p<0,004$ ; Fisher's exact test). Es zeigt sich jedoch keine statistisch signifikante Häufung bei einem speziellen Karzinom. Das relative Risiko einer Kolonisation mit *P. jirovecii* für Patienten mit einer malignen Grunderkrankung ist um das 13,9-fache höher als bei Patienten ohne Malignom. Die Odds Ratio liegt bei 17,5.
5. Ein Unterschied in der Altersverteilung zwischen Patienten mit einem positiven und einem negativen mtLSU nPCR Nachweis zeigte sich nicht.
6. Durch die DNA-Sequenzierung konnten bei sechs von 12 Sequenzen insgesamt vier bisher nicht veröffentlichte Punktmutationen auf dem mtLSU rRNA Gen nachgewiesen werden. Dabei war eine der Punktmutationen bei drei verschiedenen Patienten nachweisbar.

7. Da das mtLSU Gen bisher nicht vollständig sequenziert und damit die Aminosäuresequenz des aus der transkribierten und translatierten DNA resultierenden Proteins unbekannt ist, kann über eine Veränderung der Aminosäuresequenz keine Auskunft gegeben werden.
8. Bei zwei von 14 Proben (14,3%) konnte *P. jirovecii* DNA mittels DHPS nPCR nachgewiesen werden. Eine der Proben war sowohl in der ersten als auch der zweiten Stufe, die andere Probe nur in der zweiten Stufe der DHPS nPCR positiv.
9. Die DNA-Sequenzierung zeigte bei einem Patienten neben dem Wildtyp zwei bisher nicht bekannte Punktmutationen auf dem DHPS Gen. Diese führen jeweils zu einem Aminosäureaustausch an Codon 87 von Valin zu Isoleucin und an Codon 100 von Alanin zu Serin. Über eine mögliche Lokalisation dieser Mutationen in der aktiven Region des Enzyms kann bisher keine Aussage getroffen werden. Eine Bewertung im Hinblick auf eine Resistenzentwicklung gegenüber Medikamenten ist noch nicht möglich.
10. Die Auswertung der Labordaten bei zehn von 14 Patienten zeigte Abweichungen aus dem Normbereich bei den Lymphozyten, Leukozyten, neutrophilen Granulozyten, dem Hämoglobinwert, der Laktatdehydrogenase, dem CRP sowie dem Fibrinogen. Diese können sowohl im Rahmen von entzündlichen Geschehnissen als auch bei Malignomen im menschlichen Körper beobachtet werden. Der spezifische Parameter Neopterin wurde bei den Patienten nicht bestimmt. Da lediglich unspezifische Parameter untersucht wurden, lassen sich keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Ursache der paraklinischen Veränderungen ziehen.
11. Die mtLSU nPCR ist aufgrund ihrer höheren Sensitivität besser zum Nachweis von *P. jirovecii* geeignet als die DHPS nPCR.
12. Die *Pneumocystis*-DNA wird weder durch den Vorgang der Paraffinisierung noch bei der Aufbereitung durch die Entparaffinisierung zerstört. Das Auftreten unspezifischer DNA-Banden in der Gel-Elektrophorese konnte nicht beobachtet werden.

werden. Für den klinischen Alltag eröffnet diese Methodik einen neuen diagnostischen Rahmen.

13. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen keine Verteilungsmuster in der pulmonalen Besiedelung mit *P. jirovecii* erkennen.

14. Durch diese Arbeit konnte nicht bewiesen werden, ob als Ursache einer PCP eine Reinfektion oder eine Reaktivierung anzusehen ist. Jedoch sprechen die Ergebnisse dieser Untersuchung eher für die Theorie der Reinfektion.

15. Die vorliegenden Daten unterstützen die bisherige Vermutung, dass der Mensch das Reservoir für diesen Organismus bildet.

16. Der Erreger *P. jirovecii* scheint eine immunsupprimierte Umgebung zur Proliferation vorzuziehen. Bei Patienten mit Neoplasien liegt eine erhöhte immunologische Aktivität vor. Durch diesen erhöhten Verbrauch immunologisch tätiger Zellen wird eine gewisse Immunsuppression induziert. Diese Abwehrminderung kann zu einer höheren *P. jirovecii*-Besiedelungsrate bei Patienten mit Malignom führen.

17. Mit Hilfe einer quantitativen PCR zum Nachweis von *P. jirovecii* kann die labortechnische Entscheidung zwischen Erkrankung und Besiedelung genau definiert und allgemein vergleichbar gemacht werden. Die quantitative PCR bietet die Möglichkeit den Erfolg oder Misserfolg einer PCP-Therapie zu evaluieren.

18. Die Sensitivität der Methodik zum Nachweis von *P. jirovecii* aus paraffinisierten Lungenbioptaten sowie die Qualität und Quantität des verwendeten Materials müssen in weiteren Studien geprüft werden.

19. Eine möglicherweise notwendige medikamentöse Prophylaxe für Patienten, die aufgrund einer malignen Grunderkrankung immunsupprimiert sind, sollte in naher Zukunft diskutiert werden.

## **Danksagung**

Für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der notwendigen Materialien sowie die Förderung dieser Arbeit bin ich Professor Dr. med. Emil C. Reisinger zu großem Dank verpflichtet. Darüber hinaus bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. agr. Dipl.-Ing. Diana Riebold für Ihre große Unterstützung und ständige Bereitschaft, mir mit allen Fragen und Problemen zu helfen. Für ihre kollegiale Betreuung und Förderung dieser Arbeit danke ich ihr sehr herzlich.

Mein Dank gilt nicht zuletzt meinem Ehemann Ingo Hartig, meinen Eltern und meiner Schwester Stephanie, die mich über den langen Zeitraum hinweg immer wieder motiviert und unterstützt haben.

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbständig und lediglich unter Benutzung der angegebenen Hilfsmittel sowie der im Quellenverzeichnis aufgeführten Literatur angefertigt zu haben. Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher keine Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

## **Lebenslauf**

### Persönliche Daten:

Name: Anne-Kathrin Munk-Hartig, geb. Munk  
Anschrift: Wilhelmshavener Str. 25, 24105 Kiel  
Geburtsdatum: 12.07.1980  
Geburtsort: Stade  
Familienstand: verheiratet

### Schulbildung:

1986-1990 Grundschule Bockhorster Weg in Stade  
1990-1992 Orientierungsstufe Hohenwedel in Stade  
1992-1996 Gymnasium Oedeme Klassen 7-10 in Lüneburg  
1996-1997 Battle Creek Central High School in Battle Creek,  
Michigan, U.S.A., Abschluss mit High School Diploma  
1997-1999 Gymnasium Oedeme Klassen 12-13 in Lüneburg  
Schulabschluss: 03. Juli 1999 Abitur

### Medizinische Ausbildung:

10/1999 – 11/2005 Studium der Humanmedizin an der medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock  
18.09.2001 Ärztliche Vorprüfung  
29.08.2002 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
15.09.2004 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
14.11.2005 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### Berufliche Tätigkeit:

02/2006 – z.Zt. Weiterbildung zur Fachärztein für Urologie an der Klinik für  
Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums  
Schleswig-Holstein, Campus Kiel