

Aus dem Institut für Pathologie

der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

**Untersuchung der mikrobiellen Diversität in entzündlichen Lymphadenitiden
mittels einer 16S-rRNA-basierten Heterogenitäts- & phylogenetischen Analyse
(SHARP-Screening)**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Matthias Seibl

aus Köln

Würzburg, November 2010

Referent: Prof. Dr. med. H. K. Müller-Hermelink

Korreferent: Prof. Dr. med. A. Rosenwald

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2011

Der Promovend ist Arzt

Diese Arbeit widme ich meiner großen Liebe,

Lydia Katharina Leven.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	2
2.1	Material.....	2
2.1.1	Lymphknotengewebe.....	2
2.2	Methoden.....	3
2.2.1	DNA-Extraktion.....	3
2.2.2	Ausgangs-PCR.....	4
2.2.3	Nested-PCR.....	6
2.2.4	Problembehandlung bei der PCR.....	8
2.2.5	Gelextraktion der DNA.....	9
2.2.6	Ligation.....	10
2.2.7	Transformation.....	10
2.2.8	Problembehandlung bei der Transformation.....	11
2.2.9	Colony-PCR.....	12
2.2.10	RFLP-Verdau.....	14
2.2.11	Plasmid-Präparation und Eco RI-Verdau.....	16
2.2.12	Sequenzier-PCR.....	18
2.2.13	Sephadex-Aufreinigung und Sequenzierung.....	19
2.2.14	Auswertung.....	19

3	Ergebnisse	24
3.1	Fall 1	24
3.2	Fall 2	26
3.3	Fall 3	28
3.4	Fall 4	29
3.5	Fall 5	31
3.6	Fall 6	32
3.7	Fall 7	33
3.8	Fall 8	34
3.9	Fall 9	35
3.10	Fall 10	37
3.11	Fall 11	38
3.12	Fall 12	40
3.13	Fall 13	41
3.14	Fall 14	42
3.15	Fall 15	43
4	Diskussion	44
5	Zusammenfassung	77
6	Literaturverzeichnis	79
7	Anhang	84
8	Danksagung	
9	Lebenslauf	

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Gelelektrophorese der Ausgangs-PCR	7
Abb. 2: Gelelektrophorese der nested-PCR.....	7
Abb. 3: Gelelektrophorese der nested-PCR-Produkte zur Aufreinigung und Isolierung	12
Abb. 4: Gelelektrophorese der Colony-PCR	14
Abb. 5: Gelelektrophorese des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)	15
Abb. 6: Gelelektrophorese des Restriktionsverdau mit <i>EcoRI</i>	17
Abb. 7: Bildausschnitt aus dem Programm ChromasPro: <i>SP6</i> - und <i>T7</i> -Teilsequenz.....	20
Abb. 8: Bildausschnitt des Alignments der beiden Teilsequenzen in BLAST	21
Abb. 9 a/b: Bildausschnitt aus der Chromatographie einer Sequenz in ChromasPro	21
Abb. 10: Auszug der Ergebnisseite nach dem Blasten einer Sequenz.....	22
Abb. 11: Auszug aus dem „distance tree of results“ mit Verwandtschaftsbeziehungen	23
Abb. 12 a-d: Histologische Präparate von Fall 1 , a) HE, 1:50, b) HE, 1:400, c) CD20-Färbung, d) CD30-Färbung.....	25
Abb. 13 a-c: Histologische Präparate von Fall 2 , a) Giemsa, 1:400, b) HE, 1:100, c) lamda, 1:400.....	27
Abb. 14 a-c: Histologische Präparate von Fall 3 , a) HE, 1:25, b) CD8-Färbung, 1:25 c) Ki67-Färbung, 1:25	29
Abb. 15 a-c: Histologische Präparate von Fall 4 , a) HE, 1:50, b/c) Warthin-Starry, 1:400 und digitale Vergrößerung.....	30
Abb. 16 a-c: Histologische Präparate von Fall 5 , a) HE, 1:50, b/c) Warthin-Starry, 1:400 und digitale Vergrößerung.....	32
Abb. 17: Histologisches Präparat von Fall 8 , (HE, 1:50).....	35
Abb. 18 a/b: Histologische Präparate von Fall 10 , a) HE, 1:50, b) HE, 1:200.....	37
Abb. 19: Histologisches Präparat von Fall 11 , (HE, 1:100).....	39
Abb. 20: Histologisches Präparat von Fall 12 , (HE, 1:50).....	40
Tabelle 1: Darstellung der photometrisch gemessenen DNA-Konzentrationen.....	4
Tabelle 2: Übersicht über die, in den jeweiligen Fällen nachgewiesenen Phylotypen.....	89

1 Einleitung

Während die Diagnose neoplastischer Lymphknotenerkrankungen in den vergangenen Jahren und Jahrzehnten große Fortschritte gemacht und zu einem tiefen Verständnis der betreffenden Krankheitsmechanismen geführt hat, bleibt die Diagnostik der entzündlichen Lymphknotenerkrankungen oft bei der Feststellung einer unspezifischen Lymphadenitis stehen, wenn es sich nicht um eine Mykobakteriose oder eine der wenigen, für einen bestimmten Erreger charakteristischen entzündlichen Lymphknotenveränderungen handelt.

In solchen Fällen ist auch meist mit bakterioskopischen Färbungen kein Erreger zu identifizieren. Ein spezifischer Erregernachweis mittels PCR ist meist nicht möglich, wenn nicht bekannt ist, nach welchem Erreger gesucht werden soll. Vor diesem Hintergrund haben wir daher nach einer Methode gesucht, die gesamte, im Lymphknotengewebe reaktiver Lymphadenitiden enthaltene bakterielle Flora ohne vorherige Kenntnis der jeweiligen Erreger zu erfassen und zu charakterisieren.

Die dafür in der vorliegenden Studie verwendete Methode (SHARP-Screening) ist aus der Umweltbiologie bekannt und wurde erstmalig auf die beschriebene Fragestellung angewandt. Die Methode beruht auf der gezielten Amplifikation des bakteriellen 16S-rRNA-Gens aus der gesamten extrahierten DNA einer Gewebeprobe und der Transformation und Klonierung in ultrakompetente *Escherichia coli*-Stämme, für die weitere Selektion durch Analyse des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus. Abschließend erfolgt die Sequenz- und phylogenetische Analyse durch den Vergleich mit bekannten bakteriellen Sequenzen. Die Methode konnte für eine Verwendung von paraffineingebettetem Gewebe adaptiert werden.

Wir haben 15 Lymphknoten untersucht, die histologisch eine „unspezifische Lymphadenitis“ aufgewiesen haben. Zunächst sollte die gesamte enthaltene bakterielle Flora erfasst werden. Darüber hinaus sollten repetitiv nachweisbare Keime identifiziert werden. Und schließlich wurde eine mögliche Korrelation der nachgewiesenen Keime mit verschiedenen morphologischen Veränderungen der Entzündung des Lymphknotenparenchyms überprüft.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Lymphknotengewebe

In diese Studie wurden 15 Lymphknotenresektate aus den Jahren 2006 und 2007 aus dem Register des Referenzzentrums für Lymphknotenerkrankungen an der Universität Würzburg eingeschlossen. Das Patientenkollektiv umfasste acht Männer und sieben Frauen mit einem medianen Alter von 35 Jahren (18 - 78 Jahre). Sechs Lymphknoten stammten aus der Inguinalregion, drei Lymphknoten aus der Axillarregion, drei Lymphknoten aus dem Zervikalbereich, ein Lymphknoten aus dem Gebiet der A. mammaria interna, einer aus der Analregion und ein Lymphknoten ungenannter Lokalisation. Für die histopathologische Begutachtung wurden nach der Paraffineinbettung des formalinfixierten Gewebes 2 µm dicke Schnitte hergestellt und neben den Standardfärbungen (HE, Giemsa, PAS) auch immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen CD4, CD5, CD8, CD10, CD15, CD20, CD30, kappa/lamda, bcl-2 und Ki67 angefertigt.

Bei der histopathologischen Beurteilung der Gewebe handelte es sich in elf Fällen um reaktive Lymphadenitiden mit morphologischen Hinweisen auf eine infektiöse Genese. In zwei Fällen davon bestand der Verdacht auf eine virale Ursache. In den anderen neun Fällen wiesen die reaktiven Veränderungen auf eine bakteriell bedingte, eitrige Lymphadenitis hin. In fünf Fällen bestanden granulomatös nekrotisierende Veränderungen, wie sie als typisch für eine Katzenkratzkrankheit oder ein Lymphgranuloma venerum angesehen werden. Im Gewebe aus der Analregion bestand der Verdacht auf den Primäraffekt einer Treponemeninfektion. In einem weiteren Fall bestand der Verdacht auf eine mögliche Toxoplasmeninfektion. In einem der 15 Fälle bestand die Differentialdiagnose zu einem peripheren T-Zell-Lymphom. In den anderen Fällen fanden sich keine Hinweise auf ein malignes Geschehen. Die bakterioskopischen Färbungen und sonstigen mikrobiologischen Untersuchungen ergaben keine Hinweise auf einen spezifischen Erreger.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion:

Zur DNA-Extraktion aus den Paraffinblöcken der 15 Lymphknoten wurde das Cleanmix-DNA-Purification-Kit gemäß Protokoll B der Gebrauchsanweisung verwendet. Hierzu wurden mit Hilfe eines Mikrotoms von jedem Paraffinblock jeweils acht bis zehn Gewebeschnitte von 10 - 20 µm Dicke geschnitten und für jeden Fall getrennt in ein autoklaviertes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Um Kontaminationen und das Vermischen der Proben untereinander zu vermeiden, wurde die Klinge des Mikrotoms vor der Benutzung bei jedem der 15 Paraffinblöcke mit Ethanol gründlich gereinigt und die ersten beiden Schnitte verworfen. Zur Entfernung des Paraffins wurde das Eppendorf-Gefäß nach Zugabe von 1 ml Xylol gevortext und 5 Minuten lang bei 13000 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Für die vollständige Entfernung des Paraffins musste dieser Schritt dreimal wiederholt werden. Anschließend wurde das Pellet zweimal hintereinander mit 100 %-igem Ethanol gewaschen und 1 Minute lang bei 13000 U/min. zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes ließ man das Pellet 1 bis 2 Stunden lang bei 50 °C trocknen. In jedes Eppendorf-Gefäß wurden anschließend 150 µl (300 µl) Proteinase K-Verdau-Puffer und 15 µl (30 µl) Proteinase K hinzupipettiert und für 24 Stunden bei 56 °C im Rüttler inkubiert.

Als nächstes wurden zum verdauten Gewebe zuerst 450 µl Binding Solution und anschließend 50 µl Resin hinzugefügt (bei 400 µl Gesamtvolumen entsprechend 900 µl Binding Solution und 100 µl Resin). Hierbei war darauf zu achten, dass bei Überschreitung des Gesamtvolumens von Gewebe und Verdau-Puffer von 200 µl, sowohl Binding Solution als auch Resin proportional erhöht werden mussten. Das Verhältnis von Binding Solution zu Resin sollte mindestens 2:1 betragen. 50 µl Resin können bis zu 10 µg DNA binden. Bei mehr als 50 µl musste das Volumen von TE-Puffer bzw. Aqua dest. proportional erhöht werden.

Anschließend wurde der Ansatz durch vorsichtiges Kippen des Eppendorf-Gefäßes gemischt und in ein vorbereitetes 2 ml Eppendorf-Gefäß mit Cleanmix-Filtereinsatz gegeben. Nach Zentrifugation bei 14000 U/min für 30 Sekunden verblieb das Resin mit der nun gebundenen DNA im Filter und der Durchfluss konnte verworfen werden. Zur Reinigung der gebundenen DNA wurden 500 µl Washing Solution

hinzupipettiert und 30 Sekunden lang bei 14000 U/min. zentrifugiert. Anschließend wurde der Filter auf ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß übertragen. Um die gebundene DNA auf dem Filter zu lösen, gab man 20 - 30 µl vorgeheizten TE-Puffer bzw. Aqua dest. dazu, ließ das ganze 1 Minute lang bei Raumtemperatur inkubieren und zentrifugierte für 30 Sekunden bei 14000 U/min. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde das Eluat noch einmal auf den Filter pipettiert, 1 Minute lang bei Raumtemperatur inkubiert und wieder 30 Sekunden bei 14000 U/min zentrifugiert.

Die DNA aus den Gewebeschnitten der eingebetteten Lymphknoten befand sich nach diesen Schritten in Lösung und wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Um den Erfolg der DNA-Extraktion zu kontrollieren, wurden die Konzentrationen und die Reinheit der gelösten DNA aller 15 Fälle photometrisch gemessen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Darstellung der photometrisch gemessenen DNA-Konzentrationen bei 260 nm für alle 15 Fälle und Ermittlung des Reinheitsgrades mit Hilfe des Quotienten der beiden Extinktionswerte bei 260 und 280nm. Für eine reine DNA sollte der Wert > 1,7 betragen.

Fall	DNA-Konzentration ng / µl	260/280nm- Quotient	Fall	DNA-Konzentration ng / µl	260/280nm- Quotient
1	17	1,71	9	12	1,64
2	15,6	1,75	10	22	1,86
3	40	1,71	11	18	1,78
4	4	2,96	12	23	2,01
5	48	1,89	13	23	1,65
6	27	1,60	14	17	1,75
7	24,3	1,73	15	35	1,51
8	21,7	1,71			

2.2.2 Ausgangs-PCR:

Um das 16S-rRNA-Gen der isolierten DNA gezielt zu amplifizieren, wurde unter Verwendung der universellen und eubakteriellen Primer *27f* und *1492r* eine PCR durchgeführt. Dieser Schritt stellte die Ausgangs-PCR für die anschließende nested-PCR dar. Der Ansatz betrug für jede Probe 50 µl, wobei sich der Mastermix wie folgt zusammensetzte:

- | | | | |
|------------|-------------------|-----------|---------------------------|
| • 40,75 µl | H ₂ O | • 1 µl | Primer <i>1492r</i> |
| • 5 µl | 10 x Puffer | • 0,25 µl | Taq-Polymerase |
| • 1 µl | dNTPs | • 1 µl | extrahierte DNA in Lösung |
| • 1 µl | Primer <i>27f</i> | | (Template) |

Die Positiv-Kontrolle wurde mittels 1 µl DNA von *E.coli* (DH5α1) durchgeführt und bei der Negativ-Kontrolle, statt 1 µl DNA, zusätzlich 1 µl Wasser verwendet. Die Ausgangs-PCR setzte sich aus den folgenden Schritten zusammen:

- | | | | |
|--------------------------|---|-----------------------------|-------------------------|
| Wiederholung
(35-mal) | { | 1. Initiale Denaturierung: | 94 °C => 2 min. |
| | | 2. Denaturierung: | 94 °C => 45 sek. |
| | | 3. Primer-Annealing: | 56 °C => 45 sek. |
| | | 4. Primer-Extension: | 72 °C => 1 min. 30 sek. |
| | | 5. Abschließende Extension: | 72 °C => 10 min. |

Die Schritte 2. bis 4. wurden nach der initialen Denaturierungsphase (1.) 35-mal wiederholt. Nach der 10 minütigen Abschlussphase bei 72 °C wurde die Temperatur auf 16 °C gesenkt, um das PCR-Produkt bis zur weiteren Verwendung zu kühlen. Zum Nachweis des PCR-Produkts wurde eine Gelelektrophorese mit einem 1 %-igen Agarose-Gel durchgeführt. Für die Herstellung des 1 %-igen Agarose-Gels wurden 2,5 g Agarose in 250 ml 1x TAE-Puffer durch wiederholtes Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen des Gefäßes unter ständigem Rühren erfolgte das Ausgießen in einen vorbereiteten Gelschlitten. Das ausgehärtete Agarose-Gel konnte anschließend in eine, mit 1x TAE-Puffer befüllte Gelelektrophoresekammer (Biorad mit Halterung) gegeben und das PCR-Produkt aufgetragen werden. Dazu wurden 5 µl des PCR-Ansatzes mit 2 µl Loading-Puffer (Stopp-Puffer) gemischt und in eine Geltasche aufgetragen. Das amplifizierte 16S-rRNA-Gen (1500 bp) konnte dadurch anhand seiner Größe identifiziert werden. Zur Größenbestimmung der Banden wurde eine benachbarte Gel-Tasche mit 10 µl einer DNA-Leiter (1 kb-Marker, Fermentas) befüllt, die parallel zum PCR-Produkt mitlaufen gelassen wurde. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Gleichspannung von 500 mV und 300 mA. Dabei bewegten sich die kleineren Fragmente schneller durch das Gel als die größeren und es fand eine Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe statt.

Nach etwa 20 Minuten wurde das Gel zum Anfärben der Banden ca. 15 Minuten lang in eine ethidiumbromidhaltige Lösung gelegt. Anschließend konnte es unter ultraviolettem Licht fotografiert werden.

Für das weitere Vorgehen wurden von jedem der 15 Fälle insgesamt drei unabhängige PCR-Reaktionen durchgeführt, um Amplifikationsfehler zu reduzieren. Bei der anschließenden nested-PCR wurden diese drei Ausgangs-PCR-Produkte dann ebenfalls unabhängig voneinander amplifiziert.

2.2.3 Nested-PCR:

In der Ausgangs-PCR konnte in keinem der 15 Fälle eine Bande in der Größenordnung von 1500 bp, entsprechend dem 16S-RNA-Gen, nachgewiesen werden. Deshalb wurde an die Ausgangs-PCR eine nested-PCR-Reaktion angeschlossen. Dabei wurde das Ausgangs-PCR-Produkt als Template verwendet. Statt der Primer *27f* und *1492r* wurden die degenerierten eubakteriellen Primer *27f-b* und *1406r-b* verwendet. Das Volumen des PCR-Ansatzes betrug bei der nested-PCR nur 30 µl und der Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

- | | | | |
|------------|---------------------|-----------|-----------------------|
| • 24,45 µl | H ₂ O | • 0,6 µl | Primer <i>1406r-b</i> |
| • 3 µl | 10 x Puffer | • 0,15 µl | Taq-Polymerase |
| • 0,6 µl | dNTPs | • 0,6 µl | Ausgangs-PCR-Produkt |
| • 0,6 µl | Primer <i>27f-b</i> | | |

Bei der nested-PCR gab es zwei Positiv- und zwei Negativ-Kontrollen. Als Template für die Positiv-Kontrolle wurden zum einen 0,6 µl DNA von *E.coli* (DH5α1) und zum anderen 0,6 µl des PCR-Produktes der Positiv-Kontrolle der Ausgangs-PCR verwendet. Für die Negativ-Kontrolle wurden zum einen 0,6 µl H₂O und zum anderen 0,6 µl des PCR-Produktes der Negativ-Kontrolle der Ausgangs-PCR verwendet. Die PCR-Reaktion im Thermocycler wurde wie folgt durchgeführt:

- | | | | |
|--------------------------|---|-----------------------------|-------------------------|
| Wiederholung
(35-mal) | { | 1. Initiale Denaturierung: | 95 °C => 2 min. |
| | | 2. Denaturierung: | 95 °C => 45 sek. |
| | | 3. Primer-Annealing: | 54 °C => 45 sek. |
| | | 4. Primer-Extension: | 72 °C => 1 min. 30 sek. |
| | | 5. Abschließende Extension: | 72 °C => 10 min. |

Dabei wurden nach der initialen Denaturierungsphase (1.) die Schritte 2. bis 4. wieder 35-mal wiederholt. Anschließend erfolgte die 10 minütige Abschlussphase bei 72 °C. Das nested-PCR-Produkt wurde anschließend nach demselben Schema in einem 1 %-igen Agarose-Gel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese bei gleicher Stromstärke und Stromspannung aufgetrennt. Als Ergebnis konnten die für das 16S-rRNA-Gen spezifischen Banden bei 1500 bp nachgewiesen werden (Abb. 2).

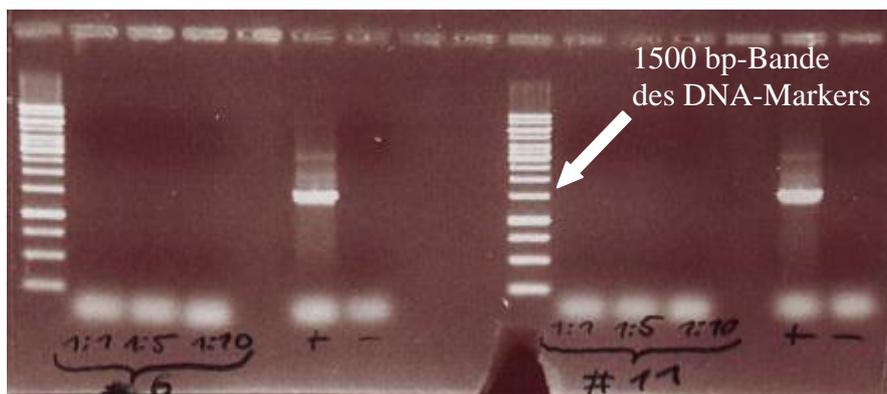


Abb. 1: Gelelektrophorese einer Ausgangs-PCR der Proben #6 und #11. Hier wurden vor der PCR-Reaktion die Verdünnungsreihen (1:1, 1:5, 1:10) der DNA für die Proben vorgenommen. Die Proben wiesen bei der Ausgangs-PCR-Reaktion noch keine Banden auf, weshalb eine nested-PCR angeschlossen wurde. Die Negativ-Kontrolle (-) ist regelhaft negativ.

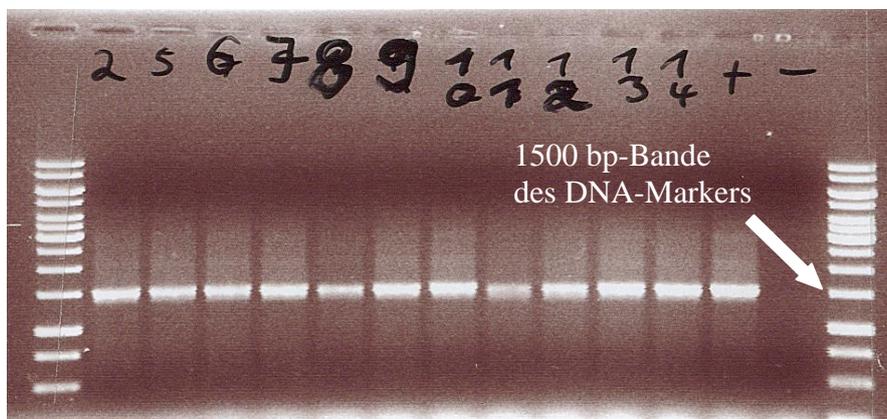


Abb. 2: Ergebnis einer nested-PCR für die Fälle #2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 und 14. Die Positiv-Kontrolle (+) mit 0,6 µl DNA von *E.coli* (DH5α1) zeigt ebenso wie die Proben eine, für das 16S-rRNA-Gen spezifische Bande bei 1500 bp. Die Negativ-Kontrolle (-) ist negativ.

2.2.4 Problembehandlung bei der PCR:

Auch bei korrekt durchgeführter Ausgangs- und nested-PCR konnte bei einigen der 15 Fälle kein positives Ergebnis in der Gelelektrophorese erzielt werden. Um auszu-schließen, dass bei der Extraktion aus den Paraffinblöcken keine DNA in Lösung ge-gangen war, wurden die Konzentrationen der gelösten DNA aller 15 Proben nach der Extraktion photometrisch gemessen (Tabelle 1). Im Vergleich der Konzentrationen mit den Ergebnissen der nested-PCR (Daten nicht dargestellt) ergab sich folgender Zusam-menhang: Die Proben, bei denen eine deutliche Bande gewünschter Länge in der Gel-elektrophorese zu erkennen war, wiesen geringere Konzentrationen an gelöster DNA auf, als die Proben, bei denen keine Bande zu sehen war (Tabelle 1: #1, 4, 9, 14). Als Konsequenz wurden Verdünnungsreihen der gelösten DNA im Verhältnis 1:1, 1:5 und 1:10 hergestellt und die Ausgangs- und nested-PCRs unter sonst gleichen Bedingungen wiederholt (Abb. 1).

Ein weiteres Problem stellten Verunreinigungen dar. Auch wenn die DNA bei elf der 15 Proben mit einem 260/280 nm-Quotienten von $> 1,7$ (Tabelle 1) einen ausrei-chenden Reinheitsgrad aufwies, konnten die Negativ-Kontrollen durch anschließende Kontaminationen sowohl in der Ausgangs- als auch in der nested-PCR positiv ausfallen. Um dies zu vermeiden, wurde der PCR-Ansatz unter sterilen Bedingungen unter der sterilen Arbeitsbank mit regelmäßig gewechselten Handschuhen und frisch autoklavier-ten Gefäßen durchgeführt. Außerdem wurde vermieden, autoklaviertes Wasser mehr-fach aus demselben Gefäß zu verwenden. Desweiteren zeigte sich, dass es sowohl aus Gründen der Verunreinigung als auch für das Ergebnis der PCR besser war, für die Ausgangs- und nested-PCR keine Gemische von Desoxy-Nukleotiden (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) zu verwenden, die mehrfach verwendet werden konnten, sondern die Desoxy-Nukleotide von der Konzentration 100 mmol/l auf 10 mmol/l zu verdünnen und einzeln zum PCR-Ansatz hinzuzufügen. Die Herstellung der Mastermixe änderte sich für die beiden PCRs dann wie folgt:

Ausgangs-PCR: (50 μl-Ansatz)		Nested-PCR: (30 μl-Ansatz)	
• 37,75 μ l	H ₂ O	• 22,65 μ l	H ₂ O
• 5 μ l	10 x Puffer	• 3 μ l	10 x Puffer
• 1 μ l	dATP (10 mmol/l)	• 0,6 μ l	dATP (10 mmol/l)

• 1 µl	dGTP (10 mmol/l)	• 0,6 µl	dGTP (10 mmol/l)
• 1 µl	dCTP (10 mmol/l)	• 0,6 µl	dCTP (10 mmol/l)
• 1 µl	dTTP (10 mmol/l)	• 0,6 µl	dTTP (10 mmol/l)
• 1 µl	Primer <i>27f</i>	• 0,6 µl	Primer <i>27f-b</i>
• 1 µl	Primer <i>1492r</i>	• 0,6 µl	Primer <i>1406r-b</i>
• 0,25 µl	Taq-Polymerase	• 0,15 µl	Taq-Polymerase
• 1 µl	DNA (1:1, 1:5, 1:10)	• 0,6 µl	Ausgangs-PCR-Produkt (1:1, 1:5,1:10)

2.2.5 Gelextraktion der DNA:

Um das 16S-rRNA-Gen aufzureinigen und zu isolieren, wurden für jeden Fall die restlichen 25 µl aller drei unabhängigen nested-PCR-Produkte gemeinsam in eine breite Tasche eines 1 %-igen Agarose-Gels aufgetragen und durch Elektrophorese aufgetrennt (Abb. 3). Nach dem Anfärben im Ethidiumbromidbad wurden die DNA-Banden von 1500 bp Größe unter ultraviolettem Licht aus dem Gel ausgeschnitten und in vorbereitete 2 ml Eppendorf-Gefäße gegeben. Im weiteren Verlauf diente das QIAquick® Gel Extraction Kit (250) zur Gelextraktion. Dabei wurde gemäß Anleitung zuerst das Gewicht der ausgeschnittenen DNA-Banden bestimmt und das dreifache Volumen an QG-Puffer dazugegeben (100 mg Gel ~ 100 µl QG-Puffer). Diese Suspension ließ man bei 50 - 60 °C in einem Heizblock schmelzen, bis das Gel vollständig aufgelöst war und gab daraufhin dem Gemisch das gleiche Volumen Isopropanol dazu. Nach dem Mischen wurde das gelöste Gel in eine QIAquick Spin-Säule auf einem 2 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert und für 1 Minute bei 13000 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurden der Spin-Säule weitere 500 µl QG-Puffer hinzugefügt und noch einmal für 1 Minute bei 13000 U/min zentrifugiert, um die restliche Agarose zu entfernen. Zur Reinigung der gewonnenen DNA wurden 750 µl PE-Puffer hinzupipettiert, kurz gewartet und wiederum 1 Minute lang bei 13000 U/min zentrifugiert. Nach Abschütten des Durchflusses wurde die DNA im Spin-Filter nochmals bei 13000 U/min für 2 Minuten zentrifugiert. Danach wurde die Spin-Säule auf ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesetzt und zum Lösen der getrockneten DNA 50 µl EB-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) oder 50 µl destilliertes und autoklaviertes Wasser

hinzupipettiert. Beim Zentrifugieren für 1 Minute bei 13000 U/min gelangte die DNA-Lösung ins Eppendorf-Gefäß und wurde bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.2.6 Ligation:

Bei der Ligation wurde das gereinigte PCR-Produkt, welches das gesuchte 16S-rRNA-Gen enthielt, mittels der T4 DNA-Ligase in einen linearisierten Vektor (pGEM - T Easy-Vektor[®]) eingefügt. Daraus entstand ein ringförmiges Plasmid, zur anschließenden Transformation in Bakterienzellen. Zunächst wurde der Ligationsansatz für jeden der 15 Fälle in der angegebenen Reihenfolge pipettiert:

- 7 µl 2x Ligations-Puffer
- 5 µl gereinigtes PCR-Produkt
- 1 µl pGEM - T Easy Vektor (Promega)
- 1 µl T4 DNA Ligase

Dieser Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und vor der weiteren Verwendung bei der Transformation eingefroren. Die ansonsten noch intakte Ligase hätte die Transformation stören können.

2.2.7 Transformation:

Bei der hier angewendeten Hitze-Transformation wurde das, bei der Ligation hergestellte Plasmid in ultrakompetente Escherichia coli Novablue[®] eingeschleust und die Bakterien auf speziellem Nähragar angezüchtet. Um sicher zu gehen, dass nur die verwendeten E. coli-Stämme angezüchtet wurden, fand die gesamte Hitze-Transformation unter sterilen Bedingungen statt.

Zunächst wurden die, bei - 80 °C gelagerten und in Lösung befindlichen E. coli-Bakterien auf Eis langsam aufgetaut und anschließend 2 µl des Ligationsansatzes jeder Probe zu 100 µl E. coli hinzupipettiert. Die Ansätze wurden 30 Minuten auf Eis gestellt. Daraufhin erfolgte der sogenannte Hitzeschock für 1 Minute 15 Sekunden in einem Wasserbad von 42 °C. Nach weiteren 5 Minuten auf Eis wurde jeweils mit 1 ml LB-Medium resuspendiert und die Eppendorf-Gefäße für 2 Stunden bei 37 °C auf die Rüttelplatte gestellt.

Als nächster Schritt erfolgte das Ausplattieren. Jeder Ansatz enthielt insgesamt ca. 1100 µl, von dem jeweils 10 % auf eine Agarplatte ausplattiert wurden. Da sich die restlichen 90 % der Bakterien in 990 µl Flüssigkeit befanden, wurden diese für 3 Minuten bei 8000 U/min zentrifugiert und der Überstand fast vollständig verworfen. Mit dem Rest des Überstandes wurden die abzentrifugierten Bakterien resuspendiert und auf eine weitere Agarplatte ausplattiert. Sowohl die 10 %- als auch die 90 %-Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank aufbewahrt.

Am nächsten Tag konnte im blue-white-Screening anhand der Anzahl weißer Kolonien festgestellt werden, ob die Hitze-Transformation erfolgreich war. Blaue Klone enthielten kein Plasmid. Ausschließlich die weißen Kolonien wurden mittels gelber Pipettenspitzen oder autoklavierter Zahnstocher „gepickt“ und auf einer frischen Agarplatte ausgestrichen. Diese Platten wurden wiederum über Nacht bei 37 °C bebrütet, um dann zur weiteren Verwendung bei der Colony-PCR zur Verfügung zu stehen.

2.2.8 Problembehandlung bei der Transformation:

Die Anzahl weißer Kolonien nach dem Ausplattieren hing von unterschiedlichen Faktoren ab. Zum einen durften für die DNA-Aufreinigung und Isolierung nur nested-PCR-Produkte verwendet werden, bei denen in der Gelelektrophorese eine deutliche Bande zu erkennen war. Schwache Banden oder sehr nahe aneinander liegende Banden erschwerten es, die gewünschte Bande bei 1500 bp auszuschneiden (Abb. 3). Dies führte dazu, dass bei der Ligation entweder kaum DNA des 16S-rRNA-Gens vorhanden war und sich der linearisierte Vektor ohne Gen zu einem Plasmid zusammenfügte. Andererseits konnte neben dem 16S-rRNA-Gen noch andere DNA extrahiert werden, die von der Ligase statt des gewünschten Gens ins Plasmid eingebaut wurde.

Bei der Hitze-Transformation musste zu Beginn darauf geachtet werden, dass die tiefgefrorenen E. coli Novablue[®] auf Eis aufgetaut wurden und nicht an der Luft oder in der Hand. Aufgrund zu schneller Temperaturänderung konnten die Zellen dabei sonst zerstört werden. Zudem eignete sich ein Wasserbad besser für den Hitzeschock als ein Heizblock, da die Eppendorf-Gefäße besser von der Wärme umspült wurden und das Plasmid somit leichter aufgenommen werden konnte. Beim Ausplattieren war desweiteren darauf zu achten, dass die übrigen 90 % der Bakterien für die 90 %-Platte bei nicht mehr als 8000 U/min zentrifugiert wurden, um sie nicht zu zerstören. Zur Konta-

minationsprävention mussten die verwendeten Agarplatten möglichst frisch sein, so dass das enthaltene Ampicillin noch eine ausreichende Wirkung besaß.

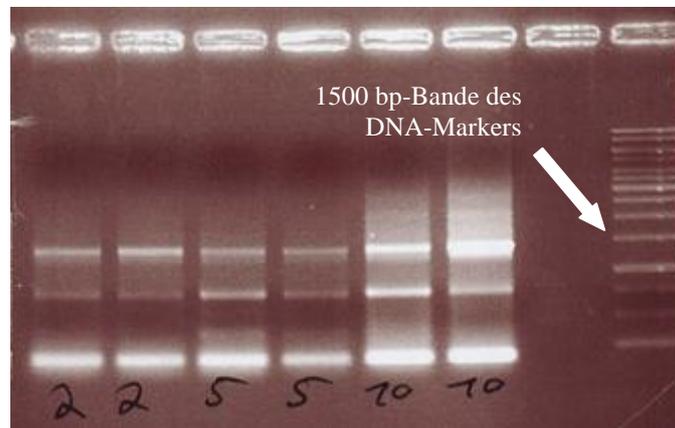


Abb. 3: Gelelektrophorese der nested-PCR-Produkte der Proben #2, #5 und #10 zur Aufreinigung und Isolierung. Zu erkennen sind die unterschiedlich starken Banden bei 1500 bp. Bei #10 ist die Abgrenzung der Banden und das Ausschneiden aus dem Gel aufgrund von Verschmierung verkompliziert.

2.2.9 Colony-PCR:

Mit Hilfe der Colony-PCR wurde geprüft, ob die E.coli-Bakterien bei der Hitze-Transformation ein Plasmid mit dem gesuchten 16S-rRNA-Gen aufgenommen hatten. Damit wurde sichergestellt, dass die gepickten weißen Klone das richtige Insert besaßen. Für diese PCR-Reaktion wurden die Plasmidprimer *SP6* und *T7* verwendet, um das Insert zu reamplifizieren. Der Mastermix für die Colony-PCR enthielt folgende Komponenten:

(30 µl-Ansatz)

- 25,05 µl H₂O
- 3 µl 10 x Puffer
- 0,6 µl dNTPs
- 0,6 µl Primer *SP6*
- 0,6 µl Primer *T7*
- 0,15 µl Taq-Polymerase

Nach der Verteilung des Mastermixes auf die benötigte Menge von PCR-Streifen, wurde unter der sterilen Arbeitsbank von jedem ausgestrichenen weißen Klon mit einer sterilen Pipettenspitze ein wenig Zellmaterial entnommen und in das PCR-Gefäß eingebracht. Während der PCR wurde dann in der Denaturierungsphase die DNA aus den Bakterien freigesetzt und stand zur Amplifikation zur Verfügung. Die Colony-PCR wurde mit dem folgenden Programm durchgeführt:

Wiederholung (35-mal)	{	1. Initiale Denaturierung:	95 °C => 5 min.
		2. Denaturierung:	95 °C => 45 sek.
		3. Primer-Annealing:	45 °C => 45 sek.
		4. Primer-Extension:	72 °C => 1 min. 30 sek.
		5. Abschließende Extension:	72 °C => 10 min.

Die Schritte 2. bis 4. wurden 35-mal wiederholt. Für das weitere Vorgehen wurden von jedem der 15 Fälle mindestens 48 positive Klone aus der Colony-PCR ausgewählt. Für eine erfolgreiche Colony-PCR musste beachtet werden, dass zum einen nur wenig Zellmaterial von einem Klon entnommen und in den Mastermix eingerührt werden durfte. Denn zu viel Zell-Detritus konnte die Colony-PCR behindern. Desweiteren sollten die PCR-Streifen während des Einreibens des Zellmaterials auf Eis stehen, da die DNA-Polymerase sonst denaturieren konnte.

Nach der Colony-PCR wurde das PCR-Produkt auf einem 1 %-igen Agarosegel in der Gelelektrophorese aufgetrennt. Falls der verwendete Klon das richtige Insert besaß, wurde es bei der Colony-PCR durch die beiden Plasmidprimer *SP6* und *T7* gezielt amplifiziert. Bei der Gelelektrophorese zeigte sich dann die typische Bande des 16S-rRNA-Gens bei 1500 bp (Abb. 4).

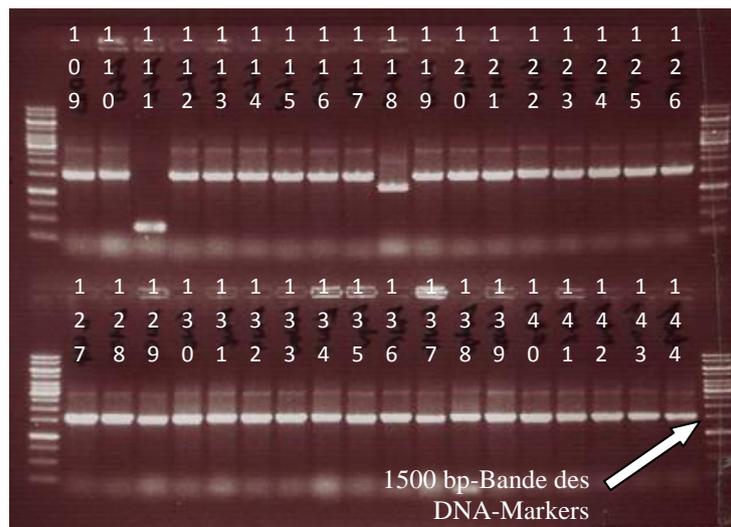


Abb. 4: Dieses Bild einer Colony-PCR zeigt für die Klone #109 bis #144 eines der 15 Fälle, die typische Bande bei 1500 bp. Diese Größe entspricht dem 16S-rRNA-Gen. Die beiden Klone #111 und #118 stellten sich auf dem Nähragar mit einer hellblauen Farbe dar. In der Colony-PCR wurde das Insert reamplifiziert und die anschließende Gelelektrophorese veranschaulicht, dass ein falsches Insert bei der Transformation aufgenommen wurde.

2.2.10 RFLP-Verdau:

Waren ursprünglich unterschiedliche Erreger in den Lymphknoten enthalten, so lagen nach der Transformation auch E.coli-Bakterien mit 16S-rRNA-Genen verschiedener Erreger vor. Die Analyse des **R**estriktions-**F**ragment-**L**ängen-**P**olymorphismus (RFLP) wurde bei diesem Versuch dazu verwendet, transformierte E.coli mit dem richtigen Insert innerhalb eines Falls voneinander zu unterscheiden. Dabei wurde das 16S-rRNA-Gen durch Einzelverdau mittels der Restriktionsendonukleasen *MspI* und *HaeIII* jeweils an bestimmten Stellen geschnitten und in Bruchstücke zerlegt. Die geschnittenen Gene unterschieden sich im Muster der resultierenden Banden, nachdem der fertige Verdau in der Gelelektrophorese zur Darstellung gebracht wurde. Durch den Einzelverdau mit zwei Enzymen, die an verschiedenen Stellen im 16S-rRNA-Gen schnitten, konnten die Klone besser voneinander unterschieden werden. Von jedem Klon mit dem richtigen Insert wurde mit dem Colony-PCR-Produkt ein eigener Verdau angesetzt. Der Restriktionsansatz enthielt folgende Substanzen:

(20 µl – Ansatz)

Hae III:

- 1 µl Hae III - Enzym
- 2 µl 10 x Puffer 2
- 7 µl H₂O
- 10 µl Colony-PCR-Produkt

MSP I:

- 0,5 µl MSP I - Enzym
- 2 µl 10 x Puffer 2
- 7,5 µl H₂O
- 10 µl Colony-PCR-Produkt

Der Verdau wurde in 96er Well-Platten angesetzt und für 2 ½ Stunden bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Danach wurde der Verdau durch Zugabe von 5 µl Stopp-Puffer beendet. Zur anschließenden Auftrennung in der Gelelektrophorese diente ein 3 %-iges Agarose-Gel, das wegen der kleineren Fragmentgröße der geschnittenen DNA etwas dichter gewählt werden musste. Nach dem Anfärben und Fotografieren wurden die Bakterien anhand der Bandenmuster verglichen und in Gruppen mit identischen Restriktionsmustern eingeteilt (Abb. 5). Um möglichst alle Erreger zu identifizieren, die sich ursprünglich in den Lymphknoten befanden, musste jeder Klon, dessen Muster sich im RFLP-Verdau von den anderen unterschied, in die Analyse einbezogen werden. Dies war auch der Fall, wenn sich die Muster im HAE III-Verdau unterschieden, im MSP I-Verdau allerdings nicht, oder umgekehrt.

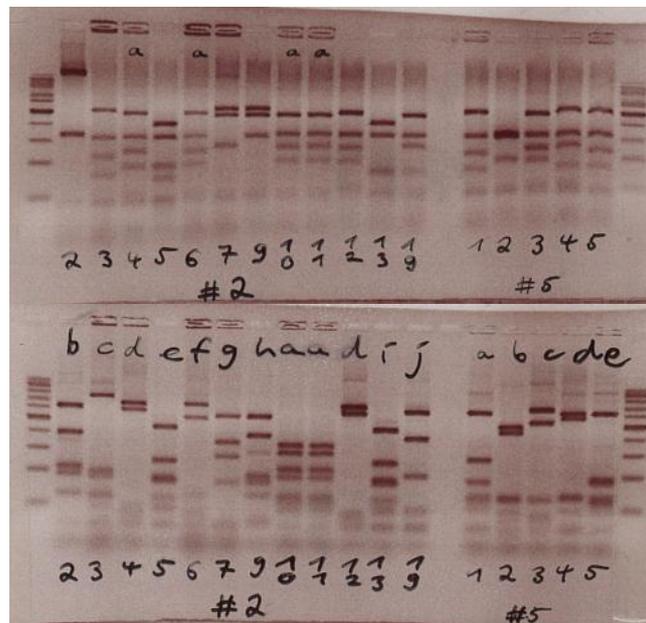


Abb. 5: Ausschnitt aus der Analyse des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) der Proben #2 und #5. Ziel war die Selektion der jeweiligen unterschiedlichen Phlotypen der enthaltenen 16S-rRNA-Gene. **oben:** Hae III-Verdau, **unten:** Msp I-Verdau, Die Klone #10, #11 und #12 der Probe #2 ähneln sich in ihrem Bandenmuster im Hae III-Verdau. Im Msp I-Verdau unterscheidet sich jedoch Klon #12 von den anderen beiden deutlich.

2.2.11 Plasmid-Präparation und Eco RI-Verdau:

Bei der Plasmid-Präparation wurden die 16S-rRNA-Gene aus den einzelnen Klonen der 15 Fälle für die anschließende Sequenzierung isoliert. Dieser Schritt begann mit der erneuten Anzucht eines zufällig ausgewählten Vertreters jeder Gruppe von Klonen mit identischem RFLP-Muster. Dazu wurde für jede Gruppe ein autoklaviertes Reagenzglas mit Deckel unter der sterilen Bank mit 3 ml ampicillinhaltigem LB-Medium (LB-Amp) gefüllt und mit dem jeweiligen Klon angeimpft. Bei 37 °C auf dem Rüttler vermehrten sich die Bakterien über Nacht und führten bis zum Folgetag zu einer Trübung der Lösung. Von jedem Reagenzglas wurden 2 ml der Über-Nacht-Kultur in ein 2 ml-Eppendorf-Gefäß gegeben und bei 8000 U/min zentrifugiert. Nach dem Abschütten des klaren Überstandes wurde das Pellet vorsichtig mit 150 µl QIAGEN®- P1-Puffer vollständig resuspendiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Bakterien durch Zugabe von 150 µl QIAGEN®- P2-Puffer. Diese Inkubation durfte maximal 5 Minuten dauern, um die DNA nicht zu schädigen. Zur Neutralisation wurden dem Ansatz anschließend 150 µl QIAGEN®- P3-Puffer hinzugefügt und für 15 Minuten auf Eis gestellt. Dabei flockten die Zellbestandteile der Bakterien sichtbar aus, während die DNA in Lösung blieb. Anschließend wurden die Zellfragmente 30 Minuten lang bei 13000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand mit der gelösten DNA wurde in ein neues 2 ml-Eppendorf-Gefäß gegeben und nochmals für 15 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß gegeben.

Die Fällung der DNA geschah durch Zugabe von 350 µl Isopropanol und anschließender Zentrifugation für 15 Minuten bei 13000 U/min. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet am Boden des Gefäßes mit 250 µl Ethanol gewaschen und bei 13000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und sämtliche Ethanolreste kräftig aus dem Eppendorf-Gefäß geschüttelt. Die offenen Gefäße mussten solange an der Luft oder bei 40 °C im Heizblock getrocknet werden, bis kein Ethanol mehr vorhanden war. Dann erst konnte die DNA mit 50 µl H₂O vorsichtig resuspendiert werden.

Nach der Plasmid-Präparation lag das Plasmid in isolierter Form vor und konnte zur Aufbewahrung eingefroren werden. Zur Erfolgskontrolle der Plasmid-Präparation wurde ein Verdau mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* angeschlossen, welches das 16S-rRNA-Gen aus dem Plasmid herausschneidet. In der Gelelektrophorese konnte das Gen daraufhin durch die entsprechende Bande bei 1500 bp dargestellt werden (Abb. 6). Für den Verdau wurden folgende Substanzen verwendet:

- 13 µl H₂O
- 2 µl *EcoRI* – Puffer
- 1 µl *EcoRI* – Enzym
- 5 µl Plasmid in Lösung

Dieser Ansatz wurde für 2 Stunden bei 37 °C in den Brutschrank gestellt und die Reaktion daraufhin durch Zugabe von 5 µl Stopp-Puffer angehalten. Die anschließende Gelelektrophorese erfolgte mit einem 1 %-igen Agarose-Gel. Bei der Beurteilung des Elektrophoresebildes war entweder eine Bande bei 1500 bp oder eine Doppelbande bei 750 bp als positives Ergebnis zu werten. Im Falle eines längeren Verdau konnte es dazu kommen, dass das herausgeschnittene 16S-rRNA-Gen vom Enzym selbst noch einmal genau in der Mitte geschnitten wurde und in zwei gleich große Hälften zerfiel.

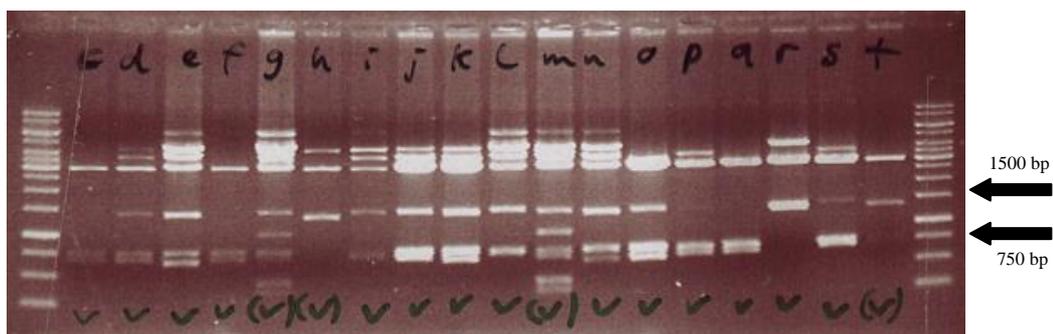


Abb. 6: Restriktionsverdau mit dem Enzym *EcoRI*. Nach dem Verdau lag das 16S-rRNA-Gen entweder vollständig (Bande bei 1500 bp) oder zweigeteilt vor (Doppelbande bei 750 bp).

Das isolierte Plasmid wurde als nächstes einer speziellen PCR unterzogen, um das darin enthaltene 16S-rRNA-Gen zu amplifizieren. Dadurch erhielt man genügend Kopien für die Sequenzierung, die als letzter Schritt des Experiments die Basenfolge des entsprechenden 16S-rRNA-Gens lieferte.

2.2.12 Sequenzier-PCR:

Für die Sequenzier-PCR wurden die gleichen Plasmidprimer, wie bei der Colony-PCR verwendet. Da nicht das gesamte Gen an einem Stück gelesen werden kann, wurde die PCR in zwei getrennten Schritten durchgeführt. Mit dem *SP6*-Primer von der einen Seite und mit dem *T7*-Primer von der anderen Seite. Hinterher konnte eine der beiden Teilsequenzen umgedreht und unter Berücksichtigung des Überlappungsbereichs mit der anderen Teilsequenz zum kompletten 16S-rRNA-Gen zusammengesetzt werden. Die beiden Teil-PCRs enthielten folgende Bestandteile:

- | | |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| <i>SP6:</i> (10 µl-Ansatz) | <i>T7:</i> (10 µl-Ansatz) |
| • 7 µl Plasmid | • 7 µl Plasmid |
| • 1 µl <i>SP6</i> -Primer | • 1 µl <i>T7</i> -Primer |
| • 2 µl Sequenzier-Mix | • 2 µl Sequenzier-Mix |

Das PCR-Programm bestand aus folgenden Schritten:

- | | | | |
|--------------------------|----------------------------|----------------------|------------------|
| | <i>SP6:</i> | | |
| | 1. Initiale Denaturierung: | 96 °C => 2 min. | |
| Wiederholung
(30-mal) | { | 2. Denaturierung: | 96 °C => 30 sek. |
| | | 3. Primer-Annealing: | 45 °C => 15 sek. |
| | | 4. Primer-Extension: | 60 °C => 4 min. |
| | | | |
| | <i>T7:</i> | | |
| | 1. Initiale Denaturierung: | 96 °C => 2 min. | |
| Wiederholung
(30-mal) | { | 2. Denaturierung: | 96 °C => 30 sek. |
| | | 3. Primer-Annealing: | 50 °C => 15 sek. |
| | | 4. Primer-Extension: | 60 °C => 4 min. |
| | | | |

Die Schritte 2. bis 4. wurden 30-mal wiederholt und der PCR-Ansatz anschließend tiefgefroren.

2.2.13 Sephadex-Aufreinigung und Sequenzierung:

Vor der Sequenzierung des amplifizierten 16S-rRNA-Gens, musste die DNA aufgereinigt werden. Das dabei verwendete Filtermaterial Sephadex[®] (Pharmacia) ist ein kugelförmig poröses Dextrangel, das durch Kreuzvernetzung unterschiedlicher Dextranfraktionen mit Epichlorhydrin hergestellt und normalerweise für die Gelchromatographie benutzt wird. Durch den hohen Gehalt an Hydroxylgruppen in den Polysaccharidketten ist das Polymer stark hydrophil und quillt daher in wässrigen Lösungen zu einem Gel.

Zunächst wurden Pipettenspitzen mit Filtereinlage auf 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße mit gelochtem Deckel gesteckt und bis zum Oberrand mit gequollenem Sephadex befüllt. Dann wurde die Flüssigkeit 3 Minuten lang bei 3000 U/min. aus dem Sephadex-Gel in das Eppendorf-Gefäß zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nach dem Wechsel der Spitzen auf frische Eppendorf-Gefäße konnte die DNA aus der Sequenzier-PCR auf das Sephadex-Gel aufgebracht werden. Hierzu wurden 10 µl der *SP6*- bzw. *T7*-PCR auf das Sephadex-Gel einer Spitze pipettiert und für 3 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Dieser Schritt entfernte aus der Lösung sämtliche Restproteine, die darin noch enthalten waren.

Die abschließende Sequenzierung wurde auf einem ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) nach dem ABI-Prism-Sequenzierungsprotokoll durchgeführt.

2.2.14 Auswertung:

Das Ergebnis der Sequenzierung der *SP6*- und *T7*-Sequenzier-PCR der Plasmide waren zwei Dateien, die je eine Hälfte der Basenfolge des gesuchten 16S-rRNA-Gens enthielten. Um die beiden Teilsequenzen zum gesamten Gen zusammenzufügen, musste eine davon umgedreht und der Überlappungsbereich herausgeschnitten werden. Das dazu verwendete Programm war „ChromasPro“ (Version 1.41[©] 2003 - 2007 Technelysium Pty Ltd.). Methodisch wurden dazu zunächst in der Basensequenz die beiden degenerierten eubakteriellen Primer *27f-b* und *1406r-b* aufgesucht, die bei der nested-PCR verwendet wurden und dem 16S-rRNA-Gen direkt angelagert waren (Abb. 7). Dadurch wurde sichergestellt, dass bei der Identifikation des ursprünglichen

Erregers tatsächlich nur das 16S-rRNA-Gen und nicht der benachbarte Bereich des Plasmids verwendet wurde. Die Abschnitte vor den Primern wurden herausgeschnitten und eine der beiden Teilsequenzen umgedreht. Um alle Sequenzen einheitlich auszuwerten, wurde im Vorfeld festgelegt, immer die *T7*-Teilsequenz umzudrehen und die *SP6*-Teilsequenz in ihrer Basenfolge zu belassen.

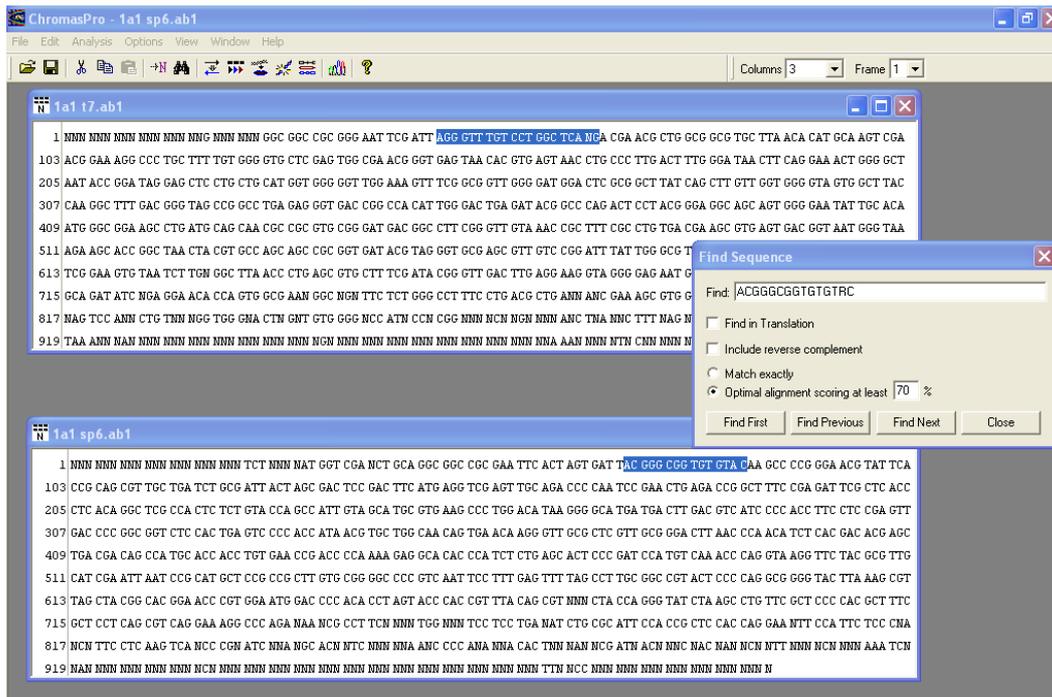


Abb. 7: Bildausschnitt aus dem Programm ChromasPro: Dargestellt sind die *SP6*- und die *T7*-Teilsequenzen, wobei in jeder, einer der beiden Primer *27f-b* und *1406r-b* gefunden wurde (blau markiert).

Als nächstes wurden die beiden Teilsequenzen mit Hilfe des „Basic-Local-Alignment-Search-Tool“ (BLAST) unter der Kategorie „Align two sequences using BLAST (bl2seq)“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) verglichen und der Überlappungsbereich berechnet (Abb. 8). Dieser enthielt neben den vier verschiedenen Basen (A, G, C, T) auch den Buchstaben „N“, der die Positionen in der Sequenz markierte, an denen bei der Sequenzierung die Base nicht zu lesen war. Vor dem Alignment bot es sich an, beide Teilsequenzen auf Lücken zu untersuchen und gegebenenfalls auszubessern, da fehlende Basen meist anhand der Kurvenverläufe im dazugehörigen Chromatogramm ergänzt werden konnten (Abb. 9a/b). Diese Korrektur war aber nicht immer möglich, da die Kurven manchmal nicht eindeutig waren und

mehrere Basen für ein „N“ in der Sequenz in Frage kamen. Außerdem zeigte die Erfahrung, dass sich das Ausbessern bei nur wenigen Lücken in der Sequenz kaum auf das Ergebnis der Übereinstimmung bei der Identifikation des Klons auswirkte.

Im Überlappungsbereich der beiden Teilsequenzen wurde eine möglichst große Basenfolge ohne Lücken markiert (Abb. 8) und in beiden Teilsequenzen in ChromasPro danach gesucht. Dieser Abschnitt musste einmal in einer der beiden Teilsequenzen gelöscht werden, damit das zusammengesetzte Gen diesen nicht zweimal enthielt.



Abb. 8: Ergebnis des Alignments der beiden Teilsequenzen in BLAST. „Query“ stellt die Teilsequenz *SP6* dar und „Subject“ die von *T7*. Der Bereich, in dem beide Teilsequenzen übereinstimmen, ist hier angezeigt und enthält aufgrund unvollständiger Sequenz auch einige Lücken. Das schwarze Rechteck markiert die Stelle des Überlappungsbereichs, der in Chromas Pro beim Zusammenfügen der beiden Teilsequenzen verwendet wurde.

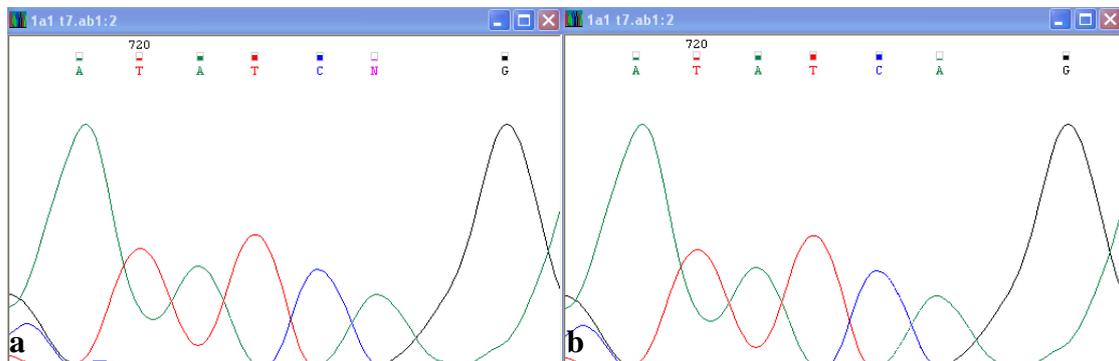


Abb. 9: a) Der hier dargestellte Auszug aus der Chromatographie der Sequenz eines Klons zeigt bei der vorletzten Base ein „N“ und markiert somit eine Stelle, an der die Sequenziermaschine die richtige Base nicht erkennen konnte. b) Nach der manuellen Korrektur wurde das „N“ durch die richtige Base Adenosin ersetzt, die bei dieser Chromatographie durch den grünen Kurvenverlauf gekennzeichnet ist.

Mit der Basenfolge des vollständigen 16S-rRNA-Gens wurde auf der Internetseite von BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) unter der Kategorie „nucleotid blast“ nach den dazugehörigen Erregern gesucht. Hierzu musste man unter „database“ das Feld für „Others“ auswählen, um nach Bakterien zu suchen. Das Basic-Local-Alignment-Search-Tool verglich daraufhin die eingegebene DNA-Sequenz mit bekannten Sequenzen in der NCBI-Genbank. Aus der Liste der gefundenen Organismen (Abb. 10) wurden für jeden Klon die beiden Bakterien ausgewählt, die am besten mit der Sequenz übereinstimmten oder damit am nächsten verwandt waren. Diese waren anhand des „query coverage“ und der „max. identity“ zu erkennen. Der Wert des „query coverage“ entsprach einer Prozentzahl und gab den Anteil des 16S-rRNA-Gens des gefundenen Bakteriums an, der mit der eingegebenen Sequenz übereinstimmte und für den Vergleich herangezogen wurde. Der Wert der „max. identity“ entsprach ebenfalls einer Prozentzahl und gab das Ausmaß der Übereinstimmung des gefundenen Bakteriums und der bei BLAST eingegebenen Sequenz im Bereich des „query coverage“ an. Für eine hohe Übereinstimmung musste sowohl der Wert des „query coverage“ als auch der „max. identity“ möglichst groß sein.

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EF540485.1	Comamonadaceae bacterium b4M 16S ribosomal RNA gene, partial s	2407	2407	98%	0.0	98%
EF516158.1	Uncultured bacterium clone FCPO695 16S ribosomal RNA gene, comp	2379	2379	98%	0.0	97%
EF516441.1	Uncultured bacterium clone FCPU546 16S ribosomal RNA gene, comp	2337	2337	98%	0.0	97%
EU979062.1	Uncultured beta proteobacterium clone g53 16S ribosomal RNA gene.	2335	2335	99%	0.0	96%
EF516785.1	Uncultured bacterium clone FCPS694 16S ribosomal RNA gene, comp	2331	2331	99%	0.0	96%
EF515881.1	Uncultured bacterium clone FCPT469 16S ribosomal RNA gene, comp	2331	2331	98%	0.0	97%
EF157172.1	Uncultured bacterium clone 91-50 16S ribosomal RNA gene, partial s	2329	2329	98%	0.0	97%
EF516254.1	Uncultured bacterium clone FCPS541 16S ribosomal RNA gene, comp	2329	2329	98%	0.0	97%
EF516144.1	Uncultured bacterium clone FCPP663 16S ribosomal RNA gene, comp	2327	2327	98%	0.0	97%
EF515900.1	Uncultured bacterium clone FCPT657 16S ribosomal RNA gene, comp	2327	2327	98%	0.0	97%
DQ451482.1	Uncultured bacterium clone FAC43 16S ribosomal RNA gene, partial s	2324	2324	99%	0.0	96%
AY429716.1	Ramlibacter sp. HTCC332 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2311	2311	98%	0.0	97%
EF516902.1	Uncultured bacterium clone FCPN541 16S ribosomal RNA gene, comp	2307	2307	98%	0.0	96%
EF516381.1	Uncultured bacterium clone FCPS464 16S ribosomal RNA gene, comp	2298	2298	98%	0.0	96%
DQ398883.1	Uncultured bacterium clone 28 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	2298	2298	99%	0.0	96%
DQ906852.1	Uncultured bacterium clone 10A-16 16S ribosomal RNA gene, partial	2292	2292	98%	0.0	96%
AY921862.1	Uncultured beta proteobacterium clone AKYG862 16S ribosomal RNA	2287	2287	99%	0.0	96%

Abb. 10: Diese Abbildung zeigt einen Ausschnitt der Ergebnisseite nach dem Blasten der experimentell ermittelten Sequenz auf der Internetseite BLAST. Nur der obere Teil der Liste ist angegeben. Die darin enthaltenen Bakterien weisen alle einen „query coverage“ und „max. identity“ von 96% bis 99% auf.

Um aus der Menge der Bakterien mit gleich hohen „query coverage“- und „max. identity“-Werten diejenigen herauszusuchen, die mit der geblasteten Sequenz am meisten übereinstimmten, ließ man sich über den Button „distance tree of results“ den Verwandtschaftsbaum anzeigen (Abb. 11). Dieser gab die gefundenen Bakterien aus der Datenbank in einem Verwandtschaftsbaum graphisch wider. Je näher zwei Bakterien darin abgebildet wurden, desto höher war ihr Verwandtschaftsgrad. Hatte ein Bakterium also den höchsten Übereinstimmungswert in der Liste der gefundenen Organismen, und befand es sich im Verwandtschaftsbaum auch direkt neben der geblasteten Sequenz, kam es für die Auswertung in Frage.

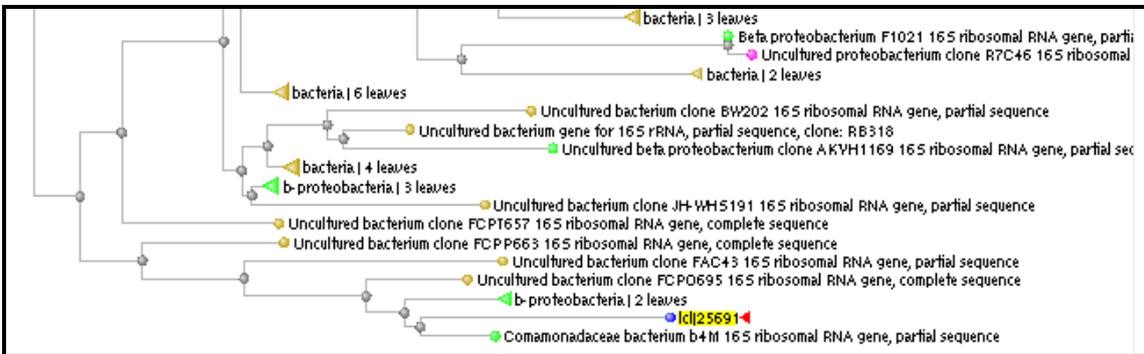


Abb. 11: Der dargestellte Auszug aus dem „distance tree of results“ zeigt die eigene geblastete Sequenz als blauen Punkt mit Gelb markiertem Text und rosanem Pfeil. Alle Bakterien die sich in unmittelbarer Nähe zur geblasteten Sequenz befinden, weisen einen hohen Verwandtschaftsgrad auf.

3 Ergebnisse

Die Amplifikation der 16S-rRNA-Gene aus der extrahierten DNA der Lymphknoten ergab in allen 15 Fällen Fragmente der erwarteten Größe von 1500 bp. Bei der Analyse des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus gingen aus dem Vergleich der Restriktionsmuster für alle Fälle zusammen insgesamt 400 Klone hervor, deren 16S-rRNA-Gene sequenziert wurden. Nach der phylogenetischen Identifikation der Sequenzen, unter der Zuhilfenahme des Basic-Local-Alignment-Search-Tool- (BLAST-) Algorithmus, verringerte sich die Anzahl brauchbarer Sequenzen um 37 durch den Wegfall lückenhafter bzw. unvollständiger Sequenzen. Es blieben insgesamt 363 Sequenzen übrig, von denen 327 Sequenzen (90,1 %) zu einem bekannten Phylotyp homolog waren. Diese Sequenzen ließen sich einer von zehn Klassen von Bakterien zuordnen (*Alpha-Proteobacteria*, *Beta-Proteobacteria*, *Gamma-Proteobacteria*, *Delta-Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Planctomycetes*) (Tabelle 2). 36 Sequenzen (9,9 %) entsprachen keiner bekannten Bakterienspezies, konnten aber durch ihre Homologie zu verschiedenen *uncultured bacteria* einem, bisher noch nicht kultivierten Phylum zugeordnet werden.

Zum Vergleich der Ergebnisse im SHARP-Screening wurde mit Hilfe spezies-spezifischer Primer in zusätzlichen PCR-Reaktionen nach *Bartonella henselae*, *Chlamydia trachomatis*, *Toxoplasma gondii*, *Yersienien*, *Enterobakterien* und atypischen *Mykobakterien* gesucht.

3.1 Fall 1:

Im Fall 1 handelte es sich um einen Lymphknoten aus der linken Leistenregion eines 46-jährigen männlichen Patienten. In der histologischen Betrachtung war die Struktur des Lymphknotens prinzipiell noch erhalten. Die fibrös verbreiterte Lymphknotenkapsel und die folliculäre Reaktion in den darunter gelegenen Schichten bzw. die daneben gelegene sinusoidale B-Zell-Reaktion gaben den Hinweis auf eine entzündliche Veränderung (Abb. 12a). Dabei enthielten die Sinus zahlreiche kleine Mikroabszesse,

die teilweise auch auf das Lymphknotenparenchym übergriffen (Abb. 12b). Im Parenchym selbst zeigte sich eine deutliche Aktivierung der T-Zone. Immunhistochemisch fand sich eine regelrechte Verteilung der B- und T-Zell-Areale (Abb. 12c). Die Proliferation in der T-Zone war erhöht. Hier kamen auch zahlreiche CD30-positive aktivierte Zellformen vor, die Plasmoblasten entsprachen (Abb. 12d). Schließlich wurden in der CD15-Färbung die neutrophilen Granulozyten in den Mikroabszessen markiert. Differentialdiagnostisch kamen bei dieser reaktiven Veränderung eine Katzenkratzkrankheit oder ein Lymphgranuloma venerum in Frage.

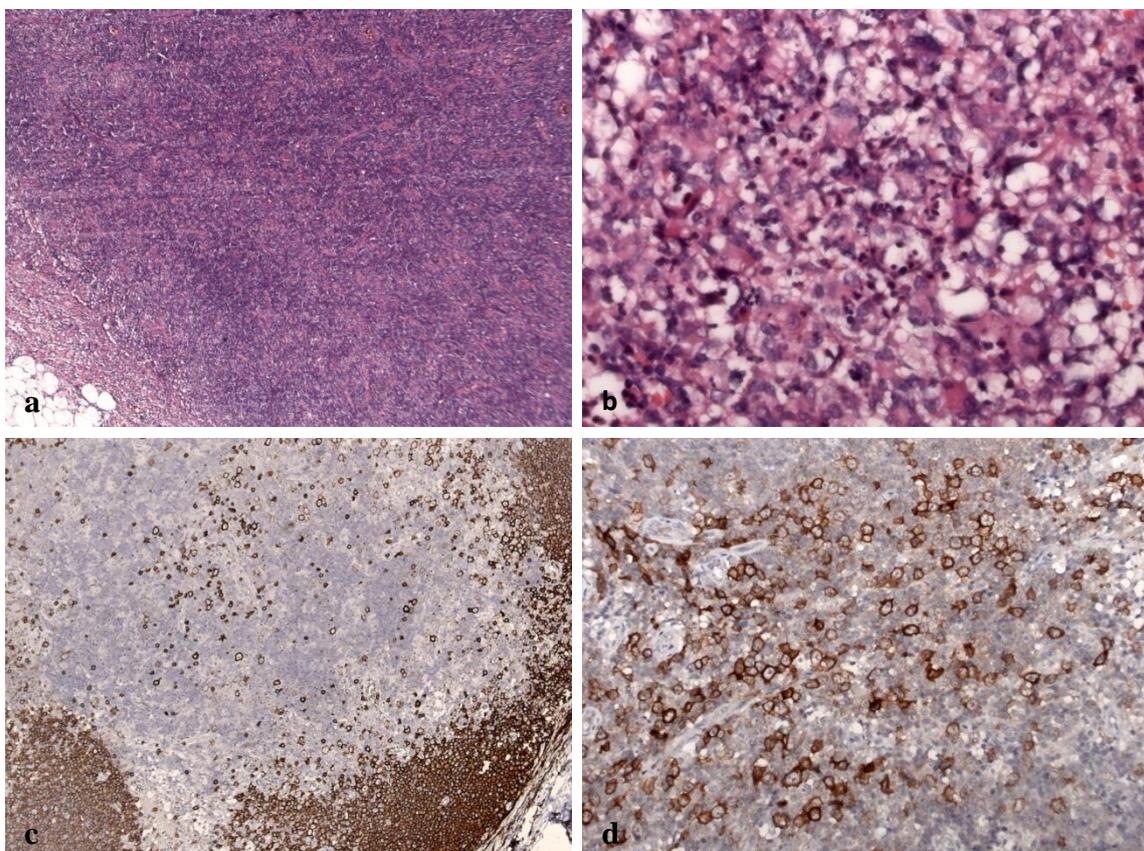


Abb. 12: Fall 1 a) Entzündliche Verbreiterung der Lymphknotenkapsel mit folliculärer Reaktion und sinusoidaler B-Zell-Reaktion; Mikroabszesse sowohl sinusoidal als auch im Parenchym (HE, Vergr. 1:50), b) vergrößerte Darstellung der Mikroabszesse (HE, Vergr. 1:400), c) immunhistochemische Darstellung der B-Zellen, neben der regelrechten folliculären Verteilung sind auch zahlreiche B-Zellen interfolliculär zu sehen (CD20-Färbung), d) Plasmoblasten (CD30- Färbung)

Im Fall 1 wurden insgesamt 21 Sequenzen phylogenetisch analysiert, die sich vier Klassen von Bakterien zuordnen ließen (Tabelle 2). Drei Sequenzen entsprachen *Janthinobacterium* aus der Ordnung der *Burkholderiales* (*Beta-Proteobacteria*, Familie: *Oxalobacteraceae*). Drei weitere Sequenzen waren zu Vertretern aus der Ordnung der

Corynebacteria homolog (*Actinobacteria*). Zwei davon besaßen die größte Homologie zu *Corynebacterium pseudogenitalium*. Vier weitere Sequenzen zeigten eine Übereinstimmung mit einem nicht kultivierten Bakterium aus der Klasse der *Cyanobacteria* (*Klon M4-11*). Aus der Klasse der *Firmicutes* fand sich eine Übereinstimmung mit *Staphylococcus epidermidis* und zwei mit *Streptokokken*. Die Subspezies waren hierbei *Streptococcus salivarius* und *Streptococcus vestibularis*.

Drei weitere Sequenzen konnten keiner bekannten Bakterienspezies zugeordnet werden. Zwei davon waren zu *uncultured bacterium clone P5D18-494* homolog. Die andere Sequenz entsprach dem *uncultured bacterium clone RL387_aao89h04*.

In den zusätzlichen PCR-Reaktionen mit Hilfe speziesspezifischer Primer konnten weder *Bartonella henselae*, *Chlamydia trachomatis*, *Toxoplasma gondii* noch *Yersienien*, *Enterobakterien* und atypische *Mykobakterien* nachgewiesen werden.

3.2 Fall 2:

Fall 2 war eine linksseitige inguinale Lymphknotenexstirpation einer 20-jährigen Frau. Bei der diagnostizierten Lymphadenitis war die Grundstruktur des Lymphknotens noch zu erkennen. Es fanden sich einzelne Primärfollikel und zahlreiche Plasmazellen in den Marksträngen (Abb. 13a), die eine polytypische Expression ihrer Immunglobulin-Leichtketten aufwiesen (Abb. 13c). In den B-Zell-Arealen wurden durch die immunhistochemischen CD20-, CD23- und Immunglobulin D-Färbungen naive B-Lymphozyten mit rudimentären Netzwerken follikulärer dendritischer Zellen nachgewiesen. In der T-Zone zeigten sich zum Teil aktivierte hochendotheliale Gefäße und kleine aktivierte Lymphozyten (Abb. 13b). Hier kamen zahlreiche CD4- und CD8-positive T-Zellen vor. Die Proliferation war leicht knotig im Bereich der T-Zell-Areale verteilt und lag bei 20 - 30 %. Im Rahmen der Klonalitätsuntersuchungen ergab sich bei der Amplifikation der FR2-A- und FR3-A-Region des Immunglobulinschwerkettengens ein polyklonales oligoklonales Resultat. In der Multiplex-PCR des T-Zellrezeptor-Gammakettengens fand sich ebenso ein polyklonales Amplifikat. Insgesamt handelte es sich bei dieser Lymphadenitis um eine reaktive Veränderung im Sinne einer atypischen Immunreaktion mit dem Verdacht auf eine Virusinfektion.

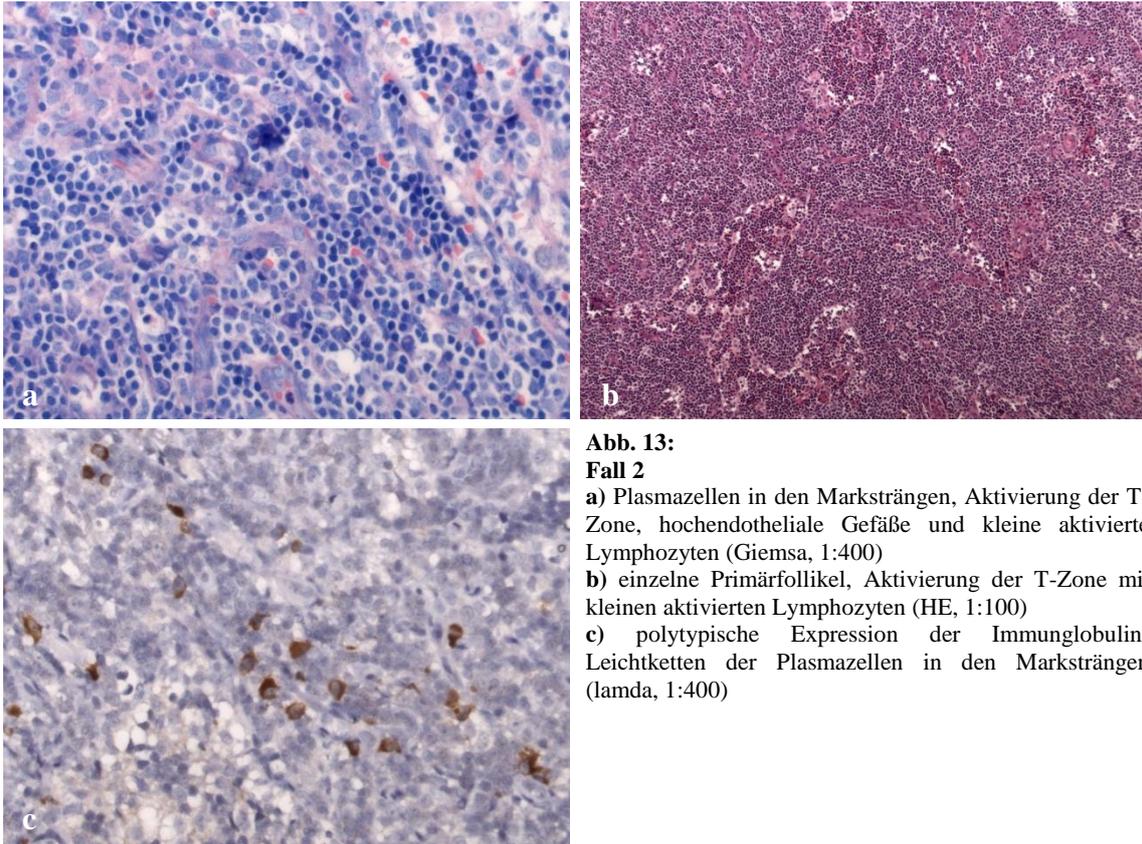


Abb. 13:

Fall 2

- a)** Plasmazellen in den Marksträngen, Aktivierung der T-Zone, hochendotheliale Gefäße und kleine aktivierte Lymphozyten (Giemsa, 1:400)
b) einzelne Primärfollikel, Aktivierung der T-Zone mit kleinen aktivierten Lymphozyten (HE, 1:100)
c) polytypische Expression der Immunglobulin-Leichtketten der Plasmazellen in den Marksträngen (lambda, 1:400)

Die phylogenetische Identifikation von 51 Sequenzen im Fall 2 ergab in der Klasse der *Beta-Proteobacteria* zwölf Homologien zu *Comamonadaceae* aus der Ordnung der *Burkholderiales* (Tabelle 2). Aus der Klasse der *Alpha-Proteobacteria* fanden sich drei Sequenzen, die zu *Novosphingobium* aus der Ordnung der *Sphingomonadaceae* homolog waren. Weiterhin besaß eine Sequenz eine Übereinstimmung mit einer *Paracoccus*-Spezies aus der Ordnung der *Rhodobacterales*. 22 Sequenzen zeigten Homologien zu verschiedenen Spezies der *Actinobacteria*. Davon gehörten zwei Sequenzen der Unterordnung der *Corynebacteria* an und entsprachen einer *Rhodococcus*-Spezies aus der Familie der *Nocardia*. Innerhalb der *Propionibacterineae* waren vier Sequenzen zu *Nocardioides* homolog. Elf Sequenzen zeigten Übereinstimmungen mit Bakterien aus der Klasse der *Firmicutes*. Davon entsprachen sechs Sequenzen der Spezies *Bacillus* (Klon: *Jamb-602*). Fünf weitere Sequenzen gehörten der Spezies *Staphylococcus* an, wobei vier Sequenzen zu *Staphylococcus hominis* und eine zu *Staphylococcus epidermidis* homolog waren.

In den zusätzlichen PCR-Reaktionen mit Hilfe speziesspezifischer Primer konnten weder *Bartonella henselae*, *Chlamydia trachomatis*, *Toxoplasma gondii* noch *Yersienien*, *Enterobakterien* und atypische *Mykobakterien* nachgewiesen werden.

3.3 **Fall 3:**

Im dritten Fall handelte es sich um einen linksseitigen inguinalen Lymphknoten einer 22-jährigen Patientin. In der histopathologischen Begutachtung fand sich eine ausgeprägte lymphofollikuläre Hyperplasie (Abb. 14a). Die Lymphfollikel enthielten hauptsächlich Blasten und wiesen kaum Mantelzonen auf. Dabei war keine signifikante plasmazelluläre Differenzierung zu erkennen. Interfollikulär zeigten sich kleine aktivierte Lymphozyten der B- und T-Zell-Reihe. Immunhistochemisch lag eine regelrechte Verteilung der B- und T-Zell-Areale vor. Auch bei der IgD-Färbung konnten um die vergrößerten Keimzentren kaum Mantelzonen nachgewiesen werden. Die Proliferation war in den Keimzentren normal und betrug interfollikulär 30 - 40 % (Abb. 14c). In diesen Arealen kamen vermehrt CD8-positive T-Lymphozyten vor (Abb. 14b). Desweiteren lag keine Verminderung der CD4-positiven T-Zellen vor und in der CD21-Färbung stellten sich weitgehend intakte Netzwerke follikulärer dendritischer Zellen dar. Die polyklonale Plasmazytose erstreckte sich zum Teil auch auf die Kapselregion. Zusammenfassend bestand der Verdacht auf eine infektiös verursachte Lymphadenitis mit viraler Genese.

Die Sequenzanalyse der 16S-rRNA-Gene der 20 Klone ergab innerhalb der *Alpha-Proteobacteria* eine Homologie zu *Paracoccus* (Tabelle 2). 13 Sequenzen konnten den *Actinobacteria* zugeordnet werden, von denen zehn *Propionibacterium* angehörten. Unter den *Chloroflexi*-Bakterien ergaben sich drei Homologien zu unkultivierten Vertretern. Bei den *Firmicutes* gehörte eine Sequenz *Staphylococcus capitis* an. Eine weitere Sequenz war homolog zu *Veillonella (sp. oral)* aus der Ordnung der *Clostridia*. Eine letzte Sequenz konnte keiner bekannten Klasse zugeordnet werden. Die höchste Übereinstimmung ergab sich zu zwei unkultivierten Bakterien (*uncultured bacterium clone RL387_aao89h04* und *uncultured bacterium clone P5D18*).

In den zusätzlichen PCR-Reaktionen mit Hilfe speziesspezifischer Primer konnten weder *Bartonella henselae*, *Chlamydia trachomatis*, *Toxoplasma gondii* noch *Yersienien*, *Enterobakterien* und atypische *Mykobakterien* nachgewiesen werden.

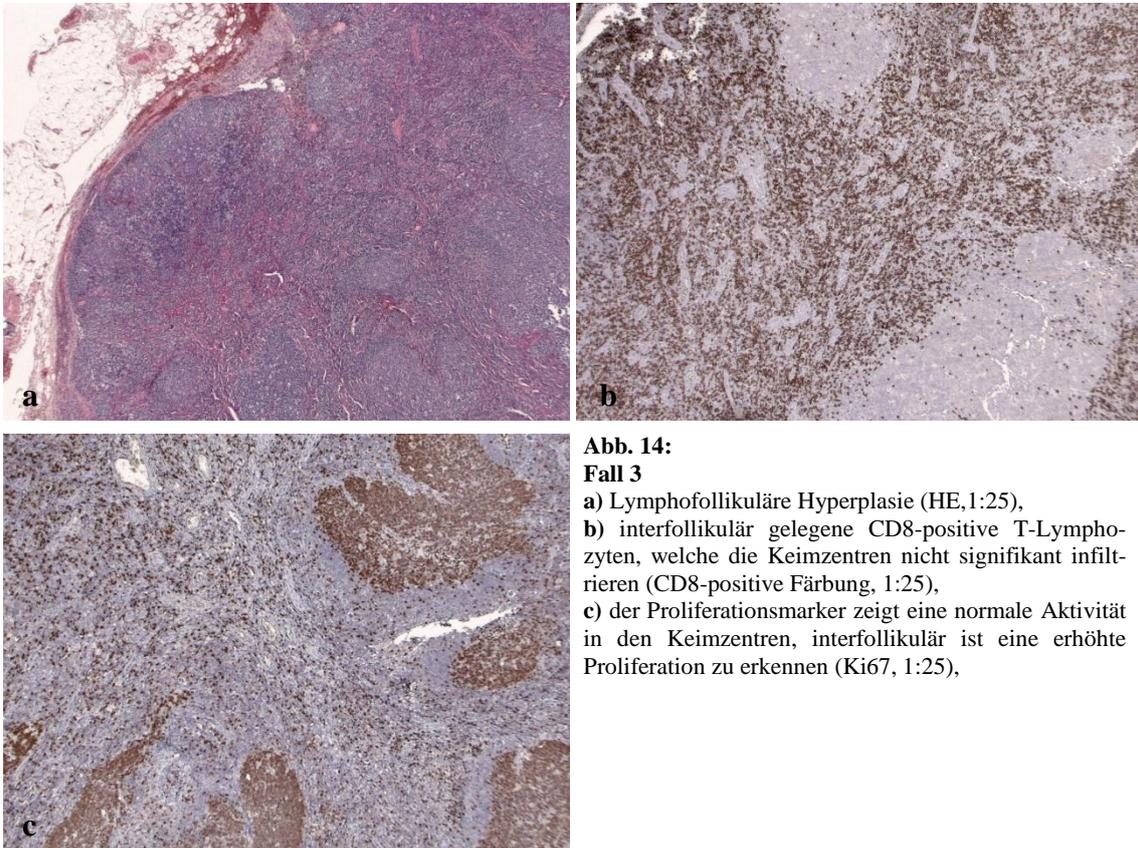


Abb. 14:
Fall 3

a) Lymphofollikuläre Hyperplasie (HE, 1:25),
b) interfollikulär gelegene CD8-positive T-Lymphozyten, welche die Keimzentren nicht signifikant infiltrieren (CD8-positive Färbung, 1:25),
c) der Proliferationsmarker zeigt eine normale Aktivität in den Keimzentren, interfollikulär ist eine erhöhte Proliferation zu erkennen (Ki67, 1:25),

3.4 Fall 4:

Im Fall vier handelte es sich um einen Lymphknoten aus dem Bereich einer ausgedehnten Nekrose in der linken Hüfte einer 62-jährigen Patientin. Die Ätiologie dieser Nekrose war unklar und es wurden mikrobiologisch keine Erreger gefunden. In der mikroskopischen Betrachtung war eine deutliche Nekrose mit den Resten einer granulomatösen Reaktion zu erkennen, die zum Teil Riesenzellen vom Langhans-Typ enthielt (Abb. 15a). Weiterhin wurden vereinzelt Nester von Bakterien fädiger und kokkoider Form beschrieben, die in der Warthin Starry-Färbung zur Darstellung gebracht wurden (Abb. 15b/c). Die immunhistologischen Untersuchungen mit CD138 zeigten in der Umgebung eine kräftige plasmazelluläre Reaktion. Hierbei lag bei der

Analyse der Leichtketten eine Prädominanz Lambda-positiver Plasmazellen im Bereich des wenig vitalen nekrotischen Gewebes vor. Die molekularbiologischen Klonalitätsanalysen der Immunglobulin-Schwerketten-Loki ergaben bei der PCR-basierten Amplifikation der CDR3-Region ein polyklonales Amplifikat. Bei der CDR2-Region ebenso wie bei der Gamma-Kette des T-Zell-Rezeptors war das Amplifikat oligoklonal, so dass insgesamt kein Anhalt für eine klonale Lymphozytenpopulation vorlag. Zusammenfassend sprachen die Befunde für eine reaktive Plasmozytose in der Umgebung einer septischen Nekrose.

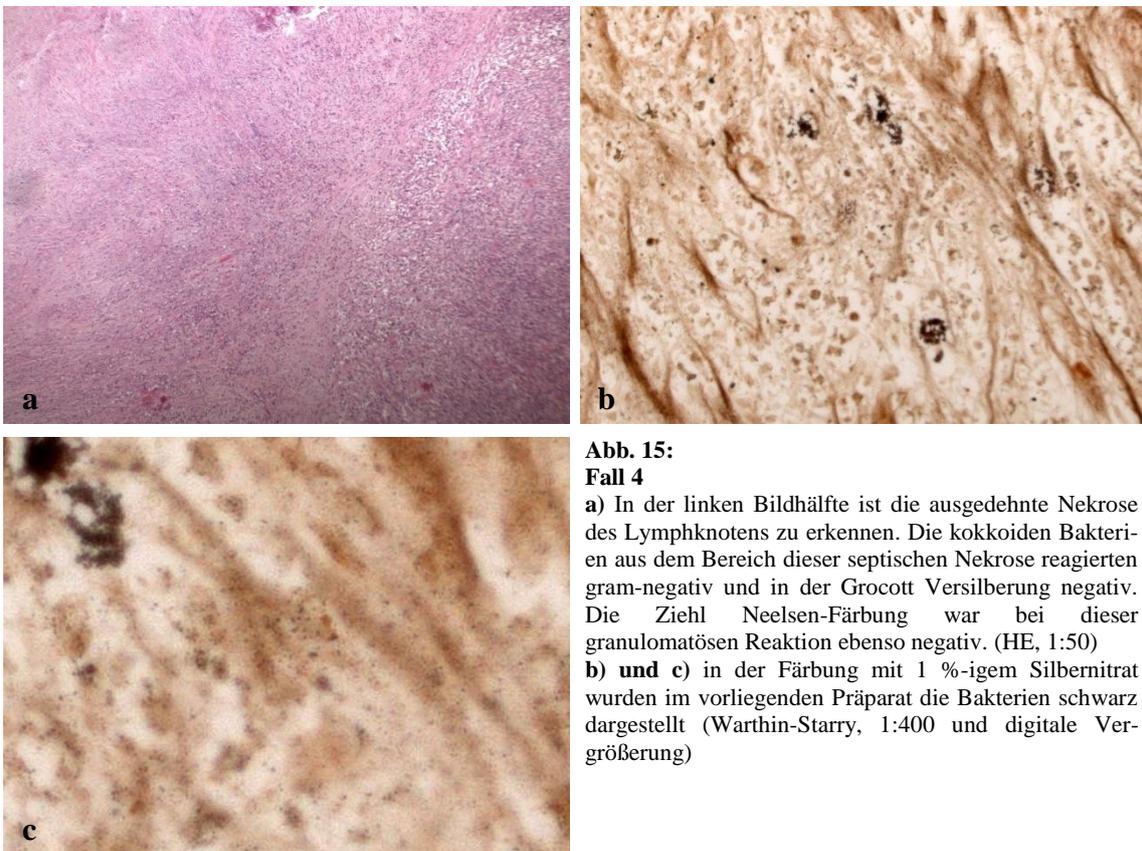


Abb. 15:
Fall 4

a) In der linken Bildhälfte ist die ausgedehnte Nekrose des Lymphknotens zu erkennen. Die kokkoiden Bakterien aus dem Bereich dieser septischen Nekrose reagierten gram-negativ und in der Grocott Versilberung negativ. Die Ziehl Neelsen-Färbung war bei dieser granulomatösen Reaktion ebenso negativ. (HE, 1:50)
b) und c) in der Färbung mit 1 %-igem Silbernitrat wurden im vorliegenden Präparat die Bakterien schwarz dargestellt (Warthin-Starry, 1:400 und digitale Vergrößerung)

Im Fall 4 wurden insgesamt 19 Klone phylogenetisch analysiert (Tabelle 2). Davon konnten 14 keiner bekannten Spezies zugeordnet werden. Jedoch waren alle 14 Sequenzen zu den beiden unkultivierten Bakterien *uncultured bacterium clone RL387_aao89h04* und *uncultured bacterium clone P5D18* homolog. Weiterhin fand sich bei einem Klon innerhalb der Klasse der Gamma-Proteobacteria die Homologie zu einer *Pseudomonas*-Spezies. Vier Sequenzen zeigten Übereinstimmungen mit den

Actinobacteria. Davon entsprach eine Sequenz der *Rhodococcus*-Spezies (Unterordnung: *Corynebacteria*, Familie: *Nocardia*). Schließlich war eine Sequenz homolog zu *Corynebacterium diphtheriae*.

In der Kontrolluntersuchung mit Hilfe spezifischer Primer wurde *Yersinia enterocolitica* nachgewiesen.

3.5 **Fall 5:**

Fall 5 war ein Lymphknoten aus der linken Leistenregion eines 41-jährigen männlichen Patienten. Die Lymphknotenarchitektur war prinzipiell noch erhalten. Die Kapsel war deutlich fibrosiert und verbreitert. Zahlreiche riesenzellhaltige Epitheloidzellgranulome umgaben kleinere und größere Abszesse (Abb. 16a). Stellenweise waren die Epitheloidzellen in einer charakteristischen Palisadenstellung angeordnet. In der Warthin Starry-Färbung konnten Bakterien nachgewiesen werden (Abb. 16b/c). Die immunhistochemischen Färbungen zeigten eine regelhafte Kompartimentierung CD20-positiver B-Lymphozyten und CD5-positiver T-Lymphozyten. In der Immunglobulin-Leichtkettenanalyse wiesen die enthaltenen Plasmazellen eine polytypische Expression auf. Zusammenfassend handelte es sich in diesem Fall um eine granulomatös nekrotisierende Lymphadenitis. Die Befunde sprachen in erster Linie für Veränderungen im Rahmen einer Katzenkratzkrankheit.

Von 31 untersuchten Klonen waren bei der phylogenetischen Analyse innerhalb der *Beta-Proteobacteria* elf Sequenzen homolog zu verschiedenen Spezies aus der Ordnung der *Burkholderiales* (Tabelle 2). Neun Sequenzen davon zeigten die Übereinstimmung mit *Comamonadaceae* und zwei Sequenzen mit *Janthinobacterium* aus der Familie der *Oxalobacteraceae*. In der Klasse der *Gamma-Proteobacteria* entsprachen zwei Klone der Spezies von *Escherichia coli* und ein anderer Klon einer *Stenotrophomonas*-Spezies. Weiterhin ergab sich bei 13 Klonen die Übereinstimmung mit *Propionibacterium*. Unter den 31 Sequenzen konnte eine davon keinem bekannten Phylotyp zugeordnet werden. Die höchste Übereinstimmung gab es mit den beiden unkultivierten Bakterien *uncultured bacterium clone RL387_aao89h04* und *uncultured bacterium clone P5D18*.

Die Kontrolluntersuchung mittels speziesspezifischer Primer ergab einen positiven Nachweis für *Bartonella henselae*.

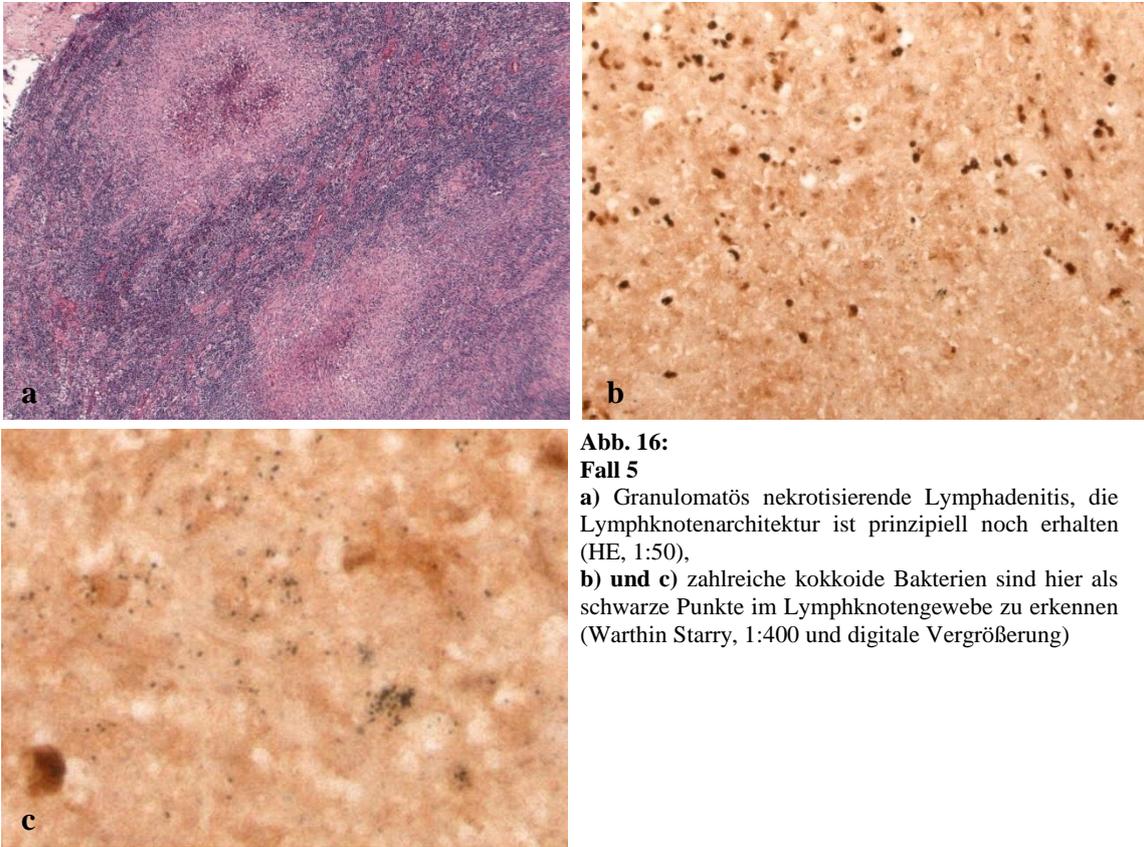


Abb. 16:

Fall 5

a) Granulomatös nekrotisierende Lymphadenitis, die Lymphknotenarchitektur ist prinzipiell noch erhalten (HE, 1:50),

b) und c) zahlreiche kokkoide Bakterien sind hier als schwarze Punkte im Lymphknotengewebe zu erkennen (Warthin Starry, 1:400 und digitale Vergrößerung)

3.6 Fall 6:

Im Fall 6 handelte es sich um einen linksseitigen inguinalen Lymphknoten eines 55-jährigen männlichen Patienten. Der Lymphknoten stammte aus einem Weichteil-exzizat mit mehreren stärker vergrößerten und partiell aufgebrochenen Lymphknoten, sowie Nekrosen in den angrenzenden Weichgeweben. Die Infektionsserologie für *Chlamydien* zeigte positive Werte für die IgA- und IgG-Antikörper. Histologisch bestand eine ausgeprägte granulomatös eitrig Lymphadenitis mit zahlreichen schlitzförmigen Nekrosen, die von einer Epitheloidzellreaktion mit untermischten Fibroblasten und gelegentlich erkennbaren Riesenzellen vom Langhans-Typ umgeben waren. Die bakterioskopischen Färbungen (Ziehl-Neelsen, Gram, Warthin Starry, Grocott und PAS) lieferten keinen Erregernachweis. In den immunhistochemischen Färbungen zeig-

ten die reichlich enthaltenen Plasmazellen eine polytypische Leichtkettenexpression. Die CD30-Färbung stellte zahlreiche blastäre Zellformen im Sinne von aktivierten B-Zellen und Plasmazellvorläufern dar. Folglich gab es keinen Hinweis auf ein malignes Lymphom. Insgesamt bestand der Verdacht auf eine infektiöse Genese im Rahmen eines Lymphgranuloma venerum.

In diesem Fall wurden 14 Klone phylogenetisch analysiert (Tabelle 2). Davon waren drei Klone homolog zu *Comamonadaceae* aus der Klasse der *Beta-Proteobacteria*. Weiterhin fand sich eine Übereinstimmung mit einem nicht kultivierten Bakterium aus der Klasse der *Gamma-Proteobacteria*. Unter den *Actinobacteria* ergaben sich sechs Homologien zu *Propionibacterium* und eine zu *Leifsonia xyli* aus der Ordnung der *Mikrokokken*. In der Klasse der *Firmicutes* bestand eine Homologie zu *Bacillus JAMB-602* und eine weitere zu *Streptococcus pneumoniae*. Eine Sequenz konnte keinem bekanntem Phylotyp zugeordnet werden. Diese zeigte die höchste Übereinstimmung mit *uncultured bacterium clone RL387_aao89h04* und *uncultured bacterium clone P5D18*.

In den Kontrolluntersuchungen mittels speziesspezifischer Primer ergab sich ein positiver Nachweis für *Chlamydia trachomatis*.

3.7 **Fall 7:**

Im Fall 7 lag ein axillärer Lymphknoten einer 69-jährigen Patientin vor, dessen Struktur prinzipiell noch erhalten war. Es waren zahlreiche Follikel und zum Teil auch eine Aktivierung der Thymus-abhängigen Zone zu erkennen. Im interfollikulären Bereich fanden sich ausgedehnte histiozytäre Granulome, die teilweise von neutrophilen segmentkernigen Granulozyten durchsetzt waren. Es konnte keine signifikante monozytoide B-Zell-Reaktion nachgewiesen werden. Weiterhin bestand eine Infiltration über die Lymphknotengrenzen hinaus, septal in das umliegende Fettgewebe. Die immunhistochemischen Färbungen zeigten eine regelrechte Verteilung der B- und T-Zell-Areale. In den aktivierten interfollikulären Zonen waren einzelne B-Blasten zu erkennen. Die Proliferation war regelrecht auf die Follikel akzentuiert und im interfollikulären Bereich bei 10 - 20 %. Die CD8-positiven T-Lymphozyten waren leicht ver-

mehrt. Insgesamt handelte es sich um eine histiozytär eitrige Lymphadenitis. Differentialdiagnostisch bestand der Verdacht auf eine Katzenkratzkrankheit.

Von 13 untersuchten Sequenzen entsprachen neun den *Actinobacteria*. Davon war eine homolog zu *Rhodococcus* aus der Familie der *Nocardia* und eine weitere zu einer anderen Spezies der *Corynebacteria* (Tabelle 2). Sieben Sequenzen entsprachen *Propionibacterium*. Desweiteren fand sich eine Übereinstimmung mit dem unkultivierten *Cyanobacterium clone M4-11*. Aus der Klasse der *Firmicutes* ergab sich eine Homologie zu *Aerococcus viridans*. Zwei weitere Sequenzen konnten phylogenetisch keiner bekannten Spezies zugeordnet werden und zeigten die höchste Übereinstimmung mit *uncultured bacterium clone RL387_aao89h04* und *uncultured bacterium clone P5D18*.

3.8 **Fall 8:**

Das Lymphknotenpräparat einer 78-jährigen Patientin im Fall 8 stammte aus der rechten Axilla nach rezidivierender Lymphknotenschwellung an dieser Stelle. Histologisch lag eine erhaltene Lymphknotenarchitektur mit mäßiger lymphofollikulärer Hyperplasie und einer deutlichen Aktivierung der T-Zone vor (Abb. 17). In den immunhistochemischen Färbungen zeigte sich eine regelhafte Kompartimentierung CD20-positiver B-Lymphozyten und CD5-positiver T-Lymphozyten. Die CD30-Färbung stellte zahlreiche blastäre Zellformen dar, die aktivierten B-Zellen und Plasmazellvorläufern entsprachen. Die Proliferation zeigte anhand des Ki67-Index regelhaft hohe Werte in den Keimzentren und außerhalb davon nur mäßige Aktivität. Zusammenfassend handelte es sich um reaktive Veränderungen im Sinne eines infektiösen Geschehens. Für ein Lymphom bestand kein Anhalt.

Im Fall 8 gingen 24 Klone mit verschiedenen Bandenmustern aus dem RFLP-Vergleich hervor (Tabelle 2). Bei sechs Sequenzen (25 %) bestand die Homologie zu *Comamonadaceae* aus der Klasse der *Beta-Proteobacteria*. Eine Sequenz konnte *Sphingomonas* aus der Klasse der *Alpha-Proteobacteria* zugeordnet werden. Insgesamt acht Klone gehörten den *Actinobacteria* an (33,3 %). Darunter fand sich eine Übereinstimmung mit *Corynebacterium pseudogenitalium*. Weiterhin entsprachen drei Sequenzen der Ordnung der *Mikrokokken*. Zwei davon zeigten die Übereinstimmung mit einer

Knoellia Subspezies und die andere mit einem Vertreter von *Arthrobacter*. Im Bereich der *Propionibacterineae* war eine Sequenz homolog zur Spezies von *Aeromicrobium* aus der Familie der *Nocardioides*. Der Klasse der *Firmicutes* gehörten sechs Sequenzen an. Davon entfielen drei Sequenzen auf *Staphylococcus*, eine auf *Streptococcus* und eine auf *Clostridia*. Drei Sequenzen konnten keinem kultivierten Phylotyp zugeordnet werden. Zwei davon entsprachen dem *uncultured bacterium clone P5D18* und eines dem *uncultured bacterium clone rRNA 089*.

In den Kontrolluntersuchungen mittels speziesspezifischer Primer ergab sich ein positiver Nachweis für *Chlamydia trachomatis*.



Abb. 17: Fall 8, Eitrige Lymphadenitis mit wenigen Granulozyten, reaktive Veränderungen im Sinne eines infektiösen Geschehens. Lymphofollikuläre Hyperplasie mit deutlicher Aktivierung der T-Zone und Ansammlung monozytoider B-Zellen, (HE, 1:50)

3.9 Fall 9:

Im Fall 9 handelte es sich um einen rechtszervikalen Lymphknoten einer 43-jährigen Patientin mit der klinischen Angabe einer unklaren Lymphadenitis colli. Es lagen negative Befunde zur Cytomegalie-Serologie vor (DNA aus Plasma und Leukozyten). Histologisch fand sich eine nahezu vollständig zerstörte Struktur des Lymphknotens. Man konnte eine ausgeprägte Aktivierung der Gefäße mit hochendothelialen Venolen erkennen, in deren Umgebung zahlreiche kleine lymphoide Zellen mit hellem,

fast klarem Zytoplasma vorkamen. Diese Zellen wiesen häufig Apoptosen auf. Immunhistochemisch zeigte sich eine deutlich aktivierte T-Zellpopulation mit Überwiegen des CD8-Anteils, die aber lediglich etwa 30 % der perivaskulären Infiltrate ausmachte. Zum einen grenzte sich davon ein Teil der T-Lymphozyten ab, der CD4-positiv und CD3-negativ war. Zum anderen ließ sich eine mononukleäre Zellpopulation mit CD68 anfärben. Beide Zellpopulationen wiesen gleich hohe Proliferationsaktivitäten auf. In der CD21-Färbung konnten keine Netzwerke follikulär dendritischer Zellen nachgewiesen werden. Die molekularbiologischen Untersuchungen ergaben kein klonales Amplifikat für die CDR3-Region des Immunglobulinschwerkettengens oder die Gamma-Kette des T-Zell-Rezeptorgens. In der LMP-Färbung und der in situ Hybridisierung zum Nachweis EBV-spezifischer RNA fand sich kein Hinweis auf eine EBV-Infektion. Insgesamt wurden die Befunde als Lymphoproliferation mit dem Verdacht auf ein T-Zell-Lymphom vom nicht weiter spezifizierten Typ (PTCL NOS) eingeordnet.

Die phylogenetische Analyse von 24 Sequenzen ergab innerhalb der Klasse der *Alpha-Proteobacteria* zwei Homologien zu *Sphingomonas*. Unter den *Gamma-Proteobacteria* fanden sich zwei homologe Sequenzen zu *Pseudomonas*-Spezies. Ebenso entsprach eine Sequenz einem nicht kultivierten Bakterium aus der Klasse der *Delta-Proteobacteria*. Aus dem Bereich der *Actinobacteria* waren vier Klone mit *Propionibacterium*, ein weiterer mit einer *Mikrokokkus*-Subspezies und fünf Klone mit *Streptomyces* verwandt. Unter den *Firmicutes* fanden sich fünf homologe Sequenzen zu *Clostridium* und drei weitere zu nicht kultivierten *Firmicutes*. Eine Sequenz entsprach keinem kultivierten Phylotyp und besaß die höchste Übereinstimmung mit dem *uncultured bacterium clone RL387_aao89h04*.

Die zusätzlichen Kontrolluntersuchungen zum gezielten Nachweis mittels speziesspezifischer Primer lieferten keinen Hinweis für *Bartonella henselae*, *Chlamydia trachomatis*, *Toxoplasma gondii*, *Yersienien*, *Enterobakterien* oder atypische *Mykobakterien*.

3.10 Fall 10:

Das Lymphknotenpräparat eines 35-jährigen männlichen Patienten im Fall 10 entstammte einer nicht näher bezeichneten anatomischen Lokalisation. Histologisch fanden sich im Parenchym immer wieder zahlreiche neutrophile segmentkernige Granulozyten, die zum Teil kleine Mikroabszesse ausbildeten (Abb. 18b). Auch in den Lymphknotensinus war neben einer Histiozytose eine sehr ausgeprägte Granulozytose zu erkennen. Es bestand eine geringe Aktivierung des B-Zellsystems. Die parakortikale Pulpa des T-Zellsystems erschien dagegen etwas verbreitert (Abb. 18a). Hier kamen aktivierte Lymphozyten, Plasmazellen und andere Vorläuferzellen vor. In den immunhistochemischen Untersuchungen ergab sich eine regelrechte Verteilung der B- und T-Zellareale mit extrafollikulärer Aktivierung zahlreicher CD30-positiver aktivierter Blasten. Eine signifikante monozytoide B-Zellreaktion war aber nicht zu erkennen. Insgesamt sprachen die Befunde für eine infektiöse Lymphadenitis, die bakteriell verursacht sein konnte. Differentialdiagnostisch kam eine Katzenkratzkrankheit in Betracht.

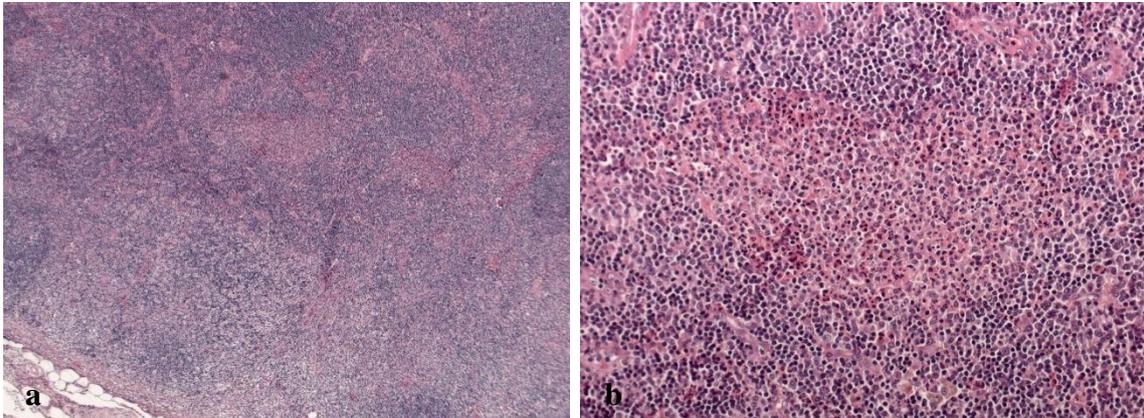


Abb. 18: Fall 10 a) Infektiöse Lymphadenitis eventuell bakterieller Genese, teilweise sind B-Zellfollikel zu Sekundärfollikeln aktiviert. Der parakortikale T-Zellbereich erscheint etwas verbreitert (HE, 1:50), **b)** zahlreiche neutrophile segmentkernige Granulozyten, Mastzellen und Histiocyten bestimmen das Bild in Form von kleinen Mikroabszessen und vereinzelt Granulomen (HE, 1:200)

Im Fall 10 wurden insgesamt 21 Sequenzen phylogenetisch analysiert (Tabelle 2). Bei 13 Sequenzen davon fand sich eine Übereinstimmung mit der Ordnung der *Burkholderiales* aus der Klasse der *Beta-Proteobacteria*. Davon entsprachen sieben Sequenzen *Comamonadaceae* und vier Sequenzen den *Oxalobacteraceae*, darunter drei

der *Janthinobacterium*-Spezies und eine der *Pelomonas*-Spezies. Die restlichen zwei Sequenzen waren homolog zu *Burkholderia sp.* Innerhalb der Klasse der *Alpha-Proteobacteria* waren zwei Sequenzen homolog zu *Paracoccus yeii*. Unter den *Actinobacteria* entsprachen vier Sequenzen verschiedenen Spezies von *Corynebacterium*.

Die zusätzlichen Kontrolluntersuchungen zum gezielten Nachweis mittels speziesspezifischer Primer lieferten keinen Hinweis für *Bartonella henselae*, *Chlamydia trachomatis*, *Toxoplasma gondii*, *Yersienien*, *Enterobakterien* oder atypische *Mykobakterien*.

3.11 Fall 11:

Das Exzizat eines 31-jährigen männlichen Patienten aus dem vorliegenden Fall stammte aus der Analregion und enthielt Weichteilgewebe ohne Lymphknoten. In vorangegangenen Gewebeproben fanden sich bei diesem Patienten fortgeschrittene Condylomata acuminata. Histologisch war ein oberflächlich ulzeriertes Gewebestück zu erkennen, das teilweise Erosionen aufwies. Unterhalb der Ulzeration fand sich eine sehr ausgedehnte, perivaskulär akzentuierte Infiltration durch Lymphozyten und Plasmazellen (Abb. 19). An der Basis der Ulzeration wiesen die Gefäße eine gewisse Endothelschwellung auf. Immunhistochemisch zeigten die CD5- und CD20-Färbungen eine gewisse Strukturierung der lymphoiden Infiltrate, wobei vor allem die perivaskulären Lymphozytenpopulationen CD5-positiven T-Lymphozyten entsprachen. Die zahlreichen Plasmazellen zeigten eine polytypische Immunglobulin-Leichtketten-Expression. Aufgrund der Diagnose der Condylomata acuminata, die am Rande des Präparats in Form einer deutlichen papillären Epithelhyperplasie zu erkennen waren, drängte sich der Verdacht auf den Primäraffekt einer Treponemen-Infektion auf. In der Warthin Starry-Färbung konnten allerdings keine Treponemen-ähnlichen Bakterien beobachtet werden.

Von 34 sequenzierten Klonen entsprachen bei der phylogenetischen Analyse innerhalb der *Beta-Proteobacteria* vier Klone der Familie der *Comamonadaceae* (Tabelle 2). In der Klasse der *Actinobacteria* gehörten neun Sequenzen zur Ordnung der *Mikrokokken*. Davon war eine homolog zur *Arthrobacter*-Spezies, sechs zur *Kocuria*-

Spezies, eine zu *Janibacter* und eine zu *Knoellia*. Insgesamt zehn Sequenzen entsprachen der Klasse der *Firmicutes*. Davon gehörten vier zu verschiedenen *Bacillus*-Spezies, eine zu *Staphylococcus epidermidis*, zwei zu *Streptococcus* und drei Sequenzen waren nicht kultivierte *Firmicutes*. Desweiteren fanden sich drei homologe Sequenzen zu *Planctomycetes* und zwei Homologien zu nicht kultivierten Spezies aus der Klasse der *Acidobacteria*. Eine Sequenz konnte phylogenetisch nicht weiter eingeordnet werden, da sie gleich hohe Verwandtschaftsgrade mit *Alpha*-, *Beta*- und *Gamma-Proteobacteria* zeigte. Diese Sequenz besaß die höchste Übereinstimmung mit dem *uncultured bacterium clone PR51*.

Die zusätzlichen Kontrolluntersuchungen zum gezielten Nachweis mittels speziesspezifischer Primer lieferten keinen Hinweis für *Bartonella henselae*, *Chlamydia trachomatis*, *Toxoplasma gondii*, *Yersienien*, *Enterobakterien* oder atypische *Mykobakterien*.

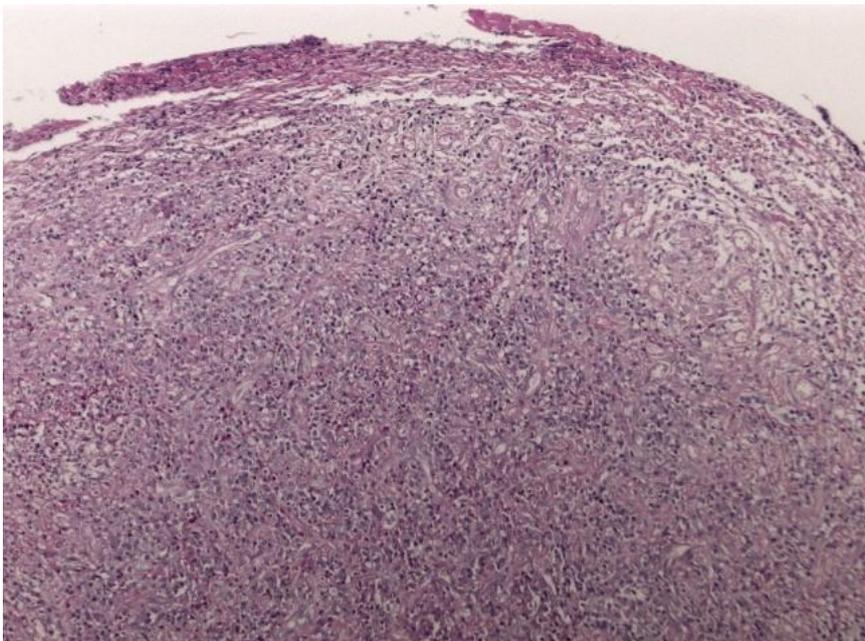


Abb. 19: Fall 11, Unspezifische Ulzeration eines Weichteilgewebes der Analregion mit lymphoplasmazellulären Infiltraten (HE, 1:100)

3.12 Fall 12:

Bei den vergrößerten zervikalen Lymphknoten eines 18-jährigen männlichen Patienten handelte es sich im Fall 12 um eine reaktive Lymphknotenerkrankung im Sinne einer eitrigen Lymphadenitis. Die Struktur des Lymphknotens war prinzipiell erhalten. Neben einer ausgeprägten Sinushistiozytose waren auch zahlreiche neutrophile segmentkernige Granulozyten zu erkennen. Die Follikel zeigten eine regelrechte Schichtgliederung bei Vorhandensein einer deutlichen lymphofollikulären Hyperplasie (Abb. 20). In den T-Zell-Arealen fand sich eine deutliche Aktivierung von B- und T-Lymphozyten. Die immunhistochemischen Färbungen bestätigten eine regelrechte Verteilung der B- und T-Zellareale. In der CD30-Färbung konnten intra- und perifollikulär zahlreiche einkernige Blasten nachgewiesen werden, die zum Teil prominente Nukleolen enthielten. CD15 markierte die zahlreichen neutrophilen segmentkernigen Granulozyten. Die Proliferation war innerhalb der Follikel regelhaft und in den Thymus-abhängigen Arealen leicht erhöht.

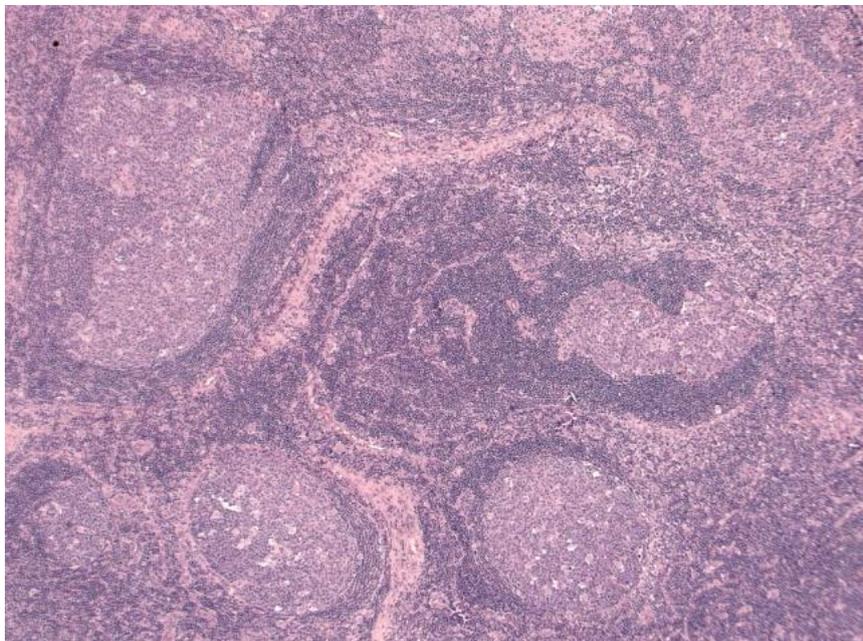


Abb. 20: Fall 12, Eitrige Lymphadenitis mit großen, landkartenartig angeordneten Follikeln, die eine regelmäßige Schichtgliederung aufweisen. (HE, 1:50)

Im Fall 12 ergab die Amplifikation des 16S-rRNA-Gens aus der DNA des Lymphknotens 14 verschiedene Muster im Vergleich des Restriktionsfragment-

längenpolymorphismus. Davon entsprachen bei der phylogenetischen Analyse sechs Sequenzen der Spezies *Paracoccus yeeii* aus der Klasse der *Alpha-Proteobacteria*. Eine weitere Sequenz konnte ebenfalls mit einer Homologie zu *Pedomicrobium* den *Alpha-Proteobacteria* zugeordnet werden. Zudem gehörten sechs Sequenzen *Propionibacterium* aus der Klasse der *Actinobacteria* an. Eine weitere Sequenz zeigte einen gleich hohen Verwandtschaftsgrad zu *Alpha-* und *Beta-Proteobacteria* und konnte somit keiner Klasse eindeutig zugeordnet werden. Die höchste Übereinstimmung besaß diese Sequenz mit dem *uncultured bacterium clone 3B03*.

Die Kontrolluntersuchung mittels speziesspezifischer Primer ergab einen positiven Nachweis für *Bartonella henselae*.

3.13 Fall 13:

Im Fall 13 handelte es sich um einen axillären Lymphknoten eines 26-jährigen männlichen Patienten. Die prinzipiell erhaltene Lymphknotenarchitektur wies eine deutliche folliculäre Hyperplasie mit floriden Keimzentren auf. Es bestand weiterhin eine erhebliche sinusoidale B-Zellreaktion einer Perilymphadenitis mit einzelnen Epitheloidzellclustern in der Pulpa. Auffällig war eine extrafolliculäre Hyperplasie (bunte Pulpa-hyperplasie) mit einer Vermehrung unreifer Plasmoblasten und vielen Plasmazellvorläufern, sowie einigen eosinophilen Granulozyten. In diesem Bereich bestand eine deutliche Aktivierung des T-Zellkompartiments mit einer Vermehrung epitheloider Venolen. In der immunhistologischen Untersuchung fand sich eine Vermehrung CD30-positiver aktivierter B-Zellen und Plasmazellvorläufer. Die Lokalisation von CD15 und CD30 war im Lymphknoten unterschiedlich. Die CD30-positivern Zellformen exprimierten zum großen Teil auch CD20. Insgesamt bestand bei dieser chronischen bzw. subakuten Lymphadenitis eine gewisse Ähnlichkeit zur Piringer'schen Lymphadenitis und es bestand deshalb der Verdacht auf eine floride Phase einer Toxoplasmen-Infektion.

Von insgesamt 30 sequenzierten Klonen fanden sich zwei Übereinstimmungen in der Klasse der *Alpha-Proteobacteria*. Eine Sequenz davon war homolog zu *Roseomonas gilardii* aus der Ordnung der *Acetobacteraceae* und die andere zu einer *Paracoccus*-Spezies. In der Klasse der *Beta-Proteobacteria* waren zwei Sequenzen homolog zur Ordnung der *Burkholderiales*. Die eine Sequenz entsprach dabei einer

Spezies von *Janthinobacterium* aus der Familie der *Oxalobacteraceae* und die andere Sequenz einem nicht kultivierten Vertreter von *Comamonadaceae*. Weiterhin ergaben sich zwei Übereinstimmungen in der Klasse der *Acidobacteria*. Unter den *Actinobacteria* fanden sich acht Homologien zu *Propionibacterium* und eine zu *Micrococcus*. Zwei weitere Sequenzen gehörten der Klasse der *Bacteroidetes* an. Eine davon zeigte trotz Zugehörigkeit zu den *Bacteroidetes* eine auffällige Häufung von Übereinstimmungen mit verschiedenen Spezies der *Gamma-Proteobacteria*. Bei den *Firmicutes* fand sich eine Homologie zu *Anoxybacillus*, eine zu *Staphylococcus* und zwei weitere zu nicht kultivierten Bakterien. Eine weitere Sequenz zeigte eine Übereinstimmung mit einer nicht kultivierten *Leptotrichia*-Spezies aus der Klasse der *Fusobacteria*. Bei vier Sequenzen fand sich eine Homologie zur Klasse der *Planctomycetes*. Bei vier weiteren Klonen ergab sich keine Homologie zu einer bekannten Spezies. Drei davon besaßen die höchste Übereinstimmung mit *uncultured bacterium clone RL387_aao89h04* und *uncultured bacterium clone P5D18*. Der andere Klon zeigte Homologien zu *Alpha-*, *Gamma-* und vorwiegend *Delta-Proteobacteria* und konnte folglich nicht eindeutig zugeordnet werden. Die höchste Übereinstimmung gab es aber mit *uncultured bacterium clone 300E2-D11* und *uncultured bacterium clone CCSD_RK730_B19*.

Die zusätzlichen Kontrolluntersuchungen zum gezielten Nachweis mittels speziesspezifischer Primer lieferten keinen Hinweis für *Bartonella henselae*, *Chlamydia trachomatis*, *Toxoplasma gondii*, *Yersienien*, *Enterobakterien* oder atypische *Mykobakterien*.

3.14 Fall 14:

Die zervikale Lymphknotenbiopsie einer 20-jährigen Patientin im Fall 14 zeigte sich histologisch mit einer erhaltenen Parenchymarchitektur bei deutlicher Pulpahyperplasie und ausgeprägter Sinuslymphozytose. Der Nachweis zahlreicher blastärer Zellformen ergab keine morphologischen Charakteristika von Hodgkin-Zellen oder Sternberg-Reed'schen Riesenzellen. Die folliculären Strukturen wiesen eine erhaltene Schichtengliederung und scharf abgrenzbare Mantelzonen auf. Es bestand eine mäßige Plasmazytose. In den immunhistochemischen Untersuchungen konnte man eine regel-

hafte Kompartimentierung CD20-positiver B- und CD5-positiver T-Lymphozyten finden. Die Färbung mit CD23 stellte kompakte Netzwerke follikulärer dendritischer Zellen dar. Die Färbung für Cyclin D1 fiel negativ aus. In der Immunglobulin-Leichtketten-Analyse wiesen die enthaltenen Plasmazellen eine polytypische Expression auf. Die Proliferation war überwiegend an die Keimzentren gebunden und regelhaft hoch. Außerhalb der Follikel fand sich nur eine geringe proliferative Aktivität. Zusammenfassend handelte es sich in diesem Fall um reaktive Veränderungen des Lymphknotenparenchyms. Für ein Lymphom bestand kein Verdacht.

In der phylogenetischen Analyse wurden 28 sequenzierte Klone untersucht. Davon waren 19 Klone homolog zu *uncultured cyanobacterium clone M4-11*. Weiterhin ergab sich eine Übereinstimmung mit *Janthinobacterium* aus der Klasse der *Beta-Proteobacteria*. Acht Klone entsprachen *Propionibacterium*.

In den Kontrolluntersuchungen mittels speziesspezifischer Primer ergab sich ein positiver Nachweis für *Chlamydia trachomatis*.

3.15 Fall 15:

Fall 15 war ein Lymphknoten im Abstromgebiet der Arteria mammaria interna eines 78-jährigen männlichen Patienten. Der Lymphknoten wies histologisch eine ausgeprägte Sinushistiozytose und einige Staubgranulome auf. Es bestand kein Malignitätsverdacht.

In diesem Fall entsprach von 19 untersuchten Sequenzen eine der Familie der *Comamonadaceae* aus der Klasse der *Beta-Proteobacteria*. Drei Sequenzen konnten den *Gamma-Proteobacteria* zugeordnet werden. Davon waren zwei Sequenzen zu *Stenotrophomonas maltophilia* homolog. Neun weitere Sequenzen gehörten zu den *Actinobacteria*, wovon eine zu *Arthrobacter* aus der Ordnung der *Mikrokokken* und sechs zur *Streptomyces*-Spezies homolog waren. Unter den *Bacteroidetes* fand sich eine Übereinstimmung mit einer *Prevotella*-Spezies. Ein weiterer Klon gehörte zu den *Planctomycetes*. Vier Klone konnten phylogenetisch keiner bekannten Klasse zugeordnet werden. Diese zeigten die höchste Übereinstimmung mit *uncultured bacterium clone RL387_aao89h04* und *uncultured bacterium clone P5D18*.

4 Diskussion

Entzündliche Lymphknotenveränderungen stellen einen häufigen histologischen Befund mit vielen verschiedenen möglichen Ursachen dar. Solche Ursachen können Infekte (z.B. Tuberkulose, Katzenkratzkrankheit, Lymphgranuloma inguinale, Brucellose, Toxoplasmose, Aktinomykose, EBV-Infektion, HIV, usw.), Autoimmunerkrankungen (z.B. Sarkoidose usw.), Begleitreaktionen (z.B. bei malignen und benignen Lymphomen, Metastasen, dermatopathische Lymphadenopathie usw.) sein. Die Abgrenzung von Lymphadenitiden unterschiedlicher Genese untereinander ist klinisch und histopathologisch häufig schwierig. Folglich bleibt das kausale Agens für die beobachtete Lymphknotenveränderung nicht selten ungeklärt [67, 68]. Bisherige Studien zeigen, dass 18 - 49 % der Lymphadenitiden infektiös bedingt sind, 12 - 17 % maligne Ursachen haben und 17 - 40 % ungeklärt bleiben [68]. In den ungeklärten Fällen kann eine infektiöse Ätiologie jedoch nicht ausgeschlossen werden. Herkömmliche Diagnoseverfahren, wie die Anlage von Kulturen, erbringen oft keinen spezifischen Befund. Der Grund hierfür ist, dass schätzungsweise über 90 % aller Organismen, die in der Natur gefunden werden, typischerweise mit Standardmethoden nicht kultiviert und somit nur mit molekularen Methoden charakterisiert werden können [1, 43, 47, 66].

Der histopathologisch-feingewebliche Befund ist häufig unspezifisch im Sinne einer einschmelzenden Entzündung mit histiozytärer Randinfiltration oder auch einer granulomatösen Entzündung, zum Teil mit verkäsender Nekrose. Solche Veränderungen finden sich zum Beispiel bei einer Tuberkulose, Katzenkratzkrankheit, Toxoplasmose und Tularämie, aber auch bei Infektionen mit *Histoplasma capsulatum* und *Coccidioïdes immitis*. Dabei variiert das histologische Bild auch in Abhängigkeit von der Abwehrlage des Patienten. Letzten Endes erlauben die morphologischen Befunde alleine meist nur gut begründete Vermutungen. Der endgültige Erregernachweis bleibt oft der mikrobiologischen Diagnostik vorbehalten. Daher hat die kulturelle Anzucht wesentlichen Anteil an der Erforschung bakterieller Erkrankungen [46]. Auch für die Antigenbestimmung, Antibiotika-Empfindlichkeitsbestimmungen und experimentelle Modelle in vivo und in vitro ist die Kultivierung bei der Untersuchung bakterieller Erkrankungen ein unersetzbares Verfahren. Fortschritte in der genetischen Analytik (z.B.

PCR) und die Entdeckung der hochkonservierten Regionen des 16S-rRNA-Gens, das universell in allen Bakterien präsent ist, haben es möglich gemacht, auch bislang nicht identifizierte und nicht kultivierte Bakterien zu charakterisieren [20]. Die Einführung der PCR bedeutete einen Quantensprung für die, durch die Abhängigkeit von der kulturellen Anzucht, sehr eingeschränkte Erfassbarkeit der mikrobiellen Diversität [46, 47]. Molekulare, kulturunabhängige Verfahren werden heute favorisiert [46], da die direkte Untersuchung aus Gewebeprobe möglich ist [66]. Zudem ist die Untersuchung nicht an das Vorhandensein lebender Bakterien gebunden [46]. Unkultivierbare Bakterien können detektiert [9] und seltene Isolate in anderen Laboratorien reproduziert werden [26]. Weiterhin bieten genotypische Merkmale im Vergleich zu phänotypischen Merkmalen verlässliche und quantifizierbare Informationen zur Identifikation infektiöser Erreger und verursachen bei der Charakterisierung weniger häufig Fehlschlüsse [66]. PCR-basierte Analysen zeigen darüber hinaus ein realistischeres Bild von der Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften als traditionelle Methoden [32]. Die Identifikation von Bakterien durch die Anlage von Kulturen kann eine komplette Charakterisierung der gesamten Diversität in einem komplexen mikrobiologischen Umfeld nicht garantieren [1]. Aus diesem Grund hat sich die Betrachtung der mikrobiellen Diversität in den letzten Jahrzehnten stark verändert [47].

Schon über zwei Jahrzehnte ist es her, seitdem ribosomale RNA zur Charakterisierung von Umweltproben herangezogen wurde. Zunächst wurde das 5S-rRNA-Gen mit einer Länge von 120 Nukleotiden verwendet. Für die Information bei der Analyse zur phylogenetischen Identifikation sind allerdings rRNA-Moleküle mit mehr als 1000 Basenpaaren besser geeignet [5]. Deshalb wurde schon bald nach größeren rRNA-Molekülen gesucht [5]. Das 16S-rRNA-Gen, mit einer Größe von 1500 bp und das 23S-rRNA-Gen, mit einer Größe von 3000 bp kamen hierfür in Frage [5]. Eine weitere Möglichkeit ist der Internal Transcribed Spacer (ITS). Diese Region, zwischen dem 16S-rRNA-Gen und dem 23S-rRNA-Gen, wird zwar transkribiert, es kodiert aber nicht für ein funktionelles Protein. Dieser Abschnitt der DNA ist deshalb nicht so hochkonserviert wie die Gene [41]. Unter den molekularen Techniken ist die 16S-rRNA-Analyse die geeignetste Methode zur genotypischen Klassifizierung von Bakterien [20]. Denn sie kann Bakterien identifizieren, bei denen eine phänotypische Charakterisierung scheitert [26].

Die 16S-rRNA ist eine strukturelle Komponente der bakteriellen Ribosomen, welche die Translation von Messenger-RNA in Aminosäuresequenzen zur Proteinbiosynthese durchführen. Im Laufe der Evolution ist diese 16S-rRNA hochkonserviert geblieben [1]. Das 16S-rRNA-Gen umfasst 1500 Basenpaare [5] und ist in allen Bakterien vorhanden. Über 10 % der Basen dieses Gens sind konserviert [9]. Bei der phylogenetischen Analyse dienen die hochkonservierten Regionen des 16S-rRNA-Gens als Bindungsstelle für universelle eubakterielle Primer [24, 32, 46]. Die übrigen Basen stellen speziesspezifische variable Regionen dar [26]. Die verschiedenen Bakterien unterscheiden sich in der exakten Nukleotidsequenz der variablen Regionen des 16S-rRNA-Gens [1]. Folglich erlaubt die Sequenzierung der hypervariablen Regionen innerhalb des hochkonservierten 16S-rRNA-Gens die detaillierte und präzise Bestimmung isolierter Bakterien, d.h. die Charakterisierung auf Spezies- und Subspezieslevel [24, 69].

Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass durch die hohe Sensitivität auch mit geringen Mengen an DNA bzw. Bakterien speziesspezifische Sequenzen direkt aus Gewebeproben amplifiziert werden können [46]. Sowohl bekannte, als auch unbekannte Bakterien [20], schwer kultivierbare Erreger, wie z.B. intrazelluläre Bakterien (*Ehrlichia ewingii*), und latente Erreger (z.B. bei der chronischen Lyme-Arthritis), bei der die Kultur versagt, werden mit dieser Technik erkannt [7, 46]. Zusätzlich macht der Vergleich mit einer Sequenz-Datenbank für die phylogenetische Identifikation die Charakterisierung von Erregern möglich, die bislang noch nicht kultiviert wurden. Als Beispiele aus den vergangenen 15 Jahren für die Entdeckung ursächlicher Erreger aus Biopsiematerial durch diese Methode sind *Bartonella henselae* als Erreger der bazillären Angiomatose, *Tropheryma whippeli* als Erreger des M. Whipple und *Helicobacter pylori* als Verursacher des Ulcus duodeni zu nennen [46, 66]. Weiterhin war mit dieser Methode eine Subtypisierung von *Borrelia burgdorferi* in drei geographisch unterschiedliche Genotypen mit unterschiedlich pathogenem Potential möglich [46]. Inzwischen wird die PCR-Amplifikation des bakteriellen 16S-rRNA-Gens heute routinemäßig in der Diagnose von Endophthalmitis, Meningitis, Endokarditis, Gelenkinfektionen, Osteomyelitis und Salpingitis eingesetzt [30].

Die Untersuchung wird sehr erfolgreich an frischem Biopsiematerial durchgeführt. Probleme ergeben sich aber nach wie vor bei formalinfixierten und paraffineingebetteten Geweben. Denn die DNA wird bei der Fixierung häufig fragmentiert [57]. Dies

kann zu falsch negativen Ergebnissen führen [70]. Studien belegen, dass die Sensitivität bei der Untersuchung von Lymphknotenpräparaten höher ist, wenn die Gewebe nur eingefroren und nicht fixiert waren [70]. Im Falle der eingangs erwähnten reaktiven (entzündlichen) Lymphadenitiden, die in der Regel in einem Routineverfahren eingebettet und nach Standardmethoden gefärbt wurden, steht normalerweise keine Gefriermaterial zur Verfügung. Wir haben uns daher in der vorliegenden Studie mit der Adaptierung der 16S-rRNA-Analyse auf die Anwendung an paraffineingebettetem Gewebe beschäftigt.

In dieser Studie haben wir mit der beschriebenen molekularbiologischen Screeningmethode 15 Fälle von unspezifischen Lymphadenitiden unterschiedlicher Lokalisationen bezüglich ihrer mikrobiologischen Diversität untersucht. Ziel war eine umfassende Charakterisierung des, in den jeweiligen formalinfixierten und paraffineingebetteten Lymphknotengeweben enthaltenen Erregerspektrums, sowie der Versuch einer Korrelation des erhaltenen Erregerspektrums mit den histologischen Befunden, um die Anwendbarkeit dieser Methode in der Routinediagnostik zu untersuchen. Die angewandte Screeningmethode wird als **SHARP**-Screening bezeichnet, ein Akronym, das für **16S**-rRNA-**H**eterogenitäts**a**nalyse durch **R**FLP und **P**hylogenetik steht [1]. SHARP-Screening basiert auf der Analyse der unterschiedlichen Allele der bakteriellen 16S-ribosomalen RNA-Gene. Dabei werden nahezu alle, in der Gewebeprobe enthaltenen 16S-rRNA-Gensequenzen detektiert und die entsprechenden Bakterien durch die Analyse der präzisen Basensequenzen identifiziert [1]. Zwei komplementäre Schritte sind dazu nötig: Zunächst wird eine Genbank aller bakteriellen 16S-rRNA-Gene, die in den jeweiligen analysierten Geweben enthalten waren, erstellt. Danach erfolgt die Analyse des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) zur Selektion der jeweiligen unterschiedlichen Phylotypen der enthaltenen 16S-rRNA-Gene. Schließlich werden die 16S-rRNA-Gene sequenziert und durch den Vergleich mit bekannten bakteriellen Sequenzen identifiziert [1]. SHARP-Screening hat sich im Vergleich zu allen anderen verfügbaren Methoden (Kultur, bakterioskopische Färbungen, Immunhistochemie, Immunfluoreszenz, PCR) als nützliche und geeignete Methode erwiesen, um die gesamte bakteriologische Diversität auch in formalinfixierten und paraffineingebetteten Geweben zu erfassen [1].

Von den 15, in der vorliegenden Studie untersuchten Fällen bestand aufgrund des histologischen Befundes in elf der Verdacht auf eine bakterielle Genese der Lymphadenitis. Vier davon (Fall 1, 5, 7, 10) zeigten mit einer erhaltenen Lymphknotenarchitektur, einer fibrosierten und ödematös verbreiterten Lymphknotenkapsel, vereinzelt Mikroabszessen, segmentkernigen neutrophilen Granulozyten, einer Sinushistiozytose und dem Fehlen einer ausgeprägten monozytoiden B-Zell-Reaktion, histologisch charakteristische Merkmale einer Katzenkratzkrankheit [34, 39, 79, 84]. Das verursachende Bakterium *Bartonella henselae* wurde im SHARP-Screening in keinem der vier Fälle nachgewiesen. Alleine im Fall 5 ergab eine zusätzliche Kontrolluntersuchung mit *Bartonella*-spezifischen Primern ein positives Ergebnis für *Bartonella henselae*.

Die fehlende Detektion von *Bartonella henselae* in den Fällen 1, 5, 7 und 10, bei denen der histologisch mikroskopische Befund einen Hinweis auf das Vorliegen einer Katzenkratzkrankheit gab, könnte verschiedene Gründe haben. Zum einen kann die histopathologische Begutachtung nur einen Hinweis auf eine möglicherweise vorliegende Katzenkratzkrankheit geben [70]. Aus dem histologischen Befund kann nicht sicher auf das Vorhandensein von *Bartonellen* als Ursache der Lymphadenitis geschlossen werden.

Die im Rahmen des SHARP-Screenings verwendeten Primer *27f* und *1492r* für die Ausgangs-PCR und *27f-b* und *1406r-b* für die nested PCR sind universelle eubakterielle Primer. Sie werden für die Detektion sämtlicher Prokaryonten herangezogen. In unserer Studie wurden diese beiden Primerpaare ausgewählt, um die gesamte mikrobielle Diversität innerhalb der entzündeten Lymphknotengewebe zu erfassen. Rolain et al. verwendeten 2006 in ihrer Studie zur Untersuchung der bakteriellen Diversität in Lymphknoten von Patienten mit Verdacht auf Katzenkratzkrankheit die selben Primer. Sie konnten im Gegensatz zu unseren Ergebnissen in 51,7 % von 236 Fällen *Bartonella henselae* in der 16S-rRNA-basierten Analyse nachweisen [68]. Der Unterschied zu unserer Studie bestand darin, dass sich alle untersuchten Lymphknoten in Transportmedium befanden oder tiefgefroren waren und sich somit nicht die Problematik beschädigter DNA aufgrund von Fixation und Paraffineinbettung ergab. Es sollte die Aufgabe zukünftiger Studien sein, die Detektionsrate des SHARP-Screenings an frischem, tiefgefrorenem und fixiertem Lymphknotengewebe im direkten Vergleich zu untersuchen.

Rolain et al. beschrieben weiterhin, dass die Sensitivität der 16S-rRNA-Analyse zur Detektion von *Bartonellen* geringer war als bei der Verwendung *Bartonella*-spezifischer Primer [68]. Das gleiche Ergebnis veranschaulicht die Studie von De Hertogh et al. aus dem Jahre 2006. Darin wurden anhand von 54 Proben aus 30 Biopsien Mikrodissektionen vorgenommen und eine 16S-rRNA-Analyse zur Untersuchung der bakteriellen Diversität in M. Crohn beteiligten Organen des Abdomens durchgeführt. Unter den Geweben befanden sich auch fixierte Lymphknoten. Eine Kernaussage dieser Studie bezüglich der 16S-rRNA-basierten Heterogenitätsanalyse war, dass typische Erreger wie *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium paratuberculosis* oder verschiedene Spezies von *Yersinia* nur selten entdeckt wurden. Andere Bakterien waren so häufig, dass die erwarteten Bakterien dabei anteilmäßig unterrepräsentiert waren. Eine Möglichkeit der Abhilfe dieses Problems ist laut dieser Studie die Verwendung spezies-spezifischer Primer, falls nach bestimmten Erregern gesucht wird [24]. In unserer Studie war das Ziel allerdings die Untersuchung der mikrobiellen Diversität innerhalb der Lymphknoten, weshalb *Bartonella*-spezifische Primer nur bei Kontrolluntersuchungen verwendet wurden.

Die von uns verwendeten universellen Primer *27f* und *1492r* erhielten ihre Bezeichnung entsprechend der Positionen im 16S-rRNA-Gen von *Escherichia coli*, an denen sie binden. *27f* bindet im Bereich der Basenpositionen 8 - 27, und *1492r* im Bereich 1492 - 1507 [32]. Damit kann in der PCR-Reaktion nahezu das vollständige 16S-rRNA-Gen an einem Stück amplifiziert werden, was bei der Erregeridentifikation durch Sequenzanalyse mit der NCBI-Datenbank zu genaueren Ergebnissen führt. So konnte in unserer Studie (Tabelle 2: Fall 5), genauso wie erstmals durch Greenberg et al., durch die Amplifikation des 16S-RNA-Gens in seiner ganzen Länge, *Gluconacetobacter sacchari* im Zusammenhang mit der septischen Granulomatose detektiert werden [37]. Allerdings setzt dieses Vorgehen das Vorhandensein intakter 16S-rRNA-Gene voraus. Aufgrund der Fragmentationsgefahr der DNA bei der Fixierung und Paraffineinbettung wurde für den Erfolg in der Diagnostik der Katzenkratzkrankheit deshalb schon in früheren Studien eine kurze Dauer der Fixierung und die Verwendung von Primern empfohlen, mit denen nur kleine Abschnitte des 16S-rRNA-Gens (298 bp, 480 bp) von *Bartonella henselae* amplifiziert werden [7, 24, 57, 66, 70].

Ein weiteres Problem ist, dass *Bartonellen* durch einen genotypischen Erregernachweis gerade in nekrotischen Geweben schwer zu erfassen sind [68]. In einer von Ridder et al. im Jahre 2002 veröffentlichten Studie konnten bei nachweislich *Bartonella*-infizierten Patienten in der Warthin Starry-Färbung meist keine Bartonellen festgestellt werden und wenn, dann nur in sehr frühen Stadien der Erkrankung [67]. Die Studie zeigte, dass *Bartonella henselae* aus exstirpierten Lymphknoten nur innerhalb der ersten sechs Wochen der Erkrankung detektiert werden konnten. In unseren Fällen lagen keine Informationen über den Zeitpunkt möglicher Expositionen bzw. Dauer der Erkrankung vor. Deshalb könnte, trotz eventuell bestehender Katzenkratzkrankheit, bei der Biopsie der Lymphknoten der Zeitpunkt der Nachweisbarkeit von *Bartonellen* schon überschritten gewesen sein.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die Verwendung universeller Primer, der von speziesspezifischen Primern, in der Detektion von *Bartonellen* gerade in nekrotischen und fixierten Geweben unterlegen ist. Da aber nur in einem der vier Verdachtsfälle auch mit *Bartonellen*-spezifischen Primern ein positives Ergebnis erzielt wurde, bleibt die histologisch begründete Verdachtsdiagnose einer Katzenkratzkrankheit fraglich. Mit Hilfe von SHARP-Screening wurden allerdings in allen Fällen Bakterien detektiert, die ebenfalls eine Lymphadenitis verursachen und zu einem ähnlichen histologischen Bild führen können:

Im entzündlichen Gewebe eines inguinalen Lymphknotens in Fall 1 waren zahlreiche Mikroabszesse zu erkennen, die neutrophile Granulozyten enthielten. Bei dem dringenden Verdacht auf eine bakterielle Genese der Lymphadenitis konnte im SHARP-Screening bei drei Sequenzen (14,3 %) *Janthinobacterium* aus der Familie der *Oxalobacteraceae* (*Burkholderia*) nachgewiesen werden. Zudem ergab die Sequenzanalyse weiterhin *Staphylokokken*, *Streptokokken* und bei zwei Sequenzen (9,5 %) *Corynebacterium pseudogenitalium*. In 19 % der Sequenzen fand sich eine nicht kultivierte *Cyanobacterium*-Spezies, die im Zusammenhang mit kolorektalen Adenokarzinomen entdeckt wurde. Und schließlich wurden nicht kultivierte Bakterien detektiert, die in der Literatur im Rahmen von gastrointestinalen Beschwerden mit Übelkeit und Erbrechen auftraten (*uncultured bacterium clone RL387_aao89h04*) [53]. Anhand des gefundenen Erregerspektrums im Fall 1 bekommt man einen Einblick, in wie weit SHARP-

Screening dazu in der Lage ist, die Komplexität der mikrobiellen Diversität einer Mikroumgebung, wie in einem Lymphknoten, zu erfassen. Die gefundenen Bakterien können die Entzündung in dem Gewebe letztendlich ausgelöst oder zumindest getriggert haben. Die zusätzlichen Kontrolluntersuchungen mittels speziesspezifischer Primer ergaben keinen Hinweis auf die verursachenden Erreger einer Katzenkratzkrankheit oder eines Lymphgranuloma venerum. Es ist also davon auszugehen, dass weder *Bartonella henselae* noch *Chlamydia trachomatis* im Lymphknoten vorhanden waren und zur Lymphadenitis geführt haben. Folglich wurde in diesem Fall der histologisch begründete Verdacht auf eine Katzenkratzkrankheit bzw. ein Lymphgranuloma venerum durch SHARP-Screening widerlegt, wobei eine mangelnde Sensitivität der Methode durch die Kontrolluntersuchungen ausgeschlossen wurde.

Bei den Fällen 2 und 3 handelte es sich um reaktive Veränderungen mit der histopathologischen Vermutung auf das Vorliegen einer viralen Genese der Lymphadenitis. Im Fall 2 sprachen hierfür die aktivierten hochendothelialen Gefäße und die kleinen aktivierten Lymphozyten. Es konnten zahlreiche CD4- und CD8-positive T-Zellen nachgewiesen werden. Die Proliferation lag im Bereich der T-Zell-Areale bei 20 - 30 %. Im Fall 3 betrug die Proliferation interfollikulär 30 - 40 %. Hier ließen sich vermehrt CD8-positive T-Lymphozyten nachweisen. Zudem fehlten eine signifikante plasmazelluläre Entwicklung und Mantelzonen innerhalb der lymphofollikulären hyperplastischen Areale. Dennoch wurde im SHARP-Screening in beiden Fällen bakterielle DNA nachgewiesen. Im Fall 2 ergab die Sequenzanalyse in 25,5 % aller Sequenzen *Propionibacterium acnes*, in 11,8 % *Bacillus sp. JAMB-602* und in 9,8 % der Fälle *Staphylococcus hominis*. Fall 3 enthielt zu 50 % *Propionibacterium acnes*. Eine pathogene Rolle spielt *Propionibacterium acnes* beispielsweise bei Hautinfektionen, osteoartikulären Infektionen und bei Endokarditiden. Im Rahmen von Lymphknotenerkrankungen kommt dieser Erreger vor allem bei Sarkoidosepatienten in Form granulomatöser Veränderungen im peripheren Lungengewebe und mediastinalen Lymphknoten vor [19, 48, 87]. Auch innerhalb von Abszessen wurde *Propionibacterium acnes* schon in beteiligten Lymphknoten nachgewiesen [19]. Dennoch muss bei dem fehlenden histologischen Verdacht auf eine bakterielle Beteiligung der Lymphadenitis, bei diesem Erreger auch an eine mögliche Kontamination während des SHARP-Screenings gedacht werden.

Die Hauptquellen möglicher Verunreinigungen und Störfaktoren stellen Gewebeverunreinigungen bei der Biopsieentnahme, kontaminierte Reagenzien und das Vorhandensein bakterieller DNA in sterilen Kompartimenten des Körpers dar [46]. Auf den ersten und letzten Punkt konnte in unserer Studie kein Einfluss genommen werden, da die Lymphknotengewebe zu Beginn der Studie bereits in fixierter Form vorlagen. Durch die hohe Sensitivität der in dieser Studie verwendeten Methode und der Fähigkeit, geringste Mengen an DNA zu detektieren, ist eine strenge Kontaminationsprävention für das Ergebnis entscheidend [5, 7, 46, 66]. Deshalb war es bei allen folgenden Schritten wichtig, im Umgang mit den Gewebeproben und Reagenzien gewisse Vorkehrungen zu treffen. So wurden alle Arbeitsschritte unter der sterilen Bank durchgeführt, Labormäntel getragen, puderfreie Handschuhe regelmäßig gewechselt und nicht wieder verwendbare Abfallbehältnisse eingesetzt. Alle verwendeten Gefäße und Einwegmaterialien (z.B. Eppendorf-Gefäße, PCR-Caps, Pipettenspitzen, usw.) wurden vor Gebrauch sterilisiert, Flüssigkeiten und Medien autoklaviert und Reagenzien (z.B. Taq-Polymerase, Primer, Desoxynukleotide, usw.) für jeden Arbeitsplatz separat bereitgestellt.

Trotz rigoroser technischer Vorkehrungen sind falsch-positive Ergebnisse dennoch immer möglich [46]. In unserer Studie wurde *Propionibacterium acnes* in allen 15 Fällen nachgewiesen (siehe Tabelle 2). Aber nur in zwei Fällen machte der Anteil von *Propionibacterium acnes* mehr als 50 % aller Sequenzen aus. In zehn Fällen lag der Anteil unter 30 % und davon in vier Fällen unter 11 %. Die Frage, ob es sich beim Nachweis von *Propionibacterium acnes* um Kontamination oder um ubiquitär vorkommende DNA in Lymphknoten mit oder ohne Krankheitswert handelt, kann nicht mit letzter Sicherheit geklärt werden. Hier wären weitere Untersuchungen mit SHARP-Screening an größeren Fallzahlen aufschlussreich.

Ein anderer klassischer Hautkeim, der bei einem positiven Nachweis häufig als Verunreinigung gesehen wird, ist *Staphylococcus epidermidis*. In unserer Studie stimmen von insgesamt 400 Sequenzen nur vier mit der DNA dieses Bakteriums überein. Wenn unsere Kontaminationsmaßnahmen nicht ausreichend effizient gewesen wären, hätten unter den Ergebnissen, neben *Propionibacterium acnes*, auch andere typische Hautkeime häufiger vorkommen müssen. Dennoch macht *Propionibacterium acnes* im Fall 3 bei insgesamt 20 untersuchten Sequenzen einen Anteil von 50 % aus. Bei den restlichen Sequenzen handelte es sich um eine *Paracoccus*-Spezies, *Corynebacterium*,

Micrococcus, *Chloroflexi*, *Veillonella* und *Staphylococcus* (siehe Tabelle 2). Entsprechend dem mangelnden Hinweis auf eine bakterielle Genese der Lymphadenitis im histologischen Befund, wurden diese Bakterien im SHARP-Screening nur vereinzelt und nicht in größerer Anzahl nachgewiesen. Da die Sensitivität der Methode sehr hoch ist, muss die gefundene DNA nicht automatisch pathogenetisch bedeutsam sein. Im Fall 3 liegt demnach eine Korrelation zwischen Histologie und SHARP-Screening vor.

Anders ist es im Fall 2. Trotz dem histologischen Verdacht auf eine virale Genese der Lymphadenitis, ohne Anzeichen für eine bakterielle Beteiligung, wurden in 23,5 % der Sequenzen *Comamonadaceae* nachgewiesen (Tabelle 2). Dieser Erreger trat in unseren anderen Fällen im Rahmen von entzündlichen Ödemen, Mikroabszessen, Nekrosen und granulomatösen eitrigen Veränderungen im Lymphknotengewebe auf. Eine solche Morphologie besaß das Gewebe im Fall 2 nicht. Bei insgesamt 51 Sequenzen fanden sich wie im Fall 3 zudem eine *Paracoccus*-Spezies, *Corynebacterium*, *Propionibacterium acnes* (25,5 %), *Micrococcus* und *Staphylococcus aureus*. Zusätzlich ergaben sich Übereinstimmungen mit *Novosphingomonas*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Cyanobacteria* und *Bacillus sp. JAMB-602*. Dieses Spektrum an verschiedenen Erregern und die Anzahl verschiedener Bandenmuster im RFLP-Verdau (51) scheinen mit dem histologischen Befund nicht übereinzustimmen. Vor allem der hohe Anteil von *Comamonadaceae* lässt eine bakterielle Mitbeteiligung am Entzündungsvorgang vermuten.

Durch die Ergebnisse im SHARP-Screening könnte als tatsächliche Ursache der Lymphadenitis eine bakterielle Genese in Frage kommen. Es fanden sich immerhin auch Primärfollikel und zahlreiche Plasmazellen in den Marksträngen. Andererseits setzt der Nachweis bakterieller DNA nicht automatisch das Vorhandensein lebender Bakterien im Lymphknotengewebe voraus [24]. So kann es auch vorkommen, dass im SHARP-Screening DNA von Bakterien detektiert wird, die vom Immunsystem bereits zerstört wurden und pathophysiologisch keine Bedeutung mehr für eine lokale Entzündungsreaktion des Lymphknotens besitzen. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn Makrophagen nach Phagozytose von Erregern zur Antigenpräsentation in den Lymphknoten abwandern und deren Inhalt bei der DNA-Extraktion miterfasst wird. Es bleibt weiteren Studien überlassen, mit Hilfe von SHARP-Screening eine größere Anzahl von vermuteten virusverursachten Lymphadenitiden auf bakterielle DNA zu untersuchen. Dabei

sollte auch geprüft werden, ob *Comamonadaceae* enthalten ist und welche histologische Morphologie die Gewebe aufweisen.

Im Fall 4 ließen die unbekannte Ätiologie einer großflächigen Nekrose, als auch der fehlende Erregernachweis in den mikrobiologischen Untersuchungen die Ursache der Lymphknotenentzündung ungeklärt. Die reaktive Plasmazytose ergab in den Klonalitätsuntersuchungen der Immunglobulin-Schwerkettenloki als auch bei der Gamma-Kette des T-Zellrezeptors keinen Hinweis auf das Vorliegen einer klonalen Lymphozytenpopulation. Die granulomatöse Reaktion, sowie die Riesenzellen vom Langhans-Typ und nicht zuletzt der Nachweis fädiger und kokkoider Bakterien in der Warthin-Starry-Färbung (Abb. 15b/c) machten eine bakterielle Genese jedoch wahrscheinlich. In 73,7 % der untersuchten Sequenzen wurden die beiden unkultivierten Bakterien *clone RL387_aao89h04* und *clone P5D18* identifiziert. Die Quellen dieser beiden Bakterien sind laut NCBI-Datenbank zum einen humane Darmflora (*clone RL387_aao89h04*) und zum anderen endotracheales Aspirat (*clone P5D18*) [31, 53]. Über die Pathogenität dieser beiden Bakterien ist nichts bekannt. Da in diesem Fall aber ein septisches Geschehen beschrieben wurde, können diese Bakterien durchaus eine Rolle im Rahmen der Lymphadenitis gespielt und zur Entzündung geführt oder sie getriggert haben. Eine weitere Sequenz war homolog zu *Rhodococcus* aus der Familie der *Nocardia* (*Corynebacteria*). Die häufigste und im Verwandtschaftsbaum am nächsten gelegene Spezies war dabei *Rhodococcus erythropolis*. *Nocardia*-Infektionen stellen zumeist opportunistische Infektionen bei immunsupprimierten Patienten dar [50]. Gerade bei Erwachsenen sind die primär kutane Nokardiosis und das „nocardial lymphocutaneous syndrome“ häufiger als bei Kindern beschrieben, die eher von zervikofazialen *Nocardia*-Infektionen mit Otitis und Lymphadenitis betroffen sind [50]. Lymphknotenschwellungen im Rahmen von Hautdefekten sind häufig die Folge von bakteriellen Superinfektionen durch *Sporothrix schenckii*, *Nocardia brasiliensis*, *Mycobacterium marinum*, *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis/guyanensis* und *Francisella tularensis*. Eine offene eitrige Sekretion spricht dabei eher für eine Infektion mit *Nocardia* und *Francisella* [25]. So wurden bereits in früheren Studien Fälle von, zum Teil nekrotisierenden Lymphadenitiden, durch verschiedene *Nocardia*-Spezies wie *N. asteroides* und *N. brasiliensis* beschrieben [10, 25, 50, 63]. *Rhodococcus*

erythropolis ist beispielsweise im Rahmen einer HIV-Infektion, in Form von multiplen subkutanen Knoten detektiert worden [82]. Die Lymphknotenschwellung im Zusammenhang mit einer septischen Nekrose in unserem Fall kann deshalb durchaus die Folge einer Infektion mit *Rhodococcus erythropolis* gewesen sein.

Schließlich fand sich bei einer Sequenz die Übereinstimmung mit verschiedenen *Corynebacteria*-Spezies. Die häufigsten und im Verwandtschaftsbaum am nächsten gelegenen Spezies waren bei diesem Klon *Corynebacterium diphtheriae* und *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Gerade *Corynebacterium pseudotuberculosis* wurde bereits im Zusammenhang mit Lymphadenitiden beschrieben. So finden sich bei einer Infektion mit diesem Erreger die gleichen histopathologischen Veränderungen im Lymphknotengewebe, wie in unserem Fall. Es handelt sich dabei um granulomatöse Veränderungen mit eingestreuten Nekrosen und dem Nachweis von bazillären Erregern in den bakterioskopischen Färbungen [11, 42, 49, 61]. Eine Infektion mit diesem Erreger tritt häufig im Umgang mit Tieren, wie z.B. Schafen, auf. Das im SHARP-Screening nachgewiesene *Corynebacterium pseudotuberculosis* sollte in unserem Fall, neben *Rhodococcus erythropolis*, als möglicherweise verursachendes Bakterium der Lymphadenitis mit ausgedehnter Nekrose im Bereich der linken Hüfte einer 62-jährigen Patientin betrachtet werden.

In den zusätzlichen Untersuchungen mittels speziesspezifischer Primer fand sich, im Gegensatz zu den Ergebnissen im SHARP-Screening mit 97 %-iger Übereinstimmung DNA von *Yersinia enterocolitica*. Im Rahmen von intestinalen Infektionen verursacht dieser Erreger Enteritiden, terminale Ileitis, Pseudoappendizitis und mesenteriale Lymphadenitiden. Vor allem bei älteren Menschen ist eine Infektion mit *Yersinia enterocolitica* häufig nicht mehr selbstlimitierend. Es kann zur septischen Streuung mit Abszessen in zahlreichen Organen, wie Leber und Milz, oder einer Lymphadenopathie mit generalisierter Lymphadenitis kommen [14, 45, 77]. Wie schon weiter oben erwähnt, berichteten Rolain et al. bereits 2006 über die Problematik, dass erwartete Erreger wie *Yersinia enterocolitica* zugunsten anderer, häufiger vorkommender Bakterien unterrepräsentiert bleiben [68]. Auch in unserem Fall waren andere Bakterien, wie die beiden unkultivierten Bakterien *clone RL387_aao89h04* und *clone P5D18*, mit 73,7 % deutlich häufiger vertreten. Das Problem von präferentieller Amplifikation und die generelle Nachweisbarkeit von *Yersinia enterocolitica* in fixierten

Lymphknotengewebe, mit Hilfe von SHARP-Screening, könnte Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Fall 5 stellte eine granulomatös nekrotisierende Lymphadenitis der Leistenregion dar. Im histopathologischen Befund bestand der Verdacht auf eine Katzenkratzkrankheit. Das verursachende Bakterium *Bartonella henselae* konnte im SHARP-Screening allerdings nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde in den zusätzlichen Untersuchungen, mittels speziesspezifischen Primern, DNA von *Bartonella henselae* detektiert. Die zahlreichen kokkoiden Bakterien, die in der Warthin-Starry-Färbung zur Darstellung gebracht wurden, und die Nekrosen, sowie die palisadenartige epitheloide Histiozytose ließen jedoch auch an das Vorliegen einer septischen Granulomatose (CGD) denken [37]. Diese Erkrankung stellt eine wichtige Differentialdiagnose der Katzenkratzkrankheit dar, da sie ihr histopathologisch ähnlich ist [67, 70]. Bei der septischen Granulomatose liegt ein genetischer Defekt der NADPH-Oxidase in den neutrophilen Granulozyten vor, der zu einer Immunschwäche und einer bakteriellen Besiedelung des Körpers mit Bildung von Granulomen und Lymphadenitiden führt. Im Rahmen dieses Infektgeschehens spielen gerade Vertreter aus der Ordnung der *Burkholderia* typischerweise eine Rolle [37]. Neben *Burkholderia* (35,5 %), *Propionibacterium acnes* und *Escherichia coli* konnte im SHARP-Screening allerdings auch ein Klon mit der Homologie zu *Gluconacetobacter sacchari* detektiert werden. Diese Spezies aus der Klasse der *Alpha-Proteobacteria* wird normalerweise in der Essigherstellung und Weinfermentation industriell genutzt. Greenberg et al. beschrieben 2006 den ersten Fall einer invasiven Erkrankung beim Menschen durch *Acetobacteraceae* im Rahmen einer septischen Granulomatose [37]. Unsere Ergebnisse des SHARP-Screenings in diesem Fall konnten den histopathologischen Verdacht auf eine Katzenkratzkrankheit zwar nicht bestätigen. Allerdings gibt der Nachweis von DNA von *Gluconacetobacter sacchari* den Hinweis darauf, dass die Lymphknotenentzündung eventuell auch durch andere Bakterien als *Bartonella henselae* verursacht worden sein kann. *Gluconacetobacter sacchari* würde also zu einem histologisch ähnlichen Bild führen. Allerdings wurde dieser Erreger in der histopathologischen Begutachtung differentialdiagnostisch nicht einbezogen.

Im Fall 6 lag eine granulomatös eitrige Lymphadenitis mit eingestreuten Nekrosen vor. Die inguinale Weichteilumgebung enthielt weitere stark vergrößerte und partiell aufgebrochene Lymphknoten und Nekrosen. Der histologisch begründete Verdacht auf eine infektiöse Genese im Sinne eines Lymphgranuloma venerum konnte im SHARP-Screening nicht bestätigt werden. In den zusätzlichen Untersuchungen mittels speziesspezifischer Primer wurde allerdings DNA von *Chlamydia trachomatis* nachgewiesen. Auch die Immunserologie ergab positive Werte für *Chlamydia trachomatis*-spezifisches IgA und IgG. Diese Diskrepanz kann unterschiedlich bewertet werden. Zum einen gibt der Nachweis von IgA-Antikörpern zwar den Hinweis auf eine noch vorhandene Infektion, er ist letztendlich aber nicht beweisend. In unserem Fall konnte deshalb, bei Fehlen klinischer Angaben, anhand des IgA-Titers alleine keine sichere Aussage zum Stadium der Infektion getroffen werden. Positive Antikörper könnten zum Beispiel auch im Rahmen einer Immunreaktion auf ein Autoantigen entstanden sein und zu einer positiven *Chlamydien*-Serologie geführt haben. Zudem hat bei der Diagnose einer *Chlamydia trachomatis*-Infektion die Serologie eine geringere Sensitivität als der molekulargenetische Nachweis [74]. In den Studien von Wilkinson et al. 1998 und Siala et al. 2009, zum PCR-gestützten Nachweis von *Chlamydia trachomatis* in Gelenkflüssigkeit bei reaktiver Arthritis und undifferenzierter Oligoarthritis, wurden ebenfalls in 7 % bzw. 9,4 % der PCR-negativen Fälle Antikörper gegen *Chlamydia trachomatis* nachgewiesen. Wegen der geringen Anzahl untersuchter Patienten (32 bzw. 34) konnte laut dieser Studien aber keine statistische Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Antikörpern und dem Nachweis von DNA angegeben werden [86]. Deshalb lässt sich erst recht in unserem Einzelfall, trotz negativem PCR-Ergebnis, keine Aussage über die generelle Nachweisbarkeit von *Chlamydia trachomatis* mit Hilfe von SHARP-Screening in fixiertem Lymphknotengewebe treffen.

Da *Chlamydia trachomatis* ein streng intrazellulär lebendes Bakterium ist, erscheint es nicht ungewöhnlich, dass in der Ziehl-Neelsen-, Gram-, Warthin Starry-, Grocott- und PAS-Färbung des Lymphknotengewebes keine Erreger gefunden werden konnten. In der Regel gelingt der *Chlamydia trachomatis*-Nachweis nur anhand von Zellen des ursprünglichen Infektionsortes, die z.B. im Rahmen eines Harnröhrenabstrichs gewonnen werden. Der positive DNA-Nachweis im Lymphknotengewebe setzt folglich das Vorhandensein *Chlamydia*-haltiger Zellen im Lymphknoten voraus, wie

z.B. Makrophagen oder Riesenzellen. Wenn dies hier der Fall gewesen wäre, bliebe immer noch unklar, ob zum Zeitpunkt der Infektion die DNA von *Chlamydia trachomatis* noch ausreichend intakt war. Im Gegensatz zur PCR mittels speziesspezifischer Primer, setzt SHARP-Screening durch Verwendung der beiden universellen Primer 27f und 1492r ein intaktes 16S-rRNA-Gen in seiner vollen Länge voraus.

Zudem wurden die Zellen bei der DNA-Extraktion einer Lyse unterzogen, welche die Integrität vollständiger Gene zusätzlich gefährdet. Aufgrund der paraffineingebetteten Lymphknotengewebe mussten die Gewebe-Pellets in unserer Studie vor dem Verdau außerdem mit 100 %-igem Ethanol gewaschen werden. Wilkinson et al. und Siala et al. schlugen in ihren Studien zum Schutz der DNA bei der Extraktion deshalb bewusst vor, auf die Verwendung von Alkohol zu verzichten [74, 86]. Siala et al. konnte in 59 % der untersuchten Fälle *Chlamydia trachomatis* nachweisen. Um die Sensitivität zu erhöhen, wurde allerdings neben dem 16S-rRNA-Gen noch nach *Chlamydia*-Plasmid-DNA und dem omp 1-Gen gescreent. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass das 16S-rRNA-Gen nur in 35 % der Fälle nachgewiesen werden konnte, im Vergleich zu 56 % beim *Chlamydia*-Plasmid. Der Grund hierfür kann an der fünfmal höheren Anzahl von Kopien im Genom dieses Bakteriums im Vergleich zum 16S-rRNA-Gen liegen [74, 86]. Eine hohe Sensitivität der Nachweismethode ist aufgrund des intrazellulären Wachstums und der geringen Anzahl von Bakterienzellen bei der Diagnose einer *Chlamydia trachomatis*-Infektion essentiell. Deshalb wird in diesen Studien in erster Linie der Nachweis der *Chlamydia*-Plasmid-DNA empfohlen.

Schließlich könnte in unserem Fall die DNA-Menge aus den genannten Gründen die Nachweisgrenze des SHARP-Screenings auch unterschritten haben, weshalb keine Sequenz mit einer Homologie zu *Chlamydia trachomatis* gefunden wurde. Bei der Sequenzanalyse im Fall 6 wurden allerdings in 21,4 % der gefundenen DNA *Comamonadaceae* identifiziert. Wie auch in unseren anderen Fällen wurde dieser Erreger hier wieder im Rahmen einer eitrigen Lymphadenitis mit eingestreuten Nekrosen detektiert. Bei 42,9 % der Klone handelte es sich um *Propionibacterium acnes*. Sowohl *Comamonadaceae*, als auch *Propionibacterium acnes* und die weniger häufig gefundenen Erreger (*Bacillus JAMB-602*, *Streptococcus pneumoniae*, *Leifsonia xyli*, *uncultured bacterium clone RL387_aao89h04* und *uncultured bacterium clone P5D18*) besitzen das pathogene Potential, über die Haut oder von inneren Organen aus eine Lymphadeni-

tis auszulösen. Deshalb ist es bei negativem *Chlamydia trachomatis*-Nachweis im SHARP-Screening nicht ausgeschlossen, dass diese Erreger eine Entzündung mit Ausbildung ausgedehnter Nekrosen im Bereich der Inguinalregion mit mehreren vergrößerten Lymphknoten verursacht haben.

Bei der histiozytär eitrigen Lymphadenitis im Fall 7 konnte im SHARP-Screening bei einer Sequenz die Übereinstimmung mit *Aerococcus* festgestellt werden. Dabei waren *Aerococcus viridans* und *Aerococcus urinae* in der Sequenzanalyse die Spezies mit dem höchsten Verwandtschaftsgrad. *Aerococcus* ist in der Raumluft von Krankenhäusern zu finden und besiedelt die Haut sowie den oberen Respirationstrakt [80]. Infektionen durch dieses Bakterium scheinen vorwiegend aufgrund von Gewebeschädigungen, als nosokomiale Infektionen im Zusammenhang mit verlängerten Krankenhausaufenthalten, antibiotischer Behandlung und invasiven Maßnahmen zu entstehen [80]. In früheren Studien wurde *Aerococcus* ursächlich als Erreger von bakterieller Meningitis, Endokarditis, Bakteriämie und anderen Infektionen, wie Infektion des Harntrakts, septische Arthritis und Wundinfektionen beschrieben [71, 80]. Santos et al. konnten 2003 in ihrer Studie *Aerococcus urinae* als verursachendes Bakterium für eine regionale Lymphadenitis identifizieren. Dabei wurde in der histologischen Beschreibung der Lymphknotenpräparate auf die Ähnlichkeiten mit anderen Infektionen, wie Tuberkulose, Granuloma inguinale, primärer Syphilis und anderen Ursachen für reaktive Lymphadenitiden hingewiesen [71]. In unserem Fall lag eine eitrige Lymphadenitis mit histiozytären Granulomen vor, die teilweise von neutrophilen segmentkernigen Granulozyten durchsetzt waren. Der Befund sprach für eine bakterielle Genese, wobei differentialdiagnostisch eine Katzenkratzkrankheit in Frage kam. Da im SHARP-Screening *Bartonella henselae* allerdings nicht detektiert wurde, schließt das eine mögliche *Aerococcus*-Infektion als Ursache für die Lymphadenitis nicht aus. Denn die anaerobe Umgebung innerhalb eines Lymphknotens ist auch für das fakultativ aerobe *Aerococcus* geeignet [71]. Auch die Beteiligung anderer Bakterien am Entzündungs geschehen ist nicht ausgeschlossen. So konnte im SHARP-Screening, wie im Fall 4, beispielsweise DNA von *Rhodococcus* aus der Familie der *Nocardia* nachgewiesen werden.

Im Fall 8 handelte es sich um ein Lymphknotenpräparat aus der Axilla bei rezidivierender Lymphknotenschwellung an dieser Stelle. Die erhöhte Proliferationsaktivität in den Keimzentren und der histologische Nachweis aktivierter B-Zellen und Plasmazellvorläufer ließen insgesamt den Schluss auf ein infektiöses Geschehen zu. Passend dazu konnte im SHARP-Screening bei 25 % der analysierten Sequenzen *Comamonadaceae* identifiziert werden. Die genaue Analyse der mikrobiellen Diversität ergab unter den restlichen Sequenzen jedoch ein breites Spektrum an Bakterien, von denen 33,3 % den *Actinobacteria* und 25 % den *Firmicutes* zugeordnet werden konnten. Neben den anteilmäßig überwiegenden *Comamonadaceae* kommen folglich auch die anderen gefundenen Bakterien, wie *Corynebacterium pseudogenitalium*, *Aeromicrobium*, *Propionibacterium*, *Arthrobacter*, *Knoellia* sp., *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridia*, *uncultured bacterium clone P5D18* und *uncultured bacterium clone rRNA 089* dafür in Frage, die Lymphadenitis im Zusammenspiel getriggert zu haben.

Man sollte vorsichtig sein, den Begriff symbiotische Mikroflora automatisch mit Probenverunreinigung und dem Einwandern opportunistischer Krankheitserreger in Verbindung zu bringen. So werden gerade *Staphylokokken* und *Propionibakterien* häufig als Verunreinigung ohne ursächliche Bedeutung einer Entzündung gesehen [68]. Die Symbiose verschiedener Keime spielt aber, unabhängig von ihrem pathogenen Potential, in der Genese einer Entzündung vielleicht eine viel bedeutendere Rolle als bisher angenommen. Denn vieles ist über das räumliche und zeitliche Zusammenspiel bakterieller Gemeinschaften noch unverstanden [66]. Das Verstehen Lernen solcher komplexer Prozesse setzt allerdings die Kenntnis der ganzen mikrobiellen Diversität voraus. In unserem Fall konnte SHARP-Screening auch ein sehr umfangreiches Spektrum an Bakterien detektieren, wo die histologische und mikrobielle Untersuchung keine Hinweise auf Erreger gaben.

In den zusätzlichen Untersuchungen mit speziesspezifischen Primern wurde DNA von *Chlamydia trachomatis* nachgewiesen. Da es sich allerdings um einen zervikalen Lymphknoten einer 78jährigen Patientin handelte, sprechen sowohl das Alter als auch die Lokalisation eher gegen ein Lymphgranuloma venerum mit *Chlamydia trachomatis* als verursachenden Erreger der Lymphadenitis [3].

Fall 9 wurde als Kontrollfall ausgewählt. Bei diesem zervikalen Lymphknoten, mit der klinischen Angabe einer Lymphadenitis colli, handelte es sich histologisch um eine Lymphoproliferation mit dem Verdacht auf ein T-Zell-Lymphom vom nicht weiter spezifizierten Typ (PTCL NOS). Bei nahezu vollständig zerstörter Struktur des Lymphknotengewebes mit zahlreichen Apoptosen, zeichnete sich eine CD8-positive T-Zellpopulation ab. Es wurden nur wenige Granulozyten nachgewiesen. Die Kontrolluntersuchungen mittels speziesspezifischer Primer konnte keine DNA von *Bartonella henselae*, *Chlamydia trachomatis*, *Toxoplasma gondii*, *Yersienien*, *Enterobakterien* oder atypischen *Mykobakterien* detektieren. Eine virale Genese wurde in Bezug auf *CMV* und *EBV* durch eine negative *Cytomegalie*-Serologie bzw. einer negativen LMP-Färbung und in situ-Hybridisierung EBV-kodierter RNA (EBER) ebenso ausgeschlossen. Im SHARP-Screening wurden insgesamt 24 Klone identifiziert. Davon ließen sich 25 % der Klasse der *Firmicutes* und 41,7 % den *Actinobacteria* zuordnen. Auch wenn histologisch kein Hinweis auf eine infektiöse Genese der Lymphadenitis bestand, schließt das keineswegs das Vorhandensein bakterieller DNA im Lymphknotengewebe aus.

Auch bei dem Verdacht auf ein T-Zell-Lymphom ist eine, zuvor oder nebenbei abgelaufene Entzündung durch Bakterien möglich. Zumal hier auch eine Immunsuppression vorgelegen haben kann. 20,8 % aller Sequenzen wurden als *Streptomyces* identifiziert (Tabelle 2). *Streptomyces* gehören zusammen mit *Nocardia* zu den *Actinomycetales* und wurden früher aufgrund ihrer Hyphenbildung zu den Pilzen gezählt [27]. Sie sind für ihre Produktion von Antibiotika bekannt und werden nur selten als Ursache für eine Infektion in Zusammenhang gebracht. In einem solchen Fall handelt es sich klinisch dann in der Regel um eine chronisch eitrige Infektion der Haut und des Unterhautgewebes. Allerdings wurden *S. violaceoruber*, *S. coelicolor* und *S. albus* auch schon aus Karies, Tonsillen, Blut, Haut und Sputum isoliert [27]. Weiterhin wurden *S. candidus* aus purulentem Exsudat einer frakturierten Patella, *S. horton* aus Eiter, *S. willmorei* aus Leberabszessen und *S. gedaensis* aus Sputum und Abszessen extrahiert [27]. Ebenso sind Fälle von Sepsis, Lungeninfiltration, Perikarditis, Hirnabszessen (*S. griseus*), abdominalen Abszessen (*S. somaliensis*) und Endokarditis durch *Streptomyces*-Spezies beschrieben worden. Schließlich konnten Holtz et. al. bereits 1985 *Nocardia* und *Streptomyces* in Lymphknoten von AIDS-Patienten nachweisen

[44]. In den meisten Fällen werden *Streptomyces* allerdings nicht als primär verursachendes Agens mit Sicherheit identifiziert. Deshalb wurde die Rolle von *Streptomyces* bei Infektionen unterschiedlicher Lokalisationen auch früher schon kontrovers diskutiert. Fest steht, dass diese Bakterien das pathogene Potential zur invasiven Infektion besitzen [27]. Gerade bei immunsupprimierten Patienten scheinen *Streptomyces* und *Nocardia* eine häufige Rolle bei Lymphadenitiden zu spielen [28]. Mit dem Verdacht auf ein T-Zell-Lymphom könnte in unserem Fall ebenso eine Immunsuppression vorgelegen haben. Da keine Informationen über den klinischen und therapeutischen Status des Patienten bekannt waren, ist eine *Streptomyces*-Infektion als Ursache für diese Lymphadenitis colli nicht ausgeschlossen.

Unter den *Firmicutes* waren fünf Sequenzen homolog zu verschiedenen *Clostridium*-Spezies. Drei weitere Sequenzen entsprachen nicht kultivierten *Firmicutes*. In wie weit solche Bakterien bei Lymphomen regelmäßig in Lymphknoten zu finden sind, sollte in weiteren Studien an größeren Fallzahlen untersucht werden. Dabei könnte auch auf die Fragestellung eingegangen werden, ob die Sensitivität des SHARP-Screenings eventuell zu hoch ist und Bakterien-DNA detektiert wird, die pathogenetisch kein Korrelat besitzt. So behaupten manche Autoren, dass ein 16S-rRNA-Genfragment das Vorhandensein des entsprechenden Bakteriums voraussetzt [20]. De Hertogh und Fenollar sind dagegen der Meinung, dass der Nachweis bakterieller DNA kein Beweis für lebende Bakterien ist [24, 30]. *Streptomyces pneumoniae*-DNA wurde beispielsweise ohne Anhalt für eine aktuelle Infektion sieben Jahre nach einer Endokarditis an einer Herzklappe detektiert [30]. Auch in unserem Fall konnte SHARP-Screening neben *Streptomyces* auch *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Delta-Proteobacteria*, *Propionibacteria* und *Mikrokokken* detektieren. Da die Struktur des Lymphknotens nicht mehr erhalten war, bleibt letztendlich ungeklärt, in wie weit lebende Bakterien im Gewebe enthalten waren und zur Entzündung geführt haben können.

Im Fall 10 enthielt das Lymphknotengewebe deutlich entzündliche Ödeme, Mikroabszesse und zahlreiche neutrophile Granulozyten. Im SHARP-Screening konnten bei diesem histologischen Befund in 61,9 % der untersuchten Sequenzen wieder Vertreter aus der Ordnung der *Burkholderia* identifiziert werden. Über die Hälfte davon gehörte den *Comamonadaceae* an. Diese Bakterien sind häufig auf Oberflächen von Kranken-

hauszubehör, sowie in menschlichem Urin und Sputum zu finden [6]. Auch wenn *Comamonadaceae* eine geringe klinische Bedeutung besitzen, wurden Spezies wie *C. testosteroni* und *C. acidovorans* ursächlich mit dem Auftreten von bakterieller Meningitis, Endokarditis, Peritonitis, zentralvenöser Katheterinfektion und Bakteriämie beschrieben [6, 18, 22, 51, 54]. Gul et al. berichteten 2007 über eine durch *C. testosteroni* verursachte Bakteriämie bei akuter Appendizitis. Gerade bei Erkrankungen des Abdomens spielt dieser Erreger häufig eine Rolle [38].

Weiterhin entsprachen zwei von den 21 Sequenzen im Fall 10 der Spezies *Paracoccus yeeii* aus der Klasse der *Alpha-Proteobacteria*. Daneshvar et al. beschrieben 2003 diese Spezies als erste im Zusammenhang mit Infektionen beim Menschen [23]. Da die Pathogenität von *Paracoccus yeeii* gering ist, wird dieser Erreger vermutlich häufig nicht als infektiöse Ursache erkannt [33]. Er erhält über Hautdefekte von hospitalisierten Patienten Zugang zum menschlichen Körper und kann z.B. in Blutkulturen detektiert werden. Funke et. al. konnten 2004 den ersten dokumentierten Fall einer *Paracoccus yeeii*-Infektion allein mit Hilfe einer 16S-rRNA-Analyse verifizieren. Auch in unserem Fall wurden zwei Klone durch SHARP-Screening der *Paracoccus yeeii*-Spezies eindeutig zugeordnet. Sowohl *Paracoccus yeeii* als auch *Comamonadaceae* können im Fall 10 die bakteriell bedingte Lymphadenitis getriggert oder verursacht haben. Denn trotz des histopathologischen Verdachts auf das Vorliegen einer Katzenkratzkrankheit, konnte *Bartonella henselae*-DNA weder im SHARP-Screening noch in den Zusatzuntersuchungen mittels speziesspezifischer Primer nachgewiesen werden.

Im Fall 11 bestand bei dem Weichteilgewebe aus der Analregion eines 31-jährigen Mannes aufgrund ausgeprägter Condylomata accuminata der dringende Verdacht auf den Primäraffekt einer Syphilis. Die Warthin-Starry-Färbung ließ allerdings keine *Treponema pallidum*-ähnlichen Bakterien im Gewebe erkennen. Dennoch machten die lymphozytären und plasmazellulären Infiltrate eine bakterielle Beteiligung wahrscheinlich. Vor allem perivaskulär waren CD5-positive T-Lymphozyten und Plasmazellen zu erkennen, die eine polytypische Immunglobulin-Expression aufwiesen. Aus dem SHARP-Screening ging keine Sequenz mit einer Homologie zu *Treponema pallidum* hervor. Unsere Ergebnisse wurden von den zusätzlichen Untersuchungen mittels speziesspezifischer Primer bestätigt. Denn auch hier fiel der *Treponemen*-spezifische Nach-

weis negativ aus. Im SHARP-Screening konnte allerdings ein breites Spektrum an Bakterien detektiert werden, die für eine reaktiv entzündliche Veränderung in dem Gewebe verantwortlich gemacht werden könnten. So wurden auch in diesem Fall vier Sequenzen mit einer Homologie zu *Comamonadaceae* aus der Ordnung der *Burkholderia* identifiziert. Weiterhin fand sich DNA von verschiedenen Spezies von *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* und weiteren unkultivierten Spezies aus der Klasse der *Firmicutes* (Tabelle 2). Der Nachweis einer Homologie zu *Staphylococcus epidermidis* sollte nicht nur als Kontamination gesehen werden. Zum einen wurde dieses Bakterium in unseren anderen Fällen kaum nachgewiesen. Zum anderen berichteten Ben-Ami et al. 2003 in ihrer Studie bereits über die phänotypische Variabilität von *Staphylococcus epidermidis*. Darin wird die Fähigkeit dieses Bakteriums erklärt, sich ändernden Umweltbedingungen anzupassen und damit das Überleben und die Virulenz als pathogener Keim zu verbessern [13]. In der Folge führen die phänotypische Variabilität und das Versagen herkömmlicher Nachweisverfahren zur falschen Interpretation einer polymikrobiellen Kontamination einer klinischen Probe. Wie in unserem Fall, kann erst die molekulargenetische Diagnostik mittels SHARP-Screening einen genauen Einblick und einen Hinweis auf das tatsächlich verursachende Bakterium geben.

Insgesamt neun Sequenzen machten mit ihrer Homologie zur Unterordnung der *Micrococcinae*, aus der Klasse der *Actinobacteria*, einen Anteil von 26,5 % der gefundenen Klone aus. Davon entsprachen wiederum sechs Sequenzen dem Genus *Kocuria*. Ursprünglich gehörten *Kocuria* dem Genus *Micrococcus* an. Dieses wurde allerdings anhand phylogenetischer Analysen in die Genera *Kocuria*, *Micrococcus*, *Nesterenkonia*, *Kytococcus* und *Dermaococcus* aufgeteilt und den beiden Familien *Micrococcaceae* und *Dermaococcaceae* zugeordnet. Diese gehören wiederum der Subordnung der *Micrococcineae* an [76]. Bakterien des ursprünglichen Genus der *Micrococccen* werden als Teil der natürlichen Flora der Haut, Schleimhäute und des Oropharynx, in klinischen Proben häufig als Kontamination gesehen. Dennoch werden *Micrococccen* immer häufiger nicht nur als pathogene Keime im Rahmen von opportunistischen Infektionen bei immundefizienten Patienten beschrieben [2, 62, 64]. Sie wurden auch schon ursächlich im Zusammenhang mit Meningitis, intrakraniellen Abszessen, Arthritis, Endokarditis, Pneumonie und Sepsis nachgewiesen [52, 56, 72, 73, 81, 83, 85]. Verschiedene *Kocuria*-Spezies, wie z.B. *K. rosea* und *K. kristinae*, verursachen akute Cholezystitis

und Infektionen von zentralen venösen Venenkathetern mit Bakteriämie und Sepsis als Folge [4, 12, 55, 64]. Schließlich werden *Kocuria* aufgrund phänotypischer Ähnlichkeiten häufig zum Beispiel mit Koagulase-negativen *Staphylokokken* verwechselt, was die molekulargenetische Diagnostik mittels 16S-rRNA-Analyse notwendig macht [13]. Insgesamt sollte die Bedeutung eines Nachweises von *Kocuria spp.* in klinischen Proben nicht unterschätzt werden, da sich in der Literatur zunehmend Berichte von infektiösen Erkrankungen durch diese Erreger finden [4, 55]. Die Übereinstimmung von insgesamt neun Klonen mit den *Micrococcineae* sollte in unserem Fall die Aufmerksamkeit von *Treponema pallidum*, als einzig verursachenden Erreger eines ausgedehnten Abszesses mit Nekrosen, auch auf andere potentiell verursachende Bakterien lenken. Im SHARP-Screening, als auch in den Untersuchungen mittels speziesspezifischer Primer wurde keine DNA von *Treponema pallidum* detektiert. Letztlich könnte man die Vermutung anstellen, dass der akute Abszess im Weichteilgewebe durch die, im SHARP-Screening nachgewiesenen Erreger bedingt war.

Die eitrige Lymphadenitis im Fall 12 enthielt histologisch eine ausgeprägte Sinushistiozytose und zahlreiche neutrophile Granulozyten. Die erhaltene Lymphknotenstruktur wies eine lymphofollikuläre Hyperplasie auf. Ebenso wie im Fall 10, gibt *Paracoccus yeeii* hier, mit einem Anteil von 42,9 % im SHARP-Screening, einen möglichen Hinweis auf den verursachenden Erreger einer bakteriellen Genese der Lymphadenitis. Daneshvar et al. deklarierten dieses Bakterium in ihrer Studie 2003 als neue *Paracoccus*-Spezies, weil es die erste, jemals aus klinischem Material gewonnene Spezies war [23]. Trotz der geringen Pathogenität von *Paracoccus*, konnten Funke et al. in ihrer Studie 2004 diese neue Spezies als verursachenden Erreger einer Infektion identifizieren [33]. Laut dieser Studie ist es wahrscheinlich, dass *Paracoccus yeeii* häufig unentdeckt bleibt. Dies liegt laut Funke daran, dass das makroskopische Erscheinungsbild bei der Kultivierung, wie bei *Kocuria*, dem von Koagulase-negativen *Staphylokokken* ähnelt. Das kann zur falschen Erregeridentifikation führen. Vor allem dann, wenn das vermutete Koagulase-negative *Staphylokokkus*-Bakterium in der Bestimmung der Antibiotikempfindlichkeit eine, zur Behandlung ausreichende Sensibilität zeigt und somit keine weitere Erregeridentifikation durchgeführt wird. Folglich hat in der Studie nur

die molekulargenetische Untersuchung des 16S-rRNA-Gens den schnellen und eindeutigen Nachweis von *Paracoccus yeeii* erbracht [33].

Auch in unserem Fall gab SHARP-Screening den einzigen Hinweis auf eine mögliche *Paracoccus yeeii*-Infektion. Daneben fanden sich unter den restlichen Sequenzen nur Übereinstimmungen mit *Propionibacterium acnes*. Es stellt sich die Frage, ob SHARP-Screening die Fehlerquelle beseitigen kann, durch das Angewiesensein auf die Kultivierung, falsche Erreger zu identifizieren. Hier müssten in zukünftigen Studien, Fälle von Koagulase-negativ getesteten *Staphylokokken* aus klinischen Proben, mit SHARP-Screening auf das Vorhandensein von *Paracoccus yeeii* untersucht werden.

Schließlich wurde in den zusätzlichen PCR-Reaktionen mittels speziesspezifischer Primer, DNA von *Bartonella henselae* nachgewiesen. Es bestand weder der histopathologisch begründete Verdacht auf eine Katzenkratzkrankheit, noch wurde *Bartonella henselae* im SHARP-Screening detektiert. Eine Beteiligung dieses Erregers bleibt bei einer nur 93 %-igen Übereinstimmung in den Kontrolluntersuchungen folglich zweifelhaft.

Im Fall 13 lag bei dem äxillären Lymphknoten eines 26-jährigen Patienten das histologische Bild einer Piringer'schen Lymphadenitis vor. Dabei bestand der Verdacht auf eine floride Phase einer Toxoplasmose. Der Befund stützte sich auf das Vorhandensein einzelner Epitheloidzellcluster und einigen eosinophilen Granulozyten in der interfollikulären Pulpa. Zudem enthielt das Gewebe dieser chronischen bzw. subakuten Lymphadenitis eine deutliche follikuläre Hyperplasie, floride Keimzentren und eine erhebliche sinusoidale B-Zellreaktion. Extrafollikulär zeigte sich eine bunte Pulpa-hyperplasie mit unreifen Plasmoblasten, Plasmazellvorläufern und einer Aktivierung des T-Zellkompartiments. Die Piringer Kuchinka-Lymphadenitis hat eine hohe Spezifität für eine Toxoplasmose.

Toxoplasma gondii ist ein Protozoon und kann mit Hilfe der, in unserer Studie verwendeten, universellen eubakteriellen Primer im SHARP-Screening nicht nachgewiesen werden. Hierzu wären Primer für die Suche nach dem 16S-ähnlichen RNA-Molekül nötig, das in Protozoen enthalten ist [15, 65]. Im Rahmen der zusätzlichen Kontrolluntersuchungen mittels speziesspezifischer Primer konnte allerdings ebenso wenig DNA von *Toxoplasma gondii* nachgewiesen werden. Die Anwesenheit dieses

Parasiten und seine Rolle bei der Entstehung der vorliegenden Lymphadenitis bleiben folglich zweifelhaft. Die folliculäre Hyperplasie und die ausgeprägte sinusoidale B-Zellreaktion schließen jedoch eine bakterielle Beteiligung am Entzündungsvorgang nicht aus. So wurde im SHARP-Screening ein breites Spektrum an Bakterien detektiert, die ebenso die Ursache einer chronischen Lymphadenitis darstellen können. Hierzu gehörten zwei Vertreter aus der Ordnung der *Burkholderia*, eine *Paracoccus*-Spezies, eine *Micrococcus*-Spezies, acht Übereinstimmungen mit *Propionibacterium acnes* und neben einer *Staphylococcus*-Spezies zwei weitere Vertreter aus der Klasse der *Firmicutes* (Tabelle 2).

Weiterhin fand sich bei zwei Sequenzen die Übereinstimmung mit der Klasse der *Bacteroidetes* und bei einer weiteren Sequenz die Homologie zu *Leptotrichia* aus der Klasse der *Fusobacteria*. Als Teil der menschlichen Flora der Mundschleimhaut finden sich *Bacteroidetes* und *Fusobacteria* aber auch häufig im Zusammenhang mit Infektionen und eitrigen Entzündungen des Mund-Rachen-Raumes [16, 17, 78]. Im Rahmen solcher Infektionen kommt es gerade bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen zu Tonsillitis, Parotitis, Abszessen und zervikalen Lymphadenitiden [40]. Aufgrund der retrospektiven Untersuchung des Lymphknotengewebes lagen keine Informationen über eine eventuelle orofaziale Infektion bei unserem Patienten vor. Dennoch erscheint es nicht ungewöhnlich, dass in dem axillären Lymphknoten des 26-jährigen Patienten, im SHARP-Screening diese Erreger nachgewiesen wurden.

Schließlich gab es innerhalb der Klasse der *Alpha-Proteobacteria* auch eine Übereinstimmung mit der *Acetobacter*-Spezies *Roseomonas gilardii rosea*. Diese Spezies wurde in der Literatur bisher in einigen wenigen Studien im Zusammenhang mit malignen hämatologischen Erkrankungen beschrieben. So konnten Elshibly et al. 2005 *Roseomonas gilardii* im Fall einer Bakteriämie, bei einem Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom der B-Zellreihe, nur mit Hilfe einer 16S-rRNA-Analyse nachweisen [29]. In weiteren Studien konnte anhand der 16S-rRNA-Analyse *Roseomonas gilardii* vor allem bei Kindern in Fällen von akuter myeloischer Leukämie detektiert werden [21, 60]. In unserem Fall bestand bei dem 26-jährigen Patienten das histologische Bild einer Piringer'schen Lymphadenitis. Es stellt sich die Frage, ob *Roseomonas gilardii* auch mit anderen (z.B. hämatologischen?) Erkrankungen im Zusammenhang steht und eine chronische oder subakute Entzündung triggern kann. Entsprechend der Aussage der wenigen

bisherigen Studien zu diesem Thema, ist die konventionelle phänotypische Identifikation von *Roseomonas*-Spezies schwierig. Sie kann jedoch durch die molekulargenetische 16S-rRNA-Analyse deutlich verbessert werden [21, 29, 60]. SHARP-Screening gibt in unserem Fall einen wichtigen Hinweis auf eine bakterielle Mitbeteiligung der Lymphadenitis durch *Roseomonas gilardii*.

In der zervikalen Lymphknotenbiopsie einer 20-jährigen Patientin im Fall 14 handelte es sich um eine reaktive Veränderung des Lymphknotenparenchyms. Histologisch zeigten sich eine ausgeprägte Sinuslymphozytose, eine deutliche Pulpahyperplasie und eine regelhaft hohe Proliferation in den Keimzentren. Trotz zahlreicher blastärer Zellformen konnte ein Lymphom ausgeschlossen werden. Im SHARP-Screening zeichnete sich eine *Cyanobacterium*-Spezies mit 67,9 % der untersuchten Sequenzen als deutliche Mehrheit ab. Weiterhin ergab die 16S-rRNA-Analyse unter den 28 sequenzierten Klonen eine Übereinstimmung mit *Janthinobacterium* aus der Ordnung der *Burkholderia* und acht Übereinstimmungen mit *Propionibacterium acnes*. Das Parenchym enthielt keine Ödeme, Mikroabszesse oder granulomatös eitriges Gewebe, wie in den anderen Fällen, in denen *Burkholderia* nachgewiesen wurde. Dennoch gibt der Nachweis von *Janthinobacterium* einen Hinweis auf eine mögliche bakterielle Genese der Lymphadenitis.

In den Kontrolluntersuchungen mit Hilfe speziesspezifischer Primer war der Nachweis von *Chlamydia trachomatis*-DNA positiv. Allerdings besaß im SHARP-Screening keine der untersuchten Sequenzen, wie auch in den Fällen 6 und 8, eine Übereinstimmung mit *Chlamydia trachomatis*. Auch in der histologischen Betrachtung des Lymphknotengewebes bestand kein Verdacht auf ein Lymphgranuloma venereum. Anhand der wenigen Fälle in dieser Studie kann nicht geklärt werden, wie aussagekräftig ein negativer Nachweis für *Chlamydia trachomatis* im SHARP-Screening ist. Die intrazelluläre Lebensweise dieser Bakterien stellt sicherlich besondere Herausforderungen an die 16S-rRNA-Analyse mittels universeller eubakterieller Primer. Eine *Chlamydia trachomatis*-Besiedelung oder Infektion ist bei einer 20-jährigen Patientin nicht auszuschließen.

Das Ergebnis des SHARP-Screenings konnte in diesem Fall die Diagnose eines Lymphgranuloma venereum zwar nicht direkt stützen. Laut einer Studie von McCoy aus

dem Jahre 2006 geben die zahlreich gefundenen *Cyanobakterien* jedoch einen Hinweis auf die Anwesenheit von *Chlamydia trachomatis*. Denn Genomsequenzierungen konnten zeigen, dass *Chlamydia trachomatis* selbst nicht in der Lage ist, die lebensnotwendige Meso-Diaminopimelinsäure (*m*-DAP), eine Vorläufersubstanz in der Synthese von Peptidoglykanen, Koenzymen und Aminosäuren, wie Tryptophan und Lysin, zu bilden [59]. Zur Vollständigkeit des Syntheseweges fehlt den Bakterien eine gewisse Aminotransferase (CT390), welche allerdings in *Cyanobakterien* kürzlich entdeckt wurde [59]. *Chlamydia trachomatis* besitzt die Eigenschaft, sich die fehlende Aminotransferase über die Anwesenheit von *Cyanobakterien* zu erwerben. Das würde bedeuten, dass *Chlamydia trachomatis* in bestimmter Weise an das Vorhandensein von *Cyanobakterien* gebunden ist. Auch wenn SHARP-Screening *Chlamydia trachomatis* nicht direkt nachweisen konnte, gibt *uncultured cyanobacterium clone M4-11* mit 67,9 % der untersuchten Sequenzen einen möglichen Hinweis auf die Anwesenheit von *Chlamydia trachomatis*. SHARP-Screening wäre eine geeignete Methode, um in zukünftigen Studien diese Hypothese an größeren Fallzahlen auf ihre Richtigkeit zu überprüfen.

Im Fall 15 wies das Lymphknotengewebe eine deutliche Sinushistiozytose auf. Der Lymphknoten lag im Abstromgebiet der Arteria mammaria interna. Auch wenn im histologischen Befund kein Verdacht auf eine bakterielle Beteiligung gestellt wurde, kann die ausgeprägte Histiozytose durchaus bakteriell bedingt gewesen sein. Im SHARP-Screening wurde ein breites Spektrum an Bakterien aus verschiedenen Klassen detektiert. Der Nachweis von *Comamonadaceae*, *Propionibacterium*, *Arthrobacter* und *Prevotella* gibt zumindest einen Hinweis auf ein bakteriell verursachendes Agens. Deutlich auffällig war jedoch der Anteil von *Streptomyces* mit 31,6 % der untersuchten Sequenzen (Tabelle 2). Unter allen 15 Fällen wurde *Streptomyces* sonst nur im Fall 9 detektiert. Die beiden Fälle verbindet der initiale Verdacht auf ein Malignom. Im Fall 9 wurde histologisch ein T-Zell-Lymphom vom nicht weiter spezifizierten Typ vermutet. Über das Vorliegen einer chronisch eitrigten Infektion der Haut war in diesem Fall nichts bekannt. Diese Erkrankungen sind allerdings keine Voraussetzungen für eine *Streptomyces*-Infektion. So wurden verschiedene *Streptomyces*-Spezies bereits aus den unterschiedlichsten Lokalisationen isoliert, zu denen auch Abszesse, Lungeninfiltrationen, Perikarditiden und Hautbiopsien zählen [27]. In der Literatur wird gerade bei Im-

munsupprimierten, wie AIDS-Patienten, ein gehäuftes Auftreten von *Streptomyces* und *Nocardia* in Lymphadenitiden beobachtet [28, 44]. Da es sich in diesem Fall um einen 78-jährigen Patienten mit fraglicher Tumorerkrankung, eventuell auch anderer Lokalisation handelte, ist eine Immunsuppression mit Neutropenie nicht gänzlich auszuschließen. Mit Hilfe von SHARP-Screening wurde in den beiden einzigen Fällen, mit dem Verdacht auf ein Malignom, *Streptomyces* nachgewiesen.

Unter den 19 untersuchten Sequenzen fanden sich auch zwei Homologien zu *Stenotrophomonas maltophila*. Dieser Vertreter aus der Klasse der *Gamma-Proteobacteria* hat sich in den letzten Jahren durch die Entwicklung multiresistenter Stämme zu einem wichtigen nosokomialen Keim entwickelt [8, 35]. Eine Infektion mit *Stenotrophomonas maltophila* betrifft besonders bei stark immunsupprimierten und Mukoviszidosepatienten den Atemtrakt und kann in manchen Fällen zu Lungenblutungen führen. Weiterhin kann es zu septischer Arthritis, Spondylodiszitis und seltener posttraumatisch, postoperativ oder bei chronischem Ulcusleiden auch zu Hautbeteiligung kommen [8, 35, 75]. In einer Studie von Marques da Silva et al. 2006 wurde mittels universeller eubakterieller Primer eine 16S-rRNA-Analyse von Gefäßwänden aus Aortenaneurysmata durchgeführt. In dem gefundenen bakteriellen Spektrum gehörte *Stenotrophomonas maltophila* zu den häufigsten nachgewiesenen Bakterien [58]. Weiterhin fanden sich auch *Propionibacterium acnes*, *Comamonadaceae*, sowie andere Vertreter der *Burkholderia* und *Prevotella* aus der Klasse der *Fusobacteria*. Dasselbe Erregerspektrum wurde in vergleichbarer anteilmäßiger Zusammensetzung in unserem Lymphknoten detektiert (Tabelle 2). Über klinische Angaben des Patienten war leider nichts bekannt.

Insgesamt wurden im Fall 15, mit dem Nachweis von *Streptomyces* und *Stenotrophomonas maltophila* zwei Erreger gefunden, die typischerweise bei immunsupprimierten Patienten und im Zusammenhang mit Malignomen vorkommen. Das hohe Alter des Patienten und der initiale Verdacht auf ein tumoröses Geschehen prästernal lassen eine Immunsuppression möglich erscheinen. Mit Hilfe von SHARP-Screening könnte in künftigen Studien die bakterielle Diversität bei Immunsuppression und Malignomen weiter untersucht werden. Denn dieses Verfahren ist in der Lage, auch initial schwer nachweisbare Erreger, wie *Streptomyces* und *Stenotrophomonas*, zu detektieren und die gesamte bakterielle Diversität im Lymphknoten zu erfassen.

Zusammenfassend hat sich SHARP-Screening in unserer Studie als geeignete Methode herausgestellt, das Erregerspektrum in formalinfixierten und paraffineingebetteten Lymphknoten zu erfassen. Im Vergleich zur Studie von Adam et al. 2008, in der die mikrobiologische Diversität pulmonaler MALT-Typ-Lymphome mit Hilfe von SHARP-Screening untersucht wurde, stammten die Lymphknoten in dieser Studie aus verschiedenen Regionen des Körpers. Das Ziel war die Erfassung des bakteriellen Spektrums in entzündeten Lymphknotengeweben ungeklärter Ursache unterschiedlicher Lokalisationen. In allen 15 Fällen konnte bakterielle DNA nachgewiesen werden, so dass eine Genbank von insgesamt 400 Sequenzen entstand. Durch die molekulargenetische Identifikation ergab sich für jeden Fall einzeln betrachtet ein Spektrum verschiedener Bakterien, das im Vergleich mit den histologischen Befunden und Verdachtsdiagnosen interpretiert werden musste. Dabei hat SHARP-Screening zum Beispiel mit dem Nachweis von *Gluconacetobacter sacchari*, als potentieller Erreger einer septischen Granulomatose einen interessanten Einblick in die mikrobiologische Flora und eine alternative Differentialdiagnose zur histologisch vermuteten Katzenkratzkrankheit aufgezeigt [37]. Weiterhin ergaben sich in nekrotischen und eitrigen Geweben Erreger, wie *Rhodococcus erythropolis*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Aerococcus urinae* und *Kocuria*. Ein immer wieder auftretender Erreger bei dem gleichen histologischen Bild war *Comamonadaceae* bzw. *Janthinobacterium*, beide aus der Ordnung der *Burkholderia*. Zu diesem histologischen Befund zählten Ödeme, Nekrosen, granulomatöse eitrig Veränderungen und eine ausgeprägte Sinushistiozytose im Lymphknotengewebe. SHARP-Screening wies in zwei Fällen auch *Paracoccus yeeii* nach, eine Spezies, die mit klassischen Methoden häufig übersehen wird, in Lymphknoten jedoch eine pathogene Rolle spielen kann [23, 33]. In drei Fällen könnte aufgrund des histologischen Befundes eine Immunsuppression oder sogar ein Malignom vorgelegen haben. Im SHARP-Screening wurden nur in diesen Fällen *Streptomyces*, *Roseomonas gilardii rosea* und *Stenotrophomonas maltophilia* nachgewiesen. In der Literatur kommen diese Erreger häufig bei immunsupprimierten Patienten und malignen hämatologischen Erkrankungen vor [8, 21, 28, 29, 35, 44, 60]. Bei dem Verdacht auf ein Lymphgranuloma venerum wurde eine *Cyanobacterium*-Spezies detektiert, die es *Chlamydia trachomatis* erst möglich macht, den eigenen Aminosäurestoffwechsel zu betreiben [59].

Durch die Ergebnisse dieser Studie sind neue Fragestellungen entstanden, die mit Hilfe von SHARP-Screening untersucht werden können. Da mit dieser Methode die molekulargenetische Untersuchung formalin-fixierter Lymphknoten möglich ist, besitzt sie einen deutlichen Vorteil gegenüber herkömmlichen Methoden. Dennoch gibt es auch Nachteile und Verbesserungsmöglichkeiten zur Optimierung der Ergebnisse. Zum einen birgt die hohe Sensitivität zur Erfassung geringster DNA-Mengen auch gleichzeitig eine Gefahr. Denn im Vergleich zu mikrobiologischen Nachweisverfahren, besteht während der verschiedenen Arbeitsschritte, eine noch größere Kontaminationsgefahr. Bereits bei der Biopsie ist auf eine besonders sterile Gewebsentnahme zu achten. Weiterhin darf während der DNA-Gewinnung aus dem Paraffinblock und vor allem vor und nach den PCR-Reaktionen keine DNA-Kontamination entstehen. Die DNA eines einzigen Bakteriums würde während der PCR millionenfach vervielfältigt werden. Wenn es sich dabei nicht um einen typischen Hautkeim handelt, wäre nach der phylogenetischen Auswertung eine Unterscheidung zwischen Kontamination und tatsächlichen Erregern schwierig. Es gibt zahlreiche zusätzliche Maßnahmen zur Kontaminationsprävention, die einer Verunreinigung erfolgreich vorbeugen können und in unserer Studie nicht alle umgesetzt wurden (siehe Fall 2/3).

Die ersten PCR-Reaktionen waren in den einzelnen Fällen unterschiedlich erfolgreich. Dafür gibt es verschiedene Gründe. Fulvinsäure, Huminsäure und Exopolysaccharide sind Beispiele für Inhibitoren, die im PCR-Ansatz enthalten sein können und nur schwer zu entfernen sind [36]. Für die Ursachensuche einer erfolglosen PCR existieren Möglichkeiten, die Anwesenheit von Inhibitoren nachzuweisen. So hätten zusätzliche PCR-Ansätze einbezogen werden können, die Primer für das humane β -Globulin, den 215 bp-langen humanen Marker D3S3332 oder das 242 bp-lange HLA-Fragment-DQA-Gen enthalten [20, 24, 30, 68]. Diese Ansätze sollten mit extrahierter DNA aus menschlichem Gewebe immer ein positives Ergebnis erzielen, falls die Amplifikation nicht durch Inhibitoren gehemmt wird. In unserer Studie wurde auf diese Kontrollansätze in den PCR-Reaktionen verzichtet. Allerdings wurden bei den erfolglosen Fällen Verdünnungsreihen der extrahierten DNA hergestellt (siehe Kapitel 2.2.4). Dadurch konnte eine signifikante Verringerung der hemmenden Wirkung der enthaltenen Inhibitoren erreicht werden. Die DNA-Menge reichte für ein positives Ergebnis in der PCR dennoch aus [7].

Für die Erstellung der Genbank der bakteriellen 16S-rRNA-Gene wurde im Vorfeld vereinbart, von jedem der 15 Fälle 48 Klone mit dem richtigen Insert aus der Colony-PCR auszuwählen und im RFLP-Verdau zu vergleichen. Aufgrund der unterschiedlichen Erfolge in der Ausgangs-PCR, nested-PCR und der Transformation in *E. coli*, mussten die einzelnen Schritte in manchen Fällen mehrmals wiederholt werden, bis genügend Klone vorhanden waren. Schließlich wurden teilweise sogar mehr als 48 Klone für die Analyse der Bandenmuster des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus herangezogen. Dieses Vorgehen verursacht einen Fehler, der zu Problemen beim Vergleich der absoluten Häufigkeiten der einzelnen Bakterien der Fälle untereinander führt. Allerdings ändert sich dadurch nicht der relative Anteil am Gesamtspektrum und die quantitative Aussagekraft der Ergebnisse bleibt erhalten.

Desweiteren wurde bereits auf den Nachteil der Verwendung der universellen eubakteriellen Primer *27f* und *1492r* für die Ausgangs-PCR und *27f-b* und *1406r-b* für die nested PCR hingewiesen. Diese Primer ermöglichen zwar die Amplifikation des 16S-rRNA-Gens in seiner ganzen Länge und damit eine eindeutigere Erregeridentifikation. Da die DNA in fixierten Lymphknotengeweben allerdings mit Alkohol extrahiert wird, ist die Wahrscheinlichkeit fragmentierter und nicht vollständiger Gene größer, als bei frischem oder tiefgefrorenem Material [7, 24, 57, 66, 70]. In einer zukünftigen Studie könnte eine vergleichende Analyse des Erregerspektrums mit der Verwendung von Primern durchgeführt werden, welche zum einen die gesamte Länge des 16S-rRNA-Gens erfassen, und zum anderen mit Hilfe von Primern, welche nur kleine Abschnitte des Gens amplifizieren (z.B. *27f* / *907r*, *539f* / *1099r*, *926f* / *1525r*). Für die Detektion geringer DNA-Mengen existiert weiterhin die Möglichkeit, in einer semi-nested-PCR das 16S-rRNA-Gen in Teilen zu amplifizieren und hinterher zum gesamten Gen zusammenzusetzen [24].

Im Moment besteht noch das Problem, dass keiner der derzeitig verfügbaren Primer wirklich universell ist und garantieren kann, alle Prokaryonten zu amplifizieren. Trotz der hochkonservierten Abschnitte des 16S-rRNA-Gens, ist das Primer-Mismatch eine bekannte Problematik bei der Verwendung universeller eubakterieller Primer [9, 32]. Die Folge ist, dass auch im Rahmen des SHARP-Screenings die mikrobiologische Diversität in einer so komplexen Mikroumgebung, wie in einem Lymphknoten nicht zu 100 % erfasst werden kann. Auch wenn es den perfekten universellen Primer noch nicht

gibt, kann keine andere Methode das bakterielle Erregerspektrum bisher so genau erfassen, wie es im SHARP-Screening möglich ist.

Zu Beginn wurde schon auf die Schwierigkeit bezüglich präferentieller Amplifikation hingewiesen. De Hertogh et al. beschrieben diese Problematik in ihrer Studie 2006. Bei der 16S-rRNA-basierten Heterogenitätsanalyse ergab sich das Problem, dass typische Erreger wie *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium paratuberculosis* oder verschiedene Spezies von *Yersinia* nur selten entdeckt wurden. Andere Bakterien waren so häufig, dass die erwarteten Erreger dabei anteilmäßig unterrepräsentiert waren [24]. Auch in unserer Studie konnte bei dem mehrfachen histologischen Verdacht auf eine Katzenkratzkrankheit in keinem Fall *Bartonella henselae* im SHARP-Screening nachgewiesen werden. Die verschiedenen Ursachen wurden bereits besprochen. Da in jedem dieser Fälle allerdings auch zahlreiche andere Bakterien detektiert wurden, muss die Möglichkeit einer präferentiellen Amplifikation berücksichtigt werden. Ein Grund hierfür könnte eine geringe Anzahl von Kopien spezifischer Sequenzen von *Bartonella henselae* sein oder wie bei *Chlamydia trachomatis*, das intrazelluläre Wachstum (siehe Fall 6). Inhibitoren im PCR-Ansatz würden diesen Effekt noch verstärken [36]. Eine Möglichkeit der Abhilfe dieses Problems ist laut De Hertogh et al. die Verwendung speziesspezifischer Primer, was in unserer Studie keine Alternative darstellte [24]. Schon 1992 gab es eine Empfehlung von Tsai und Olsen, geringe Konzentrationen von Mikroorganismen durch adäquate DNA-Extraktion und Amplifikation zu detektieren. Dieses Thema wurde von Frank et al. und Gonzalez et al. in den vergangenen Jahren noch einmal aufgegriffen und weiterverfolgt. Die Wahl der Annealing-Temperatur, der Template-Konzentration und der Zyklusanzahl sollen einen signifikanten Effekt auf die Fehler bei selektiver Amplifikation haben. Weiterhin beeinflussen die Genomgröße, die Anzahl der 16S-rRNA-Genkopien und der G/C-Gehalt die PCR-Produkt-Ratios. Das Primer-Annealing ist von der Pufferzusammensetzung, der Primerkonzentration, der Mg^{2+} -Konzentration und der Annealing-Temperatur abhängig. So soll bei der Verwendung des Primers 27f eine niedrige Annealing-Temperatur zur signifikanten Senkung präferentieller Amplifikation führen. Die Zyklusanzahl kann dabei trotzdem hoch sein, ohne dass die Spezifität der Amplifikation sinkt [32, 36]. Weiterhin gibt es die Möglichkeit einer vorausgehenden speziellen PCR-Reaktion. Dabei handelt es sich um eine Amplifikation des, nach der DNA-Extraktion gesamten enthaltenen Genoms (WGA:

Whole Genome Amplification). Unter Verwendung der Φ 29 DNA-Polymerase und „random hexamer primers“ wird dadurch die initiale Anzahl der Gen-Kopien in einer isothermen Reaktion erhöht und Inhibitoren der PCR-Reaktion zusätzlich aufgelöst. An diesen Schritt würde sich die normale Ausgangs-PCR anschließen [36].

Die Amplifikation der extrahierten DNA aus den Lymphknoten während der Ausgangs- und nested-PCR enthält ein weiteres Risiko. Denn zwischen den DNA-Fragmenten kann es zum Austausch von Teilen des 16S-rRNA-Gens kommen. Die Folge dieser chimären DNA-Produkte wären Sequenzen verschiedener Bakterien, die bei der phylogenetischen Analyse nicht existierende Spezies ergeben [26]. So stellt sich die Frage, ob die nachgewiesenen nicht kultivierten Bakterien *clone P5D18-494*, *clone RL387_aao89h04* und *clone rRNA 089* neue Erreger mit pathogener Bedeutung darstellen, oder aber die Folge chimärer DNA-Bildung während der Amplifikation sind. Die Fälle 11, 12 und 13 enthielten zudem jeweils eine Sequenz, die gleich hohe Verwandtschaftsgrade zu mehreren Klassen aus *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* und *Delta-Proteobacteria* besaßen. Diese Sequenzen konnten folglich nicht eindeutig zugeordnet werden und besaßen die höchste Übereinstimmung mit weiteren unkultivierten Bakterien. Zur Vermeidung dieses Problems könnten in zukünftigen Studien spezielle Programme, wie Bellerophon und Chimera-Check verwendet werden, um chimäre DNA-Produkte zu analysieren und herauszufiltern.

Die Selektion der richtigen Klone nach der Transformation mit Hilfe des blue-white-Screenings hat zur Folge, dass zum Teil Klone mit dem falschen Insert ausgewählt werden. In diesem Screening wird X-Gal dazu verwendet, um bei Klonen das Vorhandensein der β -Galaktosidase zu prüfen. β -Galaktosidase wird durch das lacZ-Gen kodiert und spaltet X-Gal in Galaktose und 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindol. Dieses wird zu 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo oxidiert, einem unlöslichen blauen Farbstoff. IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid) wird ebenfalls dem Agar zugesetzt. Es ist ein Aktivator der β -Galaktosidase, d.h. es triggert die Transkription des lac-Operon, indem es den lac-Repressor bindet und inhibiert. *E. coli* produzieren keine β -Galaktosidase, da ihnen das lacZ-Gen fehlt. Beim Klonieren wird in die *E. coli*-Bakterien ein Plasmid eingeschleust, das das lacZ-Gen enthält. Befindet sich nun im lacZ-Gen des Plasmids ein Insert, wird das Gen unterbrochen und β -Galaktosidase kann nicht gebildet werden. Bakterien mit einem Plasmid ohne Insert besitzen ein intaktes

lacZ-Gen und können β -Galaktosidase exprimieren. Es entsteht der blaue Farbstoff. Allerdings ist die Trennung zwischen weißen und blauen Klonen nach der Transformation nicht immer eindeutig. So kann es sein, dass bei zu kurzer Inkubationszeit die Klone ohne Insert noch nicht den blauen Farbstoff gebildet haben und weiß aussehen. Diese würden dann fälschlicherweise für die Colony-PCR selektiert werden, obwohl der blaue Farbstoff wenige Stunden später zu erkennen wäre. Weiterhin existieren sogenannte „Bulls eyes“, die beispielsweise durch Mischkolonien entstehen und eine hellblaue Farbe besitzen. Bei solchen Klonen kann man sich über das richtige Insert nicht sicher sein. Die Folge wären bei der Colony-PCR dann PCR-Produkte mit Doppelbanden, die sich für den RFLP-Verdau nur bedingt eignen.

Schließlich kann aus dieser Studie das Fazit gezogen werden, dass sich Histologie und SHARP-Screening gegenseitig gut ergänzen. Im klinischen Alltag könnte SHARP-Screening eindeutige Hinweise auf den verursachenden Erreger einer Erkrankung geben, wo herkömmliche Methoden, wie die Anlage von Kulturen versagen. Bei einem histologisch begründeten Verdacht auf eine bakterielle Infektion, ohne dass ein Erreger als Ursache identifiziert wurde, könnte durch das Screening der gesamten bakteriellen Diversität ein bestimmter Erreger ausgemacht werden. Durch die Erfassung der ganzen mikrobiologischen Flora ist es auch möglich, im Vergleich zum Screening mit speziesspezifischen Primern, neue Krankheitserreger zu entdecken und dann gezielt zu behandeln. Bisher haben es die bakterielle Kultivierung und phänotypische Charakterisierung längst nicht geschafft, alle humanpathogenen Keime zu identifizieren. Moderne und schnelle Methoden sollten bei der Erforschung neuer Infektionskrankheiten helfen und im klinischen Alltag Einzug halten.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie haben wir mit Hilfe von SHARP-Screening, einer 16S-rRNA-basierten Heterogenitäts- und phylogenetischen Analyse, die mikrobielle Diversität in entzündlichen Lymphadenitiden ohne vorherige Kenntnis der jeweiligen Erreger an einer Serie von 15 Lymphknoten untersucht. Die Methode wurde erstmals auf diese Fragestellung angewandt. Sie konnte für die Verwendung von paraffineingebettetem Gewebe adaptiert werden, so dass auch Gewebeproben analysiert werden konnten, von denen kein Gefriermaterial zur Verfügung stand und die in Routineverfahren eingebettet und nach Standardmethoden gefärbt wurden. SHARP-Screening beinhaltet zwei komplementäre Schritte: Zuerst erfolgte die Erstellung einer Genbank aller bakteriellen Gene aus der gesamten extrahierten DNA des analysierten Gewebes durch gezielte Amplifikation des 16S-rRNA-Gens mittels universeller eubakterieller Primer. Als zweiter Schritt wurde nach der Transformation mittels Analyse des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus die Selektion der jeweiligen unterschiedlichen Phylotypen der enthaltenen 16S-rRNA-Gene durchgeführt (insgesamt 400). Nach der Sequenzierung wurden die 16S-rRNA-Gene durch den Vergleich mit bekannten bakteriellen Sequenzen mit Hilfe des „Basic-Local-Alignment-Search-Tool“ (BLAST) identifiziert.

SHARP-Screening hat sich als geeignete Methode zur Analyse der gesamten, in einer Gewebeprobe enthaltenen bakteriellen Flora erwiesen. Dabei wurden zum Teil andere Erreger gefunden, als aus dem histologischen Bild vermutet wurden. So konnte zum Beispiel mit dem Nachweis von *Gluconacetobacter sacchari*, als potentieller Erreger einer septischen Granulomatose, eine alternative Differentialdiagnose zur histologisch vermuteten Katzenkratzkrankheit aufgezeigt werden. Darüber hinaus konnten auch gleichartige histologische Bilder bei dem gleichen identifizierten Erreger beobachtet werden. Zum Beispiel konnten im Zusammenhang mit dem Auftreten von Ödemen, Nekrosen, granulomatös eitrigen Veränderungen und einer ausgeprägten Sinus-histiozytose im Lymphknotengewebe immer wieder *Comamonadaceae* bzw. *Janthinobacterium* nachgewiesen werden. Oft zeigte sich nicht ein einzelner Erreger der Lymphadenitis, sondern ein ganzes Spektrum, wobei aus dem Vorhandensein der 16S-

rRNA nicht auf das Vorhandensein vitaler Erreger geschlossen werden kann. Dennoch erlaubt die Häufigkeit der entsprechenden Klone eine semiquantitative Abschätzung der Bedeutung des jeweiligen Erregers. So wies SHARP-Screening auch Homologien zu *Paracoccus yeeii* nach. Eine Spezies, die mit klassischen Methoden häufig übersehen wird, die in Lymphknoten jedoch eine pathogene Rolle spielen kann. Im Zusammenhang mit dem histologischen Verdacht auf ein Malignom wurden in einigen Fällen *Streptomyces*, *Roseomonas gilardii rosea* und *Stenotrophomonas maltophilia* nachgewiesen, die auch in der Literatur häufig bei immunsupprimierten Patienten vorkommen. Bei dem Verdacht auf ein Lymphgranuloma venerum wurde eine *Cyanobacterium*-Spezies detektiert, die es nach Literaturangaben *Chlamydia trachomatis* erst ermöglicht, den eigenen Aminosäurestoffwechsel zu betreiben.

Insgesamt dürften vom SHARP-Screening noch weitere tiefgreifende Erkenntnisse der bakteriellen Diversität und kausaler Erregerassoziationen in Erkrankungen des lymphatischen Systems zu erwarten sein.

6 Literaturverzeichnis

- [1] **Adam P, Gernert C, Schmitt S, Haralambieva E, Ott G, Muller-Hermelink H K and Hentschel U** (2008): *[The spectrum of microbiological agents causing pulmonary MALT-type lymphomas : A 16S rRNA-based analysis of microbial diversity.]*. Pathologe.
- [2] **Aepinus C, Adolph E, von Eiff C, Podbielski A and Petzsch M** (2008): *Kytococcus schroeteri: a probably underdiagnosed pathogen involved in prosthetic valve endocarditis*. Wien Klin Wochenschr, 120(1-2): p. 46-49.
- [3] **Albay D T and Mathisen G E** (2008): *Head and neck manifestations of lymphogranuloma venereum*. Ear Nose Throat J, 87(8): p. 478-480.
- [4] **Altuntas F, Yildiz O, Eser B, Gundogan K, Sumerkan B and Cetin M** (2004): *Catheter-related bacteremia due to Kocuria rosea in a patient undergoing peripheral blood stem cell transplantation*. BMC Infect Dis, 4(1): p. 62.
- [5] **Amann R I, Ludwig W and Schleifer K H** (1995): *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*. Microbiol Rev, 59(1): p. 143-169.
- [6] **Arda B, Aydemir S, Yamazhan T, Hassan A, Tunger A and Serter D** (2003): *Comamonas testosteroni meningitis in a patient with recurrent cholesteatoma*. APMIS, 111(4): p. 474-476.
- [7] **Avidor B, Kletter Y, Abulafia S, Golan Y, Ephros M and Giladi M** (1997): *Molecular diagnosis of cat scratch disease: a two-step approach*. J Clin Microbiol, 35(8): p. 1924-1930.
- [8] **Aydemir C, Aktas E, Eldes N, Kutsal E, Demirel F and Ege A** (2008): *Community-acquired infection due to Stenotrophomonas maltophilia: a rare cause of septic arthritis*. Turk J Pediatr, 50(1): p. 89-90.
- [9] **Baker G C, Smith J J and Cowan D A** (2003): *Review and re-analysis of domain-specific 16S primers*. J Microbiol Methods, 55(3): p. 541-555.
- [10] **Baroni M R, Norona M, Ronchi S and Mayoral C** (2004): *Necrotizing lymphadenitis caused by Nocardia asteroides in a healthy girl*. Rev Argent Microbiol, 36(2): p. 75-77.
- [11] **Bartolome J, Roca M J, Marcote E and Moreno R** (1995): *Corynebacterium pseudotuberculosis adenitis in a shepherd*. Med Clin (Barc), 104(18): p. 699-701.
- [12] **Basaglia G, Carretto E, Barbarini D, Moras L, Scalone S, Marone P and De Paoli P** (2002): *Catheter-related bacteremia due to Kocuria kristinae in a patient with ovarian cancer*. J Clin Microbiol, 40(1): p. 311-313.
- [13] **Ben-Ami R, Navon-Venezia S, Schwartz D and Carmeli Y** (2003): *Infection of a ventriculoatrial shunt with phenotypically variable Staphylococcus epidermidis masquerading as polymicrobial bacteremia due to various coagulase-negative Staphylococci and Kocuria varians*. J Clin Microbiol, 41(6): p. 2444-2447.
- [14] **Bockemuhl J and Roggentin P** (2004): *[Intestinal yersiniosis. Clinical importance, epidemiology, diagnosis, and prevention]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 47(7): p. 685-691.
- [15] **Bogdanov A A, Chichkova N V, Kopylov A M, Mankin A S and Skripkin E A** (1988): *Surface topography of ribosomal RNA*. Methods Enzymol, 164: p. 440-456.
- [16] **Brook I** (2003): *Acute bacterial suppurative parotitis: microbiology and management*. J Craniofac Surg, 14(1): p. 37-40.
- [17] **Brook I and Frazier E H** (1998): *Microbiology of cervical lymphadenitis in adults*. Acta Otolaryngol, 118(3): p. 443-446.
- [18] **Castagnola E, Tasso L, Conte M, Nantron M, Barretta A and Giacchino R** (1994): *Central venous catheter-related infection due to Comamonas acidovorans in a child with non-Hodgkin's lymphoma*. Clin Infect Dis, 19(3): p. 559-560.
- [19] **Chanet V, Romaszko J P, Rolain J M and Beytout J** (2005): *Propionibacterium acnes adenitis*. Presse Med, 34(14): p. 1005-1006.
- [20] **Chiba M, Kono M, Hoshina S, Komatsu M, Kitagawa Y, Iizuka M and Watanabe S** (2000): *Presence of bacterial 16S ribosomal RNA gene segments in human intestinal lymph follicles*. Scand J Gastroenterol, 35(8): p. 824-831.
- [21] **Christakis G B, Perlorentzou S, Alexaki P, Megalakaki A and Zarkadis I K** (2006): *Central line-related bacteraemia due to Roseomonas mucosa in a neutropenic patient with acute myeloid leukaemia in Piraeus, Greece*. J Med Microbiol, 55(Pt 8): p. 1153-1156.

- [22] **Cooper G R, Staples E D, Iczkowski K A and Clancy C J** (2005): *Comamonas (Pseudomonas) testosteroni endocarditis*. Cardiovasc Pathol, 14(3): p. 145-149.
- [23] **Daneshvar M I, Hollis D G, Weyant R S, Steigerwalt A G, Whitney A M, Douglas M P, Macgregor J P, Jordan J G, Mayer L W, Rassouli S M, Barchet W, Munro C, Shuttleworth L and Bernard K** (2003): *Paracoccus yeii sp. nov. (formerly CDC group EO-2), a novel bacterial species associated with human infection*. J Clin Microbiol, 41(3): p. 1289-1294.
- [24] **De Hertogh G, Aerssens J, de Hoogt R, Peeters P, Verhasselt P, Van Eyken P, Ectors N, Vermeire S, Rutgeerts P, Coulie B and Geboes K** (2006): *Validation of 16S rDNA sequencing in microdissected bowel biopsies from Crohn's disease patients to assess bacterial flora diversity*. J Pathol, 209(4): p. 532-539.
- [25] **Dinubile M J** (2008): *Nodular lymphangitis: a distinctive clinical entity with finite etiologies*. Curr Infect Dis Rep, 10(5): p. 404-410.
- [26] **Drancourt M, Bollet C, Carlizot A, Martelin R, Gayral J P and Raoult D** (2000): *16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates*. J Clin Microbiol, 38(10): p. 3623-3630.
- [27] **Dunne E F, Burman W J and Wilson M L** (1998): *Streptomyces pneumonia in a patient with human immunodeficiency virus infection: case report and review of the literature on invasive streptomyces infections*. Clin Infect Dis, 27(1): p. 93-96.
- [28] **el Hassan A M and Mahgoub E S** (1972): *Lymph node involvement in mycetoma*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 66(1): p. 165-169.
- [29] **Elshibly S, Xu J, McClurg R B, Rooney P J, Millar B C, Alexander H D, Kettle P and Moore J E** (2005): *Central line-related bacteremia due to Roseomonas mucosa in a patient with diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma*. Leuk Lymphoma, 46(4): p. 611-614.
- [30] **Fenollar F, Roux V, Stein A, Drancourt M and Raoult D** (2006): *Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections*. J Clin Microbiol, 44(3): p. 1018-1028.
- [31] **Flanagan J L, Brodie E L, Weng L, Lynch S V, Garcia O, Brown R, Hugenholtz P, DeSantis T Z, Andersen G L, Wiener-Kronish J P and Bristow J** (2007): *Loss of bacterial diversity during antibiotic treatment of intubated patients colonized with Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol, 45(6): p. 1954-1962.
- [32] **Frank J A, Reich C I, Sharma S, Weisbaum J S, Wilson B A and Olsen G J** (2008): *Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes*. Appl Environ Microbiol, 74(8): p. 2461-2470.
- [33] **Funke G, Frodl R and Sommer H** (2004): *First comprehensively documented case of Paracoccus yeii infection in a human*. J Clin Microbiol, 42(7): p. 3366-3368.
- [34] **Gelenko A M** (1981): *[Morphological changes in the lymph nodes in benign lymphoreticulosis (cat-scratch disease)]*. Arkh Patol, 43(11): p. 78-81.
- [35] **German V, Tsimpoukas F, Goritsas C and Ferti A** (2007): *Spondylodiscitis due to Stenotrophomonas maltophilia*. Eur J Intern Med, 18(6): p. 501-503.
- [36] **Gonzalez J M, Portillo M C and Saiz-Jimenez C** (2005): *Multiple displacement amplification as a pre-polymerase chain reaction (pre-PCR) to process difficult to amplify samples and low copy number sequences from natural environments*. Environ Microbiol, 7(7): p. 1024-1028.
- [37] **Greenberg D E, Ding L, Zelazny A M, Stock F, Wong A, Anderson V L, Miller G, Kleiner D E, Tenorio A R, Brinster L, Dorward D W, Murray P R and Holland S M** (2006): *A novel bacterium associated with lymphadenitis in a patient with chronic granulomatous disease*. PLoS Pathog, 2(4): p. e28.
- [38] **Gul M, Ciragil P, Bulbuloglu E, Aral M, Alkis S and Ezberci F** (2007): *Comamonas testosteroni bacteremia in a patient with perforated acute appendicitis. Short communication*. Acta Microbiol Immunol Hung, 54(3): p. 317-321.
- [39] **Guttman P H** (1955): *Pathology of cat-scratch disease*. Calif Med, 82(1): p. 25-31.
- [40] **Hagelskjaer Kristensen L and Prag J** (2008): *Localised Fusobacterium necrophorum infections: a prospective laboratory-based Danish study*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 27(8): p. 733-739.
- [41] **Hazra R, Floyd M M, Sloutsky A and Husson R N** (2001): *Novel mycobacterium related to Mycobacterium triplex as a cause of cervical lymphadenitis*. J Clin Microbiol, 39(4): p. 1227-1230.

- [42] **Hemond V, Rosenstingl S, Auriault M L, Galanti M J and Gatifosse M** (2008): *Axillary lymphadenitis due to Corynebacterium pseudotuberculosis in a 63-year-old patient*. Med Mal Infect.
- [43] **Hentschel U, Hopke J, Horn M, Friedrich A B, Wagner M, Hacker J and Moore B S** (2002): *Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans*. Appl Environ Microbiol, 68(9): p. 4431-4440.
- [44] **Holtz H A, Lavery D P and Kapila R** (1985): *Actinomycetales infection in the acquired immunodeficiency syndrome*. Ann Intern Med, 102(2): p. 203-205.
- [45] **Hoogkamp-Korstanje J A** (1996): [*Yersinia infections*]. Ned Tijdschr Geneesk, 140(3): p. 128-130.
- [46] **Houpikian P and Raoult D** (2002): *Traditional and molecular techniques for the study of emerging bacterial diseases: one laboratory's perspective*. Emerg Infect Dis, 8(2): p. 122-131.
- [47] **Hughenoltz P, Goebel B M and Pace N R** (1998): *Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity*. J Bacteriol, 180(18): p. 4765-4774.
- [48] **Ishige I, Eishi Y, Takemura T, Kobayashi I, Nakata K, Tanaka I, Nagaoka S, Iwai K, Watanabe K, Takizawa T and Koike M** (2005): *Propionibacterium acnes is the most common bacterium commensal in peripheral lung tissue and mediastinal lymph nodes from subjects without sarcoidosis*. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis, 22(1): p. 33-42.
- [49] **Join-Lambert O F, Ouache M, Canioni D, Beretti J L, Blanche S, Berche P and Kayal S** (2006): *Corynebacterium pseudotuberculosis necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient*. Pediatr Infect Dis J, 25(9): p. 848-851.
- [50] **Kumar T S, Scott J X, Viswanathan S, Agarwal I, Raj P M and Lalitha M K** (2005): *Cervicofacial nocardiosis in an immunocompetent child*. Acta Paediatr, 94(9): p. 1342-1343.
- [51] **Le Moal G, Paccalin M, Breux J P, Roblot F, Roblot P and Becq-Giraudon B** (2001): *Central venous catheter-related infection due to Comamonas testosteroni in a woman with breast cancer*. Scand J Infect Dis, 33(8): p. 627-628.
- [52] **Levenga H, Donnelly P, Blijlevens N, Verweij P, Shirango H and de Pauw B** (2004): *Fatal hemorrhagic pneumonia caused by infection due to Kytococcus sedentarius--a pathogen or passerger?* Ann Hematol, 83(7): p. 447-449.
- [53] **Ley R E, Turnbaugh P J, Klein S and Gordon J I** (2006): *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity*. Nature, 444(7122): p. 1022-1023.
- [54] **Lopez-Menchero R, Siguenza F, Caridad A, Alonso J C and Ferreruela R M** (1998): *Peritonitis due to Comamonas acidovorans in a CAPD patient*. Perit Dial Int, 18(4): p. 445-446.
- [55] **Ma E S, Wong C L, Lai K T, Chan E C, Yam W C and Chan A C** (2005): *Kocuria kristinae infection associated with acute cholecystitis*. BMC Infect Dis, 5(1): p. 60.
- [56] **Magee J T, Burnett I A, Hindmarch J M and Spencer R C** (1990): *Micrococcus and Stomatococcus spp. from human infections*. J Hosp Infect, 16(1): p. 67-73.
- [57] **Margolis B, Kuzu I, Herrmann M, Raible M D, Hsi E and Alkan S** (2003): *Rapid polymerase chain reaction-based confirmation of cat scratch disease and Bartonella henselae infection*. Arch Pathol Lab Med, 127(6): p. 706-710.
- [58] **Marques da Silva R, Caugant D A, Eribe E R, Aas J A, Lingaas P S, Geiran O, Tronstad L and Olsen I** (2006): *Bacterial diversity in aortic aneurysms determined by 16S ribosomal RNA gene analysis*. J Vasc Surg, 44(5): p. 1055-1060.
- [59] **McCoy A J, Adams N E, Hudson A O, Gilvarg C, Leustek T and Maurelli A T** (2006): *L,L-diaminopimelate aminotransferase, a trans-kingdom enzyme shared by Chlamydia and plants for synthesis of diaminopimelate/lysine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 103(47): p. 17909-17914.
- [60] **McLean T W, Rouster-Stevens K, Woods C R and Shetty A K** (2006): *Catheter-related bacteremia due to Roseomonas species in pediatric hematology/oncology patients*. Pediatr Blood Cancer, 46(4): p. 514-516.
- [61] **Mills A E, Mitchell R D and Lim E K** (1997): *Corynebacterium pseudotuberculosis is a cause of human necrotising granulomatous lymphadenitis*. Pathology, 29(2): p. 231-233.
- [62] **Mnif B, Boujelbene I, Mahjoubi F, Gdoura R, Trabelsi I, Moalla S, Frikha I, Kammoun S and Hammami A** (2006): *Endocarditis due to Kytococcus schroeteri: case report and review of the literature*. J Clin Microbiol, 44(3): p. 1187-1189.
- [63] **Newton J A, Jr. and Wallace M R** (1994): *Nodular lymphadenitis caused by Nocardia brasiliensis*. Clin Infect Dis, 18(5): p. 843.

- [64] **Oudiz R J, Widlitz A, Beckmann X J, Camanga D, Alfie J, Brundage B H and Barst R J** (2004): *Micrococcus-associated central venous catheter infection in patients with pulmonary arterial hypertension*. Chest, 126(1): p. 90-94.
- [65] **Parija S C and Khairnar K** (2008): *Mutation detection analysis of a region of 16S-like ribosomal RNA gene of Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar and Entamoeba moshkovskii*. BMC Infect Dis, 8: p. 131.
- [66] **Relman D A** (1999): *The search for unrecognized pathogens*. Science, 284(5418): p. 1308-1310.
- [67] **Ridder G J, Boedeker C C, Technau-Ihling K, Grunow R and Sander A** (2002): *Role of cat-scratch disease in lymphadenopathy in the head and neck*. Clin Infect Dis, 35(6): p. 643-649.
- [68] **Rolain J M, Lepidi H, Zanaret M, Triglia J M, Michel G, Thomas P A, Texereau M, Stein A, Romaru A, Eb F and Raoult D** (2006): *Lymph node biopsy specimens and diagnosis of cat-scratch disease*. Emerg Infect Dis, 12(9): p. 1338-1344.
- [69] **Rustscheff S, Maroti L, Holberg-Petersen M, Steinbakk M and Hoffner S E** (2000): *Mycobacterium interjectum: a new pathogen in humans?* Scand J Infect Dis, 32(5): p. 569-571.
- [70] **Sander A, Posselt M, Bohm N, Ruess M and Altwegg M** (1999): *Detection of Bartonella henselae DNA by two different PCR assays and determination of the genotypes of strains involved in histologically defined cat scratch disease*. J Clin Microbiol, 37(4): p. 993-997.
- [71] **Santos R, Santos E, Goncalves S, Marques A, Sequeira J, Abecasis P and Cadete M** (2003): *Lymphadenitis caused by Aerococcus urinae infection*. Scand J Infect Dis, 35(5): p. 353-354.
- [72] **Selladurai B M, Sivakumaran S, Aiyar S and Mohamad A R** (1993): *Intracranial suppuration caused by Micrococcus luteus*. Br J Neurosurg, 7(2): p. 205-207.
- [73] **Shanks D, Goldwater P, Pena A and Saxon B** (2001): *Fatal Micrococcus sp. infection in a child with leukaemia--a cautionary case*. Med Pediatr Oncol, 37(6): p. 553-554.
- [74] **Siala M, Gdoura R, Younes M, Fourati H, Cheour I, Meddeb N, Bargaoui N, Baklouti S, Sellami S, Rihl M and Hammami A** (2009): *Detection and frequency of Chlamydia trachomatis DNA in synovial samples from Tunisian patients with reactive arthritis and undifferentiated oligoarthritis*. FEMS Immunol Med Microbiol, 55(2): p. 178-186.
- [75] **Smeets J G, Lowe S H and Veraart J C** (2007): *Cutaneous infections with Stenotrophomonas maltophilia in patients using immunosuppressive medication*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 21(9): p. 1298-1300.
- [76] **Stackebrandt E, Koch C, Gvozdiak O and Schumann P** (1995): *Taxonomic dissection of the genus Micrococcus: Kocuria gen. nov., Nesterenkonia gen. nov., Kytococcus gen. nov., Dermacoccus gen. nov., and Micrococcus Cohn 1872 gen. emend*. Int J Syst Bacteriol, 45(4): p. 682-692.
- [77] **Stolk-Engelaar V M and Hoogkamp-Korstanje J A** (1996): *Clinical presentation and diagnosis of gastrointestinal infections by Yersinia enterocolitica in 261 Dutch patients*. Scand J Infect Dis, 28(6): p. 571-575.
- [78] **Swidsinski A, Goktas O, Bessler C, Loening-Baucke V, Hale L P, Andree H, Weizenegger M, Holz M, Scherer H and Lochs H** (2007): *Spatial organisation of microbiota in quiescent adenoiditis and tonsillitis*. J Clin Pathol, 60(3): p. 253-260.
- [79] **Torne R, Soyer H P, Juttner F M and Kerl H** (1987): *[Cat-scratch disease. Histopathology of the primary skin lesion. Apropos of a case]*. Med Cutan Ibero Lat Am, 15(6): p. 445-448.
- [80] **Uh Y, Son J S, Jang I H, Yoon K J and Hong S K** (2002): *Penicillin-resistant Aerococcus viridans bacteremia associated with granulocytopenia*. J Korean Med Sci, 17(1): p. 113-115.
- [81] **Uso J, Gil M, Gomila B and Tirado M D** (2003): *Endocarditis due to Micrococcus luteus*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 21(2): p. 116-117.
- [82] **Vernazza P L, Bodmer T and Galeazzi R L** (1991): *[Rhodococcus erythropolis infection in HIV-associated immunodeficiency]*. Schweiz Med Wochenschr, 121(30): p. 1095-1098.
- [83] **von Eiff C, Kuhn N, Herrmann M, Weber S and Peters G** (1996): *Micrococcus luteus as a cause of recurrent bacteremia*. Pediatr Infect Dis J, 15(8): p. 711-713.
- [84] **Wear D J, Margileth A M, Hadfield T L, Fischer G W, Schlagel C J and King F M** (1983): *Cat scratch disease: a bacterial infection*. Science, 221(4618): p. 1403-1405.
- [85] **Wharton M, Rice J R, McCallum R and Gallis H A** (1986): *Septic arthritis due to Micrococcus luteus*. J Rheumatol, 13(3): p. 659-660.
- [86] **Wilkinson N Z, Kingsley G H, Sieper J, Braun J and Ward M E** (1998): *Lack of correlation between the detection of Chlamydia trachomatis DNA in synovial fluid from patients with a*

- range of rheumatic diseases and the presence of an antichlamydial immune response. Arthritis Rheum, 41(5): p. 845-854.*
- [87] **Yamada T, Eishi Y, Ikeda S, Ishige I, Suzuki T, Takemura T, Takizawa T and Koike M** (2002): *In situ localization of Propionibacterium acnes DNA in lymph nodes from sarcoidosis patients by signal amplification with catalysed reporter deposition. J Pathol, 198(4): p. 541-547.*

7 Anhang

Materialien:

- Waage: Chyo MP – 3000 / Chyo Balance Corp.
- Zentrifuge: biofuge pico / Haraeus / Eppendorf centrifuge 5415R
- Geltrafo: CONSORT, Microcomputer Electrophoresis power supply
(300 – 340 V, 500 mA)
- Gelelektrophoresekammer (Biorad mit Halterung)
- Gel-Doku: Gel Doc 2000, Bio-Rad
- Software: Multianalyst / Intas GDS
- Inkubator/Rüttler: Innova™ 4300, incubator shaker,
New Brunswick scientific GmbH
- PCR-Maschine: T3 Thermocycler Biometra®,
Eppendorf: Mastercycler personal / Mastercycler gradient
- Thermo Scientific 0,2 ml thermo Strip:
Cat. # AB – 0266
0,2 ml thin-walled 8 tube and domed cap strips
- Sequenzier-Maschine: ABI PRISM / 3130xl Genetic Analyzer
- 10 x Puffer: Qiagen® PCR Buffer, 10x,
Mat. No.: 1005479, containing 15 mM MgCl₂
- dNTPs: SIGMA® Deoxynucleotide Set
DNTP 100 – 1 KT, 107K6135
0,25 ml each of 100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- Taq-Polymerase: Qiagen® Taq DNA Polymerase
Mat. No.: 1005476, 5 units/μl
- Sequenzier-Mix S: Big Dye® Terminator v. 3.1 Cycle
Sequencing RR - 100
- Primer:
 - 27f: 5'-GAC/GTTTGATCCTGGCTCA-3'
Sigma Genosys, Sigma Aldrich

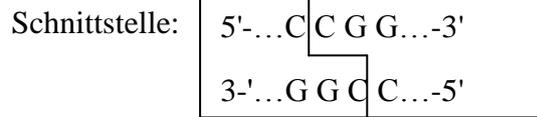
- Tm = 58,8 °C, MW = 5505
- 1492r: 5'-TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3'
Sigma Genosys, Sigma Aldrich
Tm = 59,1 °C, MW = 6684
 - 27f-b: 5'-AG(A/G)GTT(C/T)GAT(C/T)(A/C)TGGCTCAG-3'
Sigma Genosys, Sigma Aldrich
Tm = 59,3 °C, MW = 6208
 - 1406r-b: 5'-ACGGGCGGTGTGT(A/G)C-3'
Sigma Genosys, Sigma Aldrich
Tm = 61,9 °C, MW = 4657
 - SP6: 5'-GATTTAGGTGACACTATAGAATAC-3'
Sigma Genosys, Sigma Aldrich
Tm = 52,2 °C, MW = 7400
 - SP6 long: 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAAT-3'
Sigma Genosys, Sigma Aldrich
Tm = 48,6 °C, MW = 6468,
für die Sequenzier-PCR:
MWG-Biotech AG, 37-5015-3/3
 - T7: 5'-GAATTGTAATACGACTCACTATAG-3'
(5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3')
Sigma Genosys, Sigma Aldrich
Tm = 53,2 °C, MW 7360,
für die Sequenzier-PCR:
MWG-Biotech AG, 46-4101-1/2
- Escherichia coli-DNA (DH5α1)
 - TAE-Puffer: 50 x TAE
 - Tris: 242 g 363 g
 - Eisessig: 57,5 ml 85,65 ml
 - 0,5 M EDTA: 100 ml 150 ml
(pH 8,0)
 - + dest. H₂O 1,0 l 1,5 l
 - => autoklavieren

- Ethidiumbromid-Lösung: 200 µl EtBr + 800 ml H₂O
- Gene Ruler 1kb DNA Ladder: Fermentas Genruler™
0,5 µg/µl, 50 µg, # SM 0311
- Gene Ruler 100 bp DNA Ladder: Fermentas Genruler™
0,5 µg/µl, 50 µg, # SM 0241
- Stopp-Puffer = 6x Loading Dye: Fermentas 6 x Loading Dye Solution 1 ml,
R 0611
 - oder selbst herstellen: 0,25 % Bromphenolblau 25 mg
 - 0,25 % Xylencyanol 25 mg
 - 25 % ficoll (Type 400) 2,5 g
 - 10 ml bidestilliertes H₂O
- Ligation:
 - 2 x Ligation Buffer: Promega Madison, WI U.S.A.
608 – 274 – 4330, C671A
2 x Rapid Ligation Buffer, 200 µl
 - T4 DNA Ligase: Promega Madison, WI U.S.A.
608 – 274 – 4330, M180A
T4 DNA Ligase, 100 u, 3 u/µl
 - pGEM – T Easy: Promega Madison, WI U.S.A.
608 – 274 – 4330, A137A
pGEM® - T Easy, 1,2 µg, 50 ng/µl
- Eco R I: New England Bio Labs® Inc.,
R0101S, 20,000 U/ml, Amt: 0,5 ml,
Schnittstelle:

5'-...G	A A T T C...-3'
3'-...C T T A A	G...-5'
- HAE III: New England Bio Labs® Inc.,
R0108S, 10,000 U/ml, Amt: 0,3 ml
Schnittstelle:

5'-...G G	C C...-3'
3'-...C C	G G...-5'
- MSP I: New England Bio Labs® Inc.,

R0106S, 20,000 U/ml, Amt: 0,25 ml



- Enzym-Puffer 2: New England Bio Labs[®] Inc.
NE Buffer 2, # B7002S, 10 x concentrate, Amt: 1,5 ml
- Eco R I Buffer: New England Bio Labs[®] Inc.
NE Buffer for Eco R I, # B0101S, 10 x concentrate,
Amt: 1,5 ml
- IPTG: 1 M
- Cleanmix DNA Purification System:
Cleanmix 50 extractions
Code: TA 050 CLN
 - Cleanmix - Binding Solution: 25 ml
 - Cleanmix - High Capacity Purification Resin: 5 ml
 - Washing Solution: 50 ml
 - Cleanmix Filters: 50 pieces
 - TBE Conditioning Solution: 2,5 mlzur DNA-Extraktion aus Paraffin zusätzlich benötigt:
 - Proteinase K (20mg/mg)
 - Proteinase K-Verdau-Puffer
(150 mM NaCl, 50 mM TRIS, pH 7,5,
50 mM EDTA, 1 % Triton X100)
- QIA - prep[®] Spin Miniprep Kit (50):
Cat. No.: 27104
 - QIA Prep[®] Spin Columns 50: Mat. No.: 1018398
 - Buffer PE (ethanol added): Mat. No.: 1015211
Wash Buffer, 6 ml concentrate
 - Buffer EB: Mat. No.: 1014602
Filtron Buffer, 15 ml
 - Buffer PB: Mat. No.: 1015093
Binding Buffer, 30 ml

- Puffer P2: Mat. No.: 1014940
Lysis buffer, 20 ml
- QIA quick[®] Gel Extraction Kit (250):
Cat. No.: 28706
 - QIA quick[®] Spin Columns 50: Mat. No.: 1018215
 - Buffer QG (orange): Mat. No.: 1014876
Sulubilization buffer 250 ml with pH indicator
 - Buffer PB: Mat. No.: 1015089
Binding buffer 150 ml
 - Buffer EB: Mat. No.: 1014608
Elution buffer 15 ml
 - Buffer PE: Mat. No.: 1015208
Wash buffer concentrate 50 ml
- Plasmid Präp: QIAGEN[®]
 - Buffer P1 (RNase added): Mat. No.: 1014865
Resuspension buffer 280 ml
 - Buffer P2: Mat. No.: 1014948
Lysis buffer 500 ml
 - Buffer P3: Mat. No.: 1014964
Neutralization buffer 500 ml
- Agar: 8g Pepton + 4g Hefe + 4g NaCl
+ 12g Difco[™] Agar Granulated + 800 ml H₂O
=> autoklavieren und anschließend
800 µl Ampicillin, 400 µl IPDG und 1,28 ml X-Gal
hinzufügen und ausplattieren
- Agarose: peq GOLD Universal Agarose 500g, Bestell Nr.: 2073234
peQLAB
- LB-Medium: 4g Pepton + 2g Hefe + 2g NaCl + 400ml H₂O
=> autoklavieren
- Sephadex: GE Healthcare, illustra[™], Sephadex[™] G-50
Fine DNA-Grade

Anhang

Tabelle 2: Übersicht über die in den jeweiligen Fällen nachgewiesenen bakteriellen 16S-rRNA-Phylotypen mit Identifikation des betreffenden Erregers und Anzahl der identifizierten identischen Erreger																	
		Fälle:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
α-Proteobacteria	Acetobacter						1								1		
	Paracoccus			1	1							2		6	1		
	Pedomicrobium													1			
	Sphingomonas			3						1	2						
β-Proteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae		12			9	3		6		7	4		1		1
		Oxalobacteraceae	3				2					4			1	1	
		others/uncultured										2					
γ-Proteobacteria	Escherichia						2										
	Pseudomonas				1						2						
	Stenotrophomonas					1											2
		others/uncultured						1									
δ-Proteobacteria	others/uncultured										1						
Acidobacteria	others/uncultured												2		2		
Actinobacteria	Corynebacterium	Nocardia		2		1			1								
		others/uncultured	3	2	2	1			1	1		4	2				
	Propionibacterineae	Nocardioidea		4						1			1				
		Propionibacterium	5	13	10	2	13	6	7	3	4	1	2	6	8	8	2
		Micrococcus		1	1			1		3	1		9		1		1
		Streptomyces									5						
Bacteroidetes	Prevotella																1
	others/uncultured														2		
Chloroflexi	others/uncultured			3													
Cyanobacteria	others/uncultured		4	2			1		1								19
Firmicutes	Aerococcus								1								
	Bacillus			6				1					4		1		
	Clostridia	Veillonella			1												
		others/uncultured								1	5						
	Lactobacillus											1					
	Staphylococcus		1	5	1					3			1		1		
	Streptococcus		2				1	1		1			2				
	others/uncultured								1	3		3		2			
Fusobacteria	Leptotrichia														1		
Planctomycetes	Planctomycetales												3		4		1
uncultured			3		1	14	1	1	2	3	1		1	1	4		4
Summe		363 Sequenzen	21	51	20	19	31	14	13	24	24	21	34	14	30	28	19

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium und somit die Voraussetzung für diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Weiterhin danke ich ganz herzlich Herrn PD Dr. Patrick Adam, der meine Arbeit durchgehend betreut hat. Die Zusammenarbeit war von Anfang bis zum Ende extrem angenehm, so dass er über die Jahre nicht nur ein Betreuer für mich war.

Herrn Prof. Dr. H. K. Müller-Hermelink danke ich für die Erlaubnis zur Durchführung dieser Arbeit am Pathologischen Institut der Uniklinik Würzburg und die Betreuung als Doktorvater.

Frau Prof. Dr. Ute Hentschel danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in ihrer Arbeitsgruppe und für die Betreuung während des experimentellen Teils im Labor.

Vielen Dank auch an Frau Christine Gernert für die Einführung in die Methodik und die Unterstützung bei der Durchführung sämtlicher Versuche.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Sabine Roth bedanken, die zusammen mit mir die Methode erlernt und die Sequenzierung meiner Proben vorgenommen hat.

Zuletzt danke ich Lydia Leven für die viele Geduld, die sie über die ganze Zeit aufgebracht hat.