

Untersuchungen zur immunologischen Spezifität von *Pneumocystis carinii*-Antigen aus Mensch und Tier

Karin Lemmer, A. Szabados, F. Deinhardt

Einleitung

Pneumocystis carinii (PC) ist der Erreger einer atypischen interstitiellen Pneumonie (PCP), die bei Mensch und Tier nur dann auftritt, wenn eine Immundefizienz vorliegt. Der vorwiegend in der Lunge parasitierende Erreger ist in Form von einzelligen, dünnwandigen Trophozoiten (1 - 2 µm) und in Form von Zysten (4 - 7 µm) mit bis zu acht intrazystischen Tochterzellen nachweisbar. Bei dem offensichtlich ubiquitären Parasiten ist mit einer aerogenen Übertragungsform zu rechnen, jedoch bietet ein intaktes Immunsystem ausreichend Schutz vor einer Infektion. Nach wie vor ist die PCP eine der häufigsten opportunistischen Erkrankungen bei AIDS-Patienten und verläuft ohne konsequente Therapie nahezu immer letal.

Noch immer sind für *Pneumocystis carinii* die Klassifikation, der Entwicklungszyklus und der Übertragungsmechanismus nicht vollständig geklärt. Da eine PCP auch in tierischen Lungen, speziell der Ratte, durch Immunsuppression erzeugt werden kann, stellt sich die Frage, wieweit die Erreger im Mensch und im Tier identisch sind. Obwohl morphologisch kaum unterscheidbar, ist offensichtlich eine immunologische Differenz vorhanden. Diese Frage der immunologischen Spezifität des menschlichen und tierischen PC-Antigen stellt immer wieder einen Diskussionspunkt in der PC-Forschung dar. KIM et al. (4) stellten bereits 1972 fest, daß immunologisch Unterschiede in der Antigenität bestehen. Sie fanden, daß immunreaktives Rattenserum gegen PC im Immunfluoreszenztest (IFT) nur mit Ratten-PC (PC aus Rattenlunge) und nicht mit PC menschlichen Ursprungs reagiert. Demgegenüber reagierten die von NORMAN und KAGAN (10) 1973 untersuchten Humanseren im IFT sowohl mit humanem PC als auch mit Ratten-PC. WALZER und Mary E. RUTLEDGE (14) beschreiben 1980, daß PC-Antigen aus Ratten-, Mäuse- und menschlicher Lunge weitaus intensiver mit dem Serum der gleichen Wirtsspezies reagiert. Andere Autoren setzen für den Nachweis von PC-Antikörpern im menschlichen Serum tierisches PC-Antigen (Ratte) ein (2, 9, 12). Die Immunoblotstudien verschiedener Arbeitsgruppen lassen vermuten, daß menschliches und tierisches PC aus der Ratte sowohl speziesspezifische als auch gemeinsame Antigeneterminanten besitzen (3, 15).

Wir testeten die Seren der Kaninchen, die mit PC-Antigen aus menschlicher Lunge immunisiert wurden, im ELISA auf ihre Reaktivität gegenüber PC-Antigen aus Mensch und Ratte. Dabei stellten wir eine deutliche Immunreaktivität mit dem speziesspezifischen PC-Antigen aus der menschlichen Lunge und dem nicht speziesspezifischen PC-Antigen aus der Rattenlunge fest. Zum Vergleich testeten wir die Reaktivität von menschlichen Seren gegenüber beiden PC-Antigenen.

Material und Methoden

Herstellung von gelöstem PC-Antigen zur Beschichtung der ELISA-Testplatten

PC-Antigen wurde aus dem Lungengewebe eines an PCP verstorbenen AIDS-Kranken und aus den Lungen immunsupprimierter Sprague-Dawley-Ratten mit der Methode der forcierten Lungenlavage (13) gewonnen. Dazu wurden ca. 1 cm³ große Gewebsblöcke der menschlichen Lunge bzw. die gesamte Rattenlunge unter Druck mit physiologischer Kochsalzlösung lavagiert. Ein Großteil der in der Lavage enthaltenen Lungengewebsfragmente wurde anschließend durch Gelchromatographie (6) und Percoll-Gradientenzentrifugation nach dem Verfahren von SZABADOS und FREYTAG (7) eliminiert. Im Anschluß daran wurde das gereinigte PC-Antigen in Harnstofflösung (8) oder HBSS (Hanks Balance Salt Solution) aufgenommen und in 10 × 2 min-Intervallen und mit einer Intensität von 100 Watt mit Ultraschall behandelt (Labsonic 1510, Fa. Braun). Mikroskopisch waren danach keine intakten Zysten mehr nachweisbar. Der Harnstoff wurde durch Dialyse gegen 0,05 M PBS, pH 7,4, 48 h, entfernt, die Antigensuspension bei 27.000 g, 60 min, zentrifugiert, der Überstand dekantiert und membranfiltriert. Das gelöste PC-Antigen wurde als Harnstoff-PC-Antigen bzw. HBSS-PC-Antigen bezeichnet. Negativkontrollen aus gesundem menschlichen und tierischen Lungengewebe wurden nach dem gleichen Verfahren hergestellt und mit Harnstoff- bzw. HBSS-Negativlunge bezeichnet.

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach LOWRY, abgewandelt nach McDONALD (1).

Immunisierung der Kaninchen mit PC-Antigen

Zwei Kaninchen (K 1, K 2) wurden einmal wöchentlich mit intaktem (K 1) und beschalltem PC-Antigen (K 2) parenteral immunisiert (5 × 10⁶ Zysten/ml). Das Auszählen der Zysten erfolgte nach Färben der Präparate mit der Versilberungstechnik nach GRO-COTT. Die ersten vier Injektionen erfolgten mit komplettem, alle weiteren Injektionen mit inkompletem Freund'schen Adjuvans.

Der Nachweis von PC-Antikörpern im ELISA

Die Mikrotiterplatten (Fa. Greiner) wurden mit in Carbonatpuffer, pH 9,6, verdünntem Harnstoff- bzw. HBSS-PC-Antigen beschichtet (5 µg Protein/ml) und über Nacht bei 4° C inkubiert. Danach wurden die Platten viermal mit PBS-Tween gewaschen und die Seren in einer Anfangsverdünnung von 1 : 100 aufgetragen. Der Verdünnungspuffer (PBS-Tween) enthielt 0,5% Albumin. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurden die Platten erneut gewaschen und anschließend mit anti-Human-IgG-(γ-chain)-Peroxidase (Fa. Dako) eine Stunde bei 37° C inkubiert. Der Nachweis der Immunreaktion erfolgte mit H₂O₂ als Substrat und ortho-Phenylendiamin (Fa. Merck). Die Reaktion wurde mit 2 n HCl gestoppt und die Extinktionen bei 492 nm gemessen. Als Grenzwert wurde die zweifache Extinktion der Negativkontrollen (anti-PC negative Seren) festgelegt. Als Positivkontrollen dienten u. a. kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper gegen Human-PC-Antigen (Fa. Dako, Fa. Progen, Fa. Bios), die jedoch nicht alle mit Ratten-PC-Antigen reagierten.

Unspezifische Immunreaktionen mit Lungengewebe wurden zum Ausschluß getestet.

Als Serumproben wurden getestet:

1. Kaninchenserum, wie oben beschrieben,
2. Seren von HIV-infizierten und anderen immunsupprimierten Personen mit PCP und PCP-Verdacht,
3. Seren von Blutspendern und Kindern,
4. Seren von Personen mit häufigem Erregerkontakt und
5. Seren von PC-infizierten Ratten.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die Elektrophorese wurde mit 12,5, 14 und 16%igen Polyacrylamidgelen mit 0,1% SDS durchgeführt. Die Herstellung der Gele erfolgte nach der Vorschrift von LAEMMLI (5). Hauptsächlich wurden Flachgele der Größe $6 \times 7 \times 0,5$ cm gegossen und pro Slot 5 - 8 μg Protein aufgetragen.

Probenvorbereitung: Das in HBSS oder Harnstoff gelöste PC-Antigen und die gelöste Negativlunge wurden 1 : 1 mit Probenpuffer verdünnt (2% SDS, 5% Mercaptoethanol, 10% Saccharose in 0,06 M Tris, pH 6,8) und fünf Minuten auf 100°C erhitzt.

Die Darstellung der Proteinbanden erfolgte mit der Silbernitratfärbung. Die mit 20%igem Trichlorazetat fixierten Gele wurden 30 bis 60 Minuten in 0,2%iger Silbernitratlösung inkubiert und anschließend mit Natriumcarbonatlösung entwickelt (4,5% Natriumcarbonat versetzt mit 0,04% Formaldehyd). Die Entwicklung wurde mit 1%iger Essigsäure gestoppt. Um die Proteinbanden eindeutig darzustellen, war häufig eine zweite Silberfärbung notwendig. Dazu wurde das Gel mit Farmer'schem Abschwächer (Fa. Tetenal) entfärbt, der Abschwächer ausgewaschen und die Färbeprozedur erneut mit Silbernitrat begonnen.

Immunoblot

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine bzw. Proteide wurden 90 Minuten mit 0,9 A auf Nitrozellulosemembran geblottet ($0,45 \mu\text{m}$, Fa. Schleicher & Schuell) und der Blot anschließend zwei Stunden in Cohen-Puffer absorbiert. Nach Inkubation mit anti-PC-Serum vom Kaninchen, Mensch oder von der Ratte für vier Stunden und der speziesspezifischen anti-Ig-Peroxidase (Fa. Dako) für zwei Stunden erfolgte der Nachweis der immunreaktiven Banden mit H_2O_2 und Diaminobenzidin (Fa. Serva). Das anti-PC-Serum und die Peroxidase wurden mit TBS-Tween und 0,5% Albumin bzw. 3% Schafserum verdünnt.

Ergebnisse

Der Nachweis von PC-Antikörpern im ELISA

Wie schon anfangs berichtet und aus den Abbildungen 1 und 2 hervorgeht, reagierten die Seren der mit intaktem und beschalltem menschlichen PC-Antigen immunisierten Kaninchen (K 1 und K 2) nicht nur mit Human-PC-Antigen (PC aus menschlicher Lunge) sondern auch mit Ratten-PC-Antigen (PC aus Rattenlunge) positiv. Auch zeigten sich bei beiden Seren deutliche Immunreaktionen mit gelöster PC-Negativlunge. Letzteres weist darauf hin, daß trotz der angewandten Reinigungsverfahren (Gelchromatographie, Percoll-Gradientenzentrifugation) noch immer genügend kleinste Lungengewebspartikel in den Antigenfraktionen vorhanden waren. Die hohen Extinktionen (E) mit Negativlunge in beiden Abbildungen sind darauf zurückzuführen, daß sowohl gelöste Negativlunge als auch gelöstes PC-Antigen mit gleicher Proteinkonzentration aufgetragen wurden ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$). Demzufolge war die Anzahl an Bindungsstellen für Antikörper gegen Lungengewebe in den mit Negativlunge beschichteten Platten erheblich höher als in den Platten mit PC-Antigenbeschichtung. Die wöchentlich bzw. 14tägig gewonnenen Serenvolumina aus den Kaninchen reichten nicht aus, um sie vor dem Test mit Negativlunge zu absorbieren. Die später durchgeführten Absorptionsversuche mit dem Kaninchenserum K 1 führten im ELISA zu einer nahezu vollständigen Eliminierung dieser gewebsspezifischen Immunreaktion. Die Extinktionswerte in Abbildung 1 und 2 wurden bei einer Serumverdünnung von 1 : 400 gemessen.

Die in Tabelle 1 dargestellten Seren der verschiedenen Personengruppen wurden zu einem früheren Zeitpunkt im Rahmen einer epidemiologischen Studie auf Antikörper

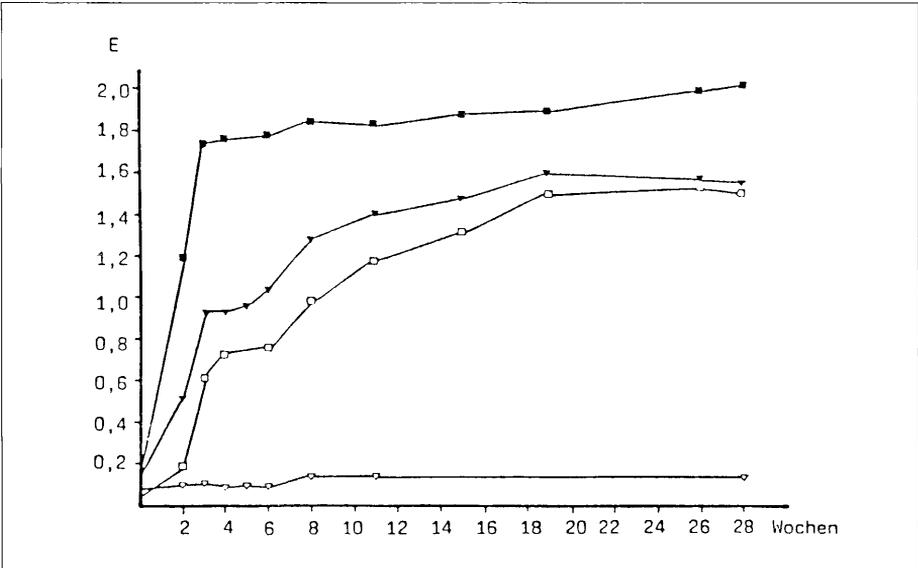


Abb. 1:

Zeitlicher Ablauf der Bildung von Serumantikörper (AK) gegen *P. carinii* (PC) im Kaninchen K 1. Das Kaninchen wurde mit intaktem PC-Antigen aus menschlicher Lunge (Human-PC-Antigen) immunisiert. Gemessen wurde die AK-Aktivität gegen gelöstes Human-PC-Antigen ■, Ratten-PC-Antigen ▼, gelöste humane Negativlunge □, und Ratten-Negativlunge ▽. Die Extinktionen (E) wurden im ELISA bestimmt (Serumverdünnung 1 : 400).

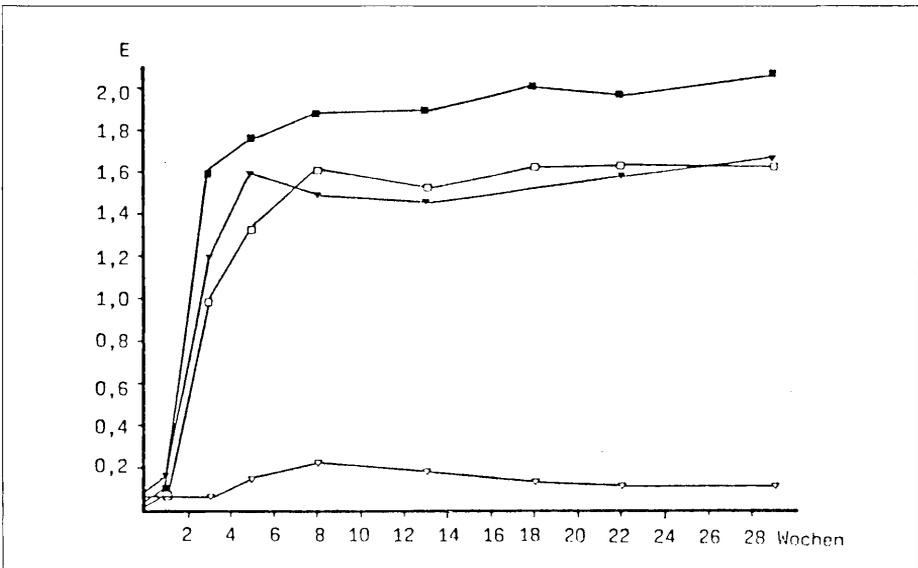


Abb. 2:

Zeitlicher Ablauf der Bildung von Serumantikörper (AK) gegen *P. carinii* (PC) im Kaninchen K 2. Das Kaninchen wurde mit beschalltem Human-PC-Antigen immunisiert. Gemessen wurde die AK-Aktivität gegen gelöstes Human-PC-Antigen ■, Ratten-PC-Antigen ▼, gelöste humane Negativlunge □, und Ratten-Negativlunge ▽. Die Extinktionen (E) wurden im ELISA bestimmt (Serumverdünnung 1 : 400).

TABELLE 1

Bestimmung der Antikörperaktivität (IgG) gegen *Pneumocystis carinii* in 200 Seren verschiedener Personengruppen. Die Seren wurden zum Vergleich sowohl gegen Human-PC-Antigen als auch gegen Ratten-PC-Antigen im ELISA getestet (anti-PC-IgG negativ $\leq 1 : 100$, anti-PC-IgG positiv $> 1 : 100$ Serumverdünnung)

Serumprobe	Ges. (n)	identische Resultate (n)		nur mit Human- PC-Antigen positiv (n)	nur mit Ratten- PC-Antigen positiv (n)
		pos.	neg.		
PCP-Diagnostik	111	101	47	54	5
Blutspender	50	42	22	20	6
Kinder Personen	33	30	7	23	2
mit Erregerkontakt	6	5	4	1	1

gegen menschliches PC-Antigen im ELISA getestet. Zum Vergleich zu dem immunologischen Verhalten der Kaninchenserum gegenüber dem menschlichen und tierischen PC-Antigen erfolgte in einer zweiten Studie die Testung der Humanserum mit Ratten-PC-Antigen.

Von den insgesamt 200 getesteten Seren reagierten 178 (98%) Seren identisch, d. h. sie reagierten sowohl mit dem menschlichen als auch mit dem tierischen PC-Antigen positiv bzw. negativ. Demzufolge verhielten sie sich entsprechend den Kaninchenserum.

22 (11%) der Seren zeigten jedoch im ELISA voneinander abweichende Resultate. Die Mehrzahl dieser Seren (64%) war, wie zu erwarten, positiv mit Human-PC-Antigen und negativ mit Ratten-PC-Antigen. Acht Humanserum reagierten mit Ratten-PC-Antigen positiv. Gegenüber Human-PC-Antigen reagierten diese Seren zum Teil mit erhöhten Extinktionen, die jedoch nicht den festgelegten Grenzwert überschritten.

Die Personen mit häufigem Erregerkontakt waren mit beiden PC-Antigenen konfrontiert. Trotzdem reagierte eines der Seren aus diesem Personenkreis lediglich positiv mit Human-PC-Antigen und zeigte keine Reaktivität mit Ratten-PC-Antigen.

Von den drei untersuchten monoklonalen Antikörpern für den Nachweis von Human-PC-Antigen mittels IFT waren zwei der Proben Gemische aus monoklonalen Antikörpern gegen unterschiedliche Antigenepitope, während die dritte Probe lediglich einen einzelnen monoklonalen Antikörper enthielt. Einer der Antikörpercocktails reagierte im ELISA mit beiden PC-Antigenen (Human und Ratte) positiv. Der zweite Antikörpercocktail und der einzelne monoklonale Antikörper reagierten positiv mit Human-PC-Antigen, zeigten jedoch keine Reaktivität mit Ratten-PC-Antigen.

SDS-PAGE

Nach Elektrophorese und Proteinfärbung stellten sich für das menschliche und tierische PC-Antigen aus Rattenlunge folgende Bandenspektren dar (Abb. 3):

Das Bandenspektrum des in Harnstoff oder HBSS gelösten humanen PC-Antigens enthielt zwei dominierende Proteinbanden mit Molekulargewichten (MG) von 105 und 67 kD (Abb. 3, A und B) und schwächere Banden mit MG von 125, 116 kD (B) sowie zwischen 95 und 50 kD (A, Slot 4 und B, Slot 3 - 6). Im niedermolekularen Bereich stellten sich andeutungsweise drei Banden mit MG zwischen 43 und 40 kD dar (B, Slot 3).

Charakteristisch für Ratten-PC-Antigen waren die Banden mit MG von 116, 84 und

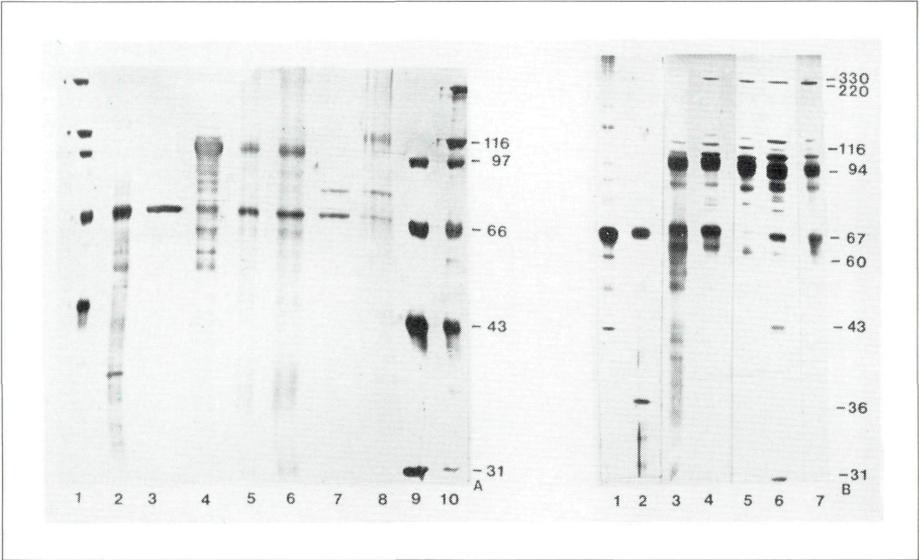


Abb. 3:

Mit Silbernitrat gefärbte Elektrophoresegele (12,5% PAA).

A: Elektrophorese mit in Harnstoff gelöster humaner Negativlunge (2) und Ratten-Negativlunge (3), in HBSS gelöstem (4) und in Harnstoff gelöstem Human-PC-Antigen (5, 6), in HBSS gelöstem (7) und in Harnstoff gelöstem Ratten-PC-Antigen (8), MG-Marker (1, 9, 10).

B: Elektrophorese mit in HBSS (1) und in Harnstoff gelöster humaner Negativlunge (2), mit in HBSS gelöstem humanen PC-Antigen aus zwei verschiedenen Lungen (L 1 = 3, 4, 5; L 2 = 6, 7)

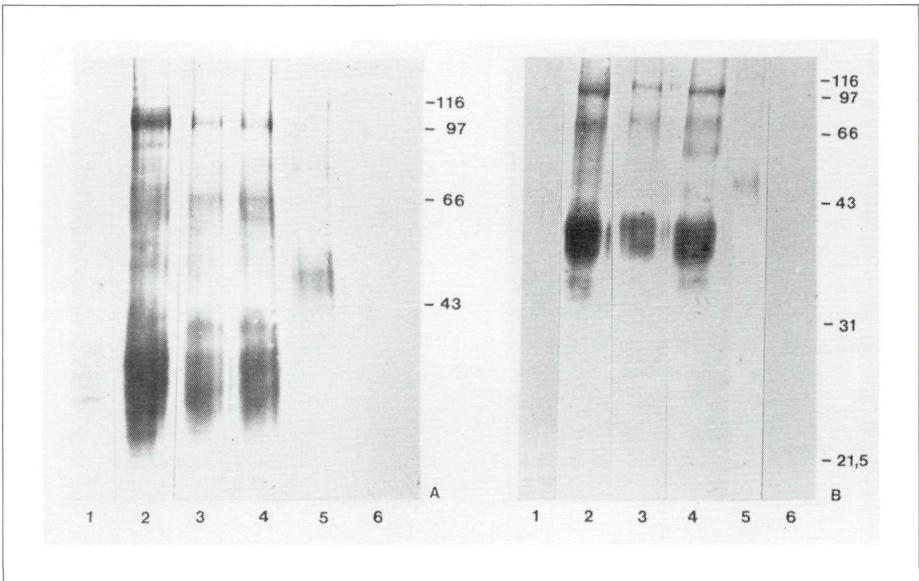


Abb. 4:

Immunoblots inkubiert mit anti-Human-PC-haltigem Serum vom Kaninchen K 1. Das Kaninchenserum wurde zuvor mit humaner Negativlunge absorbiert. Probenauftragung in A und

B: In Harnstoff gelöste humane Negativlunge (1), in HBSS (2) und in Harnstoff gelöstes Human-PC-Antigen (3, 4), in Harnstoff gelöstes Ratten-PC-Antigen (5), in Harnstoff gelöste Ratten-Negativlunge (6). • A: 12,5% SDS-PAGE • B: 16% SDS-PAGE

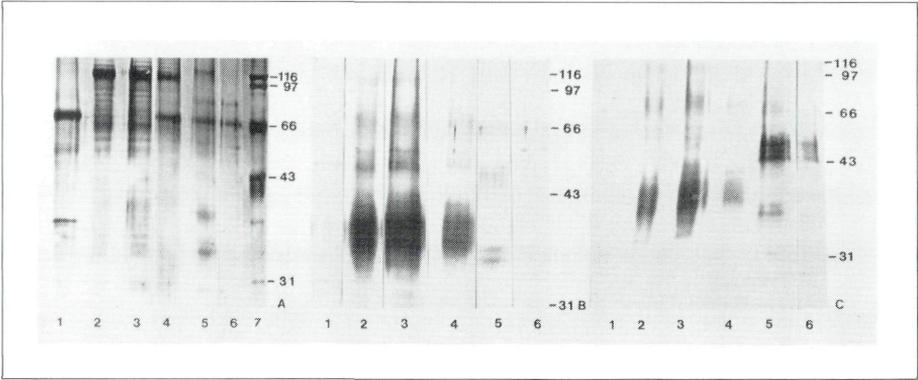


Abb. 5:

Elektrophorese (A) und Immunoblots (B, C) mit in Harnstoff gelöster humaner Negativlunge (1) in HBSS (2, 3) und in Harnstoff gelöstem Human-PC-Antigen (4), in Harnstoff gelöstem Ratten-PC-Antigen (6), MG-Marker (7).

B: Immunoblot inkubiert mit Humanserum. C: Immunoblot inkubiert mit Rattenserum. Beide Seren enthielten Antikörper gegen Human-PC-Antigen und Ratten-PC-Antigen.

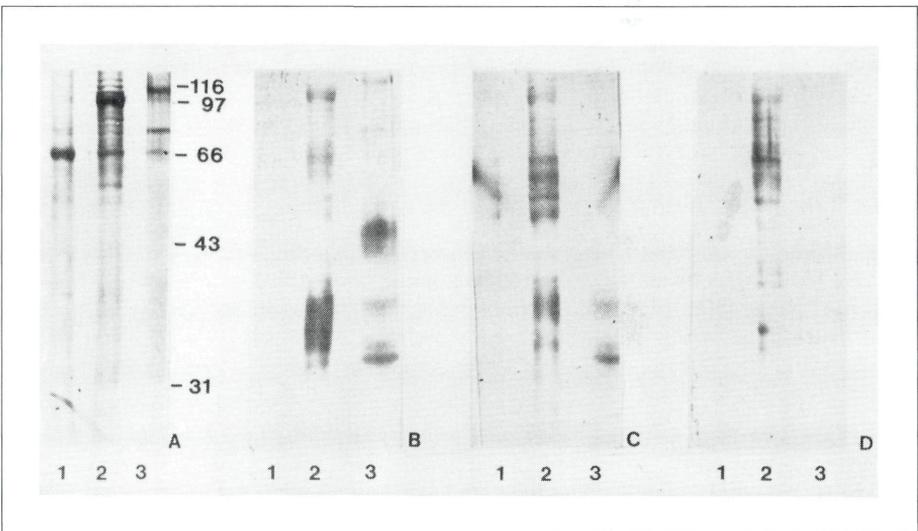


Abb. 6:

Elektrophorese und Immunoblots mit in Harnstoff gelöster humaner Negativlunge (1), in HBSS gelöstem Human-PC-Antigen (2), in Harnstoff gelöstem Ratten-PC-Antigen (3).

A: PAGE nach Färbung mit Silbernitrat. B: Blot inkubiert mit anti-Human-PC- und anti-Ratten-PC-haltigem Humanserum. C: Blot inkubiert mit anti-Human-PC positivem und anti-Ratten-PC negativem Humanserum. D: Blot inkubiert mit einem monoklonalen Antikörper gegen Human-PC.

67 kD (Abb. 3, A, Slot 8). Mit in HBSS gelöstem PC-Antigen stellte sich, aufgrund der geringen Proteinkonzentration dieser Probe, die 116 kD-Bande häufig nur angedeutet dar (A, Slot 7). Im niedermolekularen Bereich ließen sich teils diffuse Banden mit 40, 35, und 30 kD Molekulargewicht nachweisen (Abb. 5, A, Slot 5).

Kennzeichnend für den Lauf der Probe mit Negativlunge beider Spezies (Human- und Ratten-PC-Negativlunge) war eine dominierende Bande mit 67 kD (Abb. 3, A, Slot 2, 3 und B, Slot 1, 2).

Western-Immunoblot

Die in Abbildung 4 dargestellten Immunoblots wurden mit anti-PC-Serum von Kaninchen K 1 (Immunisierung mit Human-PC-Antigen) inkubiert. Das Serum wurde vorher mit menschlicher Negativlunge absorbiert, um diesbezüglich unspezifische Reaktionen auszuschließen. Danach stellten sich folgende immunreaktive Bandenspektren dar:

Human-PC-Antigen zeigte deutliche Immunreaktivität um 105 und 67 kD entsprechend den dominierenden Proteinbanden. Zusätzlich trat eine auffallend starke Immunreaktion im MG-Bereich 40 - 35 kD auf (Abb. 4, A und B, Slot 2, 3, 4), der sich keine diskrete Bande(n) im Blot und keine Bande(n) nach Proteinfärbung der Gele zuordnen ließ.

Ratten-PC-Antigen reagierte mit dem Kaninchenserum (Immunisierung mit Human-PC-Antigen) abgeschwächt im Bereich zwischen 53 und 45 kD (A und B, Slot 5). Auch in diesem Bereich konnten nach Proteinfärbung keine Proteinbanden nachgewiesen werden.

Wie aus Abbildung 4 ersichtlich, stellten sich im niedermolekularen Bereich, zwischen 30 und 20 kD, keine immunreaktiven Banden dar (Abb. 4, B). Keinerlei Reaktivität zeigten die 67 kD-Banden der Human- und Ratten-Negativlunge (A und B, Slot 1 und 6).

In Abbildung 5 wurde Blot B mit Humanserum inkubiert. Dieses Serum reagierte im ELISA mit PC-Antigen beider Wirtsspezies positiv. Zur Darstellung kamen auch hier die genannten immunreaktiven Bereiche des humanen PC-Antigens mit 105, 67 und 40 - 35 kD und zusätzlich zwei schwache Banden mit 62 und 58 kD (Blot B, Slot 2 und 3). Mit in Harnstoff gelöstem Ratten-PC-Antigen traten neben dem schwach reaktiven Bereich zwischen 53 und 45 kD zusätzlich Banden mit 36 und 35 kD auf (Blot B, Slot 5).

Nach Inkubation mit Serum einer an PCP erkrankten Ratte (Abb. 5, Blot C) wurde im Bereich 53 - 45 kD des Ratten-PC-Antigens eine deutliche Reaktion sichtbar. Das Rattenserum reagierte im ELISA mit Ratten- sowie mit Human-PC-Antigen positiv. Diese Blotanalyse bestätigte die immunologische Aktivität des Ratten-PC-Antigens in dem MG-Bereich 53 - 45 kD und gleichzeitig die Reaktivität des Rattensersums mit Human-PC-Antigen (Blot C, Slot 2 - 4).

Die in Abbildung 6 dargestellten Immunoblots wurden mit Humanserum inkubiert, die im ELISA unterschiedlich reagierten (Blots B und C). Blot D wurde mit dem monoklonalen Antikörper gegen Human-PC inkubiert und dabei die folgenden Reaktionen festgestellt:

Die Inkubation von Blot B (Abb. 6) erfolgte mit Humanserum, das im ELISA mit Ratten-PC-Antigen positiv reagierte (Titer 1 : 200) und mit Human-PC-Antigen lediglich eine leicht erhöhte, jedoch negative Extinktion zeigte. Gegenüber der Reaktion des Humanserums in Abbildung 5, B stellte sich mit diesem Serum der Bereich 53 - 45 kD des Ratten-PC-Antigens deutlich dar. Außerdem waren die Banden mit 36 und 35 kD und eine zusätzliche Bande mit 40 kD nachweisbar. Trotz der Negativbewertung im ELISA war das gesamte immunreaktive Bandenspektrum des humanen PC-Antigens nachweisbar.

Blot C wurde mit dem Serum der Person inkubiert, die trotz häufigem Erregerkontakt mit *Pneumocystis carinii* aus beiden Wirten (Mensch und Ratte) im ELISA keine Reaktivität mit Ratten-PC-Antigen zeigte. In diesem Falle beschränkte sich das immunreaktive Bandenspektrum des Ratten-PC-Antigens lediglich auf die 40, 36 und 35 kD-Ban-

den, keinerlei Reaktion war im Bereich 53 - 45 kD nachweisbar (C, Slot 3). Mit Human-PC-Antigen (Slot 2) stellte sich der bisher stark reaktive Bereich zwischen 40 und 35 kD abgeschwächt dar, dagegen war eine verstärkte Immunantwort im Bereich 67 - 50 kD zu beobachten.

Blot D bestätigte die im ELISA erhaltenen Resultate. Demzufolge war keinerlei Reaktivität des monoklonalen Antikörpers mit den Banden des Ratten-PC-Antigens nachweisbar (Slot 3). Mit Human-PC-Antigen (Slot 2) trat eine sehr schwache Immunantwort in dem niedermolekularen Bereich 40 - 35 kD auf, dagegen reagierten verstärkt die Banden im Bereich 55 - 105 kD.

Diskussion

Unsere Ergebnisse bestätigten im Einzelnen die Resultate der Gruppen KIM et al. (4), NORMAN und KAGAN (10) und WALZER und Mary E. RUTLEDGE (14). Zum einen war es möglich, mit Human-PC-Antigen und Ratten-PC-Antigen anti-PC-IgG in Humanseren nachzuweisen, zum anderen reagierten einige Humanseren verstärkt mit Human-PC-Antigen und zeigten abgeschwächte bis keine Reaktionen mit Ratten-PC-Antigen sowohl im ELISA als auch im Western-Immunoblot.

Nach Elektrophorese und Proteinfärbung des Ratten- und Human-PC-Antigens traten Proteinbanden vermehrt im höhermolekularen Bereich zwischen 125 und 55 kD auf. Ihre Molekulargewichte waren zum Teil identisch. Das Spektrum von Ratten-PC-Antigen enthielt zusätzlich im niedermolekularen Bereich Banden mit 40, 36, 35 und 31 kD, die jedoch nicht immer zur Darstellung kamen.

Im Western-Immunoblot reagierten beide PC-Antigene deutlich im niedermolekularen Bereich. Human-PC-Antigen reagierte im Bereich 40 - 35 kD und Ratten-PC-Antigen im Bereich 53 - 45 kD und mit den Banden 40, 35 und 36 kD.

Die immunologisch aktiven Bereiche 40 - 35 kD des humanen und 53 - 45 kD des tierischen PC-Antigens waren im SDS-Gel nach Proteinfärbung nicht darstellbar. Im Immunoblot waren diese Banden nur dann gemeinsam nachweisbar, wenn die Inkubation mit Seren erfolgte, die im ELISA mit beiden PC-Antigenen positiv reagierten.

Humanserum mit Antikörperreaktivität gegen beide PC-Antigene reagierte im allgemeinen sehr intensiv mit dem 40 - 35 kD-Bereich des humanen PC-Antigens und abgeschwächt mit dem 53 - 45 kD-Bereich des Ratten-PC-Antigens. Entsprechend reagierte auch das Serum des Kaninchens, das mit Human-PC-Antigen immunisiert wurde. Basierend auf diesen Beobachtungen kann offensichtlich auf ein kreuzreaktives Verhalten geschlossen werden. Möglicherweise handelt es sich hierbei um funktionell bzw. morphologisch ähnliche Antigenabschnitte mit zum Teil äquivalenten Determinanten. Diese Resultate bestätigten die Ergebnisse von WALZER und LINKE (15).

Dafür, daß diese immunologisch aktiven Bereiche Antigengemeinschaften haben, spricht auch die Tatsache, daß sie mit der relativ sensiblen Proteinfärbung mit Silbernitrat nicht darstellbar sind. Die Vermutung liegt nahe, daß es sich hierbei um Glykoproteine handelt, die sich allerdings aufgrund ihrer geringen Konzentration im Gel nicht mit Schiff'schem Reagenz anfärben ließen. PESANTI und SHANLEY (11) gelang es, mit der sensibleren Lektinnachweismethode u. a. eine Glykoproteinbande mit einem Molekulargewicht von 46 kD im Bandenspektrum des Ratten-PC-Antigens nachzuweisen, die möglicherweise dem Bereich 53 - 45 kD entsprechen könnte.

Die Möglichkeit, ob der Bereich 40 - 35 kD des Human-PC-Antigens identisch ist mit den 40, 36 und 35 kD-Banden des Ratten-PC-Antigens muß überprüft werden. Unterschiede bestehen jedoch in der Anfärbbarkeit mit Silbernitrat. Während, wie schon

erwähnt, die Human-PC-Banden nicht darstellbar sind, stellen sich die Ratten-PC-Banden teils abgeschwächt dar (Abb. 5).

Die Immunoblotstudien unterstützen nicht voll die ELISA-Befunde. Mit dem Humanserum, das im ELISA deutlich positiv mit Ratten-PC-Antigen und mit Human-PC-Antigen abgeschwächt ($<$ Grenzwert) reagierte, zeigte sich im Immunoblot trotzdem eine verstärkte Reaktivität mit dem Bereich 40 - 35 kD des Human-PC-Antigens (Abb. 6, B). Gleichzeitig zeigte sich eine verstärkte Reaktion mit dem Ratten-PC-Bereich 53 - 45 kD. Die Immunoblots C und D in Abbildung 6 lassen die Vermutung zu, daß die höhermolekularen Banden mit MG 55 - 110 kD des menschlichen PC-Antigens zum Teil speziesspezifisch sind. Offensichtlich werden anti-PC-Immunglobuline gebildet, die nur mit Human PC-Banden in diesem Bereich reagieren und keine Reaktivität bzw. kein kreuzreaktives Verhalten mit den höhermolekularen Banden des Ratten-PC-Antigens zeigen.

Es stellt sich die Frage, ob aufgrund der immunologischen Unterschiede zwischen den Banden des Human-PC-Antigens und des Ratten-PC-Antigens auf verschiedene Pneumozystisstämmen geschlossen werden kann. Möglicherweise beeinflussen die Cortison- und Antibiotikabehandlung der Ratten die Membranstrukturen des Erregers, so daß ein Unterschied in der Antigenität gegenüber Human-PC zustande kommt.

Zusammenfassung

Nach den bisher gewonnenen Resultaten waren sowohl im ELISA als auch im Western-Immunoblot speziesspezifische PC-Antigen-Antikörperreaktionen nachweisbar. Die Mehrzahl der im ELISA getesteten anti-PC-IgG-haltigen Humansenen reagierten positiv sowohl mit PC-Antigenen aus menschlicher Lunge als auch mit PC-Antigenen aus Rattenlunge. 14 der im ELISA getesteten 200 Humansenen reagierten jedoch speziesspezifisch, d. h. nur mit Human-PC-Antigenen positiv. Acht Seren reagierten nur mit Ratten-PC-Antigenen positiv.

Nach SDS-Gelelektrophorese waren bei beiden PC-Antigenen Proteinbanden im höhermolekularen Bereich zwischen 125 und 55 kD nachweisbar.

Im Western-Immunoblot stellten sich weiters zwei niedermolekulare speziesspezifische Bereiche dar. So zeigte sich im Bandenspektrum des Human-PC-Antigens ein immunologisch reaktiver Bereich zwischen 40 und 35 kD und für Ratten-PC-Antigen ein reaktiver Bereich zwischen 53 und 45 kD. Nachdem die im ELISA mit beiden PC-Antigenen positiv reagierenden Seren im Immunoblot eine intensive Reaktivität mit dem speziesspezifischen PC-Antigen und eine abgeschwächte Reaktivität mit dem Ratten-PC-Antigen zeigten, kann auf Kreuzreaktivität geschlossen werden.

Auch die sich im Bereich 105 - 55 kD darstellenden Banden des Human-PC-Antigens sind offensichtlich zum großen Teil in ihrer immunologischen Antigenität nicht identisch mit denen des Ratten-PC-Antigens. Diesbezüglich sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß es empfehlenswert ist, den Nachweis von Antikörpern gegen PC in Humansenen mit PC-Isolaten aus menschlicher Lunge zu führen.

Schlüsselwörter

Pneumocystis carinii-Antigenspezifität, Human-PC-Antigen, Ratten-PC-Antigen, *Pneumocystis carinii*-Antikörper-Nachweis, Immunoblotstudien.

Summary

Studies on the Immunological Specificity of Human and Animal *Pneumocystis carinii* Antigen

According to the results obtained up to now, it has been possible to ascertain species-specific PC antigen antibody reactions with the ELISA and Western immunoblot methods. The majority of the human sera containing anti-PC-IgG which were tested with ELISA showed a positive reaction, both with PC antigen from human lungs and with PC antigen from rat lungs. Of the 200 samples of human sera which were tested with ELISA, 14, however, reacted in a species-specific manner, i. e. a positive reaction occurred only with human PC antigen. Eight sera showed a positive reaction only with PC antigen from rats.

Following SDS-gelelectrophoresis, protein bands in the high molecular area between 125 and 55 kD were ascertainable in both PC antigens.

Two low molecular, species-specific areas showed up in the Western immunoblot. Thus, an immunologically reactive area between 40 and 35 kD was found in the band spectrum of human PC antigen and a reactive areas between 53 and 45 kD was found for rat PC antigen. Since the sera that reacted positively with both PC antigens when the ELISA method was applied showed intense reactivity with the species-specific PC antigen and low reactivity with the rat PC antigen, a cross-reactivity can be concluded.

Evidently the immunological antigenicity of the bands of the human PC antigen, which appear in the area of 105 - 55 kD, also is not identical with that of the rat PC antigen to a large extent. In the connection, however, further studies are necessary.

The results obtained up to now show that it is advisable to study the existence of antibodies against PC in human sera with PC isolates from human lungs.

Key words

Pneumocystis carinii antigenic specificity, human PC antigen, rat PC antigen, *Pneumocystis carinii* antibody detection, immunoblotting.

Literatur

1. ALEXANDER, R. R., GRIFFITHS, J. M., WILKINSON, M. L.:
Basic Biochemical Methods
John Wiley & Sons, New York (1985).
2. BURNS, S. M., READ, J. A., YAP, P. L., BRETTLE, R. P. (1990):
Reduced Concentrations of IgG Antibodies to *Pneumocystis carinii* in HIV-infected Patients during active *Pneumocystis carinii* Infection and the Possibility of Passive Immunisation.
J. Infect. 20, 33-39.
3. GRAVES, D. C., McNABB, S. J. N., WORLEY, M. A., DOWNS, T. D., IVEY, M. H. (1986):
Analyses of Rat *Pneumocystis carinii* Antigens Recognized by Human and Rat Antibodies by Using Western Immunoblotting.
Infect. Immun. 54, 96-103.
4. KIM, H. K., HUGHES, W. T., FELDMAN, S. (1972):
Studies of Morphology and Immunfluorescence of *Pneumocystis carinii*.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 141, 304-309.
5. LAEMMLI, U. K. (1970):
Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Heat of Bacteriophage T 4.
Nature 227, 680-685.

6. LEMMER, K. (1991):
Dissertationsarbeit (in Vorbereitung).
7. FREYTAG, A. (1990):
Isolierung und Anreicherung von *Pneumocystis carinii* aus der Ratte bei experimentell erzeugter Pneumocystosis. Vergleichende Untersuchungen mit vom Menschen isolierten *Pneumocystis carinii*-Stämmen.
Dissertationsarbeit an der Medizinischen Fakultät der Ludwig Maximilians-Universität, München.
8. MADDISON, S. E., HAYES, G. V., IVEY, M. H., TSANG, V. C. W., SLEMENDA, S. B., NORMAN, G. (1982):
Fractionation of *Pneumocystis carinii* Antigens Used in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Antibodies and in the Production of Antiserum for Detecting *Pneumocystis carinii* Antigenemia. *J. Clin. Microbiol.* 15, 1029-1035.
9. MADDISON, S. E., HAYES, G. V., SLEMENDA, S. B., NORMAN, L. G., IVEY, M. H. (1982):
Detection of Specific Antibody by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Antigenemia by Counterimmunoelectrophoresis in Humans Infected with *Pneumocystis carinii*. *J. Clin. Microbiol.* 15, 1036-1043.
10. NORMAN, L., KAGAN, I. G. (1973):
Some Observations of the Serology of *Pneumocystis carinii* by Immunofluorescence. *Infect. Immun.* 8, 317-321.
11. PESANTI, E. L., SHANLEY, J. D. (1988):
Glycoproteins of *Pneumocystis carinii*: Characterization by Electrophoresis and Microscopy. *J. Infect. Dis.* 158, 1353-1359.
12. PIFER, L. L., NIELL, H. B., LANGDON, S. B., BALTZ, S., CLARK, S. T., EDWARDS, C. C., WOODS, D. R. (1987):
Evidence for Depressed Humoral Immunity to *Pneumocystis carinii* in Homosexual Males, Commercial Plasma Donors and Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 25, 991-995.
13. SZABADOS, A., FREYTAG, A., TYBUS, K., SCHIERZ, G., DEINHARDT, F. (1986):
Neues Verfahren zur Gewinnung von *Pneumocystis carinii* aus der Rattenlunge: Gewinnung von *Pneumocystis carinii*-Antigen mit Hilfe der „forcierten“ Lungenperfusion. *Mitt. Österr. Tropenmed. Parasitol.* 8, 197-202.
14. WALZER, P. D., RUTLEDGE, M. E. (1980):
Comparison of Rat, Mouse and Human *Pneumocystis carinii* by Immunofluorescence. *J. Infect. Dis.* 142,449.
15. WAIZER, P. D., LINKE, M. J. (1987):
A Comparison of the Antigene Characteristics of Rat and Human *Pneumocystis carinii* by Immunoblotting. *J. Immun.* 138, 2257-2265.

KORRESPONDENZADRESSE:

Dipl. Biol. Karin Lemmer
Max von Pettenkofer Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der
Universität München

Pettenkoferstraße 9a
D-8000 München · Bundesrepublik Deutschland

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1991

Band/Volume: [13](#)

Autor(en)/Author(s): Lemmer Karin, Szabados Andreas, Deinhardt F.

Artikel/Article: [Untersuchungen zur immunologischen Spezifität von Pneumocystis carinii-Antigen aus Mensch und Tier. 133-144](#)