



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Molekularbiologischer Nachweis Azol-Resistenz vermittelnder Mutationen im *cyp51A*-Gen von *Aspergillus fumigatus* bei immunsupprimierten Patienten mit invasiver *Aspergillus*-Infektion

Autor: Patricia Amely Elisabeth Postina
Institut / Klinik: III. Medizinische Klinik
Doktorvater: Prof. Dr. D. Buchheidt

Immunsupprimierte Patienten, insbesondere hämatologische Patienten mit protrahierter Neutropenie, haben ein erhöhtes Risiko, an lebensbedrohlichen Pilzinfektionen zu erkranken, großteils verursacht durch *Aspergillus fumigatus*. Invasive Aspergillose werden primär mit Triazol-Antimykotika behandelt. Seit 1997 werden Resistenzen, inzwischen auch Pan- und Multi-Azol-Resistenzen bei *Aspergillus fumigatus* beschrieben, die zu einer erhöhten Sterblichkeit führen. Ursächlich für eine Vielzahl der Resistenzen sind Mutationen im *cyp51A*-Gen, das für die 14- α -Sterol-Demethylase, einem wichtigen Enzym in der Ergosterolbiosynthese und Angriffsort der Azol-Antimykotika, codiert. Besonders häufig finden sich die TR34/L98H- und die TR46/Y121F/T289A-Mutation im *cyp51A*-Gen. Hierbei handelt es sich um Punktmutationen beziehungsweise um Tandem-Repeat-Sequenzen in der Promotor-Region des Gens.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung neuer PCR-Reaktionsansätze zur nicht-kulturbasierten Detektion Azol-Resistenz vermittelnder Mutationen direkt in klinischen Proben von überwiegend hämatologischen Hochrisiko-Patienten mit invasiven *Aspergillus*-Infektionen, sowie die Verbesserung bereits in der Mannheimer Arbeitsgruppe „Molekularbiologische Diagnostik invasiver Pilzinfektionen“ etablierter PCR-Reaktionsansätze. Außerdem sollte die Häufigkeit Azol-Resistenz vermittelnder Mutationen untersucht werden. Hierzu wurden 200 klinische Proben von 172 Patienten (131x BAL, 28x Blut, 18x Gewebe, 20x Liquor cerebrospinalis, 1x Pleurapunktat, 1x Urin, 1x aufbereitete DNA) aus den Jahren 1995 bis 2014 untersucht. Es wurden drei verschiedene Mutationen im *cyp51A*-Gen (L98H-, M220-Punktmutation, TR34-Tandem-Repeat-Mutation) mit Hilfe von drei PCR-Reaktionsansätzen untersucht. Ein definitiver Mutationsnachweis erfolgte anschließend durch Sequenzierung der amplifizierten Sequenz. In vier Proben konnten in der anschließenden Sequenzierung Mutationen im *cyp51A*-Gen gefunden werden. Bei zweien handelte es sich um die am häufigsten als Resistenz vermittelnd beschriebene TR34/L98H-Mutation. Beide Patienten litten an hämatologischen Erkrankungen (AML bzw. ALL). Eine einzelne L98H-Punktmutation konnte bei einem weiteren Patienten entdeckt werden. Erstmals wurde eine N90K-Mutation beschrieben, eine Aussage über Resistenzen gegenüber Triazol-Antimykotika konnte jedoch nicht getroffen werden. Die Prävalenz Azol-Resistenz vermittelnder Mutationen in Deutschland über einen Zeitraum von 20 Jahren beträgt 1,74 Prozent (3/172 Patienten), wobei die meisten Resistenzkonstellationen ab 2010 nachweisbar sind. 2012 wurde erstmalig die TR46/Y121F/T289A-Mutation in Belgien beschrieben, die eine hochgradige Resistenz vor allem gegenüber Voriconazol, dem aktuellen Erstlinientherapeutikum, verursacht. In dem neu etablierten TR46-PCR-Reaktionsansatz wurden 58 Proben auf das Vorliegen einer Tandem-Repeat-Mutation in der Promotorregion des *cyp51A*-Gens untersucht, Mutationen konnten nicht gefunden werden.

Azol-Resistenz bei *Aspergillus fumigatus* stellt mittlerweile ein weltweites diagnostisches und therapeutisches Problem dar; dies erfordert die Etablierung weiterer schneller, möglichst kultur-unabhängiger Verfahren zur Detektion und Charakterisierung des Erregers bei Hochrisiko-Patienten.