

AUS DER KINDERKLINIK UND KINDERPOLIKLINIK
IM DR. VON HAUNERSCHEN KINDERSPITAL
KLINIKUM DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN
DIREKTOR: PROF. DR. DR. MED. CHRISTOPH KLEIN

Untersuchungen der Wirt-Pathogen Interaktion bakterieller Infektionen auf molekularer Ebene

Kumulative Habilitationsschrift
zum Erlangen der Venia Legendi für das Fach Kinder- und Jugendmedizin

vorgelegt

von

Dr. Hartwig Ulrich von Both

2019

Fachmentorat:

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

Herr Prof. Dr. med. Johannes Hübner

Herr Prof. Dr. med. Michael Hölscher

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Hintergrund	1
1.2.	Fragestellung und Zielsetzung des Habilitationsprojekts	2
1.3.	Vorarbeiten und Einstieg in die Thematik	3
1.3.1.	Pathogenitäts- und Virulenz-Faktoren bakterieller Erreger – Genomische Kartierung am Modell-Organismus <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	3
2.	Ergebnisse	3
2.1.	Etablierung der Klonierung großer DNA-Abschnitte und Konstruktion eines neuen molekularbiologischen Instruments für funktionell-genomische Untersuchungen	3
2.2.	Funktionelle Genomik: Virulenz-Transfer zwischen pathogenen und apathogenen bakteriellen Spezies (Beispiel <i>L. monocytogenes</i> und <i>L. innocua</i>)	4
2.3.	Molekulare Epidemiologie pathogener Erreger – Modell-Organismus <i>S. agalactiae</i>	6
2.4.	Humane Immunantwort auf Transkriptom-Ebene als Schlüssel zum Verständnis des Erfolgs intrazellulärer Erreger – Modell-Organismus <i>M. tuberculosis</i> / <i>M. bovis</i> BCG	10
2.5.	Auswirkungen der Wirt-Pathogen Interaktion auf zellulärer Ebene und deren Bedeutung in der klinischen Tuberkulose – molekulare Marker $\text{INF}\gamma^+$ Mtb-spezifischer CD4 T Zellen	15
3.	Schlussbetrachtung und Ausblick	19
4.	Literatur	21
5.	Referenzierte Anlagen	24
6.	Verzeichnis der wissenschaftlichen Veröffentlichungen	26
7.	Danksagung	32

1. Einleitung

1.1. Hintergrund

Seit ihrer Geburtsstunde koexistiert die Menschheit mit einer unvorstellbaren Vielfalt mikrobieller Erreger. Ein Großteil dieser Mikroorganismen stellen bakterielle Spezies dar, die entweder von großem Nutzen oder gelegentlich ein Feind für das Wohlbefinden des Menschen sein können. Schon in ägyptischen Mumien konnten Zeichen des Befalls des menschlichen Organismus mit bakteriellen Pathogenen nachgewiesen werden, zum Beispiel durch Nachweis typischer Veränderungen infolge einer Tuberkulose-Erkrankung. [14, 55] Aus Sicht des menschlichen Körpers und seines Bestrebens, eine Homöostase aufrecht zu erhalten, ist es entscheidend, dass gegenüber nützlichen Mikroorganismen eine gewisse Toleranz geübt wird. Hingegen müssen Erreger von Infektionskrankheiten effektiv bekämpft und, idealerweise, vollständig eliminiert werden. Aus Sicht des bakteriellen Erregers und dessen Ausrichtung auf die Erhaltung der eigenen Spezies ist es wiederum von zentraler Bedeutung, die effektive Immunantwort des menschlichen Wirts zu umgehen, zu überlisten oder, zumindest in Teilen, auszuschalten. Die Erforschung dieses komplexen Feldes der Wirt-Pathogen Interaktion, die ganz wesentlich durch das Zusammenspiel von bakteriellen Pathogenitäts- und Virulenz-Faktoren auf der einen und den zahlreichen Molekülen und Mechanismen des unspezifischen sowie des spezifischen Arms des menschlichen Immunsystems beruht, hat durch die Methodik der Molekularbiologie sowie durch die sogenannte ‚*genomic revolution*‘ einen ungeahnten Schub erfahren. Waren ehemals Lichtmikroskopie, spezielle Färbetechniken oder Antigen-Antikörper Reaktion (wie bei der Verwendung von ELISAs) zum direkten oder indirekten Erregernachweis eingesetzt worden, wurden nun Klonierungen und die Analyse einzelner DNA-Abschnitte sowie automatische Sequenzierungen immer größerer DNA-Moleküle möglich. [34, 35] Schließlich war auch die Analyse der Genexpression (*transcriptomics*), die *whole genome* bzw. *whole exome* Sequenzierung (*genomics*) sowie die Beschreibung sogenannter epigenetischer Mechanismen möglich. Insbesondere die Entwicklung der Genexpression Microarrays [47, 48] stellte eine Revolution auf diesem Gebiet dar; diese wurden mittlerweile von sogenannten *next-generation sequencing* Methoden (u.a. RNA Sequenzierung) schrittweise abgelöst. Die Methodik hat ganz wesentlich dazu beigetragen, dass wir nun komplex Zusammenhänge auf molekularer Ebene besser verstehen können. All diese Möglichkeiten eröffnen eine Vielzahl innovativer Untersuchungsansätze der Wirt-Pathogen Interaktionen und bieten zudem auch neue Möglichkeiten der Diagnostik von Infektionskrankheiten. So hat beispielsweise die Analyse der humanen Immunantwort auf Geneexpressionsebene gezeigt, dass spezifische bakterielle oder auch parasitäre Erreger (wie z.B. *Plasmodium falciparum*, der Erreger der Malaria tropica) eine spezifische Geneexpressionssignatur beim Menschen hinterlassen. [46] Da die Tuberkulose den Kliniker noch immer vor große diagnostische Herausforderungen stellt, insbesondere im Kindesalter aufgrund ihrer paucibacillären Form, wäre die Beschreibung einer entsprechenden spezifischen Geneexpressionssignatur hier von großer Relevanz. Erste Arbeiten in diese Richtung zeigen bereits sehr

vielversprechende Hinweise, dass diese ‚indirekte‘ Diagnosestellung der Tuberkulose möglich sein kann. [3, 10, 28] Aber auch die Wirt-Pathogen Interaktion auf immun-zellulärer Ebene, vor allem mittels Flow zytometrischer Analysen phänotypischer Variationen von Lymphozyten im Kontext unterschiedlicher Erkrankungsstadien stellt einen weiteren Bereich dar, der viel Potential für das klinische Management der Tuberkulose bietet [44, 52, 53]. Entsprechend des Prinzips *from-bench-to bedside* wird hier versucht, dass wissenschaftliche Erkenntnisse baldmöglichst dem individuellen Patienten zugute kommen.

1.2. Fragestellung und Zielsetzung des Habilitationsprojekts

Zielsetzung dieses Habilitationsprojektes war die Charakterisierung und Beschreibung der Wirt-Pathogen Interaktion bakterieller Infektionen auf molekularer Ebene. Dieses Zusammenspiel sollte von Seiten beider Beteiligter, also aus Sicht der bakteriellen Erreger sowie aus Sicht der menschlichen Immunantwort, näher untersucht werden. Auch die klinische Relevanz der untersuchten Erreger war hierbei aus Sicht des klinisch tätigen Pädiaters und Infektiologen von Bedeutung, weshalb auch Aspekte der molekularen Epidemiologie pädiatrisch bedeutender bakterieller Isolate Teil dieses Projekts wurden. Schließlich sollten die Arbeiten des Habilitationsprojekts auch einen praktischen Bezug zu relevanten Aspekten des klinisch-infektiologischen Arbeitens, z.B. der Verbesserung der Diagnostik und Prävention von Infektionserkrankungen, aufweisen. Dieses Projekt ist gleichzeitig ein Spiegelbild der Entwicklung technischer Errungenschaften der letzten Jahre auf dem Gebiet der molekularen Analyse.

Im Wesentlichen befasste sich dieses Projekt mit den folgenden Fragestellungen:

- A. Versuch eines partiellen Virulenz-Transfer zwischen pathogenen und apathogenen bakteriellen Spezies (Beispiel: *L. monocytogenes* EGD-e und *L. innocua*) im Sinne funktioneller Genomik.
- B. Beschreibung der molekularen Epidemiologie pädiatrisch-infektiologisch relevanter bakterieller Erreger am Beispiel von *S. agalactiae*.
- C. Beschreibung der molekularen Mechanismen erfolgreicher Immun-Evasion intrazellulärer Erreger auf Wirt-Transkriptom Ebene am Beispiel von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. bovis* BCG.
- D. Charakterisierung der Auswirkungen unterschiedlicher klinischer Stadien der Tuberkulose auf die Wirt-Pathogen Interaktion auf zellulärer Ebene durch durchflusszytometrische Analyse molekularer Marker auf INF γ + *M. tuberculosis*-spezifischen CD4 T Zellen

1.3. Vorarbeiten und Einstieg in die Thematik

1.3.1. Pathogenitäts- und Virulenz-Faktoren bakterieller Erreger – Genomische Kartierung am Modell-Organismus *L. monocytogenes* EGD-e

Der erste Abschnitt des Habilitationsprojekts entstand auf der Grundlage von Vorarbeiten im Rahmen der Dissertation. Das pathogenetische Potential eines Erregers wird entscheidend durch das Vorhandensein spezifischer Virulenz Faktoren und der dafür codierenden Gene bestimmt. Die genaue Kartierung solcher Virulenz Faktor-Gene ist für das Verständnis der Evolution von Pathogenität von entscheidender Bedeutung. Im Rahmen der Dissertation konnte erstmals eine akkurate physikalische Karte des Ringchromosoms von *L. monocytogenes* EGD-e 1/2a erstellt werden [11]. Das Virulenzgen-Cluster (vgc) stellt dieser Karte zufolge eine Anordnung einiger dieser Virulenzgene (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*) im Verbund auf einem chromosomalen Abschnitt dar und wird auch als *Listeria* pathogenicity island 1 (LIPI-1) bezeichnet. Weitere bekannte Virulenzgene (*inlAB*, *inlFDE*, *flaR*, *irpA*) konnten an entfernter gelegenen Abschnitten auf dem Ringchromosom kartiert werden [11].

Für diese erfolgreiche Genkartierung der *L. monocytogenes* Virulenzgene wurde die Methodik der Pulsed Field Gel-Elektrophorese (PFGE) mit einer neuartigen und innovativen Klonierungsstrategie und DNA-Hybridisierungstechniken gepaart. Darüber hinaus wurden die klonierten DNA-Abschnitte mittels ALF-Sequenzierung auf von Hand gegossenen Polyacrylamid-Gelen durchgeführt (ALFexpress DNA Analysis System from Pharmacia Biotech). Hierbei handelte es sich um ein, zur damaligen Zeit, erstes voll-automatisches Elektrophorese System, das auf einem neuartigen Detektionssystem Laser-induzierter Fluoreszenz beruhte. Der im Rahmen dieser Anwendung zur Detektion verwendete Fluorophor war der fluoreszierende Carbocyanin Marker Cy5. Die Methodik war sehr zeitaufwendig und die Länge der adäquat zu sequenzierenden Abschnitte auf max. 300bp begrenzt. Die von mir in diesen Vorarbeiten generierte physikalische Karte diente im Verlauf als wertvolle Referenz bei der Annotation der sequenzierten Genabschnitte und trug somit zum erfolgreichen Abschluss des *Listeria* Genom-Projekts bei. [19, 21]

2. Ergebnisse

2.1. Etablierung der Klonierung großer DNA-Abschnitte und Konstruktion eines neuen molekularbiologischen Instruments für funktionell genomische Untersuchungen

Bakterielle Erreger benötigen für die erfolgreiche Invasion menschlicher Zellen und Gewebe spezifische Virulenzfaktoren, wie z.B. das vgc oder auch die Internaline (*inlA*, *inlB*, *inlF*, *inlD*, *inlE*) im Fall von *L. monocytogenes*. Um erstmalig eine Klonierung des gesamten und damit zusammenhängenden *L. monocytogenes* Virulenzgen-Clusters zu ermöglichen, wurde die Klonierung großer DNA Abschnitte

(100-200 kb) in sogenannte BAC-Vektoren (BAC = Bacterial Artificial Chromosome) etabliert. Die BAC-Vektor Technologie erlaubte die Erstellung von sogenannten Genbanken, die das gesamte Genom eines Erregers, z. B. von *L. monocytogenes* abbilden. Auf der Grundlage dieses Systems konnte im Rahmen des Projekts ein neuer Vektor konstruiert werden (pUvBBAC), der sowohl über einen Promotor für Gram-positive als auch einen für Gram-negative Mikroben verfügt (Abbildung 1). Dieser 11827 bp große BAC-Vektor pUvBBAC schuf die wesentlichen Voraussetzungen für die erstmalig erfolgreiche Klonierung des gesamten Virulenzgen-Clusters *L. monocytogenes* EGD und dessen Expression in *E. coli* DH10 β und in anderen *Listeria* Spezies (**Anlage 1**). Die Mutanten *L. innocua*(pUvBBAC+vgc1) und *L. innocua*(pUvBBAC+vgc2) unterschieden sich allein im Hinblick auf die Orientierung des klonierten vgc auf pUvBBAC.

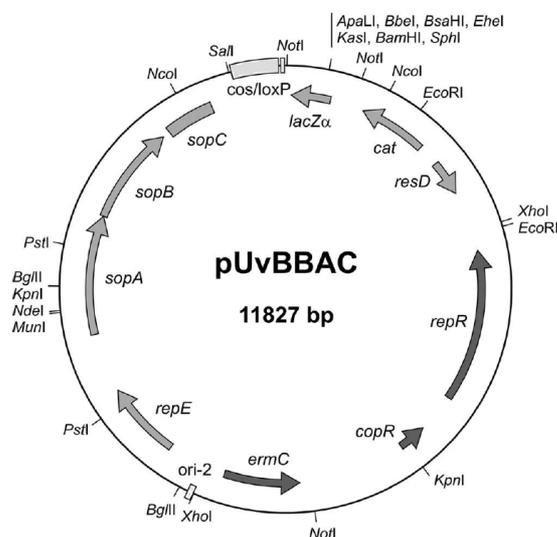


Abb. 1.: Genetische Karte des neu entwickelten *bacterial artificial chromosome* (BAC) Vektors pUvBBAC. [21] – **Anlage 1**

2.2. Funktionelle Genomik: Virulenz-Transfer zwischen pathogenen und apathogenen bakteriellen Spezies (Beispiel *L. monocytogenes* und *L. innocua*)

Ein partieller Transfer von *L. monocytogenes* Virulenz Faktor-codierenden Genen auf einen für den Menschen apathogenen Erreger wie *L. innocua* könnte zu dessen partieller ‚Aufrüstung‘ des pathogenetischen Potenzials führen und die sequenzielle Entstehung bakterieller Pathogenität illustrieren.

Aufbauend auf dem neu generierten Vektor pUvBBAC und nach Klonierung des *Listeria monocytogenes* Virulenzgenclusters waren die Voraussetzungen für einen Virulanztransfer gegeben, der Untersuchungen auf dem Gebiet der funktionellen Genomik ermöglichte. Im weiteren Verlauf der experimentellen Arbeiten wurden das Potential dieses neuen shuttle-Vektors untersucht und die beiden ‚aufgerüsteten‘ Mutanten *L. innocua*(pUvBBAC+vgc1) bzw. *L. innocua*(pUvBBAC+vgc2) auf ihre neu

erworbenen Fähigkeiten hin untersucht. Die funktionellen Ergebnisse dieser Arbeiten waren eindrucklich[21]- **Anhang 1.** Beide *L. innocua* Klone zeigten neben der neu erworbenen Fähigkeit zu hämolytischer Aktivität (demonstriert auf Blut Agar Platten) nun tatsächlich auch die Fähigkeit zu intrazellulärem Wachstum und intrazellulärer Mobilität, wie in den beiden Abbildungen 2 und 3 dargestellt wird.

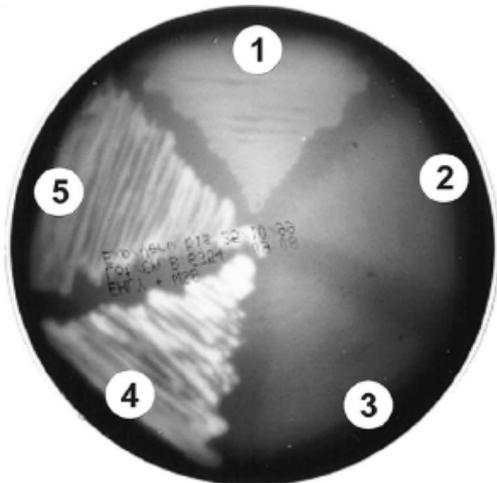


Abb.2: Hämolytische Aktivität auf Blut-Agarplatten: 1, *L. monocytogenes* EGD-e; 2, *L. innocua*; 3, *L. innocua*(pUvBBAC); 4, *L. innocua*(pUvBBAC+vgc1); 5, *L. innocua*(pUvBBAC+vgc2). [21]

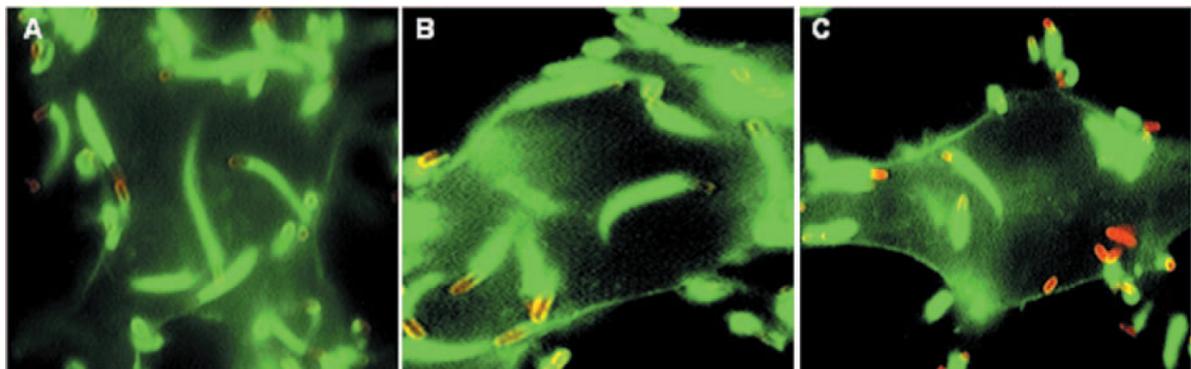


Abb.3: Vergleichende Darstellung der intrazellulären Akkumulation und Motilität von *L. monocytogenes* EGD-e (A), *L. innocua*(pUvBBAC+vgc1) (B) und *L. innocua*(pUvBBAC+vgc2) (C) 4 Stunden nach Infektion einer J774 Makrophagen Zell-linie. Listerien wurden mittels eines monoklonalen Antikörpers N81/N111 gegen ActA detektiert und mittels eines zweiten Cy3-markierten Antikörpers dargestellt. Actin Filamente sind in dieser Darstellung mit Oregon Green 488-konjugiertem Phalloidin grün gefärbt. [21]

Die Konstruktion und Anwendung dieses ersten BAC Vektors, der einen stabilen Einsatz im Sinne eines ‚Shuttle‘ Vektors zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien ermöglicht, ist eine ganz wesentliche Errungenschaft für das Gebiet der Infektionsforschung. Das System konnte im Rahmen der

oben dargestellten Arbeiten eindrücklich getestet werden. Damit wurde das molekularbiologische Handwerkszeug zur genetischen Untersuchung entscheidend erweitert und pUvBBAC wurde in der Folge bereits von mehreren Arbeitsgruppen erfolgreich eingesetzt [39]. Damit konnten nun funktionelle Genomanalysen großer chromosomaler DNA-Fragmente in einer großen Anzahl relevanter bakterieller Pathogene (wie z.B. *Staphylococcus*, *Streptococcus* und *Enterococcus* Spezies), aber auch in industriell genutzten Stämmen (wie z.B. *Bacillus* oder *Lactobacillus* spp.), oder sogar für nicht kultivierbare Spezies in der Umwelt mittels BAC-Klonierung unternommen werden. [21]

In einer weiterführenden Arbeit konnten diese von mir generierten, rekombinanten *L. innocua* Stämme weiter charakterisiert werden. Es wurde gezeigt, dass die neuen Mutanten eine attenuierte *in vivo* Virulenz aufwiesen und eine deutlich reduzierte Wirts-Immunreaktion hervorriefen. Ähnlich wie der Wildtyp *L. monocytogenes* induzierten die rekombinanten *L. innocua* Isolate eine Typ I Interferon Antwort und die Protektion wurde via Listeria-spezifischer CD8 T-Lymphozyten vermittelt. Diese Ergebnisse sind deswegen von besonderem Interesse, da attenuierte bakterielle Stämme, die keine schwere Inflammation aber eine potentiell protektive Immunantwort hervorrufen, sich für eine Impfstoff-Entwicklung eignen, indem nicht-pathogene Bakterien als Impf-Vektoren verwendet werden. Der umgekehrte Ansatz der „Aufrüstung“ weniger virulenter bakterieller Spezies, wie z.B. von *M. bovis* BCG, wurde ebenfalls in diesem Zusammenhang unternommen [4, 29, 37, 40].

Zusammenfassend hat dieser Abschnitt des Habilitationsprojekts das Repertoire molekulargenetischer Methoden innovativ erweitert und in funktionellen Zell-Kultur Experimenten das Potential dieses *tools* demonstriert: der partielle Virulenz-Transfer - nach erfolgreicher Klonierung des vollständigen und zusammenhängenden *L. monocytogenes* EGD Virulenzgen-Clusters in pUvBBAC – von einem pathogenen auf einen apathogenen Vertreter des *Listeria* spp. zeigt, wie wir Virulenz in ihrer Evolution besser verstehen und erforschen können. Insgesamt wurden damit wesentliche neue Einblicke in die Entstehung von Pathogenität bakterieller Erreger ermöglicht, die weitere Anwendungen aufgrund der technischen Weiterentwicklung auf dem Gebiet der funktionellen Genomik erlauben.

2.3. Molekulare Epidemiologie pathogener Erreger – Modell-Organismus *S. agalactiae*

Die erfolgreiche Gestaltung der Wirt-Pathogen Interaktion aus Sicht des bakteriellen Erregers entspricht dem klinischen Bild einer manifesten Infektionskrankheit. Aufgrund meiner klinischen Ausrichtung auf die Infektiologie innerhalb der Kinder- und Jugendmedizin, sollte sich dieser Teil des Habilitationsprojekts mit der Charakterisierung solcher bakterieller Isolate befassen, die eine relevante Erkrankung im pädiatrischen Patientenkollektiv verursachen. Als Modell-Organismus wurden Gruppe B Streptokokken (GBS), *S. agalactiae*, gewählt, ein Pathogen, das eine ganz entscheidende Rolle als ursächliches Agens der neonatalen Sepsis darstellt. [31, 49] Klinisch unterscheidet man dem Verlauf nach eine *early-onset* (EOD) von einer *late-onset disease* (LOD), wobei die EOD innerhalb der ersten

6 Lebensstage, die LOD hingegen in einem Zeitraum von 7 – 90 Lebenstagen auftritt[51]. GBS werden in der Regel mittels Serotypisierung eingeteilt, wobei in Deutschland Serotyp (ST) III, ST Ia und ST V den größten Teil klinisch invasiver Isolate (Nationale Surveillance Studie über einen 2-Jahres Zeitraum 2001-2003) ausmachten (ST Ia, 15%, ST III 65%, ST V 8%).[15] Die Zuordnung zu den klinischen Verläufen EOD und LOD korreliert nicht eindeutig mit einzelnen Serotypen, wobei ST III assoziierte Erkrankung meist mit einer Meningitis einherging während ST Ia eher für eine Sepsis ohne Meningitis verantwortlich war. Aus infektiologischer Sicht spielt zudem das Thema Antibiotikaresistenz eine ganz wichtige Rolle in der täglichen klinischen Arbeit. Die GBS Sepsis ist ein, wie oben ausgeführt, schweres Krankheitsbild. Die adäquate antibiotische Therapie ist somit von entscheidender Bedeutung. Makrolide stellen eine der am häufigsten verwandten Antibiotika-Gruppen dar, insbesondere in der pädiatrischen Population. Aufgrund mehrere Berichte über eine Zunahme der Makrolid-Resistenz innerhalb klinischer Gruppe B Streptokokken Isolaten, galt ein spezielles Augenmerk bei den Arbeiten an diesem Teil des Habilitationsprojekts der Identifikation und Charakterisierung dieser Gruppe von Makrolid-resistenten klinischen Isolaten [32, 33, 38].

Eine genauere Charakterisierung klinischer GBS Isolate sollte auf molekularer Ebene erfolgen, um ggf. klonale Isolate bzw. Familien zu identifizieren, die mit einem spezifischen klinischen Verlauf, auch im Hinblick auf die Schwere der Erkrankung, assoziiert sein könnten (**Anlage 2**). Hierzu kam die in den ersten Abschnitten des Habilitationsprojekts erlernte und weiterentwickelte Technik der PFGE erneut zur Anwendung. Die Genotypisierung der insgesamt 288 invasiven GBS Isolate unter Verwendung der Restriktionsendonuklease *SmaI* ergab eine Verteilung auf insgesamt 7 Genotyp-Gruppen mit mehr als 10 Vertretern (G1 – G7) für 60% der Isolate. Weitere 22% der Isolate konnten zu Genotyp-Gruppen von weniger als 10 Vertretern zusammengefasst werden, während insgesamt 18% ein ganz individuelles Genotyp-Muster aufwiesen. Neben dieses nachweislich heterogenen Anteils an der GBS Population zeigte sich eine eindeutige Assoziation von Genotyp-Gruppen zu Serotypen (Abbildung 4). So korrelierten G1 und G2 beispielsweise eindeutig mit ST III, während sich ST Ia und ST V Isolate ganz überwiegend in den Gruppen G3 bzw. G4 wiederfanden. Darüber hinaus konnte in Zusammenschau mit den klinischen Daten eine Assoziation von G1 und G2 mit dem LOD bzw. Meningitis-Verlauf der Erkrankung aufgezeigt werden. Interessanterweise wies die größte Gruppe G1, die fast ausschließlich aus ST III Isolaten bestand, gleichmäßige Anteile von EOD und LOD auf, obwohl ST III in Vorarbeiten als eindeutig eher mit einer meningitischen Verlaufsform assoziiert beschrieben worden war (Abbildung 5).[9]

PFGE Group (% of All Isolates)	Serotypes							
	All	Ia	Ib	II	III	IV	V	NT
G1 (20%)	58	1			57			
G2 (9.7%)	28				28			
G3 (8.7%)	25	21			4			
G4 (7.6%)	22		1		2		18	1
G5 (4.5%)	13	1	10		2			
G6 (4.5%)	13		1	2	9		1	
G7 (4.9%)	14				14			
No major PFGE group (40%)	115	21	3	13	71	2	3	2
Total	288	44	15	15	187	2	22	3

NT indicates non typeable.

Abb. 4: Verteilung von 288 invasiven GBS Isolaten spezifischer molekularer, durch PFGE gewonnener, Genotyp-Gruppen (G1–G7) auf die bekannten Serotypen (ST).[9]

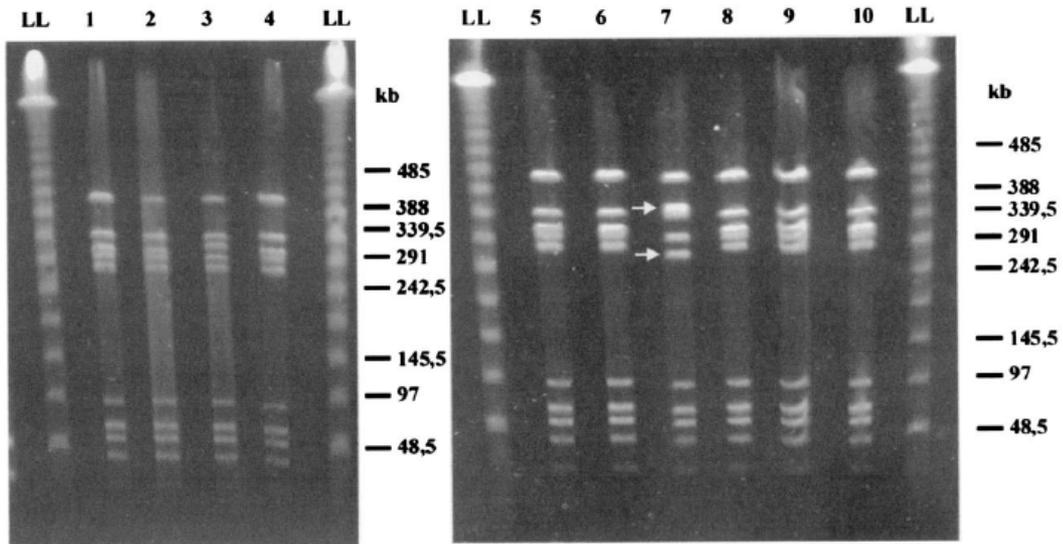
PFGE Group	EOD	LOD	No Data
G1 (n = 58)	25	33	
G2 (n = 28)	9	19	
G3 (n = 25)	17	8	
G4 (n = 22)	15	6	1
G5 (n = 13)	7	4	2
G6 (n = 13)	8	5	
G7 (n = 14)	7	7	
All isolates G1–G7 (n = 173)	88	82	3
Isolates other than G1–G7 (n = 115)	75	37	3

Abb. 5: Vergleich der auf 7 PFGE-Genotyp-Gruppen verteilten GBS Isolate mit Daten zur klinischen Präsentation der GBS-Erkrankung als entweder EOD oder LOD.[9]

Während in der oben beschriebenen Studie keine eindeutigen GBS Klone oder Familien beschrieben werden konnten, die mit besonders schweren Verläufen der GBS Erkrankung assoziiert wären, ergab eine Untersuchung von 339 GBS Isolaten (davon 193 neonatale und 146 maternale), die im Rahmen einer anderen Studie gewonnen worden waren, ein eindeutiges Ergebnis in Richtung einer klonalen Verbreitung (**Anlage 3**). Die Analyse dieser GBS Isolate zeigte ein Überwiegen an ST V unter den insgesamt 27 identifizierten Erythromycin-resistenten Isolaten. [12] Die weiterführende PFGE-Genotypisierung offenbarte dann das Bild eines spezifischen ST V Klons, der mit der Em-Resistenz vollkommen korrelierte (Abbildung 6).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde im weiteren Verlauf des Habilitationsprojekts eine größere Anzahl Em-resistenter klinischer GBS Isolate genotypisch und phänotypisch charakterisiert (**Anlage 4**). Insgesamt gingen 74 Em-resistente Isolate, inklusive der oben beschriebenen 27 Isolate, in diese Untersuchung ein. Antibiotikaresistenz gegenüber Makroliden ist genetisch determiniert. Die Resistenz entsteht zum einen aufgrund einer Mutation des *erm* kodierten Ribosoms (*macrolide-lincosamide-streptogramin B* Resistenz, MLS_B) mit einem induzierbaren (iMLS) oder konstitutiven (cMLS) Phänotyp. Ein anderer Mechanismus der Makrolid-Resistenz stellt eine Efflux-Pumpe dar (*mefA* kodiert), die für einen aktiven Transport der Makrolide aus der bakteriellen Zelle sorgt und damit die phänotypische Resistenz vom M Typ (M Phänotyp) determiniert. Die Ergebnisse zeigten ein Überwiegen des cMLS Phänotyps (n=39) sowie eine eindeutige Klonalität innerhalb der Gruppe der ST V Isolate, die zu 79% den gleichen Phänotyp (cMLS) aufwiesen (Abbildung 7)[8].

A



B

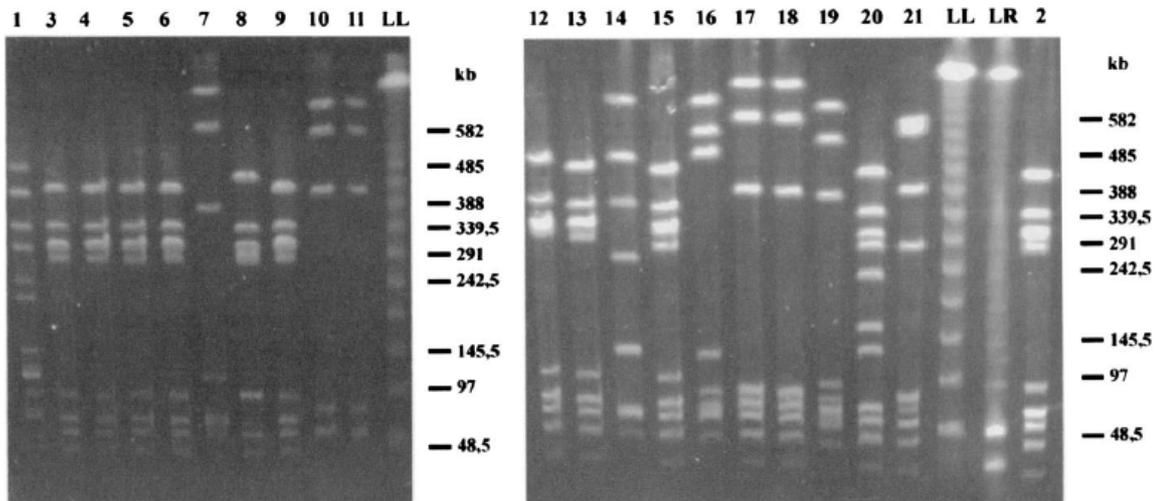


Abb.6: PFGE genomischer DNA von Erythromycin-resistenten (A) und - empfindlichen (B) Serotyp (ST) V GBS Isolaten nach Restriktionsverdau mit *Sma*I. Marker: Lambda ladder PFG Marker (LL) und low-range PFG Marker (LR) (A) *Sma*I Muster von 10 Erythromycin-resistenten ST V Isolaten, wobei das Isolat in Spur 7 lediglich für zwei Banden eine unterschiedliche Größe aufwies, einer einzigen zusätzlichen *Sma*I Restriktionsstelle entsprechend. (B) Spuren 1 bis 21 zeigen das Muster nach *Sma*I-Verdau von 21 Erythromycin-empfindlichen ST V GBS Isolaten. [12]

Abb. 7: Verteilung der GBS Serotypen innerhalb vier verschiedener Makrolid-Resistenz Phänotypen.

Phenotype	No. of isolates with serotype:							Total
	Ia	Ib	II	III	IV	V	NT	
P1	3	2	1	7	2	22	2	39
P2		1	1	4			1	7
P3	1	1		3	2	6		13
P4	4	2	2	6	1			15
Total	8	6	5	20	5	28	3	74

P1 = cMLS Phänotyp, P1 und P2 = iMLS Phänotyp P4 = M Phänotyp.
 Fett gedruckt ist der jeweils prädominierende Serotyp innerhalb der jeweiligen Phänotyp-Gruppe.
 NT = nicht typisierbar.

Diese Untersuchungen mit dem Ziel, mögliche spezifische GBS-Klone zu identifizieren, die mit einem schweren klinischen Verlauf oder einer Antibiotikaresistenz assoziiert sind, sind sowohl therapeutisch aber auch für die Entwicklung präventiver Maßnahmen, nicht zuletzt der angestrebten Entwicklung eines Impfstoffs, unerlässlich. Vor diesem Hintergrund waren die Ergebnisse dieser Arbeiten an *S. agalactiae* von besonderer klinischer Relevanz und konnten erstmals die molekulare Epidemiologie innerhalb klinischer GBS Isolate in Deutschland darstellen.

2.4. Humane Immunantwort auf Transkriptom-Ebene als Schlüssel zum Verständnis des Erfolgs intrazellulärer Erreger – Modell-Organismus *M. tuberculosis* / *M. bovis* BCG

Nachdem der Fokus der initialen Abschnitte des Habilitationsprojekts auf molekularen Aspekten bakterieller Pathogenität sowie funktioneller Genomik und molekularer Epidemiologie lag, versuchte der darauf folgende Teil durch eine genauere Untersuchung der Geneexpressionsmuster während der humanen Immunantwort gegen bakterielle Infektionen, Rückschlüsse auf Virulenz-Strategien des bakteriellen Erregers zu gewinnen. Die hierzu verwendeten und klinisch höchst relevanten Modellorganismen waren Mykobakterien, speziell *M. tuberculosis* H37Rv (Mtb) und *M. bovis* BCG (BCG).

Mycobacterium tuberculosis ist vermutlich das erfolgreichste und am besten an den menschlichen Wirt adaptierte bakteriellen Pathogen, das wir kennen. Weltweit ist ein gutes Drittel der Weltbevölkerung mit Mtb infiziert, jährlich kommen 9.6 Millionen Neuerkrankungen dazu, die zu ca. 1.5 Millionen Todesfällen pro Jahr führen. [54] Seit der Erstbeschreibung durch Robert Koch im Jahre 1882 konnte in zahlreichen funktionellen Untersuchung gezeigt werden, dass Mtb in menschlichen phagozytierenden Zellen, vor allem Makrophagen, überleben und sich vermehren kann, indem immunologische Mechanismen des Wirts umgangen oder teilweise ausgesetzt werden[5, 13, 16, 20, 22].

Ausgangspunkt für die Arbeiten an diesem Projekt war die Tatsache, dass diese funktionell gut bekannten und auf zellulärer Ebene entsprechend beschrieben Immun-Evasion Phänomene auf molekularer Ebene weitestgehend unverstanden sind (Abbildung 8).

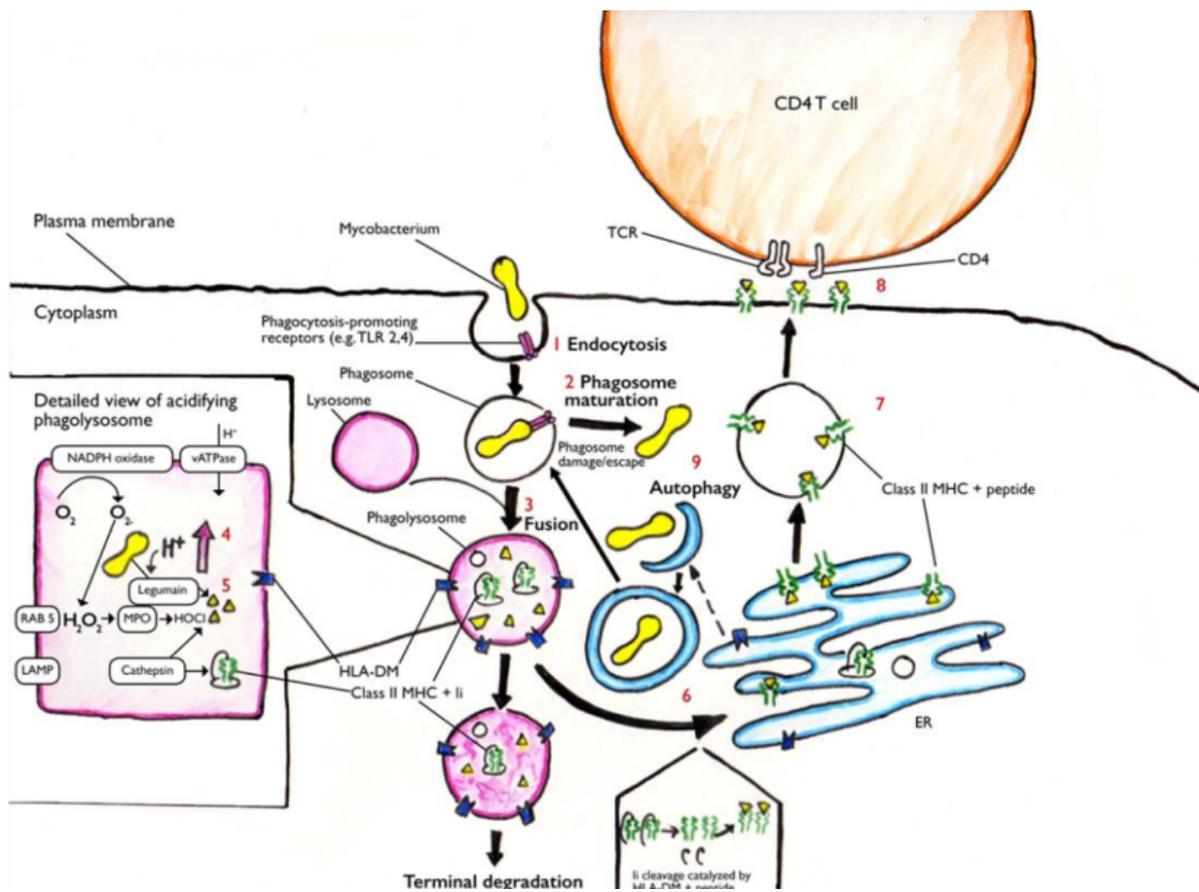


Abb.8: Intrazelluläre Mykobakterien umgehen die menschliche Immunantwort auf multiplen Ebenen. Diese Zeichnung (Design: U. von Both, Grafische Bearbeitung: C. Zwarenstein) gibt einen Überblick über die verschiedenen Prozesse, für die funktionelle Daten für eine Subversion der Wirtsantwort beschrieben worden sind. Eine Vielzahl dieser Prozesse wird durch Suppression der hierfür benötigten Enzyme auf Transkriptionsebene beeinflusst: **1)** Mykobakterien werden durch Phagozytose-assoziierte Rezeptoren erkannt und in eine frühe phagozytische Vakuole aufgenommen. **2)** Reifung des Phagosoms, **3)** Fusion von Phagosom und Lysosom zum Phagolysosom mit Einstrom proteolytischer Enzyme, **4)** Das innere Milieu des Phagolysosoms wird durch die Aktivität der vATPase sowie einer NADPH-Oxidase auf extrem niedrige pH Werte angesäuert, **5)** Zersetzung bakterieller Proteine zu einzelnen Peptiden, **6)** HLA-DM-vermitteltes Einbringen bakterieller Peptide in MHC Moleküle der Klasse II, **7)** Transport des [MHC Klasse II + Peptid] Komplexes vom Endoplasmatischen Retikulum zur Zelloberfläche, **8)** Präsentation des bakteriellen Peptid-Antigens durch das MHC Klasse II Molekül gegenüber CD4+ T-Zellen, **9)** Freie, ins Zytoplasma gelangte Mykobakterien werden durch die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms abgetötet (**Anlage 5**)[7].

Durch Verwendung eines gut etablierten Infektions-Assays (Infektion von Vollblut gesunder Probanden[41]) wurde die Infektion mit Mtb, sowie parallel mit BCG, *in vitro* bzw. *ex vivo* über einen Zeitraum von 96h auf molekularer Ebene (*whole genome* mRNA Expression, Expression von small ncRNAs, DNA-Methylierung sowie mittels ELISA und Durchflusszytometrie) untersucht. Der

experimentelle Ansatz umfasste die initiale Durchführung eines ‚Discovery‘ und in der Folge eines ‚Validation‘ Experiments. Faszinierenderweise zeigten die Experimente, dass nicht eine Immunaktivierung sondern vielmehr eine Immunparalyse durch Suppression zahlreicher relevanter Immun-Gene sowie komplexer Signalwege das dominierende Muster auf Genexpressionsebene war. Die weitere Analyse zeigte, dass hierbei vor allem Gene betroffen waren, die ihrer Funktion nach den folgenden Bereichen zugeordnet werden konnten: Pathogen-Erkennung, Phagozytose, Formierung des Phagolysosms und Abbau von Fremdmaterialien im Phagolysosom sowie Antigen-Verarbeitung und Präsentation. Dass die Veränderungen auf Transkriptom-Ebene entsprechend auch auf Protein-Ebene zu finden sind, konnte mittels ELISA und Durchflusszytometrie ausgewählter Gen-Protein Paare gezeigt werden. Unter den supprimierten Genen fand sich auch eine große Anzahl von mRNA-Transkripten, die für Zell-Oberflächen-Strukturen / Marker codieren. Der ganz überwiegende Teil (2/3) aller signifikant differentiell exprimierten (SDE) Gene dieser Gruppe zeigte eine deutliche Suppression im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontroll-Ansätzen.

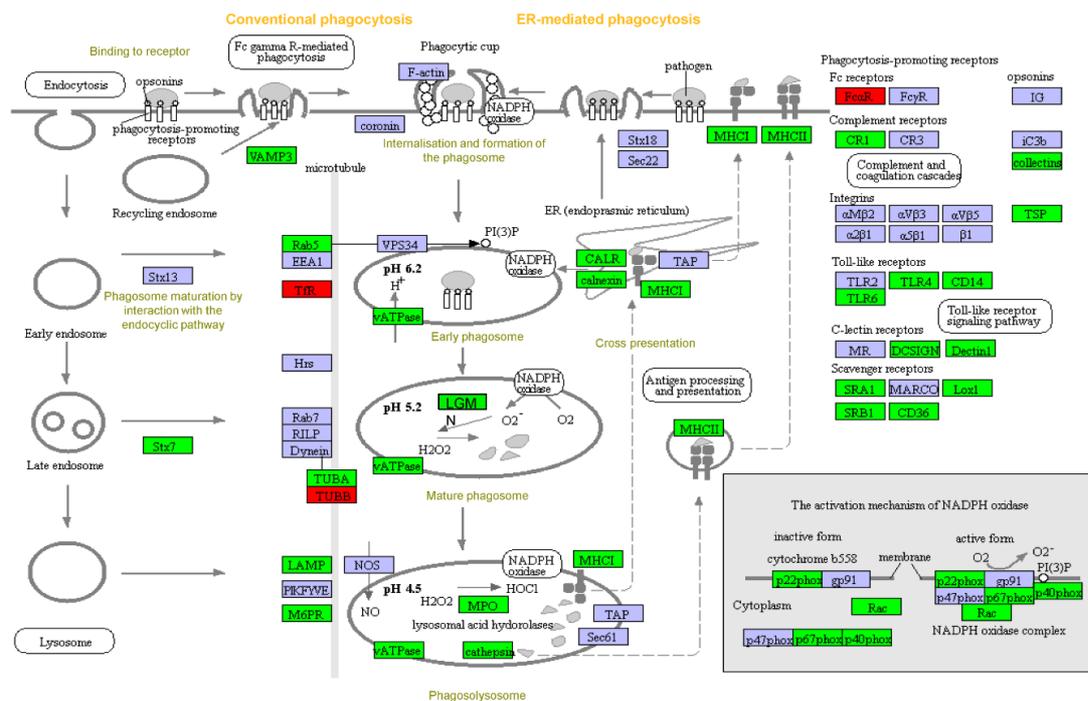


Abb. 9: Grafische Darstellung der an den Prozessen der Phagozytose beteiligten Enzyme und Signalwege, die an der Elimination von *M. tuberculosis* (Mtb) mitwirken. Gene, die im Rahmen der Wirt-Antwort gegen Mtb in dem beschriebenen Vollblut-Infektionsassay signifikant differentiell exprimiert (SDE) wurden, sind entweder aktiviert (rot) oder supprimiert (grün). In blau gefärbte Gene erreichten bei der biostatistischen Analyse keine Signifikanz hinsichtlich differentieller Expression im Vergleich zu den Kontrollen. Mit freundlicher Erlaubnis von Kegg Pathway analysis, www.kegg.jp/kegg/. [7]

Die dynamische Analyse des zeitlichen Ablauf des Infektionsexperiments illustrierte eine initiale kurzzeitige Aktivierung pro-inflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-6, IL-8, MIP-1a oder MCP-1). Aber nachdem die Mykobakterien in die phagozytierenden Zellen gelangt waren, erschien die Immunantwort unter anderem ganz wesentlich von einer Suppression solcher Gene geprägt zu sein, die für Zelloberflächenrezeptoren (inklusive einiger Toll-Like Rezeptoren), die zur Erkennung infizierter Zellen entscheidend sind, codieren. Ebenso von der ausgeprägten Gensuppression betroffen waren Signalwege, die für das intrazelluläre Abtöten von Mikroorganismen sowie die Aufbereitung und Präsentation von Antigenen an T- und B-Zellen des spezifischen Arms der Immunsystems essentiell sind (Abbildung 9). Damit wurde erstmalig ein möglicherweise entscheidender molekularer Mechanismus für die zuvor vielfach beschriebenen funktionellen Immundefekte im Rahmen der Infektion mit Mtb aufgezeigt: Eine gezielte Suppression der Expression von Genen, die für die Produktion von Proteinen in diesen wesentlichen immunologischen Signalwegen erforderlich sind (**Anlage 5**).

Die sich aus den oben aufgeführten Beobachtungen ergebende Frage, wie eine so große Anzahl von Genen koordiniert auf Transkriptionsebene supprimiert werden kann, wurde im Folgenden auf zweierlei Weise experimentell-analytisch angegangen. Zum einen wurden Expressionsdaten einer Vielzahl von small-non-coding RNAs, inklusive microRNAs, aus den gleichen experimentellen Proben des Infektions-Assays gewonnen. Hiermit sollte untersucht werden, ob ggf. ein epigenetischer Mechanismus - wie zum Beispiel die mRNA-miRNA Interaktion - eine Rolle in diesem Prozess der Gene-Suppression spielt. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass eine große Anzahl der SDE supprimierten Gene Ziel-RNAs (target RNAs) für microRNAs darstellten, die ebenfalls im gleichen Experiment SDE wurden. Damit erschien es möglich, dass ein Teil der ausgeprägten mRNA Suppression durch microRNA-vermittelte Prozesse verursacht wird. Einige dieser SDE miRNAs, wie zum Beispiel hsa-miR-155, hsa-miR-223 or hsa-miR-132, wurden bereits in verschiedenen Studien im Zusammenhang mit immunregulatorischen Mechanismen und der Pathogenese der Mtb Infektion beschrieben [17, 24, 25, 30]. Zum anderen wurde anschließend der Frage nachgegangen, ob Gene, die ein gleiches generegulatorisches Muster im Rahmen der Immunantwort gegenüber Mtb aufweisen, ggf. gemeinsame *upstream* regulatorische Elemente auf Genomebene aufweisen. Zu diesem Zweck wurde die Region 1500 bp upstream der *transcription start site* (TSS) der 100 höchst-supprimierten und der 100 höchst-aktivierten Gene auf das Vorhandensein gemeinsamer Sequenz-Muster hin untersucht. Diese aufwendige Analyse zeigte eine signifikante Anzahl genetisch konservierter Elemente ausschließlich in der Gruppe der supprimierten Gene im Vergleich zu den aktivierten Kontroll-Genen. Diese Elemente konnten im weiteren Verlauf als *Alu repeat elements* identifiziert werden, eine Gruppe parasitischer genetischer Elemente, die bereits in anderen Zusammenhängen als Gen-Regulatoren beschrieben worden waren. Vor dem Hintergrund einer wachsenden Zahl an Publikationen über sogenannte ‚*selfish genetic elements*‘ kann zusammenfassend als Ergebnis dieser Untersuchungen

festgestellt werden, dass sich die in dieser Arbeit identifizierten *Alu elements* möglicherweise als *upstream* regulatorische Elemente betrachten lassen, die eine profunde Suppression von Genen kontrollieren, die für die Immunantwort gegenüber Mykobakterien von essentieller Bedeutung sind.

Das menschliche Immunsystem ist ganz bemerkenswert in seiner Geschwindigkeit, mit der es auf all die mikrobiellen Pathogene reagiert, denen gegenüber wir Menschen während unseres ganzen Lebens ausgesetzt sind. Diese erste inflammatorische Antwort eliminiert in der Regel die meisten attackierenden Pathogene erfolgreich oder begrenzt sie auf einen umschriebenen Ort der Infektion, bis sich die zelluläre und Antikörper-vermittelte Antwort des spezifischen Arms des Immunsystems entwickelt. Trotz des evolutionären Erfolgs des menschlichen inflammatorischen und Immunsystems bei der Bewahrung unseres Überlebens angesichts der Vielzahl an pathogenen Erregern, denen wir uns gegenüber sehen, so ist eine exzessive oder unkontrollierte Inflammation meist doch mit schwerer Krankheit und Organdysfunktion sowie ggf. mit einem tödlichen Verlauf assoziiert, wie zum Beispiel im Rahmen eines SIRS oder septischen Schocks. [23] Daher ist es nicht überraschend, dass die Vielzahl inflammatorischer Prozesse zur Pathogen-Abwehr gepaart ist mit einem ebenso effektiven System biologischer Prozesse, das sich darauf spezialisiert hat, inflammatorische Prozesse zu supprimieren. Beide Systeme, die Aktivierung der Inflammation sowie das Bremsen der inflammatorischen Antwort ergänzen sich dementsprechend in einer perfekt ausgewogenen Balance, einer Art „Yin/Yang-Dualität“, die sowohl exzessive Inflammation als auch ineffektive Immunantwort zu vermeiden hilft.

Die in diesem Teil des Habilitationsprojekts (**Anlage 5**) dargestellte weitreichende Suppression der Gen-Transkription, speziell der Gene mit wichtigen immunologischen Funktionen, könnte darauf hinweisen, dass *Mtb* einen Weg gefunden hat, der die Immun-inhibitorischen Prozesse begünstigt bzw. „anschaltet“ und damit durch Inaktivierung der inflammatorischen Antwort einen Weg gefunden hat, intrazellulär im menschlichen Wirt zu überleben und damit einen ganz entscheidenden Überlebensvorteil zu gewinnen. Diese Untersuchungen der Wirt-Pathogen Interaktion des intrazellulären Erregers *Mtb* konnten somit eindrücklich demonstrieren, wie sich aus der Immunantwort des Menschen wichtige Rückschlüsse auf Virulenz-Strategien eines Erregers ziehen lassen. Die Frage, wie genau *Mtb* diese beschriebenen Mechanismen zu seinem Vorteil orchestriert und nutzt, ist Gegenstand weiterer Forschungsaktivitäten, unter anderem eines *Clinical Leave Fellowships*, das mir durch das Deutsche Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) verliehen wurden.

2.5. Auswirkungen der Wirt-Pathogen Interaktion auf zellulärer Ebene und deren Bedeutung in der klinischen Tuberkulose – molekulare Marker $\text{INF}\gamma^+$ Mtb-spezifischer CD4 T Zellen

Wie oben bereits ausgeführt spielen neben Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten die Gruppe der CD4⁺ T Zellen eine zentrale Rolle in der Interaktion zwischen *M. tuberculosis* und dem menschlichen Wirt. Während sich einige Arbeitsgruppen mit dem Gebiet der Transkriptom-Signatur aus Vollblut für die Diagnose der aktiven Tuberkulose (bei Kindern wie Erwachsenen; bei HIV⁺ wie HIV-Individuen) befassen, gibt es auch Flow-zytometrische Untersuchungen an Patientenproben, die eine Sputum-unabhängige Diagnostik der Tuberkulose erlauben können [3, 28, 53]. Der *T cell activation marker* (TAM) – TB Assay ist ein solches Verfahren, das auf dem Prinzip beruht, dass sich phänotypische Unterschiede an $\text{INF}\gamma^+$ Mtb-spezifischen CD4 T Zellen abhängig von der klinischen Ausprägung einer Tuberkulose detektieren lassen. Grundlage dieser phänotypischen Veränderungen ist die Tatsache, dass sich Funktion und Aktivierungsstatus dieser Immunzellen abhängig vom klinischen Status des einzelnen Patienten ausprägen, also unterschiedliche Muster im Kontext einer aktiven Tuberkulose (aTB), einer latenten tuberkulösen Infektion (LTBI) bzw. im gesunden Zustand / nach Heilung zu erkennen sind. Der TAM-TB Assay macht sich einen „maturation“ Marker (CD27) und drei „activation“ Marker (Ki67, CD38, HLA-DR) zu Nutze. Die initialen Arbeiten zum TAM-TB Assay, der von Christof Geldmacher entwickelt wurde ([44]), zielten darauf ab, einen **Sputum-unabhängigen diagnostischen Test** zu entwickeln, der es erlaubt, Patienten mit einer aTB von denen mit einer LTBI zu unterscheiden. Herkömmliche immunologische Tests erlauben lediglich eine Differenzierung zwischen „infiziert“ und „nicht-infiziert“, so z.B. die Gruppe der Interferon Gamma Release Assays (IGRA) oder der Tuberkulin-Hauttest (RT23 PPD SSI). Der TAM-TB Assay hingegen ist gewissermaßen ein Test, der zwei Ebenen umfasst. Zum einen basiert er auf der Detektion Mtb-spezifischer CD4 T-Zellen, vergleichbar dem Prinzip der IGRAs. Zusätzlich jedoch wird auf diesen selektierten T-Zellen die Expression der o.g. Marker gemessen, so dass die Dynamik innerhalb verschiedenen Erkrankungsstadien messbar wird. Die Arbeiten konnten zeigen, dass die „activation“ Marker bei Patienten mit aktiver Tuberkulose auf $\text{INF}\gamma^+$ Mtb-spezifischen CD4 T Zellen im Vergleich zu Patienten mit einer LTBI hochreguliert waren, während der „maturation“ Marker CD27 ein gegenteiliges Bild aufwies [43, 44, 50, 52].

Weiterführende und auf diesen Ergebnissen aufbauende Arbeiten, die ich zusammen mit meinem Kollegen Christof Geldmacher und Mohamed Ahmed sowie weiteren Mitarbeitern durchgeführt habe, legten den Fokus der Untersuchungen dann auf den Aspekt des **Therapie-Monitoring**. Hierzu ist eingangs zu erwähnen, dass es eine Reihe klinischer Studien der vergangenen Jahre gibt, die nahelegen, dass eine Vielzahl von Patienten, die wegen einer Tuberkulose behandelt werden, bereits vor Ende der in allen Leitlinien festgelegten Therapiedauer von mindestens 6 Monaten geheilt werden könnten [18, 26, 36]. Derzeit existiert kein Test, der eine Aussage darüber treffen hilft, ob und wann ein Patient als

geheilt gilt und wann – als Konsequenz – seine Therapie beenden kann. Diesem klinischen Problem wollten wir uns bei der Untersuchung unter Anwendung des TAM-TB Assays zuwenden. Im Rahmen dieser Arbeiten konnte tatsächlich gezeigt werden, dass dieser Test das Potential hat, in Zukunft die Therapieentscheidungen klinisch tätiger Ärzte zu unterstützen.

In der entsprechenden Studie (**Anlage 6**) wurden 16 Patienten mit LTBI sowie 39 Patienten mit aktiver pulmonaler Tuberkulose untersucht. Die Patienten wurden ursprünglich im Rahmen einer umfangreichen Therapiestudie rekrutiert und klinisch sowie laborchemisch hervorragend monitoriert[6]. Patienten mit aTB wurden über den gesamten Therapiezeitraum eng kontrolliert und anschließend für weitere 6 Monate nachverfolgt. Initial wurden bis Woche 12 wöchentlich Sputum Kulturen unter Verwendung des MGIT Systems durchgeführt, anschließend an vier weiteren Zeitpunkten bis zum Ende der Therapie (Woche 26). Damit konnten die 4 o.g. Marker von IFN γ + Mtb-spezifischen CD4 T Zellen aus peripherem Blut bei Patienten mit LTBI sowie Patienten mit einer aktiven Tuberkulose zum Zeitpunkt des Therapiestarts und unter anti-tuberkulöser Therapie, inklusive eines Vergleichs zum mikrobiologischen Therapieansprechen, untersucht werden.

Der TAM TB Assay zeigte eine eindeutige Dynamik in der Expression der „activation“ Marker CD38, HLA-DR und Ki67 während der „maturation“ Marker CD27 keine wesentlich Veränderung während der 6 monatigen Therapie aufwies (Abbildung 10). Dies war vor dem Hintergrund anderer Arbeiten zu erwarten gewesen [52]. CD27 spielt somit für das Therapie Monitoring keine Rolle, war aber der beste Marker, um klinisch gesunde Individuen mit LTBI von Patienten, die nach 26 Wochen anti-tuberkulöser Therapie geheilt waren, zu unterscheiden ($p=0,0003$).

Besonders zu betonen ist hier, dass bereits zwei Monate nach Therapiestart der Anteil Aktivierungsmarker-positiver IFN γ + Mtb-spezifischen CD4 T Zellen im Vergleich zum Zeitpunkt des Therapiestarts signifikant reduziert ($p<0,0001$) war. Zudem konnte eine Korrelation der TAM TB Signatur (speziell der Marker CD38 und HLA-DR) mit dem individuellen Zeitraum bis zu einer stabilen mikrobiologischen Sputum-Konversion (im Sinne einer definitiv negativen Sputum Kultur für *M. tuberculosis*) aufgezeigt werden. Im Zuge der weiteren Analyse fiel auf, dass die Marker CD38, KI67 und HLA-DR sehr gut miteinander korrelierten, so dass die Bestimmung eines einzigen Aktivierungsmarkers (CD38) vermutlich ausreichen sein kann, um eine aktive Tuberkulose von einer LTBI zu unterscheiden und das Therapieansprechen zu kontrollieren. Dies ist vor dem Hintergrund der Vereinfachung des Tests und für dessen Umsetzung in die Praxis von entscheidender Bedeutung, da die Verwendung von lediglich 4 Antikörpern (CD4, INF γ , CD38, CD27) die durchflusszytometrische Analyse der jeweiligen Patientenprobe mit nur einem Laser statt zuvor drei Lasern erlaubt. Weitere Untersuchungen mit der vereinfachten Version des Tests sind derzeit im Gange und wurden durch einen FlexFund des DZIF gefördert. Diese Untersuchungen werden weitere wichtige Daten zur Evaluierung des TAM TB erbringen.

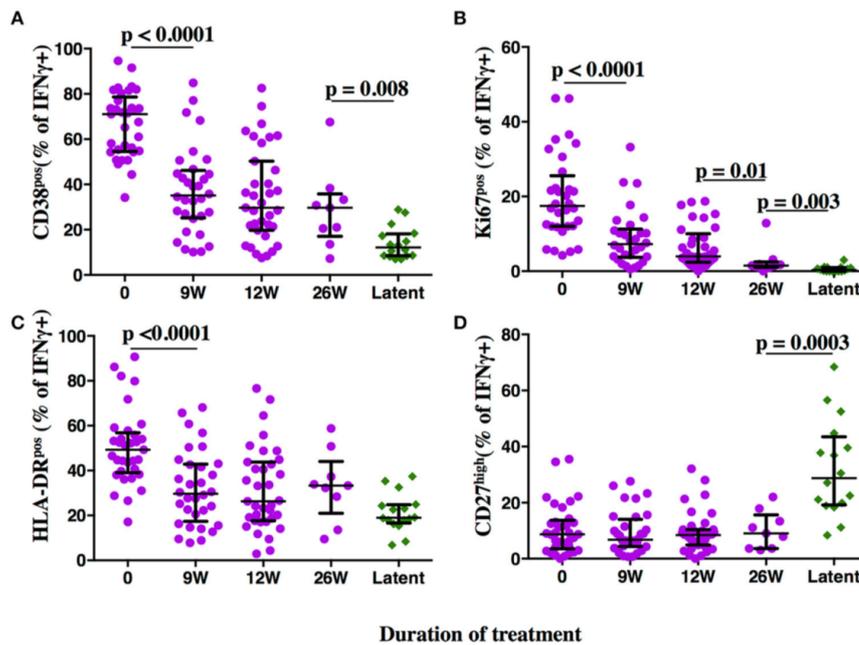


Abb.10: Darstellung der phänotypischen Profile von $\text{IFN}\gamma^+$ Mtb-spezifischen CD4 T Zellen in Patienten mit aktiver Tuberkulose, nach Beginn der anti-tuberkulösen Therapie und bei LTBI. Der Anteil von $\text{IFN}\gamma^+$ Mtb-spezifischen CD4 T Zellen, welche die „activation“ Marker CD38 (A), Ki67 (B), HLA-DR (C) bzw. den „maturation“ Marker CD27 (D) exprimieren, ist auf der jeweiligen y-Achse dargestellt. Die x-Achse illustriert die unterschiedlichen Zeitpunkte der Durchführung des TAM TB Assay (Baseline, 9. Woche, 12. Woche, 26. Woche nach Therapiestart). $\text{IFN}\gamma^+$ Mtb-spezifischen CD4 T Zellen wurden nach Stimulation mit PPD charakterisiert. Statistische Analysen wurden mittels Mann-Whitney Test durchgeführt., Violette Punkte = pulmonale TB Patienten; grüne Diamanten = LTBI Kontrollen (Anlage 6)[1].

Während die beschriebene Studie das Potential des TAM-TB Assays bei Patienten mit pulmonaler Tuberkulose, in Korrelation zur Sputum-Konversion, aufzeigen konnten, stellt sich die Frage, wie dessen Praktikabilität und Relevanz im Hinblick auf Diagnosestellung und Therapie Monitoring in Fällen einer extra-pulmonalen Tuberkulose ist. Um dies in einem ersten Schritt zu untersuchen, wurde ein jugendlicher (16 Jahre) Patient, der mit einer Tuberkulose des linken Hüftgelenks diagnostiziert wurde, über den gesamten Zeitraum der 12 monatigen anti-tuberkulösen Therapie mittels TAM-TB Assay untersucht. Die o.g. Marker wurden entsprechend auf $\text{IFN}\gamma^+$ Mtb-spezifischen CD4 T Zellen aus peripherem Blut des Patienten zu den folgenden Zeitpunkten untersucht (Zeitpunkt der Diagnosestellung, 1 Monat, 2 Monate, 6 Monate und 12 Monate nach Therapiestart). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 11 dargestellt. Es zeigte sich eine vergleichbar rasche Dynamik in den Anteilen von $\text{IFN}\gamma^+$ Mtb-spezifischen CD4 T Zellen mit Expression von CD38, Ki67 und HLA-DR, wie bei der Kohorte mit Pulmonaler Tuberkulose beschrieben. Der „maturation“ Marker CD27 wies erneut kein wesentlich verändertes Muster in den ersten 6 Monaten der Therapie auf. Allerdings nahm der Anteil von $\text{IFN}\gamma^+$ CD27⁺ Mtb-spezifischen CD4 T Zellen bis zum

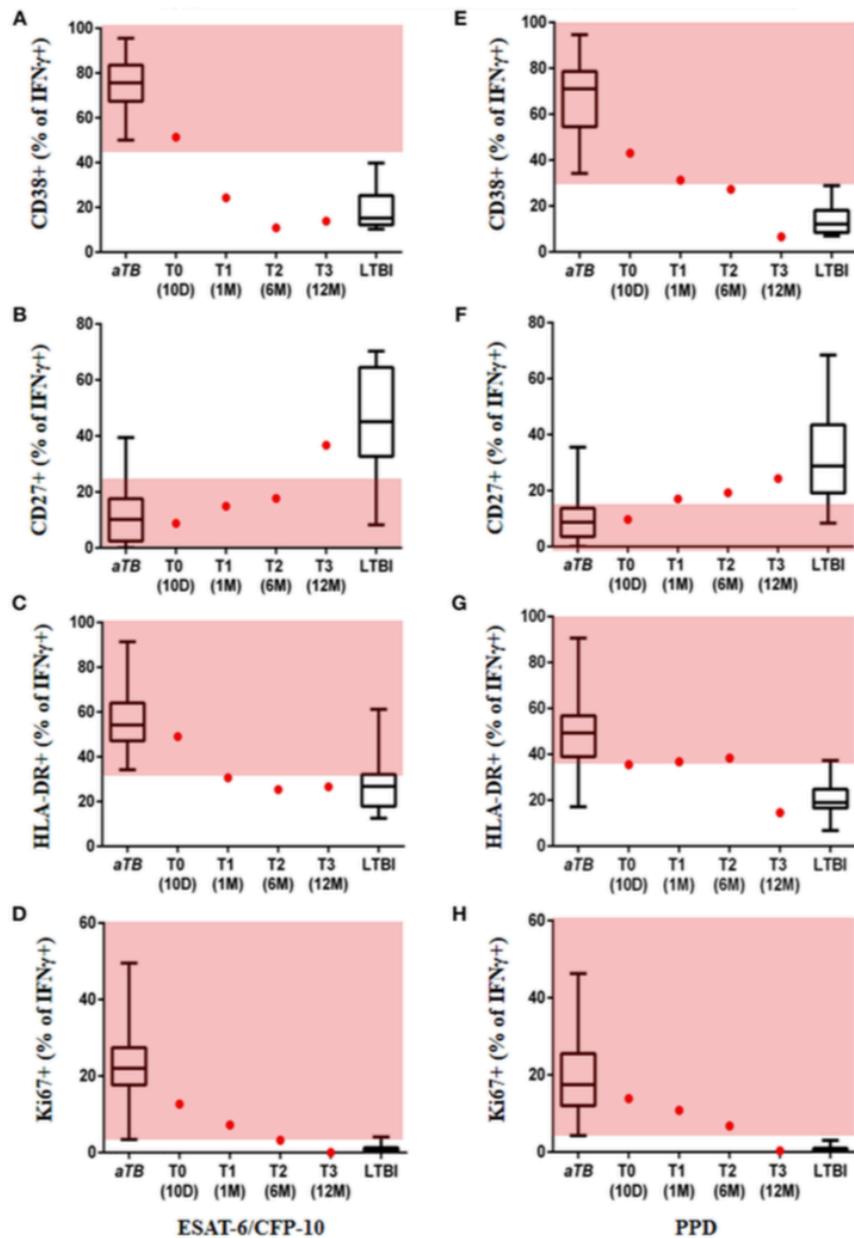


Abb.11:

Darstellung

der phänotypischen Profile von IFN γ + Mtb-spezifischen CD4 T Zellen in einem Patienten mit extrapulmonaler Tuberkulose nach Beginn der anti-tuberkulösen Therapie.

Als Referenz dienen Werte von Patienten mit aktiver pulmonaler TB sowie LTBI [1] und bei LTBI. Der Anteil von IFN γ + Mtb-spezifischen CD4 T Zellen, die nach Stimulation durch ESAT6/CFP10 die Marker CD38 (A), CD27 (B), HLA-DR (C) und Ki67 (D) exprimieren, und der Anteil von IFN γ + Mtb-spezifischen CD4 T Zellen, die nach Stimulation durch PPD die Marker CD38 (A), CD27 (B), HLA-DR (C) und Ki67 (D) exprimieren, ist auf den jeweiligen y-Achsen dargestellt und mit einem roten Punkt illustriert. Die roten Flächen stellen den Bereich dar, der vor dem Hintergrund vorangehender Arbeiten ([1]) als Profil einer „aktive Tuberkulose“ definiert wurde, wobei der jeweilige cut-off mittels ROC Analyse ermittelt wurde[2].

Zeitpunkt von 12 Monaten nach Therapiestart schließlich deutlich zu und erreichten den anhand der Vorarbeiten definierten Bereich gesunder / LTBI Patienten. Insgesamt konnten diese Untersuchungen

einen ersten Beleg dafür liefern, dass der TAM TB Assay als Sputum-unabhängiger Test auch beim Therapie Monitoring von Patienten mit einer extrapulmonalen Form der Tuberkulose eingesetzt werden kann (**Anlage 7[2]**). Weitere und auf größeren Kohorten basierende Untersuchungen sind zur Bestätigung dieser Ergebnisse erforderlich und bereits in Arbeit. Zusammenfassend haben diese Arbeiten des Habilitationsprojekts zeigen können, dass phänotypische Veränderungen von IFN γ + Mtb-spezifischen CD4 T Zellen auf Molekül-Ebene als Surrogat Marker für ein Therapieansprechen verwendet werden können. Sie können dazu dienen, eine aktive Tuberkulose (CD38 positive, CD27 niedrig) von einer erfolgreich behandelten Tuberkulose (CD38 negativ, CD27 niedrig) und einer latenten tuberkulösen Infektion (CD38 negativ, CD27 hoch) zu unterscheiden. Diese Untersuchungen basieren auf Kohorten pulmonaler Tuberkulose Patienten, aber man kann festhalten, dass dieser Test voraussichtlich auch bei Patienten mit extrapulmonalen Formen einer aktiven Tuberkulose zu Zwecken der Diagnosestellung und des Therapie Monitorings eingesetzt werden kann.

3. Schlussbetrachtung und Ausblick

Die rasanten Entwicklungen auf dem Gebiet der molekularen Biologie, speziell der Genomik, Transkriptomik, sowie seit wenigen Jahren auch Proteomik und Metabolomik, erlauben eine weitaus umfassendere und tiefgreifende Analyse biologischer Prozesse, inklusive der Wirt-Pathogen Interaktion. Zusammen und in Korrelation mit immunologischen bzw. durchflusszytometrischen Methoden können diese Verfahren wesentlich zur Aufdeckung und dem besseren Verständnis klinisch relevanter Mechanismen in der Wirt-Pathogen Interaktion beitragen.

Das beschriebene Habilitationsprojekt begann mit den zu Beginn zur Verfügung stehenden, damals modernen, Methoden (DNA-Klonierungen, BAC-Vektoren, Genbank-Erstellung, ALF-Express Sequenzierung) und nahm in seinem Verlauf die entsprechenden neuen methodischen Möglichkeiten (genome-wide mRNA *profiling*, Epigenetik) auf, um Fragen der Wirt-Pathogen Interaktion zu untersuchen. Die zukünftigen Monate und Jahre werden auf diese Vorarbeiten aufbauen, indem das Phänomen der Immunsuppression im Rahmen der Mtb Infektion näher beleuchtet werden wird. Ein erster entsprechender Antrag wird bereits vom DZIF gefördert. Darüberhinaus soll die Methodik der Transkriptomik und Signalweg-Analysen auch und vermehrt für diagnostische Fragestellungen genutzt werden. Insbesondere die Verbesserung der Diagnosestellung der Tuberkulose sowie die bessere Anpassung der Therapie-Dauer bei der Behandlung einer aktiven Tuberkulose werden Gegenstand meiner zukünftigen Forschungsaktivitäten sein. Ein Ziel ist hierbei unter anderem, RNA-Signaturen zu beschreiben, die in der Zukunft eine Individualisierung der Therapiedauer bei Patienten, die an einer Tuberkulose erkrankt sind, ermöglichen können. Hierbei ist auch ein besseres Verständnis bzw. die Beschreibung eines oder mehrerer Korrelate(s) der Protektion entscheidend. Die gezielte Untersuchung von RNA-Signaturen an definierten klinischen Phänotypen (Patienten Kohorten) kann hierbei ein wertvoller Ansatz sein [10]. Denn der natürliche Verlauf der Tuberkulose basiert ganz eindeutig auf dem Prinzip, dass Infektion nicht gleich Erkrankung ist. Zudem infiziert sich nicht jedes Individuum,

das mit einer offenen und damit hoch-ansteckenden Tuberkulose in Kontakt kommt. Die genauere Untersuchung der Wirt RNA Signaturen in diesen spezifischen Patientenkollektiven kann uns dabei helfen, ein solches Korrelat der Protektion zu beschreiben (**Anlage 8**; Abbildung 12). Mit Hilfe eines solchen Korrelates der Protektion bekäme zudem das wichtige Gebiet der Impfstoffentwicklung gegen die Tuberkulose ein lang ersehntes Werkzeug zur Evaluation möglicher Vakzin Kandidaten an die Hand [42].

Schließlich werden weitergehende klinische Studien zur Evaluierung des TAM-TB Testes in klinischen Kohorten dabei helfen, diesen Test in Zukunft als festen Bestandteil des diagnostischen Repertoires zu etablieren. Eine entsprechende Studie, in der auch Geneexpression untersucht wird, wurde unter anderem im Raum München durchgeführt; die entsprechenden Ergebnisse werden bald veröffentlicht werden können. Insbesondere auf dem Gebiet der personalisierten Medizin werden dieser Assay wie auch Genexpression Biomarker einen wesentlichen Beitrag leisten können [27, 42, 45].

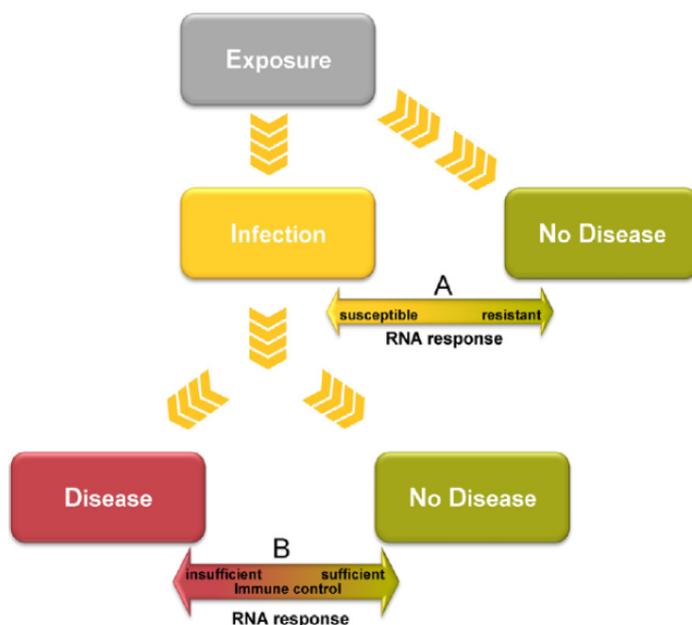


Abb. 12: Skizze zur Darstellung möglicher experimenteller Ansätze, um mittels RNA Expressionsanalysen eine Korrelat der Protektion beschreiben zu können. (A) Nach Tuberkulose-Exposition lassen sich möglicherweise Immunmechanismen der Wirt-Suszeptibilität oder Wirtsresistenz aufzeigen. (B) der hier dargestellte Vergleich zwischen infizierten Individuen kann ggf. ein Korrelat offenbaren, das mit Kontrolle und Begrenzung der Infektion mit *M. tuberculosis* assoziiert ist. [10]

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die Untersuchungen der Wirt-Pathogen Interaktion auf molekularer Ebene eines der faszinierendsten Forschungsfelder die Medizin darstellen. Das hier skizzierte Habilitationsprojekt konnte von verschiedenen Ansatzpunkten aus mehrere neue und wertvolle Beiträge zum besseren Verständnis dieser komplexen Wechselbeziehung leisten, auf deren Grundlage weitere Forschungsaktivitäten aufbauen werden.

4. Literatur

- 1 Ahmed MIM, Ntinginya NE, Kibiki G, Mtafya BA, u. a. Phenotypic Changes on Mycobacterium Tuberculosis-Specific CD4 T Cells as Surrogate Markers for Tuberculosis Treatment Efficacy. *Front Immunol* 2018. 9:
- 2 Ahmed MIM, Ziegler C, Held K, Dubinski I, u. a. The TAM-TB Assay—A Promising TB Immune-Diagnostic Test With a Potential for Treatment Monitoring. *Front. Pediatr.* 2019. 7:
- 3 Anderson ST, Kaforou M, Brent AJ, Wright VJ, u. a. Diagnosis of childhood tuberculosis and host RNA expression in Africa. *N. Engl. J. Med.* 2014. 370: 1712–23
- 4 André G Loxton JKKLGAGCMBEHJGVDSJMSHEKACHGWMFC. Safety and Immunogenicity of the Recombinant Mycobacterium bovis BCG Vaccine VPM1002 in HIV-Unexposed Newborn Infants in South Africa. *Clin. Vaccine Immunol.* 2017. 24:
- 5 Baena A, Porcelli SA. Evasion and subversion of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis. *Tissue Antigens* 2009. 74: 189–204
- 6 Boeree MJ, Heinrich N, Aarnoutse R, Diacon AH, u. a. High-dose rifampicin, moxifloxacin, and SQ109 for treating tuberculosis: a multi-arm, multi-stage randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis* 2017. 17: 39–49
- 7 Both von U, Berk M, Agapow P-M, Wright JD, u. a. Mycobacterium tuberculosis Exploits a Molecular Off Switch of the Immune System for Intracellular Survival. *Sci. Rep.* 2018. 8: 271
- 8 Both von U, Buerckstuemmer A, Fluegge K, Berner R. Heterogeneity of genotype-phenotype correlation among macrolide-resistant Streptococcus agalactiae isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. 49: 3080–82
- 9 Both von U, John A, Fluegge K, Siedler A, u. a. Molecular epidemiology of invasive neonatal Streptococcus agalactiae isolates in Germany. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2008. 27: 903–6
- 10 Both von U, Kaforou M, Levin M, Newton SM. Understanding immune protection against tuberculosis using RNA expression profiling. *Vaccine* 2015;
- 11 Both von U, Otten S, Darbouche A, Domann E, u. a. *Physical and genetic map of the Listeria monocytogenes egd serotype 1/2a chromosome.* onlinelibrary.wiley.com. <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13632.x/asset/j.1574-6968.1999.tb13632.x.pdf?v=1&t=htt39joz&s=777a762a7ddb6d5a32822d7d7f162a9331306f87>
- 12 Both von U, Ruess M, Mueller U, Fluegge K, u. a. A serotype V clone is predominant among erythromycin-resistant Streptococcus agalactiae isolates in a southwestern region of Germany. *J. Clin. Microbiol.* 2003. 41: 2166–69
- 13 Cambier CJ, Falkow S, Ramakrishnan L. Host Evasion and Exploitation Schemes of Mycobacterium tuberculosis. *Cell* 2014. 159: 1497–1509
- 14 Chastel C. [When the Egyptian mummies are speaking about the infections that have made them ill]. *Hist Sci Med* 2004. 38: 147–55
- 15 Fluegge K, Supper S, Siedler A, Berner R. Serotype Distribution of Invasive Group B Streptococcal Isolates in Infants: Results from a Nationwide Active Laboratory Surveillance Study over 2 Years in Germany. *Clinical infectious ...* 2005;
- 16 Gengenbacher M, Kaufmann SHE. Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy. *Fems Microbiol Rev* 2012. 36: 514–32
- 17 Ghorpade DS, Leyland R, Kurowska-Stolarska M, Patil SA, u. a. MicroRNA-155 is required for Mycobacterium bovis BCG-mediated apoptosis of macrophages. *Mol. Cell. Biol.* 2012. 32: 2239–53
- 18 Gillespie SH, Crook AM, McHugh TD, Mendel CM, u. a. Four-month moxifloxacin-based regimens for drug-sensitive tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* 2014. 371: 1577–87
- 19 Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, Rusniok C, u. a. Comparative genomics of Listeria species. *Science* 2001. 294: 849–52
- 20 Gupta A, Kaul A, Tsolaki AG, Kishore U, u. a. Mycobacterium tuberculosis: Immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology* 2011;, S. 1–12
- 21 Hain T, Otten S, Both von U, Chatterjee SS, u. a. Novel bacterial artificial chromosome vector pUvBBAC for use in studies of the functional genomics of Listeria spp. *Appl. Environ.*

- Microbiol. 2008. 74: 1892–1901
- 22 *Hmama Z, Peña-Díaz S, Joseph S, Av-Gay Y.* Immuno-evasion and immunosuppression of the macrophage by *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunological Reviews* 2015. 264: 220–32
 - 23 *Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D.* Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 2013. 13: 260–68
 - 24 *Iannaccone M, Dorhoi A, Kaufmann SH.* Host-directed therapy of tuberculosis: what is in it for microRNA? *Expert Opin. Ther. Targets* 2014;
 - 25 *Iwai H, Funatogawa K, Matsumura K, Kato-Miyazawa M, u. a.* MicroRNA-155 knockout mice are susceptible to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis (Edinb)* 2015. 95: 246–50
 - 26 *Jindani A, Harrison TS, Nunn AJ.* High-dose rifapentine with moxifloxacin for pulmonary tuberculosis. ... *England Journal of ...* 2014;
 - 27 *John SH, Kenneth J, Gandhe AS.* Host biomarkers of clinical relevance in tuberculosis: review of gene and protein expression studies. *Biomarkers* 2012. 17: 1–8
 - 28 *Kaforou M, Wright VJ, Oni T, French N, u. a.* Detection of tuberculosis in HIV-infected and -uninfected African adults using whole blood RNA expression signatures: a case-control study. *PLoS Med.* 2013. 10: e1001538
 - 29 *Kaufmann SHE.* Tuberculosis vaccine development: strength lies in tenacity. *Trends Immunol.* 2012. 33: 373–79
 - 30 *Kumar R, Halder P, Sahu SK, Kumar M, u. a.* Identification of a novel role of ESAT-6-dependent miR-155 induction during infection of macrophages with *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol* 2012;
 - 31 *Le Doare K, Heath PT.* An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine* 2013;
 - 32 *Lin FYC, Azimi PH, Weisman LE, Philips JB, u. a.* Antibiotic Susceptibility Profiles for Group B Streptococci Isolated from Neonates, 1995-1998. *Clinical Infectious Diseases* 2000. 31: 76–79
 - 33 *Marisol Fernandez MEHCJB.* Antimicrobial Susceptibilities of Group B Streptococci Isolated between 1992 and 1996 from Patients with Bacteremia or Meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998. 42: 1517
 - 34 *Meldrum D.* Automation for Genomics, Part One: Preparation for Sequencing. *Genome Res.* 2000. 10: 1081–92
 - 35 *Meldrum D.* Automation for Genomics, Part Two: Sequencers, Microarrays, and Future Trends. *Genome Res.* 2000. 10: 1288–1303
 - 36 *Merle CS, Fielding K, Sow OB, Gningafon M, u. a.* A Four-Month Gatifloxacin-Containing Regimen for Treating Tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* 2014. 371: 1588–98
 - 37 *Mohamed W, Sethi S, Tchatalbachev S, Darji A, u. a.* Protective Immunity to *Listeria Monocytogenes* Infection Mediated by Recombinant *Listeria innocua* Harboring the VGC Locus. *PLoS ONE* 2012. 7: e35503
 - 38 *Morales WJ, Dickey SS, Bornick P, Lim DV.* Change in antibiotic resistance of group B Streptococcus: Impact on intrapartum management. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1999. 181: 310–14
 - 39 *Mukherjee K, Altincicek B, Hain T, Domann E, u. a.* *Galleria mellonella* as a Model System for Studying *Listeria* Pathogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. 76: 310–17
 - 40 *Natalie E Nieuwenhuizen PSKUSMFCCARBELGSHEK.* The Recombinant Bacille Calmette–Guérin Vaccine VPM1002: Ready for Clinical Efficacy Testing. *Front Immunol* 2017. 8:
 - 41 *Newton S, Martineau A, Kampmann B.* A functional whole blood assay to measure viability of mycobacteria, using reporter-gene tagged BCG or M.Tb (BCG_{lux}/M.Tb_{lux}). *J Vis Exp* 2011;
 - 42 *Ottenhoff THM, Ellner JJ, Kaufmann SHE.* Ten challenges for TB biomarkers. *Tuberculosis* 2012. 92: S17–S20
 - 43 *Petruccioli E, Petrone L, Vanini V, Cuzzi G, u. a.* Assessment of CD27 expression as a tool for active and latent tuberculosis diagnosis. *Journal of Infection* 2015. 71: 526–33
 - 44 *Portevin D, MSc FM, MD PC, PhD AB, u. a.* Articles Assessment of the novel T-cell activation marker–tuberculosis assay for diagnosis of active tuberculosis in children: a prospective proof-of-concept study. *Lancet Infect Dis* 2014;, S. 1–8
 - 45 *Rachow A, Heinrich N, Geldmacher C.* Early Identification of Progressive TB Disease Using Host Biomarkers. *EBioMedicine* 2015. 2: 107–8
 - 46 *Ramilo O, Allman W, Chung W, Mejias A, u. a.* Gene expression patterns in blood leukocytes discriminate patients with acute infections. *Blood* 2007. 109: 2066–77

- 47 *Schena M.* Genome analysis with gene expression microarrays. *Bioessays* 1996. 18: 427–31
- 48 *Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO.* Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science* 1995. 270: 467–70
- 49 *Schrag SJ, Zywicki S, Farley MM, Reingold AL, u. a.* Group B Streptococcal Disease in the Era of Intrapartum Antibiotic Prophylaxis. *N. Engl. J. Med.* 2000. 342: 15–20
- 50 *Schuetz A, Haule A, Reither K, Ngwenyama N, u. a.* Monitoring CD27 Expression to Evaluate Mycobacterium Tuberculosis Activity in HIV-1 Infected Individuals In Vivo. *PLoS ONE* 2011. 6: e27284
- 51 *Simonsen KA, Anderson-Berry AL, Delair SF, Davies HD.* Early-Onset Neonatal Sepsis. *Clinical Microbiology Reviews* 2014. 27: 21–47
- 52 *Streitz M, Tesfa L, Yildirim V, Yahyazadeh A, u. a.* Loss of Receptor on Tuberculin-Reactive T-Cells Marks Active Pulmonary Tuberculosis. *PLoS ONE.* 2: e735
- 53 *Tebruegge M, Ritz N, Donath S, Dutta B, u. a.* Mycobacteria-Specific Mono- and Polyfunctional CD4+ T Cell Profiles in Children With Latent and Active Tuberculosis: A Prospective Proof-of-Concept Study. *Front Immunol* 2019. 10:
- 54 *WHO.* *Global Tuberculosis Report 2016.* reliefweb.int. <https://reliefweb.int/report/world/global-tuberculosis-report-2016>
- 55 *Ziskind B, Halioua B.* [Tuberculosis in ancient Egypt]. *Rev Mal Respir* 2007. 24: 1277–83

5. Referenzierte Anlagen

Anlagen zur Zusammenfassung des Habilitationsprojekts.

Anlage 1

Hain T, Otten S, **von Both U***, Chatterjee SS, Technow U, Billion A, Ghai R, Mohamed W, Domann E, Chakraborty T. Novel bacterial artificial chromosome vector pUvBBAC for use in studies of the functional genomics of *Listeria* spp. **Appl Environ Microbiol.** 2008 Mar;74(6):1892-901; DOI: 10.1128/AEM.00415-07 (***joint first author**).

Anlage 2

von Both, U, John A, Fluegge K, Siedler A, Berner R. Molecular epidemiology of invasive neonatal *Streptococcus agalactiae* isolates in Germany. **Pediatr Infect Dis J.** 2008 Oct;27(10):903-6; DOI: 10.1097/INF.0b013e318178d1ff.

Anlage 3

von Both U, Ruess M, Mueller U, Fluegge K, Sander A, Berner R. A serotype V clone is predominant among erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* isolates in a southwestern region of Germany. **J Clin Microbiol.** 2003 May;41(5):2166-9; DOI: 10.1128/jcm.41.5.2166-2169.2003.

Anlage 4

von Both U, Buerckstuemmer A, Fluegge K, Berner R. Heterogeneity of genotype-phenotype correlation among macrolide-resistant *Streptococcus agalactiae* isolates. **Antimicrob Agents Chemother.** 2005 Jul;49(7):3080-2. DOI: 10.1128/AAC.49.7.3080-3082.2005.

Anlage 5

von Both U, Berk M, Agapow PM, Wright JD, Git A, Hamilton MS, Goldgof G, Siddiqui N, Bellos E, Wright VJ, Coin LJ, Newton SM, Levin M. *Mycobacterium tuberculosis* Exploits a Molecular Off Switch of the Immune System for Intracellular Survival. **Sci Rep.** 2018 Jan 12;8(1):661. DOI: 10.1038/s41598-017-18528-y.

Anlage 6

Ahmed MIM, Ntinginya NE, Kibiki G, Mtafya B, Semvua H, Mpagama S, Mthabo C, Saathoff E, Held K, Kroidl I, Chachage M, **von Both U**, Haule A, Mekota AM, Boeree MJ, Gillespie SH, Hoelscher M, Heinrich N, Geldmacher C and the Pan African Consortium. "Phenotypic changes on *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4 T cells as surrogate markers for Tuberculosis treatment efficacy. **Front Immunol.** 2018 Sep 28;9:2247. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02247.

Anlage 7

Ahmed MIM, Ziegler C, Held K, Dubinski I, Ley-Zaporozhan J, Geldmacher, C, **von Both U**. The TAM-TB Assay—A Promising TB Immune-Diagnostic Test With a Potential for Treatment Monitoring. **Front. Pediatr** **2019**; 7:27. DOI: 10.3389/fped.2019.00027.

Anlage 8

von Both U, Kaforou, M, Levin, M, Newton, SM, “Understanding immune protection against tuberculosis using RNA expression profiling”, *Vaccine*. 2015 Sep 29;33(40):5289-93; DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.05.025.

6. Verzeichnis der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

6.1. Originalarbeiten als Erst- oder Letztautor

1. Singer K, Schulze-Sturm U, Alba-Alejandre I, Hollwitz B, Nguyen TTT, Sollinger F, Eberle J, Hübner J, Kobbe R, Genzel-Boroviczény O, **von Both U**. Impact of refugee influx on the epidemiology of late-presenting HIV-infected pregnant women and mother-to-child transmission: comparing a southern and northern medical centre in Germany. **Infection**. 2019 Jun 12. doi: 10.1007/s15010-019-01332-3. (IF 2,927)
2. Ahmed MIM, Ziegler C, Held K, Dubinski I, Ley-Zaporozhan J, Geldmacher, C, **von Both U**. The TAM-TB Assay—A Promising TB Immune-Diagnostic Test With a Potential for Treatment Monitoring. **Front. Pediatr** 2019; 7:27. doi: 10.3389/fped.2019.00027 (IF 2,335)
3. **von Both U**, Berk M, Agapow PM, Wright JD, Git A, Hamilton MS, Goldgof G, Siddiqui N, Bellos E, Wright VJ, Coin LJ, Newton SM, Levin M. *Mycobacterium tuberculosis* Exploits a Molecular Off Switch of the Immune System for Intracellular Survival. **Sci Rep**. 2018 Jan 12;8(1):661. doi: 10.1038/s41598-017-18528-y (IF 4,847)
4. **von Both, U**, John A, Fluegge K, Siedler A, Berner R. Molecular epidemiology of invasive neonatal *Streptococcus agalactiae* isolates in Germany. **Pediatr Infect Dis J**. 2008 Oct;27(10):903-6. (IF 3,176)
5. **von Both U***, Hain T, Otten S, Chatterjee SS, Technow U, Billion A, Ghai R, Mohamed W, Domann E, Chakraborty T. Novel bacterial artificial chromosome vector pUvBBAC for use in studies of the functional genomics of *Listeria* spp. **Appl Environ Microbiol**. 2008 Mar;74(6):1892-901. Epub 2008 Jan 25. (*joint first author), (IF 3,801)
6. **von Both U**, Buerckstuemmer A, Fluegge K, Berner R. Heterogeneity of genotype-phenotype correlation among macrolide-resistant *Streptococcus agalactiae* isolates. **Antimicrob Agents Chemother**. 2005 Jul;49(7):3080-2. (IF 4,79)
7. **von Both U**, Ruess M, Mueller U, Fluegge K, Sander A, Berner R. A serotype V clone is predominant among erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* isolates in a southwestern region of Germany. **J Clin Microbiol**. 2003 May;41(5):2166-9.(IF 3,78)

8. **von Both U**, Otten S, Darbouche A, Domann E, Chakraborty T. Physical and genetic map of the *Listeria monocytogenes* EGD serotype 1/2a chromosome. **FEMS Microbiol Lett.** 1999 Jun 15;175(2):281-9. (IF 2,02 in 2008)

6.2. Originalarbeiten als Koautor

1. B elard S, Brand J, Schulze-Sturm U, Janda A, **von Both U**, Tacoli C, Alberer M, Kempf C, Stegemann M, Krüger R, Varnholt V, Blohm M, Reiter K, Zoller T, Suttorp N, Mall M, von Bernuth H, Gratopp A, Hübner J, Hufnagel M, Kobbe R, Kurth F. Intravenous Artesunate for Imported Severe Malaria in Children Treated in Four Tertiary Care Centers in Germany. **Pediatr Infect Dis J.** 2019. (IF 3,176).
2. Araujo da Silva A, Jaszkowski E, Schober T, **von Both U**, Meyer-Buehn M, F aris Marques A, Farkas B, Silva de Abreu B, Biscaia di Biase J, Miyoshi Takahashi J, Dutra de Castro L, Leal I, Henriques Teixeira C, Nussbaum CF, Hoffmann F, Hübner J. Patterns of antimicrobial consumption in neonatal and paediatric intensive care units in Germany and Brazil.. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2019. (IF 2.722).
3. Borensztajn D, Yeung S, Hagedoorn NN, Balode A, **von Both U**, Carrol ED, Dewez JE, Eleftheriou I, Emonts M, van der Flier M, de Groot R, Herberg JA, Kohlmaier B, Lim E, Maconochie I, Martin on-Torres F, Nijman R, Pokorn M, Strle F, Tsolia M, Wendelin G, Zavadska D, Zenz W, Levin M, Moll HA. Diversity in the Emergency care for febrile children in Europe: a questionnaire study. **BMJ Paediatr Open.** 2019 Jun 27;3(1):e000456. doi: 10.1136/bmjpo-2019-000456. 2019. (IF 2,413).
4. Ahmed MIM, Ntinginya NE, Kibiki G, Mtafya B, Semvua H, Mpagama S, Mthabo C, Saathoff E, Held K, Kroidl I, Chachage M, **von Both U**, Haule A, Mekota AM, Boeree MJ, Gillespie SH, Hoelscher M, Heinrich N, Geldmacher C and the Pan African Consortium. "Phenotypic changes on Mycobacterium tuberculosis-specific CD4 T cells as surrogate markers for Tuberculosis treatment efficacy. **Front Immunol.** 2018 Sep 28;9:2247. doi: 10.3389/fimmu.2018.02247(IF 5,511).
5. Kreitmeyr K, **von Both U**, Pecar A, Borde JP, Mikolajczyk R, Huebner J. Pediatric antibiotic stewardship: successful interventions to reduce broad-spectrum antibiotic use on general pediatric wards. **Infection.** 2017 Aug;45(4):493-504. doi: 10.1007/s15010-017-1009-0. (IF 2,927).

6. Kontturi, B Santiago, M Tebruegge, **U von Both**, E Salo, N Ritz. The impact of Bacille Calmette-Guérin shortage on immunisation practice and policies in Europe – A Paediatric Tuberculosis Network European Trials Group (ptbnet) survey. **Tuberculosis**. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2016.08.005>. (IF 2,873).
7. M Kappler, F. Nagel, M. Feilcke, C. Kroener, I. Pawlita, S. Naehring, J. Ripper, M. Hengst, **U von Both**, M. Forstner, A. Hector, M. Griese. Eradication of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis – a single center observational study over 11 years. **Pediatric Pulmonology**. 2016. (IF 2,758).
8. M. Seilmaier, W. Guggemos, A. Wieser, V. Fingerle, L. Balzer, T. Fenzl, M. Hoch, U. von Both, H.U. Schmidt, C.M. Wendtner, E. Strobel. 25 Fälle von Läuse rückfallfieber bei Flüchtlingen aus Ostafrika. **Dtsch Med Wochenschr (DMW)** 2016; 141: e133–e142. (IF 0,552).
9. Wieser A, Löscher T, Schunk M, Seilmaier M, Balzer L, Margos G, **von Both U**, Schulzki T, Kopf S, Hoch M, Sing A, Fingerle V. Relapsing fever: an almost forgotten disease in focus again. **Dtsch Med Wochenschr**. 2016. (IF 0,552).
10. Hoch M, Wieser A, Löscher T, Margos G, Pürner F, Zühl j, Seilmaier M, Balzer L, Guggemos M, Rack-Hoch A, **von Both U**, Hauptvogel K, Schönberger K, Hautmann W, Sing A, Fingerle V. Louse-borne relapsing fever (*Borrelia recurrentis*) diagnosed in 15 refugees from northeast Africa: epidemiology and preventive control measures, Bavaria, Germany, July to October 2015. **Eurosurveillance**, Volume 20, Issue 42, 22 October 2015. (IF 5,983).

6.3. Kasuistiken/Case Reports

1. **von Both U**, Alberer M. *Borrelia recurrentis* infection. N Engl J Med 2016; 375:e5 August 4, 2016 DOI: 10.1056/NEJM 2016 icm1513366. (IF 72,406).
2. C Papan, **U von Both**, M Kappler, B Kammer, M Griese, J Huebner. Pott's disease: a major issue for an unaccompanied refugee minor. **Thorax** 2016 doi:10.1136/thoraxjnl-2016-209468. (IF 8,272).
3. **von Both U**, Laffer R, Grube C, Bossart W, Gaspert A, Günthard HF. Acute cytomegalovirus colitis presenting during primary HIV infection: an unusual case of an immune reconstitution inflammatory syndrome. **Clin Infect Dis**. 2008 Feb 15;46(4):e38-40. (IF 8,266).

4. **von Both U**, Baehr A, Kontny U, Kromeier J, Batsford S, Berner R. A boy with a mediastinal mass. **Lancet**. 2004 Jul 31-Aug 6;364(9432):474. (IF 21,713).

6.4. Übersichtsartikel/Reviews

1. Posovszky C, Backendorf V, Buderus S, Claßen S, Epple HJ, Gruber B, Hauer AC, Hübner J, Keller KM, Koletzko S, Lawrenz B, Schmidt-Choudhury A, Stallmach A, **von Both U**. S2k-Leitlinie „Akute infektiöse Gastroenteritis im Säuglings-, Kindes- und Jugendalter“ – AWMF Registernummer 068-003. *Z Gastroenterol*. 2019 Sep;57(9):1077-1118. doi: 10.1055/a-0981-6906. Epub 2019 Sep 16. (IF 1,236).
2. Schrier L, Wyder C, Del Torso S, Stiris T, **von Both U**, Brandenberger J, Ritz N. Medical care for migrant children in Europe: a practical recommendation for first and follow-up appointments. *Eur J Pediatr*. 2019 Jun 26. doi: 10.1007/s00431-019-03405-9. [Epub ahead of print]. (IF 2,188).
3. Wintergerst U, Baumann U, **von Both U**, Buchholz B, Feiterna-Sperling C, Förster-Waldl E, Kobbe R, Königs C, Maritz E, Neubert J, Niehues T, Notheis G, Paioni P. HIV-Infektion im Kindesalter – Update. *Pädiatrie & Pädologie* 2019. 54(9). DOI: 10.1007/s00608-018-0640-z. (IF -).
4. Hübner J, **von Both U**, Tenenbaum T, Weichert S, Liese J, Hufnagel M, Pecar A, Strenger V, Simon A. Antibiotic Stewardship: Konzeption und Umsetzung in der stationären Kinder- und Jugendmedizin. **Monatsschrift Kinderheilkunde** 2019. (IF 0.31).
5. Kroidl A & **von Both U**. HIV-Mutter-zu-Kind-Übertragung – aktuelle und neue präventive Maßnahmen. *NRZ Retroviren Bulletin*, LMU, 01/2018.
6. Feiterna-Sperling C, Brinkmann F, Adameczick C, Ahrens F, Barker M, Berger C, Berthold LD, Bogyi M, **von Both U**, Frischer T, Haas W, Hartmann P, Hillemann D, Hirsch FW, Kranzer K, Kunitz F, Maritz E, Pizzulli A, Ritz N, Schlags R, Spindler T, Thee S, Weizsäcker K. Consensus-Based Guidelines for Diagnosis, Prevention and Treatment of Tuberculosis in Children and Adolescents - A Guideline on Behalf of the German Society for Pediatric Infectious Diseases (DGPI). **Pneumologie**. 2017 Oct;71(10):629-680. doi: 10.1055/s-0043-116545. (Medline- / PubMed-gelistet; IF ?).

7. Vlcek C, Rack-Hoch A, **von Both U**, Jansson A. Fever in infants: investigating the source. **MMW Fortschr Med.** 2016;158(16): 58-66. (IF 0,552).
8. Alberer M, **von Both U**, Loescher T. Der medizinische Erstkontakt mit Flüchtlingen und Asylbewerbern – wichtige und praxisnahe Fragestellungen. **Kinder- und Jugendarzt.** 2016.
9. Papan C, Huebner J, **von Both U**. Infectious diseases in refugees and their minors arriving in Germany – what the GP needs to know. *Münchener Medizinische Wochenschrift (MMW)*, 2016. (IF 0,552).
10. Kohl L, **von Both U**, Huebner J. Vaccination. *Münchener Medizinische Wochenschrift (MMW)*, 2016. (IF 0,552).
11. Simon, A, **von Both U**, Hufnagel M, Huebner J. “Antibiotic Stewardship”: Zwingend für die Pädiatrie”, **Dtsch Arztebl** 2016; 113(21): [23]; DOI: 10.3238/PersInfek.2016.05.27.07. (IF 3,78).
12. Simon A, **von Both U**, Hufnagel M, Hübner J. 2016. Antibiotic Stewardship in der Kinder- und Jugendmedizin. **Monatsschrift Kinderheilkunde** 2016. (IF 0.31).
13. Papan C, Huebner J, **von Both U**. Infektionen bei Flüchtlingskindern – woran muss man denken? **Kinderärztliche Praxis.** 2016.
14. **von Both U**, Wieser A, Alberer M, Fingerle V, Huebner J. Läuserückfallfieber – ein alter Bekannter im (neuen) Gewand. **Kinder- und Jugendarzt.** 2016.
15. **von Both U**, Simon A, Hufnagel M, Huebner J. Antibiotic Stewardship im stationären Bereich der Pädiatrie. **Kinder- und Jugendarzt.** 2016.
16. Ritz N, Brinkmann F, Feiterna-Sperling C, Hauer B, Haas W, Ahrens F, Barker M, Berger C, Berthold LD, Bogyi M, **von Both U**, Frischer T, Hartmann P, Hillemann P, Hirsch W, Kranzer K, Kunitz F, Pizzulli A, Schlags R, Spindler T, Thee S, Weizsäcker K. Tuberkulosescreening bei asylsuchenden Kindern und Jugendlichen < 15 Jahren in Deutschland. Stellungnahme der Arbeitsgruppe AWMF- Leitlinie Tuberkulose im Kindes- und Jugendalter: Diagnostik, Prävention und Therapie. **Monatsschr Kinderheilkunde** 2015. 163:1287–1292. (IF 0,31).

17. **von Both U**, Kaforou, M, Levin, M, Newton, SM, “Understanding immune protection against tuberculosis using RNA expression profiling”, **Vaccine**. **2015** Sep 29;33(40):5289-93. (IF 3,413).

6.5. Buchkapitel/Book Chapters

1. Baumann U, **von Both U**, Buchholz B, Feiterna-Sperling C, Kobbe R., Königs C, Niehus T., Notheis G, Paioni P, Wintergerst U. HIV Infektion. DGPI Handbuch. Infektionen bei Kindern und Jugendlichen. Thieme. 8. Auflage. Akzeptiert & beim Editor.
2. Borte M., **von Both U**. Huebner J. Kardiale Infektionen. DGPI Handbuch. Infektionen bei Kindern und Jugendlichen. Thieme. 8. Auflage. Akzeptiert & beim Editor.
3. Bialek R, **von Both U**, Wintergerst U, Mueller A. Kryptosporidiose. DGPI Handbuch. Infektionen bei Kindern und Jugendlichen. Thieme. 8. Auflage. Akzeptiert & beim Editor.
4. **von Both U**. , 1/2 jähriger Junge mit Fieber und Hautausschlag. Infektionskrankheiten in der Pädiatrie. Springer. **2015**.

6.6. Sonstige Veröffentlichungen

1. Müller A, **von Both U**, , Iseke I, Grundhewer H, Knuf M, Korenke G Ch, Heininger U. Impfprophylaxe invasiver Erkrankungen mit Meningokokken der Serogruppe B – Stellungnahme der Kommission für Infektionskrankheiten und Impffragen. 2019. **Monatsschr Kinderheilkunde 2019**. (IF 0,31)
2. Müller A, **von Both U**, , Iseke I, Grundhewer H, Knuf M, Korenke G Ch, Heininger U. Impfungen in der Schwangerschaft – Stellungnahme der Kommission für Infektionskrankheiten und Impffragen der DAKJ. 2019. **Monatsschr Kinderheilkunde 2019**. (IF 0,31)
3. **von Both U**. Tuberkulose im Kindesalter – neue Aspekte zu einer alten Erkrankung. **Hauner Journal**, **2015**.

6.7. Internet (WWW) Link Publikationen

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=von+Both+U&cmd=DetailsSearch>

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinen Fachmentoren an der Haunerschen Kinderklinik und am Tropeninstitut, Herrn Prof. Christoph Klein, Herrn Prof. Johannes Hübner und Herrn Prof. Michael Hölscher, die meinen wissenschaftlichen und klinischen Werdegang unterstützt und gefördert haben.

Insbesondere Herr Prof. Hübner hat mir nach längerer Tätigkeit im europäischen Ausland (Zürich, & London) meine Rückkehr nach Deutschland geebnet und mir die Möglichkeit gegeben, in einer für Deutschland einzigartigen pädiatrisch infektiologischen Stelle, die sich an angelsächsischen Modellen orientiert, klinisch und wissenschaftlich tätig zu sein. Er hat mich seither auf meinem weiteren Werdegang nachhaltig unterstützt und gefördert. Durch ihn bekam ich zudem die Möglichkeit, meine Erfahrungen auf dem Gebiet des *Antibiotic Stewardship* in der Haunerschen Kinderklinik einzubringen und weiter auszubauen sowie bei der Etablierung eines ersten nationalen Ausbildungscurriculums für klinisch tätige Kinder- und Jugendärzte mitzuarbeiten.

Herrn Prof. Hölscher bin ich besonders für seine Unterstützung und Hilfe bei der Etablierung meiner Ideen und praktischen Weiterführung meiner in London begonnenen Arbeiten auf dem Gebiet der Tuberkulose Forschung dankbar. Durch seine stete Begleitung konnte ich meinen Kollaborationshorizont ausbauen und mich aktiv in die Arbeit der „TTU Tuberkulose“ des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung (DZIF) einbringen sowie Forschungsgelder für gemeinsame Projekte einwerben.

Darüberhinaus danke ich meinem englischen Mentor und Freund Prof. Mike Levin für die mannigfaltigen wissenschaftlichen und klinisch-infektiologischen Weisheiten, die er mir während meiner Jahre am Imperial College mit auf den Weg gegeben hat. Ich habe so viel von gelernt!

Ganz speziell und von tiefstem Herzen möchte ich mich auch bei meiner Familie bedanken, bei meiner lieben Ehefrau Julia, die mich in all den Jahren unglaublich unterstützt hat, sowie bei unseren beiden Kindern Linus und Emily, die jeden unserer Tage seit ihrer Geburt mit Lachen und viel Freude füllen. Sie beide haben allzu oft auf ihren Papa verzichten mussten, unter anderem, damit die wissenschaftlichen Arbeiten durchgeführt und dieses Schriftstück erstellt werden konnte.

Einen ganz herzlichen Dank möchte ich auch meinen lieben Eltern Dr. Hartwig und Uta von Both sowie meinen beiden Schwestern Kerstin und Claudia aussprechen. Ohne sie alle hätte ich diesen Weg nicht beschreiten und dieses Ziel auch nie erreichen können.