

Aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und
Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand Prof. Dr. med. Sebastian Suerbaum

**Stoffwechselbeeinflussung vom Bacille Calmette-Guérin (BCG)
Modellorganismus durch antimykobakterielle Substanzen in der
massenspektrometrischen Analyse von Proteinextrakten nach
stabiler Isotopenmarkierung**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Bianca Daniela Seitz

aus Ellwangen

2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Andreas Wieser

Mitberichterstatter: PD Dr. Luisa F. Jimenez-Soto

PD Dr. Andreas Roggenkamp

Prof. Dr. Gabriele Rieder

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. Anna-Cathrine Neumann-Cip

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2025

Zusammenfassung

Tuberkulose (TB) ist, aktuell nach COVID-19, die zweittödlichste Infektionserkrankung, die durch eine einzelne Pathogengruppe (*Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex (MTBC)) verursacht wird. Sie steht an 13. Stelle der häufigsten Todesursachen weltweit (Stand 2019). Die Organisation der Vereinten Nationen (*United Nations, UN (engl.)*) hat sich das Ziel gesetzt, die TB Epidemie bis zum Jahr 2030 zu beenden. Eine erfolgreiche Behandlung der TB ist ein wesentlicher Bestandteil der Strategie, jedoch ist die kurative Therapie geprägt von einer monatelangen Einnahme mehrerer Antibiotika, verbunden mit hohen Nebenwirkungs- und Therapieabbruchraten. Außerdem gefährden zunehmende Antibiotikaresistenzen des TB Erregers (*Mycobacterium tuberculosis*) den Therapieerfolg. Dass sich die Behandlung der Tuberkulose schwierig gestaltet, liegt unter anderem an der Fähigkeit des Erregers in ein dormantes Stadium überzugehen, in welchem eine niedrige Stoffwechselaktivität vorliegt. In diesem Zustand entzieht sich der Erreger der Wirkung des Immunsystems des Wirts als auch der Antibiotika.

Zur Optimierung der Antibiotika-Kombinationstherapie ist es essentiell, den Metabolismus des TB Erregers sowie die Wirkung der Antibiotika auf den Metabolismus besser zu verstehen. Wesentlich hierzu ist es, die Wirkungsweise der einzelnen Antibiotika, sowie mögliche Synergismen zwischen Antibiotika *in vitro* untersuchen zu können, um Rückschlüsse auf die Wirksamkeit *in vivo* zu ermöglichen. Bisherige *in vitro* Modelle zur Untersuchung der Wirksamkeit der Antibiotika auf den TB Erreger (z.B. *Hollow-Fiber-Model (engl.)* oder Resazurin-Assay) beschreiben allerdings nicht die Wirkung auf Ebene des Metabolismus zu multiple Zeitpunkten.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Weiterentwicklung eines Modells – basierend auf Massenspektrometrie und stabiler Isotopenmarkierung – zur Untersuchung der zeitlichen Dynamik der Analytneubildungsrate des Modellorganismus *Bacillus*

Calmette-Guérin (*Mycobacterium bovis* BCG), welcher große Ähnlichkeit zu *M. tuberculosis* aufweist.

Hierzu wurden kultivierte *M. bovis* BCG Proben extrahiert und mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie (Matrixunterstützte Laser-Desorptions-Ionisation Flugzeit (*matrix-assisted laser desorption/ ionisation time-of-flight (engl.)*)) gemessen. In den entstehenden Spektren wurden neun Intensitätsmaxima ausgewählt, die durch ein charakteristisches Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) definiert wurden. Diese Analyten erlauben auch ohne Identifikation des zu Grunde liegenden Moleküls (Proteins) eine Beschreibung der zeitlichen Dynamik des Metabolismus. Um die neugebildeten Anteile der Analyten zu identifizieren, wurden die Bakterien zu definierten Zeitpunkten während ihres Wachstums mit stabilen Kohlenstoffisotopen (^{13}C) markierten Nährstoffen versorgt. Dies führt zu einer messbaren Änderung der Masse der neu gebildeten Analyten.

Zur Standardisierung des Versuchsaufbaus wurden Reinheitskontrollen der *M. bovis* BCG Kultur durchgeführt, sowie die Verdopplungszeit bestimmt. Es wurde versucht, die Methodik der rasterelektronenmikroskopischen Darstellung zu optimieren, mit dem Ziel, Zellwandveränderungen des *M. bovis* BCG unter Einfluss von Antibiotika zu visualisieren.

Nach Zugabe der Antibiotika Linezolid und BTZ043 (jeweils in einfacher und zweifacher 90 %-Hemmkonzentration (IC_{90})) wurde nachgewiesen, dass die Neubildungsrate einiger Analyten im Verlauf – verglichen zu der Kontrolle ohne Antibiotikazugabe – signifikant abnimmt. Basierend auf diesen Beobachtungen könnte demnach die antibiotische Potenz einzelner Wirkstoffe und mögliche Antibiotikasynergismen auf Proteinebene untersucht werden.

Dies könnte dazu beitragen, effektivere und möglicherweise auch kürzere Antibiotika-Therapieregime gegen die Tuberkulose zu entwickeln. Zusätzlich könnten die Nebenwirkungsraten reduziert und die biopsychosoziale Belastung der Patienten verringert werden. All dies reduziert die Kosten für das Gesundheitssystem und beugt der Resistenzentwicklung und einem verfrühten Therapieabbruch vor.

Abstract

Tuberculosis (TB) is at the moment, following COVID-19, the second leading cause of death caused by a single infectious agent and is the 13th leading cause of death worldwide as of 2019. The United Nations (UN) has set the goal to end the TB epidemic by the year of 2030. Successful treatment of TB is an essential part of the strategy, but curative therapy is characterized by a long duration of treatment with multiple antibiotics leading to multiple side effects and therefore high treatment discontinuation rates. As a result, antibiotic resistances of the TB pathogen (*Mycobacterium tuberculosis*) are increasing. The difficulty in treating tuberculosis is partly due to the ability of the pathogen to enter a dormant stage in which it has low metabolic activity. In the dormant state, the pathogen is able to escape the action of both the host immune system and antibiotics.

To optimize antibiotic combination therapy, it is essential to improve the understanding of the TB metabolism and to learn more about the effects of antibiotics on the TB metabolism. Therefore, it is essential to describe the potency of individual antibiotics as well as possible synergisms between antibiotics *in vitro* to enable conclusions about the efficiency *in vivo*. However, previous *in vitro* models describing the efficiency of antibiotics on the TB pathogen (e.g. hollow fiber model, resazurin assay) do not describe the effect at the level of metabolism at multiple time points.

The aim of this work is the further development of a model, based on mass spectrometry and stable isotope labeling, to investigate the dynamics of the analyte neogenesis rate of the model organism Bacillus Calmette-Guérin (*Mycobacterium bovis* BCG), which has high similarity to *M. tuberculosis*.

For this purpose, cultured *M. bovis* BCG samples were extracted and measured by MALDI-TOF mass spectrometry (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight). In the resulting spectra, nine intensity maxima were selected, defined by a specific mass-to-charge ratio (m/z). These analytes allow a description of the temporal dynamics of metabolism even without identification of the

underlying molecule (protein). In order to identify the newly formed fractions of the analytes, bacteria were supplied with stable carbon isotope (^{13}C) labeled nutrients at defined time points during their growth. This leads to a measurable change in the mass of newly formed analytes.

To standardize the experimental setup, purity controls of *M. bovis* BCG culture were performed and the doubling time was determined. An attempt was made to optimize the scanning electron microscopy method for *M. bovis* BCG with the aim of visualizing cell wall alterations under the influence of antibiotics.

The analyte neogenesis rate for some analytes, measured by the model based on mass spectrometry and stable isotope labeling, decreased significantly over time after the addition of the antibiotic (antibiotics linezolid and BTZ043, each in 1-fold und 2-fold 90 %-inhibitory concentrations (IC90)) compared to the control without antibiotic addition. This model could therefore be used to investigate the antibiotic action of the individual antibiotic agents in a time resolved manner. Also possible synergistic affects at the level of protein neogenesis could be investigated.

This could help in the future to improve the success rate of TB therapy, reduce side effects and subsequently the biopsychosocial burden of the patients through adjusted antibiotic dosage and more effective therapy regimens, as well as saving costs for the health care system and preventing the development of antibiotic resistance through lower therapy discontinuation rates.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Bakterien und Infektionserkrankungen	1
1.2 Mykobakterien und deren Bedeutung als Krankheitserreger.....	3
1.2.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> - der Erreger der Tuberkulose.....	4
1.2.2 Bacillus Calmette-Guérin (BCG) als Modellorganismus.....	7
1.3 Problematik der derzeitigen Tuberkulosetherapie	9
1.4 Neues Antibiotikum BTZ043	13
1.5 Zweitlinien-Antibiotikum Linezolid.....	14
1.6 Theoretischer Hintergrund	15
1.6.1 Beschreibung der erregerspezifischen Wirksamkeit von Antibiotika	15
1.6.2 Proteomik – neue Möglichkeiten durch dynamische Quantifizierung auf Proteinebene.....	18
1.7 Zielsetzung.....	23
2 MATERIAL UND METHODEN.....	25
2.1 Material.....	25
2.1.1 Geräte.....	25

2.1.2	Software	27
2.1.3	Bakterienstämme	28
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	28
2.1.5	Chemikalien.....	29
2.1.6	Pufferlösungen	32
2.2	Methoden	33
2.2.1	Standardisierung der BCG Wachstumsbedingungen.....	33
2.2.2	Reinheitskontrolle der <i>M. bovis</i> BCG Kultur.....	35
2.2.3	Methodenoptimierung der Rasterelektronenmikroskopischen Darstellung des Bacillus Calmette-Guérin (BCG).....	37
2.2.4	Ermittlung der Eigenschaften des BCG Stammes unter Verwendung der Antibiotika BTZ043 und Linezolid	39
2.2.5	Isotopenmarkierung und Erstellung einer Analytendynamik durch massenspektrometrische Messung	42
2.2.6	Statistische Auswertung	44
3	ERGEBNISSE.....	46
3.1	Reinheitskontrolle der Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Kultur	46
3.1.1	Dreiösenausstrich auf Blutagar.....	46
3.1.2	Multiplex-PCR zur Differenzierung des <i>M. bovis</i> BCG von <i>M. tuberculosis</i> und <i>M. smegmatis</i>	46
3.1.3	Rasterelektronenmikroskopische Darstellung des <i>M. bovis</i> BCG.....	47
3.1.4	Methodenoptimierung der Rasterelektronenmikroskopischen Darstellung des Bacillus Calmette-Guérin (BCG).....	48
3.2	Eigenschaften des Bacillus Calmette-Guérin (BCG).....	52
3.2.1	Wachstumsanalyse des <i>M. bovis</i> BCG	52
3.2.2	Minimale Hemmkonzentration und Reduktionsfaktor von Linezolid	54
3.2.3	Minimale Hemmkonzentration und Reduktionsfaktor von BTZ043.....	56

3.3	Isotopenmarkierung und massenspektrometrische Bestimmung der Analytendynamik.....	59
3.3.1	Etablierung eines Messprotokolls für MALDI-TOF Massenspektrometrie	59
3.3.2	Beeinflussung der Analytendynamik durch die Antibiotika Linezolid und BTZ043	76
4	DISKUSSION.....	81
4.1	Etablierung des Bacillus Calmette-Guérin (BCG) als Modellorganismus und Voruntersuchungen zur Sicherung der Gütekriterien des Modells	81
4.2	Methodenoptimierung der Rasterelektronenmikroskopischen Darstellung des Bacillus Calmette-Guérin (BCG).....	84
4.3	Modell zur Untersuchung der Analytendynamik des Bacillus Calmette-Guérin (BCG) nach stabiler Isotopenmarkierung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	86
4.4	Einfluss der Antibiotika Linezolid und BTZ043 auf den Bacillus Calmette-Guérin (BCG)	91
4.4.1	Untersuchung der Potenz der Antibiotika Linezolid und BTZ043 auf den Bacillus Calmette-Guérin (BCG)	91
4.4.2	Untersuchung der Antibiotikawirksamkeit von BTZ043 und Linezolid mithilfe des Modells zur Untersuchung der Analytendynamik des Bacillus Calmette-Guérin (BCG) nach stabiler Isotopenmarkierung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie	94
4.5	Limitationen und Ausblick.....	98
	LITERATUR	100
	ANHANG.....	109
I.	Beeinflussung der Analytendynamik durch das Antibiotikum Linezolid	109
II.	Beeinflussung der Analytendynamik durch das Antibiotikum BTZ043 ...	111
III.	Webquellen Screenshots	116

DANKSAGUNG..... 131

AFFIDAVIT..... 132

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Zellwandaufbau der Mykobakterien</i>	3
<i>Abbildung 2: Wirkungsmechanismen der Primärtherapie-Antibiotika, sowie Linezolid und BTZ043</i>	12
<i>Abbildung 3: Schaubild zur MALDI-TOF Massenspektrometrie</i>	20
<i>Abbildung 4: Kolonien des M. bovis BCG auf Festmedium</i>	41
<i>Abbildung 5: Multiplex-PCR zur Differenzierung von M. tuberculosis DNA und M. bovis BCG DNA</i>	47
<i>Abbildung 6: Agarose-Gelelektrophorese des Multiplex-PCR-Produkts</i>	47
<i>Abbildung 7: REM Aufnahme von M. bovis BCG Einzelzellen nach Kultivierung aus dem Aliquot nach einer Wachstumsdauer von 13 Tagen</i>	48
<i>Abbildung 8: REM Aufnahme des M. bovis BCG nach Rücklösung in aufsteigenden Konzentrationen von NaCl Lösung</i>	50
<i>Abbildung 9: REM Aufnahme des M. bovis BCG nach Rücklösung in aufsteigenden Konzentrationen PBS-Puffer</i>	50
<i>Abbildung 10: REM Aufnahme des M. bovis BCG nach Rücklösung in aufsteigenden Konzentrationen PBS-Puffer und Zentrifugation bei geringerer Umdrehungszahl (2000 rpm)</i>	51
<i>Abbildung 11: REM Aufnahme des M. bovis BCG nach Rücklösung in sterilem Wasser (Kontrolle)</i>	51
<i>Abbildung 12: Darstellung des Wachstumes des M. bovis BCG</i>	53
<i>Abbildung 13: 90 %-Hemmkonzentration (IC90) des Antibiotikums Linezolid für den M. bovis BCG</i>	55
<i>Abbildung 14: 90 %-Hemmkonzentration und Reduktionsfaktor von Linezolid für den M. bovis BCG</i>	56
<i>Abbildung 15: 90 %-Hemmkonzentration (IC90) des Antibiotikums BTZ043 für den M. bovis BCG</i>	57

Abbildung 16: 90 %-Hemmkonzentration und Reduktionsfaktor von BTZ043 für den M. bovis BCG 58

Abbildung 17: Beispielhafte kumulative Darstellung mehrerer Einzelspektren des M. bovis BCG ohne Antibiotikazugabe. 60

Abbildung 18: Schaubild zur Ermittlung des Massenschwerpunktes COG 61

Abbildung 19: Analyt bei 2740 m/z des M. bovis BCG im Zeitraum von 12 bis 168 Stunden..... 66

Abbildung 20: Analyt bei 3441 m/z des M. bovis BCG im Zeitraum von 12 bis 168 Stunden..... 67

Abbildung 21: Analyt bei 4342 m/z des M. bovis BCG im Zeitraum von 12 bis 168 Stunden..... 68

Abbildung 22: Analyt bei 5500 m/z des M. bovis BCG im Zeitraum von 12 bis 168 Stunden..... 69

Abbildung 23: Analyt bei 5688 m/z des M. bovis BCG im Zeitraum von 12 bis 168 Stunden..... 70

Abbildung 24: Analyt bei 6361 m/z des M. bovis BCG im Zeitraum von 12 bis 168 Stunden..... 71

Abbildung 25: Analyt bei 8335 m/z des M. bovis BCG im Zeitraum von 12 bis 168 Stunden..... 72

Abbildung 26: Analyt bei 8726 m/z des M. bovis BCG im Zeitraum von 12 bis 168 Stunden..... 73

Abbildung 27: Analyt bei 11373 m/z des M. bovis BCG im Zeitraum von 12 bis 168 Stunden..... 74

Abbildung 28: Analyt bei 5688 m/z des M. bovis BCG im Zeitraum von 12 bis 96 Stunden..... 77

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Schema der Tuberkulose Standardtherapie bei Patienten mit neu aufgetretener TB ohne Antibiotikaresistenzen.....</i>	<i>10</i>
<i>Tabelle 2: Wirkungsmechanismen und Nebenwirkungen und Besonderheiten der Primärtherapie-Antibiotika gegen TB.....</i>	<i>12</i>
<i>Tabelle 3: Übersicht über die Versuchsansätze zur Optimierung der REM Probenpräparation des M. bovis BCG Stammes.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 4: Volumenkonzentrationen der Rücklösungssubstanzen</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 5: Versuchsansätze zur Optimierung der REM Probenpräparation des M. bovis BCG.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 6: Wachstum des M. bovis BCG durch Messung der Absorption</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 7: Reduktionsfaktor R des Antibiotikum BTZ043 für den M. bovis BCG</i>	<i>58</i>
<i>Tabelle 8: Spezifisch für den M. bovis BCG definierte Analyten in m/z mit zugehörigen Messgrenzen.</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 9: Statistische Analyse der Analyten mit Identifikation des ersten Zeitpunktes, ab welchem sich die Mittelwerte der Massenschwerpunkte (COG) von Kontrollgruppe (KG) und Testgruppe (TG) signifikant unterscheiden.</i>	<i>75</i>
<i>Tabelle 10: Mittelwert, Standardabweichung (SD) und 95 %-Konfidenzintervall des Δ COG von der Gruppe ohne Antibiotikum, BTZ043 1x IC90 und BTZ043 2x IC90 des Analyten bei 5688 m/z des M. bovis BCG zu den Zeitpunkten 12 bis 96 Stunden.....</i>	<i>78</i>
<i>Tabelle 11: Zusammenfassung der Anzahl der Versuchsdurchführungen unter Einwirkung der Antibiotika und Visualisierung der Messbarkeit der Δ COG der einzelnen Analyten unter Einfluss der Antibiotika BTZ043 und Linezolid in den jeweiligen Konzentrationen (1x und 2x IC90).</i>	<i>80</i>

Abkürzungsverzeichnis

a.u.	willkürliche Einheit (<i>arbitrary unit (engl.)</i>)
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AIDS	Erworbenes Immunschwächesyndrom (<i>acquired immune deficiency syndrome (engl.)</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
BTZ	Benzothiazone
BTZ043	spezifischer Wirkstoff aus der Gruppe der Benzothiazone
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa (lat.)</i>
CFU	Koloniebildende Einheiten (<i>colony forming units (engl.)</i>)
CI	Konfidenzintervall
COG	Massenschwerpunkt (<i>center of gravity (engl.)</i>)
COVID-19	Coronavirus-Krankheit-2019, ausgelöst durch eine Infektion mit dem Virus SARS-CoV-2
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid (engl.)</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat

DPA	Decaprenylphosphoryl Arabinose
DprE1	Decaprenylphoryl- β -D-Ribose 2'-Epimerase
DRP	Decaprenylphosphoryl Ribose
<i>E.</i>	<i>Escherichia (lat.)</i>
<i>e.g.</i>	<i>exempli gratia (lat.)</i>
<i>engl.</i>	englisch
<i>etc.</i>	<i>et cetera (lat.)</i>
evtl.	eventuell
g	Gramm (Einheit) (mg = 10^{-3} g, μ g = 10^{-6} g, ng = 10^{-9} g)
HCCA	alpha-Cyano-4-Hydroxycimtsäure (<i>alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (engl.)</i>)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus (<i>human immunodeficiency virus (engl.)</i>)
IC	Hemmkonzentration (<i>inhibitory concentration (engl.)</i>)
insg.	Insgesamt
<i>kb</i>	Kilobase (<i>kilobase (engl.)</i>)
l	Liter (ml = 10^{-3} l, μ l = 10^{-6} l)
<i>lat.</i>	lateinisch
LC-MS	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie
M	Mittelwert
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium (lat.)</i>
m/z	Masse / Ladung
MALDI	Matrixunterstützte Laser-Desorptions-Ionisation (<i>matrix-assisted laser desorption/ ionisation (engl.)</i>)

Abkürzungsverzeichnis

MTBC	<i>Mycobacterium-tuberculosis-Komplex (Mycobacterium-tuberculosis-complex (engl.))</i>
MDR-TB	Multiresistente Tuberkulose (<i>multidrug-resistant tuberculosis (engl.)</i>)
MIC	Minimale Hemmkonzentration (<i>minimal inhibitory concentration (engl.)</i>)
min	Minuten
mind.	mindestens
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NaCl	Natriumchlorid
NTM	nicht-tuberkulösen Mykobakterien (<i>nontuberculous-mycobacteria (engl.)</i>)
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline (engl.)</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction (engl.)</i>)
REM	Rasterelektronenmikroskop
rpm	Umdrehungen pro Minute (Einheit) (<i>revolutions per minute (engl.)</i>)
RR-TB	Rifampicin resistente Tuberkulose (<i>rifampicin-resistant tuberculosis (engl.)</i>)
SARS-CoV-2	schweres akutes respiratorisches Syndrom Coronavirus-2 (<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (engl.)</i>)
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation (engl.)</i>)

SDG	Ziel für nachhaltige Entwicklung (<i>sustainable development goal (engl.)</i>)
sog.	sogenannt
Ssp.	<i>Subspecies (lat.)</i>
STIKO	Ständige Impfkommision
TB	Tuberkulose
TMC207	Antibiotikum der Klasse Diarylquinoline (Eigenname Bedaquiline)
TOF	Flugzeit (<i>time-of-flight (engl.)</i>)
u.a.	unter anderem
UN	Vereinte Nationen (<i>United Nations (engl.)</i>)
V	Volt (Einheit)
v/v	Volumenkonzentration
w/v	Massenkonzentration
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization (engl.)</i>)
XDR-TB	Extrem arzneimittelresistente Tuberkulose (<i>extensively drug-resistant tuberculosis (engl.)</i>)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Bakterien und Infektionserkrankungen

Infektionserkrankungen sind noch immer eines der größten Probleme der Weltgesundheit. Das vielfältige Spektrum der Krankheitserreger erstreckt sich von Bakterien über Viren bis hin zu Protozoen und Würmern. Zur Behandlung von Infektionskrankheiten wurden in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl von Therapeutika entwickelt. Die Medikamentengruppe der Antibiotika hat zu einem entscheidenden Fortschritt in der Therapie von bakteriellen Infektionskrankheiten beigetragen. Nach der Entdeckung von Antibiotika anfangs des 20. Jahrhunderts herrschte bei einigen Wissenschaftlern die Meinung, dass der Kampf gegen die bakteriellen Pathogene gewonnen sei [1].

Doch noch heute werden neu auftretende Infektionskrankheiten in der Mehrheit der Fälle von Bakterien verursacht [2]. Außerdem waren drei Infektionskrankheiten unter den zehn häufigsten Todesursachen weltweit in den Jahren von 2000 bis 2015 laut einem Bericht der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization, WHO (engl.)*). Untere Atemwegserkrankungen liegen an dritter Stelle, Durchfallerkrankungen auf Platz 8 und Tuberkulose auf Platz 9 (Stand Jahr 2019: Tuberkulose auf Platz 13) [3-5]. Ischämische Herzkrankheiten stehen global betrachtet weiterhin an erster Stelle, doch in Ländern mit niedrigem Einkommen sind Infektionskrankheiten noch immer die führende Todesursache. Ein Fortschritt zeigt sich jedoch an insgesamt sinkenden Todesraten durch Infektionskrankheiten im Vergleich zu den Vorjahren. Dabei ist vor allem die gesunkene Todesrate durch HIV/ AIDS hervorzuheben, durch bessere Verfügbarkeit der antiretroviralen Therapie [4].

Doch woran liegt es, dass trotz Antibiotika die Morbidität und Mortalität von bakteriellen Infektionserkrankungen noch immer hoch ist [2, 4]? Während bei der antiretroviralen Therapie gegen HIV inzwischen Erfolge zu verzeichnen sind, so gestaltet sich im Gegenzug die Therapie von bakteriellen Infektionskrankheiten immer problematischer, da zunehmend Resistenzen gegen herkömmliche

Antibiotika beschrieben werden. Mit Erstlinien-Antibiotika können multiresistente Keime zum Teil nicht mehr erfolgreich behandelt werden und es bedarf somit der Entwicklung neuer wirksamer Antibiotika [6].

Je nach Aufbau der Bakterien gibt es verschiedene Angriffspunkte der Antibiotika. Einige Antibiotika greifen bspw. in den Zellwandaufbau ein und andere in die ribosomale Proteinsynthese.

Bakterien werden anhand des bakteriellen Zellwandaufbaus in zwei große Gruppen eingeteilt, die nach dem historisch beobachteten Färbeverhalten in der Färbung nach Gram benannt wurden. So zeichnen sich die meisten grampositiven Bakterien durch eine mehrschichtige peptidoglycanhaltige Zellwand aus. Wohingegen gramnegative Bakterien eine dünne peptidoglycanhaltige Zellwand aufweisen, welcher eine Lipopolysaccharidmembran aufgelagert ist. Diese hydrophobe äußere Membran von gramnegativen Bakterien verhindert die Diffusion von hydrophilen Antibiotika (bspw. beta-Lactam Antibiotika) durch die Zellmembran, weshalb diese nur beim Vorliegen von Porinen und spezifischen Kanälen wirken können [7, 8].

Einige Bakterien, wie bspw. Mykobakterien, lassen sich jedoch aufgrund ihres Färbeverhaltens nicht eindeutig in die Gruppen der gramnegativen bzw. grampositiven Bakterien einordnen (siehe Kapitel 1.2) [9].

1.2 Mykobakterien und deren Bedeutung als Krankheitserreger

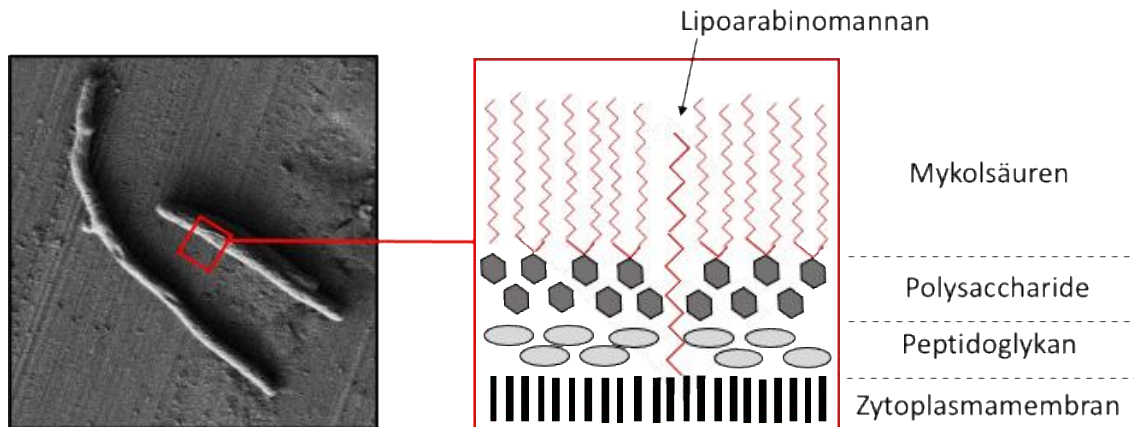


Abbildung 1: Zellwandaufbau der Mykobakterien

Links: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme zweier *M. bovis* BCG Zellen. Rechts: Schematische Darstellung des Zellwandaufbaus der Mykobakterien.

Die Familie der *Mycobacteriaceae* (*lat.*) charakterisiert sich durch aerobe, unbewegliche, stäbchenförmige Bakterien mit lipidreichem Zellwandaufbau. Die Zellwand besteht aus Peptidoglykan (Murein), Arabinogalactan, Mykolsäuren und Lipoarabinomannan [10]. Mykobakterien sind aufgrund ihres Färbeverhaltens nach der Gram-Färbung nicht eindeutig zuzuordnen. Durch genom-basierte Taxonomie lassen sie sich jedoch den grampositiven Bakterien zuordnen [11]. Sie besitzen zudem eine Peptidoglykan-Schicht, welche in ähnlicher Weise bei grampositiven Bakterien auftritt. Der Peptidoglykan-Schicht ist jedoch eine Schicht von langkettigen Mykolsäuren aufgelagert. Diese lipidhaltige Mykolsäure-Schicht verleiht den Mykobakterien eine hydrophobe Membran, welche Ähnlichkeiten zu der äußeren Lipopolysaccharidmembran von gramnegativen Bakterien aufweist. Der lipidreiche Wandaufbau der Mykobakterien, welcher auch zur Beschreibung der Säurefestigkeit in der mikrobiologischen Ziehl-Neelsen-Färbung dient, macht die Bakterien besonders widerstandsfähig [9].

Nach ihrer Teilungsrate werden Mykobakterien in schnell wachsende und langsam wachsende Bakterien eingeteilt. Zu den langsam wachsenden Mykobakterien zählen *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprea*, welche jeweils die Erreger der Tuberkulose, der Rindertuberkulose und der Lepra sind (Verdopplungszeit

$t_v = 11 - 23$ Stunden) [12-15]. Zu den schnell wachsenden Mykobakterien gehört bspw. *M. smegmatis* (Verdopplungszeit $t_v = 2 - 6$ Stunden) [16, 17].

Im klinischen Kontext hat sich die Einteilung der Mykobakterien in *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex (MTBC) und nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM) etabliert. Der *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex (MTBC) beschreibt die humanpathogenen Tuberkuloseerreger zu dem neben *M. tuberculosis* auch *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. pinnipedii* und *M. caprae* gezählt werden [16].

Neben den MTBC gibt es zahlreiche nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM), welche nicht bzw. fakultativ-pathogen sind und ubiquitär in der Umwelt vorkommen. Infektionen mit NTM sind selten, wobei meist die Lunge bei vorbestehenden Lungenerkrankungen betroffen ist. Weiterhin können NTM zu Infektionen der Haut, Weichgewebe und selten auch zu Infektionen der Knochen führen. Das Erkrankungsbild des Buruli Ulkus bspw. wird durch *M. ulcerans* hervorgerufen und manifestiert sich als schmerzloses kutanes Ulcus. Bei Kindern manifestieren sich Infektionen mit NTM oft in Form einer Lymphadenitis. In immunsupprimierten Patienten können Infektionen mit atypischen Mykobakterien jedoch zu Dissemination und somit zu schweren Erkrankungsverläufen führen [15].

1.2.1 *Mycobacterium tuberculosis* - der Erreger der Tuberkulose

Mycobacterium tuberculosis, der bakterielle Erreger der Tuberkulose (TB), wurde erstmalig 1882 von Robert Koch beschrieben, was damals die Hoffnung auf eine baldige Beendigung der TB Epidemie wachsen ließ [10]. Doch noch heute ist die TB laut der Weltgesundheitsorganisation WHO eine der größten Herausforderungen für die Weltgesundheit [18].

Tuberkulose ist, aktuell nach SARS-CoV-2, die zweittödlichste Infektionserkrankung, welche durch eine einzelne Pathogengruppe (*Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex (MTBC)) ausgelöst wird und ist Stand 2019 die dreizehnt häufigste Todesursache weltweit [3, 5]. In der Europäischen Union lag die TB Prävalenz

im Jahr 2017 bei nur 3 %. Daher wird die enorme Bedrohung der Weltgesundheit durch die TB dort häufig unterschätzt. Zwei Drittel der Erkrankten stammten 2019 aus acht Ländern, darunter Indien (26 %), Indonesien (8,5 %), China (8,4 %), die Philippinen (6 %), Pakistan (5,7 %), Nigeria (4,4 %), Bangladesch (3,6 %) und Südafrika (3,6 %) [5].

Laut dem WHO „Global Tuberkulose Report“ des Jahres 2020 sind schätzungsweise 1,7 Milliarden Menschen weltweit mit TB infiziert. Dies entspricht ca. einem Viertel der gesamten Weltbevölkerung [5]. Meist liegt bei immunkompetenten Patienten zuerst die latente und somit symptomlose TB vor. Die Wahrscheinlichkeit aus einer latenten Infektion eine aktive, klinisch manifeste TB zu entwickeln ist mit 5 – 10 % zwar relativ gering und tritt häufig im Zusammenhang mit einer kompromittierten Immunlage auf, aber auch Risikofaktoren wie eine HIV Infektion, Unterernährung, Alkoholkonsum, Diabetes Mellitus oder Rauchen steigern das Risiko eine aktive TB zu entwickeln [18]. Die Symptomatik einer aktiven TB ist oft unspezifisch mit Symptomen wie Husten, Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust und leichtem Fieber. Der infektiöse Zustand (auch als ‚offene TB‘ bezeichnet) kann sich schon Monate vor Diagnosestellung manifestieren und da die TB meist über Aerosole übertragen wird, trägt dies zur Ausbreitung bei [10].

Nicht nur die hohen weltweiten Infektionsraten, sondern auch die zunehmende Anzahl von antibiotikaresistenter TB verstärken die Problematik. Alleine 3,5 % der neu aufgetretenen TB Fälle und zusätzlich 18 % der vorbehandelten TB Fälle litten im Jahr 2017 unter multiresistenter TB (MDR-TB) bzw. Rifampicin-resistenter-Tuberkulose (RR-TB) [18]. Dies bedeutet, dass die Erreger bei der MDR-TB gegen die beiden bislang potentesten Primärtherapie-Medikamente Isoniazid und Rifampicin bzw. bei der RR-TB ausschließlich gegen Rifampicin resistent sind. 8,5 % dieser Fälle wiesen sogar einen extrem resistenten Phänotyp (XDR-TB) auf. Hier liegen zusätzlich Resistenzen gegen alle Fluorchinolone und mindestens eine Resistenz gegen ein Zweitlinienmedikament vor [18].

Der Behandlungserfolg der MDR/ RR-TB ist weltweit mit einer Erfolgsrate von 57 % niedrig. Somit stellten sich prozentual bei den Patienten, welche im Jahr 2019 die Behandlung der MDR/ RR-TB abgeschlossen haben, lediglich 57 % in

bakteriologischen Untersuchungen als geheilt dar, wobei bei 43 % noch ein Erreger nachweisbar war. Jedoch auch bei sensiblen TB Stämmen lag die Erfolgsrate im Jahr 2019 nur bei 85 %. Als Ursache hierfür können die komplexen und langwierigen Therapieschemata und die relativ nebenwirkungsreichen TB Medikamente gezählt werden, welche zu hohen Therapieabbruchraten führen [5].

Doch warum ist die TB so schwierig zu therapieren? Die intrinsischen Eigenschaften des *M. tuberculosis* bedingen die schwierige Behandlung. Die lipidreiche Zellwand trägt zum einen zur Widerstandsfähigkeit der Mykobakterien bei [10]. Außerdem besitzen pathogene Mykobakterien mehrere spezifische Mechanismen, um der Immunabwehr zu entkommen. Am Ort der Primärmanifestation (meist die Lunge; prinzipiell kann jedoch jedes Organ betroffen sein) verursacht der Erreger die Bildung von epitheloidzelligen verkäsenden Granulomen. In diesen Granulomen ist *M. tuberculosis* in der Lage intrazellulär in Makrophagen und in nekrotischem (verkäsenden) Gewebe zu überleben. Die Verhinderung der Verschmelzung von Phagolysosomen und die Veränderung des intrazellulären Milieus der Makrophagen ermöglicht den MTBC-Stämmen intrazellulär zu persistieren [16]. Durch Hemmung der Inflammation und Apoptose wird darüber hinaus auch die Immunantwort des Trägers moduliert. In den Granulomen persistieren die Bakterien jahrelang, möglicherweise in stoffwechsellinaktiven, sog. dormanten Formen (aufgrund uneinheitlicher Nomenklatur z.T. auch als lebensfähige, aber nicht kultivierbare Bakterien (*viable but non-culturable*, VBNC (*engl.*)), latente oder persistierende Form bezeichnet) [16, 19-21].

Angesichts der hohen Fallzahlen scheint das Ziel der WHO und der UN, bis zum Jahr 2030 die TB Epidemie zu beenden, sehr optimistisch. Diese wurde 2015 fest in den *Sustainable Development Goals* (SDGs, (*engl.*)) der UN verankert. Die TB Inzidenzrate ist in den letzten Jahren zwar jährlich gesunken, allerdings wird das Zwischenziel zum Erreichen der gesetzten SDGs mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht erreicht. Ziel war eine Reduktion der Inzidenzrate von 20 % zwischen 2015 und 2020, jedoch lag die Reduktion zwischen 2015 und 2019 nur bei 9 % [5]. Die COVID-19 Pandemie hat laut WHO „Global Tuberkulose Report“ des Jahres 2022 letztendlich dazu geführt, dass die Ziele der WHO und UN endgültig

aus den Augen verloren wurden. Es zeigt sich zwar ein deutlicher Rückgang der neu aufgetretenen TB Fälle im Zeitraum von 2020 und 2021, was jedoch für eine erhebliche Unterdiagnose von neu infizierten Patienten spricht und demzufolge zu einer fehlenden Behandlung und weiteren Ausbreitung der TB führt. Die WHO prognostiziert deshalb, dass Anzahl der Todesfälle durch die TB in den Folgejahren deutlich steigen wird [3].

Ein wichtiger Bestandteil der WHO Strategie zur Beendigung der TB und zum Erreichen der SDGs ist dabei unter anderem, die Forschung und Entwicklung von neuen und vor allem effektiveren TB Medikamenten voranzutreiben [22].

In der „*Moscow Declaration to end Tuberculosis*“ der WHO von 2017 wird zum einen die Entwicklung neuer und effektiverer Medikamente avanciert, welche zu verkürzten, gut wirksamen und gleichzeitig kosteneffektiven Therapieschemata führen. Des Weiteren wird ein Fokus auf besseren Zugang zu neu entwickelten Medikamenten und die Entwicklung einer sicheren und effizienten TB Impfung gelegt [23]. Bislang ist die einzige zugelassene Impfung gegen TB die BCG-Impfung [15]. Da der *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) Stamm in dieser Arbeit als Modellorganismus verwendet wird, soll hierauf im Folgenden genauer eingegangen werden.

1.2.2 Bacillus Calmette-Guérin (BCG) als Modellorganismus

Der *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) wurde 1908 von den französischen Forschern Albert Calmette und Camille Guérin zuerst kultiviert. Bei dem Lebendimpfstoff handelt es sich um einen attenuierten Stamm des *M. bovis* Wildtyp.

Als bislang einzig zugelassener Impfstoff gegen die TB kommt dem *M. bovis* BCG eine große Bedeutung zu [15]. Jedoch hat sich die Effektivität und Effizienz der BCG-Impfung in verschiedenen Metaanalysen aus randomisiert kontrollierten Studien als inkonsistent und gering, aber dennoch vorhanden herausgestellt [24]. Die BCG-Impfung zeigte nur einen moderaten Schutz vor der Erstinfektion mit *M. tuberculosis*. Jedoch haben Metaanalysen einen Schutz gegen pulmonale TB und vor allem gegen schwere Verläufe der TB nachweisen können. Bei

neonataler Impfung liegt der Schutz gegen pulmonale TB zwischen 44 % bis 99 %. Man konnte eine Reduktion von Tuberkulöser Meningitis und Miliartuberkulose von je über 70 % nachweisen. Einzelne Studien zeigten auch eine Wirksamkeit der BCG-Impfung gegen andere mykobakterielle Erkrankungen bspw. Lepra (*M. leprea*) und Buruli Ulkus (*M. ulcerans*) [15].

Die inkonsistenten Ergebnisse sind wahrscheinlich auf Variation im Studiendesign und auf den Einfluss der in der Umwelt ubiquitär vorhandenen Mykobakterien auf die menschliche Immunlage zurückzuführen [15]. Der Schutz ist insgesamt bei neonataler Impfung am höchsten. Je später die Impfung erfolgt, desto geringer ist die Effektivität. Außerdem geht die Schutzwirkung im Erwachsenenalter ca. 15 bis 20 Jahren nach Impfung verloren [15].

Die WHO empfiehlt deshalb die BCG-Impfung in der Neonatalperiode und nur noch in Ländern mit hoher Inzidenz von TB, Lepra und Buruli Ulkus [5, 15, 25].

In Deutschland ist die BCG-Impfung seit 1998 nicht mehr von der STIKO empfohlen aufgrund der niedrigen TB Inzidenz in Zusammenschau mit der relativ niedrigen Schutzeffektivität und dem größeren Nebenwirkungsprofil des Lebendimpfstoffes [26].

Zunehmende Bedeutung hat *M. bovis* BCG als Modellorganismus in der Forschung erlangt, da er zum *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex zählt und mit *M. tuberculosis* über 99,9 % der DNA teilt [10, 24, 27]. Es zeigte sich in Clusteranalysen des Genoms der Bakterien des MTBC, dass *M. bovis* ein Abkömmling von *M. tuberculosis* ist, welcher sich durch zahlreiche Deletionen der DNA entwickelt hat [16, 28]. Alle *M. bovis* BCG Stämme unterscheiden sich von virulenten *M. tuberculosis* und *M. bovis* Stämmen in Deletion der Genregionen RD1 und RD3. Die RD1 Region als Modulator, scheint über ihren Einfluss auf die Expression von multiplen Genen, für die Virulenz verantwortlich zu sein [29]. Es wurde gezeigt, dass die Gene der RD1 Region Zellnekrose der infizierten Zellen induzieren [30].

Der *M. bovis* BCG Pasteur Stamm (1173P2) wird in dieser Arbeit als Modellorganismus des TB Erregers verwendet werden, da er die intrinsischen Eigenschaften der MTBC gut abbildet [27]. Zudem fällt er unter die Risikogruppe 2 nach BioStoffV [31]. *M. tuberculosis* fällt hingegen unter die Risikogruppe 3 nach BioStoffV und verlangt daher geeignete Labore mit größeren Sicherheitsvorkehrungen [31, 32].

1.3 Problematik der derzeitigen Tuberkulosetherapie

Die Standardtherapie gegen TB bei Patienten mit neu aufgetretener Erkrankung ohne Antibiotikaresistenzen bestand bislang aus einer Kombinationstherapie von zwei bzw. vier Antibiotika und einer Behandlungsdauer von insgesamt sechs Monaten. Dabei wird in der Initialphase von zwei Monaten eine Kombination von vier Wirkstoffen namentlich Isoniazid, Rifampicin, Ethambutol und Pyrazinamid verabreicht. Fortgeführt wird die Therapie für weitere vier Monate mit den zwei Wirkstoffen Isoniazid und Rifampicin. Die Kombinationstherapie gilt als obligat, da bei Monotherapie hohe Resistenzentwicklung beobachtet wurde [33]. Im Jahr 2022 wurden von der WHO neue Therapieempfehlungen veröffentlicht, wobei zwei neue und lediglich viermonatige Therapieregime bei Patienten mit neu aufgetretener TB ohne Antibiotikaresistenzen alternativ zu dem sechsmonatigen Regime empfohlen wurden (siehe Tabelle 1) [34].

Zeit nach Therapiebeginn in Monaten	1.	2.	3.	4.	5.	6.
<p>sechsmonatiges Therapie-schemata</p> <p><i>empfohlen unabhängig von Patientenalter und Schweregrad der TB</i></p>	<p>Isoniazid</p> <p>Rifampicin</p> <p>Pyrazinamid</p> <p>Ethambutol</p>		<p>Isoniazid</p> <p>Rifampicin</p>			
<p>viermonatiges Therapie-schemata</p> <p><i>empfohlen unabhängig vom Schweregrad der TB, jedoch erst ab dem 12. Lebensjahr</i></p>	<p>Isoniazid</p> <p>Rifapentin</p> <p>Moxifloxacin</p> <p>Pyrazinamid</p>		<p>Isoniazid</p> <p>Rifapentin</p> <p>Moxifloxacin</p>			
<p>viermonatiges Therapie-schemata</p> <p><i>empfohlen bei milder pulmonaler TB bzw. peripherer Lymphknoten TB, jedoch nur zwischen 3. Lebensmonat bis 16. Lebensjahr</i></p> <p>Definition der milden pulmonalen TB bzw. peripheren Lymphknoten TB: 1) intrathorakale Lymphknoten-TB ohne Atemwegsobstruktion. 2) Lungen-TB, die auf einen Lungenlappen beschränkt ist, ohne Hohlräume; ohne pulmonales Muster einer Milartuberkulose. 3) unkomplizierter Pleuraerguss (ohne Pneumothorax oder Empyem).</p>	<p>Isoniazid</p> <p>Rifampicin</p> <p>Pyrazinamid</p> <p>(Ethambutol)</p> <p><i>Ethambutol sollte nur in Regionen mit hoher HIV-Prävalenz, hoher Isoniazid-Resistenz, sowie bei HIV-Seropositivität verabreicht werden</i></p>		<p>Isoniazid</p> <p>Rifampicin</p>			

Tabelle 1: Schema der Tuberkulose Standardtherapie bei Patienten mit neu aufgetretener TB ohne Antibi-otikaresistenzen

Die Wirkungsmechanismen, Nebenwirkungen und Besonderheiten der wichtigsten Wirkstoffe der Standardtherapie sind im Folgenden aufgeführt:

Antibiotika der Primärtherapie	Wirkungsmechanismus	Nebenwirkungen	Besonderheiten
Isoniazid	Hemmung der Zellwandsynthese	<ul style="list-style-type: none"> • Exanthem +/- Puritis • Hepatitis, Ikterus, akutes Leberversagen • Gastrointestinale Nebenwirkungen • Periphere Neuropathie • Müdigkeit 	<ul style="list-style-type: none"> • Plasmahalbwertszeit: 1 – 3 Stunden • Wirkt hoch bakterizid auf replizierenden Mykobakterien
Rifampicin	Hemmung der RNA- Polymerase und somit der Transkription	<ul style="list-style-type: none"> • Exanthem +/- Puritis • Hepatitis, Ikterus, akutes Leberversagen • Schock, Purpura, akutes Nierenversagen • Gastrointestinale Nebenwirkungen • Orangeroter Urin • Grippale Symptome bei intermittierender Einnahme 	<ul style="list-style-type: none"> • Plasmahalbwertszeit: 2 – 3 Stunden • Liquorgängig • Bakterizid und bakteriostatisch • Wirkt gegen intra- und extrazelluläre Erreger
Ethambutol	Hemmung der Zellwandsynthese über Arabinosyl-Transferase	<ul style="list-style-type: none"> • Visusverlust 	<ul style="list-style-type: none"> • Plasmahalbwertszeit: 3 – 4 Stunden • Eingesetzt, um die Resistenzentwicklung zu verhindern/ verzögern

Pyrazinamid	Mehrere unspezifische Angriffspunkte	<ul style="list-style-type: none"> • Exanthem +/- Puritis • Hepatitis, Ikterus, akutes Leberversagen • Gastrointestinale Nebenwirkungen • Arthralgie 	<ul style="list-style-type: none"> • Plasmahalbwertszeit: ca. 10 Stunden • Bakteriostatisch, schwach bakterizid • Wirkt effektiv in saurem Milieu bspw. im Intrazellularraum der Makrophagen oder in Entzündungsge-webe
-------------	--------------------------------------	--	--

Tabelle 2: Wirkungsmechanismen und Nebenwirkungen und Besonderheiten der Primärtherapie-Antibiotika gegen TB

Quellen: eigene Darstellung in Anlehnung an [33, 35-37]

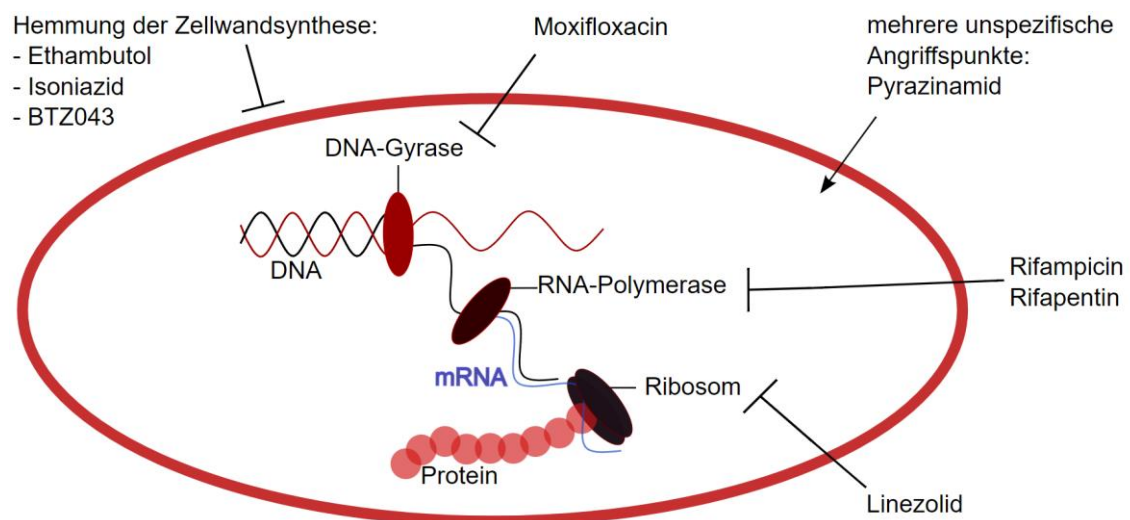


Abbildung 2: Wirkungsmechanismen der Primärtherapie-Antibiotika, sowie Linezolid und BTZ043

Quelle: eigene Darstellung in Anlehnung an [38, 39]

Die lange und komplexe Therapie, sowie die nebenwirkungsreichen Medikamente führen zu hohen Raten von Therapieabbrüchen [5]. Dies ist ein Grund für

die zunehmende Resistenzentwicklung gegen gängige TB Antibiotika [5, 33, 40]. Zur Verhinderung von Resistenzentwicklung sind zum einen Resistenztestungen vor Therapiebeginn nötig, damit stets mit einer Kombination an wirksamen Medikamenten therapiert wird. Zum anderen benötigt es eine sichergestellte Medikamenteneinnahme. Je nach Patientenkollektiv kann es notwendig sein, die Einnahme der Medikamente unter Überwachung durchzuführen. Dies ist bekannt unter dem Akronym DOT (*directly observed treatment (engl.)*). Ziel der DOT-Strategie ist die Vermeidung von unzureichender Einnahme der Antibiotika und von Therapieabbrüchen [33]. Wenn eine MDR-TB vorliegt verlängert sich das Behandlungsschema deutlich auf mindestens 9 bis 24 Monate und bedarf der Verwendung von Zweitlinienmedikamenten. Eine regelmäßige Überwachung zur frühzeitigen Erkennung von unerwünschten Arzneimittelwirkungen ist hierbei ein fester Bestandteil der Behandlung [40].

Die Therapie der TB gestaltet sich somit noch immer sehr langwierig, ist mit multiplen Nebenwirkungen assoziiert und bringt eine hohe biopsychosoziale Belastung für die Patienten mit sich [5, 40].

Im Folgenden werden zwei TB Antibiotika (BTZ043, Linezolid) mit unterschiedlichen Wirkmechanismen genauer betrachtet, welche in dieser Arbeit verwendet wurden.

1.4 Neues Antibiotikum BTZ043

Die Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen *M. tuberculosis* ist notwendig, um die Ziele der WHO Strategie zur Beendigung der TB zu erreichen und die Therapie, speziell von resistenter Tuberkulose, zu verbessern. [22, 23]. Die Benzothiazone (BTZ) sind eine vielversprechende Gruppe aus Wirkstoffen (darunter BTZ043), welche eine hohe Wirksamkeit gegen *M. tuberculosis* zeigten [38, 41]. Ihr Wirkungsmechanismus beruht auf der Hemmung des Enzyms Decaprenylphosphoryl- β -D-Ribose 2'-Epimerase (DprE1). Durch Hemmung dieses Enzyms wird die mykobakterielle Zellwandsynthese gehemmt. Dies geschieht, indem die

Umwandlung von Decaprenylphosphoryl-Ribose (DRP) in Decaprenylphosphoryl-Arabinose (DPA) inhibiert wird, wobei DPA dann für die Arabinan-Synthese der mykobakteriellen Zellwand nicht mehr zur Verfügung steht [41, 42].

In der Kombination von BTZ043 mit anderen antituberkulösen Antibiotika hat sich *in vitro* teilweise ein Synergismus gezeigt [41]. *Lechartier et al.* beschreibt für *M. tuberculosis* (H37Rv) einen Synergismus der Antibiotika TMC207 und BTZ043 *in vitro* [41]. Geringere Konzentrationen beider Antibiotika in Kombination haben einen stärkeren bakteriziden Effekt gezeigt als hochdosierte Einzelanwendungen. Dies erlaubt die Hypothese, dass durch die Hemmung der bakteriellen Zellwandsynthese durch BTZ043 andere Antibiotika leichter die bakterielle Zellwand passieren können, um ihren Wirkungsort im Zellinneren zu erreichen [41]. Jedoch ist eine Voraussetzung für die Wirkung von BTZ043 ist ein aktiver Metabolismus des Bakteriums, weshalb die Wirkung in dormanten Stadien von *M. tuberculosis*, welche bspw. bei einer latenten TB Infektion auftreten, als abgeschwächt angenommen werden muss [41, 42].

Aktuell befindet sich das Medikament BTZ043 in einer klinischen Studie der Phase Ib/IIa zur Evaluation der Sicherheit und Toleranz von BTZ043 in Patienten mit neu diagnostizierter, unkomplizierter pulmonaler TB [38, 43].

1.5 Zweitlinien-Antibiotikum Linezolid

Linezolid ist ein Antibiotikum der Gruppe der Oxazolidinone und wird häufig als Reservemedikament bei multiresistenten gramnegativen Erregern eingesetzt [44]. Außerdem wird Linezolid zur Behandlung von multiresistenter TB (MDR-TB) und extrem resistenter TB (XDR-TB) eingesetzt, wobei sich die Behandlungsdauer auf bis zu zwei Jahre ausdehnen kann [45-48]. Die Wirkung von Linezolid beruht auf der Hemmung der ribosomalen Proteinbiosynthese, indem es an die 30S-Untereinheit des Ribosoms bindet und somit die Bildung des Initiationskomplexes verhindert was zur Inhibition der Translation führt [45, 46, 49]. Linezolid hat eine sehr hohe orale Bioverfügbarkeit von 100 % und ist gut gewebeängig u.a. auch in das Lungengewebe [45, 46, 50]. Ein weiterer Vorteil von Linezolid

ist, dass es auch bei Erregern der MDR-TB eine relativ niedrige Minimale Hemmkonzentration (MIC) aufweist, wodurch die Dosis bei der Langzeittherapie verringert werden kann [48, 51, 52]. Dies ist äußerst relevant, da Linezolid zu schweren Nebenwirkungen führen kann [47, 49, 52]. Vor allem bei Langzeitanwendung mit einer Linezolid-Plasmakonzentration von über 2 µg/ml können vermehrt Nebenwirkungen wie bspw. eine periphere und optische Neuropathie, Laktatazidose und Knochenmarkssuppression mit Blutbildveränderungen beobachtet werden [46, 47]. Durch Dosierung basierend auf Wirkspiegelbestimmungen im Blutplasma können toxische Nebenwirkungen reduziert werden, wobei noch keine allgemeine Empfehlung hierfür besteht [47]. Darüber hinaus wäre es jedoch denkbar eine Dosisreduktion durch Nutzung von Synergismen zwischen mehreren Antibiotika zu erzielen und dadurch toxischen Nebenwirkungen – verursacht durch hohe Dosierung – zu reduzieren. Da ein Synergismus zwischen Linezolid und BTZ043 denkbar wäre, (angelehnt an die Erkenntnisse von *Lechartier et al.*), wurden diese Antibiotika in dieser Arbeit untersucht [41].

1.6 Theoretischer Hintergrund

1.6.1 Beschreibung der erregerspezifischen Wirksamkeit von Antibiotika

Die Minimale Hemmkonzentration (MIC) ist ein wesentlicher Parameter zur Beschreibung der Empfindlichkeit von Erregern gegenüber Arzneimitteln *in vitro*. Sie ist definiert als die niedrigste Konzentration des Antibiotikums, welche benötigt wird, um das sichtbare Wachstum des zu untersuchenden Erregers zu hemmen [53, 54]. Häufig werden in der Literatur die MIC₅₀-, MIC₈₀- oder MIC₉₀- Werte angegeben, welche der 50 %- /80 %- oder 90 %-Hemmkonzentration entsprechen [51, 52]. Die Minimale Hemmkonzentration wird hier definiert als 90 %-Hemmkonzentration (IC₉₀, MIC₉₀), sprich die Konzentration des Antibiotikums, die benötigt wurde um die photometrische Absorption (bei einer Wellenlänge von 600nm) um 90 % zu reduzieren.

Die MIC ist relevant, um die Potenz neuer Antibiotika auf Erreger zu beschreiben [53]. In der klinischen Praxis wird die MIC darüber hinaus zur Beurteilung und zur

Überwachung von Antibiotikaresistenzen herangezogen, da nach Resistenzentwicklung eines Erregers eine höhere MIC messbar wird [53, 55].

Die häufigsten Methoden zur Bestimmung der MIC sind die Agardiffusionsmethode und die Mikrodilutionsmethode. Dabei werden dem Nährmedium bestimmte Konzentrationen des Antibiotikums zugesetzt und das visuelle Wachstum nach standardisierten Wachstumsbedingungen beobachtet. Die zwei Methoden unterscheiden sich lediglich im Aggregatzustand der Nährmedien, sprich bei der Agardiffusionsmethode wird Festmedium und bei der Mikrodilutionsmethode hingegen wird Flüssigmedium verwendet [53]. Für *M. tuberculosis* wurde ein standardisiertes Protokoll zur Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration von der EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (engl.)*) entwickelt, wobei die Mikrodilutionsmethode zur Anwendung kommt [56]. Für die MIC Bestimmung weiterer Erreger des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes, worunter auch der hier verwendete Modellorganismus *M. bovis* BCG fällt, empfiehlt die EUCAST dieses Protokoll zwar als Leitlinie anzuwenden, jedoch sollte eine Adaption auf spezifische Erregereigenschaften stattfinden [56].

Für den hier gewählten Modellorganismus *M. bovis* BCG wurde die MIC über die Mikrodilutionsmethode bestimmt und das visuelle Wachstum über die Messung der photometrischen Absorption nach der Methode von *Mann et al.* bestimmt [54]. Da bei Photometrischer Messung jedoch sowohl vitale als auch avitale Zellen gemessen werden, ist die zusätzliche Bestimmung der koloniebildenden Einheiten CFU (*colony forming units (engl.)*) zur Beschreibung der bakteriziden Potenz des Antibiotikums essentiell [57]. Für die CFU Bestimmung werden die Erreger auf Festmedium unter Zugabe von Antibiotikum in verschiedenen Verdünnungsstufen unter standardisierten Bedingungen kultiviert und anschließend werden die einzelnen Kolonien auf den Agarplatten ausgezählt. Vorteil dieser Methode ist, dass nur jedes vitale Bakterium in der Lage ist eine Kolonie auf Festmedium zu formen [57].

Aus der CFU der Versuchsgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe lässt sich der Reduktionsfaktor berechnen, welcher beschreibt inwieweit Erreger durch desinfizierende Maßnahmen abgetötet wurden. Je größer der Reduktionsfaktor,

desto effektiver werden demnach die Erreger durch den Wirkstoff abgetötet. Die Berechnung des Reduktionsfaktors erfolgt anhand der CFU mithilfe des dekadischen Logarithmus. Ein Reduktionsfaktor von 1 entspricht dabei einer Reduktion der Erreger um 90 % [58].

Reduktionsfaktor 1 = 90,0 % Reduktion

Reduktionsfaktor 2 = 99,0 % Reduktion

Reduktionsfaktor 3 = 99,9 % Reduktion usw.

Insgesamt sind jedoch weder die MIC noch der Reduktionsfaktor gute Prädiktoren für die Wirksamkeit der Antibiotika *in vivo*. Die Beurteilung der Wirksamkeit im lebenden Organismus ist deutlich komplexer. Sie ist zum Einen abhängig von der Immunkompetenz des Wirts und zum Anderen hängt sie von der Pharmakodynamik und -kinetik des Wirkstoffes ab [53].

Das *Hollow-Fiber-Model* (engl.) ist ein *in vitro* Modell, welches 1985 von *Blaser et al.* entwickelt wurde, um eben diese Beziehung zwischen Pharmakokinetik und Pharmakodynamik herzustellen [59]. In einem Kreislauf wird vom zentralen Kompartiment im Sinne der zentralen Zirkulation andauernd Nährmedium und ggf. Antibiotikum in die Peripherie gepumpt. Das periphere Kompartiment (inokuliert mit Bakterien) ist durch eine semipermeable Membran vom zentralen Kreislauf getrennt, womit durch An- und Abfluten des Antibiotikums in diesem Kompartiment die Schwankungen des Plasmaspiegels der Antibiotika im menschlichen Körper simuliert werden können und eine Konzentrations-/ Wirkungsrelation erstellt werden kann [59-63].

In den letzten Jahren hat sich jedoch immer mehr gezeigt, dass sich die TB Therapie schwierig gestaltet, durch die Fähigkeit des TB Erregers in ein sog. dormantes Stadium überzugehen (sehr niedrige Stoffwechselaktivität), da der Erreger sich in diesem Zustand der Wirkung des körpereigenen Immunsystems, sowie der Wirkung von Antibiotika entziehen kann [19, 20, 64, 65]. Um die Wirksamkeit der Antibiotika auf Bakterien im dormanten Zustand zu modellieren wurde der *Resazurin-Assay* erstmals von *Taneja et al.* verwendet [66]. Der *Resazurin-Assay* wurde ursprünglich als vereinfachte Methode zur MIC Bestimmung

entwickelt, wofür Resazurin als Oxidation-Reduktionsindikator verwendet wurde. Liegen vitale Bakterien vor, so kommt es zum Farbumschlag durch Reduktion des nicht fluoreszierenden blauen Resazurin in das fluoreszierende pinke Resorufin [55, 66-70]. *Taneja et al.* bestimmten nun jedoch die MIC von *M. tuberculosis* H37Rv, *M. smegmatis* und *M. bovis* BCG nachdem durch Sauerstoff-Limitation ein dormanter Zustand hergestellt wurde. Diese Werte wurden mit den MIC Werten der Standard Methode (Agardilutionsmethode und CFU Bestimmung) verglichen. Es zeigte sich, dass dormante Kulturen zwar teilweise kein Wachstum auf Festmedium mehr aufwiesen, jedoch im *Resazurin-Assay* noch Zellaktivität nachweisbar war. *Taneja et al.* folgert daraus, dass der *Resazurin-Assay* besser geeignet ist um die Viabilität der Zellen in nicht-replizierendem, dormanten Zustand zu untersuchen [66].

All diese Modelle sind lediglich in der Lage die Vitalität der Zellen zu beschreiben (durch Bestimmung der MIC), jedoch vermag keines dieser Modelle den Einfluss von Antibiotika auf Ebene des intrazellulären Metabolismus des TB Erregers sichtbar zu machen.

1.6.2 Proteomik – neue Möglichkeiten durch dynamische Quantifizierung auf Proteinebene

Das Proteom definiert alle Proteine die von dem Genom eines Organismus exprimiert werden [71]. Das Forschungsgebiet der Proteomik ermöglicht somit eine Darstellung auf der Ebene der intrazellulärer Proteinbiosynthese [72]. Die Proteomik birgt großes Potential, da hierdurch alle zum Untersuchungszeitpunkt vorliegenden Proteine eines Organismus dargestellt werden können [72, 73].

Ein großer Fortschritt in der Proteomik wurde durch die Quantifizierung der Proteine erzielt, wofür erstmals im Jahr 1999 von *Gygi et al.* und *Oda et al.* stabile Isotopen zur Markierung der Proteine eingesetzt wurden [73-75]. Die Isotopenmarkierung kombiniert mit der Massenspektrometrie (MS) erwies sich als eine gute Methode um die Massenunterschiede nach Isotopenmarkierung sichtbar zu

machen und somit die relative Quantifizierung von Peptiden und Proteinen zu ermöglichen.

Die Massenspektrometrie ist eine analytische Methode, welche sich mittlerweile als Goldstandard in der Proteomik herausgebildet hat (v.a. zur Proteinidentifikation mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)) [76-78]. Verschiedene Technologien zur Massenanalyse stehen zur Verfügung (Ionenfalle, Flugzeitanalyse TOF (*time-of-flight (engl.)*), Quadrupol, Fourier-Transformation-Ionenzyklotron-Resonanz-Analysatoren (FS-MS)) [77]. Darüber hinaus unterscheiden sich die verschiedenen massenspektrometrischen Systeme auch in der Art der Ionisation der Analyten. Die zwei gebräuchlichsten Ionisationsmethoden sind MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ ionisation (engl.)*) und Elektrospray-Ionisierung (ESI). Häufig wird die MALDI-MS zur Analyse der Massen mit dem TOF kombiniert [77]. Bei der MALDI-TOF MS werden die Analyten zuerst zusammen mit einer Matrix co-kristallisiert und anschließend im trockenen Zustand durch einen Laserpuls desorbiert, wobei die Matrix die Laserenergie aufnimmt und zur Ionisation der Analyten beiträgt [79, 80]. Die ionisierten Analyten werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt und trennen sich auf ihrem Weg zum Detektor anhand ihres m/z -Verhältnisses auf. Der TOF-Detektor misst die Zeit zwischen Ionisation und Auftreffen auf dem Detektor, also die sog. *time-of-flight* TOF (*engl.*) [77]. Zum größten Teil treffen einfach geladene Moleküle am Detektor auf ($z = +1$, positiver Modus) es können jedoch auch mehrfach geladene Moleküle detektiert werden [81]. Die MALDI-TOF MS alleine ist jedoch nicht zur Quantifizierung geeignet, denn die Intensität der Signale ist nicht alleine von der Menge der Analyten abhängig, sondern von der Ionisierungseffizienz, welche von multiplen Parametern wie bspw. der Matrix-Kristallisation abhängt [82]. Zur Quantifizierung der Analyten ist es daher entscheidend eine Kalibration durchführen, wobei sich die Markierung mit stabilen Isotopen als eine geeignete Methode herausstellte [76, 82].

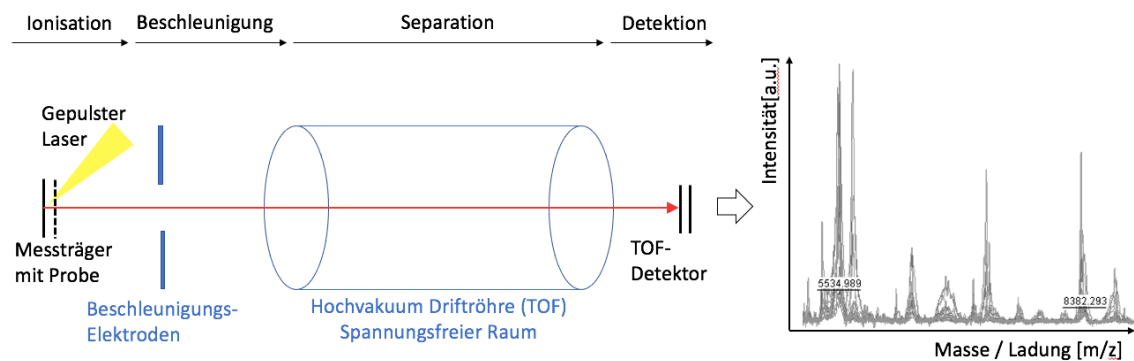


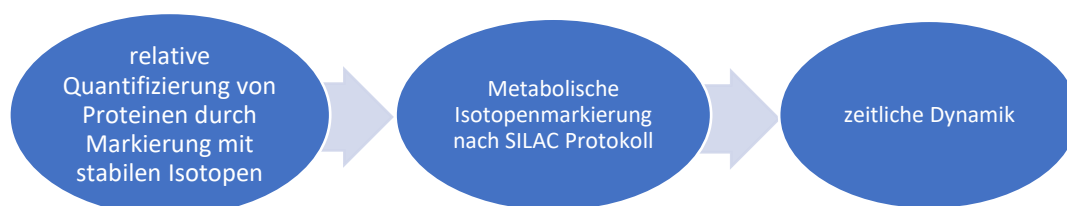
Abbildung 3: Schaubild zur MALDI-TOF Massenspektrometrie
Quelle: eigene Darstellung in Anlehnung an [77]

Die Isotopenmarkierung in Kombination mit Massenspektrometrie erlaubt die relative Quantifizierung eines Analyten. Wie in der Literatur beschrieben, werden dazu die Intensitäten der Signale des isotopenmarkierten/ schweren und des nicht-isotopenmarkierten/ leichten Proteins bestimmt und in Relation gesetzt, unter der Annahme, dass es sich um chemisch identische Moleküle handelt, die sich lediglich in der Masse unterscheiden [73, 76, 83]. Es werden hierbei stabile Isotope verwendet, welche keinem radioaktivem Zerfall unterliegen. Zum Einbau der Isotope in den Analyten bzw. das Protein haben sich mehrere Methoden etabliert. Diese reichen vom Einbringen eines standardisierten Kopplungsproteins, über enzymatische oder chemische Einbringung der schweren Isotope bis hin zu dem Zusetzen der Isotope in das Nährmedium und Metabolisierung derselben [73, 76, 77]. Aminosäuren, welche schwere Isotope tragen, haben sich als beliebte Träger für die metabolische Markierungsmethode etabliert. Eine hier häufig verwendete Methode wird SILAC (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture (engl.)*) genannt [73, 77, 84]. Bei SILAC werden die Zellen metabolisch markiert indem der Testgruppe eine bestimmte, meist essentielle Aminosäure (zB. $^{15}\text{N}_2$ -Lysin) zugesetzt wird, wobei in der Kontrollgruppe die unmarkierte Aminosäure zugesetzt wird. Das Nährmedium muss abgesehen von der zugesetzten markierten essentiellen Aminosäure frei von dieser Aminosäure sein. Dadurch kommt es nach ca. fünf Teilungszyklen zur nahezu vollständigen Markierung der Proteine mit der markierten Aminosäure. Anschließend werden die Zellpopulationen in gleichem Anteil gemischt, lysiert und die Proteine werden zu

Peptidfragmenten verdaut bevor die Messung im Massenspektrometer erfolgt [84, 85].

Die metabolische Markierung der Proteine erwies sich als gut reproduzierbar und einfach zu handhaben, da sowohl markierte als auch unmarkierte Moleküle gleichermaßen durch intakte Zellen selbst aufgenommen werden. Ein Nachteil der metabolischen Isotopenmarkierung ist, dass die Methode zeit- und kostenintensiv ist [76]. SILAC zeigte sich außerdem für *M. tuberculosis* als ungeeignet, da bisher keine benötigten Aminosäure-auxotrophen Mutanten hergestellt werden konnten [86].

Eine wesentliche Weiterentwicklung der Quantifizierungsmethode durch Isotopenmarkierung erfolgte durch Abbildung eines zeitlichen Verlaufs [73]. *Blagoev et al.* erstellte 2004 erstmals mit der SILAC Methode eine zeitliche Dynamik aus mehreren Momentaufnahmen eines Peptids [87]. Dazu wurde jedoch nicht eine Zellpopulation zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen, sondern für mehrere Zeitpunkte wurde jeweils eine Zellpopulation angesetzt. *Blagoev et al.* erstellte drei Gruppen (mit jeweils aminosäurefreiem Medium), wobei jeder Gruppe Arginin mit unterschiedlicher Isotopenzusammensetzung beigefügt wurde (Gruppe Arg-0: L-Arginin, Gruppe Arg-6: L-Arginin-U-¹³C6-¹⁴N, Gruppe Arg-10: L-Arginin-U-¹³C6-¹⁵N). Bei Gruppe Arg-6 bzw. Arg-10 verschiebt sich das m/z-Verhältnis dementsprechend um + 6 bzw. + 10 m/z. Jede Gruppe wurde unterschiedlich lange kultiviert bevor die Messung mittels Massenspektrometrie durchgeführt wurde, somit erhielt man drei Zeitpunkte [87]. Auch von *Andersen et al.* und *Doherty et al.* wurde diese Methode verwendet, jedoch beschränkte sich die Messung stets auf lediglich drei Zeitpunkte [83, 88].



Basierend auf dem Ansatz der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Andreas Wieser machten sich *Sparbier et al.* und *Jung et al.* hingegen die Methode der stabilen Isotopenmarkierung zu nutzen, um vereinfachte Antibiotikaresistenztestungen durchzuführen [89, 90]. Sie untersuchten dafür nicht einzelne Proteine, sondern das Gesamtspektrum von Erregern nach metabolischer Isotopenmarkierung mit MALDI-TOF Massenspektrometrie. Dazu wurden jeweils sensiblen und resistenten Bakterienstämme von *Staphylokokkus aureus* bzw. *Pseudomonas aeruginosa* isotopenmarkierte Aminosäuren und Antibiotika zugesetzt. Wenn Resistenzen vorlagen und der bakterielle Metabolismus trotz Antibiotikum noch aktiv war, wurden weiterhin stabile Isotopen eingebaut und somit war eine Verschiebung des m/z-Verhältnisses mehrerer Signale des Gesamtspektrums detektierbar. Eine relative Quantifizierung fand hier nicht statt und somit musste die Zeit bis zur vollständigen Markierung (5 Teilungszeiten) nicht abgewartet werden [89, 90]. Auch *Demirev et al.* benutzte die metabolische Isotopenmarkierung zur Resistenztestung, jedoch wurde hier ¹³C-markiertes Medium zur Isotopenmarkierung verwendet [91]. Diese Methode wurde im Rahmen von Wirksamkeitsuntersuchungen von Antibiotika ausschließlich zur Resistenztestung eingesetzt. Bislang wurden mithilfe der stabilen Isotopenmarkierung jedoch noch keine Dynamik der Proteinneubildungsraten dargestellt, um die Antibiotikawirkung auf Krankheitserreger abzubilden.

1.7 Zielsetzung

Tuberkulose (TB) ist, nach COVID-19, die zweittödlichste Infektionserkrankung, die durch eine einzelne Pathogengruppe (*Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex (MTBC)) verursacht wird. Sie steht an 13. Stelle der häufigsten Todesursachen weltweit (Stand 2019) [3]. Die Therapie der TB ist noch immer komplex, langwierig und nebenwirkungsreich, was gehäuft zu vorzeitigen Therapieabbrüchen und somit der Entwicklung von multiresistenten Erregern führt [5]. Dass sich die Behandlung der Tuberkulose schwierig gestaltet, liegt zum einen an der hohen Widerstandsfähigkeit des Erregers aufgrund seiner lipidreichen Zellwand und zum anderen an der Fähigkeit in ein sogenanntes dormantes Stadium überzugehen, in welchem eine sehr niedrige Stoffwechselaktivität vorliegt [10, 19, 20, 64, 65]. In diesem stoffwechselträgen Zustand, der bei inhomogener Nomenklatur verschieden bezeichnet wird, u.a. als dormant, entzieht sich der Erreger somit der Wirkung des körpereigenen Immunsystems des Wirts, sowie der Wirkung von Antibiotika [19, 20, 64, 65].

Es ist daher essentiell, den intrazellulären Metabolismus des TB Erregers besser zu verstehen und darüber hinaus die Wirkung der Antibiotika auf den intrazellulären Metabolismus des TB Erregers zu untersuchen. Das Ziel sollte sein, neue Antibiotika zu entwickeln und die Antibiotika-Kombinationstherapie zu optimieren. Wesentlich hierzu ist es, die Dynamik und Auswirkung der einzelnen Antibiotika auf den Erreger *in vitro* zu beschreiben und darüber hinaus mögliche Synergismen zwischen Antibiotika zu nutzen.

Aus diesem Grund entwickelte die Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Andreas Wieser (LMU) ein auf Massenspektrometrie in Kombination mit stabiler Isotopenmarkierung basierendes *in vitro* Modell, um einzelne Antibiotika und Antibiotikakombinationen zu untersuchen und daraus Resultate für neue Therapieschemata abzuleiten. Dafür wurde ein neues Protokoll entwickelt, in welchem erstmals ¹³C-Glycerol zur metabolischen Isotopenmarkierung von Mykobakterien verwendet wurde. Mit diesem Modell soll die Darstellung der Neubildungsrate von Proteinen und anderen Metaboliten von Mykobakterien im zeitlichen Verlauf ermöglicht werden. Dazu werden erregerspezifische Makromoleküle (bspw. Proteine,

Glykoproteine) - hier als Analyten bezeichnet - untersucht, welche sich durch Signale im Massenspektrum darstellen [78, 92, 93]. Es wird hier von Analyten und nicht von Proteinen gesprochen, da keine Identifikation der Analyten mittels MS/MS erfolgte. Denn das Ziel sollte primär nicht sein, die Neubildungsrate einzelner spezifisch bekannter Proteine zu untersuchen, sondern vielmehr einen Zellzustand zu beschreiben und somit ein dynamisches Abbild des Metabolismus auf Ebene der Proteinneubildungsrate zu erstellen. Das Modell sollte möglichst einfach, effizient und replizierbar sein, damit mehrere Analyten gleichzeitig zu möglichst vielen Zeitpunkten untersucht werden können.

Als Modellorganismus dient hierzu der Bacillus Calmette-Guérin (*M. bovis* BCG) Pasteur Stamm, da er zu dem *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex gehört und somit die intrinsischen Eigenschaften der TB Erreger abbildet [27, 29, 31].

Die Arbeit wurde wie folgt gegliedert:

- Standardisierung des Versuchsaufbaus mit dem Modellorganismus *M. bovis* BCG:
 - Standardisierung der Ausgangskultur durch Aliquotierung
 - Reinheitskontrolle mithilfe von Dreiösenausstrich/ Multiplex-PCR/ Rasterelektronenmikroskopische Darstellung
 - Wachstumsanalyse und Bestimmung der Verdopplungszeit
- Methodenoptimierung zur rasterelektronenmikroskopischen Darstellung des *M. bovis* BCG
- Erstellung eines replizierbaren Modells zur Darstellung der Analytendynamik für den Modellorganismus *M. bovis* BCG mithilfe metabolischer Isotopenmarkierung und MALDI-TOF Massenspektrometrie
- Testung der Antibiotika Linezolid und BTZ043 mithilfe des hier entwickelten Modells und Vergleich mit den Parametern zur Beschreibung der Antibiotika Wirksamkeit (MIC und Reduktionsfaktor)

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

MALDI-TOF Massen- spektrometrie	Autoflex Speed MALDI- TOF/TOF, Nd:YAG-Laser, 355 nm	Bruker-Daltonics, Bremen
	MALDI Target MTP 384 ground steel BC	Bruker-Daltonics, Bremen
Rasterelektronen- mikroskopie	Zeiss Sigma VP field emis- sion scanning microscope	Carl Zeiss Microscopy, Jena
	Sicco Star-Exsikkator	Bohler GmbH, Grünsfeld
Vakuumfiltereinheit zur Probenextrak- tion	Vakuumeinheit PALL	PALL Corporation, Port Washington, USA
PCR-Thermozykler	GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Fos- ter City, USA
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Elektrophorese	Elektrophorese PS 3000	Hoefer Chemie, Kleinblit- tersdorf
UV-Transluminator	MW312nm	Intas Science Imaging In- struments, Göttingen
Zentrifugen	Zentrifuge 3K30	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz
	Zentrifuge 1K15	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz

	Zentrifuge 5417	Eppendorf AG, Hamburg
	Zentrifuge Megafuge 1.OR	Heraeus, Hanau
	Zentrifuge LLG	Lab Logistics Group, Meckenheim
Photometer	Ultraspec 3100 pro	Amersham Bioscience, Freiburg
Sicherheitswerkbank	BDK HBB2436	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Pipetten	Eppendorf® Reference 0,5 – 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg
	Eppendorf® Reference 2 – 20 µl	
	Eppendorf® Reference 50 – 200 µl	
	Eppendorf® Reference 100-1000 µl	
	CELLSTAR 5 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Drehinkubator	CMV-RCM	Fröbel Labortechnik, Lindau
Inkubatoren	Certomat H	Satorius, Göttingen
	B20 Funktion Line	Heraeus, Hanau
	T6 Funktion Line	Heraeus, Hanau
	Certomat HK	Satorius, Göttingen

	Multitron	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
Bodenschüttler	Certomat U	Satorius, Göttingen
	Certomat R	
Analysenwaage	BP61	Satorius, Göttingen
Bunsenbrenner	Fireboy plus	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
	Gasprofi 1SCS	WLD-TEC, Arenshausen
Vortexer	VF2	Bachofer Laborgeräte, Reutlingen
	Vortex Genie 2	Scientific Industries, München
	uniTEXER1	Lab Logistics Group, Meckenheim

2.1.2 Software

FlexControl 3.4	Bruker-Daltonics, Bremen
FlexAnalysis 3.4	Bruker-Daltonics, Bremen
MATLAB R2021b	MathWorks, Natick, USA
Word 16.43	Microsoft, Redmond, USA
Exel 16.43	Microsoft, Redmond, USA
EndNote X9	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
Origin Pro 2018b	OriginLab Corporation, Northampton, USA

Inkscape 1.2.0.0	Free and Open Source Software, GNU General Public License, Version 2
------------------	--

2.1.3 Bakterienstämme

<i>Mycobacterium bovis</i> (lat.) BCG	Bacillus Calmette-Guerin (<i>M. bovis</i> BCG Pasteur), ATCC 1173P2
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (lat.)	Mc ² 155
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (lat.)	Extrahierte <i>M. tuberculosis</i> DNA

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Zentrifugenröhrchen	Moonlab plastics 50 ml	neoLab Migge, Heidelberg
	Moonlab plastics 15 ml	neoLab Migge, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Reaktionsgefäße 1,5 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
	Reaktionsgefäße 5 ml	Carl Roth, Karlsruhe
Küvetten	Semi-Micro 1 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
	UV-Küvette mikro 70 µl	Brand, Wertheim
Auffangplatten	96 Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Polypropylen-Filterplatten	96 Well, 0,45 ml, 0,22 µm Porengröße, GHP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Pipettenspitzen	0,5 – 20 µl	Brand, Wertheim
	2 – 200 µl	
	1000 µl	
Pipettenspitzen mit Filter	ClearLine 20 µl	Kisker Biotech, Steinfurt
	ClearLine 200 µl	
	ClearLine 1000 µl	
	5 – 200 µl	Brand, Wertheim
Petrischalen	49 x 16 cm	Greiner Bio-One, Frickenhausen)
Handschuhe	Nitril Safegrip	SATRA Technology Centre, Kettering, UK
Verschlussfolie	Parafilm	Bemis Flexible Packaging, Neenah, USA
Wasserfilter	0,45 µm CA	Corning Incorporated, Corning, USA

2.1.5 Chemikalien

Acetat		Carl Roth, Karlsruhe
Aceton > 99,8 %		Carl Roth, Karlsruhe
Acetonitril ≥ 99,0 %		Honeywell Fluka, Fisher Scientific, Schwerte
Agarose		Carl Roth, Karlsruhe
Ameisensäure 98-100 %		Honeywell Fluka, Fisher Scientific, Schwerte

Antibiotika	Benzothiazone BTZ043	Dr. Florian Kloß, Leibniz HKI, Jena
	Linezolid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	Merck, Darmstadt
Ethanol \geq 96 %		Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	10mg/ml in H ₂ O	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Formaldehyd 37 %		Sigma Aldrich, Taufkirchen
Glycerol > 99,5 %		Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol-1,3- ¹³ C ₂		Sigma Aldrich, Taufkirchen
HCCA	<i>α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (engl.)</i> , α -Cyano-4-Hydroxizimtsäure	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Kalibrationslösung	MBT Standard	Bruker-Daltonics, Bremen
Methanol \geq 99,9 %		Carl Roth, Karlsruhe
NaCl-Lösung		Carl Roth, Karlsruhe
Nährmedium	Middlebrook-7H9-Boullion M7H9	Sigma Aldrich, Taufkirchen
	Middlebrook OADC Anreicherung	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
	Bactoagar	Becton Dickensen, Franklin Lakes, USA

	Blood Agar Columbia Sheep W/5% SB	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
PCR-Marker	generuler 1 kb DNA ladder, 0,5 µg/µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
	generuler 100 bp Plus DNA ladder, 0,1 µg/µl	
Polysorbat	Tween 80	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Primer	ET1 (5 pmol/µl, 5'-AAGCGGTTGCCCGCCGAC-CGACC-3')	Metabion international, Planegg
	ET2 (25 pmol/ml, 5'-CTGGCTATATT-CCTGGGCCCCGG-3')	Metabion international, Planegg
	ET3 (5 pmol/ml, 5'-GAGGCGATCTGGCGGTT-TGGGG-3')	Metabion international, Planegg
Taq DNA CORE Kit 10	<ul style="list-style-type: none"> - Taq-DNA-Polymerase 5U/µl - dNTPs 10 mM - Mgcl2 25 mM - <i>10x Incubation Mix T.Pol without MgCl₂</i> 	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Trifluoressigsäure 99 %		VWR Chemicals, Fonteney-sous-Bois, Frankreich

TRIS-Puffer	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth, Karlsruhe
Wasser	Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg
	Rotisolv Ultra LC-MS	Carl Roth, Karlsruhe
6x-DNA-Loading dye		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.6 Pufferlösungen

Rücklösepuffer Probenextraktion MALDI

Acetonitril (50 % v/v)

Ameisensäure (35 % v/v)

Destilliertes Wasser (15 % v/v)

Lösungsdetergenz HCCA MALDI-Matrix

Acetonitril (50 % v/v)

HPLC grade H₂O (47,5 % v/v)

Trifluoressigsäure (2,5 % v/v)

1x TAE Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer)

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) (40 mM)

Acetat (20 mM)

EDTA (1mM)

Master-Mix

Primer: ET1 (5 pmol/μl), ET2 (25 pmol/ml), ET3 (5 pmol/ml) (je 0,5 μM)

Taq-DNA-Polymerase (0,04 U/μl)

dNTPs (1 mM)

Mg²⁺ (4 mM)

10x Puffer (2,5 μl)

PBS-Puffer

NaCl (140 mM)

Di-Natrium-Hydrogen-Phosphat-Dihydra, Na₂HPO₄ * 2H₂O (10 mM)

KCl (2,7 mM)

Kalium-Dihydrogen-Phosphat, KH₂PO₄ (1,8 mM)

In H₂O (800 ml) gelöst und auf pH 7,3 eingestellt, autoklaviert oder steril filtriert

2.2 Methoden

2.2.1 Standardisierung der BCG Wachstumsbedingungen

2.2.1.1 Quantifizierung des bakteriellen Wachstums durch Messung der Optischen Dichte

Zur Quantifizierung des Wachstums der Bakterien in Flüssigmedium wurde die optische Dichte (OD) herangezogen. Die photometrische Extinktionsmessungen bzw. Absorptionsmessungen erfolgten bei 600 nm. Als Messreferenz diente das unbeimpfte Flüssigmedium M7H9 (M7H9 + 10 % v/v OADC + 0,05 % v/v Tween 80).

2.2.1.2 Herstellung von Aliquote und Kryokonservierung

Zur Standardisierung der Ausgangsbedingungen des bakteriellen Wachstums wurde eine *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) Pasteur Kultur in Medium M7H9 mit 10 % v/v OADC Anreicherung und 0,05 % v/v Tween 80 kultiviert und aliquotiert.

Nach Beimpfen des Flüssigmediums (M7H9 + 10 % v/v OADC + 0,05 % v/v Tween 80) mit 0,007 % v/v der BCG Stammkultur wurde die Kultur für durchschnittlich 15 Tage bei 37 °C auf einem Schüttler kultiviert.

Zur Aliquotierung wurden mehrere Kulturen zusammengeführt, bei 10 000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in Flüssigmedium (M7H9 + 10 % v/v OADC + 0,05 % v/v Tween 80) rückgelöst. Zu der Flüssigkultur wurde 20 % v/v Glycerol zur Kryoprotektion der Bakterienzellen nach dem Prinzip der Vitrifikation zugegeben. Die Aliquotierung erfolgte in 100 µl bzw. 500 µl Volumeneinheiten. Anschließend erfolgte die Kryokonservierung bei -80 °C.

2.2.1.3 Bakterienkultivierung

Um möglichst replizierbare Wachstumsbedingungen zu generieren, wurde stets einer der standardisierten *M. bovis* BCG Aliquote (100 µl Volumeneinheiten) für die Experimente verwendet. Zu Beginn erfolgte die Entfernung der 20 % v/v Glycerol der Aliquote, welche zur Kryokonservation benötigt wurde. Dies war nötig, da im fortführenden Experiment (siehe Kapitel 2.2.5) eine genau definierte Menge an Glycerol zugegeben wurde, da Glycerol hier die Trägersubstanz der Isotopen darstellt. Dazu wurden die Aliquote zentrifugiert (10 000 rpm, 20 min, 20 °C) und anschließend wurde der Überstand über dem Zellpellet verworfen. Nach Rücklösung in Flüssigmedium (M7H9 + 10 % v/v OADC + 0,05 % v/v Tween 80) wurden je 4 ml Kultur in Zentrifugenröhrchen (Fassungsvolumen 15 ml) für 7 Tage vorinkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C bei langsamer Drehzahl (34 rpm) in einem Drehinkubator mit einem Neigungswinkel von 73° aus der Horizontale gemessen. Nach 7 Tagen wurde die Kultur wieder mit frischem Nährmedium angereichert und mithilfe der optischen Dichte wurde eine standardisierte Ausgangskonzentration der Bakterien gewährleistet. Dazu

erfolgte die Zentrifugation (10 000 rpm, 20 min, 20 °C). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem Medium (M7H9 + 10 % v/v OADC + 0,05 % v/v Tween 80) rückgelöst und auf eine optische Dichte von 0,1 eingestellt.

Zur Überprüfung der Reinheit der Kultur wurden im Anschluss Reinheitskontrollen durchgeführt, auf welche im folgenden Kapitel eingegangen wird.

2.2.2 Reinheitskontrolle der *M. bovis* BCG Kultur

2.2.2.1 Dreiösenausstrich auf Blutagar

Es wurde ein Dreiösenausstrich auf Blutagar der *M. bovis* BCG Kultur in Triplikaten erstellt, um eine Verunreinigung mit *M. smegmatis* oder anderen Bakterien wie bspw. *Staphylokokkus epidermidis* der Hautflora auszuschließen.

Hierzu wurde eine *M. bovis* BCG Kultur aus dem Aliquot auf Blutagar ausgestrichen (bevor die Zugabe von 20 % v/v Glycerols zur Kryoprotektion erfolgte). Nach 2 und 10 Tagen Inkubationsdauer bei 37 °C wurde überprüft, ob Bakterienkulturen auf den Blutagarplatten zu sehen sind.

2.2.2.2 Multiplex-PCR zur Differenzierung des *M. bovis* BCG von *M. tuberculosis* und *M. smegmatis*

Diese PCR Methode wurde von *Talbot et. al.* spezifisch für die Unterscheidung zwischen dem attenuierten *M. bovis* BCG und virulenten Stämmen (*M. bovis* und *M. tuberculosis*) entwickelt [94].

Die Multiplex-PCR wurde zum einen mit drei Proben des *M. bovis* BCG aus den Referenz-Aliquot und zum Vergleich mit zwei Proben *M. tuberculosis* (extrahierte DNA) und zwei Proben *M. smegmatis* durchgeführt.

Der Aufschluss der Zellen erfolgte osmotisch durch Zentrifugation von 200 µl Bakterienkultur (10 000 rpm, 10 min, 20 °C) und Rücklösen in ultra-filtrierte Wasser und anschließend durch Kochen (95 °C, 10 min).

Ein 25 µl Ansatz wurde vollständig auf Eis pipettiert. Zu der Probe (3 µl) wurde 25 µl des Master-Mix zugegeben.

Die PCR-Bedingungen wurden folgendermaßen gesetzt:

- Präinkubation 3 min, 95 °C
- 40 Zyklen 30 sec, 94 °C
- 1 min, 65 °C
- Finale Elongation 10 min, 72 °C
- Kühlung bis Entnahme Unendlich, 4 °C

Für das 3 %-Agarose-Gel wurde Agarose (3,6 g) in 1x TAE-Puffer (120 ml) gelöst und Ethidiumbromid (5 µl) hinzugefügt.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde mit dem 3 %igen-Agarosegel durchgeführt. Es wurde je 4 µl 6xDNA-Loading-dye und je 15 µl der PCR-Produkte aufgetragen. Die Laufzeit betrug eine Stunde bei einer Spannung von 120 V.

2.2.2.3 Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der BCG Bakterien

Des Weiteren wurden Rasterelektronenmikroskopische Bilder der *M. bovis* BCG Kultur erstellt, um zu überprüfen, ob die typische Morphologie von Mykobakterien abgebildet wird.

Zur Messung der *M. bovis* BCG Proben im Rasterelektronenmikroskop (REM) wurden diese 13 Tagen kultiviert und anschließend eine Formaldehyd Fixierung durchgeführt. Dazu wurde den Proben zur Fixierung für 20 Minuten 37 % v/v Formaldehyd zugegeben (Endkonzentration 3,7 % v/v Formaldehyd). Zur Entfernung des Nährmediums wurden die Proben zentrifugiert (4000 rpm, 20 min, 20 °C), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 3,7 % v/v Formaldehyd in sterilem Wasser rückgelöst. Dieser Schritt wurde insgesamt drei Mal durchgeführt. Zur Trocknung auf einem Stück Alufolie (5x5 mm) wurde 2 – 5 µl der Probe aufgetragen und bei 37 °C inkubiert und getrocknet. Der Wasserentzug aus den Bakterienzellen erfolgte mittels Überschichtung und Trocknung bei

Raumtemperatur in aufsteigenden Alkoholkonzentrationen (10 %, 30 %, 70 %, 100 % v/v). Die Aufbewahrung bis zur Messung im REM erfolgte im Exsikkator [64].

Die Messung der Proben erfolgte mit dem REM (Zeiss Sigma VP field emission scanning microscope, Carl Zeiss Microscopy, Jena). Hierzu wurde eine Spannung von 2 bis 3 kV, eine Blendengröße von 30 µm und ein Arbeitsabstand von 3,8 bis 4,3 mm verwendet.

2.2.3 Methodenoptimierung der Rasterelektronenmikroskopischen Darstellung des *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)

Die *M. bovis* BCG Proben wurden nach standardisierten Bedingungen für drei Tage kultiviert (72 Stunden Wachstumsdauer). Zuerst wurde 37 % v/v Formaldehyd (Endkonzentration 3,7 % v/v Formaldehyd) zu den Proben zugegeben und 20 Minuten fixiert. Zur Entfernung des Nährmediums wurden die Proben zentrifugiert (siehe Tabelle 5) wobei der Überstand verworfen wurde und das Zellpellet nicht direkt in 3,7 % v/v Formaldehyd rückgelöst wurde, wie bei der Kontrolle, sondern eine schrittweise Rücklösung mit absteigenden Konzentrationen am NaCl bzw. PBS-Puffer und steigenden Konzentrationen an sterilem Wasser erfolgte. Die Rücklösung erfolgte in fünf Schritten mit Lösungen unterschiedlicher Konzentrationszusammensetzung (siehe *Tabelle 4*). Nach Rücklösung entsprach die Einwirkungszeit erneut 20 Minuten mit jeweils anschließender Zentrifugation (siehe Tabelle 5). Nach dem 5. Rücklösungsschritt erfolgte die anschließende Probenauftragung auf den Messträger (Aluminiumfolie) und Trocknung in Alkohol mit aufsteigender Konzentration, sowie die REM Messung, anhand des vorbeschriebenen Protokolls (siehe Kapitel 2.2.2.3).

Versuchsansätze:	Rücklösung nach Formaldehyd Fixierung in:	Zentrifugation bei:
1)	NaCl (0,9 %) + 3,7 % v/v Formaldehyd	4000 rpm, 20 min, 20 °C
2)	PBS-Puffer + 3,7 % v/v Formaldehyd	4000 rpm, 20 min, 20 °C
3)	PBS-Puffer + 3,7 % v/v Formaldehyd	2000 rpm, 20 min, 20 °C
4) Kontrolle	Steriles Wasser + 3,7 % v/v Formaldehyd	4000 rpm, 20 min, 20 °C

Tabelle 3: Übersicht über die Versuchsansätze zur Optimierung der REM Probenpräparation des M. bovis BCG Stammes

	NaCl (0,9 % w/v) bzw. PBS-Puffer	Formaldehyd (3,7 % v/v)	Steriles Wasser
1. Rücklösung	90 % v/v	3,7 % v/v	6,3 % v/v
2. Rücklösung	70 % v/v	3,7 % v/v	26,3 % v/v
3. Rücklösung	45 % v/v	3,7 % v/v	51,3 % v/v
4. Rücklösung	20 % v/v	3,7 % v/v	76,3 % v/v
5. Rücklösung	0 % v/v	3,7 % v/v	96,3 % v/v

Tabelle 4: Volumenkonzentrationen der Rücklösungssubstanzen

2.2.4 Ermittlung der Eigenschaften des BCG Stammes unter Verwendung der Antibiotika BTZ043 und Linezolid

2.2.4.1 Wachstumskurve

Die graphische Darstellung des Wachstumsverlaufs, sowie die Berechnung der Verdopplungszeit des *M. bovis* BCG wurde mittels photometrischer Messung der optischen Dichte im zeitlichen Verlauf bestimmt. Dazu wurde eine *M. bovis* BCG Startkultur mit einer optischen Dichte von 0,1 hergestellt (siehe Kapitel 2.2.1.3). Die Inkubation erfolgte in Triplikaten (je 4 ml *M. bovis* BCG Kultur in Reaktionsgefäßen) in einem Drehinkubator (34 rpm, 37 °C, Neigungswinkel von 73° aus der Horizontale gemessen). Die Probenentnahme zur Messung der optischen Dichte erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 24, 48, 72, 96 Stunden.

Zur Berechnung der Verdopplungszeit wurde ein exponentielles Bakterienwachstum angenommen. Die Verdopplungszeit wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Wachstumsfunktion } N(t) \quad N(t) = N_0 \cdot e^{\lambda \cdot t}$$

$$\text{Verdopplungszeit } t_v \quad t_v = \frac{\ln(2)}{\lambda}$$

$$\text{Wachstumsfaktor } \lambda \quad \lambda = \frac{\ln \frac{N(t)}{N_0}}{t}$$

t : Zeit in Stunden

N_0 : Anfangsbestand zum Zeitpunkt von 0 Stunden

2.2.4.2 Minimale Hemmkonzentration

Die spezifische Minimale Hemmkonzentration für den *M. bovis* BCG wurde für die Antibiotika Linezolid und BTZ043 bestimmt. Dazu wurde das relative bakterielle Wachstum in verschiedenen Verdünnungsstufen mittels optischer Dichte ermittelt.

Die *M. bovis* BCG Kultur wurde für 7 Tage vor inkubiert und anschließend in frischem Medium auf eine optische Dichte von 0,1 eingestellt (siehe Kapitel

2.2.1.3). Die Ansätze erfolgten in Triplikaten mit einem Volumen von je 1 ml. Es wurden 7 Verdünnungsstufen (Linezolid Konzentrationen: 100/ 10/ 1/ 0,5/ 0,1/ 0,01/ 0,001 µg/ml, BTZ043 Konzentrationen: 300/ 30/ 6/ 3/ 1/ 0,3/ 0,03 ng/ml) und jeweils eine Kontrolle (ohne Antibiotikum) angesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Drehinkubator (siehe Kapitel 2.2.1.3). Nach 120 Stunden wurde die optische Dichte photometrisch bestimmt. Die graphische Auftragung und Kurvenanpassung erlaubte die Bestimmung der Hemmkonzentration (IC), auch *inhibitory concentration (engl.)* genannt. Die nicht lineare Kurvenanpassung erfolgte anhand der Funktion $f(x) = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + (x/x_0)^p)$.

Hieraus wurde die 90 %-Hemmkonzentration (IC₉₀) berechnet, welche die Konzentration des Antibiotikums beschreibt, die benötigt wurde um 90 % des Bakterienwachstums zu hemmen. Die 90 %-Hemmkonzentration (IC₉₀) wurde näherungsweise der Minimale Hemmkonzentration (MIC) gleichgesetzt und im Weiteren spezifisch für den *M. bovis* BCG als Konzentrations-Referenz verwendet.

2.2.4.3 Koloniebildende Einheiten und Reduktionsfaktor

Für die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (CFU), auch *colony forming units (engl.)* genannt, wurden Nährböden aus M7H9 Medium (5,22 g/L), Bacto Agar (15 g/L), Glycerol (4,4x10⁻³ % v/v) und 10 % v/v OADC Anreicherung hergestellt.

Jede Platte wurde mit einem Volumen von mind. 18 ml Agar gegossen. Dies wurde nötig, um eine Austrocknung bei einer langen Inkubationsdauer von über zwei Wochen zu verhindern.

Die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten erfolgte in Triplikaten entsprechend der Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (siehe Kapitel 2.2.4.2). Dabei wurde eine Antibiotikum Verdünnungsreihe (7 Verdünnungsschritte) und jeweils eine Kontrolle ohne Antibiotikum ausplattiert. Nach Inkubation der Platten bei 37 °C und einer Wachstumsdauer von 20 Tage wurden die Kolonien ausgezählt und die koloniebildenden Einheiten berechnet.

Die koloniebildenden Einheiten (CFU) wurden für jede Verdünnung wie folgt berechnet:

$$\text{CFU/ml} = \frac{\text{Kolonien pro Platte} \cdot a}{V}$$

a: Verdünnungsfaktor

V: Volumen pro Platte in ml

Der Reduktionsfaktor wurde aus den koloniebildenden Einheiten wie folgt berechnet:

$$\text{Reduktionsfaktor } R_x = \log_{10} \left(\frac{N_0}{N_x} \right)$$

N_0 : CFU des Bakteriums vor der Antibiotikabehandlung

N_x : CFU des Bakteriums nach der Antibiotikabehandlung mit der Konzentration x

Die Standardabweichung des Reduktionsfaktors (SD_R) wurde mithilfe der Fehlerfortpflanzung aus den Standardabweichungen der CFU wie folgt berechnet:

$$SD_R = \sqrt{(SD(\log_{10} N_0))^2 + (SD(\log_{10} N_x))^2}$$

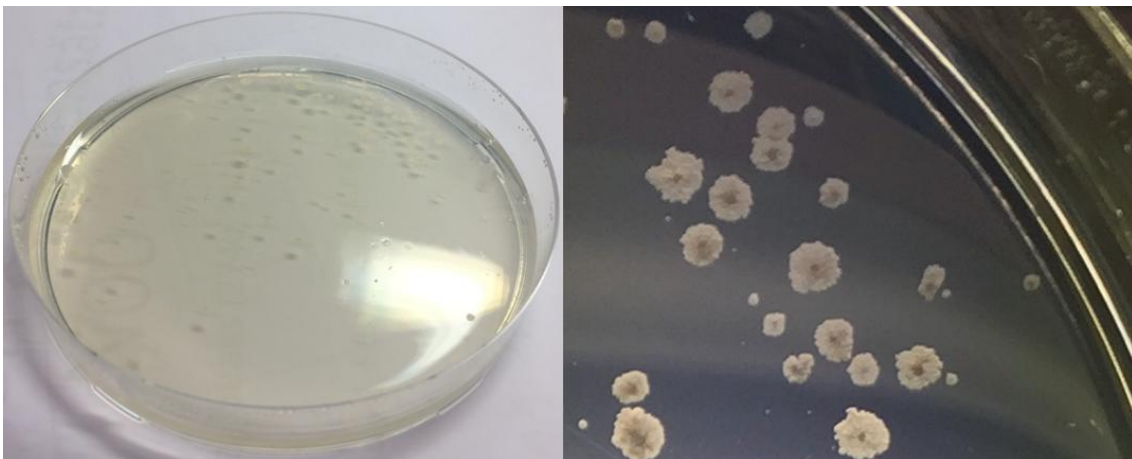


Abbildung 4: Kolonien des *M. bovis* BCG auf Festmedium

2.2.5 Isotopenmarkierung und Erstellung einer Analytendynamik durch massenspektrometrische Messung

2.2.5.1 Isotopenmarkierung

Eine *M. bovis* BCG-Kultur wurde für 7 Tage vorinkubiert und anschließend in frischem Medium auf eine optische Dichte von 0,1 eingestellt. Dazu wurde das standardisierte Protokoll zu Bakterienkultivierung (siehe Kapitel 2.2.1.3) verwendet, um somit bei allen Messungen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie mit einer standardisierter Ausgangskonzentration an Bakterien (ermittelt über die optische Dichte) zu beginnen.

Die Proben wurden in eine Kontrollgruppe (KG) und eine Testgruppe (TG) unterteilt. Dafür wurde in Triplikaten jeweils 4 ml der *M. bovis* BCG Kultur in Reaktionsgefäßen mit einem Fassungsvermögen von 5 ml vorgelegt. Anschließend erfolgte die Markierung mit jeweils 9,73 µl Glycerol (Kontrollgruppe) bzw. 9,73 µl Glycerol-1,3-¹³C (Testgruppe). Der Deckel wurde zusätzlich mit einer Verschlussfolie verschlossen, um Austrocknung zu verhindern. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Drehinkubator (siehe Kapitel 2.2.1.3). Probenentnahmen erfolgten in den ersten zwei Tagen nach Versuchsbeginn alle 12 Stunden (Zeitpunkt nach 12, 24, 36, 48 Stunden) und in den darauffolgenden sechs Tagen alle 24 Stunden (Zeitpunkt nach 72, 96, 120, 144, 168, 192 Stunden). Das entnommene Probenvolumen betrug bei den ersten 3 Zeitpunkten (Zeitpunkt nach 12, 24, 36 Stunden) jeweils 600 µl und bei den folgenden sieben Zeitpunkten (Zeitpunkt nach 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 Stunden) jeweils 300 µl. Die Volumina wurden in ersten 36 Stunden größer gewählt, um bei zu Beginn niedriger Anzahl von Bakterien pro Probe trotzdem eine ausreichende Analytenmenge für die Messung im MALDI-TOF Massenspektrometer sicherzustellen.

Die Experimente nach gleichem standardisiertem Protokoll der Isotopenmarkierung wurden zusätzlich unter Einfluss der Antibiotika Linezolid sowie BTZ043 durchgeführt. Dabei wurde zu Versuchsbeginn jeweils eine bestimmte Antibiotikumkonzentration zugesetzt. Die verwendete Konzentration der Antibiotika

wurden anhand der in Kapitel 3.3.2 und 3.3.3 ermittelten IC90 Konzentrationen für Linezolid und BTZ043 gewählt. Es wurde jeweils die einfache IC90 (1x IC90) und doppelte IC90 (2x IC90) Konzentration von Linezolid bzw. BTZ043 verwendet.

Die Durchführung der Versuche mit Antibiotika unterschied sich von den Versuchen ohne Antibiotikazugabe in einer kürzeren Inkubationsdauer von lediglich 96 Stunden (Probenentnahme zu den Zeitpunkten 12, 24, 36, 48, 72, 96 Stunden). Das Probenvolumen wurde hier mit je 660 µl größer gewählt, um bei niedriger Anzahl von Bakterien pro Probe trotzdem eine ausreichende Analytenmenge für die Messung sicherzustellen.

Als Kontrolle wurde stets auch eine Probe ohne Antibiotikum in Triplikaten angesetzt, um die Daten der Antibiotika Gruppe mit Referenzgraphiken ohne Antibiotikazugaben (siehe Kapitel 3.3.1.3) zu vergleichen.

2.2.5.2 MALDI-TOF Massenspektrometrie Probenextraktion

Zur Probenextraktion wurden Filterplatten (0,22 µm Porengröße, GHP) verwendet. Zuerst wurde mittels Vakuumextraktion das Nährmedium aus den Proben (300 – 600 µl Probenvolumen) entfernt. Es folgen drei Waschschritte mit destilliertem Wasser (je 300 µl) unter einer jeweiligen Einwirkungsdauer von 5 Minuten. Nach der Vakuumfixierung der Bakterien auf der Filtermembran wurden sie mit kaltem Aceton (100 µl) wieder gelöst. Nach erneuter Einwirkungsdauer von 5 Minuten wurde das Aceton wieder durch die Vakuumpumpe entfernt und zur Elimination des gesamten Acetons wurde die Filterplatte für 7 Minuten bei 37 °C im Inkubator getrocknet.

Die Rücklösung der Proben erfolgte in 20 µl Rücklösepuffer (Acetonitril 50 % v/v, Ameisensäure 35 % v/v, destilliertes Wasser 15 % v/v). Nach 5 Minuten Einwirkungszeit wurden die Proben aus der Filterplatte in eine Auffangplatte zentrifugiert (3 min, 4000 rpm, 20 °C) [64, 95].

Es wurde je 1 µl der extrahierten Probe in Triplikaten auf das *ground steel*-MALDI-Target pipettiert. Als Matrix diente HCCA (alpha-Cyano-4-Hydroxymizsäure) welche in Lösungsmittel (10 mg/ml HCCA in 50 % v/v Acetonitril, 47,5 % v/v destilliertes Wasser, 2,5 % v/v Trifluoressigsäure) gelöst wurde. Nach dem Trocknen der Probe erfolgte die Überschichtung mit 1 µl HCCA-Lösung (Methode: HCCA dried dropletd, thinlayer) [64, 95].

2.2.5.3 MALDI-TOF Massenspektrometrie Messvorgang

Alle Spektren wurden durch das MALDI-TOF/TOF Autoflex Speed (positiver Modus; Nd:YAG-Laser, 355 nm) mithilfe der Software FlexControl der Firma Bruker Daltonics gemessen. Die Messung erfolgte automatisiert (AutoXecute Modus, 200 Aufnahmen/Spektrum) und wurde kombiniert mit manueller Messung, falls die automatisierte Messung fehlschlug. Die Messung wurde für Proteine im Größenbereich von 2 – 20 kDa durchgeführt, wobei die Methode „LP Imaging-2-20 kDa“ der Software FlexControl der Firma Bruker Daltonics verwendet wurde. Einstellung der Ionenquelle waren wie folgt: Ionenquelle 1: 19,40 kV, Ionenquelle 2: 18,19 kV. Die Daten eines Probenpunktes auf dem Probenträger wurden gemittelt aus 2000 zufriedenstellenden Laserschüssen in 200 Schritten.

Für die Kalibration wurde der MBT Standard (Bruker-Daltonics, Bremen) nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.6 Statistische Auswertung

Die Statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der Software Matlab R2021b (MathWorks), Microsoft Excel 16.43 (Microsoft) und Originlab 2018b (OriginLab Corporation). Die Rohdaten der MALDI-TOF Massenspektrometrie wurden mittels Matlab ausgewertet (siehe Kapitel 3.3.1.2). Die Graphische Darstellung erfolgte mithilfe von Microsoft Excel und Originlab. Die statistische Auswertung der Messdaten ohne Antibiotikazugabe erfolgte mit einem Signifikanzniveau von 0,05 anhand des T-Test für zwei unabhängige Stichproben bei Vorliegen

einer Normalverteilung bzw. anhand des Mann-Whitney-U-Test im Falle keiner Normalverteilung der Messwerte. Der D`Agostino-Omnibus-Test wurde zur Ermittlung der Normalverteilung verwendet. Die statistische Auswertung der Δ COG Daten mit Antibiotika im Vergleich zu der Kontrolle ohne Antibiotika erfolgte durch Berechnung des 95 %-Konfidenzintervalls.

3 Ergebnisse

3.1 Reinheitskontrolle der Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Kultur

3.1.1 Dreiösenausstrich auf Blutagar

Da in den Räumlichkeiten der Versuchsdurchführung sowohl mit dem Bacillus Calmette-Guérin (*M. bovis* BCG) als auch mit *M. smegmatis* gearbeitet wurde, galt es eine Verunreinigung des *M. bovis* BCG Aliquot mit *M. smegmatis* auszuschließen. Nach Dreiösenausstrich auf Blutagar einer *M. bovis* BCG Kultur des Aliquot konnte kein bakterielles Wachstum nach 2 und 10 Tagen nachgewiesen werden. Somit konnte eine Verunreinigung des Aliquot mit *M. smegmatis* oder anderen Bakterien wie bspw. *Staphylokokkus epidermidis* der Hautflora ausgeschlossen werden.

3.1.2 Multiplex-PCR zur Differenzierung des *M. bovis* BCG von *M. tuberculosis* und *M. smegmatis*

Zur Reinheitskontrolle des *M. bovis* BCG Aliquot diente hier eine Multiplex-PCR basierend auf der RD1-Region-Deletion, welche von *Talbot et al.* vorbeschrieben wurde. *M. bovis* BCG unterscheidet sich von *M. bovis* Wildtyp in der Deletion des 9,5 kb RD1-Fragmentes bei *M. bovis* BCG [94]. (Die exakte Größe des Fragments beträgt 9650 bp. Es wurde vereinfacht als 9,5 kb Fragment bezeichnet.) Wenn die drei Primer (ET1, ET2, ET3) zugegeben werden binden alle drei Primer bei sowohl *M. bovis* Wildtyp als auch *M. tuberculosis* Stämmen. Es wird bei diesen Stämmen allerdings nur ein 150 bp Produkt amplifiziert. Primer ET2 bindet hier innerhalb der RD1-Region. Bei Vorliegen eines *M. bovis* BCG wird ein 200 bp Produkt amplifiziert. Primer ET2 bindet hier nicht, da die Bindungsstelle innerhalb der RD1 Region fehlt. Es kommt zur Amplifikation zwischen Primer ET1 und ET3.

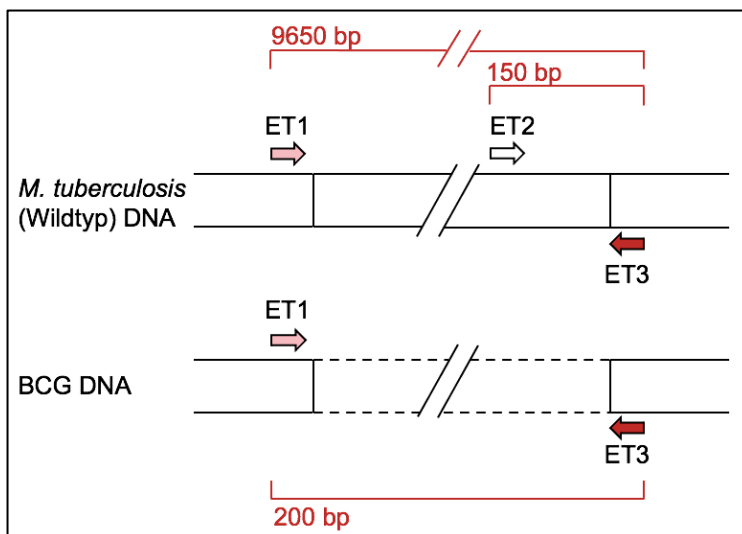


Abbildung 5: Multiplex-PCR zur Differenzierung von *M. tuberculosis* DNA und *M. bovis* BCG DNA. Dargestellt ist die RD1-Sequenz (9650 bp). Die RD1-Deletion des *M. bovis* BCG ist als gestrichelte Linie dargestellt. Die PCR Primer ET1, ET2 und ET3 sind dargestellt als Pfeile, welche in die Amplifikationsrichtung weisen.

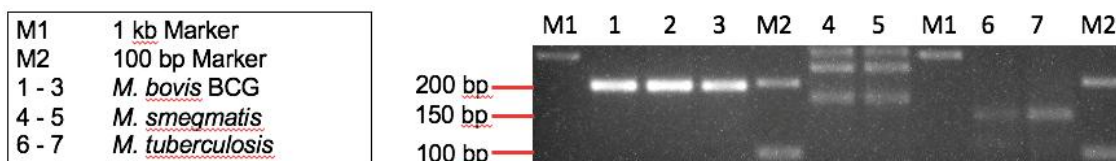


Abbildung 6: Agarose-Gelelektrophorese des Multiplex-PCR-Produkts

Die Reinheitskontrolle des *M. bovis* BCG Aliquot durch die Multiplex-PCR zeigte bei drei (von drei) *M. bovis* BCG Proben ein deutliches 200 bp Fragment (Bande 1 – 3) und keine weiteren Amplifikate. Dies wies auf das Vorliegen einer reinen *M. bovis* BCG Kultur hin. Im Vergleich dazu wurde bei *M. tuberculosis* (Bande 6 – 7) ein 150 bp Fragment amplifiziert. *M. smegmatis* (Bande 4 – 5) zeigte ein vollkommen unabhängiges Muster mit weder 200 bp noch 150 bp Fragment [94].

3.1.3 Rasterelektronenmikroskopische Darstellung des *M. bovis* BCG

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen des *M. bovis* BCG zeigten stäbchenförmige Zellen, die der typischen Morphologie von Mykobakterien entsprechen [10, 96].

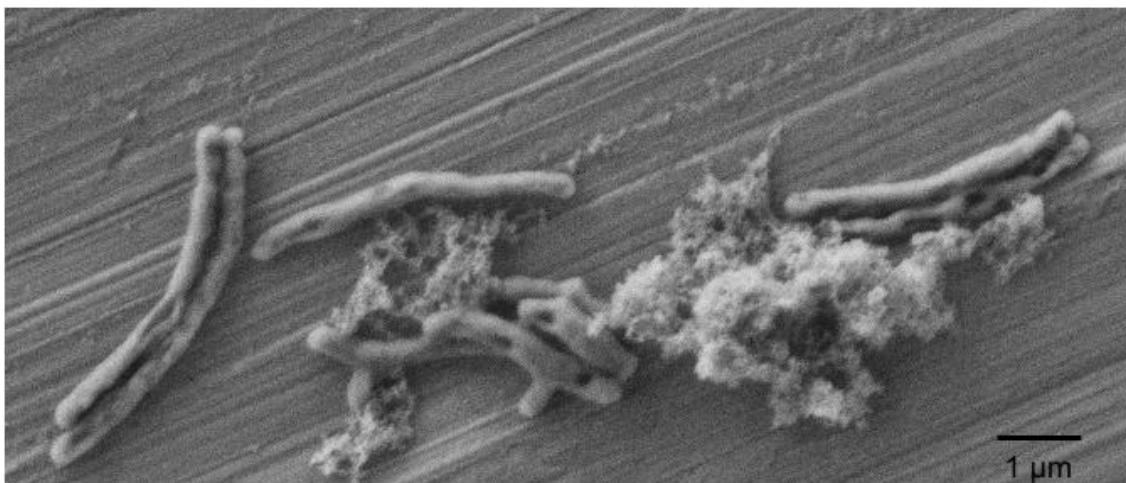


Abbildung 7: REM Aufnahme von *M. bovis* BCG Einzelzellen nach Kultivierung aus dem Aliquot nach einer Wachstumsdauer von 13 Tagen

3.1.4 Methodenoptimierung der Rasterelektronenmikroskopischen Darstellung des *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)

Angelehnt an die Probenpräparation von *M. smegmatis*, welche von *Neumann et al.* beschreiben wurde (siehe Kapitel 2.2.2.3), sollte die Methode für den *M. bovis* BCG weiterentwickelt werden [64].

Anlass zur Optimierung der Methode war, dass nach beschriebener Präparation die Zellen des *M. bovis* BCG eine unruhige Oberflächenstruktur mit Läsionen der Zellwand aufweisen (siehe Abbildung 7). Außerdem zeigte sich in Umgebung der Zellen vermehrt Ablagerungen, welche möglicherweise durch Zelldetritus oder Bestandteilen aus dem Flüssigmedium zustande kamen. Dies erlaubte die Annahme, dass die mykobakterielle Zellwand während der Präparation zu Schaden gekommen war und Proteinbestandteile und DNA möglicherweise aus dem Inneren der Zellen ausgetreten waren, welcher sich als Zelldetritus abbildeten. Um zu untersuchen, wodurch die Zellwandschädigung zustande gekommen war, wurden zwei Hypothesen aufgestellt:

- 1) Eine mögliche osmotische Schädigung durch das Rücklösen in 3,7 % v/v Formaldehyd (+ 96,3 % v/v sterilem Wasser) der Proben nach Entfernung des Nährmediums.

- 2) Eine möglicherweise mechanische Schädigung der Zellen durch Zentrifugation bei 4000 rpm.

Zur Optimierung wurden drei verschiedene Versuchsansätze etabliert (siehe Kapitel 2.2.3). Die Rücklösung des Zellpellet erfolgte nicht direkt in 3,7 % v/v Formaldehyd (wie bei der Kontrolle nach vorbeschriebener Präparationsweise), sondern in einer schrittweisen Rücklösung mit absteigenden Konzentrationen an NaCl bzw. PBS-Puffer (90 %, 70 %, 45 %, 20 %, 0 % v/v) und steigenden Konzentrationen an sterilem Wasser. Weiterhin wurde der Effekt einer niedrigeren Umdrehungszahl bei Zentrifugation untersucht. Parallel dazu wurde eine Kontrolle nach vorbeschriebener Probenpräparation angefertigt.

Versuchsansätze:	Rücklösung nach Formaldehyd Fixierung in:	Zentrifugation bei:
1)	Schrittweise Rücklösung in 0,9 %iger-NaCl-Lösung (90 %, 70 %, 45 %, 20 %, 0 % v/v) + 3,7 % v/v Formaldehyd	4000 rpm
2)	Schrittweise Rücklösung in PBS-Puffer (90 %, 70 %, 45 %, 20 %, 0 % v/v) + 3,7 % v/v Formaldehyd	4000 rpm
3)	Schrittweise Rücklösung in PBS-Puffer (90 %, 70 %, 45 %, 20 %, 0 % v/v) + 3,7 % v/v Formaldehyd	2000 rpm
4) Kontrolle	Rücklösung in Sterilem Wasser (96,3 % v/v) + 3,7 % v/v Formaldehyd	4000 rpm

Tabelle 5: Versuchsansätze zur Optimierung der REM Probenpräparation des *M. bovis* BCG

Die REM-Aufnahmen des *M. bovis* BCG nach beschriebener Probenpräparation sind beispielhaft in Abbildung 8 bis Abbildung 11 gezeigt.



Abbildung 8: REM Aufnahme des *M. bovis* BCG nach Rücklösung in aufsteigenden Konzentrationen von NaCl Lösung

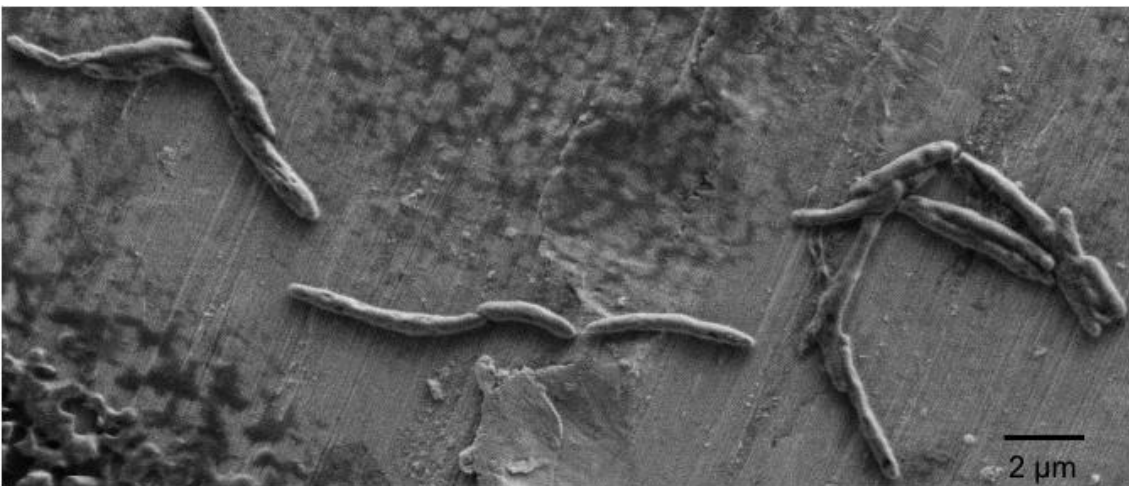


Abbildung 9: REM Aufnahme des *M. bovis* BCG nach Rücklösung in aufsteigenden Konzentrationen PBS-Puffer

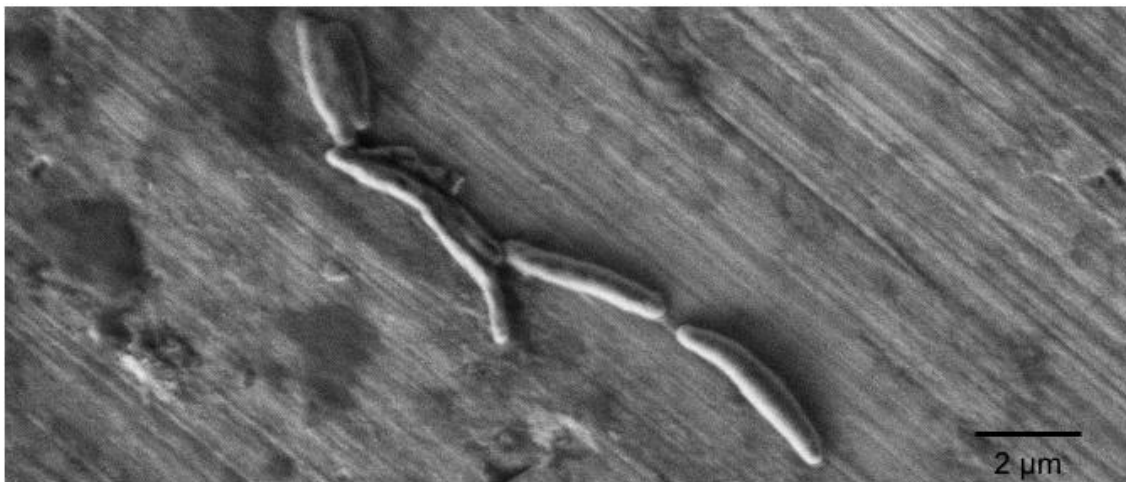


Abbildung 10: REM Aufnahme des *M. bovis* BCG nach Rücklösung in aufsteigenden Konzentrationen PBS-Puffer und Zentrifugation bei geringerer Umdrehungszahl (2000 rpm)

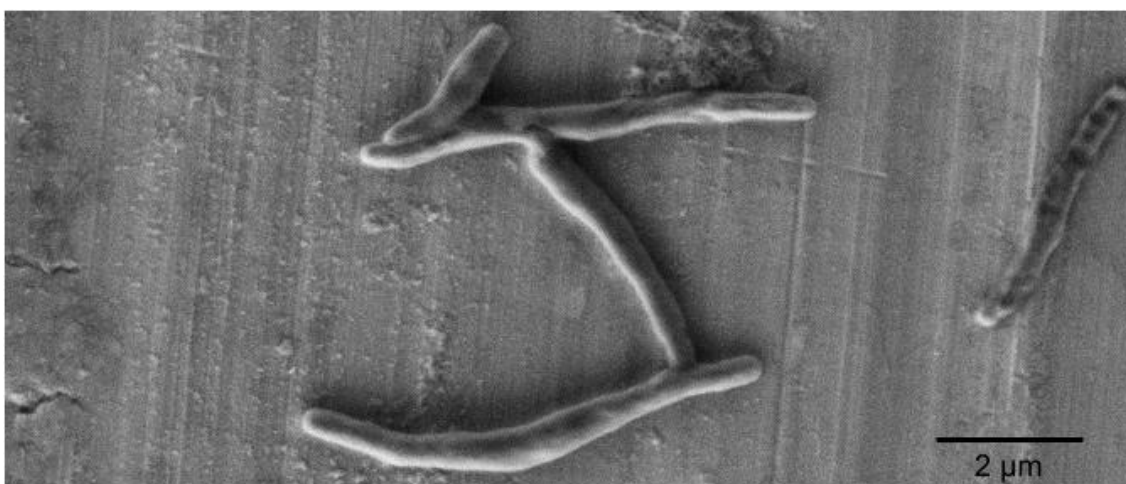


Abbildung 11: REM Aufnahme des *M. bovis* BCG nach Rücklösung in sterilem Wasser (Kontrolle)

Die verschiedenen Präparationsmethoden führten visuell in allen Ansätzen zu vergleichbaren REM Darstellungen der Einzelzellen, auch im Vergleich zu der Kontrolle, welche nach vorbeschriebenen Präparationsmethode von *Neumann et al.* präpariert wurde [64]. Es zeigten sich in allen Ansätzen stäbchenförmige Zellen mit unterschiedlicher Länge und Morphologie mit einem Spektrum von intakten Zellen mit glatter Oberflächenstruktur bis hin zu Zellen mit unregelmäßiger Oberflächenstruktur.

3.2 Eigenschaften des Bacillus Calmette-Guérin (BCG)

3.2.1 Wachstumsanalyse des *M. bovis* BCG

Die Verdopplungszeit des Bacillus Calmette-Guérin (*M. bovis* BCG) wurde anhand der Zunahme der optischen Dichte innerhalb der ersten vier Tage nach Versuchsbeginn errechnet. Dazu wurde das standardisierte Protokoll zu Bakterienkultivierung (siehe Kapitel 2.2.1.3) verwendet. Somit bietet die Wachstumsanalyse eine Aussage über das Bakterienwachstum ohne Antibiotikazugabe und entspricht denselben Bedingungen, welche auch bei den Experimenten zur Wachstumsanalyse mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie angewendet wurden.

Die in Abbildung 12 dargestellte Graphik bildet den Wachstumsverlauf des *M. bovis* BCG innerhalb der ersten vier Tage nach Versuchsbeginn ab. Es wurde eine Wachstumsdauer von 4 Tagen gewählt. In dieser Zeitspanne wird die exponentielle Phase des Wachstums des *M. bovis* BCG abgebildet.

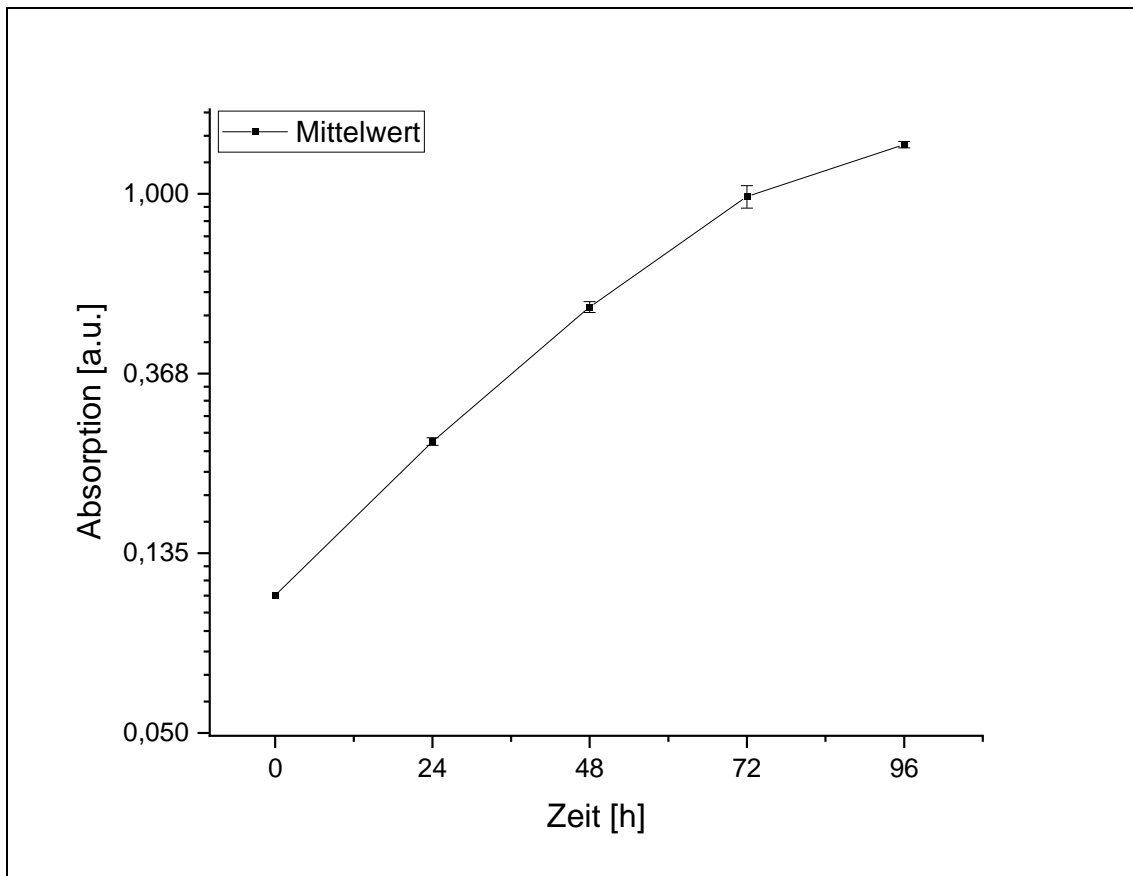


Abbildung 12: Darstellung des Wachstumes des *M. bovis* BCG ermittelt durch Messung der Absorption von *M. bovis* BCG in Triplikaten (biologische Replikate) im Zeitraum von 0 bis 96 Stunden. Logarithmische Auftragung der Mittelwerte der Absorption sowie Standardabweichung (Fehlerbalken).

Zeit [h]	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Mittelwert der Absorption [a.u.] von Probe 1 bis 3	0,107	0,252	0,533	0,985	1,315
Standardabweichung	0,000	0,005	0,016	0,061	0,023
Wachstumsfaktor		0,036	0,031	0,026	0,012
Mittelwert der Verdopplungszeit [h] von Probe 1 bis 3		19,4	22,2	27,5	59,0
Standardabweichung der Verdopplungszeit		0,469	0,518	4,22	11,3

Tabelle 6: Wachstum des *M. bovis* BCG durch Messung der Absorption ermittelt im Zeitraum von 0 bis 96 Stunden der Proben 1 bis 3 (biologische Replikate) mit errechnetem Wachstumsfaktor und Verdopplungszeit des jeweiligen Zeitraums

Die minimale Verdopplungszeit (t_v) wurde hier näherungsweise der Verdopplungszeit in den ersten 24 Stunden gleichgesetzt und beträgt $19,4 \pm 0,5$ Stunden. Die Verdopplungszeit nimmt mit zunehmender Wachstumsdauer zu (siehe Tabelle 6).

3.2.2 Minimale Hemmkonzentration und Reduktionsfaktor von Linezolid

Die 90 %-Hemmkonzentration IC90 von Linezolid beträgt in dem hier verwendeten Versuchsaufbau $0,927 \mu\text{g/ml}$ (siehe Abbildung 13) und wurde anhand photometrischer Absorptionsmessung bestimmt.

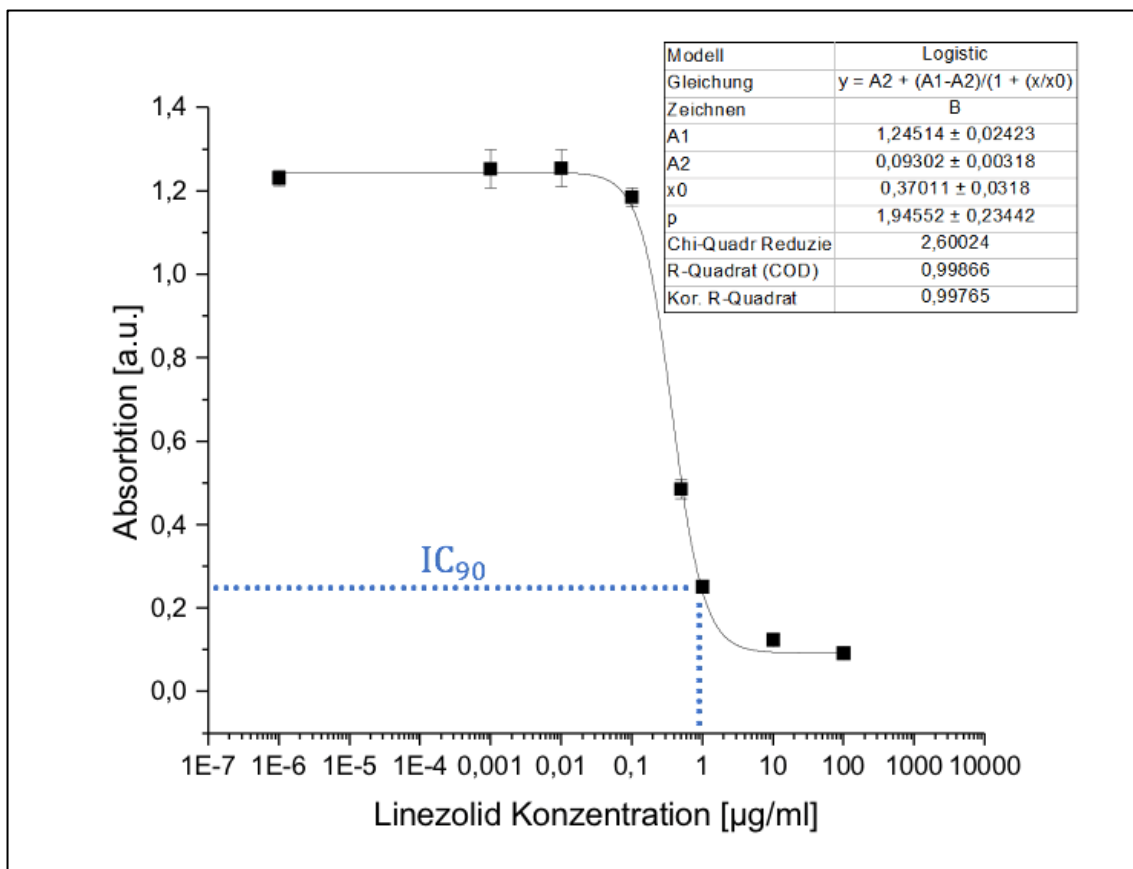


Abbildung 13: 90 %-Hemmkonzentration (IC90) des Antibiotikums Linezolid für den *M. bovis* BCG
 Logarithmische Auftragung der Linezolid Konzentration in µg/ml gegen die photometrische Absorption (Auftragung des Mittelwertes mit Standardabweichung (n=3)) nach einer Wachstumszeit von 120 Stunden mit graphischer Darstellung der 90 %-Hemmkonzentration (IC90)

Der Reduktionsfaktor ist eine weitere Möglichkeit die Wirksamkeit des Antibiotikums zu beschreiben. Hierzu wurde zur Bestimmung jedoch nicht die optische Dichte, sondern die koloniebildenden Einheiten (CFU) verwendet, um nicht nur die Wachstumshemmung, sondern auch die Abtötungswirkung zu beschreiben.

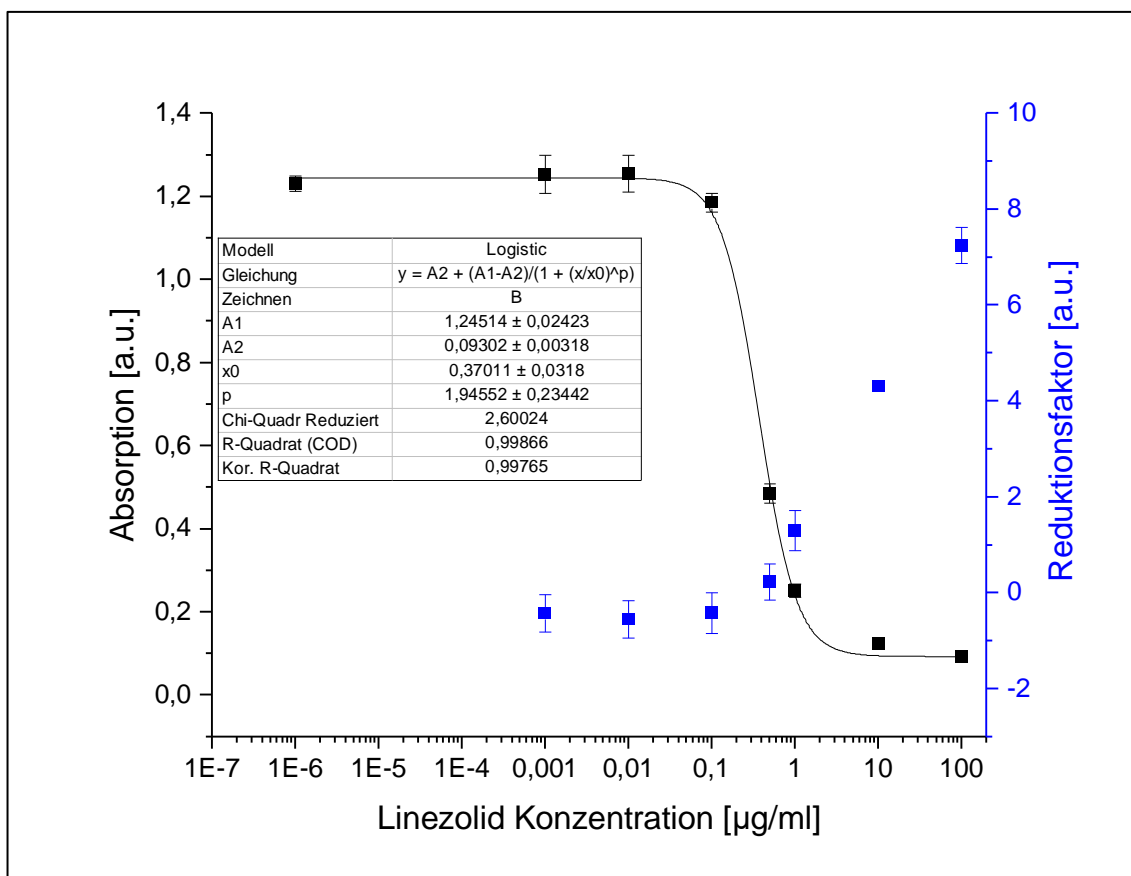


Abbildung 14: 90 %-Hemmkonzentration und Reduktionsfaktor von Linezolid für den *M. bovis* BCG
 Logarithmische Auftragung der Linezolid Konzentration in µg/ml gegen die photometrische Absorption (schwarz) (Auftragung des Mittelwertes mit Standardabweichung (n = 3)) und des Reduktionsfaktor (blau) (mit Standardabweichung nach Fehlerfortpflanzung, n = 3 – 9) nach einer Wachstumszeit von 120 Stunden

Der Reduktionsfaktor R (siehe *Abbildung 14*) beträgt $1,303 \pm 0,415$ a.u. bei einer Linezolid Konzentration von 1 µg/ml, welche gerundet der 90 %-Hemmkonzentration IC90 entspricht. Dies entspricht einer Reduktion von 95,023 %.

3.2.3 Minimale Hemmkonzentration und Reduktionsfaktor von BTZ043

Die 90 %-Hemmkonzentration und der Reduktionsfaktor wurden analog zu Linezolid (siehe Kapitel 3.3.2) für das Antibiotikum BTZ043 bestimmt.

Die 90 %-Hemmkonzentration IC90 beträgt hier 4,226 ng/ml (siehe *Abbildung 15*).

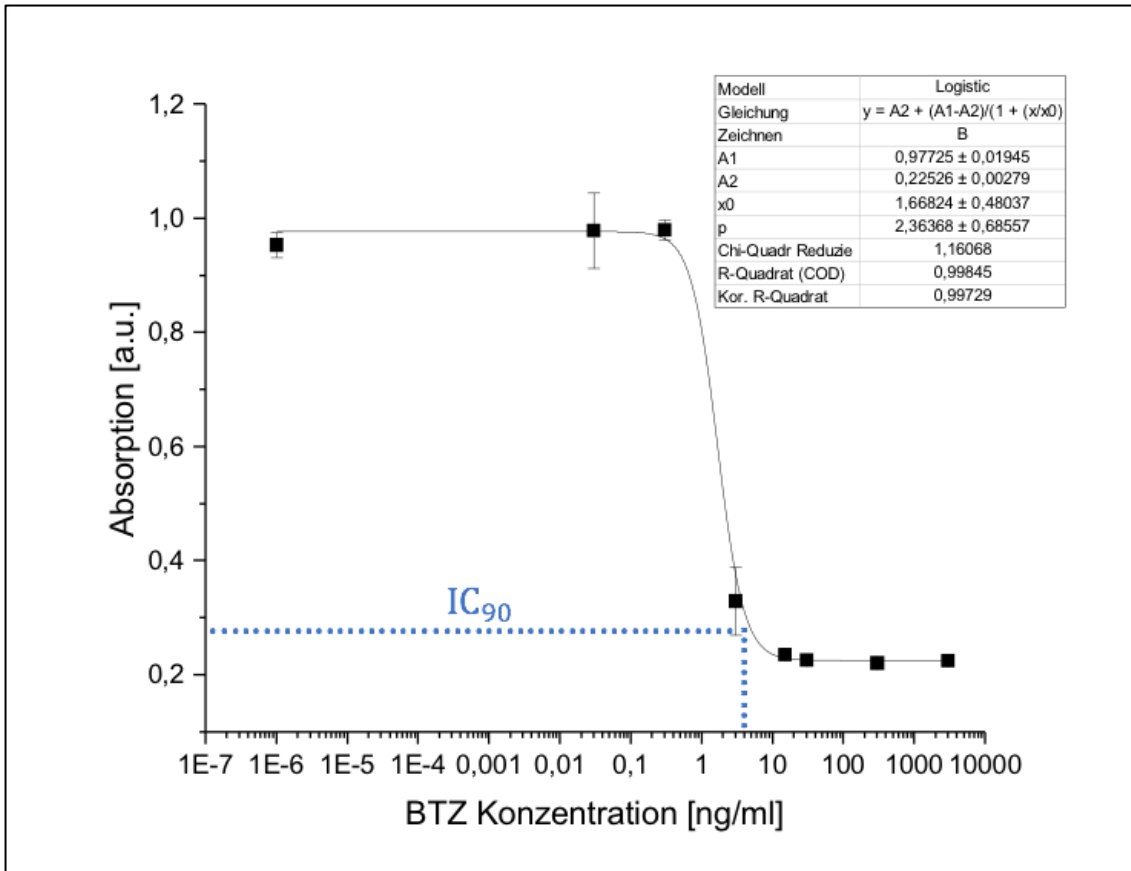


Abbildung 15: 90 %-Hemmkonzentration (IC₉₀) des Antibiotikums BTZ043 für den *M. bovis* BCG
 Logarithmische Auftragung der BTZ043 Konzentration in ng/ml gegen die photometrische Absorption (Auftragung des Mittelwertes mit Standardabweichung (n = 3)) nach einer Wachstumszeit von 120 Stunden mit graphischer Darstellung der 90 %-Hemmkonzentration (IC₉₀)

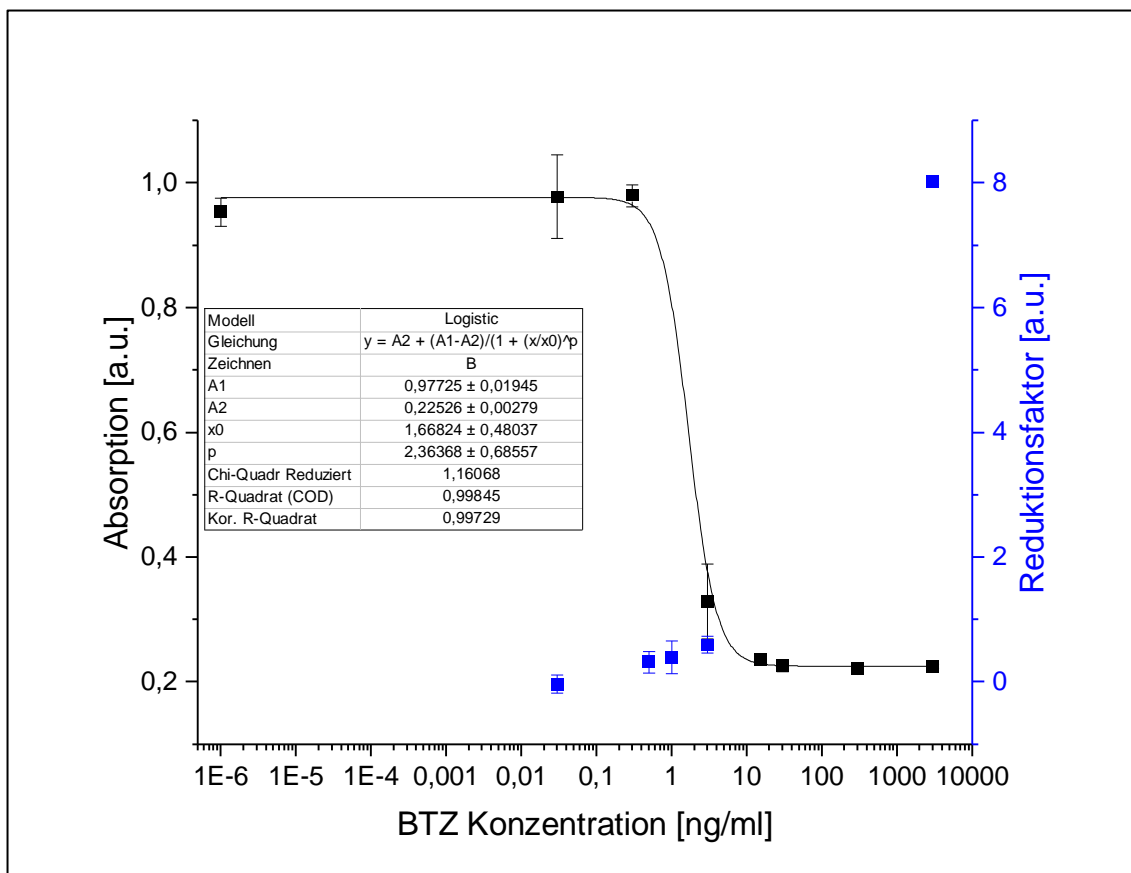


Abbildung 16: 90 %-Hemmkonzentration und Reduktionsfaktor von BTZ043 für den M. bovis BCG
 Logarithmische Auftragung der BTZ043 Konzentration in ng/ml gegen die photometrische Absorption (schwarz) (Auftragung des Mittelwertes mit Standardabweichung (n = 3)) und des Reduktionsfaktor (blau) (mit Standardabweichung nach Fehlerfortpflanzung, n= 9) nach einer Wachstumszeit von 120 Stunden

Der Reduktionsfaktor R (siehe *Abbildung 16*) beträgt $1,611 \pm 0,0789$ a.u. bei einer BTZ043 Konzentration von $4,226$ ng/ml, welche der 90 %-Hemmkonzentration IC90 entspricht. Dies entspricht einer Reduktion von 97,552 %. Die Ermittlung des Reduktionsfaktors R bei der 90 %-Hemmkonzentration IC90 erfolgte anhand der in *Tabelle 7* angegebenen Funktionsgleichung, die mithilfe nicht linearer Regression ermittelt wurde.

Gleichung	A	x [ng/ml]	Reduktionsfaktor R [a.u.] (berechnet)
$y = \ln(x-A)$	$-0,782 \pm 0,279$	4,226	$1,611 \pm 0,0789$

Tabelle 7: Nicht lineare Regression zur Berechnung des Reduktionsfaktor R für den Wirkstoff BTZ043 für den M. bovis BCG bei der Konzentration 4,226 ng/ml

3.3 Isotopenmarkierung und massenspektrometrische Bestimmung der Analytendynamik

3.3.1 Etablierung eines Messprotokolls für MALDI-TOF Massenspektrometrie

3.3.1.1 *Isotopenmarkierung und Ermittlung der spezifischen Massenschwerpunkte für den *M. bovis* BCG mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie*

Für den BCG Stamm wurde ein optimiertes Messprotokoll für das MALDI-TOF Massenspektrometer entwickelt. Dazu wurden massenspektrometrische Messungen von *M. bovis* BCG Proben ohne Antibiotikazugabe angefertigt (siehe Kapitel 2.2.4.1 Isotopenmarkierung).

Im MALDI-TOF Massenspektrometer weisen die verschiedenen Bakterienpezies ein jeweils spezifisches Spektrum auf, welches der Einzigartigkeit eines Fingerabdruckes gleichkommt [78, 92, 93]. Auch für den *M. bovis* BCG lässt sich ein spezifisches Spektrum messen. Es kann angenommen werden, dass sich im Messbereich von 2 bis 20 kDa einzelne Proteine bzw. Proteinfragmente in den spezifischen Signalen des Spektrums widerspiegeln. Diese spezifischen Signale korrespondieren mit spezifischen Makromolekülen die im Folgenden als Analyten bezeichnet werden.

Die hier etablierte Methode hat zum Ziel, durch Isotopenmarkierung mit ^{13}C die zeitliche Neubildungsdynamik der Analyten des *M. bovis* BCG abzubilden. Diese bildet sich durch die Veränderung des Massenschwerpunktes einzelner Analyten ab, die durch den zunehmenden Einbau von schwerem Kohlenstoffisotop ^{13}C zustande kommt. Eine genaue Identifizierung der Analyten durch Extraktion und Sequenzierung der Moleküle wurde nicht durchgeführt. Abbildung 17 zeigt beispielhaft das Spektrum des *M. bovis* BCG mit den Signalen der verschiedenen Analyten, welche charakteristisch für das hier verwendete Bakterium sind.

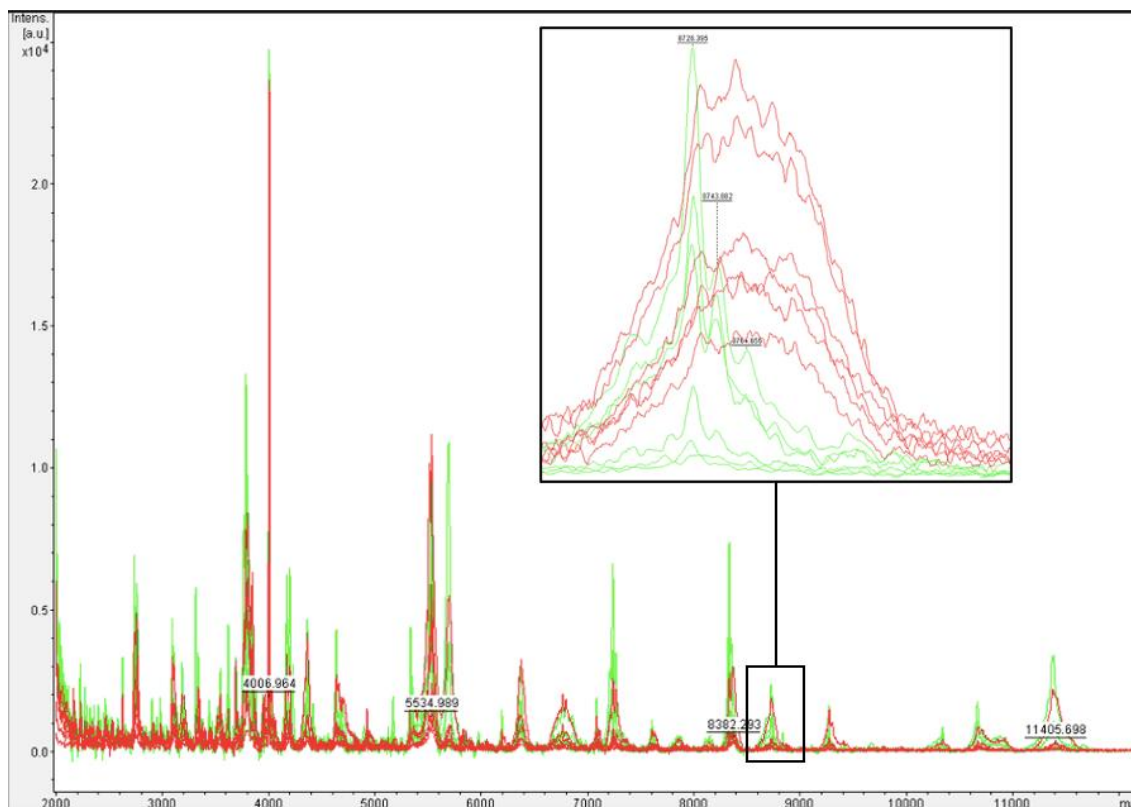


Abbildung 17: Beispielhafte kumulative Darstellung mehrerer Einzelspektren des *M. bovis* BCG ohne Antibiotikazugabe.

Ausschnitt von 2 bis 12 kDa Molekülmasse mit Abbildung der Kontrollgruppe (KG, grün) und Testgruppe (TG, rot) zum Zeitpunkt 120 Stunden nach Versuchsbeginn mit beispielhafter Detaildarstellung des Analyten bei 8726 m/z.

Zur Bestimmung der Analytendynamik wurden eine Kontrollgruppe (KG) und eine Testgruppe (TG) gebildet. Der Testgruppe wurde Glycerol-1,3-¹³C zugegeben, während der Kontrollgruppe unmarkiertes Glycerol (enthält ¹²C-Kohlenstoffatome) zugesetzt wurde. Beide Formen des Glycerols werden von den Bakterien metabolisiert und in der bakteriellen Biosynthese verwendet [97]. Durch das MALDI-TOF Massenspektrometer kann nach Einbau des Kohlenstoffisotops ¹³C in neu synthetisierte Proteine eine Verschiebung des Massenschwerpunktes einiger Signale zu schwereren Massen beobachtet werden (siehe Abbildung 17). Innerhalb der festgelegten Messgrenzen um die jeweiligen Signale wurde der zugehörige Massenschwerpunkt, auch *center of gravity (engl.)* (COG) bestimmt (siehe Abbildung 18).

Die Verschiebung des COG kommt durch die Metabolisierung und den Einbau von ^{13}C in die neu gebildeten Makromoleküle zustande.

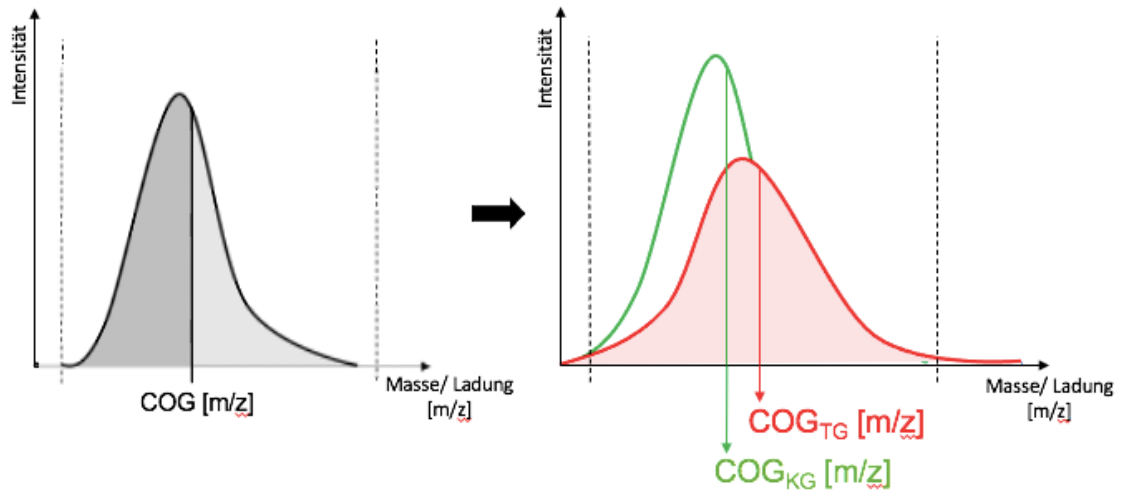


Abbildung 18: Schaubild zur Ermittlung des Massenschwerpunktes COG durch Ermittlung der Fläche unter der Kurve. (Veranschaulichung der Verschiebung des Massenschwerpunktes COG_{TG} im Vergleich zu COG_{KG} . (Grenzen des definierten Messbereichs innerhalb der gestrichelten Linien: linke bzw. rechte gestrichelte Linie = untere bzw. obere Messgrenze)

Für den *M. bovis* BCG wurden neun Analyten definiert, welche jeweils einer Masse entsprechend des höchsten Intensitätswertes zugeordnet wurden. Die Analyten wurden wie folgt benannt (siehe *Tabelle 8*).

Analyten des <i>M. bovis</i> BCG [m/z]	Linke (untere) Messgrenze [m/z]	Rechte (obere) Messgrenze [m/z]
2740	2720	2830
3441	3432	3501
4342	4295	4497
5500	5460	5638
5688	5645	5823
6361	6291	6561
8335	8270	8567
8726	8630	8986
11373	11131	11900

Tabelle 8: Spezifisch für den *M. bovis* BCG definierte Analyten in m/z mit zugehörigen Messgrenzen.

Die Definition der neun Analyten erfolgte anhand der spezifischen Spektren des *M. bovis* BCG zu den Zeitpunkten 24 und 120 Stunden nach Versuchsbeginn. Es wurden jeweils Messgrenzen im Bereich der neun Analyten definiert, um die Berechnung des Massenschwerpunktes innerhalb der Messgrenzen mit möglichst wenig Überlappung anderer Signale zu ermöglichen (siehe Abbildung 18). Bei der Definition der geeigneten Analyten galt es drei wesentliche Punkte zu beachten: Zum einen sollte eine dynamische Verschiebung der Massenschwerpunkte bei der Testgruppe nachweisbar sein. Außerdem sollte die Intensität der Spektren zeitlich konstant über der Rauschschwelle von 200 a.u. liegen. Zum anderen wurde darauf geachtet, dass isolierte Signale eines Analyten betrachtet wurden, sprich die Messgrenzen verschiedener Analyten sich nicht überschneiden. Dies ist essentiell, da durch partielle Überlagerung von Signalen unterschiedlicher Analyten der Massenschwerpunkt eines einzelnen Analyten nicht korrekt bestimmt werden kann.

Die ^{13}C -Zugabe zu der *M. bovis* BCG Kultur markierte den Startpunkt des Versuches. Je mehr Zeit vergeht, desto mehr ^{13}C -Kohlenstoff wird in den bakteriellen Stoffwechselweg aufgenommen und in Proteine eingebaut und folglich kommt es zu einer zunehmenden Verschiebung des COG bis eine Sättigung erreicht ist.

Die Messzeitpunkte der Proben wurden über einen Wachstumszeitraum von 8 Tagen gewählt, basierend auf Analyse des Wachstumsverhaltens und der Verdopplungszeit (siehe 3.2.1). In den ersten zwei Tagen nach Versuchsbeginn wurden alle 12 Stunden Proben genommen, um die Phase des exponentiellen Wachstums mit mehr Messpunkten darzustellen. Ab dem dritten Tag wurden alle 24 Stunden Proben entnommen. Daraus ergaben sich die Messzeitpunkte 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 Stunden. Für alle Zeitpunkte wurden Spektren mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie im Bereich von 2 bis 20 kDa Molekülmasse (positiver, linearer Modus) gemessen.

3.3.1.2 Berechnung des Δ COG der Massenschwerpunkte aus Testgruppe und Kontrollgruppe nach Isotopenmarkierung

Die Differenz der Massenschwerpunkte (Δ COG) von Testgruppe (TG) und Kontrollgruppe (KG) sowie die Standardabweichung (SD) wurde für jeden Zeitpunkt folgendermaßen berechnet:

$$\Delta \text{COG}_x = \frac{\sum (\text{COG } TG_i - \overline{\text{COG } KG})}{N}$$

$$SD (\Delta \text{COG}_x) = \sqrt{(SD (\overline{\text{COG } KG}))^2 + (SD (\overline{\text{COG } TG}))^2}$$

$\text{COG } TG_i$: COG Einzelmesswerte der TG zum Zeitpunkt x

$\overline{\text{COG } KG}$: Mittelwerte über alle COG Einzelmesswerte der KG zum Zeitpunkt x

$\overline{\text{COG } TG}$: Mittelwerte über alle COG Einzelmesswerte der TG zum Zeitpunkt x

N: Anzahl der TG Messwerte zum Zeitpunkt x

Durch Berechnung des Δ COG wurde die zeitliche Dynamik der Analytneubildungsrate dargestellt. Die Berechnung des Δ COG erfolgte zudem, da sich auch bei den COG Werten der Kontrollgruppe ohne ^{13}C -Markierung im Zeitverlauf Schwankungen zeigen, welche möglicherweise auf Massenänderungen durch bspw. posttranslationale Modifizierung oder Oxidation zurückzuführen sind (siehe Graphiken A in Abbildung 19 bis Abbildung 27). Da aufgrund gleicher Wachstums-, Extraktions- und Messbedingungen angenommen wurde, dass diese Änderung der Massenschwerpunkte in beide Gruppen kongruent stattfinden, wurde die Differenz (Δ COG) gebildet, um diese Schwankungen zu eliminieren.

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. rer. nat. Christoph Haisch (Institut für Analytische Chemische und Wasserchemie, TU München) wurde für die Auswertung der Daten ein Skript mittels der Software MATLAB von MathWorks programmiert zu Berechnung der Δ COG, deren Standardabweichungen sowie der graphischen Darstellung der Δ COG. Hierzu wurde eine Rauschschwelle von einer Intensität von 150 a.u. eingestellt, um Messwerte mit niedrigerer Intensität nicht mit einzubeziehen. Für die Glättung der Spektren wurde ein Savitzky-Rauschfilter angewendet.

*3.3.1.3 Veranschaulichung der Analytendynamik ohne Antibiotikazugabe des *M. bovis* BCG*

Die Analytendynamik ohne Antibiotikazugabe wurde in 7 unabhängigen Experimenten gemessen und zu einem großen Datensatz mit 1165 Einzelmessungen zusammengefügt, um ein möglichst valides Modell zu erstellen. Hinter jeder Einzelmessung verbirgt sich ein komplettes Einzelspektrum des *M. bovis* BCG im Messbereich von 2 bis 20 kDa. Dieses Einzelspektrum ergibt sich wiederum durch ein gemittelttes Spektrum, welches durch wiederholte Messung (2000 Laserschüssen in 200 Schritten) eines Messpunktes auf dem MALDI-TOF Messträger generiert wurde. Dabei wurden pro Zeitpunkt und Gruppe (z.B.

Kontrollgruppe, Zeitpunkt 12 Stunden) neun Einzelmessungen generiert, da die Proben in Triplikaten vorlagen (drei biologische Replikate) und aus jeder dieser Proben drei Messpunkte auf den Messträger des MALDI-Targets aufgetragen wurden (drei technische Replikate).

In Abbildung 19 bis Abbildung 27 wird die Dynamik der neun Analyten dargestellt. Die Veranschaulichung der Daten erfolgte zum einen in der Auftragung der Einzelmessungen der Massenschwerpunkte (COG) von Kontrollgruppe und Testgruppe gegen die Zeit in Boxdiagrammen (siehe Graphiken A in Abbildung 19 bis Abbildung 27). Zum anderen erfolgte eine Auftragung der Δ COG gegen die Zeit (siehe Graphiken B in Abbildung 19 bis Abbildung 27).

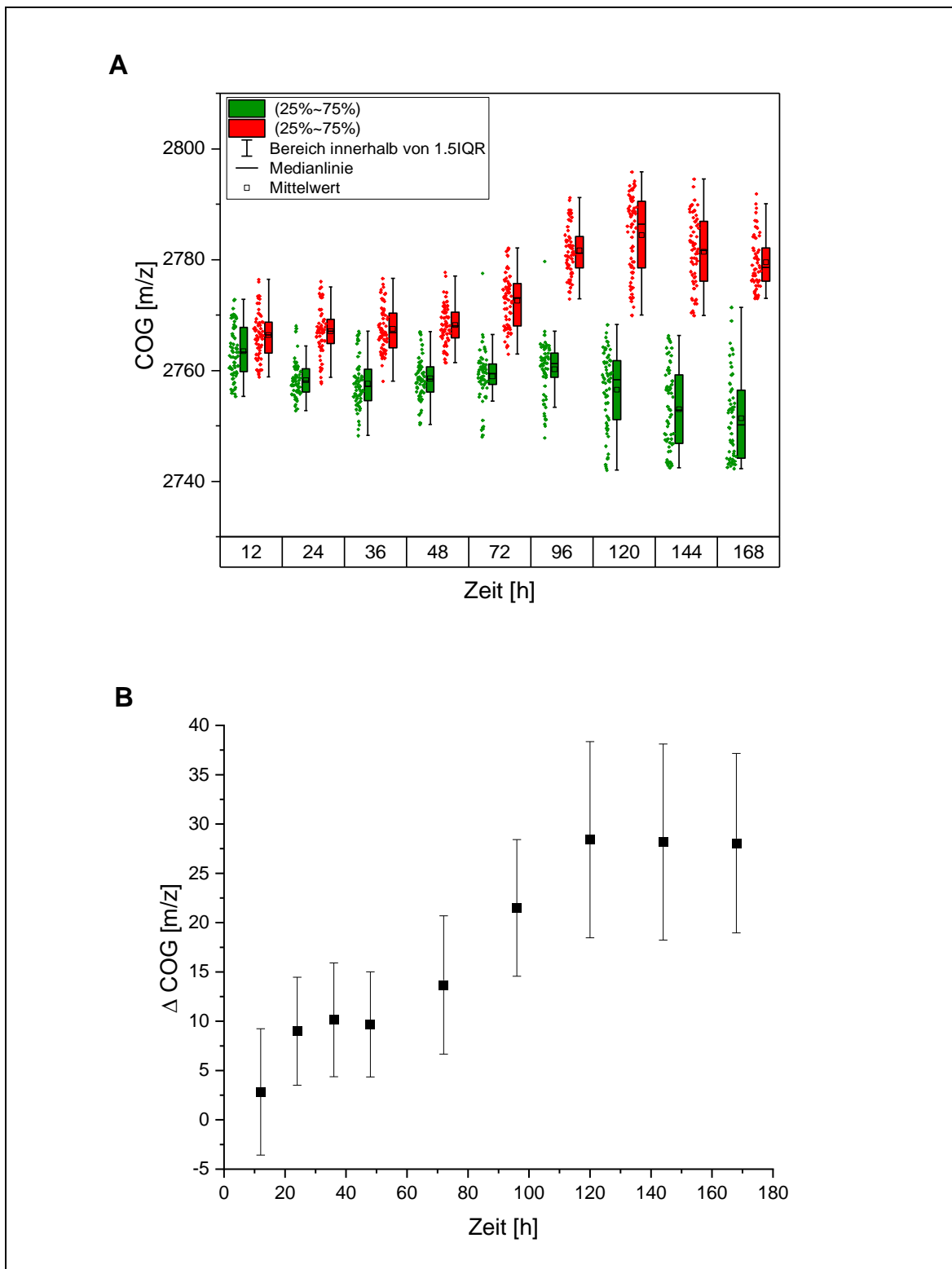


Abbildung 19: Analyt bei 2740 m/z des *M. bovis* BCG im Zeitraum von 12 bis 168 Stunden
A: Auftragung der COG von Kontrollgruppe (KG, grün) und Testgruppe (TG, rot) in einem Boxdiagramm mit Darstellung der einzelnen Messpunkte (links neben der Box) und Auftragung des 1,5-fachen Interquartilabstandes (IQR). Zeitpunkte sind aufgrund besserer Darstellbarkeit als Kategorien mit gleichem Abstand aufgetragen. (63 Messpunkte pro Zeitpunkt) **B:** Graphische Darstellung des Δ COG mit Standardabweichung mit Fehlerfortpflanzung (Fehlerbalken). Darstellung der Zeitpunkte auf der x-Achse in linearer Skalierung.

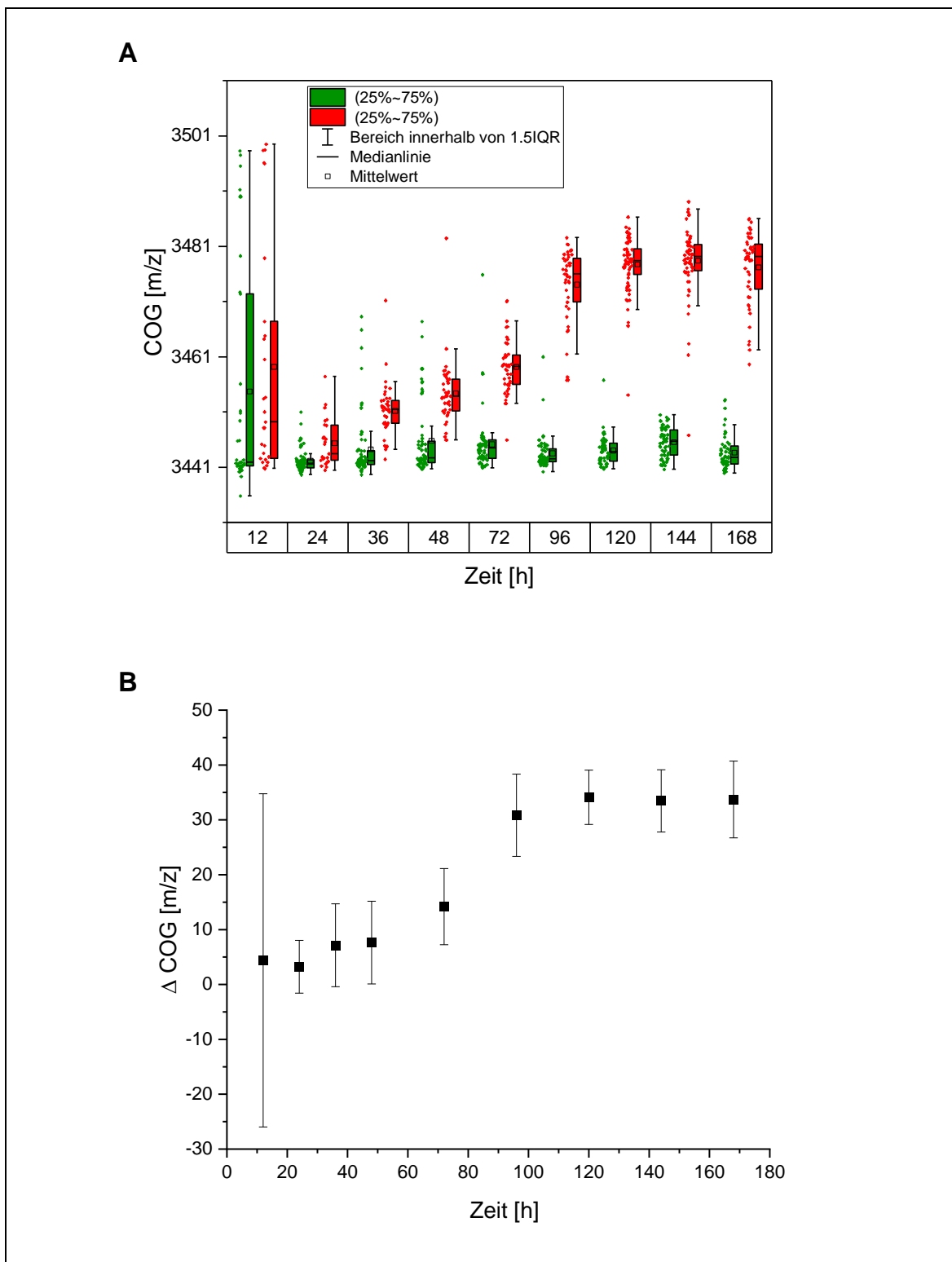


Abbildung 20: Analyt bei 3441 m/z des *M. bovis* BCG im Zeitraum von 12 bis 168 Stunden
 A: Auftragung der COG von Kontrollgruppe (KG, grün) und Testgruppe (TG, rot) in einem Boxdiagramm mit Darstellung der einzelnen Messpunkte (links neben der Box) und Auftragung des 1,5-fachen Interquartilabstandes (IQR). Zeitpunkte sind aufgrund besserer Darstellbarkeit als Kategorien mit gleichem Abstand aufgetragen. (63 Messpunkte pro Zeitpunkt) B: Graphische Darstellung des Δ COG mit Standardabweichung mit Fehlerfortpflanzung (Fehlerbalken). Darstellung der Zeitpunkte auf der x-Achse in linearer Skalierung.

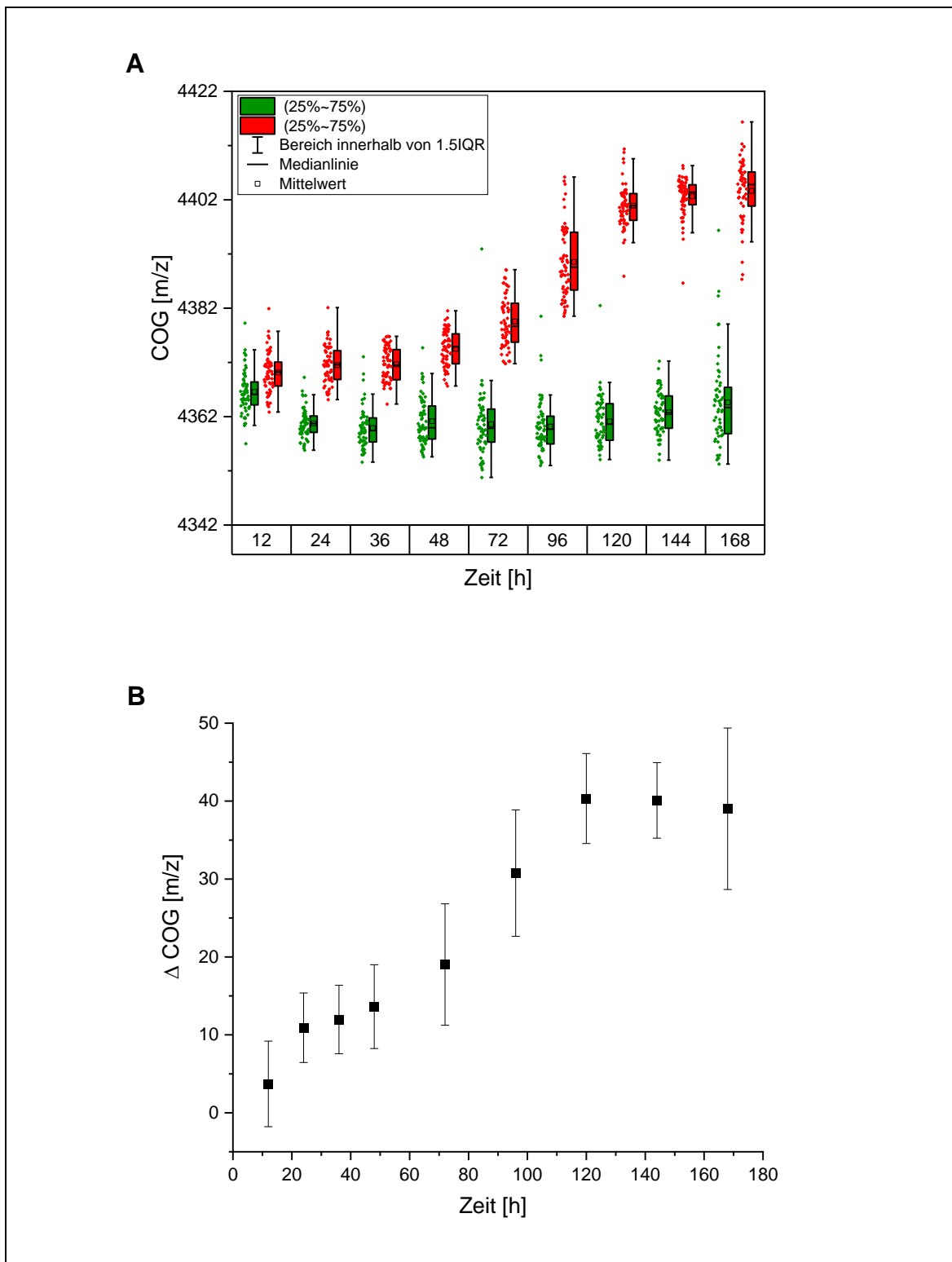


Abbildung 21: Analyt bei 4342 m/z des *M. bovis* BCG im Zeitraum von 12 bis 168 Stunden

A: Auftragung der COG von Kontrollgruppe (KG, grün) und Testgruppe (TG, rot) in einem Boxdiagramm mit Darstellung der einzelnen Messpunkte (links neben der Box) und Auftragung des 1,5-fachen Interquartilabstandes (IQR). Zeitpunkte sind aufgrund besserer Darstellbarkeit als Kategorien mit gleichem Abstand aufgetragen. (63 Messpunkte pro Zeitpunkt) **B:** Graphische Darstellung des Δ COG mit Standardabweichung mit Fehlerfortpflanzung (Fehlerbalken). Darstellung der Zeitpunkte auf der x-Achse in linearer Skalierung.

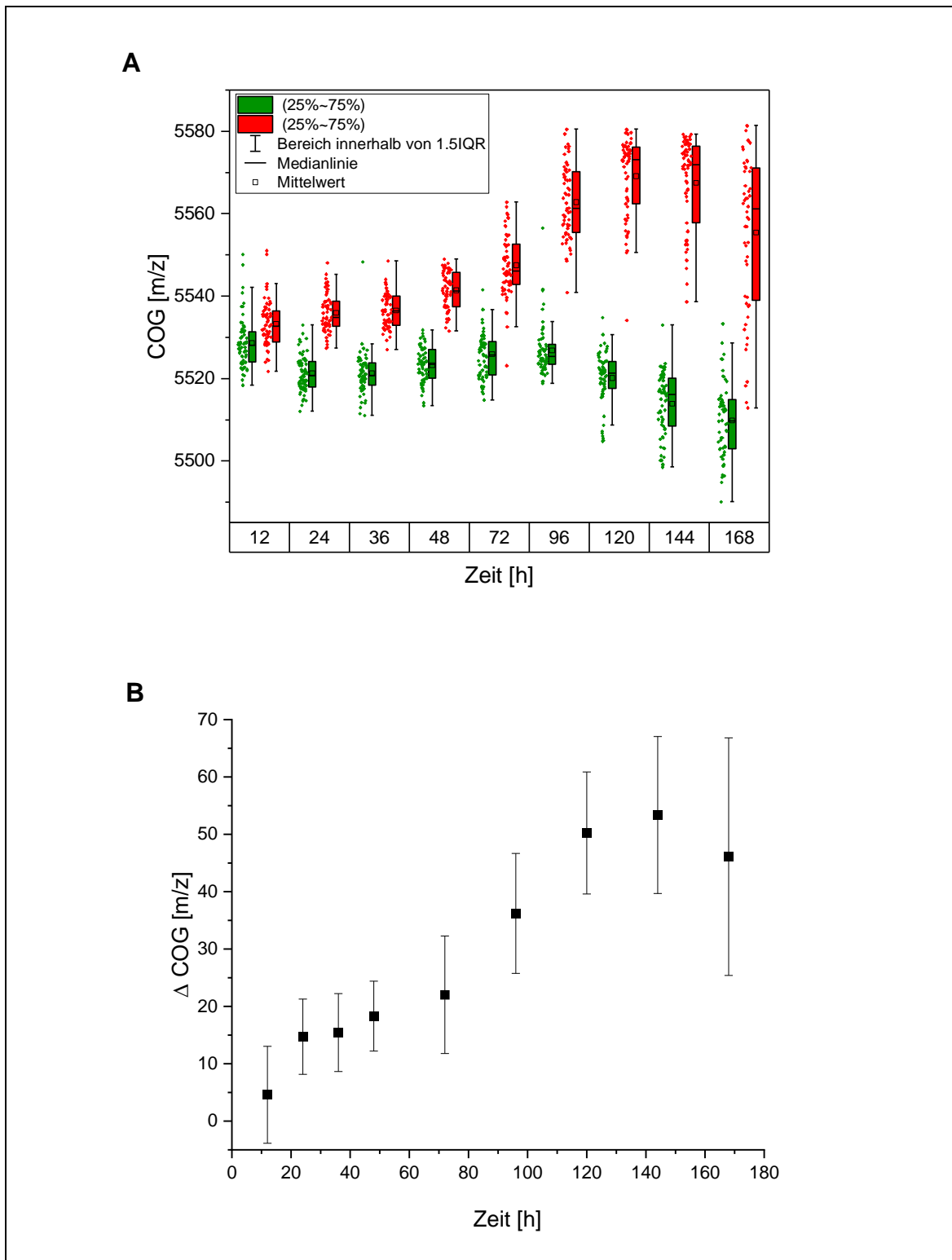


Abbildung 22: Analyt bei 5500 m/z des *M. bovis* BCG im Zeitraum von 12 bis 168 Stunden
A: Auftragung der COG von Kontrollgruppe (KG, grün) und Testgruppe (TG, rot) in einem Boxdiagramm mit Darstellung der einzelnen Messpunkte (links neben der Box) und Auftragung des 1,5-fachen Interquartilabstandes (IQR). Zeitpunkte sind aufgrund besserer Darstellbarkeit als Kategorien mit gleichem Abstand aufgetragen. (63 Messpunkte pro Zeitpunkt) **B:** Graphische Darstellung des Δ COG mit Standardabweichung mit Fehlerfortpflanzung (Fehlerbalken). Darstellung der Zeitpunkte auf der x-Achse in linearer Skalierung.

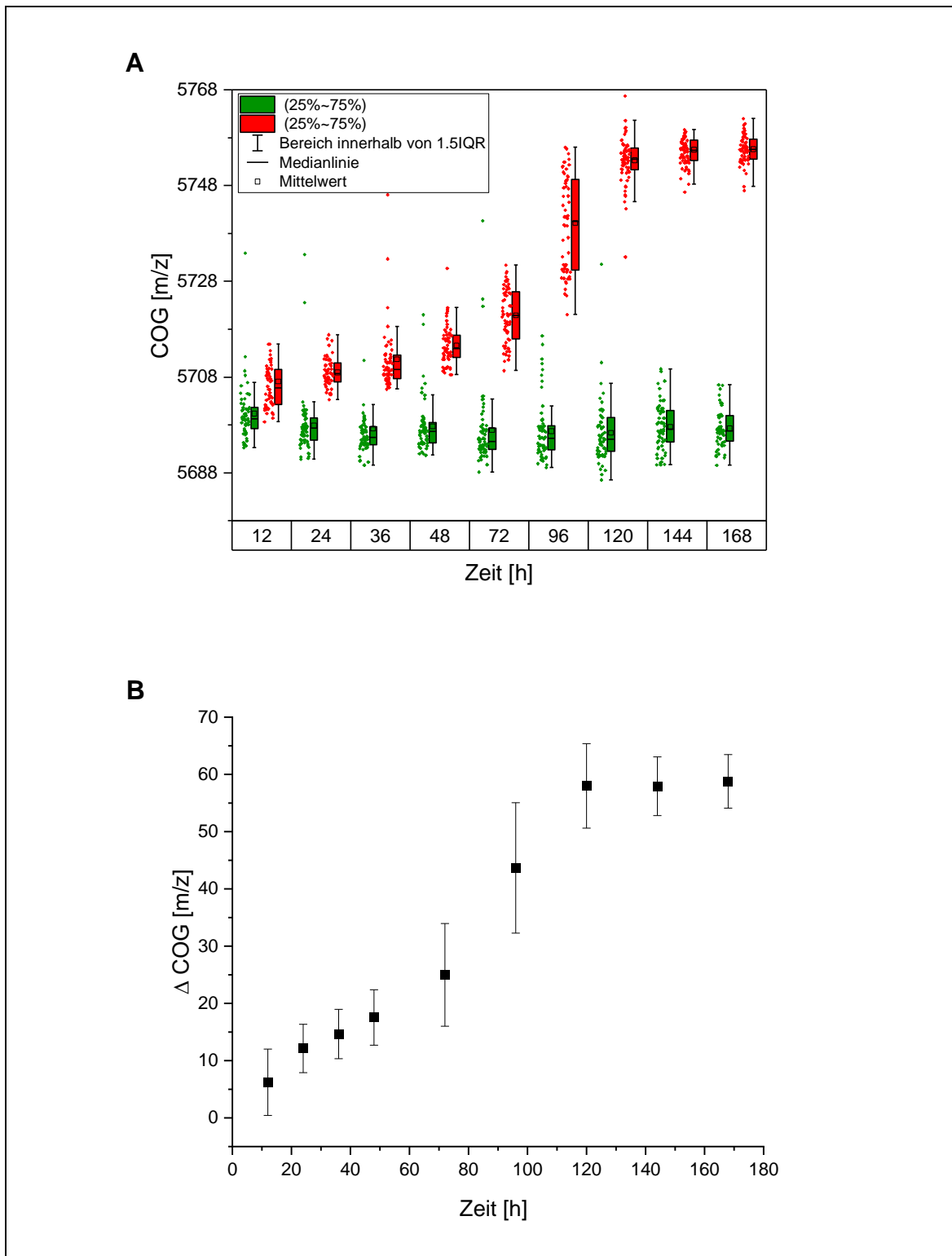


Abbildung 23: Analyt bei 5688 m/z des *M. bovis* BCG im Zeitraum von 12 bis 168 Stunden
A: Auftragung der COG von Kontrollgruppe (KG, grün) und Testgruppe (TG, rot) in einem Boxdiagramm mit Darstellung der einzelnen Messpunkte (links neben der Box) und Auftragung des 1,5-fachen Interquartilabstandes (IQR). Zeitpunkte sind aufgrund besserer Darstellbarkeit als Kategorien mit gleichem Abstand aufgetragen. (63 Messpunkte pro Zeitpunkt) **B:** Graphische Darstellung des Δ COG mit Standardabweichung mit Fehlerfortpflanzung (Fehlerbalken). Darstellung der Zeitpunkte auf der x-Achse in linearer Skalierung.

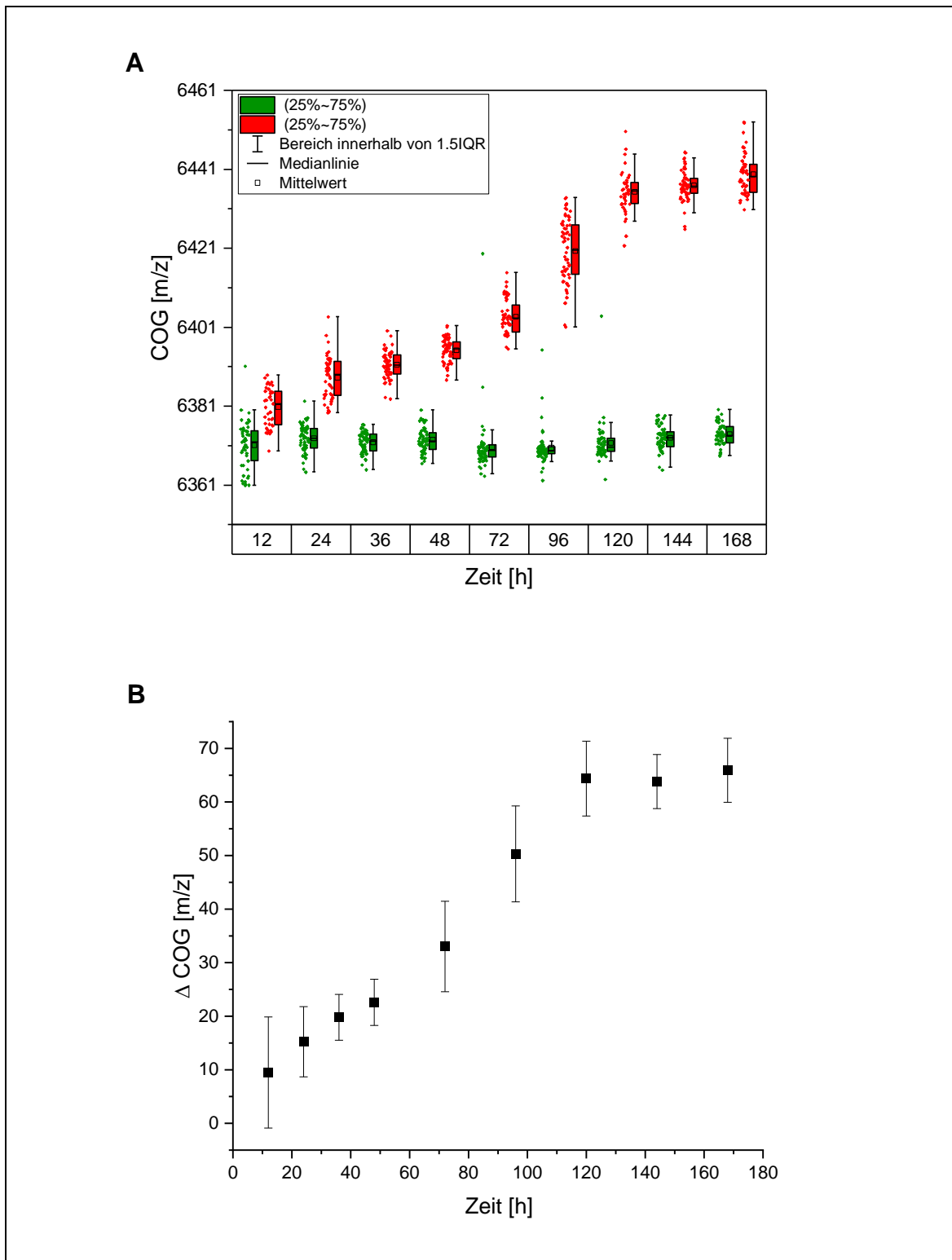


Abbildung 24: Analyt bei 6361 m/z des *M. bovis* BCG im Zeitraum von 12 bis 168 Stunden
A: Auftragung der COG von Kontrollgruppe (KG, grün) und Testgruppe (TG, rot) in einem Boxdiagramm mit Darstellung der einzelnen Messpunkte (links neben der Box) und Auftragung des 1,5-fachen Interquartilabstandes (IQR). Zeitpunkte sind aufgrund besserer Darstellbarkeit als Kategorien mit gleichem Abstand aufgetragen. (63 Messpunkte pro Zeitpunkt) **B:** Graphische Darstellung des Δ COG mit Standardabweichung mit Fehlerfortpflanzung (Fehlerbalken). Darstellung der Zeitpunkte auf der x-Achse in linearer Skalierung.

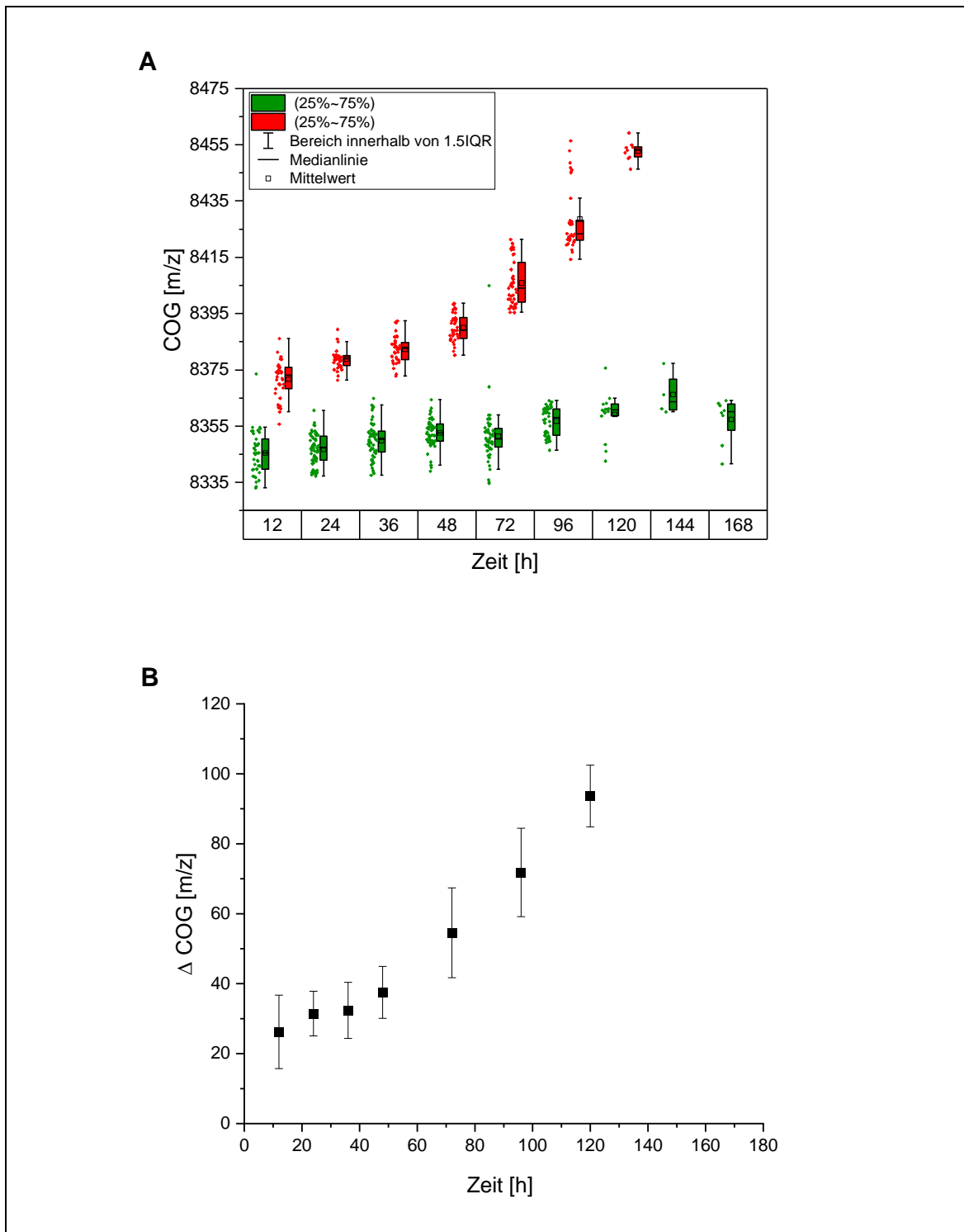


Abbildung 25: Analyt bei 8335 m/z des *M. bovis* BCG im Zeitraum von 12 bis 168 Stunden

A: Auftragung der COG von Kontrollgruppe (KG, grün) und Testgruppe (TG, rot) in einem Boxdiagramm mit Darstellung der einzelnen Messpunkte (links neben der Box) und Auftragung des 1,5-fachen Interquartilabstandes (IQR). Zeitpunkte sind aufgrund besserer Darstellbarkeit als Kategorien mit gleichem Abstand aufgetragen. (63 Messpunkte pro Zeitpunkt) **B:** Graphische Darstellung des Δ COG mit Standardabweichung mit Fehlerfortpflanzung (Fehlerbalken). Darstellung der Zeitpunkte auf der x-Achse in linearer Skalierung. zu Die fehlenden Datenpunkte bei den Zeitpunkten 144 und 168 Stunden sind auf zu wenige auswertbare Messdaten bei zu geringer Intensität der Spektren der Testgruppe (TG) zurückzuführen.

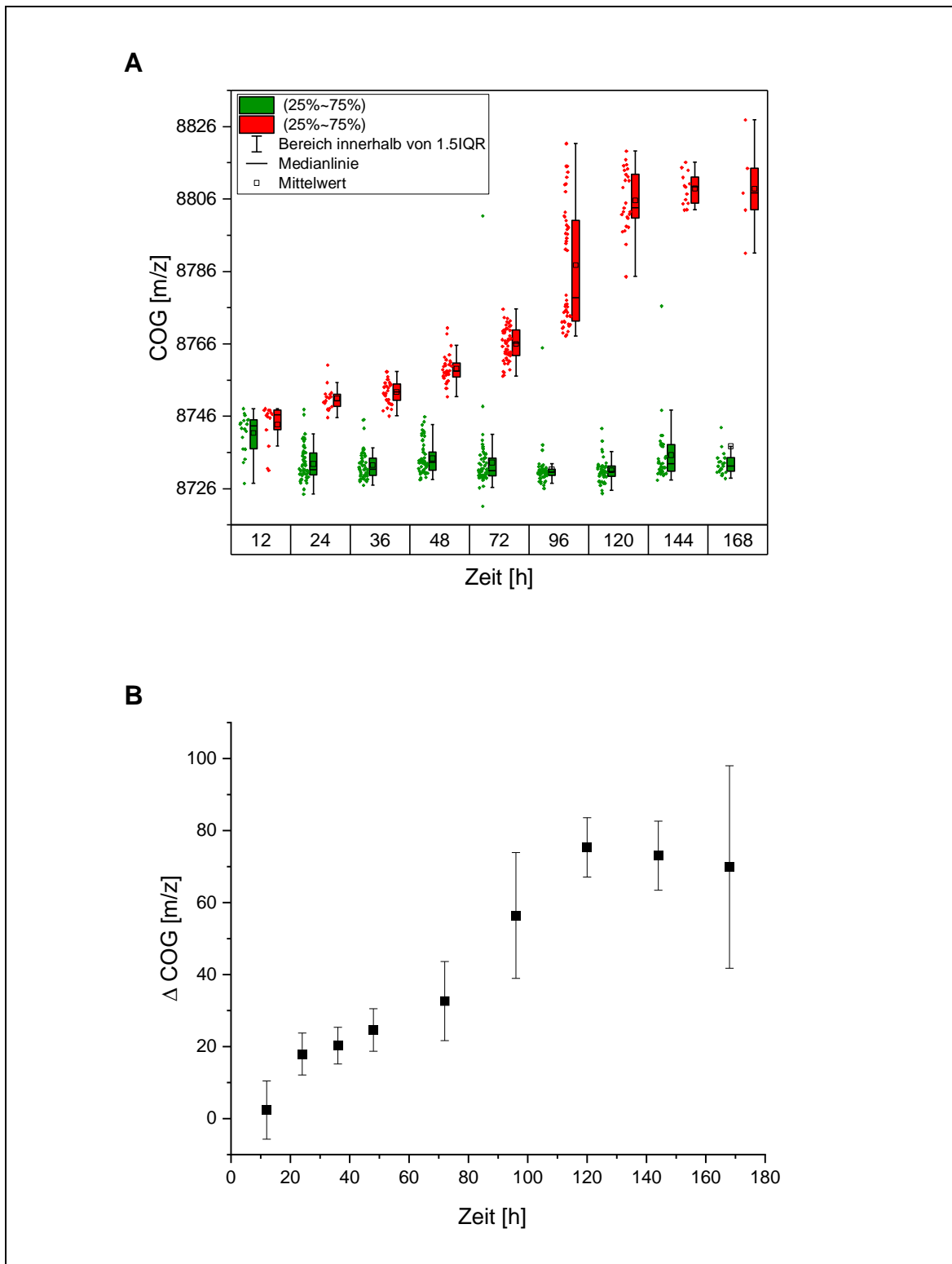


Abbildung 26: Analyt bei 8726 m/z des *M. bovis* BCG im Zeitraum von 12 bis 168 Stunden
A: Auftragung der COG von Kontrollgruppe (KG, grün) und Testgruppe (TG, rot) in einem Boxdiagramm mit Darstellung der einzelnen Messpunkte (links neben der Box) und Auftragung des 1,5-fachen Interquartilabstandes (IQR). Zeitpunkte sind aufgrund besserer Darstellbarkeit als Kategorien mit gleichem Abstand aufgetragen. (63 Messpunkte pro Zeitpunkt) **B:** Graphische Darstellung des Δ COG mit Standardabweichung mit Fehlerfortpflanzung (Fehlerbalken). Darstellung der Zeitpunkte auf der x-Achse in linearer Skalierung.

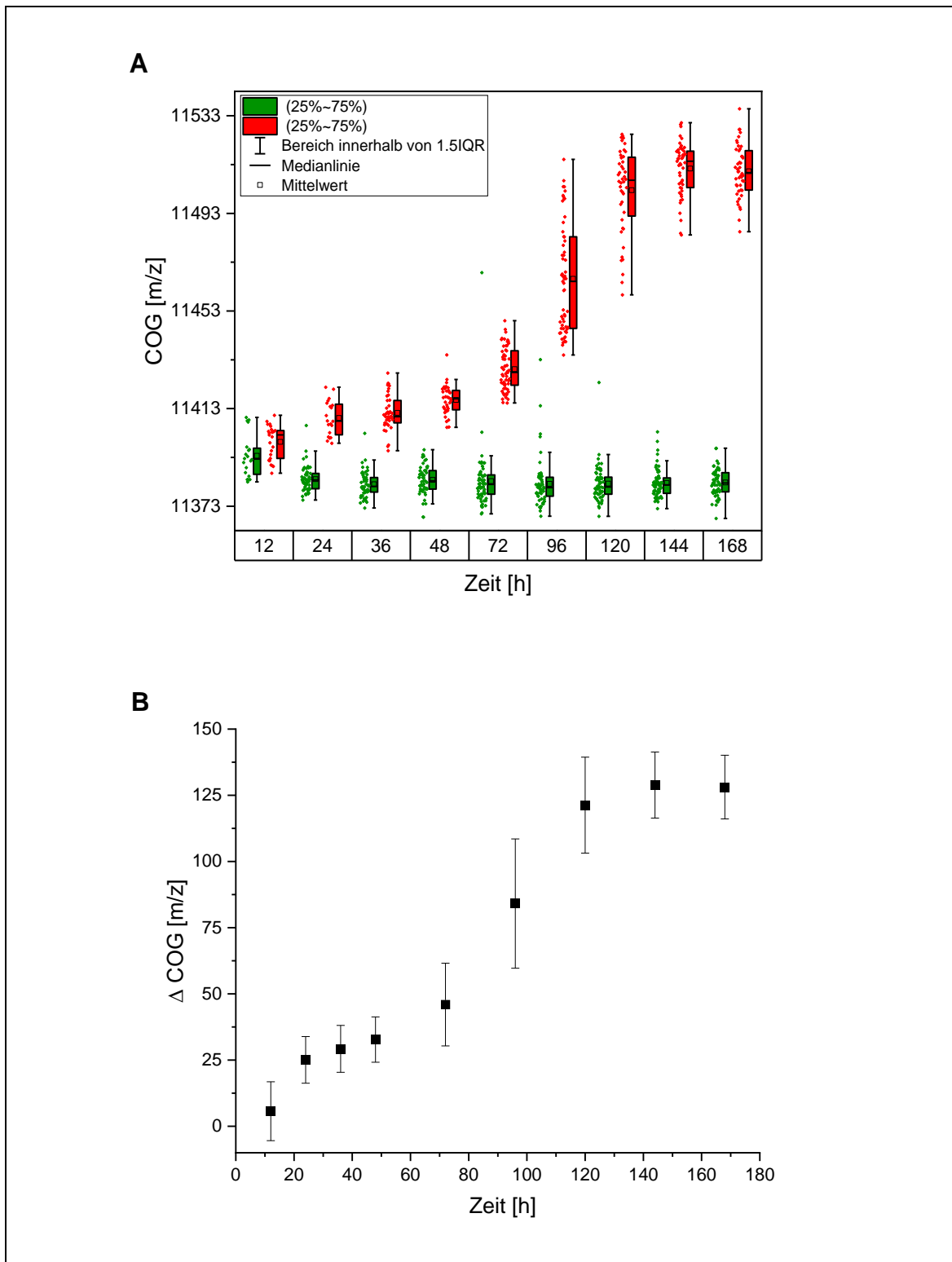


Abbildung 27: Analyt bei 11373 m/z des *M. bovis* BCG im Zeitraum von 12 bis 168 Stunden
A: Auftragung der COG von Kontrollgruppe (KG, grün) und Testgruppe (TG, rot) in einem Boxdiagramm mit Darstellung der einzelnen Messpunkte (links neben der Box) und Auftragung des 1,5-fachen Interquartilabstandes (IQR). Zeitpunkte sind aufgrund besserer Darstellbarkeit als Kategorien mit gleichem Abstand aufgetragen. (63 Messpunkte pro Zeitpunkt) **B:** Graphische Darstellung des Δ COG mit Standardabweichung mit Fehlerfortpflanzung (Fehlerbalken). Darstellung der Zeitpunkte auf der x-Achse in linearer Skalierung.

Es erfolgte eine statistische Auswertung der COG Messwerte der neun Analyten (siehe Tabelle 9). Hierbei wurde ermittelt, ab welchem Messzeitpunkt der Mittelwert des COG von Kontroll- und Testgruppe sich zum ersten Mal signifikant unterscheiden. Die Auswertung erfolgte anhand des T-Test für unabhängige Stichproben bei Vorliegen einer Normalverteilung bzw. anhand des Mann-Whitney-U-Test im Falle nicht normalverteilter Messwerte. Der p-Werts wurde bei einem Signifikanzniveau von 0,05 bestimmt. Die Normalverteilung wurde zuvor mittels des D`Agostino-Omnibus-Test geprüft.

Es zeigte sich bei acht Analyten schon nach dem ersten Messzeitpunkt (12 Stunden) ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte von Kontroll- und Testgruppe. Lediglich einer der Analyten (8726 m/z) zeigte eine signifikante Verschiebung des Massenschwerpunktes erst nach 24 Stunden.

Analyt bei ... [m/z]	Zeitpunkt, bei welchem sich ein signifikanter Unterscheid der Mittelwerte der COG _{TG} und COG _{KG} zeigt [h]	p-Wert
2740	12	0,0003
3441*	12	0,0326
4342	12	<0,0001
5500*	12	<0,0001
5688*	12	<0,0001
6361	12	<0,0001
8335*	12	<0,0001
8726*	24	<0,0001
11373	12	0,01826

Tabelle 9: Statistische Analyse der Analyten mit Identifikation des ersten Zeitpunktes, ab welchem sich die Mittelwerte der Massenschwerpunkte (COG) von Kontrollgruppe (KG) und Testgruppe (TG) signifikant unterscheiden.

Die Verteilung der Messwerte von Analyten welche mit () markiert wurden, wiesen keine Normalverteilung auf.*

Die Analytendynamik des *M. bovis* BCG ohne Antibiotikazugabe erlaubte im nächsten Schritt den Vergleich zu der Analytendynamik des *M. bovis* BCG nach Antibiotikazugabe, worauf in dem nachfolgenden Kapitel eingegangen wird.

3.3.2 Beeinflussung der Analytendynamik durch die Antibiotika Linezolid und BTZ043

Die Wirkung der Antibiotika Linezolid und BTZ043 auf die im vorigen Kapitel beschriebene Analytendynamik soll hier betrachtet werden. Dafür wurde jeweils eines der Antibiotika zu Versuchsbeginn in den Konzentrationen der einfachen IC90 bzw. zweifachen IC90 zugegeben (siehe Kapitel 3.3.2 und 3.3.3).

Es wurde eine verkürzte Versuchsdauer von 96 Stunden aus folgenden Gründen gewählt: Nach Vorversuchen zeigte sich eine signifikante Änderung der Δ COG schon in den ersten 12 bis 24 Stunden. Ein weiterer Grund war, dass im zeitlichen Verlauf ein zunehmender Verlust der Signalintensität und somit auch der Qualität der Spektren unter Einwirkung der Antibiotika auftrat. Deshalb wurde das Probenvolumen mit 660 μ l pro Zeitpunkt größer gewählt als bei den Experimenten ohne Antibiotika. Das größere Probenvolumen sollte sicherstellen, dass auch unter dem wachstumshemmenden Einfluss der Antibiotika noch ausreichend messbare Menge der Analyten pro Volumeneinheit vorlag.

Zum Vergleich der Analytendynamik erfolgte die graphische Auftragung der COG von Kontroll- und Testgruppe in einem Boxdiagramm, sowie die Auftragung des Δ COG der Antibiotika Gruppen im Vergleich zur Kontrolle ohne Antibiotikum gegen die Zeit.

Beispielhaft wurde hier nur der Analyt bei 5688 m/z unter Einfluss von BTZ043 dargestellt (siehe Abbildung 28). Die weiteren Graphiken zu BTZ043 und Linezolid wurden im Anhang dargestellt.

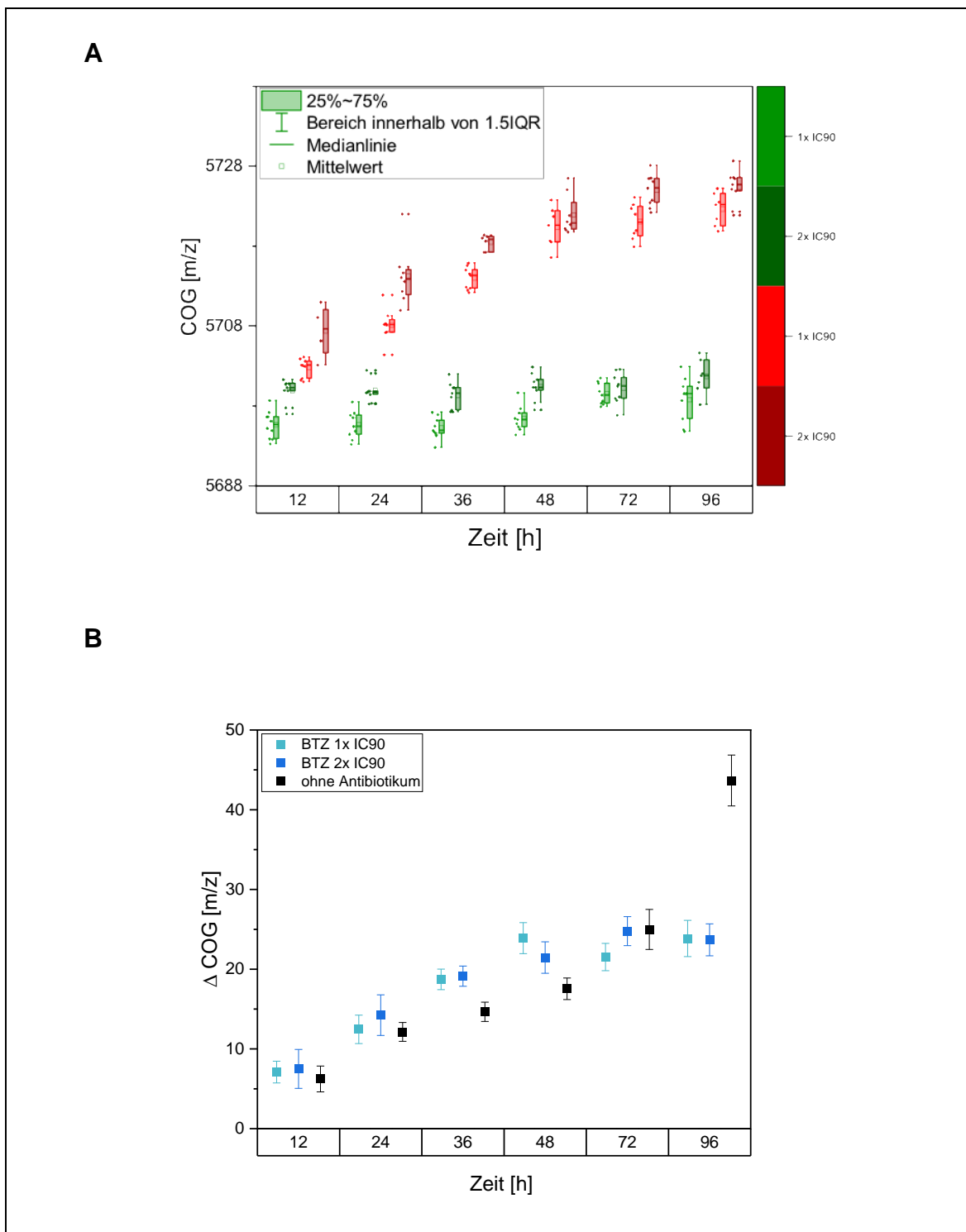


Abbildung 28: Analyt bei 5688 m/z des M. bovis BCG im Zeitraum von 12 bis 96 Stunden

A: Boxdiagramm der COG von Kontrollgruppe (KG, grün) und Testgruppe (TG, rot) in jeweils den BTZ043-Konzentrationen 1x IC90 und 2x IC90 mit Darstellung der einzelnen Messpunkte (links neben der Box) und Auftragung des 1,5-fachen Interquartilabstandes (IQR). Zeitpunkte sind aufgrund besserer Darstellbarkeit als Kategorien mit gleichem Abstand aufgetragen. (9 Messpunkte pro Zeitpunkt) B: Graphische Darstellung der Δ COG unter Einwirkung von BTZ043 (in Konzentrationen von 1x und 2x IC90) im Vergleich zu den Δ COG ohne Einfluss von Antibiotikum. Auftragung mit 95 %-Konfidenzintervall (Fehlerbalken) und Darstellung der Zeitpunkte auf der x-Achse in linearer Skalierung.

Δ COG	ohne Antibiotikum		BTZ043 1x IC90		BTZ043 2x IC90	
	Mittelwert (SD)	95 %-Konfidenzintervall	Mittelwert (SD)	95 %-Konfidenzintervall	Mittelwert (SD)	95 %-Konfidenzintervall
12	6,24 (5,80)	[4,61; 7,86]	7,10 (2,09)	[5,74; 8,46]	7,50 (3,74)	[5,05; 9,94]
24	12,13 (4,23)	[10,95; 13,32]	12,45 (2,73)	[10,66; 14,24]	14,23 (3,90)	[11,68; 16,78]
36	14,66 (4,31)	[13,45; 15,87]	18,72 (1,97)	[17,43; 20,01]	19,12 (1,94)	[17,85; 20,39]
48	17,54 (4,84)	[16,19; 18,90]	23,90 (2,98)	[21,95; 25,84]	21,46 (3,03)	[19,48; 23,44]
72	24,98 (8,98)	[22,47; 27,50]	21,53 (2,62)	[19,81; 23,24]	24,78 (2,78)	[22,96; 26,59]
96	43,66 (11,40)	[40,47; 46,86]	23,85 (3,48)	[21,58; 26,12]	23,69 (3,06)	[21,69; 25,68]

Tabelle 10: Mittelwert, Standardabweichung (SD) und 95 %-Konfidenzintervall des Δ COG von der Gruppe ohne Antibiotikum, BTZ043 1x IC90 und BTZ043 2x IC90 des Analyten bei 5688 m/z des *M. bovis* BCG zu den Zeitpunkten 12 bis 96 Stunden

Das Boxdiagramm (siehe Abbildung 28 A) des Analyten 5688 m/z zeigt, dass es auch unter Einfluss von Antibiotikum BTZ043 (in den Konzentrationen der einfachen und zweifachen IC90) zu einem Einbau des Isotops ¹³C in der ersten 96 Stunden kam, da der Massenschwerpunkt (COG) der Testgruppe (rot) einer deutlichen Verschiebung des m/z-Verhältnisses unterliegt. Der Metabolismus des *M. bovis* BCG war demnach noch aktiv und ¹³C wurde weiterhin verstoffwechselt. In Abbildung 28 B zeigt sich jedoch, dass nach 96 Stunden der Δ COG Wert der Antibiotikagruppen unter dem Δ COG Wert der Gruppe ohne Antibiotikum liegt und sich die einfache Standardabweichung der Δ COG Werte beider Gruppen nicht überschneiden. Die Standardabweichung der Δ COG Werte wurde

berechnet durch Fehlerfortpflanzung aus der einfachen Standardabweichung von TG und KG (siehe Kapitel 3.3.1.2).

Zur Prüfung, ob ein signifikanter Unterscheid zwischen Antibiotikagruppe und der Kontrolle ohne Antibiotika vorliegt, wurde das 95 %-Konfidenzintervall berechnet (siehe *Tabelle 10*). Signifikante Unterschiede zeigten sich zu den Zeitpunkten 36 Stunden und 48 Stunden, wobei das 95 %-Konfidenzintervall von den Gruppen BTZ043 1x IC90 und BTZ043 2x IC90 oberhalb der Kontrolle ohne Antibiotika liegt. Zum Zeitpunkt 96 Stunden liegt sowohl das 95 %-Konfidenzintervall von BTZ043 1x IC90 als auch BTZ043 2x IC90 unterhalb dessen der Kontrolle.

Aufgrund der wenigen Messdaten und der daraufhin unzureichenden Aussagekraft wurde hier auf eine statistische Auswertung aller Analyten verzichtet. Die Experimente mit Antibiotika wurden einmal (bzw. zweimal bei LZD 2x IC90) durchgeführt, somit lagen max. 9 bis 18 Einzelmessungen pro Zeitpunkt vor.

Unter Antibiotikaeinwirkung konnte allerdings nicht bei allen Analyten ein Spektrum gemessen werden. In *Tabelle 11* wurde dargestellt, bei welchen Analyten ein messbares Spektrum aufgezeichnet werden konnte.

Ergebnisse

Antibiotika		BTZ043		Linezolid	
Konzentrationen		1x IC90	2x IC90	1x IC90	2x IC90
Anzahl der Versuchsdurchführung		1	1	1	2
Analyten (x kennzeichnet die Analyten, bei denen das Δ COG nach 96 Stunden Wachstumsdauer bestimmt werden konnte)	2740 m/z	x	x	x	x
	3441 m/z				
	4342 m/z	x	x	x	x
	5500 m/z	x	x		
	5688 m/z	x	x		
	6361 m/z	x	x		
	8335 m/z				
	8726 m/z				
11373 m/z		x			

Tabelle 11: Zusammenfassung der Anzahl der Versuchsdurchführungen unter Einwirkung der Antibiotika und Visualisierung der Messbarkeit der Δ COG der einzelnen Analyten unter Einfluss der Antibiotika BTZ043 und Linezolid in den jeweiligen Konzentrationen (1x und 2x IC90).

(x: Δ COG messbar nach 96 Stunden).

4 Diskussion

4.1 Etablierung des Bacillus Calmette-Guérin (BCG) als Modellorganismus und Voruntersuchungen zur Sicherung der Gütekriterien des Modells

Diese Arbeit beinhaltet über die Erstellung des Modells der Analytendynamik hinaus eine Wachstumsanalyse und Reinheitskontrollen des verwendeten Bacillus Calmette-Guérin (*M. bovis* BCG), sowie eine Methodenoptimierung zur Rasterelektronenmikroskopischen Darstellung des *M. bovis* BCG (siehe Kapitel 4.2). Diese Voruntersuchungen wurden durchgeführt, um die Validität und Reliabilität des Modells sicher zu stellen.

Der Modellorganismus des *M. bovis* BCG Stammes wurde gewählt, da er als Mitglied des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes (MTBC) zu über 99,9 % der genetischen Information mit *M. tuberculosis* teilt und daher die intrinsischen Eigenschaften des Tuberkulose (TB) Erregers ausreichend abzubilden vermag [27, 29, 31]. Der *M. bovis* BCG ist ein attenuierter Stamm des *M. bovis* und gehört wie auch der *M. tuberculosis* zu den langsam wachsenden Mykobakterien. Für den hier verwendeten *M. bovis* BCG wurde die Verdopplungszeit ermittelt, um die optimalen Messzeitpunkte des entwickelten Modells zu bestimmen. Es zeigte sich eine Verdopplungszeit von $19,4 \pm 0,5$ Stunden (siehe Tabelle 6), welche sich bei wiederholter Messung reproduzierbar zeigte. Das Wachstumsverhalten von Bakterien zeichnet sich durch ein exponentielles Wachstum aus, welches nach einer kurzen sogenannten Verzögerungsphase beginnt. Nach der exponentiellen Wachstumsphase folgt die stationäre Phase, in der sich die Verdopplungszeit entsprechend den Wachstumsbedingungen verlängert (bspw. aufgrund eines im Zeitverlauf reduzierten Nährstoffangebots) und anschließend die Sterbephase. Die maximale Teilungsrate entspricht der maximalen Steigung der Kurve während der exponentiellen Wachstumsphase [98, 99]. Hier wurde die Verdopplungszeit bestimmt, welche dem Kehrwert der Teilungsrate entspricht. Die Verdopplungszeit wurde hier näherungsweise der minimalen Verdopplungszeit gleichgesetzt, welche in den ersten 24 Stunden gemessen wurde. Eine genaue

Bestimmung wäre möglich, indem mehr Messpunkte generiert werden und anschließend eine Kurvenmodellierung erfolgt [98-100]. Die Verzögerungsphase wurde hier jedoch vernachlässigt, da sie in Relation zu der langen Wachstumsdauer des *M. bovis* BCG nur zu einer geringen Änderung der Verdopplungszeit führt, welche für unsere Untersuchung keine Relevanz hat. *Beste et al.* berichten von einer Verdopplungszeit des *M. bovis* BCG von 23 Stunden. Die Verdopplungszeit des *M. tuberculosis* wird mit 16 Stunden beschrieben [14]. Die hier ermittelten Verdopplungszeit ($t_d = 19,4 \pm 0,5$ h) erscheint somit im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Verdopplungszeiten der Mitglieder des MTBC kongruent. Unterschiede im Vergleich zu Werten der Literatur lassen sich durch Variationen in den Kultivierungs- und Versuchsbedingungen erklären.

Als Konsequenz der Wachstumsanalyse des *M. bovis* BCG wurden die Messzeitpunkte für das Modell in den ersten 48 Stunden nach Versuchsbeginn zeitlich enger gesetzt (Probenentnahme alle 12 Stunden), da in dieser Phase der exponentielle Wachstumsverlauf abgebildet wird, bevor das Wachstum saturiert. Im Zeitraum zwischen 48 und 168 Stunden nach Versuchsbeginn erfolgte die Messung alle 24 Stunden, da hier eine geringere Teilungsrate vorliegt (siehe Abbildung 12) [98, 99].

Die Entwicklung eines reproduzierbaren Modells, setzt standardisierte Ausgangsbedingungen voraus. Aus diesem Grund wurde eine *M. bovis* BCG Ausgangskultur hergestellt und anschließend in kleine Volumina aufgeteilt und kryokonserviert (-80 °C mit 20 % v/v Glycerol zur Kryoprotektion), um die Bakterienkultivierung nachfolgender Experimente stets mit Kulturen aus dem Aliquot zu beginnen. Nach Aliquotierung wurden Reinheitskontrollen durchgeführt. Die Fragestellung war hier, ob es sich zum einen um das richtige Bakterium, also den *M. bovis* BCG, handelt und zum anderen, ob eine Verunreinigung vorliegt. Verifiziert wurde dies mit Hilfe von drei Methoden. Verwendet wurden ein Dreiösenausstrich, eine Multiplex-PCR basierend auf die RD1-Region-Deletion des *M. bovis* BCG und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen.

Mittels Dreiösenausstrich auf Blutagar kann bei Verunreinigung durch schnell wachsende Organismen (bspw. *Staphylokokkus epidermidis*, *M. smegmatis*, etc.) ein Wachstum dieser Keime beobachtet werden. Da mit *M. smegmatis* in den gleichen Räumlichkeiten gearbeitet wurde und dieser den schnell wachsenden Mykobakterien zuzuordnen ist (Verdopplungszeit $t_v = 2 - 6$ Stunden), wächst dieses Bakterium schon nach wenigen Tagen auf Blutagar [17]. Da kein Bakterienwachstum auf Blutagar zu beobachten war, konnte eine Verunreinigung mit schnell wachsenden Organismen ausgeschlossen werden.

Eine weitere Reinheitskontrolle des *M. bovis* BCG Aliquots wurde mithilfe der Multiplex-PCR basierend auf die RD1-Region-Deletion durchgeführt. Diese Methode wurde von *Talbot et al.* im Jahr 1996 vorbeschrieben und speziell für den *M. bovis* BCG entwickelt [94]. *Pym et al.* beschrieb daraufhin im Jahr 2002, dass die RD1-Deletion wesentlich zur Attenuierung des *M. bovis* BCG beiträgt, indem festgestellt wurde, dass ein Gen-knock-in der RD1-Region in den *M. bovis* BCG zu gesteigerter Virulenz führte [101]. Hier wurde die RD1-Region-Deletion des *M. bovis* BCG anhand der Methode von *Talbot et al.* zur Differenzierung des *M. bovis* BCG benutzt [94]. Durch die RD1-Deletion des *M. bovis* BCG kann der Primer nicht an der RD1-Region binden und es wird daher ein längeres Fragment amplifiziert als bei *M. tuberculosis*, welcher die RD1-Region enthält. *M. smegmatis* hingegen zeigt ein komplett unabhängiges Amplifikationsmuster [102, 103]. Dies kann zur Unterscheidung von *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* und dem *M. bovis* BCG verwendet werden. Bei Vorliegen von ausschließlich des *M. bovis* BCG ist ausschließlich die Amplifikation eines 200 bp Produktes zu erwarten, welches sich bei Untersuchung des *M. bovis* BCG Aliquot nachweisen ließ (siehe Abbildung 6).

In Rasterelektronenmikroskopischer Darstellung von Einzelzellen des *M. bovis* BCG Aliquot stellte sich die typische mykobakterielle Morphologie in Form von stäbchenförmigen Bakterien dar [10, 104, 105]. Jedoch zeigte sich eine unruhige Oberflächenstruktur mit tiefen Mulden, die auf Läsionen der Zellwand hindeuten kann (siehe Abbildung 7). Auch *Rosaspina et al.* beobachtete Oberflächenveränderungen dieser Art, jedoch nach gezielter Mikrowellen Behandlung zu

Sterilisation des *M. bovis* BCG [106]. Außerdem zeigten sich in der Umgebung der Zellen vermehrt Ablagerungen, welche möglicherweise aus Zelldetritus, bakterieller DNA, die durch Zellschädigung aus den Zellen austritt, oder Bestandteilen des Nährmediums bestehen. Dies führte zu der Annahme, dass die mykobakterielle Zellwand während der Präparation beschädigt wurde und Proteinbestandteile und bakterielle DNA aus dem Inneren der Zellen ausgetreten sind, welche sich als Zelldetritus abbildet. Die Methode der Rasterelektronenmikroskopischen Darstellung wurde daraufhin, wie in Kapitel 4.2 beschrieben, weiterentwickelt.

4.2 Methodenoptimierung der Rasterelektronenmikroskopischen Darstellung des Bacillus Calmette-Guérin (BCG)

Das Ziel der Methodenoptimierung der Rasterelektronenmikroskopischen Darstellung war es, in weiterführenden Untersuchungen, die Visualisierung der Zellwand des Bacillus Calmette-Guérin (*M. bovis* BCG) unter Einfluss von Antibiotika zu ermöglichen.

Zur Methodenoptimierung der rasterelektronenmikroskopischen Darstellung wurde untersucht, ob eine osmotische oder mechanische Schädigung der Zellmembran nach vorbeschriebener Probenpräparation vorliegt. Dazu wurde die Fixierung der Zellen in Formaldehydlösung in mehreren Schritten mit einem absteigenden Konzentrationsgradienten von isoosmolarer NaCl-Lösung bzw. PBS-Puffer durchgeführt bis die Zellen zuletzt in sterilem Wasser mit 3,7 % v/v Formaldehyd vorlagen. Durch die langsame und schrittweise Änderung der extrazellulären Osmolarität wurde versucht eine Anpassung der intrazellulären Osmolarität der Zellen zu ermöglichen. Gesondert davon wurde untersucht, ob eine geringere Umdrehungszahl bei der Zentrifugation einen positiven Effekt zeigt. Es zeigten sich visuell keine Unterschiede der modifizierten Präparationstechnik zur vorbeschriebenen Methode von *Neumann et al.* [64]. Die verschiedenen Präparationsmethoden führten in allen Ansätzen zu vergleichbaren REM Darstellungen der Einzelzellen, interessanterweise auch in den Ansätzen der Kontrolle, welche nach vorbeschriebenen Präparationsmethode von *Neumann et al.* präpariert

wurde [64]. Bei dieser REM Darstellungen zeigten im Vergleich zur ursprünglichen REM Messung zur Reinheitskontrolle insg. weniger Läsionen der Zellmembran und extrazelluläre Ablagerungen, was möglicherweise auf eine kürzere Kultivierungszeit in frischem Nährmedium zurückzuführen ist. Die Wachstumsdauer der *M. bovis* BCG Proben wurde bei der Methodenoptimierung von ursprünglich 13 Tage auf eine Wachstumsdauer von 3 Tagen verkürzt. *Markova et al.* wies anhand von REM Darstellungen nach, dass der *M. bovis* BCG bei Nährstoffmangel in der Lage ist in die sog. L-Form überzugehen [104]. Die L-Form – benannt nach dem Lister Institute in London, dem Ort der Erstbeschreibung – ist charakterisiert durch einen zellwand-defizienten Zustand der Bakterien, welcher sich bei mehreren Bakteriengattungen manifestiert, um in Stresszuständen zu überleben [104, 107, 108]. Die Zellwandläsionen nach 13 Tagen Wachstumsdauer könnten aufgrund von zunehmender Nährstoffdepletion auf einem Übergang in die L-Form hinweisen (siehe Abbildung 7). Bei allen Präparationsweisen zeigten sich Variationen in der bakteriellen Morphologie von unbeschädigten Zellen bis hin zu beschädigten Zellen mit extrazellulären Ablagerungen. Auch *Takayama et al.* hat die große Bandbreite an morphologischen Variationen für Kulturen von *M. tuberculosis* in früher Wachstumsphase ohne Antibiotikazugabe beschrieben [109]. *Devados et al.* untersuchte REM Darstellungen des *M. bovis* BCG (Subtypen Glaxo und Tice) und stellte ebenso polymorphe Formen fest, welche von Stäbchen unterschiedlicher Länge bis hin zu kokkoiden Formen (20 – 300 nm) reichten [110]. Es ist somit zu diskutieren, ob eine gewisse Variation der Morphologie möglicherweise charakteristisch für den *M bovis* BCG ist, bedingt durch das langsame Wachstum. Diese Annahme könnte bestärkt werden, da die hier beschriebene Probenpräparation bei dem schnell wachsenden *M. smegmatis* (*Neumann et al.*) keine Zellwandläsionen zeigte [64].

Folglich wurden die Zellwandläsionen entweder nicht durch osmotische oder mechanische Schädigung verursacht oder die neu entwickelte Präparationsmethode konnte diese Problematiken nicht entsprechend adressieren. Eine vorstellbare Ursache für die Oberflächenläsionen wäre eine Schädigung beim Trocknen der Proben. Zum Verhindern der Zellwandschädigung wird nach Dehydratation

der Proben mit Alkohol meist eine Trocknung durch *critical-point-drying* (engl.) (zu Deutsch Kritischer-Punkt Trocknung) durchgeführt, wobei eine Zellwandschädigung durch Übergang von der Flüssig- in die Gasphase verhindert wird [111]. Durch dieses Verfahren könnte die Darstellung des *M. bovis* BCG möglicherweise optimiert werden. Weitergehende Versuche wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt, da die erreichte Abbildungsqualität zur Beantwortung der Fragestellung und guten Darstellung der Zellen ausreichend war.

4.3 Modell zur Untersuchung der Analytendynamik des Bacillus Calmette-Guérin (BCG) nach stabiler Isotopenmarkierung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

Das hier beschriebene Modell zur Untersuchung der zeitlichen Dynamik der Analytneubildungsrate basiert auf Markierung der Analyten mit stabilen Kohlenstoffisotopen und Messung der Massenänderung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie. Analyten wurden hier definiert durch ihre spezifischen Masse-zu-Ladungsverhältnisse (m/z), bei denen Intensitätsmaxima im Spektrum des *M. bovis* BCG (gemessen durch MALDI-TOF Massenspektrometrie) lokalisierbar sind. Dabei macht man sich die Technik der Isotopenmarkierung zu Nutzen. Schwere Kohlenstoffatome (^{13}C) werden wie auch ^{12}C -Kohlenstoffatome metabolisiert und u.a. in Proteine eingebaut [14, 76, 112]. Nach Einbau von ^{12}C oder ^{13}C entstehen chemisch identische Analyten, die sich lediglich in ihrer Masse unterscheiden [77]. Nach ^{13}C -Zugabe kann durch Analyse der Änderung der Massenschwerpunkte (COG, *center of gravity* (engl.)) des Spektrums des Bacillus Calmette-Guérin (*M. bovis* BCG) zu mehreren Zeitpunkten, eine Aussage über die Aktivität des bakteriellen Metabolismus auf Ebene der Analyten getroffen werden. Der Massenschwerpunkt der Analyten verschiebt sich über die Zeit zunehmend, solange vermehrt schwere Kohlenstoffatome in der Biosynthese verwendet werden. Bleibt der Massenschwerpunkt jedoch konstant bedeutet das, dass im Rahmen der Proteinbiosynthese des Analyten keine schwere Kohlenstoffisotope mehr eingebaut werden. In unserem Modell beschreiben wir ausschließlich die

untersuchten Massenschwerpunkte der Analyten, ohne eine Aussage darüber zu treffen, welches Protein oder welcher Proteinbestandteil dem Analyten zuzuordnen ist, bzw. welche Funktion im Zellorganismus das zugehörige Protein erfüllt. Um diese Aussagen treffen zu können, ist eine Identifizierung der Analyten nötig (bspw. über Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)). Für die Fragestellung dieser Arbeit wurde eine Identifizierung jedoch nicht durchgeführt. Auch ohne Wissen des spezifischen Proteins bzw. Proteinbestandteil hinter den Analyten, kann eine Aussage getroffen werden, ob und ab welcher Konzentration ein bestimmtes Antibiotikum die Biosynthese signifikant hemmt.

In unserem Modell wurde die metabolische Isotopenmarkierung angewendet, aufgrund der einfachen Durchführung und der geringen Fehleranfälligkeit [76]. Jedoch wurde als Träger der Isotopen keine Aminosäuren, sondern Glycerol verwendet. Aminosäuren als Träger der Isotopen, wie angewendet bei der SILAC-Methodik (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture (engl.)*), zeigten sich bei *M. tuberculosis* ungeeignet, da es sich unter SILAC Bedingungen als nicht überlebensfähig erwies, sprich bislang war es nicht möglich lebensfähige Aminosäure-auxotrophe Mutanten zu erzeugen (siehe Kapitel 1.6.2) [84-86]. Einige Aminosäuren werden zwar durchaus durch *M. tuberculosis* und *M. bovis* BCG aufgenommen. Im Genom beider fanden sich mehrere Gene, die für Aminosäuretransporter (z.B. Arginin, Lysin) codieren, welche in der inneren Membran der Zellwand lokalisiert sind [113]. Generell weist *M. tuberculosis* jedoch wenig Porine der äußeren Zellmembran und Transporter der inneren Zellmembran auf. Diese sind aktuell noch Gegenstand der Forschung. Es zeigte sich bspw., dass *M. tuberculosis* lediglich 5 Transporter zur Aufnahme von Kohlenhydraten ausweist, wobei der schnell-wachsende *M. smegmatis* 28 dieser Transporter exprimiert. Die geringe Aufnahmekapazität an Kohlenhydraten scheint somit mitverantwortlich für das langsame Wachstum der Mitglieder des MTBC zu sein [113, 114].

Einige ausreichend lipophile Moleküle, wie bspw. Glycerol, können jedoch passiv durch die Lipidmembran diffundieren [114]. Dabei zeigte sich Glycerol als ein entscheidender Metabolit des Stoffwechsels der Mykobakterien. Die

Wachstumsrate der Mykobakterien zeigte sich durch den Zusatz von Glycerol im Nährmedium gesteigert [97, 115, 116]. *Beste et al.* beobachtete bspw. unter Verringerung der Glycerolkonzentration eine dreifache Erhöhung der Verdopplungszeit des *M. bovis* BCG von 23 Stunden auf 69 Stunden [14]. Glycerol wird zu Glycerol-3-Phosphat phosphoryliert und kann anschließend über die Glykolyse in Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) umgewandelt werden. Dies sind zentrale Metaboliten des Kohlenhydrat-Stoffwechsels, worauf auch die Aminosäuresynthese basiert [113]. Acetyl-CoA, ist u.a. ein Baustein der Fettsäuren der Zellwand. Weiterhin dient Acetyl-CoA als Substrat des Citratzyklus. [97, 117, 118]. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass sich nach Markierung der Mykobakterien ^{13}C -Kohlenstoff sowohl in Proteinen als auch in Fettsäuren wiederfinden lässt.

Aus diesem Grund wurde Glycerol-1,3- $^{13}\text{C}_2$ zur metabolischen Isotopenmarkierung verwendet. Ein entscheidender Vorteil ist – im Vergleich zur SILAC-Methodik – das einfache Markierungsprotokoll [84, 85]: Glycerol-1,3- $^{13}\text{C}_2$ ($V = 9,73 \mu\text{l}$) wurde bei der Testgruppe zu Versuchsbeginn dem Flüssigmedium zugesetzt. Da Glycerol-1,3- $^{13}\text{C}_2$ hochpreisig ist, wurde das Volumen von $9,73 \mu\text{l}$ (Konzentration $33,31 \text{ mmol/L}$ bzw. $0,24 \text{ v/v}$) experimentell festgelegt (unter Verwendung von *M. smegmatis*) auf ein möglichst geringes Volumen, bei dem jedoch während der gesamten Versuchsdauer eine ausreichende Menge zur Analytenmarkierung zur Verfügung stand (Daten nicht gezeigt). Bei der SILAC- Methode hingegen erfolgt die metabolische Isotopenmarkierung durch eine Aminosäure. Ziel dieser Methode ist es, eine nahezu vollständige Isotopenmarkierung zu erreichen. Dazu müssen Bakterienstämme verwendet werden, welche durch Mutation auxotroph gemacht wurden, sprich welche zur Proteinbiosynthese auf die zugegebene Aminosäure angewiesen sind. Außerdem muss das Nährmedium frei von der zur Markierung verwendeten Aminosäure sein [85]. Das hier verwendete Markierungsprotokoll ist im Vergleich vereinfacht, da hier keine vollständige Isotopenmarkierung zum Ziel gesetzt wurde. Mit Glycerol-1,3- $^{13}\text{C}_2$ wird eine vollständige Markierung nicht erreicht, da dieses zum einen nur zwei schwere Kohlenstoffatome von insg. drei Kohlenstoffatomen trägt. Außerdem ist Glycerol kein essentieller Metabolit und das Bakterium kann Kohlenstoff demnach über weitere

Metaboliten aufnehmen [97, 113, 117, 118]. Auch bei unvollständiger Isotopenmarkierung lässt sich jedoch eine relative Quantifizierung der neugebildeten Analyten darstellen. Um unser Ziel zu erreichen, nämlich die Änderung der Analytenneubildungsrate zweier Gruppen (mit und ohne Antibiotikumzugabe) zu vergleichen, ist eine vollständige Markierung nicht nötig.

^{13}C -Glycerol wird von *M. bovis* BCG nachweislich metabolisiert, was sich durch Verschiebung der Massenschwerpunkte (COG) der Analyten sichtbar macht (siehe Abbildung 19 – Abbildung 27 A). Die Dynamik der COG Werte von neun Analyten wurde untersucht und zeigte sich in wiederholten Messungen replizierbar. Die neun Analyten wurden nach dem dominanten Wert des Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) benannt (siehe nachfolgende Liste).

Analyten des *M. bovis* BCG [m/z]:

- 2740
- 3441
- 4342
- 5500
- 5688
- 6361
- 8335
- 8726
- 11373

Schon 12 Stunden nach Zugabe von ^{13}C -Glycerol ließ sich bei acht Analyten eine signifikante Verschiebung des Massenschwerpunktes von Test- und Kontrollgruppe messen (siehe Tabelle 9). In unserem Modell ließ sich somit schon vor der ersten Zellteilung (Verdopplungszeit $t_v = 19,4 \pm 0,5$ h) eine Markierung der Analyten mit ^{13}C messen. Lediglich der Analyt bei 8726 m/z wies erst nach 24 Stunden eine signifikante Verschiebung des Massenschwerpunktes auf. Der Analyt bei 3441 m/z wies zu Zeitpunkt 12 Stunden eine hohe Streuung der COG Werte auf, da zu Beginn der Wachstumsphase die Analytenmenge noch gering ist und sich daher die Messung durch niedrige Intensität kompromittiert zeigte.

Trotz hoher Standardabweichung ließ sich bei dem Analyten bei 3441 m/z zum Zeitpunkt 12 Stunden eine signifikante Verschiebung des Massenschwerpunktes messen. Bei der Testgruppe konnten zu späteren Messzeitpunkten z.T. keine COG Werte detektiert werden, da die Intensitäten auch hier unter die Rauschschwelle fielen (siehe bspw. Abbildung 25 A: Analyten bei 8335 m/z zu den Zeitpunkten 144 und 168 Stunden). Grund dafür ist, dass durch kontinuierlichen ^{13}C Einbau die neugebildeten Analyten in zunehmend verschiedenen Massenzahlen auftreten, das Signal wird demnach breiter und in der Intensität flacher.

Die Differenz der Massenschwerpunkte von Test- und Kontrollgruppe (Δ COG) wurde gebildet, um Effekte auf den Massenschwerpunkt (bspw. durch Oxidation) die für Test- und Kontrollgruppe gleichermaßen auftreten, zu eliminieren. Die Δ COG-Kurve in Abbildung 19 B bis Abbildung 27 B veranschaulicht die Dynamik der Analytenneubildungsrate.

Erwartet wurde, dass sich die Δ COG-Kurve mit einer Exponentialfunktion beschreiben lässt, die sich in der stationären Phase einer Asymptote annähert, entsprechend der Wachstumsdynamik von Bakterien [98, 100, 119]. Es zeigte sich interessanterweise kein exponentieller Kurvenverlauf entsprechend der Wachstumskurve (siehe Abbildung 12), sondern vielmehr ein sigmoidaler Verlauf. Ab dem Messzeitpunkt 72 Stunden findet sich in Abbildung 19 B bis Abbildung 27 B wieder ein größerer Anstieg des m/z-Verhältnisses der Δ COG-Werte, nach einer kurzen Stagnation. Der Markierungsanteil der Analyten lässt sich somit nicht vereinfacht mit einer Exponentialfunktion beschreiben, sondern scheint wesentlich komplexer zu sein. Die Verdopplungszeit des *M. bovis* BCG zeigte sich in den ersten 24 Stunden nach Versuchsbeginn am geringsten ($t_p = 19,4 \pm 0,5$ h) und somit ist in dieser Phase auch mit der höchsten Proteinneubildungsrate zu rechnen. Grundsätzlich ist der Anteil der markierten Moleküle abhängig von dem Verhältnis der Analytenneubildungsrate und der Analytenabbaurate [119, 120]. Der Markierungsanteil hängt jedoch von mehreren Variablen ab, wie dem Isotopengehalt der Vorläufermoleküle und dem Anteil der neusynthetisierten Moleküle [120]. Eine mögliche Erklärung für den Kurvenverlauf wäre, dass mit zunehmender Markierungszeit immer mehr ‚Pools‘ mit verschiedenen Vorläufermolekülen

zu Verfügung stehen [120, 121]. Beispielsweise wäre es möglich, dass erste bereits markierte Proteine wieder zu Aminosäuren abgebaut werden und somit ein neuer ‚Pool‘ mit markierten Aminosäuren zur Verfügung steht. *Bowles et al.* zeigte außerdem das Glutamat (enthalten im M7H9-Flüssigmedium) in anfänglicher Wachstumsphase den bevorzugten Metaboliten von *M. tuberculosis* darstellt und Glycerol erst in späterer Phase vermehrt verstoffwechselt wird, was auch eine Erklärung für den verzögerten Anstieg der Δ COG-Werte sein könnte [116]. Ein weiterer Grund für den verzögerten Anstieg der Kurve könnte die Stoffwechselzeit sein, die bei *M. bovis* BCG notwendig ist, um das markierte Glycerol aufzunehmen und in die analysierten Analyten einzubauen. Diese Zeit ist jedoch unbekannt. Mithilfe von mathematischen Regressionsanalysen wäre eine Kurvenmodellierung möglich. Als Voraussetzung dafür müssten mehr Messdaten generiert werden, um die Standardabweichungen der Δ COG-Werte zu minimieren.

Mit der Beschreibung der Analytenneubildungsraten durch unser Modell wird erstmals die Schnittstelle zwischen dem Forschungsgebiet der Proteomik und der Translation geschlossen. Die Proteomik, welcher das SILAC-Modell angehört, vermag lediglich eine Quantifizierung von einzelnen Peptiden (Proteine werden vor der Messung mithilfe von Trypsin zu Peptidfragmenten verdaut) abzubilden [73, 83-85, 87, 88, 122]. Unser Modell geht weit darüber hinaus, indem durch die Analytenneubildungsraten ein Abbild der Translation mehrerer intakter Analyten dargestellt wird und somit eine Aussage über die Aktivität der zellulären Proteinbiosynthese getroffen werden kann.

4.4 Einfluss der Antibiotika Linezolid und BTZ043 auf den Bacillus Calmette-Guérin (BCG)

4.4.1 Untersuchung der Potenz der Antibiotika Linezolid und BTZ043 auf den Bacillus Calmette-Guérin (BCG)

Die Wirksamkeit der Antibiotika BTZ043 und Linezolid auf den hier verwendeten Bacillus Calmette-Guérin (*M. bovis* BCG) wurde durch Bestimmung der

Minimalen Hemmkonzentration (MIC) sowie des Reduktionsfaktors über Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (CFU) untersucht. Ziel der Untersuchungen war zum einen die Potenz der beiden Wirkstoffe zu ermitteln und darüber hinaus eine Referenzkonzentration (90 %-Hemmkonzentration, IC90) zu bestimmen, bei welcher eine definierte Reduktion des bakteriellen Wachstums zu erwarten ist.

4.4.1.1 Linezolid

Die 90 %-Hemmkonzentration (IC90) von Linezolid beträgt in dem standardisierten Versuchsaufbau 0,927 µg/ml und dient hier der Beschreibung der Minimalen Hemmkonzentration (MIC) (siehe Abbildung 13). Dies bedeutet, dass eine Linezolid Konzentration von 0,927 µg/ml benötigt wurde, um das sichtbare Wachstum des *M. bovis* BCG um 90 % zu hemmen. Dieser Wert deckt sich mit MIC Angaben der Literatur, die zwischen 0,5 bis 1,0 µg/ml für verschiedene *M. tuberculosis* H37Rv Stämme liegen [51, 52].

Die hier gemessenen IC90 erlaubt nur eine Aussage über die wachstumshemmende Potenz des Antibiotikums. Um die Potenz des Antibiotikums bezüglich der Abtötung von Bakterien zu messen, wurde der Reduktionsfaktor anhand der koloniebildenden Einheiten (CFU) bestimmt. Wobei hier zu erwähnen ist, dass *M. bovis* BCG nach Untersuchungen von *Boon und Dick et al.* unter bestimmten Bedingungen bspw. durch Sauerstoff-Limitation in einer lebensfähigen, aber nicht kultivierbare oder auch sog. dormanten Form vorliegen kann [66, 123, 124]. Der Reduktionsfaktor R beträgt $1,303 \pm 0,415$ a.u. bei der Linezolid Konzentration von 1 µg/ml, äquivalent zur Minimalen Hemmkonzentration (IC90) (siehe Abbildung 14). Dies bedeutet eine *in vitro* Reduktion der Erregerlast von 95,023 % bei der Linezolid Konzentration von 1 µg/ml.

Im menschlichen Körper wurden bei Einnahme von 600 mg Linezolid alle 12 Stunden minimale Plasmakonzentrationen von 3 – 8 µg/ml und maximale Plasmakonzentrationen von 12 – 20 µg/ml gemessen [46, 47]. Die hier gemessene IC90 liegt dementsprechend deutlich unter der Plasmakonzentration. Die Plasmakonzentration entspricht jedoch nicht der Antibiotikakonzentration im

Zielgewebe, denn diese ist abhängig von der Gewebegängigkeit und der Plasmaproteinbindung des Antibiotikums und liegt meist unter der Plasmakonzentration [125, 126]. Linezolid zeigt eine gute Gewebegängigkeit [45, 46, 49, 126]. Bei Untersuchungen des TB Erregers in abgekapselten nekrotischen Lungenläsionen zeigte sich jedoch, dass sehr hohe Linezolid Konzentration benötigt wurden, um den TB Erreger abzutöten [52, 127]. Diese wurde von *Sarathy et al.* in einem *ex vivo*-Test untersucht, welcher die Abtötungsaktivität von Antibiotika auf *M. tuberculosis* bestimmte. Dabei wurden verkäsene Läsionen von infizierten Kaninchen entnommen und mit Antibiotika versetzt. Es ergab sich eine Linezolid Konzentration von 43,18 µg/ml (casM_{90} (LZD) = 128 µM, Molekulargewicht (LZD) = 337,35 g/mol), um 90 % der Erreger abzutöten. Dies entspricht mehr als der 40-fachen Konzentration der hier bestimmten IC₉₀ Konzentration von Linezolid bei *M. bovis* BCG [45, 127].

Allerdings ist auch zu berücksichtigen, dass Linezolid bei Langzeitanwendung zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führen kann [49]. Darunter zählen Knochenmarksuppression, periphere Polyneuropathie und die Entwicklung einer Laktatazidose. Da Linezolid nicht nur die bakterielle ribosomale Proteinbiosynthese, sondern auch die mitochondrialen Ribosomen des Wirts hemmt, wurden bei langzeitiger Anwendung mit einer Linezolid-Plasmakonzentration von über 2 µg/ml vermehrt Nebenwirkungen beobachtet [49].

Die Linezolidkonzentrationen der einfachen und zweifachen IC₉₀ (1x IC₉₀(LZD) = 1 µg/ml, 2x IC₉₀(LZD) = 2 µg/ml) wurden als Referenzkonzentration gewählt für die Messung der Analytendynamik mithilfe des hier beschriebenen Modells, da diese etwas unter der minimalen Plasmakonzentration liegen und daher möglicherweise die Gewebekonzentration von Linezolid widerspiegeln.

4.4.1.2 BTZ043

Die 90 %-Hemmkonzentration IC₉₀ für BTZ043 beträgt 4,226 ng/ml (siehe Abbildung 15). Dies ist übereinstimmend mit der in der Literatur vorbeschriebenen

IC90. Die IC90 wurde von Makarov et al. mit 1 – 30 ng/ml für Bakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes angegeben, wobei für *M. tuberculosis* eine IC90 von 1ng/ml angegeben wird [42]. Der Reduktionsfaktor wurde mit $R = 1,611 \pm 0,079$ a.u. bei einer BTZ043 Konzentration von 4,226 ng/ml ermittelt (siehe *Abbildung 16*). Dies entspricht einer *in vitro* Reduktion von 97,552 %. Somit weist BTZ043 schon bei Dosierungen im Nanogramm-Bereich eine hohe *in vitro* Reduktion der Erregerlast auf. Um einen vergleichbaren Effekt zu erzielen, benötigt man bspw. von dem Erstlinienantibiotikum Isoniazid eine deutlich höhere Konzentration, da die MIC hier für *M. bovis* BCG um den Faktor 14 bis 30 größer ist (0,06-0,125 µg/ml) [128]. Auch im Vergleich zu der hier ermittelten MIC von Linezolid (0,927 µg/ml) weist BTZ043 eine höhere Wirkpotenz *in vitro* auf.

Über die Wirkung von BTZ043 *in vivo* sind aktuell jedoch noch keine Daten verfügbar, da Studien zu Nebenwirkungen und Plasmaspiegel im menschlichen Körper noch ausstehen.

4.4.2 Untersuchung der Antibiotikawirksamkeit von BTZ043 und Linezolid mithilfe des Modells zur Untersuchung der Analytendynamik des Bacillus Calmette-Guérin (BCG) nach stabiler Isotopenmarkierung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

Mithilfe des hier beschriebenen Modells wurde untersucht, ob und ab wann signifikante Änderungen der Analytenneubildungsrate von *M. bovis* BCG nach Antibiotikumzugabe messbar sind und somit eine Änderung der Analytenbiosynthese auftritt.

Durch Zugabe von jeweils den Antibiotika BTZ043 und Linezolid in den Konzentrationen der einfachen und zweifachen 90 %-Hemmkonzentration (IC90) wurde diese Fragestellung überprüft. Diese Antibiotika haben zwei völlig unterschiedliche Wirkmechanismen. BTZ043 hemmt die Zellwandsynthese, Linezolid hingegen hemmt die ribosomale Proteinbiosynthese [38, 41, 42, 45, 46, 49]. BTZ043 ist ein vielversprechender neuer Wirkstoff, welcher sich momentan in klinischen

Studien befindet [38, 43]. Linezolid hingegen ist ein bewährtes Antibiotikum zur Behandlung der multiresistenten TB (MDR-TB) [44].

In den probatorischen Untersuchungen des Analyten 5688 m/z ließ sich eine Änderung der Analytneubildungsrate feststellen (siehe Abbildung 28 B). Durch Zugabe von BTZ043 in 1x IC90 und 2x IC90 Konzentration zeigte sich nach 96-stündiger Inkubation signifikant niedrigere Δ COG-Werte (1x IC90: Mittelwert [M] 23,85; 95 % CI; 21,58 – 26,12, 2x IC90: [M] 23,69; 95 % CI; 21,69 – 25,68, ohne Antibiotikum: [M] 43,66; 95 % CI; 40,47 – 46,86). Zwischen den Konzentrationen 1x IC90 und 2x IC90 konnten visuell weder bei Linezolid noch bei BTZ043 wesentlichen Unterschiede in den Analytneubildungsraten festgestellt werden. Weitere Untersuchungen mit Konzentrationen unterhalb und oberhalb der IC90 Konzentration werden hierfür benötigt.

Aufgrund der wenigen Messdaten und der daraufhin unzureichenden Aussagekraft wurde hier auf eine statistische Auswertung aller Analyten verzichtet. Die Experimente mit Antibiotika wurden einmal (bzw. zweimal bei LZD 2x IC90) durchgeführt, somit lagen max. 9 bis 18 Einzelmessungen pro Zeitpunkt vor.

Die kompromittierte Qualität der Spektren unter Antibiotikaeinfluss, vermutlich hervorgerufen durch den erhöhten Anfall von Zelldetritus durch abgetötete bakterielle Zellen, trug darüber hinaus zu verminderter Aussagekraft der Daten bei. Wie in Tabelle 11 ersichtlich, ließen sich einige Analyten nach 96 Stunden Wachstumsdauer unter Antibiotikaeinfluss nicht mehr detektieren, was darauf hindeutet, dass diese nicht mehr neu gebildet wurden. Bei BTZ043 wiesen von den 9 Analyten noch 6 Analyten ein messbares Spektrum auf, bei Linezolid wiesen noch 2 Analyten messbare Spektren auf. Es ließen sich für manche Analyten keine oder nur sehr wenige Messwerte generieren, da die Intensitäten teilweise unter der Rauschschwelle lagen.

Vor allem bei Linezolid Zugabe konnten die Spektren teilweise nur zu anfänglichen Messzeitpunkten detektiert werden, da die Intensitäten bei späteren Messzeitpunkten ebenso unter der Rauschschwelle lagen (Daten im Anhang gezeigt), was mit hoher Wahrscheinlichkeit daran liegt, dass Linezolid die ribosomale

Proteinbiosynthese hemmt [45, 46, 49]. Das zeigt, dass bei Antibiotika, welche die Proteinbiosynthese hemmen, ein größeres Probenvolumen pro Zeitpunkt gewählt werden sollte, um durch eine gesteigerte Menge der Analyten die Spektrenqualität zu verbessern. Schlussfolgernd müsste auch bei Messungen unter hohen Antibiotikakonzentrationen (bspw. 20x IC90) größere Probenvolumen pro Zeitpunkt gewählt werden, da die Bakterien mit der Zeit durch die konzentrationsabhängige bakterizide Wirkung der Antibiotika abgetötet werden [129].

In dem hier beschriebenen auf MALDI-TOF MS basierenden Modell wird nach unserem Wissen erstmals die Untersuchung der Wirkung von Antibiotika *in vitro* auf die Neubildungsrate definierter Analyten mithilfe von MALDI-TOF Massenspektrometrie ermöglicht. Die neue Methodik erlaubt nicht nur die Betrachtung der Änderung des Gesamtspektrums (im Vergleich zur Antibiotikaresistenztestung von *Sparbier et al.* und *Jung et al.*), sondern ermöglicht eine Aussage über die dynamische Änderung der Neubildungsrate einzelner definierter Analyten im zeitlichen Verlauf. Dies ermöglicht eine genaue Betrachtung der Veränderung auf Ebene der Metaboliten in Abhängigkeit der Antibiotikakonzentration. Das hier gezeigte Modell eröffnet demnach eine neue Herangehensweise zur Optimierung der Antibiotikatherapie. Möglicherweise könnten Synergismen zwischen Antibiotika mithilfe des Modells untersucht werden, welche für eine optimierte Tuberkulosetherapie genutzt werden könnten. Wäre es möglich gezielte Kombinationen von Wirkstoffen einzusetzen, könnte die Rate der therapiebedingten Nebenwirkungen durch gezielte Dosierungen der Antibiotika möglicherweise verringert werden.

Lechartier et al. beschreibt bspw. für *M. tuberculosis* (H37Rv) einen Synergismus der Antibiotika TMC207 und BTZ043 *in vitro* bei gleichzeitiger Gabe von Konzentrationen unterhalb der minimalen Hemmkonzentration (MIC) beider Antibiotika [41]. Dabei zeigte sich, dass bei Kombination von jeweils TMC207 und BTZ043 in den Konzentrationen der $\frac{1}{4}$ MIC (TMC207: 20 ng/ml, BTZ043: 0,375 ng/ml) ein stärkerer bakterizider Effekt erzielt wurde, als bei alleiniger Zugabe von TMC207 in einfacher MIC (TMC207: 80 ng/ml). Um die Antibiotikawirkungen zu beschreiben wurden von *Lechartier et al.* die koloniebildenden Einheiten

(CFU) bestimmt [41]. Die Anwendung der neu entwickelten, auf MALDI-TOF MS basierenden Methodik eröffnet neue Möglichkeiten Synergismen zu entdecken, da sie ein Abbild der Analytенеubildungsrate auf Ebene der Translation schafft. Hiermit könnte zudem die Stoffwechselaktivität von Bakterien gemessen werden, die in einen lebensfähigen, aber nicht kultivierbaren Zustand (dormanten Zustand) versetzt wurden und dementsprechend schwerer zu therapieren sind. Sprich ein Zustand in dem die CFU nicht mehr bestimmt werden kann. Die Methodik wäre zudem deutlich schneller und effektiver, da die CFU Bestimmung einen großen Materialaufwand bedeutet und eine Wachstumszeit von insg. 27 Tage benötigt [41]. Die Versuchszeit in unserem Modell beträgt lediglich 12 Tage (7 Tage Kultivierung der Startkultur + 5 Tage Versuchsdauer) und könnte durch verkürzte Kultivierungsdauer der Startkultur auf nur 10 Tage verkürzt werden. Ziel wäre eine multidimensionale Betrachtung der Antibiotikumwirkung zu ermöglichen, bei der die Stoffwechselaktivität in den Vergleich zu der herkömmlichen Bestimmung der Hemmkonzentration mittels CFU gesetzt werden kann.

Weitere Modelle, abgesehen von der Bestimmung der CFU, versuchen die Wirkung von Antibiotika auf den TB Erreger *in vitro* zu beschreiben (siehe Kapitel 1.6.1). Wichtige Vertreter sind hier das *Hollow-Fiber-Model* (engl.), welches die Beziehung zwischen Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Antibiotika im menschlichen Körper simuliert [55, 66-70]. Der *Resazurin-Assay* nutzt hingegen einen Oxidations-Reduktionsindikator (Resazurin) zur Untersuchung der Antibiotikawirksamkeit auf Mykobakterien im dormanten Stadium [59-63]. All diese Modelle beschreiben lediglich die Antibiotikawirkung über Messung der CFU oder der MIC, sprich es wird stets das sichtbare Wachstum von Bakterien beurteilt. [59, 68]. Unser Modell ermöglicht im Vergleich dazu eine Betrachtung der Antibiotikawirkung auf Ebene der Analytенеubildungsrate und somit übertragenweise auf Ebene der Proteintranslation.

4.5 Limitationen und Ausblick

Die Tuberkulosetherapie beinhaltet aktuell eine antibiotische Therapie für mindestens vier Monate mit mehreren antibiotischen Wirkstoffen [5, 130]. Bei Vorliegen einer multiresistenten TB (MDR-TB) verlängert sich die Therapiedauer auf 9 bis 24 Monate und es bedarf der Verwendung von Zweitlinienantibiotika. Selbst bei TB Erregern ohne Antibiotikaresistenzen beträgt die Therapieerfolgsrate lediglich 85 % und bei der MDR-TB liegt die Erfolgsrate nur noch bei 57 %.

Eine der größten Herausforderungen der Tuberkulosetherapie liegt darin die Therapiedauer zu verkürzen und die Nebenwirkungen der Antibiotika so gering wie möglich zu halten, damit Therapieabbrüche bedingt durch die hohe bio-psycho-soziale Belastung der Patienten und somit die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen verhindert werden [5, 40].

Ein essentieller Schritt zur Verbesserung der Tuberkulosetherapie ist, zum einen den intrazellulären Metabolismus des TB Erregers und zum anderen die Wirkung der Antibiotika auf den TB Erreger besser zu verstehen, um die Kombinationstherapie der Antibiotika zu optimieren und die Wirkung neuer Antibiotika gegen die TB schneller beschreiben zu können.

Das hier beschreibende Modell zur Untersuchung der zeitlichen Dynamik der Analytneubildungsrate des Bacillus Calmette-Guérin (*M. bovis* BCG) könnte wesentlich dazu beitragen die Wirkungsstärke einzelner Antibiotika auf den Erreger *in vitro* zu beschreiben und darüber hinaus mögliche Synergismen zwischen Antibiotika zu nutzen. Darüber hinaus sind weitere Anwendungen denkbar: Das Ziel wäre es, eine Vielzahl von Analyten, für welche das zugehörige Protein identifiziert wurde, zu untersuchen. Damit könnte das Modell auf Mykobakterien im dormanten Stadium ausgeweitet werden, sowie resistente Erreger im Vergleich zu sensiblen Erregern betrachtet werden. Interessant wäre es auch eine Hochregulation einzelner Metaboliten im Rahmen der zellulären Abwehrmechanismen darstellbar zu machen. Dies könnte genutzt werden, um gezielte Angriffspunkte ausfindig zu machen und dadurch Synergismen von Antibiotika besser zu nutzen.

Wünschenswert wäre es eine Optimierung des Messprotokolls zu erzielen, um mehr als neun Analyten zu analysieren und dadurch eine genauere Beschreibung des bakteriellen Metabolismus des *M. bovis* BCG zu ermöglichen. Die Qualität der MALDI-TOF Spektren unter Antibiotika Einfluss könnte möglicherweise verbessert werden (durch bspw. größeres Probenvolumen pro Messzeitpunkt), um zuerst die Wirkung der einzelnen Antibiotika in verschiedenen Konzentrationen (z.B.: 0,5x IC90, 10xIC90, usw.) zu ermitteln und anschließend Kombinationen von Antibiotika zu untersuchen.

Perspektivisch wäre das Ziel, das Modell auf *M. tuberculosis* anzuwenden. Auch wenn sich gezeigt hat, dass der *M. bovis* BCG als Mitglied des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes (MTBC) die Eigenschaften des TB Erregers gut abzubilden vermag, so kann der Metabolismus des *M. tuberculosis* nicht vollkommen mithilfe eines Modellorganismus vorhergesagt werden [27, 29, 31].

Anzumerken ist abschließend, dass die Aussagekraft von *in vitro* erhobenen Daten über die Antibiotikawirksamkeit nicht ohne *in vivo* Studien über die Pharmakodynamik und Pharmakokinetik der Wirkstoffe im menschlichen Körper übertragbar sind [62, 131]. Außerdem müssen vor Anwendung neuer Therapieregime stets *in vivo* Studien zur Medikamententoxizität durchgeführt werden, da vor allem bei Kombinationstherapien mit mehreren Wirkstoffen Interaktionen der Wirkstoffe auftreten können [131].

In vitro Untersuchungen von Antibiotika bezüglich Pharmakodynamik und Pharmakokinetik sind jedoch, wie auch *in vitro* Untersuchungen der Antibiotikawirksamkeit, ein unerlässliches Element in der Entwicklung neuer Therapieregime, da sie kosteneffiziente und schnelle Ergebnisse zu Wirkstoffen liefern können. Werden durch *in vitro* Untersuchungen die Dosierungen und die Toxizität der Wirkstoffe besser abschätzbar, bevor diese in Tiermodellen und letztendlich in klinischen Studien untersucht werden, müssten weniger Tierversuche durchgeführt werden, was nicht nur große ethische, sondern auch ökonomische Vorteile bieten würde [62, 131].

Literatur

1. Spellberg, B. and B. Taylor-Blake, *On the exoneration of Dr. William H. Stewart: debunking an urban legend*. *Infect Dis Poverty*, 2013. **2**(1): p. 3.
2. Jones, K.E., et al., *Global trends in emerging infectious diseases*. *Nature*, 2008. **451**(7181): p. 990-3.
3. *Global tuberculosis report 2022*. 2022, World Health Organization: Geneva. p. 33.
4. Mathers, C., et al., *Global and Regional Causes of Death: Patterns and Trends, 2000–15*, in *Disease Control Priorities: Improving Health and Reducing Poverty*, D.T. Jamison, et al., Editors. 2017, The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank © 2018 International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank.: Washington (DC). p. 73 - 98.
5. *Global Tuberculosis Report 2020*. 2020, World Health Organization: Geneva. p. 14.
6. Frieri, M., K. Kumar, and A. Boutin, *Antibiotic resistance*. *J Infect Public Health*, 2017. **10**(4): p. 369-378.
7. Breijyeh, Z., B. Jubeh, and R. Karaman, *Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It*. *Molecules*, 2020. **25**(6).
8. Miller, S.I., *Antibiotic Resistance and Regulation of the Gram-Negative Bacterial Outer Membrane Barrier by Host Innate Immune Molecules*. *mBio*, 2016. **7**(5).
9. Lambert, P.A., *Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria*. *J Appl Microbiol*, 2002. **92 Suppl**: p. 46s-54s.
10. *Mycobacterium tuberculosis : Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit*. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 2018. **61**(1): p. 100-115.
11. Hett, E.C. and E.J. Rubin, *Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2008. **72**(1): p. 126-56, table of contents.
12. Beste, D.J., et al., *The genetic requirements for fast and slow growth in mycobacteria*. *PLoS One*, 2009. **4**(4): p. e5349.
13. Levy, L., *Studies of the mouse foot pad technique for cultivation of Mycobacterium leprae. 3. Doubling time during logarithmic multiplication*. *Lepr Rev*, 1976. **47**(2): p. 103-6.
14. Beste, D.J., et al., *Compiling a molecular inventory for Mycobacterium bovis BCG at two growth rates: evidence for growth rate-mediated*

- regulation of ribosome biosynthesis and lipid metabolism.* J Bacteriol, 2005. **187**(5): p. 1677-84.
15. *BCG vaccines: WHO position paper - February 2018.* Wkly Epidemiol Rec, 2018. **93**(8): p. 73-96.
 16. Forrellad, M.A., et al., *Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex.* Virulence, 2013. **4**(1): p. 3 f.
 17. Stephan, J., et al., *The growth rate of Mycobacterium smegmatis depends on sufficient porin-mediated influx of nutrients.* Mol Microbiol, 2005. **58**(3): p. 714-30.
 18. *Global Tuberculosis Report 2018.* 2018, World Health Organization: Geneva. p. 12-17, 23.
 19. Zhang, Y., *Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis.* Front Biosci, 2004. **9**: p. 1136-56.
 20. Lipworth, S., et al., *Defining dormancy in mycobacterial disease.* Tuberculosis (Edinb), 2016. **99**: p. 131-142.
 21. Ayrapetyan, M., T. Williams, and J.D. Oliver, *Relationship between the Viable but Nonculturable State and Antibiotic Persister Cells.* J Bacteriol, 2018. **200**(20).
 22. *Global TB partnership: The paradigm shift: the Global plan to End TB, 2016-2020.* 2015, World Health Organization: Geneva.
 23. *Moscow Declaration to End TB.* 2017, World Health Organization: Geneva. p. 5.
 24. Luca, S. and T. Mihaescu, *History of BCG Vaccine.* Maedica (Buchar), 2013. **8**(1): p. 53-8.
 25. Tuberculosis Unit, N.I.S., Public Health England. *Tuberculosis by country: rates per 100,000 people.* 2020 20.10.2020 08.04.2022]; Available from: <https://www.gov.uk/government/publications/tuberculosis-tb-by-country-rates-per-100000-people#full-publication-update-history>.
 26. Institut, R.K. *Tuberkulose-Impfung in Deutschland? Welche Möglichkeiten gibt es, wenn die Impfung für einen Auslandsaufenthalt gefordert wird?* 03.01.2018 [cited 02.10.2021]; Available from: <https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Impfen/Tuberkulose/FAQ01.html>.
 27. Mattow, J., et al., *Identification of proteins from Mycobacterium tuberculosis missing in attenuated Mycobacterium bovis BCG strains.* Electrophoresis, 2001. **22**(14): p. 2936-46.
 28. Brosch, R., et al., *A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3684-9.
 29. Mahairas, G.G., et al., *Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis.* J Bacteriol, 1996. **178**(5): p. 1274-82.

30. Junqueira-Kipnis, A.P., et al., *Mycobacteria lacking the RD1 region do not induce necrosis in the lungs of mice lacking interferon-gamma*. Immunology, 2006. **119**(2): p. 224-231.
31. *Begründungspapier zur Einstufung des Stammes Mycobacterium bovis BCG Pasteur 1173P2 in Risikogruppe 2 nach BioStoffV*. 2013, Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe ABAS.
32. *Mycobacterium tuberculosis*. 2014, Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe ABAS.
33. *TB Treatment guidelines*. 2010, Geneva: World Health Organization. p. 29 ff (5, 61, 84-86, 103-113).
34. *WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee, in WHO consolidated guidelines on tuberculosis: Module 4: Treatment - Drug-susceptible tuberculosis treatment*. 2022, World Health Organization: Geneva.
35. Njire, M., et al., *Pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis: Review and update*. Adv Med Sci, 2016. **61**(1): p. 63-71.
36. Yee, D., et al., *Incidence of serious side effects from first-line antituberculosis drugs among patients treated for active tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(11): p. 1472-7.
37. Schaberg, T., K. Rebhan, and H. Lode, *Risk factors for side-effects of isoniazid, rifampin and pyrazinamide in patients hospitalized for pulmonary tuberculosis*. Eur Respir J, 1996. **9**(10): p. 2026-30.
38. Zumla, A.I., et al., *New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects*. Lancet Infect Dis, 2014. **14**(4): p. 327-40.
39. Mdluli, K. and Z. Ma, *Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase as a target for drug discovery*. Infect Disord Drug Targets, 2007. **7**(2): p. 159-68.
40. Lange, C., et al., *Management of drug-resistant tuberculosis*. Lancet, 2019. **394**(10202): p. 953-966.
41. Lechartier, B., R.C. Hartkoorn, and S.T. Cole, *In vitro combination studies of benzothiazinone lead compound BTZ043 against Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(11): p. 5790-3.
42. Makarov, V., et al., *Benzothiazinones kill Mycobacterium tuberculosis by blocking arabinan synthesis*. Science, 2009. **324**(5928): p. 801-4.
43. *BTZ-043 - Multiple Ascending Dose (MAD) to Evaluate Safety, Tolerability and Early Bactericidal Activity (EBA)*. 25.11.2020; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04044001>.
44. Boak, L.M., et al., *Clinical population pharmacokinetics and toxicodynamics of linezolid*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(4): p. 2334-43.

45. Hashemian, S.M.R., T. Farhadi, and M. Ganjparvar, *Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care*. Drug Des Devel Ther, 2018. **12**: p. 1759-1767.
46. Roger, C., J.A. Roberts, and L. Muller, *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Oxazolidinones*. Clin Pharmacokinet, 2018. **57**(5): p. 559-575.
47. Rao, G.G., et al., *Therapeutic Drug Monitoring Can Improve Linezolid Dosing Regimens in Current Clinical Practice: A Review of Linezolid Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. Ther Drug Monit, 2020. **42**(1): p. 83-92.
48. Fortún, J., et al., *Linezolid for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis*. J Antimicrob Chemother, 2005. **56**(1): p. 180-5.
49. Song, T., et al., *Linezolid Trough Concentrations Correlate with Mitochondrial Toxicity-Related Adverse Events in the Treatment of Chronic Extensively Drug-Resistant Tuberculosis*. EBioMedicine, 2015. **2**(11): p. 1627-33.
50. Boselli, E., et al., *Pharmacokinetics and intrapulmonary concentrations of linezolid administered to critically ill patients with ventilator-associated pneumonia*. Crit Care Med, 2005. **33**(7): p. 1529-33.
51. Tato, M., et al., *In vitro activity of linezolid against Mycobacterium tuberculosis complex, including multidrug-resistant Mycobacterium bovis isolates*. Int J Antimicrob Agents, 2006. **28**(1): p. 75-8.
52. Dietze, R., et al., *Early and extended early bactericidal activity of linezolid in pulmonary tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **178**(11): p. 1180-5.
53. Wiegand, I., K. Hilpert, and R.E. Hancock, *Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances*. Nat Protoc, 2008. **3**(2): p. 163-75.
54. Mann, C.M. and J.L. Markham, *A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils*. J Appl Microbiol, 1998. **84**(4): p. 538-44.
55. Palomino, J.C., A. Martin, and F. Portaels, *Rapid drug resistance detection in Mycobacterium tuberculosis: a review of colourimetric methods*. Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(8): p. 754-62.
56. Schön, T., et al., *Antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis complex isolates - the EUCAST broth microdilution reference method for MIC determination*. Clin Microbiol Infect, 2020. **26**(11): p. 1488-1492.
57. Sieuwerts, S., et al., *A simple and fast method for determining colony forming units*. Lett Appl Microbiol, 2008. **47**(4): p. 275-8.

58. *Log and Percent Reductions in Microbiology and Antimicrobial Testing*. [cited 2022 04.01.2022]; Available from: <https://microchemlab.com/information/log-and-percent-reductions-microbiology-and-antimicrobial-testing>.
59. Blaser, J., B.B. Stone, and S.H. Zinner, *Two compartment kinetic model with multiple artificial capillary units*. J Antimicrob Chemother, 1985. **15 Suppl A**: p. 131-7.
60. Pasipanodya, J.G., et al., *Systematic Analysis of Hollow Fiber Model of Tuberculosis Experiments*. Clin Infect Dis, 2015. **61 Suppl 1**: p. S10-7.
61. Cavaleri, M. and E. Manolis, *Hollow Fiber System Model for Tuberculosis: The European Medicines Agency Experience*. Clin Infect Dis, 2015. **61 Suppl 1**: p. S1-4.
62. Srivastava, S. and T. Gumbo, *In vitro and in vivo modeling of tuberculosis drugs and its impact on optimization of doses and regimens*. Curr Pharm Des, 2011. **17**(27): p. 2881-8.
63. Gumbo, T., et al., *Selection of a moxifloxacin dose that suppresses drug resistance in Mycobacterium tuberculosis, by use of an in vitro pharmacodynamic infection model and mathematical modeling*. J Infect Dis, 2004. **190**(9): p. 1642-51.
64. Neumann, A.C., et al., *Identifying Dormant Growth State of Mycobacteria by Orthogonal Analytical Approaches on a Single Cell and Ensemble Basis*. Anal Chem, 2019. **91**(1): p. 881-887.
65. Gomez, J.E. and J.D. McKinney, *M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance*. Tuberculosis (Edinb), 2004. **84**(1-2): p. 29-44.
66. Taneja, N.K. and J.S. Tyagi, *Resazurin reduction assays for screening of anti-tubercular compounds against dormant and actively growing Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis BCG and Mycobacterium smegmatis*. J Antimicrob Chemother, 2007. **60**(2): p. 288-93.
67. Coban, A.Y., et al., *Resazurin microtiter assay for isoniazid, rifampicin, ethambutol and streptomycin resistance detection in Mycobacterium tuberculosis: Updated meta-analysis*. Int J Mycobacteriol, 2014. **3**(4): p. 230-41.
68. Palomino, J.C., et al., *Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(8): p. 2720-2.
69. Rakhmawatie, M.D., et al., *Evaluation of crystal violet decolorization assay and resazurin microplate assay for antimycobacterial screening*. Heliyon, 2019. **5**(8): p. e02263.
70. Yajko, D.M., et al., *Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(9): p. 2324-7.

71. Pennington, S.R., et al., *Proteome analysis: from protein characterization to biological function*. Trends Cell Biol, 1997. **7**(4): p. 168-73.
72. Hanash, S., *Disease proteomics*. Nature, 2003. **422**(6928): p. 226-32.
73. Ong, S.E. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative*. Nat Chem Biol, 2005. **1**(5): p. 252-62.
74. Oda, Y., et al., *Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 6591-6.
75. Gygi, S.P., et al., *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(10): p. 994-9.
76. Bantscheff, M., et al., *Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review*. Anal Bioanal Chem, 2007. **389**(4): p. 1017-31.
77. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics*. Nature, 2003. **422**(6928): p. 198-207.
78. Cao, Y., et al., *Accuracy of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Mycobacteria: a systematic review and meta-analysis*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 4131.
79. Cohen, S.L. and B.T. Chait, *Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins*. Anal Chem, 1996. **68**(1): p. 31-7.
80. Hillenkamp, F. and M. Karas, *Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization*. Methods Enzymol, 1990. **193**: p. 280-95.
81. Karas, M., M. Glückmann, and J. Schäfer, *Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors*. J Mass Spectrom, 2000. **35**(1): p. 1-12.
82. Szájli, E., T. Fehér, and K.F. Medzihradsky, *Investigating the quantitative nature of MALDI-TOF MS*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(12): p. 2410-8.
83. Andersen, J.S., et al., *Nucleolar proteome dynamics*. Nature, 2005. **433**(7021): p. 77-83.
84. Mann, M., *Functional and quantitative proteomics using SILAC*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(12): p. 952-8.
85. Chen, X., et al., *Quantitative proteomics using SILAC: Principles, applications, and developments*. Proteomics, 2015. **15**(18): p. 3175-92.
86. Calder, B., et al., *Mass Spectrometry Offers Insight into the Role of Ser/Thr/Tyr Phosphorylation in the Mycobacteria*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 141.
87. Blagoev, B., et al., *Temporal analysis of phosphotyrosine-dependent signaling networks by quantitative proteomics*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(9): p. 1139-45.

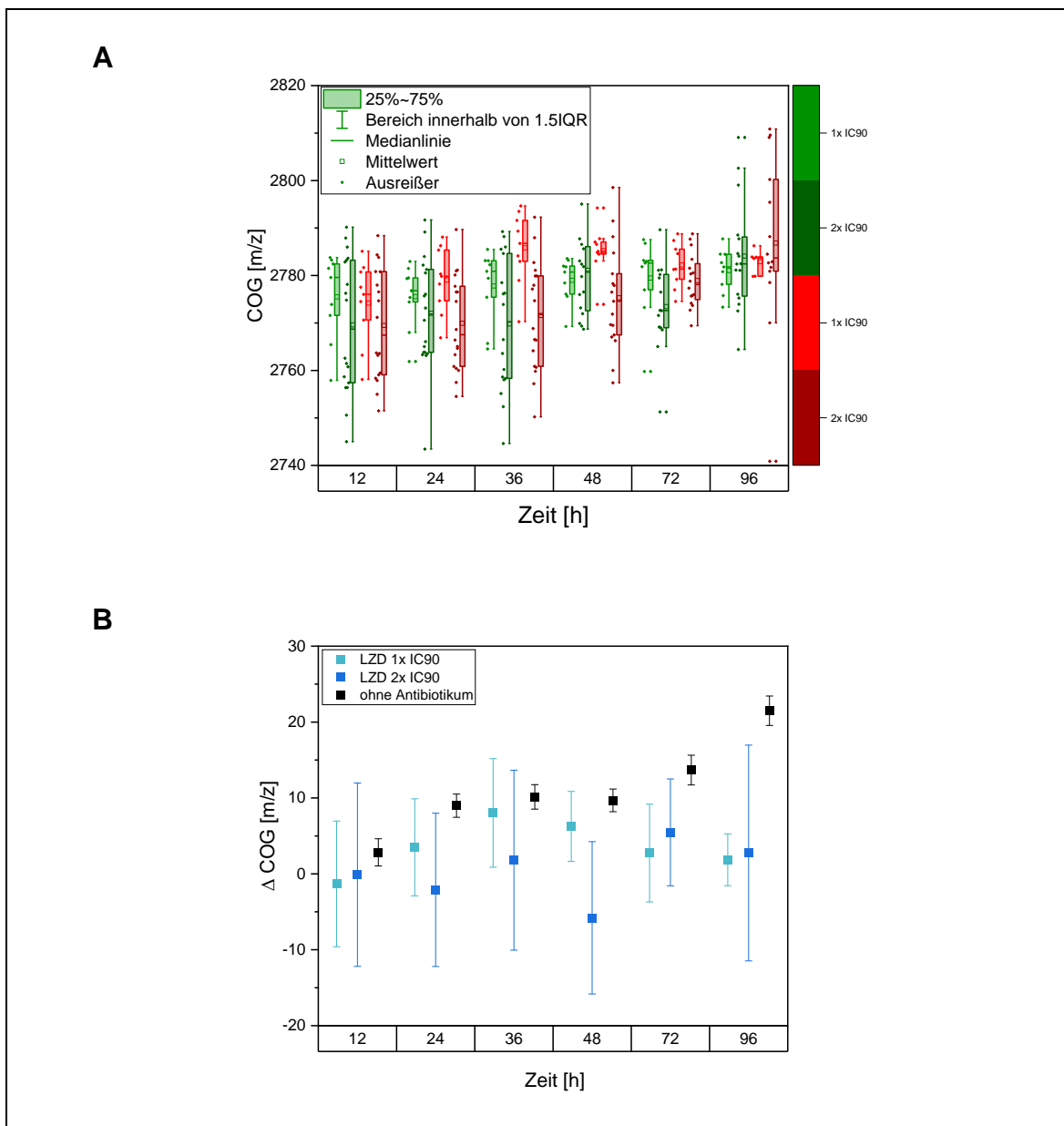
88. Doherty, M.K., et al., *Turnover of the human proteome: determination of protein intracellular stability by dynamic SILAC*. J Proteome Res, 2009. **8**(1): p. 104-12.
89. Sparbier, K., et al., *MALDI biotyper-based rapid resistance detection by stable-isotope labeling*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(11): p. 3741-8.
90. Jung, J.S., et al., *Rapid detection of antibiotic resistance based on mass spectrometry and stable isotopes*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014. **33**(6): p. 949-55.
91. Demirev, P.A., et al., *Establishing drug resistance in microorganisms by mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 2013. **24**(8): p. 1194-201.
92. Carbonnelle, E., et al., *MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory*. Clin Biochem, 2011. **44**(1): p. 104-9.
93. Claydon, M.A., et al., *The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry*. Nat Biotechnol, 1996. **14**(11): p. 1584-6.
94. Talbot, E.A., D.L. Williams, and R. Frothingham, *PCR identification of Mycobacterium bovis BCG*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(3): p. 566-9.
95. Neumann-Cip, A.C., et al., *A Novel Rapid Sample Preparation Method for MALDI-TOF MS Permits Borrelia burgdorferi Sensu Lato Species and Isolate Differentiation*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 690.
96. Dahl, J.L., *Scanning electron microscopy analysis of aged Mycobacterium tuberculosis cells*. Can J Microbiol, 2005. **51**(3): p. 277-81.
97. Ramakrishnan, T., P.S. Murthy, and K.P. Gopinathan, *Intermediary metabolism of mycobacteria*. Bacteriol Rev, 1972. **36**(1): p. 65-108.
98. McKellar, R.C., *A heterogeneous population model for the analysis of bacterial growth kinetics*. Int J Food Microbiol, 1997. **36**(2-3): p. 179-86.
99. Gibson, A.M., N. Bratchell, and T.A. Roberts, *Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature*. Int J Food Microbiol, 1988. **6**(2): p. 155-78.
100. Ross, T. and T.A. McMeekin, *Predictive microbiology*. Int J Food Microbiol, 1994. **23**(3-4): p. 241-64.
101. Pym, A.S., et al., *Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines Mycobacterium bovis BCG and Mycobacterium microti*. Mol Microbiol, 2002. **46**(3): p. 709-17.
102. Flint, J.L., et al., *The RD1 virulence locus of Mycobacterium tuberculosis regulates DNA transfer in Mycobacterium smegmatis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(34): p. 12598-603.
103. Daugelat, S., et al., *The RD1 proteins of Mycobacterium tuberculosis: expression in Mycobacterium smegmatis and biochemical characterization*. Microbes Infect, 2003. **5**(12): p. 1082-95.

104. Markova, N., G. Slavchev, and L. Michailova, *Filterable forms and L-forms of Mycobacterium bovis BCG: impact for live vaccine features*. Hum Vaccin Immunother, 2012. **8**(6): p. 759-64.
105. Naka, T., et al., *Lipid phenotype of two distinct subpopulations of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin Tokyo 172 substrain*. J Biol Chem, 2011. **286**(51): p. 44153-44161.
106. Rosaspina, S., G. Salvatorelli, and D. Anzanel, *The bactericidal effect of microwaves on Mycobacterium bovis dried on scalpel blades*. J Hosp Infect, 1994. **26**(1): p. 45-50.
107. Allan, E.J., C. Hoischen, and J. Gumpert, *Bacterial L-forms*. Adv Appl Microbiol, 2009. **68**: p. 1-39.
108. Sykes, J., *Cell Wall-Deficient Bacterial Infections*. Canine and Feline Infectious Diseases, 2013. **33**: p. 380.
109. Takayama, K., L. Wang, and R.S. Merkal, *Scanning electron microscopy of the H37Ra strain of Mycobacterium tuberculosis exposed to isoniazid*. Antimicrob Agents Chemother, 1973. **4**(1): p. 62-5.
110. Devadoss, P., M.E. Klegerman, and M.J. Groves, *Surface morphology of Mycobacterium bovis BCG: relation to mechanisms of cellular aggregation*. Microbios, 1991. **65**(263): p. 111-25.
111. Kalab, M., A.-F. Yang, and D. Chabot, *Conventional Scanning Electron Microscopy of Bacteria*. infocus Magazine, 2008. **2008**: p. 42-61.
112. Wiechert, W., *¹³C metabolic flux analysis*. Metab Eng, 2001. **3**(3): p. 195-206.
113. Niederweis, M., *Nutrient acquisition by mycobacteria*. Microbiology (Reading), 2008. **154**(Pt 3): p. 679-692.
114. Paula, S., et al., *Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness*. Biophys J, 1996. **70**(1): p. 339-48.
115. Lyon, R.H., H.C. Lichstein, and W.H. Hall, *Factors affecting the growth of Mycobacterium tuberculosis in aerobic and stationary cultures*. Am Rev Respir Dis, 1961. **83**: p. 255-60.
116. Bowles, J.A. and W. Segal, *Kinetics of Utilization of Organic Compounds in the Growth of Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 1965. **90**(1): p. 157-63.
117. López-Agudelo, V.A., et al., *A systematic evaluation of Mycobacterium tuberculosis Genome-Scale Metabolic Networks*. PLoS Comput Biol, 2020. **16**(6): p. e1007533.
118. Larrouy-Maumus, G., et al., *Discovery of a glycerol 3-phosphate phosphatase reveals glycerophospholipid polar head recycling in Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(28): p. 11320-5.

119. Holmes, W.E., et al., *Dynamic Proteomics: In Vivo Proteome-Wide Measurement of Protein Kinetics Using Metabolic Labeling*. Methods Enzymol, 2015. **561**: p. 219-76.
120. Hellerstein, M.K. and R.A. Neese, *Mass isotopomer distribution analysis: a technique for measuring biosynthesis and turnover of polymers*. Am J Physiol, 1992. **263**(5 Pt 1): p. E988-1001.
121. Slevin, K. and J. Waterlow, *Theoretical analysis of the importance of recycling in measurements of protein turnover by constant infusion of a labelled amino acid*. J Theor Biol, 2008. **253**(1): p. 215-9.
122. Ong, S.E. and M. Mann, *A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 2650-60.
123. Oliver, J.D., *Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria*. FEMS Microbiol Rev, 2010. **34**(4): p. 415-25.
124. Boon, C. and T. Dick, *Mycobacterium bovis BCG response regulator essential for hypoxic dormancy*. J Bacteriol, 2002. **184**(24): p. 6760-7.
125. Nix, D.E., et al., *Antibiotic tissue penetration and its relevance: models of tissue penetration and their meaning*. Antimicrob Agents Chemother, 1991. **35**(10): p. 1947-52.
126. Gee, T., et al., *Pharmacokinetics and tissue penetration of linezolid following multiple oral doses*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(6): p. 1843-6.
127. Sarathy, J.P., et al., *Extreme Drug Tolerance of Mycobacterium tuberculosis in Caseum*. Antimicrob Agents Chemother, 2018. **62**(2).
128. Shishido, Y., et al., *Anti-tuberculosis drug susceptibility testing of Mycobacterium bovis BCG Tokyo strain*. Int J Tuberc Lung Dis, 2007. **11**(12): p. 1334-8.
129. Pankey, G.A. and L.D. Sabath, *Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections*. Clin Infect Dis, 2004. **38**(6): p. 864-70.
130. *WHO TB Treatment guidelines*. 2010, World Health Organization: Geneva.
131. Gunderson, B.W., et al., *What do we really know about antibiotic pharmacodynamics?* Pharmacotherapy, 2001. **21**(11 Pt 2): p. 302s-318s.

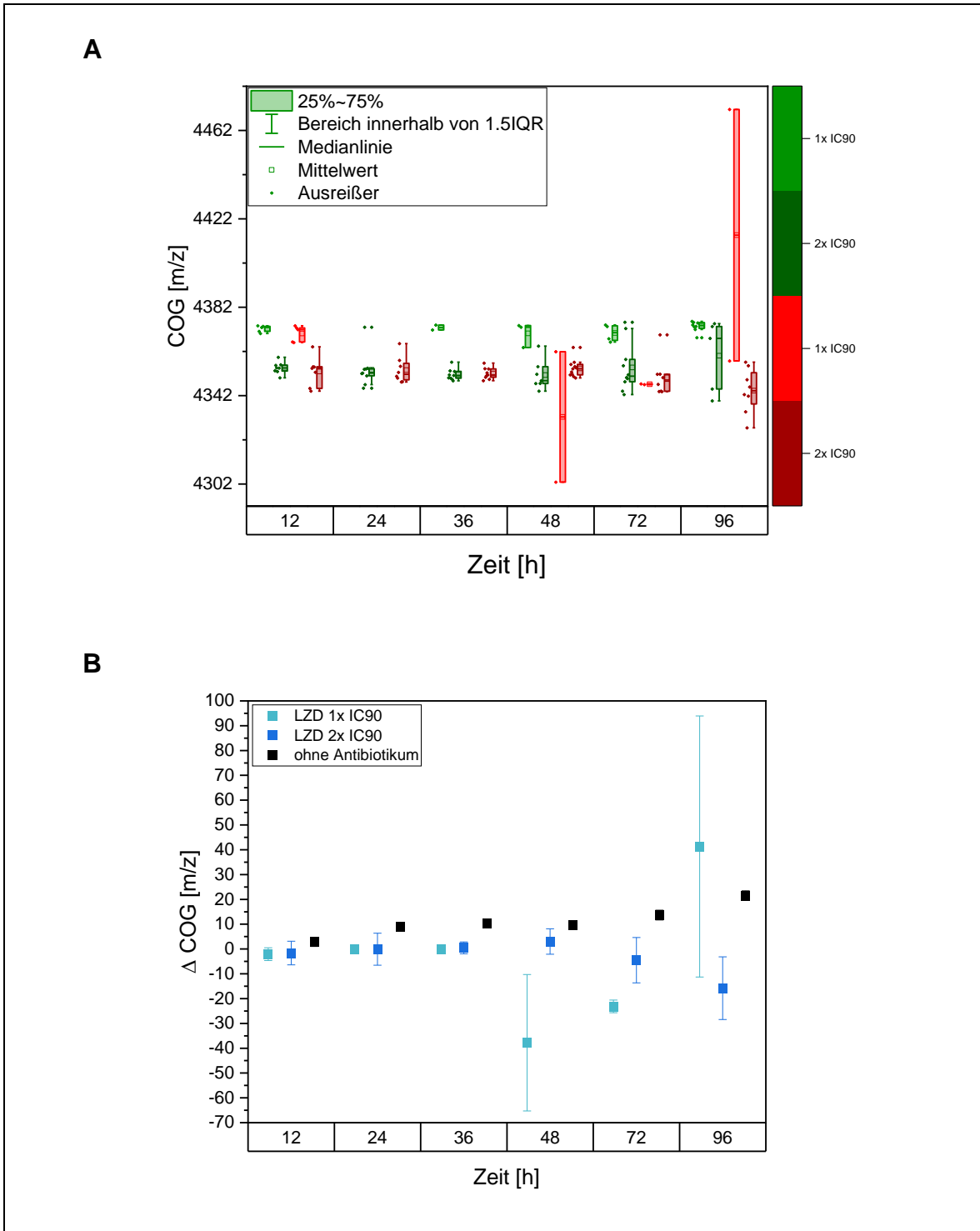
Anhang

I. Beeinflussung der Analytendynamik durch das Antibiotikum Linezolid



Analyt bei 2740 m/z des *M. bovis* BCG im Zeitraum von 12 bis 96 Stunden

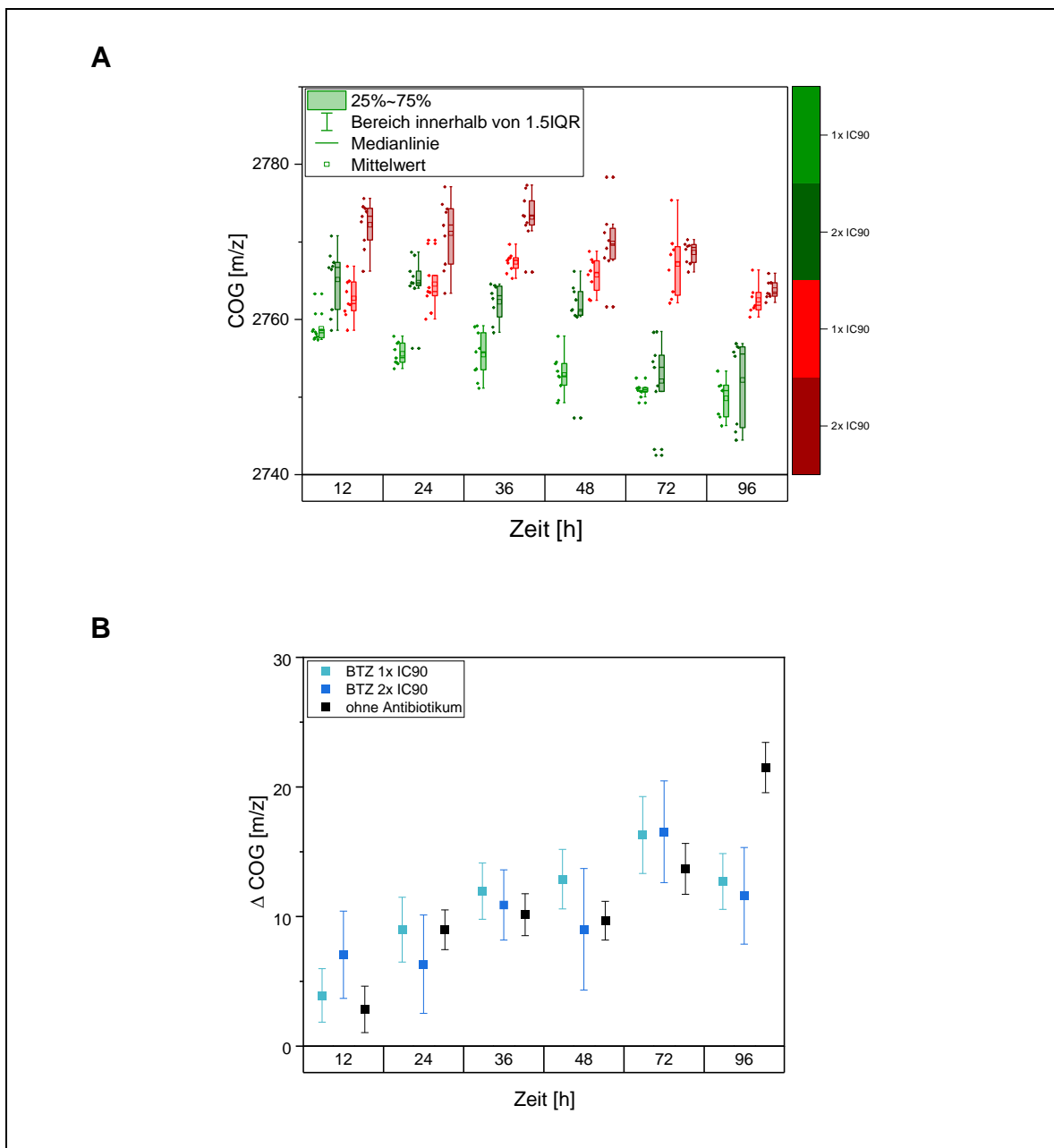
A: Boxdiagramm der COG von Kontrollgruppe (KG, grün) und Testgruppe (TG, rot) in jeweils den Linezolid-Konzentrationen 1x IC90 und 2x IC90 mit Darstellung der einzelnen Messpunkte (links neben der Box) und Auftragung des 1,5-fachen Interquartilabstandes (IQR). Zeitpunkte sind aufgrund besserer Darstellbarkeit als Kategorien mit gleichem Abstand aufgetragen. (9 Messpunkte pro Zeitpunkt) B: Graphische Darstellung der Δ COG unter Einwirkung von Linezolid (in Konzentrationen von 1x und 2x IC90) im Vergleich zu den Δ COG ohne Einfluss von Antibiotikum. Auftragung mit 95 %-Konfidenzintervall (Fehlerbalken) und Darstellung der Zeitpunkte auf der x-Achse in linearer Skalierung.



Analyt bei 4342 m/z des *M. bovis* BCG im Zeitraum von 12 bis 96 Stunden

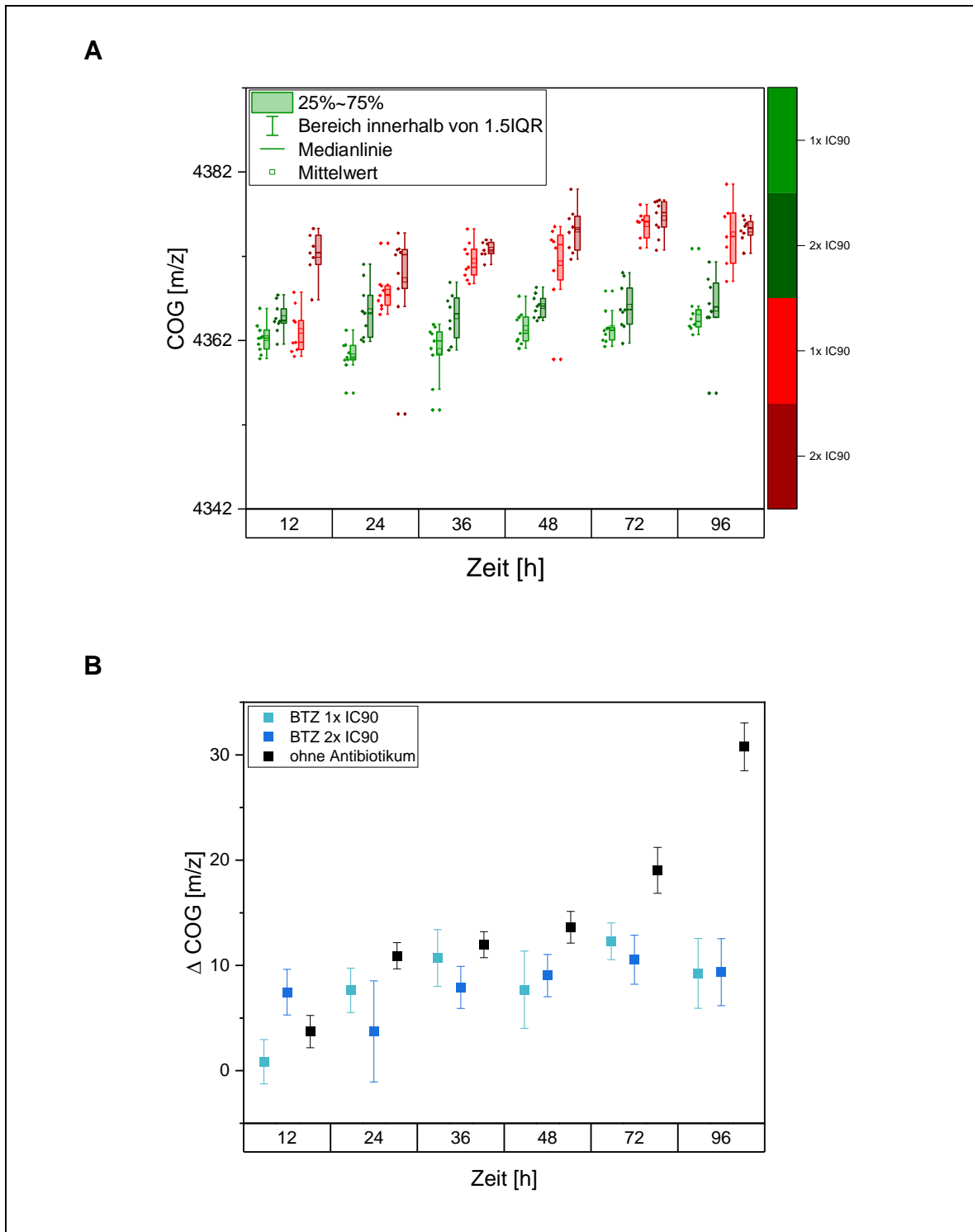
A: Boxdiagramm der COG von Kontrollgruppe (KG, grün) und Testgruppe (TG, rot) in jeweils den Linezolid-Konzentrationen 1x IC90 und 2x IC90 mit Darstellung der einzelnen Messpunkte (links neben der Box) und Auftragung des 1,5-fachen Interquartilabstandes (IQR). Zeitpunkte sind aufgrund besserer Darstellbarkeit als Kategorien mit gleichem Abstand aufgetragen. (9 Messpunkte pro Zeitpunkt) B: Graphische Darstellung der Δ COG unter Einwirkung von Linezolid (in Konzentrationen von 1x und 2x IC90) im Vergleich zu den Δ COG ohne Einfluss von Antibiotikum. Auftragung mit 95 %-Konfidenzintervall (Fehlerbalken) und Darstellung der Zeitpunkte auf der x-Achse in linearer Skalierung.

II. Beeinflussung der Analytendynamik durch das Antibiotikum BTZ043



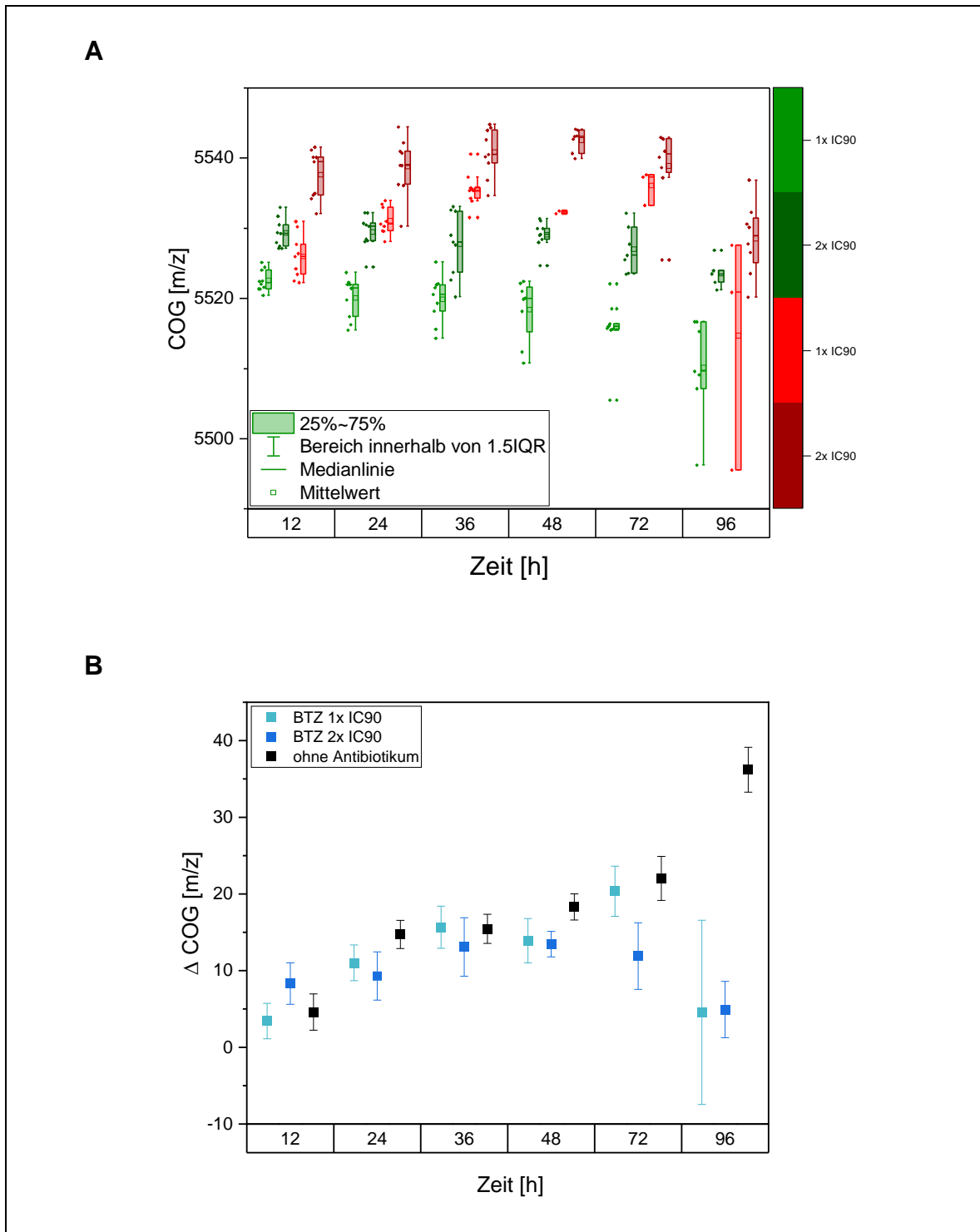
Analyt bei 2740 m/z des *M. bovis* BCG im Zeitraum von 12 bis 96 Stunden

A: Boxdiagramm der COG von Kontrollgruppe (KG, grün) und Testgruppe (TG, rot) in jeweils den BTZ043-Konzentrationen 1x IC90 und 2x IC90 mit Darstellung der einzelnen Messpunkte (links neben der Box) und Auftragung des 1,5-fachen Interquartilabstandes (IQR). Zeitpunkte sind aufgrund besserer Darstellbarkeit als Kategorien mit gleichem Abstand aufgetragen. (9 Messpunkte pro Zeitpunkt) B: Graphische Darstellung der Δ COG unter Einwirkung von BTZ043 (in Konzentrationen von 1x und 2x IC90) im Vergleich zu den Δ COG ohne Einfluss von Antibiotikum. Auftragung mit 95 %-Konfidenzintervall (Fehlerbalken) und Darstellung der Zeitpunkte auf der x-Achse in linearer Skalierung.



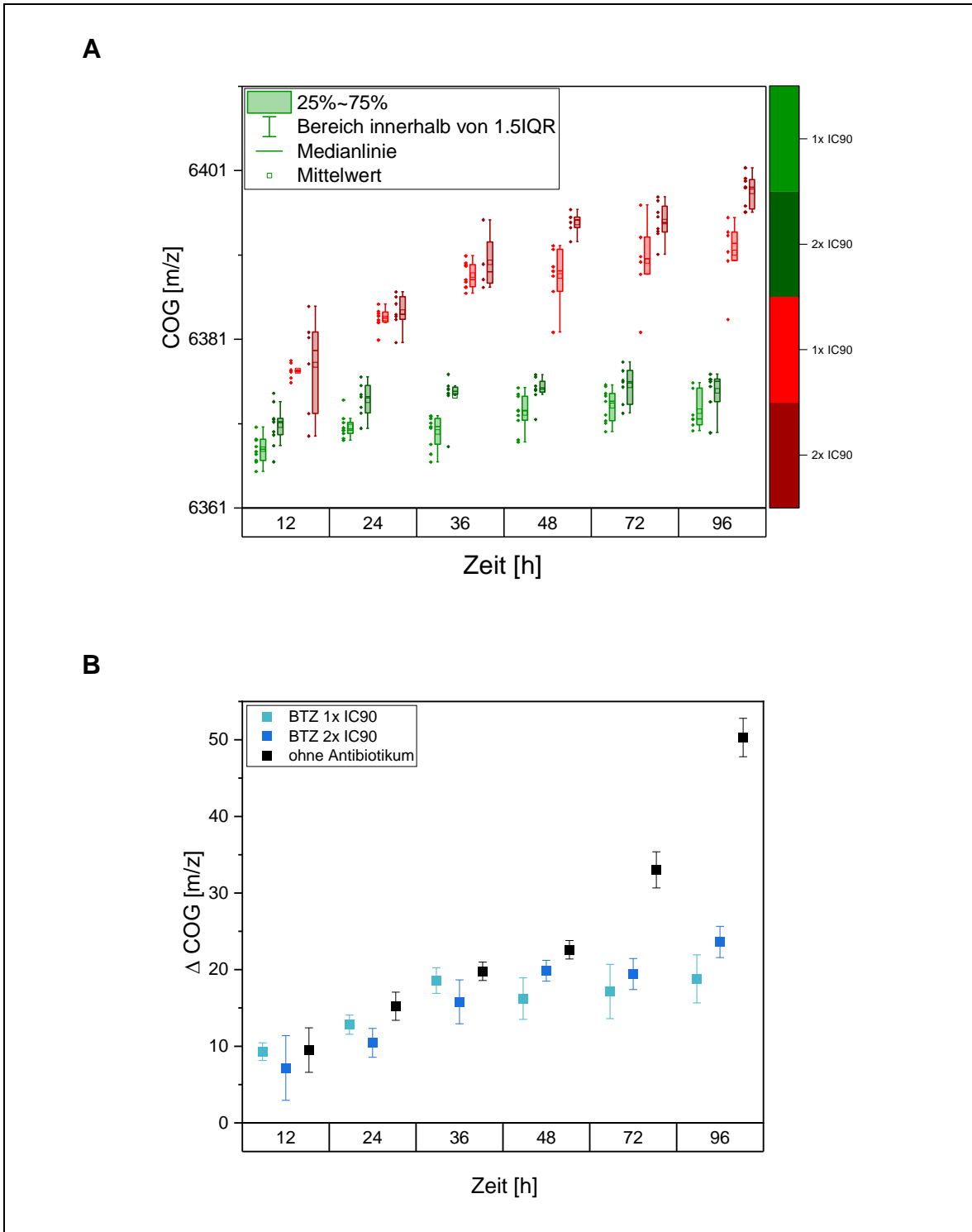
Analyt bei 4342 m/z des *M. bovis* BCG im Zeitraum von 12 bis 96 Stunden

A: Boxdiagramm der COG von Kontrollgruppe (KG, grün) und Testgruppe (TG, rot) in jeweils den BTZ043-Konzentrationen 1x IC90 und 2x IC90 mit Darstellung der einzelnen Messpunkte (links neben der Box) und Auftragung des 1,5-fachen Interquartilabstandes (IQR). Zeitpunkte sind aufgrund besserer Darstellbarkeit als Kategorien mit gleichem Abstand aufgetragen. (9 Messpunkte pro Zeitpunkt) B: Graphische Darstellung der Δ COG unter Einwirkung von BTZ043 (in Konzentrationen von 1x und 2x IC90) im Vergleich zu den Δ COG ohne Einfluss von Antibiotikum. Auftragung mit 95 %-Konfidenzintervall (Fehlerbalken) und Darstellung der Zeitpunkte auf der x-Achse in linearer Skalierung.



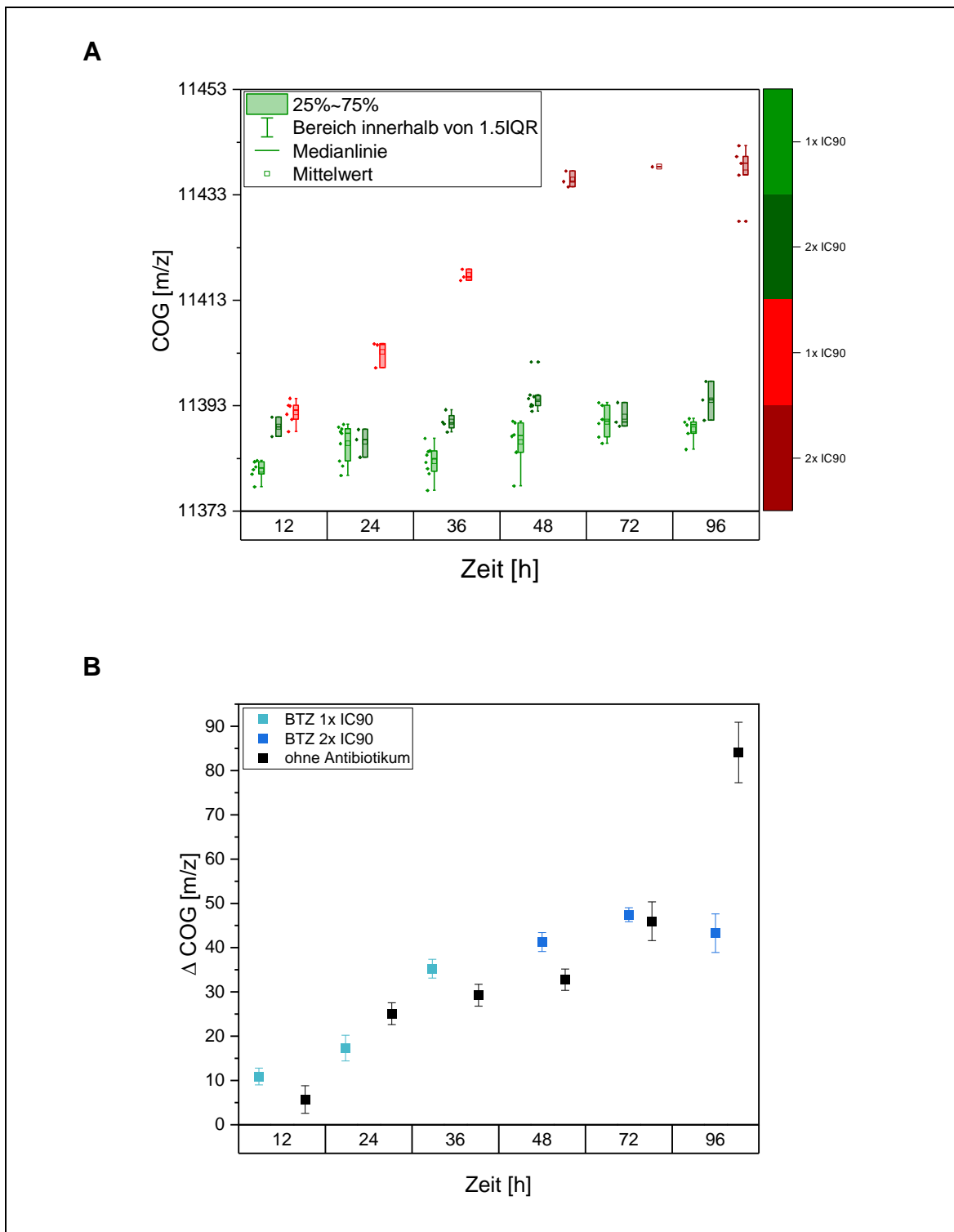
Analyt bei 5500 m/z des *M. bovis* BCG im Zeitraum von 12 bis 96 Stunden

A: Boxdiagramm der COG von Kontrollgruppe (KG, grün) und Testgruppe (TG, rot) in jeweils den BTZ043-Konzentrationen 1x IC90 und 2x IC90 mit Darstellung der einzelnen Messpunkte (links neben der Box) und Auftragung des 1,5-fachen Interquartilabstandes (IQR). Zeitpunkte sind aufgrund besserer Darstellbarkeit als Kategorien mit gleichem Abstand aufgetragen. (9 Messpunkte pro Zeitpunkt) B: Graphische Darstellung der Δ COG unter Einwirkung von BTZ043 (in Konzentrationen von 1x und 2x IC90) im Vergleich zu den Δ COG ohne Einfluss von Antibiotikum. Auftragung mit 95 %-Konfidenzintervall (Fehlerbalken) und Darstellung der Zeitpunkte auf der x-Achse in linearer Skalierung.



Analyt bei 6361 m/z des *M. bovis* BCG im Zeitraum von 12 bis 96 Stunden

A: Boxdiagramm der COG von Kontrollgruppe (KG, grün) und Testgruppe (TG, rot) in jeweils den BTZ043-Konzentrationen 1x IC90 und 2x IC90 mit Darstellung der einzelnen Messpunkte (links neben der Box) und Auftragung des 1,5-fachen Interquartilabstandes (IQR). Zeitpunkte sind aufgrund besserer Darstellbarkeit als Kategorien mit gleichem Abstand aufgetragen. (9 Messpunkte pro Zeitpunkt) B: Graphische Darstellung der Δ COG unter Einwirkung von BTZ043 (in Konzentrationen von 1x und 2x IC90) im Vergleich zu den Δ COG ohne Einfluss von Antibiotikum. Auftragung mit 95 %-Konfidenzintervall (Fehlerbalken) und Darstellung der Zeitpunkte auf der x-Achse in linearer Skalierung.



Analyt bei 11373 m/z des *M. bovis* BCG im Zeitraum von 12 bis 96 Stunden

A: Boxdiagramm der COG von Kontrollgruppe (KG, grün) und Testgruppe (TG, rot) in jeweils den BTZ043-Konzentrationen 1x IC90 und 2x IC90 mit Darstellung der einzelnen Messpunkte (links neben der Box) und Auftragung des 1,5-fachen Interquartilabstandes (IQR). Zeitpunkte sind aufgrund besserer Darstellbarkeit als Kategorien mit gleichem Abstand aufgetragen. (9 Messpunkte pro Zeitpunkt) B: Graphische Darstellung des Δ COG unter Einwirkung von BTZ043 (in Konzentrationen von 1x und 2x IC90) im Vergleich zu den Δ COG ohne Einfluss von Antibiotikum. Auftragung mit 95 %-Konfidenzintervall (Fehlerbalken) und Darstellung der Zeitpunkte auf der x-Achse in linearer Skalierung.

III. Webquellen Screenshots

Quelle [25]: Tuberculosis Unit, N.I.S., Public Health England. *Tuberculosis by country: rates per 100,000 people*. 2020 20.10.2020 08.04.2022]; Available from: <https://www.gov.uk/government/publications/tuberculosis-tb-by-country-rates-per-100000-people#full-publication-update-history>.



[Home](#) > [Health and social care](#) > [Public health](#) > [Health protection](#) > [Health surveillance and reporting programmes](#)

Research and analysis


Tuberculosis by country: rates per 100,000 people

Estimated rate of tuberculosis (TB) per 100,000 people, compiled from World Health Organization (WHO) data for each country.

From: [Public Health England](#)

Published 1 January 2013

Last updated 20 October 2020 — [See all updates](#)

 [Get emails about this page](#)

Documents



[Tuberculosis rates by country in 2019 \(worldwide table\)](#)

ODS, 42.4 KB

This file is in an [OpenDocument](#) format

This file may not be suitable for users of assistive technology.

▶ [Request an accessible format.](#)



[Tuberculosis rates by country in 2019 \(worldwide table\)](#)

MS Excel Spreadsheet, 56.2 KB

This file may not be suitable for users of assistive technology.

▶ [Request an accessible format.](#)

Related content

[Tuberculosis: the green book, chapter 32](#)

[BCG vaccination programme](#)

[BCG immunisation programme: changes from September 2021 letter](#)

[Tuberculosis \(TB\): diagnosis, screening, management and data](#)

[Tuberculosis in England: annual report](#)

Collection

[Tuberculosis \(TB\): diagnosis, screening, management and data](#)

Tuberculosis_rates_by_country_in_2019_worldwide_table

Start Einfügen Seitenlayout Formeln Daten Überprüfen Ansicht

Calibri 11 A A

Einfügen F K U Textumbruch Standard

Verbinden und zentrieren % 000 .00

A1

Public Health England					
Table 1: High incidence countries (estimated incidence rate of 40 per 100,000 or greater)					
Country/Territory	WHO Region	Estimated rate per 100,000 population	Number of cases	Rate >150 per 100,000	
Afghanistan	Eastern Mediterranean	189	72.000	✓	
Algeria	Africa	61	26.000		
Angola	Africa	351	112.000	✓	
Azerbaijan	Europe	60	6.000		
Bangladesh	South-East Asia	221	361.000	✓	
Benin	Africa	55	6.000		
Bhutan	South-East Asia	165	1.300	✓	
Bolivia (Plurinational State of)	The Americas	106	12.000		
Botswana	Africa	253	5.800	✓	
Brazil	The Americas	46	96.000		
Brunei Darussalam	Western Pacific	64	280		
Burkina Faso	Africa	47	9.600		
Burundi	Africa	107	12.000		
Cabo Verde	Africa	46	250		
Cambodia	Western Pacific	287	47.000	✓	
Cameroon	Africa	179	46.000	✓	
Central African Republic	Africa	540	26.000	✓	
Chad	Africa	142	23.000		
China	Western Pacific	58	833.000		
China, Hong Kong SAR	Western Pacific	63	4.700		
China, Macao SAR	Western Pacific	65	420		
Congo	Africa	373	20.000	✓	
Côte d'Ivoire	Africa	137	35.000		
Democratic People's Republic of Korea	South-East Asia	513	132.000	✓	
Democratic Republic of the Congo	Africa	320	278.000	✓	
Djibouti	Eastern Mediterranean	234	2.300	✓	
Dominican Republic	The Americas	42	4.500		
Ecuador	The Americas	46	7.900		
El Salvador	The Americas	58	3.800		

Anhang

Tuberculosis_rates_by_country_in_2019_worldwide_table

Start Einfügen Seitenlayout Formeln Daten Überprüfen Ansicht

Calibri 11 A A

Einfügen F K U

Textumbruch Standard

Verbinden und zentrieren % 000 .00 .0

	A	B	C	D	E	F	G
32		El Salvador		The Americas	58	3.800	
33		Equatorial Guinea		Africa	181	2.500	✓
34		Eritrea		Africa	86	3.000	
35		Eswatini		Africa	363	4.200	✓
36		Ethiopia		Africa	140	157.000	
37		Fiji		Western Pacific	66	590	
38		Gabon		Africa	521	11.000	✓
39		Gambia		Africa	158	3.700	✓
40		Georgia		Europe	74	3.000	
41		Ghana		Africa	144	44.000	
42		Greenland		Europe	128	72	
43		Guam		Western Pacific	54	91	
44		Guinea		Africa	176	22.000	✓
45		Guinea-Bissau		Africa	361	6.900	✓
46		Guyana		The Americas	79	620	
47		Haiti		The Americas	170	19.000	✓
48		India		South-East Asia	193	2.640.000	✓
49		Indonesia		South-East Asia	312	845.000	✓
50		Iraq		Eastern Mediterranean	41	16.000	
51		Kazakhstan		Europe	68	13.000	
52		Kenya		Africa	267	140.000	✓
53		Kiribati		Western Pacific	436	510	✓
54		Kyrgyzstan		Europe	110	7.100	
55		Lao People's Democratic Republic		Western Pacific	155	11.000	✓
56		Lesotho		Africa	654	14.000	✓
57		Liberia		Africa	308	15.000	✓
58		Libya		Eastern Mediterranean	59	4.000	
59		Lithuania		Europe	42	1.200	
60		Madagascar		Africa	233	63.000	✓
61		Malawi		Africa	146	27.000	
62		Malaysia		Western Pacific	92	29.000	
63		Mali		Africa	52	10.000	
64		Marshall Islands		Western Pacific	483	280	✓
65		Mauritania		Africa	89	4.000	
66		Micronesia (Federated States of)		Western Pacific	100	110	
67		Mongolia		Western Pacific	428	14.000	✓
68		Morocco		Eastern Mediterranean	97	35.000	

Anhang

Tuberculosis_rates_by_country_in_2019_worldwide_table

Start Einfügen Seitenlayout Formeln Daten Überprüfen Ansicht

Calibri 11 A A

Einfügen F K U

Textumbruch Standard

Verbinden und zentrieren % 000 .0 .00

	A	B	C	D	E	F	G
69		Mozambique		Africa	361	110.000	✓
70		Myanmar		South-East Asia	322	174.000	✓
71		Namibia		Africa	486	12.000	✓
72		Nauru		Western Pacific	182	20	✓
73		Nepal		South-East Asia	238	68.000	✓
74		Nicaragua		The Americas	43	2.800	
75		Niger		Africa	84	20.000	
76		Nigeria		Africa	219	440.000	✓
77		Northern Mariana Islands		Western Pacific	103	59	
78		Pakistan		Eastern Mediterranean	263	570.000	✓
79		Papua New Guinea		Western Pacific	432	38.000	✓
80		Paraguay		The Americas	46	3.300	
81		Peru		The Americas	119	39.000	
82		Philippines		Western Pacific	554	599.000	✓
83		Republic of Korea		Western Pacific	59	30.000	
84		Republic of Moldova		Europe	80	3.200	
85		Romania		Europe	66	13.000	
86		Russian Federation		Europe	50	73.000	
87		Rwanda		Africa	57	7.200	
88		Sao Tome and Principe		Africa	114	250	
89		Senegal		Africa	117	19.000	
90		Sierra Leone		Africa	295	23.000	✓
91		Singapore		Western Pacific	41	2.400	
92		Solomon Islands		Western Pacific	66	440	
93		Somalia		Eastern Mediterranean	258	40.000	✓
94		South Africa		Africa	615	360.000	✓
95		South Sudan		Africa	227	25.000	✓
96		Sri Lanka		South-East Asia	64	14.000	
97		Sudan		Eastern Mediterranean	67	29.000	
98		Tajikistan		Europe	83	7.700	
99		Thailand		South-East Asia	150	105.000	✓
100		Timor-Leste		South-East Asia	498	6.400	✓
101		Turkmenistan		Europe	45	2.600	
102		Tuvalu		Western Pacific	296	34	✓
103		Uganda		Africa	200	88.000	✓
104		Ukraine		Europe	77	34.000	
105		United Republic of Tanzania		Africa	237	137.000	✓

Tuberculosis_rates_by_country_in_2019_worldwide_table

Start Einfügen Seitenlayout Formeln Daten Überprüfen Ansicht

Calibri 11 A A

Einfügen F K U

Textumbruch Standard

Verbinden und zentrieren % 000 .0 .00

	A	B	C	D	E	F	G	
106		Uzbekistan		Europe	67	22.000		
107		Vanuatu		Western Pacific	41	120		
108		Venezuela (Bolivarian Republic of)		The Americas	45	13.000		
109		Viet Nam		Western Pacific	176	170.000	✓	
110		Yemen		Eastern Mediterranean	48	14.000		
111		Zambia		Africa	333	59.000	✓	
112		Zimbabwe		Africa	199	29.000	✓	
113								
114		Sources: World Health Organisation (WHO) TB burden estimates						
115		Data accessed: October 2020						
116		Prepared by: TB Surveillance Team, TB Unit, National Infection Service, Public Health England						
117								
118								

Quelle [26]: Institut, R.K. *Tuberkulose-Impfung in Deutschland? Welche Möglichkeiten gibt es, wenn die Impfung für einen Auslandsaufenthalt gefordert wird?* 03.01.2018 [cited 02.10.2021]; Available from: <https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Impfen/Tuberkulose/FAQ01.html>.

The screenshot shows the Robert Koch Institute (RKI) website. At the top, there is a navigation bar with links for 'Kontakt', 'Inhalt', 'Hilfe', 'Impressum', and 'Datenschutzerklärung'. Below this is a secondary navigation bar with 'Erklärung zur Barrierefreiheit', 'Gebärdensprache', and 'Leichte Sprache'. The main navigation bar includes 'Institut', 'Gesundheitsmonitoring', 'Infektionsschutz', 'Forschung', and 'Kommissionen'. The page title is 'Tuberkulose-Impfung in Deutschland? Welche Möglichkeiten gibt es, wenn die Impfung für einen Auslandsaufenthalt gefordert wird?'. A 'Navigation' sidebar is visible on the left. The main content area contains the following text:

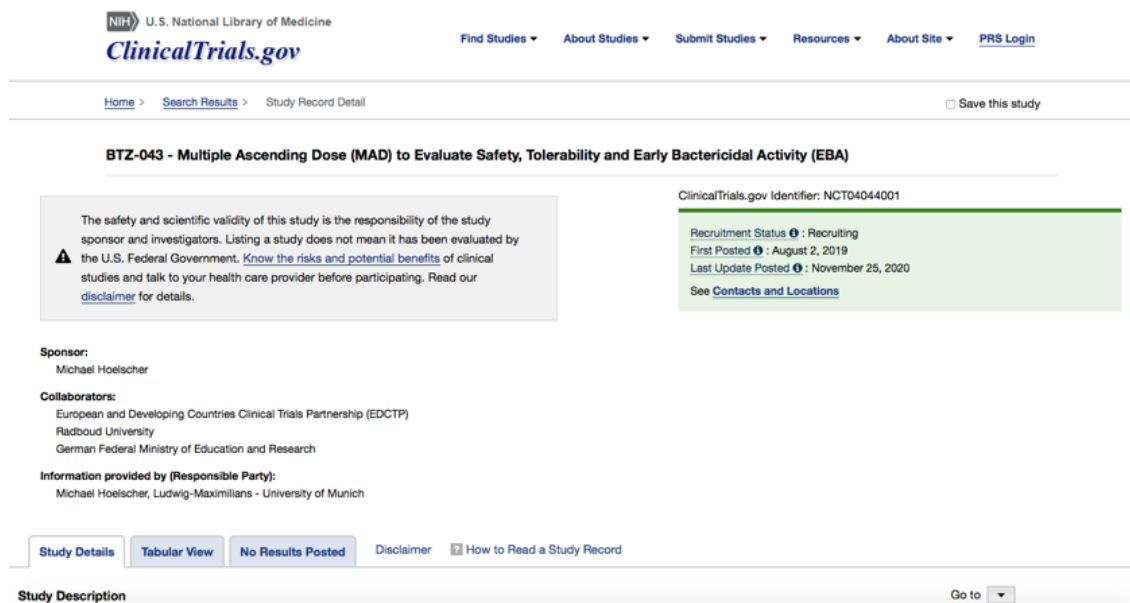
Tuberkulose-Impfung in Deutschland? Welche Möglichkeiten gibt es, wenn die Impfung für einen Auslandsaufenthalt gefordert wird?

Die BCG-Impfung gegen Tuberkulose wird von der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut seit 1998 nicht mehr empfohlen. Gründe: günstige epidemiologische Situation in Deutschland mit geringem Infektionsrisiko in der Bevölkerung, eine Schutzeffektivität von 50-80% in Abhängigkeit von Alter und der Art der Erkrankung, sowie nicht selten unerwünschte Nebenwirkungen (attenuierter Lebendimpfstoff). Dies entspricht den Empfehlungen der WHO, die vorgeschlagen hat, in Populationen, deren Infektionsrisiko für Tuberkulose unter 0,1% liegt, keine generelle BCG-Impfung durchzuführen. Ein Impfstoff ist in Deutschland nicht mehr für diese Indikation zugelassen; international ist Impfstoff verfügbar. Aufgrund unterschiedlicher epidemiologischer Gegebenheiten ist diese Situation in anderen Staaten anders zu bewerten und so fordern eine Reihe von Ländern bei Langzeitaufenthalten z.B. in Schulen oder Universitäten diese Impfung. Da die Impfung in Deutschland nicht empfohlen ist, besteht in der Mehrzahl der Bundesländer auch kein Versorgungsanspruch nach Auftreten eines Impfschadens, wenn in Deutschland geimpft wird. Detaillierte Fragen zu dieser Problematik sollten mit einem Arzt besprochen werden.

Weitere Informationen zur [Tuberkulose](#) finden Sie auf unseren Internet-Seiten.

Stand: 03.01.2018

Quelle [43]: *BTZ-043 - Multiple Ascending Dose (MAD) to Evaluate Safety, Tolerability and Early Bactericidal Activity (EBA)*. 25.11.2020; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04044001>.



U.S. National Library of Medicine
ClinicalTrials.gov

Find Studies ▾ About Studies ▾ Submit Studies ▾ Resources ▾ About Site ▾ [PRS Login](#)

[Home](#) > [Search Results](#) > Study Record Detail Save this study

BTZ-043 - Multiple Ascending Dose (MAD) to Evaluate Safety, Tolerability and Early Bactericidal Activity (EBA)

ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04044001

Recruitment Status ⓘ : Recruiting
First Posted ⓘ : August 2, 2019
Last Update Posted ⓘ : November 25, 2020
[See Contacts and Locations](#)

Disclaimer:
The safety and scientific validity of this study is the responsibility of the study sponsor and investigators. Listing a study does not mean it has been evaluated by the U.S. Federal Government. [Know the risks and potential benefits](#) of clinical studies and talk to your health care provider before participating. Read our [disclaimer](#) for details.

Sponsor:
Michael Hoelscher

Collaborators:
European and Developing Countries Clinical Trials Partnership (EDCTP)
Radboud University
German Federal Ministry of Education and Research

Information provided by (Responsible Party):
Michael Hoelscher, Ludwig-Maximilians - University of Munich

[Study Details](#) | [Tabular View](#) | [No Results Posted](#) | [Disclaimer](#) | [How to Read a Study Record](#)

Study Description Go to ▾

Study Description

Go to

Brief Summary:

This is a prospective, open label, two-centre, randomized, controlled, two-stage, phase Ib/IIa study to evaluate the safety, tolerability, PK, drug-drug interaction and bactericidal activity of BTZ-043 administered orally once daily over 14 days to participants with newly diagnosed, uncomplicated, smear-positive, drug-susceptible pulmonary tuberculosis. The primary objective is to assess the safety and tolerability of BTZ-043 given over 14 days by evaluation of adverse events during treatment and follow-up period in patients with newly diagnosed, uncomplicated, smear-positive, drug-susceptible pulmonary tuberculosis.

Condition or disease	Intervention/treatment	Phase
Pulmonary Tuberculosis	Drug: BTZ-043	Phase 1
Other Specified Pulmonary Tuberculosis	Drug: Rifafour e-275® Drug: Probe Drug Cocktail Drug: Dolutegravir 50mg Tab	Phase 2

▶ Show detailed description

Study Design

Go to

Study Type : Interventional (Clinical Trial)
Estimated Enrollment : 77 participants
Allocation: Randomized
Intervention Model: Sequential Assignment
Intervention Model Description: Stage 1: We will enrol patients sequentially in up to 8 cohorts of at least 3 patients to receive BTZ-043 in ascending doses. Patients in the first cohort will receive the lowest dose of 250mg of BTZ-043 for 14 days.
 After each patient in a cohort has completed at least 7 days, a dosing recommendation for the next cohort will be made using the continual reassessment method (CRM) algorithm.
 Stage 2: This will be a parallel group comparison of 4 treatment regimens. Patients will be randomized to receive either one of three doses of BTZ-043 within the therapeutic window defined in stage 1, or the control regimen of daily doses of Rifafour e-275®, adapted to body weight, for 14 days in the ratio 3:3:3:2.
Masking: Single (Outcomes Assessor)

Masking Description: Laboratory staff, analysing and evaluating the sputum and safety blood samples of the participants will be blinded to the treatment cohort/arm.
Primary Purpose: Treatment
Official Title: A Prospective Phase Ib/IIa, Active-controlled, Randomized, Open-label Study to Evaluate the Safety, Tolerability, Extended Early Bactericidal Activity and Pharmacokinetics of Multiple Oral Doses of BTZ-043 Tablets in Subjects With Newly Diagnosed, Uncomplicated, Smear-positive, Drug-susceptible Pulmonary Tuberculosis
Actual Study Start Date : November 15, 2019
Estimated Primary Completion Date : August 2021
Estimated Study Completion Date : September 2021

Resource links provided by the National Library of Medicine

MedlinePlus related topics: [Tuberculosis](#)

Drug Information available for: [Dolutegravir](#)

[U.S. FDA Resources](#)

Arms and Interventions

Go to

Arm	Intervention/treatment
Experimental: Stage 1 - Cohort 1 (BTZ 250) Patients will receive 1 tablet of BTZ-043 orally once daily, containing 250mg BTZ-043 from Day 1 through to Day 14	Drug: BTZ-043 BTZ-043 (250mg per tablet)
Experimental: Stage 1 - Cohort 2 (BTZ 500) Patients will receive 2 tablets of BTZ-043 orally once daily, each containing 250mg BTZ-043 (500 mg in total) from Day 1 through to Day 14	Drug: BTZ-043 BTZ-043 (250mg per tablet)
Experimental: Stage 1 - Cohort 3 (BTZ 750) Patients will receive 3 tablets of BTZ-043 orally once daily, each containing 250mg BTZ-043 (750 mg in total) from Day 1 through to Day 14	Drug: BTZ-043 BTZ-043 (250mg per tablet)

<p>Experimental: Stage 1 - Cohort 4 (BTZ 1000)</p> <p>Patients will receive 4 tablets of BTZ-043 orally once daily, each containing 250mg BTZ-043 (1000 mg in total) from Day 1 through to Day 14</p>	<p>Drug: BTZ-043</p> <p>BTZ-043 (250mg per tablet)</p>
<p>Experimental: Stage 1 - Cohort 5 (BTZ 1250)</p> <p>Patients will receive 5 tablets of BTZ-043 orally once daily, each containing 250mg BTZ-043 (1250 mg in total) from Day 1 through to Day 14</p>	<p>Drug: BTZ-043</p> <p>BTZ-043 (250mg per tablet)</p>
<p>Experimental: Stage 1 - Cohort 6 (BTZ 1500)</p> <p>Patients will receive 6 tablets of BTZ-043 orally once daily, each containing 250mg BTZ-043 (1500 mg in total) from Day 1 through to Day 14</p>	<p>Drug: BTZ-043</p> <p>BTZ-043 (250mg per tablet)</p>
<p>Experimental: Stage 1 - Cohort 7 (BTZ 1750)</p> <p>Patients will receive 7 tablets of BTZ-043 orally once daily, each containing 250mg BTZ-043 (1750 mg in total) from Day 1 through to Day 14</p>	<p>Drug: BTZ-043</p> <p>BTZ-043 (250mg per tablet)</p>
<p>Experimental: Stage 1 - Cohort 8 (BTZ 2000)</p> <p>Patients will receive 8 tablets of BTZ-043 orally once daily, each containing 250mg BTZ-043 (2000 total) from Day 1 through to Day 14</p>	<p>Drug: BTZ-043</p> <p>BTZ-043 (250mg per tablet)</p>
<p>Experimental: Stage 2 - Arm 1 (BTZ high)</p> <p>Patients will receive a higher dose of BTZ-043, that has proven to be safe in stage 1 orally once daily from Day 1 through to Day 14. The dose of BTZ-043 will be determined after review of safety data from stage 1.</p>	<p>Drug: BTZ-043</p> <p>BTZ-043 (250mg per tablet)</p> <p>Drug: Probe Drug Cocktail</p> <p>A probe drug cocktail will be given to randomly selected patients after inclusion on Day 1 and on Day 14 once orally. The probe drug cocktail consists of</p> <ul style="list-style-type: none"> • Caffeine: 1 tablet à 150mg • Tolbutamide: 1/4 tablet à 500mg • Dextromethorphan: 10 ml syrup à 15mg/5ml • Midazolam: 2 ml solution à 5mg/5ml • Digoxin: 2 tablets à 0.25mg
	<p>Drug: Dolutegravir 50mg Tab</p> <p>1 tablet à 50mg Dolutegravir will be given to randomly selected patients after inclusion on Day 1 and on Day 14 once orally.</p> <p>Other Name: Tivicay®</p>
<p>Experimental: Stage 2 - Arm 2 (BTZ medium)</p> <p>Patients will receive a medium dose of BTZ-043, that has proven to be safe in stage 1 orally once daily from Day 1 through to Day 14. The dose of BTZ-043 will be determined after review of safety data from stage 1.</p>	<p>Drug: BTZ-043</p> <p>BTZ-043 (250mg per tablet)</p> <p>Drug: Probe Drug Cocktail</p> <p>A probe drug cocktail will be given to randomly selected patients after inclusion on Day 1 and on Day 14 once orally. The probe drug cocktail consists of</p> <ul style="list-style-type: none"> • Caffeine: 1 tablet à 150mg • Tolbutamide: 1/4 tablet à 500mg • Dextromethorphan: 10 ml syrup à 15mg/5ml • Midazolam: 2 ml solution à 5mg/5ml • Digoxin: 2 tablets à 0.25mg <p>Drug: Dolutegravir 50mg Tab</p> <p>1 tablet à 50mg Dolutegravir will be given to randomly selected patients after inclusion on Day 1 and on Day 14 once orally.</p> <p>Other Name: Tivicay®</p>
<p>Experimental: Stage 2 - Arm 3 (BTZ low)</p> <p>Patients will receive a lower dose of BTZ-043, that has proven to be safe in stage 1 orally once daily from Day 1 through to Day 14. The dose of BTZ-043 will be determined after review of safety data from stage 1.</p>	<p>Drug: BTZ-043</p> <p>BTZ-043 (250mg per tablet)</p> <p>Drug: Probe Drug Cocktail</p> <p>A probe drug cocktail will be given to randomly selected patients after inclusion on Day 1 and on Day 14 once orally. The probe drug cocktail consists of</p>

	<ul style="list-style-type: none"> • Caffeine: 1 tablet à 150mg • Tolbutamide: 1/4 tablet à 500mg • Dextromethorphan: 10 ml syrup à 15mg/5ml • Midazolam: 2 ml solution à 5mg/5ml • Digoxin: 2 tablets à 0.25mg <p>Drug: Dolutegravir 50mg Tab 1 tablet à 50mg Dolutegravir will be given to randomly selected patients after inclusion on Day 1 and on Day 14 once orally. Other Name: Tivicay®</p>
<p>Active Comparator: Stage 2 - Arm 4 (control)</p> <p>Patients will receive a standard dose of Rifafour e-275® orally once daily according to body weight from Day 1 through to Day 14. Each tablet of Rifafour e-275® contains 150mg rifampicin, 75mg isoniazid, 400mg pyrazinamide and 275mg ethambutol.</p> <p>The daily doses will be given to fasting patients, in accordance with South African Guidelines for treatment of TB. The total number of tablets will be based on the body weight at screening:</p> <ul style="list-style-type: none"> • participants weighing 38 - 54 kg: 3 tablets • participants weighing 55 - 70 kg: 4 tablets • participants weighing >70 kg: 5 tablets 	<p>Drug: Rifafour e-275®</p> <p>Rifafour e-275® (150mg rifampicin, 75mg isoniazid, 400mg pyrazinamide, 275 mg ethambutol per tablet)</p> <p>Other Name: Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamide, Ethambutol (HRZE)</p>

Outcome Measures

Go to ▼

Primary Outcome Measures 1:

1. Safety and tolerability of BTZ-043 [Time Frame: Day 1 to Day 22]

Safety and tolerability of BTZ-043 will be assessed by evaluation of Adverse Events (AEs) during treatment- and follow-up phase

Secondary Outcome Measures 8:

1. Bactericidal Activity Endpoint - MGIT [Time Frame: Day -1 to Day 14]
 - changes in time to detection in the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT™) liquid media culture system from baseline
2. Bactericidal Activity Endpoint - CFU [Time Frame: Day -1 to Day 14]
 - changes in solid media colony forming units (CFU) from baseline
3. Bactericidal Activity Endpoint - LAM [Time Frame: Day -1 to Day 14]
 - changes in sputum liparabinomannan (LAM) concentration from baseline
4. Bactericidal Activity Endpoint - MBLA [Time Frame: Day -1 to Day 14]
 - changes in sputum molecular bacterial load assay (MBLA) from baseline
5. Pharmacokinetic Endpoint - BTZ-043 - AUC [Time Frame: Day 1, 12 and 14]
 - The PK of BTZ-043 and its two major metabolites BTZ-045S and M2 after a single dose and at steady state will be evaluated by measuring the area under the plasma concentration curve (AUC)
6. Pharmacokinetic Endpoint - BTZ-043 - Cmax [Time Frame: Day 1, 12 and 14]
 - The PK of BTZ-043 and its two major metabolites BTZ-045S and M2 after a single dose and at steady state will be evaluated by measuring the observed maximum concentration (Cmax)
7. Pharmacokinetic Endpoint - BTZ-043 - Tmax [Time Frame: Day 1, 12 and 14]
 - The PK of BTZ-043 and its two major metabolites BTZ-045S and M2 after a single dose and at steady state will be evaluated by measuring the time to reach Cmax (Tmax)
8. Pharmacokinetic Endpoint - BTZ-043 - Cmin [Time Frame: Day 1, 12 and 14]
 - The PK of BTZ-043 and its two major metabolites BTZ-045S and M2 after a single dose and at steady state will be evaluated by measuring the minimum observed plasma concentration 24 hours following the last dose (Cmin)

9. Pharmacokinetic Endpoint - BTZ-043 - Cl [Time Frame: Day 1, 12 and 14]
The PK of BTZ-043 and its two major metabolites BTZ-045S and M2 after a single dose and at steady state will be evaluated by measuring the Clearance (Cl)
10. Pharmacokinetic Endpoint - BTZ-043 - Vd [Time Frame: Day 1, 12 and 14]
The PK of BTZ-043 and its two major metabolites BTZ-045S and M2 after a single dose and at steady state will be evaluated by measuring the Volume of distribution (Vd)
11. Pharmacokinetic Endpoint - BTZ-043 - T1/2 [Time Frame: Day 1, 12 and 14]
The PK of BTZ-043 and its two major metabolites BTZ-045S and M2 after a single dose and at steady state will be evaluated by measuring the Elimination half-life (T1/2)
12. Pharmacokinetic Endpoint - BTZ-043 - pharmacodynamics (PD) [Time Frame: Day 1, 12 and 14]
The PK of BTZ-043 and its two major metabolites BTZ-045S and M2 after a single dose and at steady state will be evaluated by measuring the Relation of efficacy measurements to pharmacokinetic indices of BTZ-043 and its metabolites (AUC, Cmax)
13. Pharmacokinetic Endpoint - Population PK AUC [Time Frame: Day 1, 12 and 14]
A population PK-analysis of BTZ-043 and its two major metabolites will be carried out by measuring the AUC and describing PK differences of BTZ-043 and its main metabolites between subjects to quantify inter-individual variability, suitable for evaluation of alternative dosing regimens
14. Pharmacokinetic Endpoint - Population PK Cmax [Time Frame: Day 1, 12 and 14]
A population PK-analysis of BTZ-043 and its two major metabolites will be carried out by measuring the Cmax and describing PK differences of BTZ-043 and its main metabolites between subjects to quantify inter-individual variability, suitable for evaluation of alternative dosing regimens
15. Pharmacokinetic Endpoint - Food Effect PK AUC [Time Frame: Day 14]
The effect of food on the exposure of the BTZ-043 and its two major metabolites will be determined by measuring the AUC of BTZ-043 and its main metabolites and by evaluating the change after a high fat high calorie meal in comparison to the AUC under fasting conditions during the 1st stage.
16. Pharmacokinetic Endpoint - Food Effect PK Cmax [Time Frame: Day 14]
The effect of food on the exposure of the BTZ-043 and its two major metabolites will be determined by measuring the Cmax of BTZ-043 and its main metabolites and by evaluating the change after a high fat high calorie meal in comparison to the Cmax under fasting conditions during the 1st stage.
17. Pharmacokinetic Endpoint - Probe Drugs PK AUC [Time Frame: Day 0 and 14]
The effect on BTZ-043 at steady state on hepatic enzyme and P-glycoprotein activity (induction vs. inhibition) will be evaluated by measuring changes in AUC of the probe drugs administered on day 0, and day 14 during the 2nd stage.
18. Pharmacokinetic Endpoint - Probe Drugs PK Cmax [Time Frame: Day 0 and 14]
The effect on BTZ-043 at steady state on hepatic enzyme and P-glycoprotein activity (induction vs. inhibition) will be evaluated by measuring changes in Cmax of the probe drugs administered on day 0, and day 14 during the 2nd stage.

Eligibility Criteria

Go to

Information from the National Library of Medicine



Choosing to participate in a study is an important personal decision. Talk with your doctor and family members or friends about deciding to join a study. To learn more about this study, you or your doctor may contact the study research staff using the contacts provided below. For general information, [Learn About Clinical Studies](#).

Ages Eligible for Study: 18 Years to 64 Years (Adult)
Sexes Eligible for Study: All
Accepts Healthy Volunteers: No

Criteria

General inclusion criteria:

1. Provide written, informed consent prior to all trial-related procedures including HIV testing.
2. Understand and willing to comply with the study procedures.

3. Male or female adults, aged 18 up to and including 64 years.
4. Body weight \geq 40 kg.
5. Participants are either unable to conceive/father children AND/OR they will be using two effective methods of contraception, including methods used by the patient's sexual partner(s). At least one to be a barrier method.

Disease-specific inclusion criteria:

6. Newly diagnosed, previously untreated, drug-susceptible pulmonary TB
7. Chest X-ray which is consistent with TB
8. Ability to produce an adequate volume of sputum (at least 10ml estimated overnight production)
9. \geq 1 sputum sample from concentrated sputum positive for acid-fast bacilli on microscopy (at least 1+ on the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease/World Health Organization (IUATLD/WHO) scale) from either a spot sputum or overnight sputum sample.

General exclusion criteria:

1. Poor general condition, where delay in treatment cannot be tolerated or death within three months is likely, as assessed by the investigator.
2. The patient is pregnant or breast-feeding.

Disease-specific exclusion criteria:

3. The patient is infected with HIV.
4. The patient has a known intolerance to any of the study drugs or concomitant disorders or conditions for which study drugs or standard TB treatment are contraindicated.
5. Treatment with any other investigational drug within 1 month prior to enrolment or enrolment into other clinical (intervention) trials during participation.
6. The patient has a history of or current evidence of clinically relevant cardiovascular metabolic, gastrointestinal, neurological, psychiatric or endocrine diseases, malignancy or any other condition, that will influence treatment response, study adherence or survival in the judgement of the investigator, especially:
 - a. Clinically significant evidence of severe TB (e.g. miliary TB, TB meningitis, excluding limited lymph node involvement)
 - b. Serious lung conditions other than TB or significant respiratory impairment in the discretion of the investigator
 - c. Neuropathy, epilepsy or significant psychiatric disorder
 - d. Any diabetes mellitus
 - e. Cardiovascular disease, such as myocardial infarction, heart failure, coronary heart disease, arrhythmia, tachyarrhythmia, or pulmonary hypertension
 - f. Current or history of hypertension (systolic blood pressure $>$ 135 mmHg and/or diastolic blood pressure of $>$ 85 mmHg) AND/OR ever received antihypertensive treatment)
 - g. Long QT syndrome or family history of long QT syndrome or sudden death of unknown or cardiac-related cause

- h. Alcohol or other drug abuse, that is sufficient to significantly compromise the safety or cooperation of the patient, includes substances prohibited by the protocol, or has led to significant organ damage, at the discretion of the investigator

Laboratory exclusion criteria at screening:

7. Serum amino aspartate transferase (AST) and/or alanine aminotransferase (ALT) activity $>$ 2x the upper limit of normal (ULN)
8. serum alkaline phosphatase (ALP) or γ -glutamyl transferase (GGT) $>$ 2x the ULN
9. serum total bilirubin level $>$ 1.5 times the ULN
10. estimated creatinine clearance (eCrCl) using the Cockcroft and Gault formula level lower than 60 ml/min
11. haemoglobin level $<$ 8.0 g/dL
12. platelet count $<$ 100,000/mm³
13. serum potassium below the lower level of normal (LLN) for the laboratory

ECG-specific exclusion criteria:

14. corrected QT interval (QTc)F of $>$ 450 milliseconds (ms)
15. Atrioventricular (AV) block with PR interval $>$ 200 ms
16. QRS complex $>$ 120 ms
17. any other changes in the ECG that are clinically relevant as per discretion of the investigator

Restricted medication:

18. Treatment with drugs active against Mycobacterium Tuberculosis (MTB) within the last 3 months prior to screening
19. Requires medication as included in the following drug classes within 2 weeks prior to the first dose of study treatment:
 - o medication that prolongs the QTc interval
 - o Cytochrome P450 (CYP450) inhibitors or inducers, including grapefruit containing foods / beverages and St. John's Wort
 - o Antacids or anti-peptic drugs (antacids, H2 blockers, proton pump inhibitors)

Information from the National Library of Medicine



To learn more about this study, you or your doctor may contact the study research staff using the contact information provided by the sponsor.

Please refer to this study by its ClinicalTrials.gov identifier (NCT number): **NCT04044001**

Contacts

Contact: Norbert Heinrich, MD +49894400 ext 59805 heinrich@lrz.uni-muenchen.de

Contact: Susanne Schultz, MD, MSc +49894400 ext 59907 susanne.schultz@lrz.uni-muenchen.de

Locations

South Africa

TASK Applied Sciences Clinical Research Centre **Recruiting**

Cape Town, South Africa, 7530

Contact: Lize Greyling, MD +2721917 ext 1044 dr.lize@task.org.za

University of Cape Town Lung Institute (UCTLI) **Recruiting**

Cape Town, South Africa, 7700

Contact: Rodney A Dawson, Prof +2721406 ext 6850 rodney.dawson@uct.ac.za

Sponsors and Collaborators

Michael Hoelscher

European and Developing Countries Clinical Trials Partnership (EDCTP)

Radboud University

German Federal Ministry of Education and Research

Investigators

Study Director: Michael Hoelscher, Prof University Hospital, LMU Munich, Division of Infectious Diseases and Tropical Medicine

Principal Investigator: Andreas Diacon, Prof TASK Applied Science Clinical Research Centre

More Information

Go to

Responsible Party: Michael Hoelscher, Prof. Dr. Michael Hoelscher, Ludwig-Maximilians - University of Munich
 ClinicalTrials.gov Identifier: [NCT04044001](#) [History of Changes](#)
 Other Study ID Numbers: PanACEA-BTZ-043-02
 First Posted: August 2, 2019 [Key Record Dates](#)
 Last Update Posted: November 25, 2020
 Last Verified: November 2020

Individual Participant Data (IPD) Sharing Statement:
 Plan to Share IPD: No

Studies a U.S. FDA-regulated Drug Product: No
 Studies a U.S. FDA-regulated Device Product: No

Keywords provided by Michael Hoelscher, Ludwig-Maximilians - University of Munich:

Tuberculosis, Pulmonary	Drug-sensitive TB
Randomized Controlled Trial (RCT)	Early Bactericidal Activity (EBA)
BTZ-043	Drug-drug-interaction
Tuberculosis	Pharmacokinetics (PK)
Antitubercular Agents	Safety
Gram-positive Bacterial Infections	Tolerability
Escalating dose	Bactericidal Activity

Additional relevant MeSH terms:

Tuberculosis	Anti-Bacterial Agents
Tuberculosis, Pulmonary	Anti-Infective Agents
Mycobacterium Infections	Enzyme Inhibitors
Actinomycetales Infections	Molecular Mechanisms of Pharmacological Action
Gram-Positive Bacterial Infections	Fatty Acid Synthesis Inhibitors

Bacterial Infections
Lung Diseases
Respiratory Tract Diseases
Respiratory Tract Infections
Isoniazid
Pyrazinamide
Ethambutol
Dolutegravir
Antitubercular Agents

Hypolipidemic Agents
Antimetabolites
Lipid Regulating Agents
HIV Integrase Inhibitors
Integrase Inhibitors
Anti-HIV Agents
Anti-Retroviral Agents
Antiviral Agents

[^ TO TOP](#)

[For Patients and Families](#) | [For Researchers](#) | [For Study Record Managers](#)

[HOME](#) | [RSS FEEDS](#) | [SITE MAP](#) | [TERMS AND CONDITIONS](#) | [DISCLAIMER](#) | [CUSTOMER SUPPORT](#)

[Copyright](#) | [Privacy](#) | [Accessibility](#) | [Viewers and Players](#) | [Freedom of Information Act](#) | [USA.gov](#)
[U.S. National Library of Medicine](#) | [U.S. National Institutes of Health](#) | [U.S. Department of Health and Human Services](#)

Quelle [58]: *Log and Percent Reductions in Microbiology and Antimicrobial Testing.* [cited 2022 04.01.2022]; Available from: <https://microchemlab.com/information/log-and-percent-reductions-microbiology-and-antimicrobial-testing>.

The screenshot shows the Microchem Laboratory website. At the top left is the logo with a stylized 'M' and 'L' inside a circle, followed by 'MICROCHEM LABORATORY'. To the right, contact information includes 'Contact@Microchemlab.com | (512) 310-8378' and a search bar. A navigation menu contains 'ABOUT THE LAB', 'TESTING SERVICES', 'INFORMATION', and 'CONTACT US'. Below the navigation is a dark header with the breadcrumb 'HOME > INFORMATION >' and the page title 'Log and Percent Reductions in Microbiology and Antimicrobial Testing'.

To keep the individual numbers manageable, microbiologists usually express them using **scientific notation**.

Similarly, when calculating the magnitude of the change in cell number, microbiologists often use a logarithmic scale (log scale). Simply speaking, taking the log value of a large number, such as the number of cells killed in a disinfectant test, transforms it into a smaller one that is easier to work with.

Understandably, this "scientist shorthand" often prompts questions concerning how to translate log reductions to percent reductions and *vice versa*.

A series of true mathematical statements showing a pattern is presented below. If you can identify the pattern, then you are well on your way to understanding the relationship between log reduction and percent reduction.

- 1 log reduction = 90% reduction
- 2 log reduction = 99% reduction
- 3 log reduction = 99.9% reduction
- 4 log reduction = 99.99% reduction
- 5 log reduction = 99.999% reduction
- 6 log reduction = 99.9999% reduction

Microchem Laboratory Is:
An EPA and FDA GLP-compliant testing organization staffed by skilled, experienced microbiologists and chemists. Microchem can help speed *your* project to completion.

RELATED
[Scientific Notation and Significant Digits in Microbiology](#)
[Mathematical Modeling of Antimicrobial Efficacy](#)

Quick Contact
Name and Company *

As the series demonstrates, if a log reduction is a whole integer, then its numerical value equals the number of nines in the percent reduction figure.

So, if you get a study report from our lab indicating a 2.5 log reduction, then you know it corresponds to a percent reduction somewhere between 99% and 99.9%. However, because of the way log scales work, a 2.5 log reduction does not equal a 99.5% reduction.

For the more mathematically minded, formulas are presented below for percent reduction calculations, log reduction calculations, and finally a formula is presented which will allow people to go back and forth between the two.

Percent Reduction Calculation

$$\text{Percent Reduction} = \frac{(A - B) \times 100}{A}$$

Where:

A is the number of viable microorganisms before treatment,

B is the number of viable microorganisms after treatment

Log Reduction Calculation

$$\text{Log Reduction} = \log_{10}\left(\frac{A}{B}\right)$$

or,

$$\text{Log Reduction} = \log_{10}(A) - \log_{10}(B)$$

Where:

A is the number of viable microorganisms before treatment,

B is the number of viable microorganisms after treatment

Formula to Convert Log Reduction to Percent Reduction

$$P = (1 - 10^{-L}) \times 100$$

Where:

P is the percent reduction

L is the log reduction

Email *

Test or Information Needed *

Submit

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herr Dr. Andreas Wieser, welcher mir die Dissertation über dieses interessante Thema ermöglicht hat, der mich stets mit gutem Rat unterstützt hat, mich immer wieder neu gefordert und mich mit seinem unbegrenzten Enthusiasmus motiviert hat. Herzlichen Dank für die stets freundliche Unterstützung.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dr. Anna-Cathrine Neumann-Cip für die guten Anleitungen in strukturierter wissenschaftlicher Laborarbeit, Planung und Auswertung sowie die unermüdliche Unterstützung im wissenschaftlichen Schreiben und das Beantworten meiner E-Mails zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Ein besonderer Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. Christoph Haisch, der den großen Datenmengen mithilfe von MATLAB zu Sinn verholfen hat und dabei sogar stets gut gelaunt war. Danke für die vielen guten Anmerkungen.

Ein großer Dank gilt dem gesamten Labor-Team. Danke für die schöne Zeit und für die große Unterstützung auch in schwierigen Zeiten. Ein besonderer Dank gebührt hier Gabi Liegl, für die Unterstützung bei all meinen Versuchen, und die unerschütterliche positive Art. Danke an Sarah Sternkopf, Nici Kriewall, Christine Sternkopf, Birgit Groß sowie Jessica Beyerl für die tatkräftige Unterstützung und die vielen guten Ratschläge.

Allen meinen lieben Freunden danke ich für die Geduld und die vielen aufmunternden Worte, womit sie mir stets zur Seite standen.

Meinen Eltern bin ich zutiefst dankbar, dass sie mir diesen Weg ermöglicht haben. Besonderer Dank gebührt meiner Mutter, die mich immer mit unerlässlichem Rückhalt und Zuspruch unterstützt. Danke an meinen Bruder für viele gute Anmerkungen und die Hilfe bei Schreibblockaden.

Von ganzem Herzen danke ich Jakob Klotz für das unermüdliche Korrekturlesen, die unzähligen guten Ratschläge sowie seine uneingeschränkte Motivation und Liebe.

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Seitz, Bianca Daniela

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Stoffwechselbeeinflussung vom Bacille Calmette-Guérin (BCG) Modellorganismus durch antimykobakterielle Substanzen in der massenspektrometrischen Analyse von Proteinextrakten nach stabiler Isotopenmarkierung

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Rosenheim, 16.06.2025

Ort, Datum

Bianca Daniela Seitz

Unterschrift Bianca Daniela Seitz