Universitätsklinikum
Regensburg

KLINIK UND POLIKLINIK FÜR INNERE MEDIZIN I
Klinikum der Universität Regensburg
Bereich Infektiologie
D-93042 Regensburg
Direktor: Prof. Dr. J. Schölmerich
Bereichsleitung: Prof. Dr. B. Salzberger

Regensburg, 31.12.2008

Klinische Forschergruppe in der klinischen Infektiologie am Universitätsklinikum Regensburg

Abschlussbericht

Förderkennzeichen 01 KI 9952

Vorgelegt von
Prof. Dr. med. B. Salzberger
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I
Infektiologie
Universitätsklinikum Regensburg, 93042 Regensburg

Inhalt

1 Einleitung....3
2 Umsetzung des klinischen Versorgungskonzeptes und bisherige Ergebnisse, personelle Zusammensetzung, personelle Veränderungen, räumliche und sachliche Voraussetzungen....4
2.1 Klinisches Versorgungskonzept....4
2.2 Personelle Veränderungen und Zusammensetzung....4
2.3 Räumliche und sächliche Voraussetzungen:....5
3 Umsetzung der Lehre, Weiter- und Fortbildung, bisherige Ergebnisse,....7
4 Wissenschaftliches Arbeitsprogramm....8
4.1 Wissenschaftliche Projekte der Kerngruppe....8
4.1.1 Untersuchungen zur Regulation und pharmakologischen Beeinflussung der Toll-like Rezeptoren in der Sepsis....8
4.1.2 Funktion neutrophiler Granulozyten in der unspezifischen Abwehr von Mykobakterien ..10
4.1.3 Zellinfektion, Virulenz und Zytokininduktion von Mikrosporidien in professionellen und nicht professionellen Phagozyten und im Maus-Modell....17
4. 1.4a Respiratorische Virusinfektionen-Epidemiologie, Prävention und Intervention in einer Kohorte immundefizienter Patienten....25
4.1.4b CMV-Infektion der Darmmukosa bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen....26
4.2. Assoziierte Projekte....28
4.2.1 Bedeutung von MIF und zellassoziiertem p75TNF Rezeptor als Immunstatus-Parameter bei Sepsis....28
4.2.2 Identifizierung immunologischer und molekularbiologischer Parameter zur Beurteilung der Virulenz von klinischen *H. pylori*-Isolaten....29
4.2.3 Analyse Epstein-Barr-Virus (EBV)- spezifischer virologischer und immunologischer Parameter bei Patienten unter Immunsuppression: Bedeutung der EBV-Infektion für den klinischen Verlauf....30
4.3 Weitere wissenschaftliche Projekte, Studien und Publikationen des Bereichs Infektiologie 32
4.5.1 Experimentelle wissenschaftliche Projekte....32
4.5.2 Klinische Projekte und Studien....33
6 Unterschrift....35
7 Anlagen....35

1 Einleitung

An der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg wurde vom 1.5.2002 bis zum 30.6.2008 eine klinische Forschergruppe Infektiologie im Rahmen des BMBF-Programms zur Etablierung von klinischen Forschergruppen in der klinischen Infektiologie gefördert. Ebenfalls gefördert im Rahmen der klinischen Fördergruppe wurden vom 01.09.2000 bis 31.8.2006 drei assoziierte Forschungsprojekte, zwei davon im Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, eines im Institut für Pathologie bzw. Institut für Immunologie der Universität Regensburg.

2 Umsetzung des klinischen Versorgungskonzeptes und bisherige Ergebnisse, personelle Zusammensetzung, personelle Veränderungen, räumliche und sachliche Voraussetzungen

2.1 Klinisches Versorgungskonzept

Der Bereich klinische Infektiologie hat sich sowohl in die Struktur der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, als auch in das gesamte Klinikum der Universität Regensburg integriert.
Der vorbestehende Konsiliardienst ebenso wie die Arbeit in der Infektionsambulanz wurden intensiviert. Seit 1/2002 werden jährlich über 400 Konsile bei stationären Patienten im Universitätsklinikum durchgeführt und im EDV-System schriftlich dokumentiert, dabei im Rahmen der Follow-up Visiten die Patienten im Durchschnitt 3,8mal gesehen. Die jährliche Ambulanzstatistik weist jeweils ca. 1200 Patientenbesuche (pro Quartal werden ca. 350 Patienten erfasst) mit dem Schwerpunkt HIV-Infektion (ca. 65% aller Besuche aus.

2.2 Personelle Veränderungen und Zusammensetzung

Nach wie vor ist der Antragsteller und Leiter des Bereiches Infektiologie als leitender Oberarzt 100 %-ig im Stellenplan der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I eingebettet. Der bisherige Vertreter des Antragstellers, PD Dr. T. Glück wurde zwischenzeitlich zum Chefarzt des Kreisklinikums Trostberg ernannt. Neu eingestellt wurde Frau Dr. G. Birkenfeld als Oberärztin und Vertreterin der Leitung des Bereichs Infektiologie. Zwei weitere Funktionsoberärzte (Dr. B. Ehrenstein und Dr. F. Mandraka) sind zu je 50% dem Bereich zugeordnet.
Herr Dr. Arne Schneidewind und Herr Dr. Frank Hanses konnten als neue Mitarbeiter gewonnen werden, beide haben zwischenzeitlich einen Auslandsaufenthalt zu Forschungszwecken in den USA angetreten, Dr. A. Schneidewind Juli 2005 bis September 2008 zur Bearbeitung eines Projekts in Förderung des NIH am Partners Research Center, Harvard University, Boston, Dr. F. Hanses als Stipendiat der Leopoldina-Stiftung seit 8/2007 an den Channing Laboratories, Harvard University, Boston. Frau Dr. C. Dierkes, Frau Dr. U. Hempel und Frau Dr. M. Simon konnten als neue Mitarbeiterinnen gewonnen werden. Frau Dr. Hempel befindet sich derzeit auf einem Forschungsaufenthalt im Partners Research Center, Harvard University Boston (seit 7/2007), Frau Dr. Simon hat nach einem Jahr Ausbildung in der Inneren Medizin sich für eine Ausbildung in der Medizinischen Mikrobiologie und Hygiene entschieden. Philip Gross hat als naturwissenschaftlicher Doktorand die Arbeiten von Dr. K. Brandl fortgesetzt.
Das Sekretariat wird nach einer internen Reorganisation in Kooperation mit den anderen Bereichen der Klinik versorgt, Frau E. Faltermeier ist als Sekretärin für den Bereich Infektiologie tätig.
Damit ist die Zusammensetzung der Gruppe wie folgt:

- Prof. Dr. B. Salzberger, C3-Professor Klinische Infektiologie, Oberarzt (Klinikstelle)
- Dr. G. Birkenfeld, Oberärztin (Klinikstelle)
- 3 Assistenzärzte /Funktionsoberärzte Klinische Infektiologie: Fr. Dr. F. Mandraka (50%)

PD Dr. B. Ehrenstein (50%)
Dr. A. Schneidewind
Dr. C. Dierkes

-
- derzeit* 2 weitere, dem Bereich "Klinische Infektiologie" zugeordnete Assistenzärzte:

- Sekretärin des Bereiches Fr. E. Faltermeier (Klinikstelle)
- Med. techn. Asssistentinnen/Assistenten:
  Fr. I. Fink (Klinikssstelle)
  N.N.*

* 2 Arztstellen derzeit aufgrund mangelnder Bewerber nicht besetzt.

2.3 Räumliche und sächliche Voraussetzungen:

Hier waren bereits im Antrag vom 25.02.02 sämtliche für ein ordnungsgemäßes Funktionieren eines Bereiches klinische Infektiologie erforderlichen Voraussetzungen im stationären wie im ambulanten und im Forschungsbereich aus Mitteln der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I umgesetzt. Daran hat sich zwischenzeitlich nichts geändert.
Der Bereich Infektiologie ist neben den Bereichen Gastroenterologie, Endokrinologie, Rheumatologie in der Patientenversorgung, Forschung und Lehre ein eigenständiger Bereich mit Zugriff und Verwaltung eigener Drittmittlel (Personal- und Sachmittel), Laborräumen, Verbrauchs- und Investitionsmittel.
Insbesondere stehen die zugesagten Laborflächen zur Verfügung, S2- Laborraum steht im Rahmen der Kooperationen innerhalb der Klinik nach Bedarf zur Verfügung, ebenfalls ein zentraler Tierstall.
Zusammengefasst stehen zur Verfügung Im Bereich Klinikum-Hauptgebäude:

1 Arbeitszimmer für den Leiter des Bereiches Klinische Infektiologie (Prof. B. Salzberger)
1 Arbeitszimmer für die zweite Oberärztin des Bereiches (Dr. G. Birkenfeld)
1 Ambulanzzimmer
1 Arbeitszimmer mit 4 Arbeitsplätzen für Assistenzärzte und Möglichkeit zur Durchführung einfacher Labormethoden für klinische Studien
1 Sekretariat / Schreibzimmer
1 Seminar-/Besprechungsraum (gemeinsame Nutzung mit den anderen Arbeitsgruppen der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I)

Die Arbeitszimmer sind jeweils mit einem kompletten PC-Arbeitsplatz (vier im Assistentenzimmer) mit Anschluß an das Wissenschafts-Netz (→ Internet-Aufruf möglich), das Ambulanzzimmer und das Sekretariat mit einem PC mit Anschluß an das klinikinterne Netz ausgestattet.

Im Forschungsbau H1:
1 Labor im Forschungsbau der Inneren Kliniken, 40 m2, mit folgenden Einrichtungen/Grundausstattung:
- Labortische, Regale, Brutschrank, Kühlschrank/Gefrierschrank, Laminar Air Flow-Arbeitsbank, Zentrifuge, PC-Arbeitsplatz, übliches Laborgerät wie Glaswaren, Pipetten, etc.
gemeinsam mit den anderen Arbeitsgruppen im Forschungsbau können genutzt werden:
- Kühlschränke/Gefrierschränke, Laminar Air Flow-Arbeitsbank, FACS-Zellsorter, -80°C Schrank, ELISA-Reader, Szintillationszähler, PCR-Cycler.
Für zukünftige Projekte ist eine Zuteilung zusätzlicher Räume möglich, da die Raumzuteilung im Klinikum flexibel, entsprechend der Einwerbung von Drittmitteln und dem Output der Forschergruppen erfolgt.

3 Umsetzung der Lehre, Weiter- und Fortbildung, bisherige Ergebnisse,

Die im Antrag vom September 2001 vorgestellten Strukturen wurden vollständig umgesetzt. Es finden im Bereich der Lehre die regelmäßige klinisch-infektiologische Visite für die Studenten sowie eine Einbindung von infektiologischen Fragestellungen in die internistischen Hauptvorlesungen statt. Im Rahmen der Neuordnung der Approbationsordnung erhält die Infektiologie ein zusätzliches Gewicht durch die Neueinführung eines 20-stündigen Querschnittkurses Infektiologie und Immunologie, welcher erstmals ab Wintersemester 2004 abgehalten werden wird. Zur Fortbildung im Bereich Infektiologie findet 1 x wöchentlich eine klinische Infektiologiebesprechung für die Assistenten und ca. 1 x monatlich die infektiologische Fallkonferenz statt.

Schließlich konnte bei der Etablierung der Infektiologie als qualifizierte Weiterbildung durch entsprechende Vorstöße der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie (DGI) unter Mitarbeit des Bereiches Infektiologie ein wichtiger Schritt erzielt werden. Von den Mitarbeitern des Bereichs haben bisher T. Glück, P. Hartmann, C. Franzen und B. Salzberger das Zertifikat „Infektiologie“ der DGI erworben.

Der Bereich wurde als Zentrum Klinische Infektiologie der DGI im Jahre 2004 zertifiziert. Nach der Vorlage der Musterweiterbildungsordnung wurde ab 2004 der Erwerb der Zusatzweiterbildung Infektiologie nach einjährigem Curriculum möglich.

Die Weiterbildungsermächtigung für diese Zusatzweiterbildung wurde erteilt, mittlerweile wurde dies Zusatzweiterbildung von insgesamt 7 der bisherigen oder aktuellen Mitarbeiter erworben. Der Antragsteller ist von der Bayerischen Landesärztekammer im Juli 2004 als Fachberater für Infektiologie berufen worden

Die übergreifenden Fortbildungsangebote des Bereiches Infektiologie im Rahmen des Fortbildungskurrikulums der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I werden durch niedergelassene Ärzte sowie Ärzte aus umliegenden Krankenhäusern lebhaft angenommen und die Veranstaltungen sind regelmässig sehr gut besucht. Ca.3 dieser Veranstaltungen, welche sich jeweils abends über 2-3 Stunden erstrecken, wurden pro Jahr in den vergangenen Jahren angeboten.

Als internationale Fortbildungsveranstaltung wurde im Juli 2008 die ESCMID-Summerschool, eine einwöchige Intensivfortbildung für junge Infektiologen und Mikrobiologen ausgerichtet. Insgesamt 54 Teilnehmer aus mehr als 25 Ländern aus Europa, Mittelamerika und Asien nahmen teil.

4 Wissenschaftliches Arbeitsprogramm

4.1 Wissenschaftliche Projekte der Kerngruppe

4.1.1 Untersuchungen zur Regulation und pharmakologischen Beeinflussung der Toll-like Rezeptoren in der Sepsis

Gegenstand des Antrages war die Untersuchung der Rolle der Toll-like-Rezeptoren (TLR) und deren Regulation bei Patienten mit Sepsis. Zunächst konnten bei einer Reihe von Patienten mit Sepsis mittels Durchflusszytometrie die Veränderung der Rezeptorendichte der TLR2 und 4 im Verlauf der Erkrankung beobachtet werden. Hier wurde gezeigt, dass die TLR im Verlauf der Sepsis beim Menschen eher in höherer Konzentration auf der Zelloberfläche gefunden werden und damit die im klinischen Verlauf bei Patienten mit schwerer Sepsis typischerweise beobachtete Immunparalyse vermutlich nicht über eine Regulation der das Signal für die Entzündungsreaktion übermittelten Rezeptoren vermittelt wird. Es war ferner das Ziel des Projektes, den Verlauf einer experimentellen Sepsis durch gezielt konstruierte lösliche TLR Komplexe zu kontrollieren. Als Fernziel sollen diese Untersuchungen zu einer Therapieoption führen, die es ermöglicht, eine Sepsis in Patienten unter Kontrolle halten zu können.
Bei der Untersuchung der Hemmung der Signaltransduktion durch lösliche TLR2 und 4 wurde gefunden, dass das TLR-2-Fusionsprotein einen positiv synergistischen Effekt hatte, während lösliches TLR4 alleine inaktiv war. Erst ein Komplex aus TLR4 und MD-2 erbrachte eine Hemmung der LPS Aktivität. In den weiterführenden Experimenten wurde ein solcher löslicher Komplex hergestellt und konnte für beste Hemmwirkung in vitro und anschließend in vivo optimiert werden (Abb.1). Aufgrund der negativen Ergebnisse zu TLR2 wurde im Folgenden eine Konzentration auf den TLR4-Rezeptor vorgenommen.

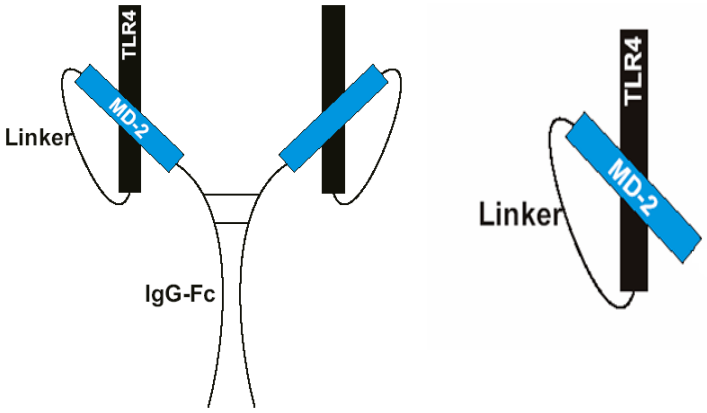


Abb. 1 Ein Designer-Molekül, um LPS zu binden; LPS-Trap-Fc und LPS-Trap:

Der extrazelluläre Teil von TLR4 wurde über einen flexiblen Linker mit MD-2 fusioniert. C-Terminal wurde ein Fc-Teil (LPS-Trap-Fc) bzw. ein HIS_6-Teil (LPS-Trap) angehängt.

Arbeitsprogramm und Ergebnisse der zweiten Antragsperiode

1. Zur Optimierung der Produktion der LPS-Trap wurden zunächst verkürzte Varianten bezüglich der Länge des MD-2 Moleküls hergestellt und untersucht

Die verkürzten Fc Varianten der LPS Trap-Fc kurzer (Fc-S) und mittlerer (Fc-M) Länge wurden auf ihre funktionellen Eigenschaften untersucht. Die Bindung dieser Fragmente an LPS findet statt, jedoch zeigt sich im in-vitro Modell keine Hemmung der IL-6 Produktion von LPS stimulierten MonoMac6-Zellen. Im LPS Bindungsassay zeigte sich auch eine niedrigere Affinität der Fc-S und Fc-M Fragmente im Vergleich zur ursprünglichen LPS-Trap sowie eine mangelnde Stabilisierung der Bindung zu LPS. Aus diesem Grund wurden diese Fragmente für die weiteren Untersuchungen wieder verlassen.

2. Die Probleme der biologischen Aktivität der Fc-Trap (mangelnde biologische Aktivität) wurden weiter untersucht. Um parallel in die in-vivo Versuche eintreten zu können, wurden die Fc-Trap mittels eines Adeno-viralen Gentransfer Modells zunächst in QBI293A-Zellen exprimiert. Der Überstand dieser Zellen zeigte im bekannten MonoMac6 Modell auch eine Inhibition, also in-vitro Funktionalität.. Mittels retrobulbärer Injetktion wurden darauf folgend Versuchstiere (Mäuse) transfiziert und dann mit LPS exponiert. Hier zeigte sich ein paradoxer Effekt, nämlich eine Verstärkung von proinflammatorischer Moleküle. Allerdings zeigte das Modell eine Reihe von Problemen: es zeigte sich initial eine gute Produktion der Fc-Trap, allerdings 4 Tage post transfektion ein rascher Abfall der Serumspiegel. Korrespondierend dazu fanden sich Antikörper gegen die Fc-Trap, so dass eine Inaktivierung und möglicherweise auch die verstärkende Wirkung auf die Produktion von Zytokinen schwer intterpretierbar ist.

Parallel zeigte sich in der Analyse der ursprünglich produzierten LPS-Fc-Trap eine Verunreinigung mit LPS. Dies ist vermutlich durch die hohe Affinität der Trap zu LPS zu erklären, erklärt parallel dazu aber auch die mangelnde biologische Aktivität des aufgereinigten Produkts.

In weiteren Versuchen mit den biologisch aktiven Überständen konnten die in-vitro Funktionsuntersuchungen fortgesetzt werden. Hier zeigte sich die Funktion der LPS-Trap-Fc als opsonierend für E. coli mit einer Verstärkung der Phagozytose.

Die weitere Aufreinigung des Moleküls zum Einsatz in einem Tiermodell und ggfs. in einem klinischen Einsatz wird in einem Folgeprojekt bearbeitet werden. Die Arbeitsergebnisse der zweiten Arbeitsperiode sind einer eingereichten Publikation zusammengefaßt worden (Gross et al.)

Publikationen:

1. Brandl K, Gluck T, Hartmann P, Salzberger B, Falk W. A designed TLR4/MD-2 complex to capture LPS. J Endotoxin Res 2005;11(4):197-206.
2. Brandl K, Gluck T, Huber C, Salzberger B, Falk W, Hartmann P. TLR-4 surface display on human monocytes is increased in septic patients. Eur J Med Res 2005;10(8):319-24.
3. Schnabl B, Brandl K, Fink M, et al. A TLR4/MD2 fusion protein inhibits LPS-induced pro-inflammatory signaling in hepatic stellate cells. Biochem Biophys Res Commun 2008;375(2):210-4.
4. Gross P , Brandl K, Dierkes C, Scholmerich J, Salzberger B, Gluck T, Falk W: The LPS-Trap-FC: A multifunctional agent to battle gram negative-bacteria. Infection and Immunity, submitted.

4.1.2 Funktion neutrophiler Granulozyten in der unspezifischen Abwehr von Mykobakterien

Neutrophile Granulozyten können zur direkten Eliminierung von Mykobakterien beitragen und spielen daher eine wesentliche Rolle in der unspezifischen Abwehr gegen diese Erreger. Wir konnten zeigen, dass mit *M. avium* infizierte Granulozyten chemotaktische Mediatoren für andere professionelle Phagozyten wie THP-1 Zellen sezernieren (und umgekehrt) und dass die Killingaktivität und Zytokinfreisetzung neutrophiler Granulozyten, ähnlich wie bei der klassischen Wirtszelle für Mykobakterien, dem Makrophagen, eine Korrelation mit der Virulenz der eingesetzten Stämme zeigt. Im weiteren Verlauf des Projektes sollen die durch *M. avium* in professionellen Phagozyten induzierten Mediatoren proteinbiochemisch analysiert und charakterisiert sowie ihre Funktion in einer möglichen Kooperation zwischen Granulozyten und Makrophagen in der Immunabwehr gegen *M. avium* ermittelt werden. Ferner soll in Anlehnung an das Makrophagenmodell untersucht werden, ob virulente *M. avium* der Abtötung durch neutrophile Granulozyten durch Manipulation der Phagolysosomenreifung entkommen können, oder ob sie möglicherweise nachdem sie phagozytiert wurden den Neutrophilen zerstören, um dann von einer geeigneten Wirtszelle aufgenommen zu werden.

Arbeitsprogramm und Ergebnisse der ersten Antragsperiode

Mauspassage von Mykobakterien, Mykobakterien Kulturen Zellkulturen, Genotypisierung und Generationszeitbestimmung der MAC Isolate

M. avium Stämme unterschiedlicher Virulenz (AIDS Isolate) wurden in Bezug auf verschiedene Parameter genauer charakterisiert:

Tabelle 1: Generationszeiten atypischer Mykobakterien (ermittelt nach der initialen Isolation)

Stamm	Herkunft	Klinik/Umwelt	Mittl. Generationszeit (h ± SD)
SCH 235	Blut DI	DI	16 ± 2
SCH 228	KM	AIDS/DI	18 ± 3,6
SCH 132	Blut	AIDS	20 ± 1,2
SCH 144	EDTA-KM		20 ± 1,2
SCH 193	Leber	AIDS/DI	21 ± 1,6
SCH 273	BAL		21 ± 1,1
1816	Wasser	Umwelt	23 ± 3
SCH 180	BAL		36 ± 8,8
SCH 187	EDTA-KM	DI	36 ± 9,5
3045	Wasser	Umwelt	58 ± 8,9
SCH 298	Sputum		58 ± 34,3
2442	Wasser	Umwelt	84 ± 26
SCH 281	BAL		123 ± 88,7
2895	Wasser	Umwelt	> 150 ± NA
1817	Wasser	Umwelt	> 190 ± NA

SCH 215	LK		> 200 ± NA

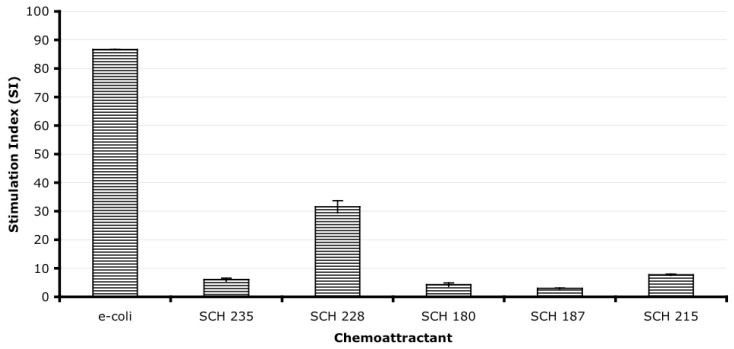
Legende: LK = Lymphknoten, BAL = Bronchoalveoläre Lavage, KM = Knochenmark, DI = Disseminierte Infektion, NA = nicht applizierbar i.S. von einem bakteriostatischem Effekt in mindestens einem Experiment.

Vergleichende funktionelle Untersuchungen von Granulozyten, THP-1 Zellen und Makrophagen nach Exposition zu Mykobakterien unterschiedlicher Virulenz

Respiratory Burst Activity

Die Produktion toxischer Sauerstoffadikale (*oxygen burst*) nach Exposition zu MAC unterschiedlicher Virulenz wurde für Granulozyten von verschiedenen Spendern bestimmt. Der Stimulationsindex (Quotient aus O2- Produktion stimulierter Zellen und dem ruhender Zellen) war für alle getesteten Stämme im Vergleich mit E. coli eher niedrig. Herausragend war lediglich der Stamm SCH 228, ein *M. avium* Isolat, das aus dem Knochenmark eines AIDS Patienten isoliert wurde (Fig.1). Die im Vergleich mit den anderen *M. avium* Isolaten starke O2- Induktion durch SCH 228 korreliert mit dessen Potential als Chemoattraktant für neutrophile Granulozyten

Fig.1: Superoxidproduktion neutrophiler Granulozyten nach Exposition mit MAC unterschiedlicher Virulenz



Chemotaxis

Mit der von uns angewandten Methode der Untersuchung des Migrationsverhaltens mit Fluoreszenz-gefärbten Zellen (Calcein-AM) in der 96 Multiwell Chemotaxis Kammer konnten wir zeigen, dass alle untersuchten AIDS Isolate von *M. avium* potente Chemoattraktanten für neutrophile Granulozyten bzw. THP-1 Zellen sind, es lässt sich aber keine klare Korrelation zur Virulenz erkennen. Dies gilt für lebende wie auch für hitzeinaktivierte Isolate. Ein signifikanter Unterschied zeigt sich bei den Neutrophilen lediglich für den Stamm niedrigster Virulenz (SCH 215) gegenüber den beiden Stämmen höchster Virulenz (SCH 235 und SCH 228) (Fig. 2).

Untersuchungen zu einer möglichen Interaktion von Neutrophilen und monozytären Zellen in der Abwehr von M.avium

Granulozyten, die mit virulenten Isolaten von *M. avium* infiziert wurden sind potente Chemoattraktanten für THP-1 Zellen (Fig 2). Chemoattraktivität im Bezug auf THP-1 Zellen konnte auch für die Überstände von mit *M. avium* infizierten neutrophilen Granulozyten gezeigt werden. Hier zeigt sich zudem eine Kinetik für die unterschiedlichen Zeitpunkte zu denen die Überstände nach Infektion gewonnen wurden. Die Überstände nach der längsten Inkubationszeit zeigen die höchst chemoattraktive Potenz. Dies impliziert, dass Granulozyten nach Infektion mit *M. avium* einen Mediator sezernieren, der eine Stabilität von mindestens 120 min (max. Inkubationszeit) hat (Fig 3). Die Spezifität dieses Phänomens für Mykobakterien wurde durch Kontrollexperimente mit Latexbeads und *E. coli* bewiesen.

Fig. 2:

Chemotaxis von THP-1 Zellen gegen *M.avium* und gegen mit *M.avium* infizierte neutrophile Granulozyten

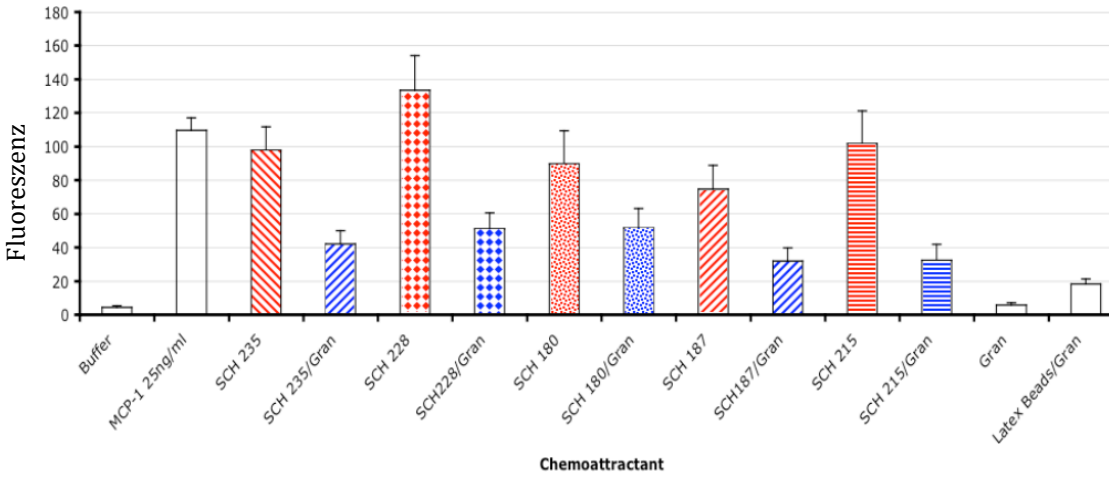
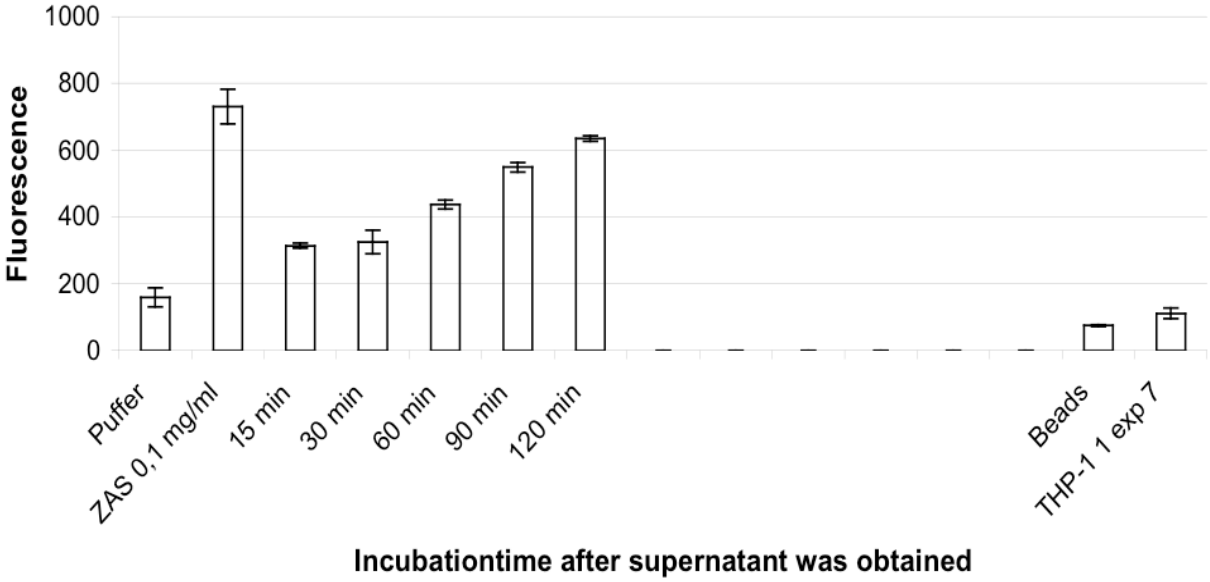


Fig.1: Chemotaxis von THP-1 Zellen gegen *M.avium* Stämme unterschiedlicher Virulenz (rot) und gegen mit *M.avium* infizierte neutrophiler Granulozyten (blau). Die Virulenz der eingesetzten Stämme nimmt von links nach rechts ab.

Fig. 3:

Chemotaxis neutrophiler Granulozyten gegen Überstände von mit *M. avium* infizierten THP-1 Zellen.



„Umkehrexperimente“ zeigen ähnliche Resultate für die Infektion von THP-1 Zellen mit *M. avium*, die ebenfalls potente Chemoattraktanten für neutrophile Granulozyten sezernieren (Fig. 4). Eine Korrelation zwischen der Inkubationszeit der THP-1 Zellen und der chemotaktischen Potenz ihrer Überstände ließ sich allerdings nicht feststellen.

Fig. 4

Chemotaxis neutrophiler Granulozyten gegen *M.avium* und gegen mit *M.avium* infizierte THP-1 Zellen

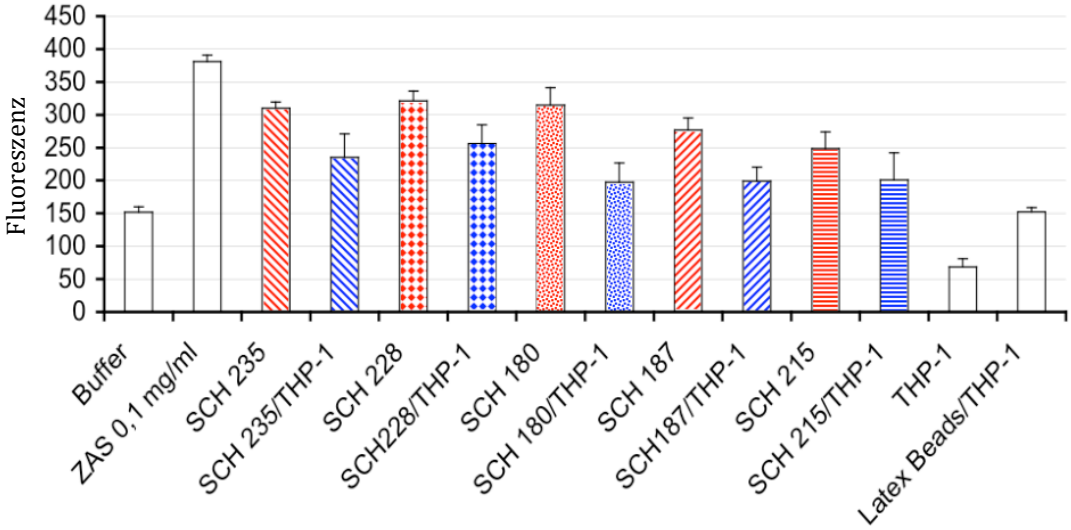


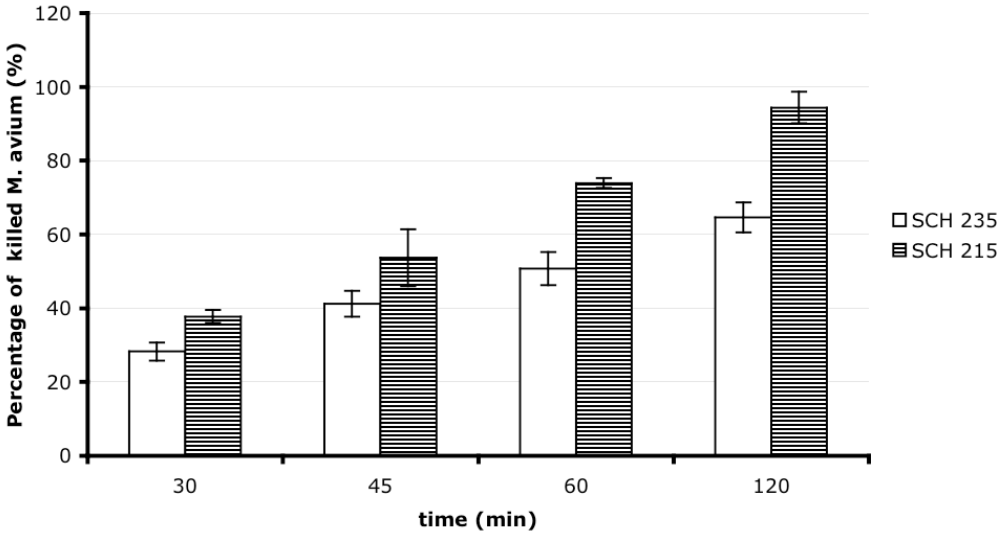
Fig.4: Chemotaxis von Neutrophilen gegen *M.avium* Stämme unterschiedlicher Virulenz (rot) und gegen mit *M.avium* infizierte THP-1 Zellen (blau). Die Virulenz der eingesetzten Stämme nimmt von links nach rechts ab.

Killing von M. avium durch neutrophile Granulozyten

Der Einfluss der Virulenz der pathogenen AIDS Isolate von *M. avium* auf die Killingkapazität neutrophiler Granulozyten wurde untersucht. Wir konnten zeigen, dass, ähnlich wie im Makrophagen, niedrig virulente Stämme schneller eliminiert werden als hoch virulente Stämme (Fig.5). Dies lässt

vermuten, das *M. avium* den Neutrophilen aktiv in seiner Killingaktivität beeinflussen kann. Ob dies, wie im Makrophagen ein Einfluss auf die phagolysosomale Reifung ist soll im weiteren Verlauf des Projektes untersucht werden.

Fig. 5 Killing von *M. avium* durch neutrophile Granulozyten



Untersuchung der Korrelation der Virulenz von M. avium mit der Zytokininduktion in verschiedenen professionellen Phagozyten

Die Induktion verschiedener Zytokine als Aktivierungsmarker für professionelle Phagozyten wurde in den Überständen von mit *M. avium* infizierten Makrophagen, THP-1 Zellen und Granulozyten mittel ELISA bestimmt.

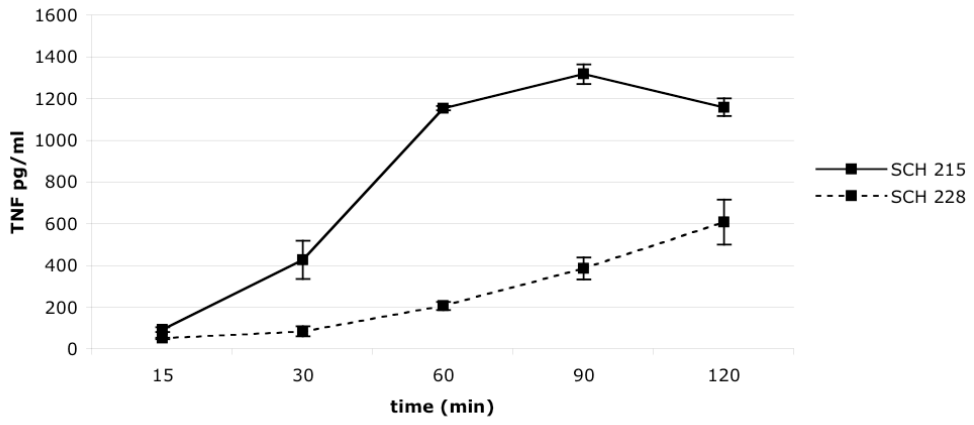
Entsprechend der Tatsache, dass sich alle AIDS Isolate von *M.avium*, wenn auch über sehr unterschiedliche Zeiträume, in Abhängigkeit von ihrer Virulenz in Makrophagen propagieren ließen, waren in den Überständen der infizierten Makrophagen bei 0, 24 und 48h nur wenige niedrig konzentrierte Zytokine nachzuweisen.

IL-12 konnte gar nicht nachgewiesen werden. Eine schwache Induktion erfolgte für INF-γ und IL-10, wobei die quantitative Induktion beider Zytokine keine Korrelation mit der Virulenz der eingesetzten *M. avium* Isolate zeigte. Die Konzentration von IL-6 nahm für alle Stämme nach Infektion mit *M. avium* ab, auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen. NO_3^- wurde bis zu einem Maximum von 900 pg/ml induziert, NO_2^- wurde jedoch kaum nachgewiesen, was mit der niedrigen Killingaktivität der Makrophagen korrelierte. Ein signifikanter Unterschied für die verschiedenen Isolate konnte auch hier nicht ermittelt werden.

Anders als in reifen Makrophagen konnten wir in der monozytären Zelllinie THP-1 eine zur Virulenz umgekehrt proportionale Induktion für die Zytokine TNF und IL-6, sowie für die Induktion von NO_2^- /NO_3^- zeigen (Fig.6)

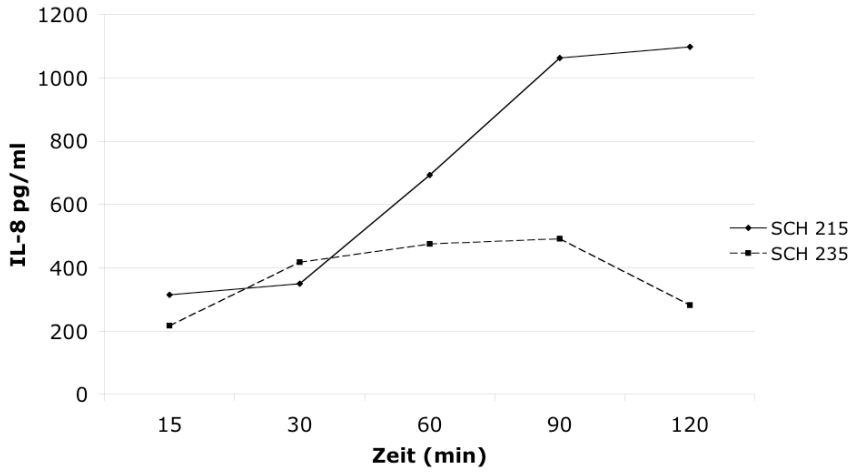
Fig.6

TNF-Induktion nach Infektion von THP-1 Zellen mit einem niedrig- (SCH 215) und einem hochvirulenten *M. avium* Isolat



In Granulozyten konnten wir über einen Zeitraum von 2 h nach Infektion mit *M. avium* einen signifikanten Anstieg der Zytokine IL-1 und IL-8 nachweisen. Dabei zeigt sich für IL 8 eine umgekehrt proportionale Induktion zur Virulenz (Fig. 7). Die stärkere Induktion des Aktivierungsmarkers IL-8 durch die niedrig virulenten Stämme korreliert mit ihrer effektiven Abtötung durch neutrophile Granulozyten. GRO-α und TGF-β konnten zumindest im Zeitraum von 120 min. nur in geringen Mengen nachgewiesen werden.

Fig. 7 Induktion von IL-8 in neutrophilen Granulozyten



Arbeitsprogramm und Ergebnisse der zweiten Antragsperiode

Charakterisierung der chemoattraktiven Fraktionen von mit *M. avium* infizierten Granulozyten bzw. THP-1 Zellen und ihrer Überstände

Wir konnten zeigen, dass *M.avium* Isolate lebend, oder hitze-inaktiviert potente Chemoattraktanten für Granulozyten und THP-1 Zellen sind. Dies gilt auch für M. avium infizierte Granulozyten, die THP-1 Zellen anziehen, und im Umkehrexperiment sind infizierte THP-1 Zellen chemoattraktiv für Granulozyten. Ebenso sind die steril filtrierten Überstände von mit *M. avium* infizierten Granulozyten potente Chemoattraktanten für THP-1 Zellen und vice versa. Keines, der von Granulozyten und THP-1 Zellen sezernierten Zytokine besitzt eine direkte chemotaktische Potenz.

Bei der Charakterisierung des migrationsinduzierenden Faktors im Überstand von mit *M. avium* infizierten THP-1 Zellen mit SDS Page , MALDI und Westernblot ließ sich in allen Untersuchungen humanes heat shock protein 70 (HSP70) nachweisen. Rekombinantes HSP70 allerdings hat keinen chemotaktischen Effekt auf neutrophile Granulozyten.

Dies legt nahe, daß HSP70 an das zu identifzierende Protein bindet. Da diese Bindung nach den bisherigen Experimenten sehr stabil ist, wurden die Überstände zunächst durch size-exclusion Chromatographie aufgeteilt. Hierbei zeigte sich, daß die Fraktion mit Größen von 50-100kD den größten chemoattraktiven Effekt zeigt ($p<0.001$) In den weiteren Untersuchungen zeigte sich ein Protein im 71kD Bereich das es nun gilt weiter zu charakterisieren.

Hierzu sollen weiter MALDI-TOF- und in Kooperation mit Prof. J. Schultze, Bonn, Untersuchungen zur Transkriptomanalyse von M.avium infizierten Granulozyten fortgesetzt werden.

Untersuchungen zur Phagosolysosomen-Reifung und Zellvitalität an *M. avium* infizierten neutrophilen Granulozyten

Diese Untersuchungen mittels Fluoreszenzmikroskopie abgeschlossen. Hier zeigt sich ein klarer Unterschied zwischen der phagosomalen Prozessierung von hochvirulenten und niedrig virulenten *M. avium* Isolaten im neutrophilen Granulozyten. Während hochvirulente AIDS-Isolate nur partiell in das reife Phagolysosom prozessiert werden erfolgt diese Prozessierung für niedrig virulente Umwelt-Isolate regelhaft. Um diese Daten für ihre Publikation über jdn Zweifel zu erheben, wird die phagosomale Prozessierung derzeit noch elektronenmikroskopisch dargestellt. Diese Resultate korrelieren mit der in Teilziel 3 untersuchten intrazellulären Abtötung. Hochvirulente Isolate werden nur partiell abgetötet, während die niedrigvirulenten Isolate vollständig in den Neutrophilen abgetötet werden.

Vergleich der Neutrophilenantwort auf virulente AIDS-Isolate und Umwelt-Isolate von *M.avium*

Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass virulente M.avium Stämme im Vergleich mit nicht virulenten Stämmen durch eine differentielle Zytokininduktion der intrazellulären Abtötung durch neutrophile Granulozyten entziehen können.

Publikationen

Hartmann, P., Sperl, F., Robinson, N., Rybniker, J., Plum, G., Franzen, C.: Cytokine secretion, phagosomal maturation and killing capacity of human neutrophils is differentially influenced by virulent and avirulent strains of *Mycobacterium avium*. Infection and Immunity (submitted)

4.1.3 Zellinfektion, Virulenz und Zytokininduktion von Mikrosporidien in professionellen und nicht professionellen Phagozyten und im Maus-Modell

Mikrosporidien sind obligat intrazelluläre Parasiten, die als Erreger schwerer Infektionen bei immundefizienten Patienten beobachtet wurden. Die Sporen von Mikrosporidien verfügen über einen speziellen Polfaden, der unter geeigneten Bedingungen aus den Sporen herausgeschleudert wird und so in neue Wirtszellen eindringen kann. Durch diesen Polfaden gelangt das infektiöse Sporoplasma aus den Sporen in das Zytoplasma der Wirtszelle. Wir haben gezeigt, dass zusätzlich die Phagozytose von Sporen für die Infektion der Zellen von Bedeutung ist. Die phagozytierten Sporen können jedoch das Phagosom, das weiter zum Lysosom reift, mit Hilfe des Polfadens verlassen und so das Zytoplasma der Wirtszelle infizieren. Im weiteren Verlauf des Projektes sollen die Untersuchungen zur Zellinfektion auf primäre gastrointestinale Zellen (Epithelzellen und Makrophagen) sowie auf M-Zellen und Zellen mit einer Störung der endosomalen/lysosomalen Reifung ausgeweitet werden. Des weiteren soll untersucht werden, ob die Phagozytose der Mikrosporidiensporen zur einer Verringerung proliferierender Infektionen in den Zellen oder über die Aufnahme von Sporen, die dann das Phagosom wieder verlassen, zu einer Zunahme der Infektiösität kommt. Um den gesamten Entwicklungszyklus der Mikrosporidien intrazellulär darzustellen, sollen stadienspezifische monoklonale Antikörper hergestellt werden, und die Zellinfektion und weitere intrazelluläre Entwicklung der Parasiten soll sowohl an einem dreidimensionalen Sphäroidmodell als auch durch „real time“ Videomikroskopie untersucht werden.

Arbeitsprogramm und Ergebnisse der ersten Antragsperiode

Aufklärung der Mechanismen der Zellinfektion durch Mikrosporidien bei professionellen und nicht professionellen Phagozyten

Durch die Doppelimmunfluoreszenzfärbung (siehe Abb. 1) mit den von uns hergestellten polyklonalen Kaninchenantiseren gegen *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis* und *V. corneae* war es möglich zwischen intrazellulären und extrazellulären Sporen bzw. Sporenanteilen zu unterscheiden (Abb. 1a/b, 2). Wir konnten zeigen, dass die Infektion der Zellen sowohl von außen durch Injektion des Polfadens (Abb. 1c) als auch von innen aus den Phago-/Endo-/Lysosomen heraus als eine Art „escape“ Mechanismus, ebenfalls mit Hilfe des Polfadens, erfolgt (Abb. 1d). Elektronenmikroskopisch konnten wir zeigen, dass die Membran der Phago-/Endo-/Lysosomen den aufgenommenen Mikrosporidiensporen sehr eng anliegt, so dass eine Infektion der Zelle durch Ejektion des Sporoplasmas in den Phagosomen ohne Penetration der Membran nicht sehr wahrscheinlich erscheint. Ob darüber hinaus eine Phagozytose eines zuvor ejezierten Sporoplasmas erfolgt kann z.Z. nicht bestätigt oder ausgeschlossen werden, da alle bisherigen Untersuchungen in einem statischen Modell zu bestimmten Zeitpunkten erfolgt sind. Hiermit ist es nicht möglich zwischen der Phagozytose eines zuvor ejezierten Polfadens und der Invagination oder Penetration der Membran durch den sich austülpenden Polfaden zu unterscheiden. Die genaue Untersuchung dieses Mechanismus soll deshalb durch „real time“ Untersuchungen an lebenden Zellen mit vitalen Mikrosporidien im weiteren Verlauf des Projektes durchgeführt werden (s.u.).

Die Rate der Zellinfektion ließ sich durch Hemmung der Phagozytose beeinflussen und nach Blockierung mit Cytochalasin wurden deutlich weniger Mikrosporidiensporen und bei höheren Konzentrationen gar keine Sporen mehr von den Zellen aufgenommen. Die Phagosomen mit den aufgenommen Mikrosporidiensporen reifen weiter zu Endosomen und dann zu Lysosomen was durch Kolokalisation von intrazellulären Sporen mit endo-/lysosomalen Markern (LAMP-1, LAMP-2, CD68, Cathepsin B und D, rab7, rab5) nachgewiesen werden konnte. Dies gilt sowohl für professionelle Phagozyten als auch für alle anderen untersuchten nicht professionellen Phagozyten.

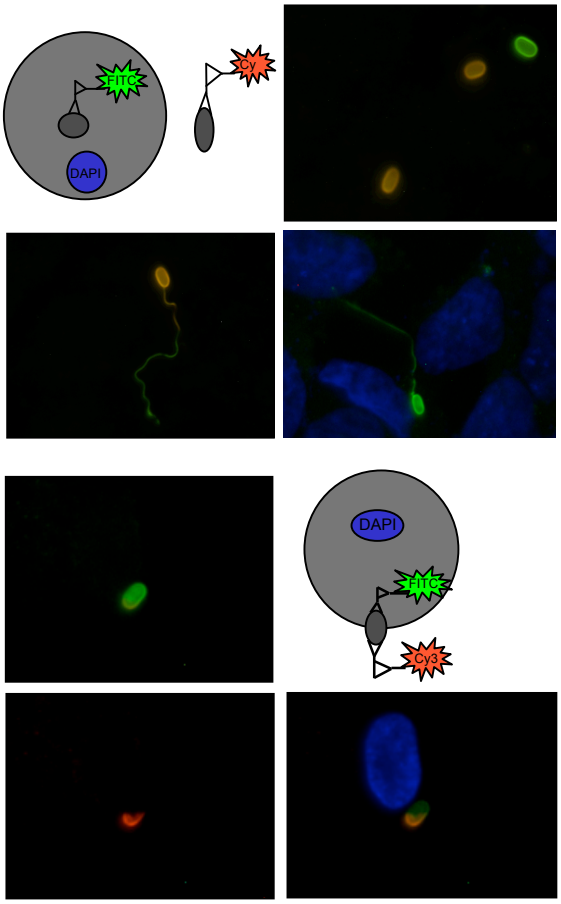


Abb. 1. Intrazelluläre und extrazelluläre Mikrosporidiensporen (differentielle Immunfluoreszenz) bzw. Anteile von Sporen. a. Färbeprinzip, b. intra- und extrazelluläre Sporen, c. extrazelluläre Sporen mit in die Zelle injiziertem Polfaden, d. intrazelluläre Spore mit ejeziertem Polfanden.
Abb. 2. Phagozytierende Zelle

In professionellen Phagozyten (humanen Makrophagen, THP-1 Zellen, Mono-Mac 6 Zellen) erfolgt nach der Aufnahme ein vollständiger Abbau der aufgenommenen Mikrosporidiensporen, und im weiteren Verlauf bildet sich keine intrazelluläre Infektion mit proliferierenden Parasiten in diesen Zellen aus. Auch in den nicht professionellen Phagozyten kommt es in den Endo-/Lysosomen zunächst zu einem Abbau der intrazellulären Sporen, doch im weiteren Verlauf etabliert sich eine Infektion in

diesen Zellen. Es kann davon ausgegangen werden, dass nur die Infektion von außen durch den Polfaden und die Infektion aus den Phago-/Endo-/Lysosomen heraus zu einer proliferierenden Infektion in den Zellen führt. Da die von uns verwendeten polyklonalen Kaninchenantiseren neben den Sporen zwar offensichtlich auch mit Sporoblasten, nicht aber mit Meronten und Sporonten (den früheren Stadien des Entwicklungszyklus), reagieren, kann die sich in den Zellen neu bildende Infektion erst ab dem Zeitpunkt, wenn Sporoblasten gebildet werden, verfolgt werden. Aus diesem Grund sollen im weiteren Verlauf des Projektes stadienspezifische monoklonale Antikörper gegen Meronten, Sporonten, Sporoblasten und Sporen produziert werden, um so den gesamten Entwicklungszyklus der Mikrosporidien intrazellulär darzustellen. Die Vakuolen, die die sich neu entwickelnden intrazellulären Mikrosporidien umgeben (parasitophore Vakuolen), ließen sich nicht mit endo-/lysosomalen Markern anfärben. Es muss also zwischen den Vakuolen, die die phagozytierten Sporen umschließen (Phago-/Endo-/Lysosomen), und den Vakuolen, in denen die Entwicklung der Parasiten stattfindet (parasitophore Vakuolen), unterschieden werden. Eine Entstehung der parsitophoren Vakuole aus den Phagosomen, wie von einigen Gruppen angenommen, kann nach unseren Ergebnissen ausgeschlossen werden. Die Entstehung und der Zeitpunkt der Entstehung der parasitophoren Vakuole im Entwicklungszyklus ist somit weiterhin unklar und soll im weiteren Verlauf des Projektes untersucht werden.

Welche Rolle die Phagozytose von Mikrosporidien in Bezug auf die Abwehrmechanismen gegen die Parasiten spielt ist zur Zeit noch unklar. Auf der einen Seite stellt die Phagozytose von Mikrosporidiensporen möglicherweise einen effektiven Abwehrmechanismus durch die Verringerung von infektiösen Sporen dar. Auf der anderen Seite kann es sein, dass dadurch, dass es den Mikrosporidien gelingt aus den Phago-/Endo-/Lysosomen zu entkommen, es zu mehr intrazellulären Infektionen kommt als ohne Phagozytose. Dies würde bedeuten, dass die Phagozytose zur Infektiösität der Mikrosporidien beiträgt bzw. ihre Infektiösität erhöht. Diese Frage soll ebenfalls im weiteren Verlauf des Projektes untersucht werden.

Bestimmung der Virulenz und Zytokin- bzw. NO_2^- Induktion von Mikrosporidien

Alle untersuchten Zelllinien nahmen Mikrosporidiensporen auf, jedoch war die Zahl der intrazellulären Sporen zu bestimmten Zeitpunkten bei allen Zellen unterschiedlich. Am besten wurden Mikrosporidiensporen aller untersuchten Spezies von professionellen Phagozyten (humanen Makrophagen, THP-1 Zellen, MonoMac 6 Zellen) aufgenommen. Bei den anderen Zellen war die Rate der aufgenommenen Sporen auch von der jeweiligen Mikrosporidienspezies abhängig. Ein eindeutiger Tropismus einer bestimmten Spezies zu einer bestimmten Zelle, die auch mit dem klinischen Bild das diese Parasiten hervorrufen korreliert, ließ sich jedoch nicht feststellen.

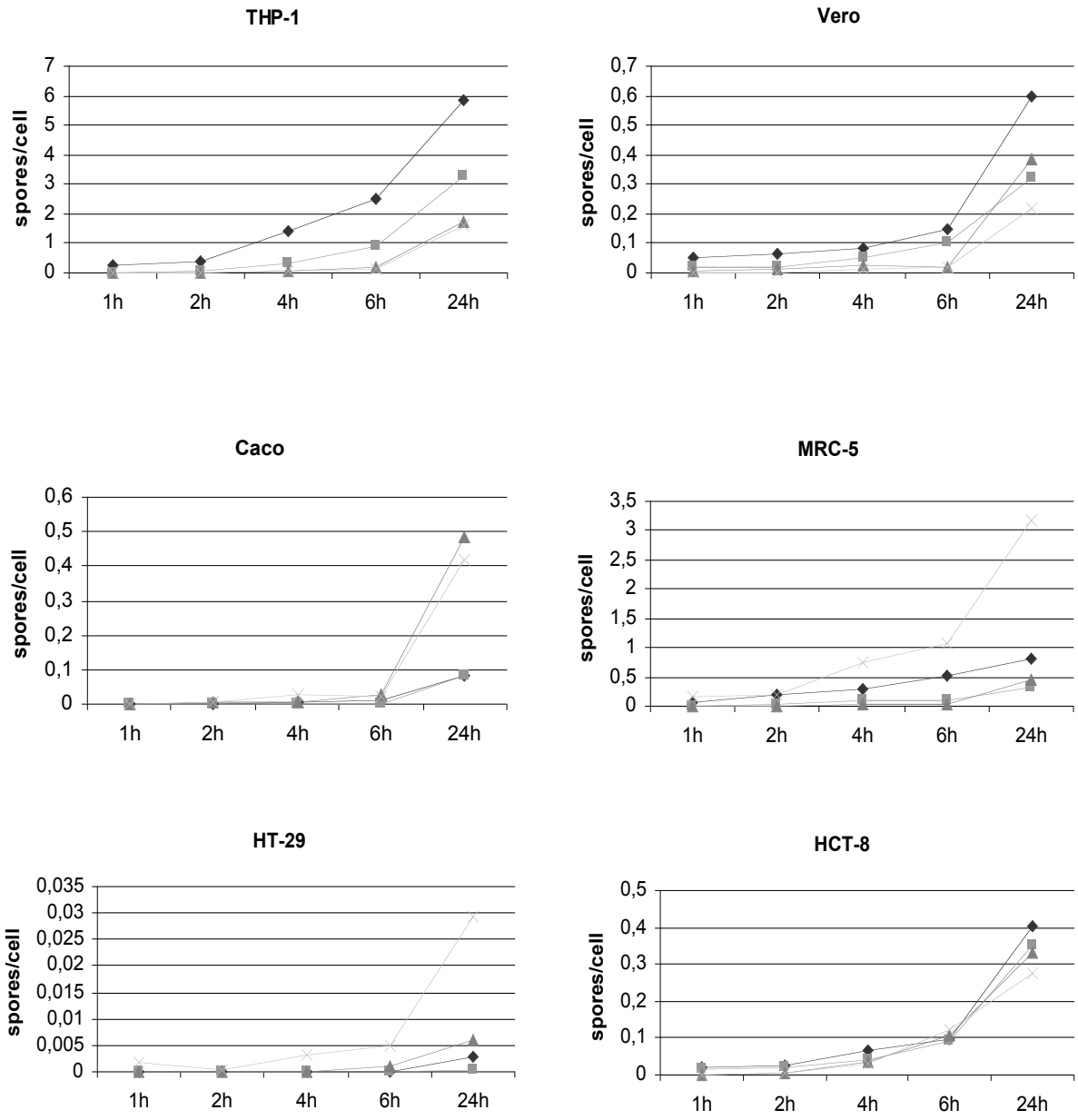


Abb. 3. Aufnahme von Mikrosporidiensporen unterschiedlicher Spezies durch professionelle (THP-1 Zellen) und nicht professionelle Phagozyten (Vero, Caco-2, MRC-5).

Zur einfacheren Quantifizierung von intrazellulären Mikrosporidiensporen wurde, wie im Antrag vorgesehen, eine flowzytometrische Methode entwickelt, die eine schnelle und einfache Quantifizierung von intrazellulären Mikrosporidiensporen erlaubt. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an intrazellulären Mikrosporidiensporen sowohl mit der Anzahl der eingesetzten Sporen als auch über die Zeit kontinuierlich zunimmt. Die Zuverlässigkeit der Methode wurde durch zahlreiche Vergleiche mit der Fluoreszenzmikroskopie belegt und die Werte beider Methoden zeigten eine sehr gute Übereinstimmung.
Hinsichtlich der Induktion von proinflammatorischen Zytokinen und toxischen Sauerstoffmetaboliten ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Mikrosporidienspezies feststellen.

Infizierte humane Makrophagen reagierten auf die Aufnahme von Mikrosporidiensporen mit der Produktion von IL-10, TNF-α und INF-γ wohingegen die Produktion von toxischen Sauerstoffmetaboliten im Zellkulturüberstand im Verhältnis zur Zahl der aufgenommenen Mikrosporidiensporen eher abnahm.

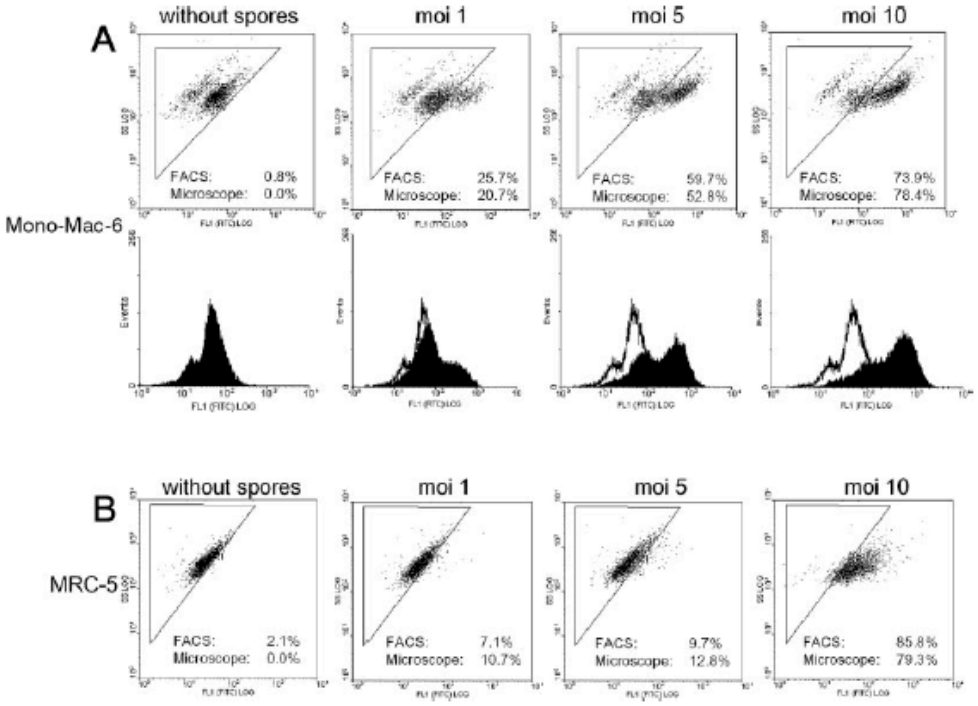


FIG. 2. FCM analysis of intracellular microsporidian spores in Mono-Mac-6 (A) and MRC-5 cells (B). Cells were incubated for 24 hr with 0, 1, 5, and 10 spores per cell. Cells were harvested, fixed, stained, and analyzed as described in Materials and Methods. The percentage of infected cells was first determined by FCM, with the indicated percentages representing the proportions of cells outside the region of background fluorescence defined by the triangle, and then by examination of at least 500 cells with a fluorescence microscope.

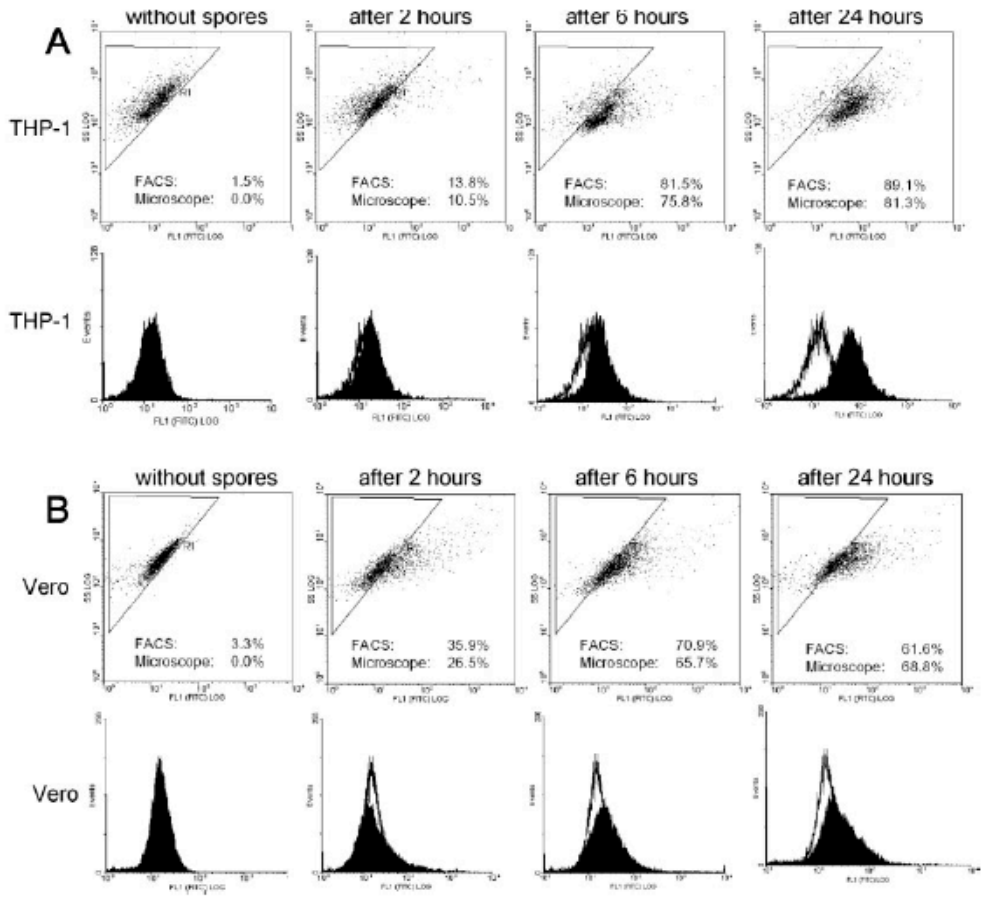


FIG. 3. FCM analysis of intracellular microsporidian spores in THP-1 (A) and Vero cells (B). Noninfected cells and infected cells (10 spores per cell) were stained and analyzed as described in Materials and Methods, after 2, 6, and 24 hr. Internalization of microsporidian spores by THP-1 and Vero cells is demonstrated by a progressive fluorescence shift over time. The percentage of infected cells was first determined by FCM, with the indicated percentages representing the proportions of cells outside the region of background fluorescence defined by the triangle, and then by examination of at least 500 cells with a fluorescence microscope.

Arbeitsprogramm und Ergebnisse der zweiten Antragsperiode

Untersuchung der Zellinvasion von Mikrosporidien an primären gastrointestinalen Zellen, Sphäroiden, M-Zellen und Zellen mit einem Defekt in der endo-/lysosomalen Reifung

Die bisherigen Untersuchungen wurden vorwiegend mit Zelllinien durchgeführt. Diese Zelllinien können sich eventuell sehr von primären Zellen unterscheiden, so dass die Untersuchungen zur Zellinvasion an primären gastrointestinalen Epithelzellen und gewebsständigen Kolonmakrophagen wiederholt werden sollen.

Alle bisher durchgeführten Untersuchungen wurden mit Monolayerkulturen durchgeführt. Da wir jedoch zeigen konnten, dass über den Polfaden die Infektion von Zelle zu Zelle weiterwandern kann, soll die Ausbreitung der Infektion in einem dreidimensionalen Sphäroidmodell untersucht werden. Ein solches Modell wird auch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen sehr vereinfachen, da sich die elektronenmikroskopische Untersuchung von Monolayerkulturen als ein sehr zeitaufwendiges und nur schlecht praktikables Verfahren gezeigt hat.

Überraschenderweise ließen sich gerade gastrointestinale Zelllinien (HCT-8, HT-29, Caco-2) nur sehr schlecht mit Mikrosporidien infizieren. M-Zellen stellen im intestinalen Epithel die wesentliche Zelle dar, durch die Antigene und auch Krankheitserreger in die darunter liegende Lamina propria gelangen. Es soll deshalb die Infektion bzw. Translokation von Mikrosporidien durch M-Zellen an einem in vitro Modell untersucht werden.

Welche Rolle die Reifung der Phagosomen zur Endo- bzw. Lysosomen in der Etablierung einer intrazellulären Infektion durch Mikrosporidien spielt, soll mit Zellen, die Defekte in der Reifung der Phagosomen zu Endosomen bzw. Lysosomen aufweisen, untersucht werden.

Bedeutung der Phagozytose für die Entwicklung einer intrazellulären Infektion

Die Bedeutung der Phagozytose von Sporen für die Infektiösität der Mikrosporidien hat ist bislang unklar (Abwehrmechanismus durch Reduktion der infektiösen Sporen oder Erhöhung der Infektiösität durch Infektion der Zelle aus den Phago-/Endo-/Lysosomen heraus). Deshalb wurde die Rate der in den Zellen proliferierenden Parasiten mit und ohne Hemmung der Phagozytose bzw. an Zellen mit einem Defekt in der endosomalen bzw. lysosomalen Reifung (s.o.) untersucht werden. Durch Infektionsversuche unter Hermmung der Phagozytose sowie an Zellen mit einer blockierten endo-/lysosomalen Reifung konnte gezeigt werden, dass sowohl die Phagozytose als auch die Infektion der Zellen von aussen etwa zu gleichen Teilen an der Zellinfektion betteiligt sind. Diese Ergebnisse unterstützen quantitativ den neuen Mechanismus der Zellinfektion der in der ersten Förderperiode gezeigt wurde.

Infektionsmodell mit M-Zellen und primären gastrointestinalen Epithelzellen

An Infektionsversuchen mit einem M-Zell Modell zeigte sich, dass diese Zellen Mikrosporidien sehr effektiv aufnehmen können und sie, ohne sie zu zerstören, hindurchschleusen können. Die Untersuchungen zur Zellinvasion wurden auf primäre gastrointestinale Zellen ausgeweitet, doch waren die Zellen leider nicht lange genug lebensfähig, um verlässliche Aussagen über die Infektionsrate zu machen

Herstellung stadienspezifischer monoklonaler Antikörper gegen E. cuniculi.

Die von uns hergestellten und verwendeten polyklonalen Kaninchenantiseren reagieren gut mit Sporen und den Polfäden aus den Sporen und offensichtlich auch mit Sporoblasten aber nicht mit Meronten und Sporonten (den frühen Stadien des Entwicklungszyklus), so dass nach der Ejektion des Polfadens eine Lücke in der Untersuchung des Entwicklungszyklus besteht. Aus diesem Grund sollen stadienspezifische monoklonale Antikörper gegen die unterschiedlichen Stadien des Entwicklungszyklus (Meronten, Sporonten, Sporoblasten und Sporen) von E. cuniculi produziert werden und mit ihnen die Zellinvasion und die intrazelluläre Entwicklung untersucht werden. Die Untersuchung der stadienspezifichen Entwicklung zeigte sich als relativ schwierig. Es gelang die Etablierung stadienspezifischer Antikörper gegen Sporonten, unreife und reife Sporen, jedoch nicht gegen Meronten. Auch die Vitalfärbung der Mikrosporidien bereitete erhebliche Schwierigkeiten, so das bisher eine Real-time Videomikroskopie zur Untersuchung der Infektions- und Entwicklungszyklen nicht etabliert werden konnte.

Marker für die Resistenz gegen Benzimidazole

In einer weiteren Untersuchung der genetischen Charakterisierung des genetischen Codes von Vittaformae cornea gelang der Nachweis von Mutationen, die in anderen Microsporidienspezies Resistenzen gegen Benzimidazole vermitteln. Diese Resistenz zeigte sich auch in in-vitro Experimenten.

Publikationen der zweiten Antragsperiode:

1. Franzen C, Muller A, Hartmann P, Salzberger B. Quantitation of microsporidia in cultured cells by flow cytometry. Cytometry A 2004;60(1):107-14.
2. Franzen C. How do microsporidia invade cells? Folia Parasitol (Praha) 2005;52(1-2):36-40.
3. Franzen C, Fischer S, Schroeder J, et al. In vitro cultivation of an insect Microsporidian Tubulinosema ratisbonensis in mammalian cells. J Eukaryot Microbiol 2005;52(4):349-55.
4. Franzen C, Fischer S, Schroeder J, Scholmerich J, Schneuwly S. Morphological and molecular investigations of Tubulinosema ratisbonensis gen. nov., sp. nov. (Microsporidia: Tubulinosematidae fam. nov.), a parasite infecting a laboratory colony of Drosophila melanogaster (Diptera: Drosophilidae). J Eukaryot Microbiol 2005;52(2):141-52.
5. Franzen C, Hartmann P, Salzberger B. Cytokine and nitric oxide responses of monocyte-derived human macrophages to microsporidian spores. Exp Parasitol 2005;109(1):1-6.
6. Franzen C, Hosl M, Salzberger B, Hartmann P. Uptake of Encephalitozoon spp. and Vittaforma corneae (Microsporidia) by different cells. J Parasitol 2005;91(4):745-9.
7. Franzen C, Muller A, Hartmann P, Salzberger B. Cell invasion and intracellular fate of Encephalitozoon cuniculi (Microsporidia). Parasitology 2005;130(Pt 3):285-92.
8. Franzen C, Futerman PH, Schroeder J, Salzberger B, Kraaijeveld AR. An ultrastructural and molecular study of Tubulinosema kingi Kramer (Microsporidia: Tubulinosematidae) from Drosophila melanogaster (Diptera: Drosophilidae) and its parasitoid Asobara tabida (Hymenoptera: Braconidae). J Invertebr Pathol 2006;91(3):158-67.
9. Franzen C, Nassonova ES, Scholmerich J, Issi IV. Transfer of the members of the genus Brachiola (microsporidia) to the genus Anncaliia based on ultrastructural and molecular data. J Eukaryot Microbiol 2006;53(1):26-35.
10. Futerman PH, Layen SJ, Kotzen ML, Franzen C, Kraaijeveld AR, Godfray HC. Fitness effects and transmission routes of a microsporidian parasite infecting Drosophila and its parasitoids. Parasitology 2006;132(Pt 4):479-92.
11. Franzen C, Salzberger B. Analysis of the beta-tubulin gene from Vittaforma corneae suggests benzimidazole resistance. Antimicrob Agents Chemother 2008;52(2):790-3.

4. 1.4a Respiratorische Virusinfektionen-Epidemiologie, Prävention und Intervention in einer Kohorte immundefizienter Patienten

In einer grossen Kohorte von Patienten aus dem Klinikum der Universität Regensburg soll die Epidemiologie (Häufigkeit, Spektrum, Komplikationen und Risikofaktoren) respiratorischer Virusinfektionen bei Patienten mit Immundefekt bzw. unter immunsuppressiver Therapie prospektiv untersucht werden.

Ein mehrstufiges Präventionsprogramm soll implementiert und evaluiert werden. Im ersten Teil soll die Kohorte mitsamt der Methodik etabliert und eine hohe Anwendungsrate der Influenza-Impfung erzielt werden, im zweiten Schritt sollen weitere Präventionsmaßnahmen randomisiert geprüft werden.

Immunologische Risikokonstellationen sowie die spezifische zelluläre Immunität gegen diese Infektionen werden prospektiv und longitudinal in der Kohorte untersucht. Hierbei sollen vor allem Einflüsse verschiedenener Immunsuppressiva auf die spezifische zelluläre Immunität und die Immunrekonstitution nach Reduktion der Immunsuppression bestimmt werden.

Nach der Etablierung der Erfassung respiratorischer Virusinfektionen und der Präventionsprogramme in dem Kollektiv immundefizienter bzw. -supprimierter Patienten soll in der zweiten Antragsperiode dieses Projekt zu einem regionalen Erfassungs- und Präventionsprojekt erweitert werden.

Aufgrund der mehrfachen Revisionen des ersten Antragsteils konnte die prospektive Erfassung der Influenzasaison nicht wie geplant im Jahre 2002 stattfinden. Als erster Schritt in für die Etablierung des aktivierten Impfprogrammes wurde deshalb die Impfeinstellung bei Ärzten, die die ausgewählten Ambulanzen betreuen, untersucht um hier möglicherweise intervenieren zu können. In der ersten Saison die Impfeinstellung von Internisten in den Kliniken I und II für innere Medizin des Universitätsklinikums Regensburg untersucht. Es wurden allen Ärzte ein anonymer Fragebogen ausgehändigt, auf dem Wissensfragen zu Impfindikationen, Effektivität der Impfung, Kosteneffektivität und Nebenwirkungen der Impfungen als multiple-choice- Fragen verzeichnet waren

Ferner wurden die Rationalen zu Impfempfehlungen für spezifische Patientengruppen und für die eigene Person abgefragt, sowie die Häufigkeit der Impfung bei den Befragten selbst und in ihrer Familie in den letzten Jahren. Der Fragebogen wurde mit freundlicher Genehmigung von K. Nichols aus einem Projekt zur Befragung von Beschäftigten im Gesundheitssystem übernommen, übersetzt und nach den Impfempfehlungen der STIKO modifiziert.

81/141 (59%) der ausgegebenen Fragebogen wurden zurückgegeben und konnten analysiert werden. Von den antwortenden Ärzten waren 57/81 (70%) männlich, 23 (28%) hatten weniger als 3 Jahre Berufserfahrung, 32 (40%) 3-7 Jahre und 25 (31%) hatten mehr als 7 Jahre Berufserfahrung. 39 (48%) hatten mindestens einmal eine Influenza-Impfung erhalten, 19 (23%) davon im vorausgegangenen Winter. 30 (37%) empfahlen die Impfung auch für Familienangehörige. Im Durchschnitt wurden 7,2 der 10 national empfohlenen Impfindikationen gewusst.

Ein deutlicher und signifikanten Unterschied bestand zwischen geimpften und nicht geimpften Ärzten in den Einschätzung zur Wirksamkeit und den Nebenwirkungen der Impfung. Geimpfte Ärzte werteten die Wirksamkeit der Impfung deutlich höher, die Relevanz der Empfehlung für Beschäftigte im Gesundheitswesen höher und die Bedeutung von Nebenwirkungen deutlich niedriger (sämtlich

p<0.05, Chi-Quadrat-Test). Das Wissen um die Impfindikationen war weiterhin bei den geimpften Ärzten deutlich höher und sie empfahlen auch die Impfung an Familienangehörige deutlich höher. Die nichtgeimpften Ärzte gaben als Grund dafür, nicht geimpft zu sein, vor allem organisatorische Gründe an.
In einem zweiten Schritt. wurden im Winter 2003/2004 Patienten aus der zu bildenden Kohorte erstmals beraten, geimpft und analysiert. Empfohlen und durchgeführt wurden nach Indikation Influenza und Pneumokokken-Impfung.
Um einen möglichst guten Impfschutz in der Periode mit der höchsten Influenza-Aktivität zu erzielen, wurde die Impfung ab Mitte Oktober vorgesehen. Da in einigen Ambulanzen (KMT, Nierentransplantation) Patienten bereits ab Mitte September geimpft wurden, gingen diese damit dem Projekt verloren. In der betreffenden Patientenkohorte wie auch in der interdisziplinären Notaufnahme wurden im Oktober im Gegensatz zur Verbreitung in Deutschland keine Influenzafälle beobachtet, auch im weiteren Verlauf des Winters war die Influenzaaktivität ausgesprochen niedrig.
Im Verlauf der prospektiven Analyse wurden 89 Patienten (18-77 Jahre, Mittelwert 52, 53m, 36w) in die Kohorte eingeschlossen (9 HIV-infizierte, 27 nierentransplantierte, 29 hämato-onkologische bzw. KM-transplantierte Patienten, 14 Patienten mit gastroenterologischen Tumoren, 3 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und 7 Patienten mit rheumatologischen Erkrankungen) 54 (61%) dieser Patienten hatten eine chronische medikamentöse Immunsuppression mit einer großen Breite von Substanzen.
49 (55%) der Patienten waren noch nie gegen Influenza geimpft, nur 22 (25%) in der letzten Saison. Nach ausführlicher Beratung wurden 80 der beratenen Patienten mit einem Influenza-Spaltimpfstoff geimpft, 8 mit Influenza- und Pneumokokken-Impfstoff und ein Patient mit Pneumokokken-Impfstoff allein. Zusätzlich konnten 41 Kontrollen eingeschlossen werden (22-48 Jahre, Mittelwert 32). Die Impferfahrung war ähnlich wie bei den Patienten: 40% waren bereits früher geimpft, 19% in der letzten Saison.
Von 76/89 Patienten (85%) und 40/41 der Kontrollen konnten vollständige Serum- und PBMC-Proben asserviert werden, die vor Impfung und im Zeitraum von 6-8 Wochen nach Impfung gewonnen wurden. Von Patienten und Kontrollen wurden über Nebenwirkungen und respiratorische Infektionen Tagebücher geführt, zusätzlich wurden Telefoninterviews durchgeführt.
Akutvorstellungen im Rahmen des Projektes in der Infektiologischen bzw. Notfallambulanz waren selten, insgesamt stellten sich nur 5 Patienten vor, sämtlich hatten diese Patienten nur wenig symptomatische Infektionen der oberen Luftwege ohne klinische Zeichen einer Influenza.
Durch diese Vorarbeiten ist die vollständige Infrastruktur für die Erfassung und Analyse weiterer Kohorten etabliert inklusive Asservierung von Proben .

4.1.4b CMV-Infektion der Darmmukosa bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

Wie vorgesehen, sind in den ersten 12 Monaten die technischen und strukturellen Voraussetzungen etabliert worden. Ebenso konnte mit der Probenasservierung begonnen werden. In den ersten 12 Monaten wurden 30 Patienten rekrutiert, von denen jeweils Kolon-Biopsien untersucht wurden. Darunter waren 2 Fälle mit CMV-Kolitis (als positiv-Kontrollen), 5 Patienten mit Morbus Crohn, 23

Patienten mit Colitis ulcerosa und 5 Kontrollpatienten. Von allen bereits rekrutierten Patienten wurde bereits DNA und RNA aus den Biopsien isoliert sowie wie im Antrag vorgesehen auf Transkripte aus dem Bereich der immediate-early, early und late Gene untersucht.
Mittlerweile sind 57 Patienten mit Episoden einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung eingeschlossen und die entsprechenden Biopsien wurden untersucht. Parallel wurden mithilfe von Positivkontrollen die bisherigen Primer optimiert und damit auch die bisherigen Proben nachuntersucht. Auch in der erneuten Zwischenauswertung zeigt sich, dass Patienten mit Krankheitsaktivität trotz Immunsuppression zu einem höheren Teil CMV-positiv sind. Dies gilt sowohl für den Nachweis von CMV-RNA in Kolongewebe als auch für den Nachweis von CMV-RNA-Transkripten, die eine aktive CMV-Replikation reflektieren.
Für die weiteren Untersuchungen ist noch eine Gruppe von Kontrollpatienten (Vorsorgekoloskopien) rekrutiert worrden. Die endgültige statistische Auswertung der Ergebnisse läuft, eine Publikation befindet sich in Vorbereitung.

4.2. Assoziierte Projekte

4.2.1 Bedeutung von MIF und zellassoziiertem p75TNF Rezeptor als Immunstatus-Parameter bei Sepsis

Ergebnisse der zweiten Arbeitsperiode

Es konnte gezeigt werden daß zellassoziierter p75TNF-Rezeptor (p75TNFR, TNFR2) als Immunstatusparameter als ungeeignet ist, da Membran-TNFR2 durch Metalloproteasen als löslicher TNFR2 freigesetzt wird und über die Niere ausgeschieden wird.

Aus diesem Grund wurde in der zweiten Antragsperiode frühzeitig eine Fokussierung auf die Funktion von MIF im Tiermodelle der Immunparalyse vorgenommen. Die Wirkung von MIF liess sich im Tiermodell an gesunden und immundefizienten Mäusen differentiell nachweisen.

In gesunden Mäusen erhöhte MIF die Corticosteron-Plasmawerte und die LPS-induzierte TNF- und NO-Produktion (nach 6 Stunden). Die Neutralisation von MIF hatte keine Auswirkung auf LPS-induzierte TNF-Serumlevel.MIF veränderte die Mortalität subletaler bakterieller Infektionen nicht. Neutralisieren von endogenem MIF erhöhte die Mortalität signifikant.

Daraus ist abzuleiten, daß MIF eine Verstärkerwirkung hat und eine Mindestmenge an MIF für eine adäquate Infektionsabwehr notwendig ist

In immundefizienten Mäusen sind MIF-(genauso wie TNF-, IL-6- und Corticosteron-) Plasmawerte kurzfristig in den ersten 12 Stunden nach CLP erhöht und sinken danach für Tage unter den Normalwert (während die TNF-, IL-6- und Corticosteron-Werte auf einen nicht nachweisbaren Level zurückgehen).

LPS-induzierten MIF-Plasmawerte verändern sich nicht nach CLP (während die LPS-induzierten TNF-, IL-6- und Corticosteroid-Werte innerhalb der ersten 12 Stunden absinken und die TNF-Produktionsfähigkeit über Tage erniedrigt bleibt).

Neutralisieren von MIF zum Zeitpunkt der CLP erniedrigt kurzfristig (für 2 Stunden) TNF- und IL-6-Werte und führt zum Schutz vor Superinfektion 2 Tage später (obwohl zu diesem Zeitpunkt TNF- und IL-6-Produktionsfähigkeit nicht verbessert ist).

Die Untersuchungen zur Funktion des MIF in den beschriebenen Mausmodellen sind damit erfolgreich verlaufen.

Publikationen

1. Pollak N, Sterns T, Echtenacher B, Mannel DN. Improved resistance to bacterial superinfection in mice by treatment with macrophage migration inhibitory factor. Infect Immun 2005;73(10):6488-92.

4.2.2 Identifizierung immunologischer und molekularbiologischer Parameter zur Beurteilung der Virulenz von klinischen *H. pylori*-Isolaten

Ergebnisse der zweiten Arbeitsperiode

Es gelang wie vorgesehen die Sequenzierung der PAI bei einer grossen Anzahl von Isolaten von H.pylori wie vorgesehen.

Bei der abschließenden Prüfung der Sequenzierungen hatten sich einige Ungenauigkeiten ergeben. Es wurden deshalb noch einmal gezielt zur Verifizierung der Gesamtsequenzdaten PCRs wiederholt und sequenziert. Damit ist das Projekt labortechnisch abgeschlossen. Damit liegen 14 komplette PAI-Sequenzdaten von klinischen H. pylori-Isolaten vor.

Hierbei zeigte sich, daß die bisherigen Vorstellungen über

Publikationen

4.2.3 Analyse Epstein-Barr-Virus (EBV)- spezifischer virologischer und immunologischer Parameter bei Patienten unter Immunsuppression: Bedeutung der EBV-Infektion für den klinischen Verlauf

Zu Beginn der zweiten Antragsperiode wurden die real-time PCR-Verfahren zum Nachweis der LMP2A-, LMP1- und EBNA2-mRNA aufgebaut (zur Charakterisierung infizierter Zellen in Latenzphase I, II bzw. III). Zur gleichen Zeit wurde mit der Rekrutierung der Patienten begonnen; zunächst wurden Patienten nach Nierentransplantation und Knochenmarkstransplantation in die Studie aufgenommen. Die Bestimmung von EBV-DNA und -mRNA der Gene BZLF1, BALF5, BLLF1 über 4-12 Monate zeigten bei den ersten 15 Patienten überraschenderweise nur bei einem Patienten EBV-DNA im Serum und nur in etwa 10% der Seren ließ sich EBV-mRNA in sehr niedrigen Konzentrationen nachweisen. Daraufhin wurde das Rekrutierungsschema geändert: die Zahl der Probanden wurde von ursprünglich 24, die für zwei Jahre verfolgt werden sollten, auf 48 erhöht, die Probanden sollten nur für ein Jahr, dafür aber monatlich verfolgt werden, und es sollten weiterhin nur Patienten nach Nieren- und Stammzelltransplantation aufgenommen werden. Die Auswertung der gewonnenen Daten dieser Patienten und von vier in gleicher Weise verfolgten gesunden Kontrollpersonen zeigte, dass die Transkription lytischer Gene in den gesunden Kontrollpersonen und den Patienten unter Immunsuppression vergleichbar war; in etwa 10% der Personen wurde BLLF1-mRNA nachgewiesen. Dagegen war die Expression der sogenannten latenten mRNAs ebenso wie die Viruslast in den Patienten gegenüber den Kontrollpersonen deutlich erhöht. Alle Teilnehmer waren positiv für EBNA1- und EBNA2-mRNA, etwa die Hälfte wies LMP1-mRNA auf. Serologische Untersuchungen zeigten bei beiden Gruppen deutliche Schwankungen der Antikörper-Titer im Verlauf, wobei die Verteilungsmuster der Antikörper bei Patienten wie Kontrollen sehr ähnlich waren. Die Ergebnisse zeigen, dass die erhöhte Viruslast bei den immunsupprimierten Patienten im wesentlichen auf der Proliferation der EBV-infizierten Zellen und nicht auf einer verstärkten Virusreplikation beruht. Interessanterweise erwies sich das Spektrum der latent infizierten B-Lymphozyten breiter als allgemein angenommen; sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollpersonen ließen sich Zellen in allen drei Phasen der Latenz nachweisen. Weder die Antikörper noch die mRNA-Expression wiesen eine Korrelation mit klinischen Parametern der Patienten auf.

Ein wesentlicher Teil des Vorhabens wurde früher als geplant abgeschlossen, allerdings unter etwas modifizierten Bedingungen (doppelte Zahl von Patienten, aber Verfolgung nur über ein Jahr; nur Untersuchung von Patienten nach Nieren- und Stammzelltransplantation); Grund für die Änderung des Protokolls war die in der ersten Hälfte der Studie sich abzeichnende sehr geringe Zahl von wenig ausgeprägten Reaktivierungen des EBV bei den immunsupprimierten Patienten (um dieses Phänomen zu verifizieren, sollten mehr Patienten untersucht werden). Entscheidende Ursache für den wenig ereignisreichen nund komplikationslosen Verlauf der Phase nach der Transplantation bei den nieren- und stammzelltransplantierten Patienten dürfte das in den letzten Jahren optimierte immunsuppressive Therapieschema sein, das nur noch zu einer geringen Beeinträchtigung der zellvermittelten Immunität führt. Die Überwachung der EBV-transformierten Zellen funktioniert unter dieser Behandlung offensichtlich noch ausreichend. Zurückgestellt wurden deshalb auch die Untersuchung der zellulären Immunität (Messung der EBV-spezifischen CTL-Aktivität bei HLA B8-

positiven Patienten) sowie die Charakterisierung der infizierten B-Zellen. Beides soll nun in einem neuen Arm der Studie untersucht werden. Dafür sollen die bisher nicht eingeschlossenen Patienten mit rheumatische Erkrankungen, die immunsuppressiv behandelt werden, aufgenommen werden. Bei ihnen werden zu Beginn der Studie EBV-transformierte B-Lymphozyten-Linien angelegt, die – nach Induktion der Virusreplikation – zur Stimulation spezifischer T-Zellen eingesetzt werden. Da EBV-transformierte B-Lymphozyten nach Induktion eine große Zahl von Virusproteinen exprimieren, wird es möglich, im autologen System ein breites Spektrum von EBV-spezifischen T-Zellen zu stimulieren und in ELI-Spot und FACS nachzuweisen, unabhängig vom HLA-Typ des Spenders. Vorversuche haben die prinzipielle Durchführbarkeit dieses Verfahrens gezeigt. Wie bisher werden auch bei diesen Patienten EBV-DNA (allerdings in einem ebenfalls etablierten empfindlicheren Verfahren) sowie die mRNA der „lytischen“ und „latenten“ Gene und die Serologie untersucht.

Publikationen

1. Weinberger B, Plentz A, Weinberger KM, Hahn J, Holler E, Jilg W. Quantitation of Epstein-Barr virus mRNA using reverse transcription and real-time PCR. J Med Virol 2004;74(4):612-8.

4.3 Weitere wissenschaftliche Projekte, Studien und Publikationen des Bereichs Infektiologie

Neben den im Kernantrag beantragten und durchgeführten Projekten wurden und werden im Bereich Infektiologie eine Reihe von weiteren wissenschaftlichen Projekten durchgeführt. Die wissenschaftlichen Projekte sind in zwei Arbeitsgruppen der Klinik integriert: Arbeitgruppen A9 “Experimentelle Infektiologie” (Leitung Dr. Pia Hartmann) und B 10 Klinische Infektiologie (Leitung Dr. Boris Ehrenstein). Eine zentrale Studie, die viele Kliniken und Institute der Med. Fakultät der Universität Regensburg verzahnt ist die interdisziplinäre Sepsisstudie, bei der klinische Daten und Laborproben von einer Kohorte von mittlerweile 250 Patienten mit schwerer Sepsis gesammelt bzw. asserviert worden sind. Die klinischen Daten dieser ersten Kohorte (Klinisches Outcome bezogen auf eine Reihe von Ausgangs- bzw. Verlaufsparametern) befinden sich derzeit in der Auswertung.

4.5.1 Experimentelle wissenschaftliche Projekte

Teilprojekt "Innate Immunity": Immunologisches Monitoring und Prädiktion von Infektionen bei Patienten nach Nierentransplantation i.R.des Projektes "Funktionsverlust von Nierentransplantaten – Bedeutung immunologischer und nichtimmunologischer Faktoren"
Förderung: Reform C-Unterstützung der Med. Fakultät Univ. Regensburg, Leitung des Reform C-Projektes: B. Krämer und M. Fischereder (Innere Medizin II). S. Blaas, T. Glück, B. Salzberger zusammen mit G. Rothe, G. Schmitz (Institut für klinische Chemie) Reform C-Antrag

Untersuchung von Apoptose-Parametern bei Patienten mit Sepsis Projekt in Assoziation mit der Sepsis-Arbeitsgruppe des Klinikums, Antrag des Reform C-Programmes. M. Fleck, T. Glück

TNF- Inhibitoren und ihr Einfluß auf die Generationszeit von Mykobakterien in humanen Makrophagen. P. Hartmann, zusammen mit M. Fleck in Zusammenarbeit mit G. Plum; Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Universität Köln und A. Rubbert; Klinik I für Innere Medizin

Untersuchung der Phagozytose- und Burstaktivität im Vollblut bei Mäusen mit Sepsis-induzierter Immunparalyse (CLP-Modell, zökale Ligatur und Punktion). S. Blaas, P. Hartmann in Zusammenarbeit mit B. Echtenacher, R. Urbascheck, D. Männel

Studie zum Verhalten von Hormonen, Zytokinen, sympathischen Neurotransmittern und Entzündungsparametern im Verlauf einer akuten unkomplizierten Infektionskrankheit
P. Hartmann, P. Härle, R. H. Straub.

Taxonomic Status of the Genus *Brachiola* (Microsporidia) – Molecular Characterization of *Anncaliia meligethi* and *A. varivestis* to determine that the two genera *Brachiola* and *Anncaliia* are congeneric
C. Franzen in Kooperation mit Prof. Irma Issi, St. Petersburg, Prof. James J. Becnel, Gainesville, Dr. Leellen Solter, Champaign.

Untersuchungen zur Epidemiologie von Infektionen mit *Encephalitozoon hellem* (Microsporidia)
C. Franzen in Kooperation mit Prof. Dr. U. Neumann, Hannover, Prof. Dr. M.-E. Krautwald-Junghanns, Leipzig, Dr. J. Schröder, Regensburg
Untersuchung der Zellinvasion von Mikrosporidien anhand eines Fibroblasten-Sphäroid-Modells
C. Franzen zusammen mit L. Kunz-Schughart (Institut für Pathologie) und J. Schröder (Abt. für Elektronenmikroskopie)

In vitro und in vivo Kultivierung von Nosema sp. aus Drosophila melanogaster
C. Franzen zusammen mit S. Fischer und S. Schneuwly (Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie)
Interaktion von Mikrosporidien mit in vitro differenzierten M- Zellen C. Franzen, F. Obermeier

Empfindlichkeit multiresistenter M. tuberculosis Isolate gegenüber dem Oxazolidinon Linezolid
S. Blaas, in Zusammenarbeit mit L. Naumann, D. Gitschner, H. Oros, M. Zintl, N. Lehn, Med. Mikrobiologie

Untersuchung der Spiegel von zellgebundenem und löslichem CD14, LBP, BPI im peripheren Blut und im Aszites bei Patienten mit Leberzirrhose. R. Wiest, T. Glück

Struktur-Funktionsanalyse des IL-1 Rezeptors
W. Falk in Zusammenarbeit mit J. Radons (Hämatologie/Onkologie)

4.5.2 Klinische Projekte und Studien

Interdisziplinäre Sepsis-Studie des Klinikums – ene Kohortenstudie von Patienten mit schwerer Sepsis
a.) Infektiologische Aspekte: Outcome in Abhängigkeit vom Erreger (u.a.)
b.) Aspekte der Zellaktivierung durch LPS
c.) Apoptose-Aspekte
d.) Einfluß der Katecholamine und Hormone auf den Verlauf der Sepsis
ReForM C - Förderung von 1/2000 bis 12/2003.
F. Audebert, M. Fleck, R.H. Straub, B. Salzberger, T. Glück, zusammen mit D. Fröhlich (Anästhesie), D. Krenz (Chirurgie), G. Rothe, W. Drobnik, S. Barlage (Klinische Chemie) und der interdisziplinären Sepsis-Studiengruppe des Klinikums.

Verbesserte molekulare mikrobiologische Diagnostik bei Osteomyelitis
B. Ehrenstein, zusammen mit U. Reischl, U. Thalhammer (Mikrobiologie).

HIV - eine chronische Erkrankung wie jede andere? CID-S Screeningbefragung von HIV-Patienten, sowie Patienten mit Diabetes mellitus Typ I oder M. Crohn bzw. Colitis ulcerosa.
F. Mandraka, zusammen mit T. Löw (Innere Medizin II).

Therapienaive HIV-infizierte Patienten - eine longitudinale Kohortenstudie.
Förderung im Rahmen des Kompetenznetzwerkes HIV durch das BMBF.
Förderkennzeichen 01 KI 0211.
Förderungszeitraum 1.6.2002 bis 31.5.2005.
B. Salzberger.

Koordination und Planung klinischer Studien im Rahmen des Kompetenznetzwerkes HIV. Förderung im Rahmen des Kompetenznetzwerkes HIV durch das BMBF.
Förderkennzeichen 01 KI 0211.
Förderungszeitraum 1.6.2002 bis 31.5.2005.
B. Salzberger, in Zusammenarbeit mit S. Staszewski (Frankfurt).

Antibiotika-Therapie auf Intensivstationen - prospektive Erfassung des Gebrauchs von Antibiotika, der Indikation und des Outcomes, Erhebung in zwei Zentren.
Förderung: Fa. Astra-Zeneca, Hamburg.
B. Salzberger, T. Glück, in Kooperation mit G. Fätkenheuer, Köln.

Impfprävalenz bei ambulant betreuten HIV-positiven Patienten – vor und nach Impfempfehlungen.
A. Schneidewind.

Atazanavir – bei vorbehandelten HIV Patienten.
Extended Access Program (EAP) der Fa. BMS; Teilnahme
A. Schneidewind, B. Salzberger

AG15009 (Proteaseinhibitor) in der Therapie der HIV- Infektion, Phase II Studie der Fa. Pfizer, Teilnahme, B. Salzberger, T. Glück, A. Schneidewind

Daptomycin in der Therapie der S. aureus Bakteriämie und Endokarditis. Eine prospektive randomisierte offene Phase III Studie zur Wirksamkeit und Sicherheit von Daptomycin, Fa. Cubist, Teilnahme. B. Salzberger, T. Glück, A. Schneidewind.
In mehreren Teilprojekten findet eine Kooperation mit der Freiburger klinischen Forschergruppe "Klinische Infektiologie" zur gemeinsamen Datenerhebung bzw. Asservierung von Proben statt. Im Kernprojekt 4.4 werden auch Proben von KM-transplantierten Patienten zur Diagnostik von humanen Metapneumoviren asserviert und im Projekt "Nosokomiale Diarrhöe durch *Clostridium difficile*-Diagnostik und Epidemiologie" fand eine epidemiologische Analyse von Patienten mit Diarrhoe in der Universitätsklinik Regensburg statt.

6 Unterschrift

Regensburg, 31.12.2008

Prof. Dr. B. Salzberger
Leiter des Bereiches Klinische Infektiologie
Ltd. OA der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I

7 Anlagen