

Kathrin Maria Gerda Schilke
Dr. med.

Untersuchung der molekulargenetischen Grundlage der Rifampicin- und Isoniazid-Resistenz von afrikanischen Isolaten des *M. tuberculosis* Komplexes

Geboren am 02.10.1968 in Göttingen
Reifeprüfung am 11.06.1988 in Kiel
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1989 bis SS 1995
Physikum am 02.09.1991 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg und Stockholm
Staatsexamen am 31.10.1995 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Kinderheilkunde
Doktorvater: Prof. Dr. med. H. J. Bremer

Thema der Arbeit sind die molekulargenetischen Grundlagen der Rifampicin- und Isoniazid (INH)-Resistenz von Mykobakterien in Ländern mit einem hohen Infektionsrisiko für Tuberkulose. Diese Grundlagen liefern die Basis, um schnellere, molekulargenetische Verfahren für die Resistenzdiagnostik zu entwickeln und geben die Leitlinien für das Design zukünftiger Antituberkulotika.

Die Rifampicin-Resistenz von Mykobakterien gilt als ein Marker für Resistenzen gegen weitere Antituberkulotika, die sogenannte Multiresistenz. Die molekulare Basis dieser Resistenz beruht auf Mutationen in einem umschriebenen Abschnitt des *rpoB* Gens, das die β -Untereinheit der RNA-Polymerase kodiert. Die Mutationen bewirken, daß Rifampicin nicht mehr an dieses Enzym binden und die Transkription und RNA-Elongation verhindern kann.

Die Analyse des *rpoB* Gens Rifampicin-resistenter Stämme des *M. tuberculosis* Komplexes mittels PCR und direkter Sequenzierung wurde mit einer Sensitivität von 100 % in 113 untersuchten Isolaten etabliert. Bei 94 % der 103 Rifampicin-resistenten Stämme, darunter 79 multiresistenten Stämmen aus Südafrika, wurden 'missense' Mutationen im zentralen Abschnitt des *rpoB* Gens gefunden. Neun Codons im Abschnitt von Aminosäureposition 504 bis 533 waren von Mutationen betroffen. 18 unterschiedliche 'missense' Mutationen traten auf. Bei einem Stamm wurde eine silente Mutation gefunden. Mutationen in Codon 504 lagen außerhalb des bisher bekannten Abschnittes des Gens, der Mutationen trug. In etwa 10 % der Isolate fanden sich Basenpaarveränderungen in zwei nicht benachbarten Codons des Abschnittes, sogenannte Doppelmutationen. Die Frequenz und Lokalisation der häufigsten Mutationen in den sequenzierten Stämmen unterschiedlicher geographischer Herkunft entsprach im wesentlichen den Ergebnissen von Isolaten aus Nordamerika und Europa. Diese Vergleichbarkeit und die gefundene hochgradige Konservierung der Sequenz bietet eine gute Voraussetzung für die Entwicklung einer molekulargenetischen Resistenzdiagnostik für den klinischen Einsatz. Diese sollte die Vielfalt der Punktmutationen und die Erweiterung des zentralen Abschnittes des *rpoB* Gens auf 90 bp berücksichtigen. Außerdem sollten auch resistente Subpopulationen eines Isolates, die nach Ergebnissen dieser Arbeit nicht selten sind, erkannt werden.

Obwohl Isoniazid hochspezifisch gegen Mykobakterien wirkt, konnte der Wirkungsmechanismus bisher nur unvollständig geklärt werden. Das Katalase-Peroxidase Gen (*katG* Gen) scheint eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Isoniazid-Resistenz bei Mykobakterien des *M. tuberculosis* Komplexes zu spielen. Die Analyse des *katG* Gens für 124 INH-resistente Isolate zeigte, daß Mutationen nicht zufällig im Gen verteilt vorkommen, sondern in ausgewählten Positionen der gut konservierten Gensequenz liegen. Der Position 315 kann ein hoher Stellenwert bei der Entwicklung schneller Screening-Methoden für die INH-Resistenz zugesprochen werden, da Mutationen in diesem funktionell relevanten Codon in zwei Dritteln der Stämme des *M. tuberculosis* Komplexes aus Süd-, Zentral- und Westafrika gefunden wurden.

Ein wichtiges Ergebnis ist der Polymorphismus der Sequenz von Codon 463 unter INH-empfindlichen Isolaten von *M. africanum*. In dieser Position erscheint die geographische Herkunft der Isolate und nicht ihre INH-Resistenz für die Konformität des Codons entscheidend. Aus diesem Grund sollte Codon 463 nicht für die INH-Resistenzdiagnostik herangezogen werden, es kann jedoch ein hilfreicher phylogenetischer Marker innerhalb von Stämmen des *M. tuberculosis* Komplexes sein.

Durch Kombination mit der Analyse des DNA-Fingerabdruckes für alle Stämme wurde die Klonalität von Isolaten mit gleichen Resistenz-Gen Mutationen untersucht. Für die Isolate aus Südafrika ergaben sich mit der Mixed-Linker-PCR-Methode 72 individuelle Bandenmuster des DNA-Fingerabdruckes. 27 Stämme teilten ihr Bandenmuster jeweils mit einem oder mehreren weiteren Isolaten. Es traten neun Cluster, definiert als Stämme mit 100 % identischem DNA-Fingerabdruck, mit je zwei Isolaten, und zwei Cluster mit vier bzw. fünf Isolaten auf. Unter Berücksichtigung der Analysen des *rpoB* Gens, des *katG* Gens und phänotypischer Merkmale der Stämme wie Resistenz gegen weitere Antituberkulotika und epidemiologischer Patientendaten ergaben sich Hinweise auf Klonalität in vier der Cluster, die jeweils aus zwei Isolaten bestanden. Ein Anhaltspunkt für eine klonale Ausbreitung bestimmter Stämme in den einzelnen Krankenhäusern ergab sich nicht. An diese Arbeit schließt sich eine prospektive Studie über die Klonalität der Tuberkulose in einer südafrikanischen Provinz während eines Jahres an, die zentrale Fragestellung ist die Ausbreitung resistenter Stämme.