

Entwicklung einer Strategie zur Inaktivierung von Genen in
Mycobacterium avium und Charakterisierung der potentiellen
Virulenz-Gene *sigE* und *mig*

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln
vorgelegt von

Christian Oliver Morscheck
aus Essen

Köln, September 2000

Berichterstatetter: Prof. Dr. Karin Schnetz
PD Dr. Christine Kocks

Tag der Disputation: 20. Dezember 2000

meinen Eltern

Der Zweifel, der an allem zweifelt, wäre kein Zweifel mehr.

Ludwig Wittgenstein

Entwicklung einer Strategie zur Inaktivierung von Genen in *Mycobacterium avium* und Charakterisierung der potentiellen Virulenz-Gene *sigE* und *mig*

Mycobacterium avium gehört zu den pathogenen Mycobakterien. Zur Charakterisierung des Gens *mig* sollte ein adäquates Mutagenese-System für einen allelen-Austausch entwickelt werden. Mit der Elektroporations-Technik wurden unterschiedliche DNA-Moleküle wie z. B. lange, lineare DNA-Moleküle als Rekombinations-Substrat in *M. avium* transferiert. Ein alleler-Austausch war bei dieser Art aufgrund einer hohen Spontanresistenzrate gegen Antibiotika oder einer hohen Rate an illegitimen Rekombinationen nicht möglich. Als eine weitere Methode für DNA-Transfer in *M. avium* wurde die Konjugation angewendet. Exkonjuganten, bei denen mittels PCR eine Inaktivierung des Gens *mig* gezeigt werden konnte, waren nicht subkultivierbar. Dagegen konnte von einer Inaktivierung des *sigE*-Gens, wie PCR- und Southern-Untersuchungen zeigten, ausgegangen werden. Diese Mutante zeigte gegenüber dem Wildtyp bei extrazellulärem Streß eine erhöhte Sensitivität und war auch in der Virulenz im humanen Makrophagen-Modell signifikant attenuiert. Das Protein Mig wurde weiterhin biochemisch charakterisiert. Ein heterolog in *E. coli* exprimierte His₆-Mig Fusions-Protein wurde mit Hilfe der immobilisierten Metalchelate-Affinitätschromatographie angereichert, das Molekulargewicht wurde auf einem SDS-Gel mit ca. 60 kDa bestimmt. Nach einer DNA-Sequenzierung des Gens für das Fusionsprotein und des *mig*-Gens aus *M. avium* konnte diese Größe verifiziert werden. Mig konnte als Acyl-CoA-Synthetase charakterisiert werden für gesättigte Fettsäuren mittlerer Länge und ungesättigter Fettsäuren. Die *mig*-Promotor-Region wurde in *M. smegmatis* durchgeführt. Die Promotorstärke hing von der Wachstumsphase ab und konnte durch Fettsäuren leicht induziert werden. Eine Überexpression von Mig in *M. smegmatis* führte zu einer erhöhten Überlebensrate bei Inkubation mit Dekansäure, die für Mycobakterien toxisch ist. Über ein "One-Hybrid-System" wurden offene Leserahmen für mögliche Transkriptionsfaktoren identifiziert.

Development of a strategy for gene-inactivation in *Mycobacterium avium* and characterization of the putative virulence-genes *sigE* and *mig*

Mycobacterium avium is a pathogen. Strategies for allelic exchange were investigated for characterization of the *mig* gene. Various DNA-recombination substrates like long linear DNA molecules were transferred into *M. avium* cells for allelic exchange by the electroporation technique. Due to problems with high rates of illegitimate recombination and spontaneous resistance all strategies failed. For this reason, conjugation was applied as another method for DNA-transfer into *M. avium*. However, this procedure could reveal no viable exconjugants after probable targeted inactivation of the *mig* gene. In contrast, this method was apparently successful for targeted gene inactivation of the *sigE* gene from *M. avium*. Analysis for this mutant revealed decreased survival rates during extracytoplasmic stress and in human macrophage model of infection compared to the wild-type strain. Mig was further characterized by biochemical methods. After expression in *E. coli* and purification, a histidin-tagged Mig was detected as a 60 kDa protein on a SDS-gel. The gene for the fusion-protein and *mig* from *M. avium* were sequenced. This revealed that the *mig* gene encodes a 550 amino acid protein (58,6 kDa). Mig exhibited detectable activity as an acyl-CoA-synthetase with saturated medium chain fatty acids and unsaturated long chain fatty acid as substrates. The predicted *mig* promoter was characterized in *Mycobacterium smegmatis*. The strength of the promoter was dependent on the growth phase and could be slightly increased by fatty acids. The expression of Mig in *M. smegmatis* resulted in an increased survival rate after incubation with toxic decanic acid. Putative transcription-regulatory proteins were discovered for the *mig* promoter using a "one-hybrid-System" in *E. coli*.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen	1
0.	Zusammenfassung	3
1.	Einleitung	5
1.1	Initiale Infektionen durch Mycobakterien	6
1.2	Das mycobakterielle Phagosom von Makrophagen	6
1.3	Die Antwort des Immunsystems auf die Infektion von Mycobakterien	10
1.4	Methoden zur Identifikation von Virulenz-Genen und deren Charakterisierung bei Mycobakterien	14
1.5	Gezielte Inaktivierung von Genen bei langsam-wachsenden Mycobakterien	18
1.6	Das Makrophagen-induzierte Gen (<i>mig</i>) von <i>M. avium</i>	19
1.7	Der alternative Sigma-Faktor SigE	21
1.8	Problemstellung	22
2.	Material und Methoden	24
2.1	Material	24
2.1.1	Oligonukleotide	24
2.1.2	Plasmide	25
2.1.3	Bakterienstämme und Cosmid-Bibliothek	28
2.1.4	Antikörper	28
2.1.5	Membranen und Filter	29
2.1.6	Chemikalien	29
2.1.7	Enzyme und Inhibitoren	29
2.1.8	Häufig verwendete Medien, Puffer und Lösungen	29
2.1.9	Geräte	31
2.1.10	DNA-Sequenzen	31
2.2	Methoden	31
2.2.1.	DNA-Arbeiten	31
2.2.1.1	Standard-Präparation von Plasmid-DNA	31
2.2.1.2	Mini- und Midi-Säulenpräparation von Plasmid-DNA	32
2.2.1.3	Elution von DNA aus Agarosegelen	32
2.2.1.4	Isolierung genomischer DNA aus <i>M. avium</i> -Stämmen	32
2.2.2	Agarosegel-Gelelektrophorese	32
2.2.3	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	32
2.2.3.1	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Stämme	33
2.2.3.2	Transformation mit Plasmid-DNA	33
2.2.4	Übertragung von Plasmiden durch Konjugation	33
2.2.5	Elektroporation von Mycobakterien-Zellen	34
2.2.6	PCR-Reaktion	34
2.2.7	Klonierung von PCR-Produkten	35
2.2.8	Southern-Untersuchung	35
2.2.8.1	Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA auf Nylonmembranen	35
2.2.8.2	Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden	36

2.2.8.3	Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden und immunologischer Nachweis der hybridisierten DNA	36
2.2.9	Dot-Blot-DNA-Hybridisierung	37
2.2.10	DNA-Sequenzierung	37
2.2.11	Konstruktion einer <i>M. avium</i> -DNA-Bibliothek	37
2.2.12	Infektion von <i>E. coli</i> mit einer <i>M. avium</i> -Cosmid-DNA-Bibliothek	37
2.2.13	Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität, der Luziferase-Aktivität und der Fluoreszenz durch das GFP-Protein	38
2.2.14	Bedingungen für die Messung der Promotor-Stärke des <i>mig</i> -Promotors in <i>M. smegmatis</i>	38
2.2.15	Enzymaktivitätsbestimmung von Mig als Acyl-CoA Synthetase	38
2.2.16	Bestimmung der Acyl-CoA-Synthetase Aktivität von Mig mittels HPLC	39
2.2.17	Zellaufschluß von Mycobakterien durch Ultrabeschallung oder durch eine Zell-Mühle	39
2.2.18	Infektionsmodell mit aus humanen Monozyten gewonnenen Makrophagen (HMDM)	39
2.2.19	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	39
2.2.20	Proteinfärbung von Polyacrylamidgelen	40
2.2.21	Protein-Konzentrations-Bestimmung	40
2.2.22	Immunodetektion (Western-Blot)	40
2.2.22.1	Proteintransfer auf PVDF-Membran	40
2.2.22.2	Nachweis von Mig und Mig-His ₆ -Fusionsproteinen durch Immunodetektion	40
2.2.23	Computerprogramme und Datenbanken	41
2.2.24	Heterologe Überexpression von Mig in <i>E. coli</i> und Aufreinigung über Ni-NTA-Superflow	42
2.2.25	Anzucht von Mycobakterien	42
2.2.26	Konstruktion des induzierbaren Suizidplasmids pGPC129	42
2.2.27	Plasmid-Konstruktionen	43
3.	Ergebnisse	44
3.1.	Evaluation unterschiedlicher Strategien zur Konstruktion einer <i>M. avium mig</i> -Mutante mittels homologer Rekombination	44
3.1.1	Transformation von <i>M. avium</i> mit den Suizidplasmiden pGPC119 und -120	44
3.1.2	Transformation von <i>M. avium</i> mit autonom replizierenden Vektoren mit einem induzierbaren Suizidgen (<i>sacB</i>)	47
3.1.3	Transformation von <i>M. avium</i> mit 50 kb großen, linearen DNA-Fragmenten als Rekombinations-Substrat	49
3.1.4	Versuch einer gezielten Mutagenese von <i>M. avium</i> durch Plasmidintegration	53
3.1.5	Diparentale und triparentale Konjugation von Plasmiden von <i>E. coli</i> zu <i>M. avium</i>	54
3.2.	Versuch einer gezielten Inaktivierung des <i>sigE</i> -Gens durch allelen Genaustausch bei <i>M. avium</i>	59
3.3	Physiologische Charakterisierung von <i>M. avium</i> K007	62
3.4	Attenuierte Virulenz von <i>M. avium</i> K007 gegenüber <i>M. avium</i> #5-8 im humanen Makrophagen-Modell (HMDM)	65
3.5	Konstruktion eines aminoterminalen Mig-His ₆ -Fusionsproteins	67

3.6	Partielle Amplifikation des <i>mig</i> -Gens aus dem Genom der <i>M. avium</i> -Stämme A5 und #5-8 und direkte Sequenzierung der PCR-Produkte	69
3.7	Bestimmung der Größe von Mig mittels Immunodetektion	70
3.8	Computer-gestützte Proteinanalyse des 550 Aminosäuren großen Mig-Proteins und Homologievergleiche mit den Datenbanken Swissprot und NCBI	72
3.9	Biochemische Charakterisierung von Mig als Acyl-CoA-Synthetase	74
3.10	Der 30 kDa große Aminoterminus des Mig-Proteins besitzt keine Aktivität als Acyl-CoA-Synthetase	80
3.11	Expression von Mig und Charakterisierung der Stärke des <i>mig</i> -Promotors in <i>M. smegmatis</i>	82
3.12	Auffindung von möglichen Transkriptionsfaktoren mit einem bakteriellen „One Hybrid System“	85
4.	Diskussion	89
4.1	Allgemeine Probleme der Herstellung von Mutanten bei langsam-wachsenden Mycobakterien	89
4.2	Unterschiedliche Strategien zur Herstellung von Mutanten bei <i>M. avium</i> mit der Elektroporations-Technik	91
4.2.1	Probleme bei der Herstellung von <i>M. avium</i> -Mutanten mit der Elektroporations-Technik	92
4.3	Konjugation zwischen <i>E. coli</i> und <i>M. avium</i> zur gezielten Inaktivierung von Genen	96
4.4	Charakterisierung von <i>M. avium</i> K007	101
4.5	Größe, Stabilität und Expression von Mig	103
4.6	Mig als Acyl-CoA-Synthetase für mittellange und gesättigte Fettsäuren	105
4.7	Die Promotor-Region des <i>mig</i> -Gens und das „One-Hybrid-System“	114
4.8	Die Bedeutung von Mig	120
4.8.1	Mig in Zusammenhang mit der Synthese von Fettsäuren und Lipiden	120
4.8.2	Zellmembran und Zellwand von Mycobakterien und ihre Bedeutung für die Virulenz	122
4.8.3	Mig in Zusammenhang mit dem Abbau von extrazellulären Fettsäuren und der Virulenz	124
5.	Anhang	129
	Anhang A	129
	Anhang B	130
	Anhang C	131
	Anhang D	132
	Anhang E	133
	Anhang F	135
	Summary	138
6.	Referenzen	140

Abkürzungen

A. dest.	Aqua destillata
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C	Celsius
CD	Differenzierungsgruppe („cluster of differentiation“)
cDNA	komplementäre DNA
CFU	Kolonie-bildende Einheiten („colony forming units“)
CoA	Coenzym A
CSPD	3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'chloro)tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)-phenylphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
ECF	extracytoplasmatische Funktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
h	Stunde(n)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
HRP	“horse radish peroxidase”
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilopasenpaar(e)
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LB	Luria Bertani-Medium
M	molar (Mol/l)
Mg²⁺	Magnesium-Ion

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“)
min	Minute(n)
MOI	Infektionsmultiplizität
mRNA	Boten-RNA
NAD⁺	Nikotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NaDOC	Natriumdesoxycholat
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
O.D.	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen („open reading frame“)
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
P_{mig}	putativer <i>mig</i> -Promotor (Plum <i>et al.</i> 1997)
PPI	anorganisches Pyrophosphat
PVDF	Polyvenylidendifluorid
RLU	relative Lichteinheit
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natrium-Dodekansäuresulfat
SSC	Standard-Saline-Citrat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	Tumorstromafaktor („tumor growth factor“)
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolylgalaktosid

0. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die potentiellen Virulenz-Gene *mig* („*macrophage induced gene*“) und *sigE* (ECF-Sigma-Faktor) von *Mycobacterium avium* charakterisiert.

Hierfür mußte zunächst ein adäquates Mutagenese-System entwickelt werden, da eine gezielte Gen-Inaktivierung bei dieser Art bislang nicht möglich war. Es wurden unterschiedliche Strategien appliziert, die bei anderen Mycobakterien-Arten erfolgreich für eine Mutagenese mittels allelen Austausch benutzt wurden. Inaktivierte Allele wurden hierbei durch Insertion eines Antibiotika-Resistenzgens in das Wildtyp-Gen konstruiert. Mit der Elektroporations-Technik wurden unterschiedliche DNA-Moleküle wie Suizid-Plasmide, Schaukel-Plasmide oder lange, lineare DNA-Moleküle als Rekombinations-Substrat in *M. avium* transferiert. Alle Versuche, einen gezielten Austausch durchzuführen, scheiterten an der hohen Spontanresistenzrate dieser Art gegen Antibiotika, der hohen Rate an illegitimen Rekombinationen und nicht zuletzt an der geringen Transformations-Effizienz. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal die Konjugation als eine weitere Methode für DNA-Transfer in *M. avium* angewendet. Exkonjuganten, bei denen mittels PCR eine Inaktivierung des Gens *mig* gezeigt werden konnte, waren nicht subkultivierbar. Andere Exkonjuganten, bei denen das inaktivierte Allel durch homologe oder illegitime Rekombination integriert war, verloren dieses nach Subkultivierung. Hieraus wurde geschlossen, daß das Gen *mig* essentiell sein kann. Da eine stabile Transformation von *M. avium* mit einem autonom replizierenden oder integrativen Plasmid nicht möglich war, konnte ein Beweis für die Essentialität des Gens *mig* über ein "gene-rescue"-Experiment nicht durchgeführt werden. Es sind aber auch andere Erklärungen für eine fehlende *mig*-Mutante möglich. Das Gen *mig* kann zum Beispiel auf dem Genom so lokalisiert sein, daß ein alleler Austausch nicht begünstigt wird.

Dagegen konnte von einer Inaktivierung des *sigE*-Gens, wie PCR- und Southern-Untersuchungen zeigten, ausgegangen werden. Diese Mutante war subkultivierbar, zeigte gegenüber dem Wildtyp bei extrazellulärem Streß eine erhöhte Sensitivität und war auch in der Virulenz im humanen Makrophagen-Modell signifikant attenuiert.

Das Protein Mig wurde weiterhin biochemisch charakterisiert; hierfür wurde ein aminoterminales Mig-His₆-Fusionsprotein konstruiert. Das heterolog in *E. coli* exprimierte Protein wurde mit Hilfe der immobilisierten Metalchelate-Affinitätschromatographie angereichert. Bei einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese konnte das Molekulargewicht

mit circa 60 kDa bestimmt werden. Nach einer DNA-Sequenzierung des Gens für das Fusionsprotein und einer direkten Sequenzierung des *mig*-Gens aus *M. avium* konnte verifiziert werden, daß das *mig*-Gen nicht für ein 295 Aminosäuren (circa 30 kDa) (Plum *et al.* 1997), sondern für ein 550 Aminosäuren (circa 58,6 kDa) großes Protein kodiert. Auch bei Immunodetektionen mit einem Mig-spezifischen Antikörper konnte in den löslichen und den unlöslichen Fraktionen von *M. avium*-Kulturen ein circa 58,6 kDa großes Protein detektiert werden. Eine Induktion dieser Kulturen durch Säure war im Gegensatz zu vorhergehenden Studien hierfür nicht nötig, so daß man davon ausgehen kann, daß es sich bei *mig* nicht nur um ein ausschließlich Makrophagen-induziertes Gen handelt. Bei wiederholten Immunodetektionen des Mig Proteins wurden auch Abbauprodukte nachgewiesen, die circa 30 bis 35 kDa groß waren. Daher wurden zusätzlich zwei Mig-Derivate als circa 30 kDa große Histidin-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Alle drei Fusionsproteine wurden einem Test für Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität unterzogen. Das 58,6 kDa große Protein Mig besitzt starke Homologien zu einer putativen Acyl-CoA-Synthetase von *M. tuberculosis* (FadD19) und zu der Fettsäure-Acyl-CoA-Synthetase von *E. coli* (FadD) und ist nach Computerberechnungen (Psort, TopPred2 und Tmpred) ein Membranprotein. Nur das 58,6 kDa große Protein zeigte eine Aktivität, so daß es sich bei Mig um eine Acyl-CoA-Synthetase handelt. Das Substrat-Spektrum reichte bei gesättigten Fettsäuren von der Pentansäure bis zur Tetradekansäure, es konnten aber auch Aktivitäten mit langkettigen ungesättigten und aromatischen Fettsäuren nachgewiesen werden.

Die Charakterisierung der *mig*-Promotor-Region wurde in *M. smegmatis* durchgeführt. Der Promotor war konstitutiv aktiv, was ein weiterer Hinweis dafür ist, daß Mig konstitutiv gebildet wird. Die Promotorstärke hing von der Wachstumsphase ab und konnte durch Fettsäuren, besonders Dekansäure, leicht induziert werden. Eine Überexpression von Mig in *M. smegmatis* führte zu einer erhöhten Überlebensrate bei Inkubation mit Dekansäure, die für Mycobakterien toxisch ist.

Über ein "One-Hybrid-System" wurden mögliche Transkriptionsfaktoren für den *mig*-Promotor identifiziert. Es konnte unter anderem ein offener Leserahmen identifiziert werden, der für ein Protein kodiert, das ein putatives DNA-bindendes Motiv (Helix-Turn-Helix-Motiv) besitzt. Bei diesem Protein und den von den anderen offenen Leserahmen kodierten Proteinen kann es sich um mögliche Repressor-Moleküle des *mig*-Promotors handeln.

1. Einleitung

Seit der Entdeckung von *Mycobacterium tuberculosis*, dem sogenannten „Tuberkel-Bazillus“, als den Erreger der Tuberkulose durch Robert Koch im Jahre 1882, werden Mycobakterien wissenschaftlich untersucht. Trotz vieler Erfolge in der Bekämpfung dieser Krankheit sterben jedes Jahr weltweit 3 Millionen Menschen an Tuberkulose. Die Verbreitung dieser Krankheit wird durch die Welt-Gesundheits-Organisation (<http://www.who.int>), nicht zuletzt aufgrund der steigenden Zahl der Resistenzen von Mycobakterien gegen Antibiotika, als eine der großen Geißeln der Menschheit bezeichnet (Bloom und Murray 1992). Neben *M. tuberculosis* sind Mycobakterien auch als Erreger der Lepra (*M. leprae*) allgemein bekannt. Seitdem sich AIDS weltweit ausbreitete treten auch häufiger Krankheiten auf, die durch *M. avium* und / oder *M. intracellulare*, die zum sogenannten „*M. avium* Complex“ (MAC) zusammengefasst werden, ausgelöst werden. MAC ist das meist verbreitete, opportunistische, bakterielle Pathogen bei HIV-Patienten und die häufigste Todesursache von Patienten im fortgeschrittenen Stadium von AIDS (Brettle 1997; zur Definition von Pathogenität siehe Falkow 1997). Wayne und Sramek (1992) ordneten *M. avium* den langsam-wachsenden (Generationszeit: 6 h bis 24 h), potentiell pathogenen und ubiquitär vorkommenden Mycobakterien zu, die Krankheiten bei Menschen auslösen können, aber nicht von Mensch zu Mensch übertragen werden.

M. tuberculosis wird in die Klasse 3 der humanen Pathogene eingeordnet, da Schädigungen nicht nur direkt durch die vom Erreger verursachte Replikation erzeugt werden, sondern vielmehr wird der Wirt durch eine inadäquate Antwort des eigenen Immunsystems auf den Krankheitserreger geschädigt. Dies führt zu einer pulmonaren und disseminierten Tuberkulose oder bei einer zu starken Immunantwort z.B. zu einer Mediastinitis. Nur eine intermediäre Immunantwort auf den Erreger der Tuberkulose führt zu einer latenten Infektion (Casadevall und Pirofski 1999). Von biologischem Interesse sind die komplexen Interaktionen zwischen den Mycobakterien und dem Immunsystem, die dazu führen, daß die Bakterien im Wirt überleben können. Die Mechanismen und Virulenz-Gene, die von Mycobakterien gegen das Immunsystem angewendet werden, sind weitgehend unbekannt. Große Bedeutung besitzt die differentielle Genexpression während der Replikation von Mycobakterien im Makrophagen.

1.1 Initiale Infektionen durch Mycobakterien

Im Allgemeinen infizieren Mycobakterien (im Speziellen *M. avium*) den Menschen über die bronchiale oder die intestinale Mukosa. Im Gastrointestinaltrakt infiltrieren die Bakterien in die Lamina propria und die Peyerschen Plaques, bevor sie in die Leber, die Milz und den Blutkreislauf gelangen (Inderlied *et al.* 1993). Über die genauen Mechanismen ist nicht viel bekannt. Frühere Studien zeigten, daß sich *M. avium* an epitheliale Zellen des respiratorischen und gastrointestinalen Traktes binden, in diese eindringen und sich darin vermehren kann (Mopathar und Sänger 1984, Bermudez 1991, Bermudez und Young 1994). In diesem Zusammenhang wurden bei *M. avium* zwei Proteine, die mit menschlichen respiratorischen Zellen (HEp-2) interagieren können identifiziert, (Reddy und Kumar 2000). Darüber hinaus konnte für systemische Infektionen gezeigt werden, daß auch Zellen des Zentralnervensystems infiziert werden können (Wu *et al.* 2000).

1.2 Das mycobakterielle Phagosom von Makrophagen

Die Infektion von Makrophagen durch Mycobakterien ist als die entscheidende Schnittstelle, durch die das Immunsystem die mycobakterielle Infektion kontrollieren kann, am besten untersucht. Mycobakterien kommen schon unmittelbar nach dem Eindringen in das Gewebe des Wirtes mit den Makrophagen in Kontakt. Sie besitzen, im Gegensatz zu avirulenten Bakterien, die Fähigkeit in den Phagosomen der Makrophagen zu überleben und sich dort zu vermehren (Amstrong und Hart 1971, Frehel *et al.* 1986).

Allgemein wird ein Phagosom, zum Beispiel nach Aufnahme eines opsonisierten avirulenten Bakteriums wie *Escherichia coli* nach Bindung an Fc γ -Rezeptoren und Phagozytose in einen Makrophagen, gebildet und einem Reifungsprozeß unterzogen. Dieser Prozeß endet mit der Fusion des Phagosoms mit einem Lysosom (Phago-Lysosom) und mit der Zerstörung der *E. coli*-Zelle (Haas 1998). Für die Reifung des Phagosoms wird nach der Bildung das Lumen durch hinzukommende Protonen-ATPasen (V-ATPasen) auf einen pH-Wert von 5 angesäuert. Außerdem werden auch lysosomale Hydrolasen und NADPH-Oxidasen, die für die Synthese von toxischen Sauerstoff-Derivaten verantwortlich sind, acquiriert (Yamada *et al.* 1987, Haas und Goebel 1992, Leusen *et al.* 1996). Zusätzlich werden noch Stickstoffmonoxid und antibakterielle Peptide (Defensine) in das Lumen der Phagosomen gebracht (Haas 1998). Dies findet jedoch nicht *ad hoc* durch Fusion mit einem Lysosom statt, sondern durch sukzessive

Fusionen des Phagosoms mit unterschiedlichen Endosomen, die man in frühe (EE) und späte Endosomen (LE) einteilt. Auf diesen sind zum Beispiel Proteasen wie das anfangs noch inaktive Cathepsin D membranständig lokalisiert (Pitt *et al.* 1992). Dieser Austausch findet nicht passiv und zufällig statt, sondern wird von dem Makrophagen kontrolliert (Haas 1998, Deretic und Fratti 1999). Es ist bekannt, daß die Phagosomen über Mikrotubuli in die Wirtszelle transportiert werden und dabei viele Membranproteine kontrolliert verlieren, wie zum Beispiel den Transferrin-Rezeptor, beziehungsweise erhalten, wie zum Beispiel das LAMP-1, das lysomassoziertes-Membranprotein-1 (Pitt *et al.* 1992, Desjardin *et al.* 1994). Diese Fusionen mit den EE oder LE werden durch einen Multikomponenten-Vesikel-Anbindungs- und Fusions-Komplex, der unter anderem aus den integralen Membranproteinen v- und t-SNAREs besteht, vorgenommen (Deretic und Fratti 1999). Wenn sich gegenseitig erkennende SNAREs von zwei unterschiedlichen Membranen (z.B. vom Phagosom und LE) paaren, entsteht ein sogenannter "SNAREpin", der in der Fusion der beiden Doppel-Lipidschichten endet (Weber *et al.* 1998). Diese Fusionen werden von einem regulierenden System, bei denen kleine GTPase-Proteine, sogenannten Rabs, eine entscheidene Rolle spielen, kontrolliert. Es existieren unterschiedliche Rab-GTPasen, die über Wechselwirkungen mit den SNARE Proteinen als negative Regulatoren die Fusion der unterschiedlichen Endosomen mit dem Phagosom unterbinden können (Deretic und Fratti 1999, Cox *et al.* 2000). Nach der Bildung eines Phagosoms sind zunächst vorherrschend die Rab5-GTPasen an der phagosomalen Membran lokalisiert, diese werden nach weiterer Reifung des Phagosoms von den Rab7-GTPasen, welche die Reifung des Phagosoms zum Phago-Lysosom durch Fusionen mit LE weiter steuern, abgelöst (Desjardins *et al.* 1994, Via *et al.* 1997, Deretic und Fratti 1999). Die abgeschlossene Reifung zum Phago-Lysosom führt dann zu den oben beschriebenen bakterioziden Bedingungen.

Anders ist die Gestalt des mycobakteriellen Phagosoms. Die unterschiedlichen Wege der Phagozytose von Mycobakterien in Makrophagen entscheiden über die Virulenz. Die Aufnahme findet unter anderem über die Komplement-Rezeptoren (vor allem CR-3), den Mannose-Rezeptor und bei opsonisierten Mycobakterien auch über den Fc γ -Rezeptor statt (Ernst, 1998). Es konnte gezeigt werden, daß nach Aufnahme über den Mannose-Rezeptor die generelle Produktion von O₂⁻ passiv unterbunden wird (Astarie-Dequeker *et al.* 1999). Malik *et al.* (2000) zeigten, daß opsonisierte *M. tuberculosis*-Zellen, die über den Fc γ -Rezeptor aufgenommen wurden, schlechter im Makrophagen persistieren und sich vermehren können als *M. tuberculosis*-Zellen, die über den Komplement-Rezeptor vom Makrophagen phagozytiert

wurden. Außerdem konnte ausschließlich bei Makrophagen, die opsonisierte Mycobakterien über den Fc γ -Rezeptor phagozytiert hatten, eine erhöhte intrazelluläre Ca²⁺ Konzentration gemessen werden (Malik *et al.* 2000). Die gestiegene intrazelluläre Ca²⁺ Konzentration wird von der Wirtszelle als Signal benutzt, um Mechanismen für die Phago-Lysosom Reifung einzuschalten (Calpham 1995, Beredige 1997). Unabhängig von dem Weg der Aufnahme in den Makrophagen unterscheidet sich das mycobakterielle Phagosom von dem im oberen Abschnitt beschriebenen. Viele Membranproteine, die auf dem späten Phagosomen oder Phago-Lysosomen lokalisiert sind, sind auf dem mycobakteriellen Phagosom nicht vorhanden. Zu diesen Proteinen gehören die V-ATPasen als Protonen-Pumpen, dessen Fehlen wahrscheinlich dafür verantwortlich ist, daß der pH-Wert der mycobakteriellen Phagosomen nicht unter pH 6,3 sinkt (Crowle *et al.* 1991, Sturgill-Koszycki *et al.* 1994, Barker *et al.* 1997, Hackam *et al.* 1997). Dieses verringert unter anderem auch die Antigen-Präsentation von mycobakteriellen Proteinen auf dem Makrophagen (Holsti und Allen 1996). Außerdem sind späte endosomale / lysosomale Membranproteine wie CD63, die aktive Form der Protease Cathepsin D, oder das LAMP-1 nur in einem sehr geringen Umfang oder gar nicht auf mycobakteriellen Phagosomen lokalisiert (Clemens und Horwitz 1995 und 1996). Dagegen sind der Transferrin-Rezeptor mit Transferrin, MHC-I und MHC-II, die alle auf nicht-mycobakteriellen Phagosomen nicht oder nur kurz nach dessen Bildung lokalisiert sind, Bestandteile des mycobakteriellen Phagosoms. Dem Transferrin wird die Versorgung des mycobakteriellen Phagosoms mit Eisen zugeschrieben (Haas 1998). Eisen ist für das Überleben und damit für die Virulenz von Mycobakterien essentiell (Manabe *et al.* 1999, De Voss *et al.* 1999). Die mycobakteriellen Phagosomen können auch durch Fusionen mit Vesikeln, die vom Plasmalemma abgeschnürt werden, extrazelluläre Moleküle (Nährstoffe) aufzunehmen (Russell *et al.* 1996, Sturgill-Koszycki *et al.* 1996). Die phagozytierten Mycobakterien fügen auch Poren in das Phagosom ein, durch die bis zu 70 kDa große Moleküle diffundieren können (Teitelbaum *et al.* 1999). Jedoch scheinen diese Poren nicht für alle Arten von Molekülen permeabel zu sein. Leucin-auxotrophe *M. tuberculosis*-Mutanten können sich nicht im Phagosom replizieren (Bange *et al.* 1996).

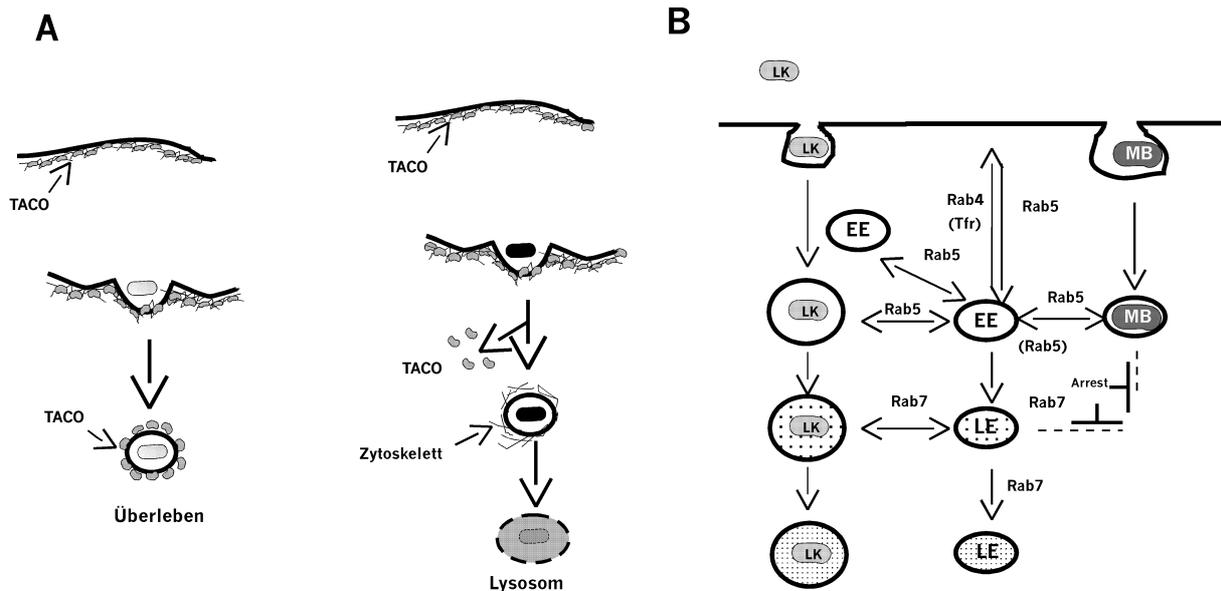


Abbildung 1.1: A) Funktion des TACO-Proteins bei mycobakteriellen Phagosomen. Links ist die Interaktion eines Phagosoms mit einem lebenden Mycobakterium dargestellt, rechts mit einem abgetöteten Mycobakterium (nach Ferrari *et al.* 1999, siehe auch Text); B) Darstellung eines mycobakteriellen Phagosoms (rechts), das durch Akkumulation der Rab5-GTPase (Rab5) und durch Ausschluss der Aufnahme von Rab7-GTPasen (Rab7) nicht zum Phago-Lysosom heranreift. Links Darstellung eines Phagosoms mit Latex-Kugel (LK), das zu einem Phago-Lysosom heranreifen kann (nach Deretic und Fratti 1999). EE: frühe Endosome; LE: späte Endosome; Rab4: RabGTPase4 (reguliert Recycling von Tfr); Tfr: Transferrin-Rezeptor; MB: Mycobakterien

Kürzlich sind zwei wichtige Gründe veröffentlicht worden, warum mycobakterielle Phagosomen nicht mit Lysosomen fusionieren und zu Phago-Lysosomen heranreifen (siehe auch Abbildung 1.1):

- 1.) Auf mycobakteriellen-Phagosomen werden im Gegensatz zu anderen Phagosomen die Rab5-GTPasen akkumuliert. Dagegen sind auf diesen Phagosomen keine Rab7-GTPasen lokalisiert, wodurch eine Reifung des Phagosoms zum Phago-Lysosom durch fehlende Fusionen mit LE unterbunden wird und das mycobakterielle Phagosom in einer frühen phagosomalen Phase verbleibt (Via *et al.* 1997, Deretic und Fratti 1999, Abbildung 1.1B).
- 2.) Das Verbleiben des TACO-Proteins auf der mycobakteriellen Phagosom-Membran scheint ein weiterer Grund für das intrazelluläre Überleben von Mycobakterien im Makrophagen zu sein (Ferrari *et al.* 1999). Dieses Protein befindet sich auf der Membran von Phagosomen mit lebenden Mycobakterien und fehlt bei anderen Phagosomen, zum Beispiel auch auf Phagosomen mit abgetöteten Mycobakterien. Ferrari *et al.* (1999) konnten zeigen, daß phagosomale Membranen mit dem TACO Protein ihren Kontakt zu Teilen des Zytoskelett (Aktin, Mikrotubuli) verlieren, wodurch eine Reifung des Phagosoms verhindert wird

(Abbildung 1.1A). Sie beschrieben auch, daß in Kupffer-Zellen der Leber, denen das TACO Protein fehlt, eine Reifung des mycobakteriellen Phagosoms stattfindet. In anderen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, daß Mycobakterien Aktin-Filamente des Makrophagen zerstören können (Guerin und deChastellier 2000). Neben diesen beiden Gründen werden auch andere Faktoren, wie die enge Bindung der phagosomalen Membran an das eingeschlossene Mycobakterium (deChastellier und Thilo 1997) oder auch die Inhibierung der Phosphorylierung einzelner Transkriptionsfaktoren durch Mycobakterien (Garcia *et al.* 2000), als Ursache für fehlende Reifung diskutiert.

Es bleibt festzuhalten, daß Mycobakterien durch aktive Veränderung des Phagosoms dessen Reifung und damit die Bildung eines Phago-Lysosoms inhibieren (Frehel *et al.* 1986; deChastellier *et al.* 1993; Clemens und Horwitz 1995). Das mycobakterielle Phagosom wird gleichsam als frühes Phagosom „eingefroren“. Dies ermöglicht den Mycobakterien das Überleben im Makrophagen und schützt sie sogar vor Antibiotika, wie dem Clarithromycin (Frehel *et al.* 1997). Die einzelnen Mechanismen hierfür sind noch weitgehend unbekannt.

1.3 Die Antwort des Immunsystems auf die Infektion von Mycobakterien

Der Wirt und im Speziellen der Makrophage „reagiert“ auf die Herausforderung durch die Mycobakterien. Im Makrophagen werden zum Beispiel Tyrosin-Kinasen der Src-Familie und die Phospholipase D aktiviert (Kusner *et al.* 1996). Die Makrophagen können auch aktiv werden und die Mycobakterien im Phagosom zerstören, dies geschieht unter anderem über Zytokine (im Besonderen durch IFN- γ) oder auch durch eine besondere genetische Ausstattung (de Chastellier *et al.* 1993, Hill 1998, Via *et al.* 1998). So wurde die schlechte Suszeptibilität einiger Maus-Stämme für *M. bovis* BCG auf das vorhandene Genprodukt Nramp1 (Natural-resistance-associated-membran-protein-1 oder auch Bcg^r genannt) zurückgeführt (deChastellier *et al.* 1993; Brown *et al.* 1997). Es handelt sich dabei um eine ATP abhängige Protonen-Pumpe, die es dem Makrophagen ermöglicht, die mycobakteriellen-Phagosomen anzusäuern (Hackam *et al.* 1998).

Hier soll nun eine kurze Zusammenfassung gegeben werden, wie das Immunsystem auf mycobakterielle Infektionen reagiert. Direkt nach dem Eindringen der Mycobakterien in den Wirt und nach der Infektion der Makrophagen antwortet dieser mit der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen. Es handelt sich dabei hauptsächlich um TNF- α , IL-6 und IL-12. Diese zügeln das Wachstum der Mycobakterien, indem sie andere Makrophagen

rekrutieren und die infizierten Makrophagen aktivieren (Fleisch und Kaufmann 1990, Appelberg *et al.* 1994, Ladel *et al.* 1997a und b, Matsumoto *et al.* 1997). Es konnte bei *M. avium* gezeigt werden, daß TNF- α autokrin die Synthese von bakterioziden Oxygen-Intermediaten anregt (Sarmiento und Appelberg 1996). Auch polymorphonukleare Granulozyten können die frühe Immunantwort über die Sekretion von Chemokinen, unter anderem auch von Leukotrienen, verstärken (Riedel und Kaufmann 1997). Durch IL-12 und TNF- α werden natürliche Killerzellen angeregt, Gamma-Interferon (IFN- γ) zu sekretieren, hierdurch findet eine weitere Aktivierung auch der infizierten Makrophagen statt (Rom *et al.* 1995, Silva *et al.* 1998).

10-14 Tage nach der Infektion wird das Wachstum der Mycobakterien im Makrophagen auch durch Mycobakterien-spezifische T-Lymphozyten inhibiert, obwohl eine Antigen-Präsentation durch die Mycobakterien inhibiert wird (Gercken *et al.* 1994, Ehlers 1999). Eine besondere Bedeutung hat dabei auch IL-12, da es neben TNF- α und IFN- γ für die Th1-Induktion bei naiven T-Lymphozyten verantwortlich ist (Doherty *et al.* 1996, De Jong *et al.* 1998). Die Th1-Lymphozyten schütten größere Mengen an IL-2 und IFN- γ aus, dies führt zu einer weiteren Aktivierung der natürlichen Killerzellen und der Makrophagen (Champsi *et al.* 1994, Rom *et al.* 1995, Bermudez und Kaplan 1995). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, daß die durch IFN- γ induzierten mycobakterioziden Wirkungen der Makrophagen abhängig sind von der Calcium abhängigen induzierbaren-NO-Synthase (Chan *et al.* 1992 und 1995, Flynn *et al.* 1993). Außerdem wird durch IFN- γ im Makrophagen die Synthese von Fc γ -Rezeptoren, MHC-II Antigenen und die Produktion von H₂O₂ angeregt (Murray 1988, Wallis *et al.* 1992, Ehlers 1999). Neben CD4⁺-T-Lymphozyten spielen auch die CD8⁺- und die CD4⁻-CD8⁻-T-Lymphozyten (γ/δ -T-Lymphozyten) eine wichtige Rolle bei der zellulären Immunabwehr (Behr-Perst *et al.* 1999, Canaday *et al.* 1999, Rosat *et al.* 1999). Die CD8⁺-T-Zellen produzieren wie die CD4⁺-T-Lymphozyten das typische Th1 Zytokin IFN- γ (Howard und Zwilling 1998, Feng *et al.* 1999). Fraglich ist, wie es zu einer MHC-I Präsentation von mycobakteriellen Antigenen kommen kann, wenn die Mycobakterien das Phagosom nicht verlassen. Es wird diskutiert, daß Glykolipide, häufige Bestandteile der mycobakteriellen Zellwand, durch CD1-Moleküle, die strukturell mit den MHC Molekülen verwandt sind, präsentiert werden und daß es sich bei den CD8⁺-zytotoxischen-T-Lymphozyten um CD1-restringierte Glykolipid-spezifische T-Zellen handelt (Kaufmann 1999). Es konnte gezeigt werden, daß diese T-Lymphozyten ihre antimikrobiellen Wirkungen durch Ausschüttung von Granulylin, das durch den Einbau von Perforinen direkt in die mycobakteriellen-Phagosomen gelangt, vermitteln (Stenger *et al.* 1998, Canaday *et al.* 1999). Ein wichtiger Mechanismus, der

auch zu einer latenten Infektion führt, ist die Bildung von granulomären Läsionen (Granulomen). Granulome bestehen im Kern aus infizierten Makrophagen, die von Lymphozyten umgeben sind und die Makrophagen so vom umliegenden Gewebe abschließen, so daß das Gewebe beschädigt, zerstört und ausgehöhlt wird (Dannenberg und Rook 1994, Jagirdar und Zagzag 1996). An der Formierung von Granulomen, die für eine effektive Immunabwehr gegen die Mycobakterien benötigt werden, sind ebenfalls die Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-12 beteiligt (Nau *et al.* 1997, Altare *et al.* 1998). Bei Mäusen führt der Verlust des TNF-Rezeptors p55 zur Bildung von letalen Granulomen nach Infektionen mit *M. avium* (Ehlers *et al.* 1999a, Benini *et al.* 1999). Granulome, die nach einer Infektion von *M. avium* gebildet werden, werden zudem durch Stickstoffmonoxid (NO) in ihrer Größe und Qualität bestimmt (Ehlers *et al.* 1999b). Durch die Bildung von Granulomen schafft es der Wirt, die Zahl der Mycobakterien konstant zu halten und eine Infektion durch eine weitere Ausbreitung zu verhindern (Ehlers 1999).

Jedoch haben Mycobakterien wie *M. avium* sich an die Mechanismen der Immunabwehr adaptiert. Bei einer Infektion mit virulenten *M. avium* Stämmen werden neben den oben genannten immunstimulierenden auch immunsupprimierende Zytokine wie TGF- β und IL-10 gebildet. Diese können eine zelluläre Immunabwehr hemmen und somit dem Pathogen die Vermehrung erleichtern (Bermudez 1993, Bermudez und Kaplan 1995). Es konnte im Tiermodell nachgewiesen werden, daß gerade eine verminderte zelluläre Immunabwehr entscheidend für die Suszeptibilität des Tieres für *M. avium* ist (Montali *et al.* 1998, Appelberg *et al.* 2000). Obwohl Dorman und Holland (1998) zeigen konnten, daß für die Immunabwehr bei *M. avium* Infektionen das Zytokin IFN- γ essentiell ist, konnte im Maus-Modell für Infektionen mit virulenten *M. avium* Stämmen beobachtet werden, daß dieses Zytokin für die effektive Kontrolle der Replikation im Makrophagen eine geringe Rolle spielt (Appelberg *et al.* 2000, Florido *et al.* 1999). Gleiches gilt auch für die bakteriozide Wirkung von NO, das seine Wirkung auf virulente *M. avium* Stämme im Makrophagen verfehlt (Gomes *et al.* 1999a). Interessanterweise ist *M. avium* tolerant gegenüber der Absenkung des pH-Wertes im Phagosom nach der Aktivierung im Makrophagen. Im Gegensatz dazu reagiert *M. tuberculosis* auf eine Ansäuerung des Phagosoms sensitiv (Gomes *et al.* 1999b, Bodmer *et al.* 2000). Diese neuen Daten machen eine Modifizierung des oben genannten Modells der Immunabwehr notwendig. Es werden nun weitere, IFN- γ unabhängige Signale und Mechanismen, durch die das intrazelluläre Wachstum unter anderem von virulenten *M. avium* Stämmen kontrolliert wird, angenommen (Florido *et al.* 1999).

Eine mögliche Rolle kann dabei der CD40-Ligand, der den Makrophagen zum abtöten intrazellulärer Mycobakterien (*M. avium*) aktivieren kann, spielen (Hayashi *et al.* 1999). Der CD40-Ligand wird auf T-Lymphozyten exprimiert, dieses kann auch die *M. avium*-Infektionen bei HIV-Patienten, die eine CD4⁺-T-Zellen-Konzentration unterhalb von 50 Zellen/µl haben, erklären (Horsburgh 1991). Die Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) der infizierten Makrophagen ist ein weiterer Mechanismus der Immunabwehr auf die Infektion von Mycobakterien zu reagieren (Mangan und Wahl 1991, Dürrbaum-Landmann *et al.* 1996, Ragno *et al.* 1997, Ragno *et al.* 1998, Fratazzi *et al.* 1999). Schon nach einer Infektion der alveolaren Makrophagen mit Mycobakterien wird Apoptose der Makrophagen ausgelöst (Keane *et al.* 1997). Es wird angenommen, daß die Apoptose mit Mycobakterien infizierten Makrophagen u.a. durch Abbauprodukten des Tryptophan-Katabolismus (Picolin-Säure) initiiert wird (Pais und Appelberg 2000). Apoptotische Zellen haben die Eigenschaft durch Quer-Vernetzung von Proteinen über γ -Glutamyl-Reste ihre Zellmembran zu stabilisieren und dadurch intrazellulär lebende Bakterien (Mycobakterien) zu sequestrieren, um damit eine weitere Verbreitung der Pathogene zu verhindern (Fesus *et al.* 1989, Fratazzi *et al.* 1997). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß zu apoptotischen und mit Mycobakterien infizierten Makrophagen neu hinzukommende Makrophagen das Wachstum der Mycobakterien zu 90 % inhibieren können (Fratazzi *et al.* 1997, Fratazzi *et al.* 1999). Es wird postuliert, daß die Apoptose mit Mycobakterien infizierten Makrophagen auch durch TNF- α induziert wird (Keane *et al.* 1997). Virulente *M. tuberculosis* und *M. avium* Stämme können durch Induktion von IL-10 die Apoptose des Wirts-Makrophagen inhibieren, um damit ihr Überleben im Wirt zu verlängern (Balcewicz-Sablinska *et al.* 1998, Fratazzi *et al.* 1999, Balcewicz-Sablinska *et al.* 1999). Das durch die virulenten Bakterien induzierte IL-10 bewirkt wiederum die Sekretion des löslichen TNF- α Rezeptors Typ-2, welcher Komplexe mit TNF- α bildet. Es binden dadurch weniger TNF- α Moleküle an den auf dem Makrophagen lokalisierten Rezeptor, die die Apoptose und andere bakteriozide Effekte induzieren können (Eriks und Emerson 1997, Fratazzi *et al.* 1999, Balcewicz-Sablinska *et al.* 1999). Die Apoptose für die Immunabwehr und IL-10 als „Virulenz-Faktor“ scheinen diesen neuen Untersuchungen eine größere Bedeutung bei mycobakteriellen Infektionen zu haben.

1.4 Methoden zur Identifikation von Virulenz-Genen und deren Charakterisierung bei Mycobakterien

Im Gegensatz zu den immunologischen und zellbiologischen Aspekten (1.1 – 1.3) während einer mycobakteriellen Infektion ist nicht sehr viel darüber bekannt, welche Gene die Virulenz verursachen. Doch nicht zuletzt seitdem das Genom von *M. tuberculosis* sequenziert wurde, steigt das Interesse, Virulenz-Gene zu identifizieren (Cole *et al.* 1998).

Es wurden und werden unterschiedliche Methoden benutzt, mögliche Virulenz-Gene zu finden. Eine Methode ist die genomische Subtraktions-Hybridisierung zweier Mycobakterien-Stämme, bei denen Unterschiede im Genom zwischen virulenten und avirulenten Stämmen untersucht werden (Mahairis *et al.* 1996, Tizard *et al.* 1998). Es konnten aber bei Mycobakterien keine DNA-Abschnitte, die man als sogenannte Pathogenitäts-Inseln bezeichnen kann, identifiziert werden (Tizard *et al.* 1998). Als Pathogenitäts-Inseln werden bis zu 200 kb große DNA-Sequenzen, die von fremden Bakterien-Arten stammen können und für die Virulenz von zum Beispiel uropathogenen *Escherichia coli* Stämmen verantwortlich sind, bezeichnet (Hacker *et al.* 1997). Des Weiteren wurden auch sogenannte „RNA-arbitrarily-primed differentiell-display PCR“ (RAP- oder DD-PCR) durchgeführt. Mit dieser Methode wurden bei virulenten (H37Rv) und avirulenten (H37Ra) *M. tuberculosis* Stämmen differentiell exprimierte Gene, die für die Virulenz verantwortlich sein können, gesucht (Rivera-Marrero *et al.* 1998, Rindi *et al.* 1999). Rivera-Marrero *et al.* (1998) identifizierten Gene, die vom avirulenten Stamm differentiell exprimiert werden. Dagegen fanden Rindi *et al.* (1999) Gene, die nur vom virulenten Stamm transkribiert werden, deren genaue Funktionen jedoch unbekannt sind.

Bei zellbiologischen Untersuchungen hat sich herausgestellt, daß nur lebende Mycobakterien die Phagosom-Lysosom Fusion verhindern und im Lysosom der Makrophagen persistieren (1.3). Es wird daher angenommen, daß die Mycobakterien nach Induktion von Umweltsignalen ihre Virulenz-Gene transkribieren (Amara und Satchidanandam 1997, Cirillo *et al.* 1997). Bei anderen virulenten Bakterien, wie zum Beispiel bei *Vibrio cholerae*, konnte dies bereits gezeigt werden. Die Erhöhung der Temperatur oder der Osmolarität induziert Virulenz-Gene, die die Überlebenschance von *V. cholerae* im Wirt erhöhen (Mekalanos 1992). Es existieren mehrere Methoden diese Gene (Genprodukte) zu identifizieren. Eine davon ist das „Proteomics“. Dabei hier werden in einer 2-dimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese die Proteine aus Mycobakterien, die unterschiedlichen Umweltbedingungen zum Beispiel der Infektion von Makrophagen ausgesetzt waren, aufgetrennt (Sturgill-Koszycki *et al.* 1997,

Jungblut *et al.* 1999). Die Gelbilder werden miteinander verglichen und die Spots einzelnen Proteinen zugeordnet. Es konnte für intrazelluläre *M. avium* Bakterien gezeigt werden, daß einige Proteine nach der Aufnahme in einen Makrophagen stärker exprimiert werden (Sturgill-Koszycki *et al.* 1997). Yuan *et al.* (1998) identifizierten bei *M. tuberculosis* ein Protein (Acr), das differentiell nur in der stationären Phase exprimiert wird und dessen Fehlen zu einer attenuierten Virulenz im Makrophagen führt, die genaue Protein-Funktion ist noch unbekannt. Eine weitere Methode Virulenz-Gene, die durch Umweltsignale induziert werden, zu identifizieren ist die cDNA-Subtraktion (Plum und Clark-Curtiss 1994, Graham und Clark-Curtiss 1999). Mit dieser Methode wurden Transkripte, die von Mycobakterien im Makrophagen transkribiert werden, gefunden (Tabelle 1.1). Auf eines dieser Gene (*mig*) wird unter 1.6 näher eingegangen. Weitere Methoden benutzen Plasmide mit DNA-Bibliotheken, bei denen mycobakterielle Promotoren kloniert wurden. In Verbindung mit Reportergenen, wie zum Beispiel dem Gen für das GFP (grün-fluoreszierendes-Protein) konnte die Promotoren-Aktivität im Makrophagen untersucht werden (Marston und Shinnick 1996, Barker *et al.* 1998, Triccas *et al.* 1999). Eine weitere Methode zur Identifikation von Virulenz-Gene ist es, Gene oder DNA-Expressions-Bibliotheken von virulenten Mycobakterien im avirulenten Bakterien (*M. smegmatis*, *E. coli*) zu exprimieren, um damit im Makrophagen oder Tiermodell transgene *M. smegmatis* oder *E. coli* Klone, die eine erhöhte Überlebensrate besitzen, zu erhalten (Barker *et al.* 1996, Wieles *et al.* 1997, Wei *et al.* 2000, Miller und Shinnick 2000). Diese Methode hat aber den Nachteil, daß nur Gene, die unabhängig des artspezifischen Kontextes ihre Virulenz vermitteln können, identifiziert werden. Zum Beispiel wurden durch heterologe Expression des *mce* Gens in *E. coli* die Zellen befähigt in Säugetierzellen einzudringen und zu überleben (Arruda *et al.* 1993). Komplementär dazu konnte nach Inaktivierung des *mce* Genes bei *M. bovis*, eine geringere Invasionsrate in Epithelzellen der genetisch veränderten Mycobakterien beobachtet werden (Flesselles *et al.* 1999). Ein anderes Verfahren ist die Herstellung einer Bibliothek von mycobakteriellen Mutanten mittels Transposon-Mutagenese, die auf eine attenuierte Virulenz im Makrophagen- oder Maus-Modell hin untersucht werden (Lagier *et al.* 1998, Camacho *et al.* 1999). Bei diesen Untersuchung wurden Virulenz-Gene oder potentielle Virulenz-Gene identifiziert (siehe Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Einige Gene oder offene Leserahmen (ORF) von Mykobakterien, die durch unterschiedliche Test-Systeme als Virulenz-Gene identifiziert wurden. Referenzen: 1) Barker *et al.* 1998; 2) Triccas *et al.* 1999; 3) Graham und Clark-Curtis 1999, 4) Camacho *et al.* 1999; 5) Lagier *et al.* 1998; 6) Wei *et al.* 2000; 7) Wieles *et al.* 1997; 8) Miller und Shinnick 2000; 9) Arruda *et al.* 1993 10) Bange *et al.* 1996 11) Plum und Clark-Curtiss 1994

Test-System	Gen (ORF)	mögliche biologische-Funktion
Promotor-Induktion ¹⁾	<i>pvdD</i>	Peptidsynthetase
Promotor-Induktion ²⁾	<i>tkt</i>	Transketolase (Pentosephosphat-Zyklus)
Promotor-Induktion ²⁾	<i>fadB4</i>	Quinonoxidoreduktase (Fettsäuresynthese)
Promotor-Induktion ²⁾	<i>cysD</i>	Sulfat-Adenylat-Transferase
cDNA-Subtraktion ³⁾	<i>sigE</i>	alternativer Sigmafaktor
cDNA-Subtraktion ³⁾	<i>aceA</i>	Isocitratlyase (Glyoxylsäure-Zyklus)
cDNA-Subtraktion ³⁾	<i>uvrA</i>	UvrABC Endonuklease
cDNA-Subtraktion ³⁾	<i>mce</i>	Makrophagen-Invasion
cDNA-Subtraktion ¹¹⁾	<i>mig</i>	potentielle Acyl-CoA-Synthetase
Transposon-Mutagenese ⁴⁾	<i>fadD26</i>	Lipid-Metabolismus
Transposon-Mutagenese ⁴⁾	<i>lipF</i>	Lipid-Degradation (Lipase?)
Transposon-Mutagenese ⁴⁾	<i>pksb</i>	Polyketid-Synthase
Transposon-Mutagenese ¹⁰⁾	<i>leuD</i>	Leucin-Biosynthese
Transposon-Mutagenese ⁵⁾	TB149	Peptid-Synthetase??
Virulenz in <i>M. smegmatis</i> ⁶⁾	<i>eis</i>	unbekannt (Virulenz)
Virulenz in <i>M. smegmatis</i> ⁷⁾	<i>trx</i>	Thioredoxin-Thioredoxin-Reduktase
Virulenz in <i>M. smegmatis</i> ⁸⁾	<i>glnA</i>	Glutaminsynthetase
Virulenz in <i>E. coli</i> ⁹⁾	<i>mce</i>	Zell-Invasion

Einige weitere potentielle Virulenz-Gene wurden aufgrund unterschiedlicher Kriterien gefunden. Es wurden Gene identifiziert, 1.) die Homologien zu Virulenz-Genen anderer virulenter Bakterien besitzen, 2.) deren Genprodukte von Mycobakterien sekretiert werden und 3.) die in avirulenten Stämmen mutiert sind (Shinnick *et al.* 1995, Collins 1996). Dazu gehört das Gen *tlyA*, das für ein hämolytisches Protein, welches zu den Hämolysinen anderer pathogener Bakterien homolog ist, kodiert (Wren *et al.* 1998). Drei weitere Gene sind das *katG* (Katalase), das *glnA* (Glutaminsynthetase A) und das *sod* (Superoxid-Dismutase), die

aufgrund ihrer katalytischen Eigenschaften eine Rolle bei der Virulenz der Mycobakterien spielen können. Die Katalase (KatG) sowie die Superoxid-Dismutase (SOD) können toxische Sauerstoff-Derivate abbauen, ihnen wird daher eine für das Überleben im Makrophagen notwendige Schutzwirkung zugeschrieben. Die Bedeutung von KatG für die Virulenz konnte bei *M. tuberculosis* manifestiert werden, dagegen war eine *katG* Mutante von *M. intracellulare* unverändert virulent (Harth *et al.* 1994, Wilson *et al.* 1995, Heym *et al.* 1997, Marklund *et al.* 1998, Harth und Horwitz 1999a). Die Bedeutung konnte bei der Glutaminsynthetase für die Virulenz im Makrophagen-Modell gezeigt werden. Ihre katalytischen Eigenschaften werden mit der Zellwandbiosynthese und dem Abbau von giftigem Ammonium im Phagosom in Zusammenhang gebracht (Harth und Horwitz 1997 und 1999b, Harth *et al.* 2000, Miller und Shinnick 2000). Auch sekretierte Proteine werden als Schlüssel für die Virulenz von Mycobakterien angesehen. Ihre Gene wurden auf unterschiedliche Weise, zum Beispiel mittels *phoA*-Fusion oder computergestützt, identifiziert (Lim *et al.* 1995, Chubb *et al.* 1998, Gomez *et al.* 2000). Besonders interessant sind Proteine, gegen die im Serum von Tuberkulose-Patienten Antikörpern gebildet werden, wie zum Beispiel die Antigene Ag85a-c und Ag19 (Young und Garbe 1991, Young *et al.* 1992). Man erhofft sich mit diesen und anderen Antigenen, neue Impfstoffe gegen die Tuberkulose zu entwickeln (Ulrichs *et al.* 1998, Hess und Kaufmann 1999, Hess *et al.* 2000, Cohavy *et al.* 1999). Ihre Bedeutung für die Virulenz ist dagegen umstritten. Es konnte bei *M. intracellulare* für eine Ag19-Mutante keine attenuierte Virulenz im Maus-Modell beobachtet werden (Mahenthiralingam *et al.* 1998). Gleiches gilt auch für *M. tuberculosis*-Mutanten, denen die Antigene Ag85b oder Ag85c fehlen, sie zeigten keine attenuierte Virulenz im Makrophagen-Modell. Dagegen war dies bei einer Ag85a-Mutante der Fall (Jackson *et al.* 1999, Armitige *et al.* 2000). Die Ag85-Proteine haben wahrscheinlich eine Funktion als Mycolyl-Transferasen bei der Zellwandbiosynthese (Jackson *et al.* 1999). Auch die Inaktivierung des Gens für das Zellwandprotein Erp von *M. tuberculosis* hatte eine attenuierte Virulenz zur Folge, die Funktion ist jedoch dieses Proteins unbekannt (Berthet *et al.* 1998). Als Virulenz-Gen bei *M. tuberculosis* wurde auch der generelle Sigma-Faktor (*rpoV*) identifiziert. Eine Punktmutation in diesem Sigma-Faktor führt zu einem attenuierten Phänotyp (Collins *et al.* 1995, Collins 1996). Weitere Virulenz-Gene sind Gene, dessen Genprodukte an der Eisen-Aufnahme und dem -Metabolismus beteiligt sind. Die Regulation dieser Prozesse ist mit Genen, die nach oxidativem Streß oder während der Persistenz im Makrophagen exprimiert werden (*katG*, *sod* oder auch *mtrA*), verknüpft. Die Regulation des Eisen-Metabolismus hat somit, neben der Aufnahme von Eisen auch eine

wichtige Funktion für die Regulation der Virulenz (Manabe *et al.* 1999, DeVoss *et al.* 1999, Zhu *et al.* 1998, Via *et al.* 1996). Im Ganzen sollte gezeigt werden, daß bislang viele Gene, die mit der Virulenz zusammenhängen, identifiziert wurden. Es fehlen jedoch noch Informationen, wie diese einzelnen Gene zum Beispiel die Fusion des mycobakteriellen Phagosoms mit dem Lysosom im Makrophagen verhindern können.

1.5 Gezielte Inaktivierung von Genen bei langsam-wachsenden Mycobakterien

Erst seit wenigen Jahren ist die Transformation von langsam-wachsenden Mycobakterien mit rekombinanter-DNA durch die Elektroporations-Technik möglich (Jacobs *et al.* 1991, Hatfull 1993). Ein gezielter Genaustausch wurde erst in den letzten Jahren beschrieben (Norman *et al.* 1995). Ein großes Problem für einen gezielten allelen-Austausch ist eine hohe Rate illegitimer Rekombinationen, die bis zu 80 % betragen kann (Kalpana *et al.* 1991; Aldovini *et al.* 1993, McFadden 1996). Eine Methode, dieses Problem zu umgehen, zeigten Balasubramanian *et al.* (1996), indem sie lange lineare DNA-Fragmente als Substrate für eine homologe Rekombination benutzten. Sie konnten damit das *leuD*-Gen bei *M. tuberculosis* gezielt inaktivieren, mit anderen Vektoren (zum Beispiel Suizid-Plasmiden) hatte dies nicht funktioniert. Diese 50 kb-langen genomischen DNA-Fragmente enthielten ein durch ein Kanamycin-Resistenzgen (*aph*) inaktiviertes *leuD*-Allel. Die Herstellung dieser DNA-Fragmente geschah in *E. coli* mittels Konjugation und homologer Rekombination eines *leuD::aph*-Allels mit einem 50 kb großen Cosmid, auf dem das *leuD*-Gen lokalisiert war (Balasubramanian *et al.* 1996). Es wurden bis heute Mutanten von unterschiedlichen Mycobakterien-Arten, zum Beispiel *M. bovis*, *M. tuberculosis* oder *M. intracellulare* konstruiert (Marklund *et al.* 1995, Pelicic *et al.* 1997, Baulard *et al.* 1996). Jedoch war ein alleler-Genaustausch bei *M. intracellulare* nur mit avirulenten Wildtyp-Stämmen möglich (Marklund *et al.* 1998). Gene von *M. avium* konnten bis zu dieser Arbeit nicht gezielt inaktiviert werden. Zwei Gründe dafür liegen in einer sehr hohen Spontanresistenzrate (bis 10^{-5}) und in einer geringen Transformationseffizienz mit der Elektroporation bei dieser Art (Inderlied und Nash 1997, Foley-Thomas *et al.* 1995, Batoni *et al.* 1998). Jedoch ist eine effiziente genetische Manipulation von *M. avium* für eine Untersuchung der Virulenz des MAC notwendig.

1.6 Das Makrophagen-induzierte Gen (*mig*) von *M. avium*

Das *mig*-Gen wurde bei *M. avium* von Plum und Clark-Curtiss (1994) durch eine cDNA Subtraktion entdeckt. Für die Subtraktion wurde RNA aus *M. avium* #5-8 Zellen, die zum einen aus infizierten Makrophagen und zum anderen aus Zellen, die in 7H9-Medium kultiviert wurden, stammten, isoliert. Die RNAs wurden, nach der Subtraktion der rRNA, in cDNA umgeschrieben. Für die cDNA-Subtraktionen wurde cDNA aus *in vitro* gewachsenen Mycobakterien im Überschuß mit der cDNA, die aus intrazellulären Mycobakterien gewonnen wurde, hybridisiert. Nachdem die Hybridisierungsprodukte aus dem Ansatz subtrahiert wurden, konnte das Makrophagen-induzierte Gen (*mig*) durch Hybridisierung mit genomischer *M. avium*-DNA auf einem 2,8 kb großen *Bam*HI-DNA-Fragment identifiziert und kloniert werden (Plum und Clark-Curtiss 1994). Der ORF des Gens *mig* konnte aufgrund einer DNA-Sequenzierung und Southern-Hybridisierungen als ORF1 (GenBank: U43598; Nukleotid 496 bis 1383; 295 Aminosäuren, Anhang A) identifiziert werden. Das Molekulargewicht des Genproduktes wurde mit 31,6 kDa berechnet (Plum *et al.* 1997). Ein zum *mig*-Gen homologes Gen konnte bei *M. intracellulare* mit Southern-Untersuchungen identifiziert werden, jedoch war dies für andere Arten, wie zum Beispiel *M. smegmatis*, nicht der Fall (Plum, persönliche Mitteilung).

Das *mig*-Gen wurde in *E. coli* und *M. smegmatis* heterolog exprimiert. Die Genprodukte wurden bei einer Immunodetektion mit einem Mig-spezifischen Antikörper mit unterschiedlichen Molekulargewichten nachgewiesen. Die heterolog exprimierten Genprodukte aus *E. coli* und *M. smegmatis* waren circa 30 kDa beziehungsweise circa 60 kDa groß (Plum *et al.* 1997). Die Ursache für ein 60 kDa große Genprodukt war bis zur vorliegenden Arbeit unklar. Zum einen hätte es sich um ein Dimer von Mig handeln können. Zum anderen wurde von Plum *et al.* 1997 eine Fusion des ORF1 mit einem direkt am 3' Ende überlappenden zweiten ORF (ORF3; Nukleotid 1361 bis 2149) postuliert. Dies kann durch ein Verrutschen der Ribosomen um ein Nukleotid, verursacht durch eine RNA-Haarnadelschleife zwischen den Nukleotiden 1273 und 1292, geschehen (Plum *et al.* 1997). Durch die Expression von Mig in *M. smegmatis* konnte eine erhöhte Überlebensrate im Makrophagen-Infektionsmodell beobachtet werden, dies unterstreicht die Bedeutung dieses Genes für die Virulenz (Plum *et al.* 1997). Das Mig-Protein konnte in *M. avium* nur bei Immunodetektionen im Zell-Lysat und in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen werden, wenn die Bakterien aus einer Makrophagen-Kultur oder aus Kulturen mit leicht saurem pH-Wert (pH 5,0-6,0) isoliert wurden (Plum *et al.*

1997). Hieraus wurde geschlossen, daß die Transkription des *mig*-Gens durch Säure induziert wird. Das Gen ist in Abbildung 1.2 und Anhang A dargestellt.

In der möglichen *mig*-Promotor-Region befindet sich ein 23 bp langer DNA-Abschnitt, der eine DNA-Sequenz mit einem relativ hohen AT-Gehalt für Mycobakterien von 57 %, besitzt. Hier konnte eine -10 Region, die eine 100 %ige Homologie zu der von Bashyam *et al.* (1996) propagierten Konsensus-Sequenz (TANNAT) für Mycobakterien besitzt, identifiziert werden (Plum *et al.* 1997). Eine -35-Region scheint wie bei anderen mycobakteriellen Promotoren zu fehlen (Bashyam *et al.* 1996). Der Transkriptions-Startpunkt konnte über Starterverlängerungs-Experimente ("Primer-Extension") aufgrund des hohen GC-Gehaltes nicht ermittelt werden (Plum, persönliche Mitteilung). Im Bereich der Promotor-Region wurden auch mögliche Erkennungsstellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert. Als direkte Wiederholungen kommen dort viermal die Sequenz GACGGC und zweimal die Sequenz ACGGCCGC vor. Außerdem treten zwei palindromische Oktamere, CGACGTCG (P1) und CGTCGACG (P2), die ineinander geschachtelt sind, und ein Palindrom, AAGATCTT (P3), das im Bereich einer potentiellen -35 Region liegt, auf (Abbildung 1.2). Der *mig*-Promotor war in *E. coli* nur aktiv, wenn ein DNA-Abschnitt um die potentielle -35 Region deletiert und gegen einen Abschnitt mit einem AT-Lauf ersetzt wurde (Thilo, unveröffentlichte Ergebnisse). AT-Läufe erzeugen meist Kurvaturen, die mit DNA-Krümmungen, die durch Transkriptionsfaktoren hervorgerufen werden, äquivalent sind. Es kann daher angenommen werden, daß Transkriptionsfaktoren (Aktivatoren) die Promotor-Aktivität regulieren (Wilkins und Rügner 1994, Lavigne *et al.* 1992).

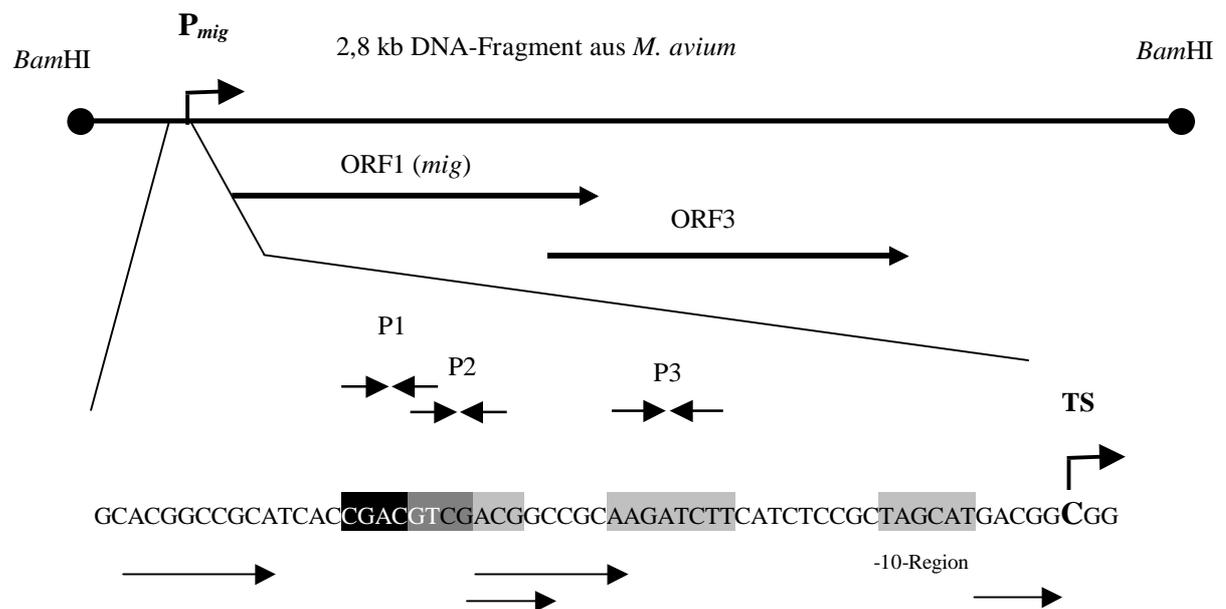


Abbildung 1.2: Das *mig*-Gen tragende DNA-Fragment aus *M. avium* mit ORF1, ORF3 und P_{mig} . Die Palindrome (P), die direkten Wiederholungen und der durch das Internet-Programm NNPP errechnete Transkriptions-Startpunkt (TS) des Promotors sind durch Pfeile gekennzeichnet (Näheres siehe Text).

1.7 Der alternative Sigma-Faktor SigE

SigE gehört zu der Familie der Sigma-Faktoren für extrazytoplasmatische Funktionen (ECF). Die ECF-Sigma-Faktoren sind Proteine, die Funktionen, die im weitesten Sinne mit der „Zellhülle“ zusammenhängen, regulieren. Bei Gram-negativen Bakterien (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) ist der Sigma-Faktor SigE besonders während extrazytoplasmatischer Streß-Situationen aktiv. Für *E. coli* konnte gezeigt werden, daß SigE eine wichtige Rolle bei der Bewältigung von extrazellulärem Hitze-Streß spielt, wobei unter anderem die Transkription des Hitzeschock-Sigma-Faktors SigH (*sigH*) von einem SigE-abhängigen Promotor reguliert wird (Connolly *et al.* 1997). Die Aktivität von SigE wird durch die Konzentration von fehlgefalteten äußeren Membranproteinen oder periplasmatischen Proteinen moduliert (Meccas *et al.* 1993). Die Regulation wird dabei von einem Anti-Sigma-Faktor (RseA) ,einem inneren Membranprotein, kontrolliert. Dieser sequestriert und inaktiviert SigE, solange ein periplasmatisches Regulator-Protein (RseB) an RseA bindet (Missiakas *et al.* 1997). Durch extrazellulären Streß (Hitze) erhöht sich die Menge an fehlgefalteten Proteinen, RseB bindet an diese Proteine und löst seine Verbindung zu RseA, mit der Folge, daß SigE im Zytoplasma frei und aktiv vorliegt (De Las Penas *et al.* 1997). In einer neueren Studie konnte

gezeigt werden, daß die SigE-Aktivität durch das relative Verhältnis von SigE zu RseA reguliert wird. Die RseA-Konzentration wird durch Proteolyse kontrolliert, hierfür ist die innere Membranprotease DegS verantwortlich (Ades *et al.* 1999). Ein wichtiges Protein, das durch SigE kontrolliert wird ist die periplasmatische Protease DegP, die fehlgefaltete Proteine im Periplasma degradiert. Die HtrA-Protease von *Salmonella typhimurium*, ein homologes Protein zu DegP, ist als Virulenz-Faktor bekannt. Eine *htrA*-Mutante von *S. typhimurium* ist im Tiermodell in der Virulenz attenuiert, diese Mutante konnte sogar als Impfstoff für Mäuse eingesetzt werden (Johnson *et al.* 1991, Chatfield *et al.* 1992). Auch Mycobakterien besitzen ein *htrA*-Gen, das unter der Kontrolle von SigE steht (Wu *et al.* 1997). Die *sigE*-Gene von *M. tuberculosis*, *M. avium* und *M. smegmatis* wurden von Wu *et al.* 1997 kloniert und sequenziert, wobei die deduzierten Aminosäure-Sequenzen zu 90% identisch waren. Sie konnten außerdem zeigen, daß eine *sigE*-Mutante bei *M. smegmatis* nach Hitze-Streß, bei saurem pH-Wert oder nach Behandlung mit Detergenzien oder H₂O₂ eine geringere Überlebensrate besitzt als der entsprechende Wildtyp (Wu *et al.* 1997). Ebenfalls wurde nachgewiesen, daß das *sigE*-Gen bei *M. tuberculosis* während der Infektion im Makrophagen stärker transkribiert wird (Graham und Clark-Curtiss 1999). Jedoch wurde die Eigenschaft als Virulenz-Faktor bis zu dieser Arbeit nicht gezeigt. Dies läßt sich aufgrund der bisher erhobenen Daten auch nicht deduzieren, da Mycobakterien wahrscheinlich zehn Sigma-Faktoren der ECF-Familie, die einen Ausfall eines einzelnen Sigma-Faktors substituieren können besitzen (Manganelli *et al.* 1999). Die Funktion von SigE bei *M. avium* wurde bis zu dieser Arbeit noch nicht untersucht.

1.8 Problemstellung

Ziel dieser Arbeit war eine Charakterisierung der potentiellen mycobakteriellen Virulenz-Gene *sigE* und *sigE* von *M. avium*:

- (1) Um die Bedeutung der potentiellen mycobakteriellen Virulenz-Gene bei *M. avium* zu untersuchen, sollten beide Gene inaktiviert werden. Da es bis zu dieser Arbeit noch nicht gelungen war, Gene gezielt in *M. avium* zu inaktivieren, mußte zunächst eine adäquate Mutagenese-strategie entwickelt werden.
- (2) Die Mutanten sollten anschließend in einem Infektionsmodell mit humanen Makrophagen auf ihre Virulenz hin untersucht werden, um eine mögliche Attenuation und damit die Bedeutung der Gene für die Virulenz zu bestimmen. Bei einer *M. avium sigE*-Mutante sollte

auch der Einfluß von extrazellulärem Streß auf die Überlebensrate (Hitze, saurer pH-Wert, SDS) untersucht werden.

(3) Die Funktion(en) von Mig war(en) bis zu dieser Arbeit nicht bekannt. Da das Protein in vorhergehenden Studien nicht aus *M. avium* isoliert werden konnte, sollte es als Mig-His₆-Fusionsprotein in *E. coli* heterolog exprimiert, angereichert und biochemisch charakterisiert werden.

(4) Der putative *mig*-Promotor sollte auf die Promotorstärke und auf mögliche Transkriptionsfaktoren hin untersucht werden. Da bei *M. avium* eine stabile Transformation mit rekombinanten Plasmiden und eine Transposon-Mutagenese nicht möglich ist, sollte dies über ein für die *mig*-Promotor-Region entwickeltes bakterielles "One-Hybrid-System" in *E. coli* geschehen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Oligonukleotide

Für die PCR, die Sequenzierungen und als DNA-Fragmente für Klonierungen wurden die in Tabelle 2.1 angegebenen Oligonukleotide eingesetzt, die von der Firma MWG-Biotech AG bezogen wurden. Einige Sequenzierungen wurden von der Firma MWG-Biotech AG durchgeführt, die von dieser Firma verwendeten Oligonukleotide sind hier nicht aufgeführt.

Tabelle 2.1: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Anzahl der Nukleotide
-35REGIONFW	GATCATTGACAT	12
-35REGIONRW	GATCATGTCAAT	12
KANFW	GAAC TTTTGCTTTGCCAC	18
KANRW	TTTATGCTTCTTCCGACC	18
M13-Forward-Primer	GTAAAACGACGGCCAG	16
M13-Reverse-Primer	CAGGAAACAGCTATGAC	17
MIG1005	GTCCGCGCAGCCACCACC	18
MIG1549	CTCCGACGACCCGACGCC	18
MIG173	ACCATGCAGGGGCATTTCAC	20
MIG472	TAGCAGGGGACCATCAGG	18
MIGGNFW	CGCCGCGTATCTGCACTC	18
MIGGNRW	TTTCATCCGTTCAACCGCC	18
MIGHISFW	AAGGATCCCACCACAACAGCATTTCAC	26
MIGHISRW	AACTGCAGGGGACCGCACGAC	21
MIGKANFW	ACACCACAACAGCATTTCAC	19
MIGKANRW	CACTCACATCAACCAACC	18
MIGTRUNCFW	CGACCGTCGCTACACCTACC	20
MIGTRUNCRW	ATCGCCGTCATCACCTC	17
P1	GCCGCCGAAACGATCTAC	18
P2	AGGTGGCGTCGAGGAAGAC	19
pLR7-F1	GGCAGCTGAATAAACGGCGAAAC	23
pLR7-R1	GGATATCACAAACGGCAAACAC	22
SIGEFW	CAGCATCCCGAGCAG	15
SIGERW	CAGCAACCACAGCCC	15
SIGETESTFW	GCTGGCTTACCGGCTTTC	18
SIGETESTRW	CACCCGCTCGTAGTCCTC	18

2.1.2 Plasmide

Die verwendeten Plasmide und ihre Eigenschaften sind in der folgenden Tabelle beschrieben.

Tabelle 2.2: Verwendete und hergestellte Plasmide

Plasmide	Charakterisierung	Referenz/Quelle
p#6	2,94 kb DNA-Fragment genomischer inseriert in <i>Bam</i> HI von pUC18	Diese Arbeit
p#10	Plasmid mit p#6 identisch	Diese Arbeit
p#59	3,7 kb DNA-Fragment aus <i>M. avium</i> Genom inseriert in <i>Bam</i> HI von pUC18	Diese Arbeit
pBBR1MCS	<i>lacZ</i> α Cm ^r rep mob	Kovach <i>et al.</i> 1995
pBluescript II (SK)	P _{T7} P _{T3} P _{lac} <i>lacZ'</i> Amp ^r ColE1	Stratagene
pBSL141	Amp ^r Gm ^r	Alexeyev <i>et al.</i> 1995
pBSL142	Amp ^r ; Ω -Gm ^r	Alexeyev <i>et al.</i> 1995,
pCM2-1	Ω -Gm ^r P _{mig} –Kassette aus pMigPromOGm inseriert in <i>Sac</i> II von pGFP (P _{mig} nicht in Orientierung von <i>gfp</i>)	Diese Arbeit
pCM2-2	Ω -Gm ^r P _{mig} –Kassette aus pMigPromOGm inseriert in <i>Sac</i> II von pGFP (P _{mig} in Orientierung von <i>gfp</i>)	Diese Arbeit
pCM2-3	Gm ^r –Kassette aus pBSL141 inseriert in <i>Sac</i> II von pGFP (Promotor von Gm ^r in Orientierung von <i>gfp</i>)	Diese Arbeit
pCM3	Ω -Gm ^r P _{mig} aus pMigPromOGm inseriert in <i>Sac</i> II von pGFP (P _{mig} in Orientierung von <i>lacZ</i>)	Diese Arbeit
pCM4	hybridisierte Oligonukleotide -35REGIONFW und -35REGIONRW inseriert in <i>Bgl</i> III von pCM3	Diese Arbeit
pCR2-1 Topo	TA-Klonierungsvektor (Topoisomerase)	Invitrogene,
pCVD442	<i>sacB</i> Amp ^r R6K ori RP4 mob	Donnenberg <i>et al.</i> 1991
pFDY157	<i>lacZ</i>	K. Schnetz
pGFP	<i>gfp</i> aus pGPC260 inseriert in <i>Hind</i> III und <i>Sac</i> II von pBBR1MCS	Diese Arbeit
pGPC100	2,8 kb großes <i>M. avium</i> DNA-Fragment mit <i>mig</i> (Gen-Bank/EMBL: U43598); Cm ^r	Plum <i>et al.</i> 1997

Plasmide	Charakterisierung	Referenz/Quelle
pGPC100-1	pGPC100 Deletion eines 1,2 kb <i>EcoRI</i> -Fragmentes durch partiellen Verdau → Δmig	Diese Arbeit
pGPC100-2	Gm ^r -Kassette aus pBSL141 inseriert in <i>EcoRI</i> von pGPC100-1 → $\Delta mig::aacCI$	Diese Arbeit
pGPC119	Km ^r -Kassette aus pUC4K inseriert in <i>NotI</i> von pGPC100 ($mig::aph$)	Diese Arbeit
pGPC120	wie pGPC119; Km ^r -Kassette aus pUC4K in anderer Orientierung inseriert	Diese Arbeit
pGPC121	$mig::aph$ -Allel aus pGPC119 inseriert in <i>EcoRV</i> von pVE-5	Diese Arbeit
pGPC126	$mig::aph$ -Allel aus pGPC119 inseriert in <i>SmaI</i> von pCVD442	Diese Arbeit
pGPC127	Cosmid mit $mig::aph$ -Allel Rekombinationsprodukt aus pYA1400 und pGPC126	Diese Arbeit
pGPC129	<i>sacB</i> pLR7 ori Hm ^r ColE1 (Methoden 2.2.1)	Diese Arbeit
pGPC130	$mig::aph$ -Allel aus pGPC119 in <i>EcoRV</i> von pGPC129	Diese Arbeit
pGPC135	PCR-Produkt MIGTRUNCFW-MIGTRUNCRW in pCR2-1	Diese Arbeit
pGPC136	Gm ^r -Kassette aus pBSL141 inseriert in <i>BamHI</i> von pGPC135	Diese Arbeit
pGPC137	Ω -Sm ^r /Sp ^r -Kassette aus pHRP316 inseriert in <i>HindIII</i> von pGPC136	Diese Arbeit
pGPC150	Amp ^r ColE1; 592 bp <i>KpnI</i> - <i>BspHI</i> DNA-Fragment der <i>mig</i> -Gen kodierenden Region fusioniert mit His ₆ -Codon für carboxyterminales Mig-His6-Fusionsprotein	Plum <i>et al.</i> 1997
pGPC200	Cm ^r <i>mig</i> pAL5000 ori	Plum <i>et al.</i> 1997
pGPC251	Col E1 Km ^r pAL5000ori <i>luxAB</i> ; <i>mig</i> Promotor-Region	G. Plum
pGPC252	Col E1 Km ^r pAL5000ori <i>luxAB</i> ; <i>rRNA</i> Promotor-Region	G. Plum
pGPC255	Col E1 Km ^r pAL5000ori <i>luxAB</i>	G. Plum
pGPC260	<i>gfp</i> Km ^r	L. Thilo
pGPC291	PCR-Produkt SIGEFW-SIGERW inseriert in <i>XbaI</i> und <i>XhoI</i> von pGPC294	Diese Arbeit

Plasmide	Charakterisierung	Referenz/Quelle
pGPC292	Gm ^r Kasette aus pBSL141 inseriert in <i>XmnI</i> von pGPC291	Diese Arbeit
pGPC293	<i>PvuII</i> -Fragment (<i>sigE::aacC1</i>) inseriert in <i>SmaI</i> von pBBR1MCS	Diese Arbeit
pGPC294	Km ^r –Kasette aus pUC4K inseriert in <i>XmnI</i> von pBluescript	Diese Arbeit
pHis5	PCR-Produkt MIGHISFW-MIGHISRW inseriert in <i>BamHI</i> und <i>PstI</i> von pQE10 für aminoterminales Mig-His ₆ -Fusionsprotein	Diese Arbeit
pHis9	<i>AscI-PstI</i> -Deletion eines 0,8 kb DNA-Fragmentes von pHis5 für deletiertes aminoterminales Mig-His ₆ -Fusionsprotein	Diese Arbeit
pHRP316	Ω-Sm ^r /Sp ^r -Kasette; Amp ^r	Parales und Harwood 1993
pLacZ	<i>lacZ</i> aus pFDY157 inseriert in <i>XbaI</i> und <i>EcoRV</i> von pBBR1MCS	Diese Arbeit
pMigGm	<i>Δmig::aacC1</i> aus pGPC100 inseriert in <i>EcoRV</i> pBBR1MCS	Diese Arbeit
pMigProm	<i>mig</i> Promotor-Region (P _{<i>mig</i>}) aus pGPC100 inseriert in <i>BamHI</i> und <i>NotI</i> von pBlueskript	Diese Arbeit
pMigPromOGm	Ω-Gm ^r –Kasette aus pBSL142 inseriert in <i>PstI</i> von pMigProm	Diese Arbeit
pQE10	P _{<i>lac</i>} Amp ^r ; His ₆ -Fusionsprotein-Expressionsvektor	Qiagen, Hilden
pREP4	p15Aori Km ^r <i>lacI^q</i>	Qiagen, Hilden
pRK2013	tra(RK2) ⁺ Km ^r ColE1	Figurski und Helinski 1979
pUC18	Amp ^r ColE1 P _{<i>lac</i>}	Pharmacia
pUC4K	Km ^r	Pharmacia
pVE-5	<i>sacB</i> pAL5000 ori Hm ^r ColE1	J. Crawford
pYA1400	Cosmid mit Wildtyp <i>mig</i> -Allel auf 50 kb großen DNA-Fragment aus <i>M. avium</i>	Plum <i>et al.</i> 1997

2.1.3 Bakterienstämme und Cosmid-Bibliothek

Tabelle 2.3: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Charakterisierung	Quelle
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ [Φ 80d Δ lacZM15] Δ (lacZYA-argF)U169 <i>deoR</i>	Life Technologies
<i>E. coli</i> LE392	F ⁻ e14 ⁻ (McrA ⁻) <i>hsdR514</i> ($r_k^- m_k^-$) <i>supE44</i> <i>supF58 lacY1</i> or Δ (lacIZY)6 <i>galK2 galT22</i> <i>metB1 trpR55</i>	Maniatis <i>et al.</i> 1989
<i>E. coli</i> M15 [pRep4]	Nal ^s Str ^s Rif ^s Thi ⁻ Ara ⁺ Gal ⁺ Mtl ⁻ F ⁻ RecA ⁺ Uvr ⁺ Lon ⁺ pREP4	Qiagen
<i>E. coli</i> NM554	<i>recA13 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7969 Δ (<i>lac</i>)17A <i>galU galK hsdR rpsL</i> (Str ^r) <i>mcrA mcrB</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> S17-1	Ec294::[RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)], <i>pro</i> , <i>res</i> , <i>recA</i> , <i>tra</i> ⁺ , Tp ^r , Sm ^r	Timmes
<i>E. coli</i> SY327 λ (<i>pir</i>)	F ⁻ [Δ lac- <i>pro</i>] <i>argE</i> (AM) <i>rpoB nalA recA56</i>	Timmes
<i>M. avium</i> #5-8	Serotyp-4 klinisches Isolat	Plum und Clark- Curtiss 1994
<i>M. avium</i> A5	klinisches Isolat	Beggs <i>et al.</i> 1995
<i>M. avium</i> K007	<i>sigE::aacCI</i>	Diese Arbeit
<i>M. avium</i> NSN94	klinisches Isolat	Batoni <i>et al.</i> 1998
<i>M. avium</i> TMC728	klinisches Isolat	F. Collins
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	elektroporationskompetenter <i>M. smegmatis</i> Stamm	W.R. Jacobs

Die Cosmid-Bibliothek stammt von G. Plum, die Herstellung ist in Plum und Clark-Curtiss (1994) beschrieben.

2.1.4 Antikörper

Für die Immunodetektionen wurden folgende Antikörper verwendet:

MRGS^{His}-Antikörper (Qiagen); Mig-Antikörper affinitätsgereinigt (Plum *et al.* 1997); Ziege-Anti-Kaninchen-HRP-Konjugat (Amersham); Anti-Dig-AP-Konjugat und Fab-Fragmente (Boehringer).

2.1.5 Membranen und Filter

Dialysefilter (Millipore), Filterpapier (Macherey-Nagel, MN), Hybond N Nylon-Membran (Amersham Buchler), PVDF-Membranfilter (Schleicher & Schuell), Sterilfilter 0,45µm (Millipore)

2.1.6 Chemikalien

Acrylamid / N,N'-Methylenbisacrylamid (Amresco), ATP (Boehringer), Agar-agar (Baker, Serva), Agarose (Seakem, Biozym), Ammoniumacetat (Baker), Ampicillin (Sigma), Bacto-Trypton (Difco), Chloroform (Baker), CoEnzymA = CoA (Sigma), Colistin (Sigma), CPSD (Promega), Desoxynukleosid-, Didesoxynukleosid-5'-Triphosphate (Perkin-Elmer, Boehringer), DTE (Boehringer), Dithiothreitol = DTT (Boehringer), Essigsäure (Riedel de Haen), Ethanol (Riedel de Haen), Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure-Dinatriumsalz = EDTA (Merck), Ethidiumbromid (Bio-Rad), Ficoll-Paque (Pharmacia), Formaldehyd (Riedel de Haen), Formamid (Riedel de Haen), Gentamycin (Sigma), Glukose (Roth), Glycerin (Riedel de Haen), Hefe-Extrakt (Difco), Isoamylalkohol (Merck), Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid = IPTG (Boehringer), Kanamycin (Sigma) 100 Bp Marker (Gibco BRL), „1kb ladder“ (MBI), β-Mercaptoethanol (Serva), Natriumchlorid (Riedel de Haen), Natriumdesoxycholat = NaDoc (Serva), Natriumdodecylsulfat = SDS (Biomol), Phosphoenolpyruvat = PEP (Sigma), Polyvinylpyrrolidon (Sigma), Palmityl-CoA (Sigma), Protein Größenstandard „rainbow-ladder“ (Amersham) und „prestained marker, low range ladder“ (Bio-Rad), Proteinase K (Sigma), reduzierte Form des Nikotinamid-Adenin-Dinukleotids = NADH (Boehringer), Rinderserumalbumin = RSA oder BSA (Serva), RPMI 1640 (Life Technologies), Saccharose (Merck), Sephadex G50 (Pharmacia), Spectinomycin (Sigma), Streptomycin (Sigma), Taurin (Merck), N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin = TEMED (Serva), Bromphenolblau (Sigma), Tetrazyklin (Serva), Tris(Hydroxymethyl)aminomethan = TRIS (Riedel de Haen), Tween80 (Serva) 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galaktopyranosid = X-Gal (Boehringer), Xylencyanol (Chroma).

Die Fettsäuren Butansäure, Pentansäure, Hexansäure, Heptansäure, Oktansäure, Dodekansäure, Tridekansäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Arachidonsäure, Linolensäure und Ölsäure wurde von der Firma Sigma bezogen

Alle sonstigen Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Amersham Buchler, Baker, Bio-Rad, Boehringer, Merck, Qiagen, Riedel de Haen, Roth, Seakem, Serva und Sigma bezogen.

2.1.7 Enzyme und Inhibitoren

RNaseA (Boehringer), Klenow-Fragment (New England Biolab), Lysozym (Biomol), Lambda-Terminase (Takara), Restriktionsenzyme (Boehringer, New England Biolab), Sequenase (Perkin-Elmer), T4-DNA-Ligase (Gibco BRL, MBI-Fermentas), T4-DNA-Polymerase (Eurogentec), *Taq*-DNA-Polymerase (Boehringer, MBI, Qiagen), *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega), Alkalische Phosphatase (Boehringer), Myokinase (Sigma), Laktat-Dehydrogenase (Boehringer), Pyruvat-Kinase (Boehringer)

2.1.8. Häufig verwendete Medien, Puffer und Lösungen

Middlebrook 7H9 (7H9-Medium): 0,25 % Na₂HPO₄; 0,1 % (w/v) KH₂PO₄; 0,05 % (w/v) NaGlutamat, 0,05 % (w/v) (NH₄)₂SO₄, 0,01 % (w/v) Na-Citrat, 0,005 % (w/v) MgSO₄·7H₂O, 0,004 % (w/v) Eisen Ammonium-Citrat, 0,0001 % (w/v) CuSO₄, 0,0001 % (w/v) Pyridoxine, 0,0001 % (w/v) ZnSO₄, 0,00005 % (w/v) Biotin, 0,00005 % (w/v) CaCl₂, 0,2 % (v/v) Tween80 und 100 ml ADC

ADC: 5 % (w/v) BSA, 2 % (w/v) Glukose, 0,85 % (w/v) NaCl

OADC: ADC + 0,05 % Ölsäure

Middlebrook 7H10: Middlebrook 7H9 wird mit 15 g Agar/1000 ml versetzt

LB Medium: 1,5 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl, pH 7,2

Festmedien: Zur Herstellung von Festmedium wurde dem entsprechenden Flüssigmedium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

α -Komplementations-Agar: (Sambrook *et al.* 1989) : 1 ml 100 mM IPTG in 70 % (v/v) Ethanol; 5 ml 2 % (w/v) X-Gal in DMF auf 300 ml LB-Agar

Tabelle 2.4: Endkonzentrationen der verwendeten Antibiotika (wenn nicht anders angegeben)

Antibiotikum	Konzentration für <i>E. coli</i> ($\mu\text{g/ml}$)	Konzentration für <i>M. avium</i> ($\mu\text{g/ml}$)
Ampicillin	100	–
Chloramphenicol	50	30
Colistin	30	-
Gentamycin	5	20
Kanamycin	50	50
Spectinomycin	50	50
Streptomycin	50	50

Makrophagen-Medium: RPMI 1640 mit 2 mM Glutamin und 5 % autologem-Serum

SSC (1x): 0,15 M NaCl, 15 mM Na -Citrat, pH 7,0

DNA-Lysis-Puffer: 1 mM Na₂EDTA, 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 25 % (w/v) Saccharose, 1 % N-Laurylsarkosin

Protein-Lysis-Puffer (Mycobakterien): 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM NaCl, 5 mM Na₂EDTA, 10% (v/v) Glycerol, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol

Protein-Lysis-Puffer: 50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0), 300 mM NaCl, 10mM Imidazol

Protein-Wasch-Puffer: 50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0), 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol

Protein-Elutions-Puffer: 50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0), 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol

Protein-Proben-Puffer: 5% (w/v) β -Mercaptoethanol, 6% (w/v) SDS, 0,6% (w/v) Bromphenolblau, 20% (v/v) Glycerol

2.1.9 Geräte

Elektrophoreseapparaturen	Bio-Rad Mini-Protean Gelkammer IITM Pharmacia Gelkammern für Agarosegel-Elektrophorese
Elektroporationsgerät	Bio-Rad Gene Pulser
Feinwaage	Sartorius 2004 MP
Fluoreszenzphotometer	Wallac Victor ² TM Multilabel Counter 1420
Hybridisierungsöfen	Biometra OV10
Inkubationsschüttler	New Brunswick Scientific Innova 4230 New Brunswick Scientific G10 Gyrotory Shaker
PCR-Automaten	Perkin-Elmer-Cetus GeneAmp PCR-System 9600 MJ Research PTC100
pH-Meter	WTW Multilab S40
Sequenzier-Automat	Applied Biosystems ABI Prism Model 310
Spannungsgeber	BioRad Powersupply 200/2.0 Pharmacia Electrophoresis Constant Power Supply ECPS 3000/150 Pharmacia Electrophoresis Power Supply EPS 500/400
Spektralphotometer	Shimadzu UV 1202
Thermoblock	Techne Dri-Block DB-1
Transferapparatur	BioRad Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell
Ultraschallgerät	Branson Sonifier 250
UV-Quervernetzer	Stratagene UV Stratalinker 2400
Vakuum-Zentrifuge	Uniequip Univapo 100 H
Videodokumentationsanlage	Bio Rad Geldoc 2000
Zellmühle	Retsch Zell-Mühle MM2000
Zentrifugen	Heraeus Sepatech Biofuge 13 Heraeus Sepatech primo Heraeus Biofuge pico Du Pont Instruments Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge (Rotoren: SS34, GS3)

2.1.10 DNA-Sequenzen

Die DNA-Sequenzen der Gene *mig* und *sigE* sind in der Gen Bank/EMBL unter den Nummern U43598 und U87308 veröffentlicht.

2.2 Methoden

Die im folgenden nicht beschriebenen Standardmethoden wie Phenol-Chloroform-Extraktion, DNA-Fällungen, Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen und DNA-Ligationen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) oder nach den Angaben der Enzymhersteller durchgeführt.

2.2.1 DNA-Arbeiten

2.2.1.1 Standard-Präparation von Plasmid-DNA (modifiziert nach Birnboim und Doly 1979)

Mix I: 50 mM Glukose, 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM Na₂EDTA (pH 8,0)

Mix II: 200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS

Mix III: 3 M Kaliumacetat, 1,8 M Formiat

Bakterienzellen aus 1,5 bis 3 ml Kulturen ($O.D._{600} > 1,0$) wurden durch Zentrifugation (10 000 g, 1 min) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde in 100 μ l Mix I resuspendiert und 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 μ l Mix II zugegeben und die Probe durch Invertieren vorsichtig gemischt. Durch Zugabe von 150 μ l Mix III und 10 min Inkubation auf Eis wurden durch alkalische Lyse freigesetzte Proteine und genomische DNA gefällt. Zelltrümmer und das Präzipitat wurden durch Zentrifugation (10 000 g, 10 min) sedimentiert. Der Überstand wurde nach Zugabe von 10 μ l Ribonuklease A (2 mg/ml) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung wurde die Plasmid-DNA in A. dest. aufgenommen und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert. DNA wurde auch mittels „QIAprep Spin Miniprep“ Säulen nach Vorschrift des Herstellers (Qiagen) isoliert.

2.2.1.2 Mini- und Midi-Säulenpräparation von Plasmid-DNA

Zur Sequenzierung verwendete Plasmid-DNA wurde mit dem „QIAfilter Plasmid Mini Kit“ säulenchromatographisch isoliert. Die Präparation größerer Mengen an Plasmid-DNA oder nur in geringer Kopienzahl in der Zelle vorliegender Plasmide wurde mit dem „QIAfilter Plasmid Midi Kit“ durchgeführt. Die Vorgehensweise orientierte sich jeweils am mitgelieferten Protokoll des Herstellers.

2.2.1.3 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Molekülen definierter Größe aus einem Agarosegel erfolgte säulenchromatographisch unter Verwendung des „Nucleo Spin Extract 2 in 1-Kits“ (Macherey-Nagel) nach dem Protokoll des Herstellers.

2.2.1.4 Isolierung genomischer DNA aus *M. avium*-Stämmen

M. avium-Zellen wurden zwei Wochen in 10 ml 7H9 Medium mit ADC bei 37 °C geschüttelt, angezogen und anschließend die Zellen abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml DNA-Lysis-Puffer aufgenommen und mit Glaskugeln in einer Zelmühle 2 min auf höchster Stufe aufgeschlossen. Anschließend wurde der Ansatz 20 min mit Lysozym (37 °C) und 30 min mit ProteinaseK (50 °C) behandelt. Die genomische DNA wurde von den Zelltrümmern durch Zentrifugation (12 000 g, 5 min) abgetrennt, mit Isopropanol gefällt und in A. dest aufgenommen und bei -20 °C eingefroren.

2.2.2 Agarosegel-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels 1 %iger Agarosegele in Tris-Acetat-Puffer nach Sambrook *et al.* 1989. Als Größenstandard dienten die „1kb ladder“ (MBI) oder der 100 bp Marker (Gibco BRL).

2.2.3 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA (modifiziert nach Hanahan 1983)

TMF-Puffer: 100 mM CaCl₂, 50 mM RbCl, 40 mM MnCl₂

2.2.3.1 Herstellung transformationskompetenter *E. coli* Stämme

E. coli-Kulturen wurden bei 37 °C in LB-Medium geschüttelt und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,5$ bis $0,7$) bebrütet. Nach Aliquotierung wurden die Bakterienzellen aus je 2 ml Kultur sedimentiert (3 000 g, 2 min) in 1 ml eiskaltem TMF-Puffer resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (3 000 g, 2 min) wurde das Sediment vorsichtig in 200 µl eiskaltem TMF-Puffer aufgenommen. Durch Zugabe von Glycerol zu einer Endkonzentration von 20 % (v/v) konnten die Zellen bis zur späteren Verwendung bei -80 °C gelagert werden.

2.2.3.2 Transformation mit Plasmid-DNA

Plasmid-DNA beziehungsweise $\frac{1}{4}$ (circa 5 µl) eines Ligationsansatzes wurden zu einem Ansatz transformationskompetenter *E. coli*-Zellen gegeben und 1 h auf Eis inkubiert. Während des sich anschließenden Hitzeschocks (90 s, 42 °C) erfolgte die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zelle. Der Ansatz wurde erneut 5 min auf Eis inkubiert, anschließend mit 700 µl LB-Medium versetzt und für 30 min bei 37 °C geschüttelt. Bei Selektion auf Gentamycin-Resistenz erfolgte eine Ausdehnung dieser phänischen Expressionsphase auf 1h. 1/10 der Zellen wurden auf entsprechenden Selektivagar ausplattiert und 24 h bei 37 °C bebrütet.

2.2.4 Übertragung von Plasmiden durch Konjugation

Der Transfer nicht-konjugativer, mobilisierbarer Plasmide von *E. coli* zu *E. coli* oder *M. avium* erfolgte wahlweise nach der Methode der di- oder triparentalen Konjugation.

Für die diparentale Konjugation wurde der *E. coli*-Stamm S17-1, der die *tra*-Gene des Plasmids RP4 stabil in das Genom integriert besitzt, verwendet (Simon *et al.* 1986). Hierdurch ist er in der Lage, über eine Plasmabrücke Kontakt zu anderen Zellen aufzunehmen und Plasmid-DNA zu übertragen. Wenn die zu transferierende DNA nicht im Stamm S17-1 vorlag, wurde als dritter Kreuzungspartner (*E. coli* DH5 α) eingesetzt, der das Plasmid pRK2013 (*tra*⁺; Figurski und Helinski 1979) aufwies (triparentale Konjugation). Nach Erhalt dieses Plasmids durch Konjugation war der Rezipient in der Lage, seinerseits als Donor zu agieren.

Die einzusetzenden *E. coli*- und *M. avium*-Zellen wurden in 10 ml LB-Medium oder 7H9 Medium bis zur früh-stationären Phase bei 37 °C angezogen, das bedeutet für langsam wachsende Mycobakterien einen Zeitraum von 10 Tagen. Es wurden für die diparentale Konjugation jeweils 100 µl *E. coli* S17-1 und *M. avium*-Zellen eingesetzt; beziehungsweise wurden für die triparentale Konjugation je 100 µl von *E. coli* DH5 α -Zellen mit dem Plasmid pRK2013 oder den Suizid-Plasmiden mit 100 µl *M. avium* Zellen eingesetzt. Die Kulturen wurden getrennt voneinander zentrifugiert (5 000 g, 2 min) und die Sedimente zur Entfernung von Antibiotikamolekülen mit LB-Medium gewaschen. Im Anschluß wurden die Zellen in 100 µl LB-Medium resuspendiert, vereinigt, durchmischt und auf einen sterilen Membranfilter (Schleicher & Schuell, Porengröße 0,45 µm) getropft und dieser auf trockene LB-Agarplatte plaziert. Bei einer anderen Technik wurden Donor- und Rezipienten-Zellen in 10 mM MgSO₄ gewaschen, vereinigt und nach Zentrifugation (3 000 g, 2 min) und 20-facher Konzentrierung auf eine LB-Platte aufgetropft. Auf diese Weise war eine hohe Zelldichte gewährleistet. Nach 24 h Inkubation bei 30 °C wurde der Konjugationsansatz mit A. dest vom Membranfilter oder der LB-Platte gewaschen und in den Verdünnungen 10⁰ bis 10⁻⁴ auf Selektivagar ausplattiert. Zur Kontraselektion der *E. coli*-Zellen wurde Colistin eingesetzt.

Für die Konjugation von *E. coli* zu *E. coli* zur Herstellung von rekombinanten Cosmiden wurde das Protokoll von Balasubramanian *et al.* (1996) angewandt.

2.2.5 Elektroporation von Mycobakterien-Zellen

Die *M. smegmatis*-Zellen wurden für die Elektroporation wie bei Jacobs *et al.* 1991 beschrieben präpariert. Für die Elektroporation wurden 150 µl Zellen zusammen mit 1 µg DNA auf Eis für 5 min inkubiert. Die Elektroporation wurde in Küvetten mit einem 0,2 cm Spalt bei 2,5 kV, 25 µF und 200-1000 Ω (Variationen des Parallelwiderstandes) mit dem Bio-Rad Gene Pulser durchgeführt. Nach der Elektroporation wurden die elektroporierten Zellen in 900µl 7H9 Medium aufgenommen und 4 h bei 37 °C phänisch expremiert. Anschließend wurden die Zellen auf 7H10 Platten gegeben und vier bis fünf Tage bei 37 °C bebrütet. Elektrokompetente *M. avium*-Zellen wurden für die Elektroporation wie bei Jacobs *et al.* (1991) beschrieben präpariert. Hier wurden jedoch alle Präparationen nicht auf Eis, sondern bei Raumtemperatur durchgeführt, um die Elektroporations-Effizienz zu erhöhen (Wards und Collins 1996). Die Zellen wurden zusätzlich vor der Elektroporation viermal mit 10 %igen Glycerol gewaschen und anschließend in in 1/10 des Ausgangsvolumen in 10 % Glycerol resuspendiert.

2.2.6 PCR-Reaktion (modifiziert nach Saiki *et al.* 1988)

Die Reaktionen wurden mit den in Tabelle 2.5 und 2.6 angegebenen Parametern mit dem PCR-Automaten durchgeführt. Die Anzahl der durchgeführten PCR-Zyklen betrug 30-33 bei gereinigter DNA und 38 Zyklen bei PCR-Reaktionen, die direkt aus einer Bakterien-Kolonien gemacht wurden. Dem ersten PCR-Zyklus ging eine 5 min Denaturierung bei 95 °C voran, nach der die Zugabe der *Taq*-DNA-Polymerase erfolgte; dem letzten Zyklus schloß sich eine Verlängerung von 8 min bei 72 °C an.

Tabelle 2.5: Konzentrationen der Reaktionskomponenten bei Standard-PCR-Reaktionen. Nicht absolute Angaben beziehen sich auf ein Reaktionsvolumen von 25 µl

Reaktionskomponente	Konzentration
Oligonukleotid 1	10 pmol
Oligonukleotid 2	10 pmol
Polymerase-Puffer	1 × <i>Taq</i> -Puffer
dNTP-Mix	0,2 mM pro dNTP
MgCl ₂	1,5 mM
DNA-Polymerase	1,25 U <i>Taq</i> -Polymerase
Matrizen-DNA	20 ng chromosomale DNA oder 5 bis 10 ng Plasmid-DNA

Tabelle 2.6: PCR-Programm zur Durchführung von Standard-PCR-Reaktionen

	Temperatur (°C)	Zeit (Sek)
Denaturierung	95	60
Hybridisierung	50 bis 62	40
Verlängerung	72	1

Bei Benutzung der *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega) wurde die Zeit für die Verlängerung verdoppelt und der von Promega mitgelieferte Puffer verwendet. Die Hybridisierungstemperaturen lagen circa 5°C unterhalb der errechneten Schmelztemperatur (T_m), die über die folgende Formel berechnet wurde: $T_m = [T/A \times 2^\circ\text{C}] + [G/C \times 4^\circ\text{C}]$. Bei PCR Reaktionen mit vielen unspezifischen Produkten wurde 5 % DMSO hinzugegeben oder eine „Touchdown“-PCR-Reaktion (TD-PCR) modifiziert nach Don *et al.* 1991 durchgeführt. Für die TD wurde die Hybridisierungstemperatur in den ersten 22 Zyklen ausgehend von 72 °C in jedem Zyklus um 1 °C abgesenkt. Es schlossen sich weitere 10 Zyklen bei einer Hybridisierungstemperatur von 50 °C an. Das gewählte Programm war dem der Standard-PCR analog und wurde lediglich bezüglich der Hybridisierungstemperaturen modifiziert. Durch unspezifische Hybridisierung von Startermolekülen gebildete PCR-Produkte sollten hierbei in den ersten Zyklen vermieden werden. Bei den niedrigeren Hybridisierungstemperaturen in den darauffolgenden Zyklen sollten die unspezifischen Produkte aufgrund der exponentiellen Natur der PCR keine nennenswerten Kontaminationen mehr bilden.

2.2.7 Klonierung von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte wurden über ein präparatives Agarosegel mit anschließender Gelelektion oder säulenchromatographisch unter Verwendung des „Nucleo Spin Extract 2 in 1“-„Kits“ nach Angaben des Herstellers gereinigt.

Aufgrund der Matrizen-unabhängigen, terminalen Transferase-Aktivität der *Taq*-DNA-Polymerase besitzen die PCR-Produkte am 3'-Ende ein einzelnes Nukleotid (Clark 1988; Mole *et al.* 1989). Bei diesem Nukleotid handelt es sich aufgrund der starken Präferenz der Polymerase für dATP in den meisten Fällen um Adenosin (Clark 1988). Hierdurch konnten auch ungereinigte PCR Produkte mit dem „Topo TA Cloning Kit“ (Invitrogen, Groningen) in den pCR2-1 Vektor kloniert werden. Für die Klonierung wurden aber auch Oligonukleotide benutzt, die ein verlängertes 5'-Ende besitzen, wodurch zusätzliche Schnittstellen eingefügt wurden. Dies ermöglichte eine direktionale Klonierung (zum Beispiel MIGHISFW und MIGHISRW).

2.2.8 Southern-Untersuchung

2.2.8.1 Transfer von geelektrophoretisch aufgetrennter DNA auf Nylonmembranen (modifiziert nach Southern 1975)

Zum spezifischen Nachweis von DNA-Sequenzen wurde restringierte und auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennte DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Schleicher & Schuell) übertragen. Der Transport der Nukleinsäuren fand innerhalb von 12 h durch gerichtete Diffusion statt.

Die DNA im Agarosegel wurde zunächst 30 min mit 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl denaturiert. Anschließend wurde das Gel in einer 1,5 M Tris/HCl (pH 7,5), 1,5 M NaCl-Lösung

neutralisiert. Eine 4 x SSC-Lösung wurde als Transferlösung verwendet. Danach wurde die Blotting-Apparatur aufgebaut. Hier von oben nach unten dargestellt: unter einem Stapel aus Handtuchpapier wurden drei Lagen mit Transferlösung getränkte Whatman-Papiere gelegt. Darunter wurden nacheinander luftblasenfrei die Nylonmembran und das Gel gestapelt. Das Gel lag getrennt durch zwei Lagen mit Transferlösung angefeuchtetem Whatman-Papieren auf einer Glasscheibe. Die Diffusion der DNA wird durch das Auflegen eines Gewichtes auf das Handtuchpapier verstärkt. Nach dem Transfer wurde die Nylonmembran in 2 x SSC gewaschen. Im „Stratalinker“ (Stratagene) konnte die DNA unter Verwendung eines fest installierten Geräteprotokolls durch UV-Licht kovalent an die Membran gebunden und somit immobilisiert werden.

2.2.8.2 Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden

Die DNA-Sonden gegen das *mig*-Gen und *aph*-Gen wurde unter vorschriftsmäßiger Anwendung des „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ (Boehringer) hergestellt. Dessen Prinzip beruht auf dem statistischen Einbau von alkalilabilem Digoxigenin-11-dUTP (DIG-dUTP) als Desoxythymidin-Analogon während einer PCR-Reaktion. Das Verhältnis von DIG-dUTP zu Desoxythymidin im Reaktionsansatz betrug 1:2. Zur Amplifizierung der DNA-Sonden wurde das Standard-PCR-Programm und die Oligonukleotid-Paare MIG1005-MIG1549 beziehungsweise KANFW-KANRW mit einer Hybridisierungstemperatur von 60 °C beziehungsweise 55 °C gewählt.

Die *sigE* DNA-Sonde wurde nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983) mit Hilfe unspezifischer Hexa-Nukleotid-Primer und dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I mit DIG-dUTP markiert. Hierzu wurde das „DIG High Prime Labeling Kit“ (Boehringer) nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.8.3 Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden und immunologischer Nachweis der hybridisierten DNA

Na-Phosphatpuffer (pH 7,0): 200 mM Na₂HPO₄, 200 mM NaH₂PO₄

Prähybridisierungspuffer: 50 % (v/v) Formamid, 5 x SSC, 2 % (w/v) Blocking-Reagenz, 0,1 % (v/v) N-Laurylsarkosin, 0,02 % SDS

Hybridisierungspuffer: Prähybridisierungspuffer + DNA-Sonde

Waschpuffer I: 2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS

Waschpuffer II: 0,5 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS

Detektionspuffer 1 (pH 7,5): 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, 0,3 % (v/v) Tween 20

Detektionspuffer 2: 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, 1 % (w/v) Blockierung-Reagenz

Detektionspuffer 3: 100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂

CSPD-Substratlösung: 1 % (v/v) CSPD in Puffer 3

Die Membran wurde für 10 min in 2 x SSC äquilibriert, bevor sie einer 2 h Prähybridisierung in 20 ml Prähybridisierungspuffer unterzogen wurde, um unspezifische Bindungen der DNA-Sonde an die Nylonmembran zu verhindern. Die DIG-markierte Sonde wurde vor ihrer

Verwendung aufgekocht und in einer Konzentration von 10 ng markierter DNA / ml im Hybridisierungspuffer während der 12 h Hybridisierung eingesetzt. Im Anschluß an die Hybridisierung wurden überschüssige Sondenmoleküle durch jeweils zwei Waschschrte mit Waschpuffer 1 (2 × 5 min) und Waschpuffer 2 (2 × 15 min) stringent entfernt. Prähybridisierung, Hybridisierung und die Waschschrte erfolgten im Hybridisierungssofen bei einer Temperatur von 42 °C. Die anschließende immunologische Detektion wurde bei Raumtemperatur nach dem Protokoll des „DIG Luminescent Detection Kit“ der Firma Boehringer durchgeführt. Der Nachweis beruht auf der Bindung eines Anti-DIG-AP-Konjugats an die markierte Sonden-DNA. Das Enzym Alkalische Phosphatase katalysiert die Licht-emittierende Spaltung des luminogenen Substrats CSPD (Roche Diagnostics). Die Dokumentation erfolgte durch 3 bis 30 min andauernde Exposition eines Röntgenfilms (Fuji X-Ray Film).

2.2.9 Dot-Blot-DNA-Hybridisierung

Eine mit Digoxygenin markierte DNA-Sonde gegen das Kanamycin-Resistenzgen wurde in 5 x SSC mit 50 % Formamid bei 45°C 16 h mit denaturierter DNA von *M. avium* Klonen hybridisiert, die auf eine Nylonmembran gebracht wurden (nach Plum und Clark-Curtiss (1994)). Für Detektion siehe 2.2.8.3.

2.2.10 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungsarbeiten wurden entweder von der Firma MWG-Biotech AG oder mit dem Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer) durchgeführt. Die Zyklische-Sequenzierung wurde nach Angaben des Herstellers mit diversen Oligonukleotiden (siehe auch Ergebnisse) im PCR-Automaten durchgeführt. Die DNA-Sequenzierungen wurden durch Ethanol-fällung gereinigt und mit dem ABI-Prism Model 310 ausgewertet.

2.2.11 Konstruktion einer *M. avium*-DNA-Bibliothek

Für die Konstruktion einer genomischen DNA-Bibliothek wurde aus *M. avium* A5 isolierte genomische-DNA mit der Restriktionsendonuklease *Sau3A* partiell verdaut. Die circa 3- 4 kb großen DNA-Fragmente wurden auf einem 0,9 %igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch isoliert. Die gereinigten DNA-Fragmente wurden danach in einen mit *Bam*HI und Alkalischer-Phosphatase behandelten pUC18 Vektor ligiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz nach Transformation von *E. coli* NM554/pCM3 beziehungsweise pCM4 auf α -Komplementationsplatten mit Ampicilin und Gentamycin gebracht.

2.2.12 Infektion von *E. coli* mit einer *M. avium*-Cosmid-DNA-Bibliothek

Eine Phagen-Cosmid-DNA-Bibliothek von *M. avium* wurde von G. Plum zu Verfügung gestellt (Plum und Clark-Curtis 1994). *E. coli*-Zellen, die mit dem Plasmid pCM2-2 transformiert waren, wurden in der logarithmischen Wachstumsphase mit den Phagen infiziert (Infektionsmultiplizität von 1) und anschließend auf LB-Platten, die mit Gentamycin und Kanamycin supplementiert waren, gebracht. Das Cosmid pYA1400, auf dem das Gen *mig* lokalisiert ist, wurde als Phagenlysat von G. Plum erhalten und anschließend wurde der *E. coli*-Stamm LE392 wie oben beschrieben infiziert.

2.2.13 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität, der Luziferase-Aktivität und der Fluoreszenz durch das GFP-Protein

Die *E. coli*-Zellen des „One-Hybrid-Systems“ Zellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase für die β -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung angezogen und mit der Retsch Zell-Mühle aufgeschlossen und die Protein-Konzentration bestimmt. Die Aktivität wurde dann unter Verwendung des FluoReporter® lacZ/Galactosidase Quantitation Kits (F-2905) der Firma Molecular Probes mit dem Fluoreszenzphotometer der Firma Wallac bestimmt und auf die Proteinkonzentration bezogen. Die Luziferase-Aktivität bei *M. smegmatis*/pGPC251 wurde modifiziert nach Heuner *et al.* (1999) mit dem Fluoreszenzphotometer der Firma Wallac bestimmt. Die Reaktionszeit betrug 10 Sekunden und wurde als relative Einheit (RLU) definiert. Die Fluoreszenz der *E. coli*-Zellen, die das GFP-Protein exprimierten, wurde mittel Fluoreszenzphotometer bestimmt und auf die Zelldichte (O.D.₆₀₀) bezogen. Die Frequenzen für die Anregung und für das Abgreifen der grünen Fluoreszenz lagen bei 485 nm bzw. 530 nm. Für die Messungen wurden 96'er Mikrotiterplatten verwendet.

2.2.14 Bedingungen für die Messung der Promotor-Stärke des *mig*-Promotors in *M. smegmatis*

Für die Messung der Promotor-Stärke wurden *M. smegmatis*-Zellen, die mit dem Plasmid pGPC251 transformiert waren, benutzt. Der Stamm *M. smegmatis*/pGPC251 wurde in LB-Medium mit Kanamycin 24 h bis zur stationären Wachstums-Phase angezogen und anschließend in einer 1:5 Verdünnung in frisches LB-Medium mit Kanamycin gegeben. In einzelnen Ansätze die Promotor-Induktion durch die folgenden Konzentrationen getestet: 10 mM H₂O₂, 10 μ g/ml Dekansäure, 10 μ g/ml Laurylsäure und 10 μ g/ml Ölsäure. Für die Messung der pH-Induktion des *mig*-Promotors wurde die Lösung mit Na-Citrat auf pH Wert von 5,5 eingestellt. Die Induktion des *mig*-Promotors wurde, wie bei Mulder *et al.* 1999, erst nach 4 h über die Luziferase-Aktivität bestimmt, um mögliche unterschiedliche Verzögerungs-Phasen nach der Induktion in den einzelnen Ansätzen zu umgehen. Als negative Kontrolle wurde die Luziferase-Aktivität, die mit *M. smegmatis*/pGPC255 und den einzelnen Induktoren bestimmt wurde, gemessen. Diese Aktivität wurde von der Luziferase-Aktivität, die für *M. smegmatis*/pGPC251 mit den einzelnen Induktoren gemessen wurde, abgezogen.

2.2.15 Enzymaktivitätsbestimmung von Mig als Acyl-CoA Synthetase

Die Aktivität von Mig als Acyl-CoA Synthetase wurde in einem gekoppelten Enzymtest verfolgt (Ziegler *et al.* 1989). Gemessen wurde die AMP-Bildung, die über die Myokinase, Pyruvatkinase und Laktat-Dehydrogenase mit der Oxidation von NADH gekoppelt ist. Der zeitliche Verlauf der Oxidation konnte bei 365 nm photometrisch verfolgt werden. Der Test wurde bei RT in einem Volumen von 1 ml durchgeführt und enthielt folgende Komponenten in 100 mM Tris/HCl (pH 7,8): 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 0,4 mM CoA, 0,4 mM NADH, 1 mM PEP, 2 mM DTE, 1 U/ml Myokinase, 2,8 U/ml Lactat-Dehydrogenase, 1,5 U/ml Pyruvatkinase, 1-20 μ g/ml Mig. Der molare Extinktionskoeffizient für NADH beträgt $3,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Hieraus wurde die Aktivität von Mig bestimmt und auf die Proteinkonzentration bezogen.

2.2.16 Bestimmung der Acyl-CoA-Synthetase Aktivität von Mig mittels HPLC

Die Palmityl-CoA-Synthese durch Mig wurde nach Grogan und Huth (1986) mit der HPLC bestimmt. Als Standard wurde Palmityl-CoA (Sigma) in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Die HPLC-Untersuchung wurde zusammen mit Dr. Ulrich Jux am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Universität zu Köln durchgeführt.

2.2.17 Zellaufschluß von Mycobakterien durch Ultrabeschallung oder durch eine Zell-Mühle

Zellen aus 10 ml (stationäre-Phase) und 100 ml (logarithmische-Phase) *M. avium*-Kulturen wurden sedimentiert und in 10 ml Protein-Lysis-Puffer gewaschen. Nach Resuspension in 1 ml Protein-Lysis-Puffer erfolgte der Aufschluß der Zellen durch Ultrabeschallung (Branson-Sonifier 250, 4 min, Leistungsstufe 2, 60 % Beschallung) oder durch Glaskugeln in der Retsch Zell-Mühle (5 min, höchste Stufe). Die unlösliche Fraktion wurde durch Zentrifugation (10 000 g, 20 min) von der löslichen Fraktion getrennt.

2.2.18 Infektionsmodell mit aus humanen Monozyten gewonnenen Makrophagen (HMDM)

Monozyten wurden aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern über eine Ficoll-Paque-Gradienten-Zentrifugation (Pharmacia, Upsala, Sweden) isoliert (Crowle *et al.* 1986). Die in der Interphase gesammelten mononuclearen Zellen wurden wiederholt in 37 °C warmen RPMI 1640, das mit 10 % (v/v) autologem Serum (AS) supplementiert war, gewaschen und anschließend resuspendiert (Life Technologies). Es wurden 10^6 -Zellen in eine Kammer von Glasboden-Platten gegeben (Nunc, Wiesbaden, Germany) und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nicht-adhärente Zellen wurden mit 37 °C warmen RPMI 1640 abgewaschen und die zurückbleibenden Monozyten (circa 5×10^4 Zellen/Kammer) wurden in Makrophagen-Medium bis zur Infektion kultiviert.

Nach fünf bis sieben Tagen wurde der Überstand der HMDM-Kultur entfernt. Die Makrophagen wurden mit einer Suspension von Mycobakterien, die in RPMI 1640 gelöst waren, mit einer Infektionsmultiplizität (Bakterien:Makrophagen) von 10:1 (MOI: 10:1) infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37 °C in 5 % CO₂ wurden Mycobakterien, die nicht die Makrophagen infiziert hatten, abgewaschen. Die infizierten Makrophagen wurden in frischem Makrophagen-Medium weiter bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. An den Tagen 1, 2 und 5 wurde der Überstand von vier Kammern pro Versuchsansatz entfernt und die Makrophagen lysiert. Die Anzahl lebender Bakterien, die aus den Makrophagen isoliert wurden, konnten nach Verdünnungen über die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (*colony forming units*: CFU) bestimmt werden (Crowle *et al.* 1986).

2.2.19 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Analyse von Proteinen wurden SDS-Polyacrylamidgele verwendet (Laemmli 1970). Die Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentration betrug 10 - 15 % im Trenngel und 5 % im Sammelgel. Die Elektrophorese erfolgte anfänglich bei 15 mA im Sammelgel und die Stromstärke wurde, nachdem die Lauffront das Trenngel erreicht hatte, auf 35 mA erhöht.

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das SDS-Polyacrylamidgel nach Behandlung mit 0,01 % (w/v) NaDoc durch 70 %ige (v/v) Trichloressigsäure gefällt. Die getrockneten Proben wurden in Protein-Proben-Puffer aufgenommen.

2.2.20 Proteinfärbung von Polyacrylamidgelen

Coomassie-Färbelösung: 50 % (v/v) Methanol, 5 % (v/v) Essigsäure, Spatelspitze Coomassie

Entfärberlösung: 50 % (v/v) Methanol, 5 % (v/v) Essigsäure

Die Polyacrylamidgele wurden entweder mit Coomassie oder Silber gefärbt. Für die Coomassie-Färbung wurde das Polyacrylamidgel in Coomassie-Färbelösung 20 min gefärbt und mit Entfärberlösung anschließend entfärbt. Für eine anschließende Silberfärbung wurde das Gel mit 50 %igen (v/v) Methanol (20 min) und A.dest (10 min) gewaschen und 1 min mit 0,02 % (w/v) Na₂SO₃ behandelt. Anschließend wurde das Gel mit 0,1 % (w/v) AgNO₃ 20 min behandelt und nach dem Waschen mit A.dest wurde durch 2 % (w/v) Na₂CO₃ + 0,04 % (v/v) Formaldehyd (37 %) die Silberfärbung sichtbar gemacht. Diese Reaktion wurde mit 5 %iger (v/v) Essigsäure gestoppt.

2.2.21 Protein-Konzentrations-Bestimmung

Die Protein-Konzentration wurde nach der Bradford Methode (BioRad Protein Test) bestimmt. Als Proteinstandard wurde BSA eingesetzt und eine Eichgerade bestimmt.

2.2.22 Immunodetektion (Western-Blot)

Die Immunodetektion von Mig bzw. der Mig-His₆-Fusionsproteine aus Zellaufschlüssen aus *M. avium* Kulturen oder aus *E. coli* Überexpressions-Kulturen erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden durch Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran (Millipore) immobilisiert und das Mig Protein oder der Mig-His₆-Fusionsproteinen daraufhin mit einem indirekten Enzym-Immunoverfahren nachgewiesen.

2.2.22.1 Proteintransfer auf PVDF-Membran (Wilson und Yunan 1989)

Transferpuffer (Dunn-Carbonat-Puffer): 10 mM NaHCO₃, 3 mM Na₂CO₃, 20 % (v/v) Methanol

Der Proteintransfer aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran erfolgte in einer Apparatur der Firma Bio-Rad (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell). Die Übertragung fand bei einer Stromstärke von 150 mA (15 min) gefolgt von 300 mA (20 min) im angegebenen Transferpuffer statt.

2.2.22.2 Nachweis von Mig und Mig-His₆-Fusionsproteinen durch Immunodetektion

TBST: 50 mM Tris/HCl (pH 6,8), 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2 % (v/v) Tween 20

Blockierungslösung: 10 % (w/v) Milchpulver in TBST

Alle folgenden Inkubations- und Waschschrte wurden bei 30 °C unter mäßigem Schütteln vorgenommen. Die PVDF-Membran wurde nach dem Elektrotransfer ü.N. in Blockierungslösung inkubiert, um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu unterdrücken und die Membran zu äquilibrieren. Es folgte eine Inkubation für 1 h mit einem 1:60 000 in TBST verdünnten Antikörper gegen Mig oder ^{MRGS}His. Nach einem zweifachen Waschschrte mit

TBST für 30 min wurde der Erstantikörper durch eine 1 h Inkubation mit einem 1:5 000 in TBST verdünnten Ziege-Anti-Kaninchen-HRP-Konjugat markiert. Die Membran wurde daraufhin erneut mit TBST gewaschen (2×30 min, 2×5 min). Der Nachweis des gebundenen Zweitantikörpers erfolgte unter Verwendung des ECL-Systems der Firma Amersham nach Herstellerangaben. Die Dokumentation erfolgte durch 3 bis 10 min andauernde Exposition eines Röntgenfilms (Hyperfilm ECL, Amersham).

2.2.23 Computerprogramme und Datenbanken

DNA- beziehungsweise Aminosäuresequenzen wurden mit dem DNASTARTM-Programm-paket der Firma Lasergene und den in Tabelle 2.7 aufgeführten Internet-Anwendungen analysiert. Klonierungsstrategien wurden mit Hilfe der Programme „Clone Manager for Windows 4.1“ (Scientific & Educational Software) und das Programm GCG (Genetic Computer Group) durchgeführt (Devereux *et al.* 1984).

DNA- und Proteinsequenzen wurden den folgenden im Internet zugänglichen Datenbanken entnommen: „Swiss-Prot Protein Sequence Database“ (<http://www.expasy.ch/sprot>), „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und für die mycobakteriellen Genome (<http://www.tigr.org>). Homologievergleiche wurden mit den Datenbank-Suchalgorithmen BLASTP 1.4.11, TBLASTN 1.4.11 und BLAST 2 SEQUENCES (Altschul *et al.* 1990 und 1997; Gish und States 1993) sowie dem „BCM Search Launcher: Multiple Sequence Alignment“ (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331>; Smith *et al.* 1996) durchgeführt.

Tabelle 2.7: Auflistung der Internet-Anwendungen, die zur Analyse von Aminosäuresequenzen herangezogen wurden

Vorhersage von	Bezeichnung	Internet-Adresse / Referenz
Lokalisation von Proteinen	PSORT	http://psort.nibb.ac.jp ; Nakai und Kanehisa 1992
N-terminalen Signalsequenzen	SignalP V2.0	http://www.genome.cbs.dtu.dk ; Nielsen <i>et al.</i> 1997 und 1999 Nielsen und Krogh 1998
Transmembranen Proteindomänen	TMpred	http://dot.imgen.bcm.tmc.edu
	TopPred2	http://www.biokemi.su.se/~server/toppred2 ; von Heijne 1992
Promotor-Suchprogramm	NNPP	http://www.fruitfly.org/seq_tools Harley und Reynolds 1987
Vorhersage von Helix-Turn-Helix Motiven	NPS @ HTH	http://pbil.icp.fr/cgi-bin

2.2.24 Heterologe Überexpression von Mig in *E. coli* und Aufreinigung über Ni-NTA-Superflow

Zur Überexpression von Mig in *E. coli* mit den Plasmiden pGPC150, pHis5 oder pHis9 wurden 1 l-Hauptkulturen in LB-Medium von einer Ü.K. ausgehend auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bebrütet. Anschließend erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM. Nach der Induktion wurden die Zellen weitere 4 h bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (25 min, 10 000 g) sedimentiert. Das Sediment wurde in 10 ml Protein-Lysis-Puffer aufgenommen und mit der Zell-Mühle aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (10 000 g, 30 min) wurde die unlösliche Fraktion von dem Lysat getrennt. Anschließend wurde das Lysat mit Ni-NTA-Superflow (Qiagen) 4 h bei 4 °C inkubiert und über eine Metallchelate-Affinitätschromatographie anreichert. Nach dreimaligen Waschen mit 1 ml Protein-Wasch-Puffer wurde Mig mit 400 µl Protein-Elutions-Puffer von der Säule in vier Fraktionen gewaschen. Die Eluate wurden mit einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.

2.2.25 Anzucht von Mycobakterien

Die langsam-wachsende Art *M. avium* wurde in Erlenmeyerkolben mit 7H9-Medium mit ADC oder OADC auf einem Schüttler mit 100 Upm bei 30 °C oder 37 °C angezogen.

Zur physiologischen Charakterisierung von *M. avium* #5-8 und K007 wurden die Zellen in 7H9-Medium bei 37°C bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,2 bis 0,3 angezogen und anschließend auf eine O.D.₆₀₀ von 0,1 in 7H9-Medium verdünnt und bei 37 °C und 100 Upm 2 - 2,5 h inkubiert. Für die unterschiedlichen Streßfaktoren wurde das 7H9-Medium entweder mit 5 mM H₂O₂ oder 0,01% (w/v) SDS supplementiert oder mit Na-Citrat auf pH 5 eingestellt. Der Streßfaktor Hitze wurde in 7H9-Medium bei 50 °C 2,5 h getestet. Es wurden alle 30 min Proben entnommen und die CFU bestimmt.

Für die pH-Induktion von Mig wurde das Protokoll von Plum *et al.* (1997) verwendet. Es wurden *M. avium* Kulturen, die sich in der stationären Phase befanden, 1/10 in frischen 7H9-Medium, das auf pH 5,5 eingestellt wurde, verdünnt und 24 h bei 37 °C und 100 Upm kultiviert. Außerdem wurde als Kontrolle das gleiche Protokoll mit pH-neutralen 7H9-Medium durchgeführt. Nach 24 h befanden sich die Mycobakterien in der logarithmischen Wachstumsphase.

Für die Bestimmung der Toxizität von Dekansäure auf *M. avium* wurde *M. avium* #5-8 bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,6 angezogen und in Verdünnungen auf 7H10-Platten, die mit unterschiedlichen Konzentrationen Dekansäure (0 µg, 10 µg, 100 µg) supplementiert waren, gebracht. Anschließend wurden die CFU auf den Platten mit den unterschiedlichen Dekansäure-Konzentrationen bestimmt und auf die CFU der Platte mit 0 µg Dekansäure bezogen (= 100 %). Die schnell-wachsende Art *M. smegmatis* wurde entweder in 7H9-Medium oder in LB-Medium bei 37 °C kultiviert. Für die Expression von Mig in *M. smegmatis* wurde das Plasmid pGPC200 verwendet (Plum *et al.* 1997). Der *M. smegmatis*/pGPC200 Stamm wurde bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,6 angezogen und in Verdünnungen auf 7H10-Platten, die mit unterschiedlichen Konzentrationen Dekansäure (0 µg, 10 µg, 100 µg) supplementiert waren, gebracht. Anschließend wurden die CFU auf den Platten mit den unterschiedlichen Dekansäure-Konzentrationen bestimmt und auf die CFU der Platte ohne Dekansäure bezogen (= 100 %).

2.2.26 Konstruktion des induzierbaren Suizidplasmids pGPC129

Der Replikationsursprung des *M. avium*-Plasmids pLR7 wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden pLR7-F1 und pLR7-R1 aus dem Plasmid pMB351 amplifiziert. Das 1 kb

große PCR-Produkt wurde mit *PvuII* und *EcoRV* behandelt und durch eine 1 %ige Agarosegel-Elektrophorese gereinigt. Es wurde weiterhin aus dem Plasmid pVE5 durch *ApaI*-Restriktion der Replikationsursprung pAL5000 deletiert, es entstand so das Plasmid pGPC38. Dieses Plasmid wurde mit *SmaI* behandelt und in das so linearisierte Plasmid wurde der Replikationsursprung des mycobakteriellen Plasmids pLR7 ligiert. Der so erhaltene Vektor wurde pGPC129 genannt und durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden pLR7-F1 und pLR7-F2 überprüft.

2.2.27 Plasmid-Konstruktionen

Alle übrigen Plasmid-Konstruktionen werden in Tabelle 2.2 und im Ergebnisteil dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Evaluation unterschiedlicher Strategien zur Konstruktion einer *M. avium* *mig*-Mutante mittels homologer Rekombination

Um die Bedeutung des *mig*-Gens für die Virulenz von *M. avium* genauer zu untersuchen, ist es notwendig, dieses Gen zu inaktivieren. Die Konstruktion von sogenannten „knock-out“-Mutanten wurde kürzlich für andere mycobakterielle Arten gezeigt (Norman *et al.* 1995; Balasubramanian *et al.* 1996; Pelicic *et al.* 1997). Allerdings ist bislang noch keine gezielte Mutagenese für *M. avium* beschrieben worden. Besondere Probleme bereiten bei der gentechnischen Veränderung von Mycobakterien die hohe Spontanresistenzrate gegen Antibiotika, die geringe Transformationsrate mittels Elektroporation und vor allem die hohe Rate illegitimer Rekombinationen (Kalpana *et al.* 1991; Aldovini *et al.* 1993; Armitige *et al.* 2000). Deshalb mußten unterschiedliche Techniken für eine gezielte Genmanipulation getestet werden.

Das Gen *mig* sollte über einen allelen Austausch gegen ein durch ein Kanamycin-Resistenzgen (*aph*) unterbrochenes Allel (*mig::aph*) inaktiviert werden. Für die Konstruktion des *mig::aph*-Allels wurde das Plasmid pGPC100, auf dem eine Genkopie von *mig* und ein Chloramphenicol-Resistenzgen lokalisiert ist, mit *NotI* hydrolysiert, und durch Insertion des Kanamycin-Resistenzgens (*aph*) wurde der ORF von *mig* unterbrochen (pGPC119/120). Das Plasmid pGPC119 enthält das Gen *aph* in der Orientierung des *mig*-ORFs, pGPC120 in der entgegengesetzten Orientierung. Nach der Insertion des Kanamycin-Resistenzgens standen als Substrat für die Rekombination circa 0,6 kb beziehungsweise 2,2 kb mycobakterieller chromosomaler DNA für den allelen Austausch zur Verfügung.

3.1.1 Transformation von *M. avium* mit den Suizidplasmiden pGPC119 und -120

Das Plasmid pGPC119 wurde in *M. avium* TMC724 elektroporiert (Abbildung 3.1). Für die Elektroporation wurde ein Parallelwiderstand von 200 Ω verwendet. Der Transformationsansatz wurde auf 7H10-Platten, die mit Kanamycin (15 $\mu\text{g/ml}$) supplementiert waren, ausplattiert. Es konnte angenommen werden, daß nach erfolgreicher Integration von pGPC119/-120 in das Genom die transformierten Zellen resistent gegen Kanamycin waren. Nach dreiwöchiger Bebrütung bei 37°C wurden alle Kolonien auf ihre Resistenz gegen Chloramphenicol hin untersucht und der Besitz des Kanamycin-Resistenzgens (*aph*) mit einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen. Für die PCR

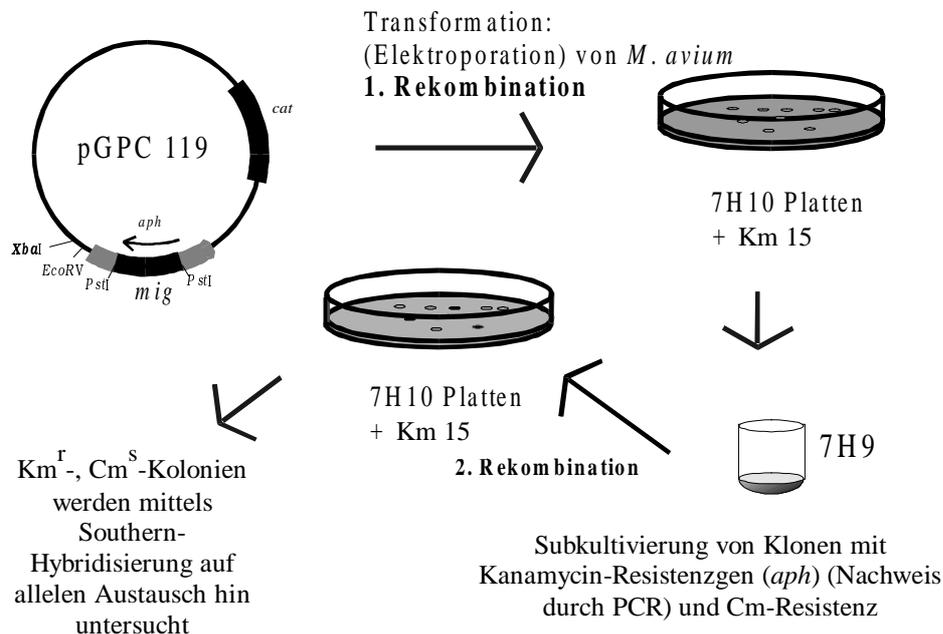


Abbildung 3.1: Strategie für den allelen Austausch von *mig* gegen ein *mig::aph*-Allel unter Benutzung der Suizidplasmide pGPC119/-120. Nach Elektroporation von *M. avium* mit pGPC119/-120 wurden die Kolonien, die auf 7H10-Platten mit 15 µg Kanamycin/ml (kan 15) gewachsen sind, mit einer spezifischen PCR auf das Kanamycin-Resistenzgen *aph* und mittels Wuchstests auf ihre Chloramphenicol-Resistenz hin untersucht (30 µg/ml; Cm 30). Hierdurch sollte die Integration des jeweiligen Plasmides in das Genom gezeigt werden. Kolonien mit integriertem Plasmid wurden subkultiviert und in Verdünnungen erneut auf 7H10 Km 15-Platten gebracht. Alle Kolonien, die sensitiv waren für 30 µg Chloramphenicol/ml (Cm 30), wurden mittels Southern-Hybridisierung auf einen allelen Austausch hin untersucht.

wurden die Primer KANFW und KANRW benutzt, die spezifisch mit dem Gen *aph* hybridisieren (siehe Abbildung 3.2). Es sollte ein circa 600 bp großes DNA-Fragment amplifiziert werden, wenn das Gen *aph* in das mycobakterielle Genom integriert worden war. Von insgesamt 32 Kanamycin-resistenten Kolonien (pGPC119 und -120 zusammen), die nach mehrfachen Elektroporationen erhalten wurden, waren 21 Klone auch Chloramphenicol-resistent. Jedoch konnte nur bei 13 dieser 32 Klone ein 600 bp großes DNA-Fragment amplifiziert werden. Alle 13 Klone waren auch resistent gegen Chloramphenicol. Bei den anderen Klonen, die Chloramphenicol resistent waren, aber bei denen das *aph*-Gen mittels PCR nicht nachgewiesen werden konnte, handelte es sich wahrscheinlich um spontanresistente Kolonien, die neben der Resistenz gegen Kanamycin auch eine Resistenz gegen Chloramphenicol spontan erworben hatten. Für *M. avium* sind hohe Spontanresistenzraten bekannt (Rastogi und Barrow 1994). Wenn man die neun Klone

berücksichtigt, die Kanamycin-resistent waren und keine Chloramphenicol-Resistenz erworben hatten, waren insgesamt 17 der 32 Kanamycin resistenten Kolonien wahrscheinlich spontanresistent. Dies bedeutet, daß 53 % der Kanamycin-resistenten Transformanten spontanresistent waren, davon waren 28 % gegen Kanamycin und Chloramphenicol resistent. Bei den anderen 15 Klonen konnte angenommen werden, daß sie das Plasmid pGPC119 oder -120 in das Genom integriert hatten.

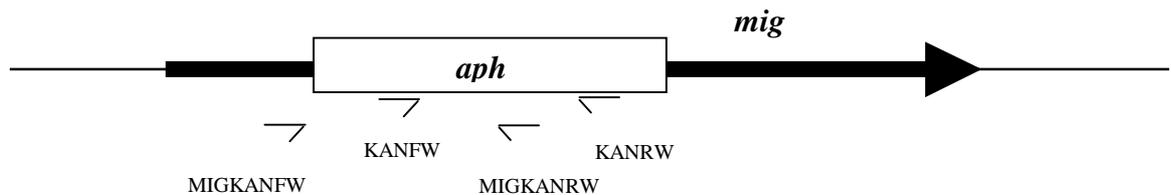


Abbildung 3.2: Positionen der Primer, die für die PCR Untersuchungen in 3.1.1 und 3.1.2 verwendet wurden; dargestellt ist hier das *mig::aph*-Allel; Näheres siehe Text.

Für einen allelen Austausch war eine zweite Rekombination notwendig, wodurch die durch homologe Rekombination des Vektors in das Genom gebildeten Kointegrationsprodukte aufgelöst werden sollten. Hierzu wurde jeweils ein Klon, der das Plasmid pGPC119 beziehungsweise pGPC120 nach den oben genannten Kriterien integriert hatte, in 7H9 Medium (supplementiert mit 15 µg Kanamycin/ml) subkultiviert. Nach einem Tag wurden Verdünnungen auf 7H10-Platten (15 µg Kanamycin/ml) plattiert und 60 (pGPC119) beziehungsweise 100 (pGPC120) Kolonien wurden auf Chloramphenicol-Sensitivität getestet. Nur drei (pGPC119) beziehungsweise fünf (pGPC120) Kolonien waren nicht mehr Chloramphenicol-resistent. Alle acht Kolonien wurden kultiviert und die genomische DNA isoliert. Anschließend wurde die DNA mit *Bam*HI restringiert, und mit einer *mig*-spezifischen DNA-Sonde wurde eine Southern-Untersuchung durchgeführt. Bei *M. avium* hybridisiert diese *mig*-DNA-Sonde mit einer 2,8 kb großen DNA-Bande (Plum *et al.* 1997 und Meyer *et al.* 1998). Für das *mig::aph*-Allel wurde aufgrund der Insertion des *aph* Gens ein Signal bei circa 4 kb erwartet. Alle acht Klone zeigten dagegen bei der Southern-Untersuchung ein Signal bei 2,8 kb, ein alleler Austausch hatte damit nicht stattgefunden. Nach einer zweiten Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde gegen das *aph*-Gen konnte außerdem das Kanamycin-Resistenzgen nicht mehr nachgewiesen werden (Southern-Untersuchung nicht gezeigt). Es wurde daher eine illegitime Rekombination von pGPC119 beziehungsweise pGPC120 in das Genom von *M. avium* ausgeschlossen. Die Plasmide sind wahrscheinlich

während des zweiten Rekombinationsschrittes -nach Auflösung des Integrationsproduktes – aus dem Genom deletiert, nachdem die Zellen gegen Kanamycin spontanresistent geworden sind.

3.1.2 Transformation von *M. avium* mit autonom replizierenden Vektoren mit einem induzierbaren Suizidgen (*sacB*)

Die unter 3.1.1 verwendete Strategie, ein Suizidplasmid zu verwenden, um einen allelen Austausch zwischen dem Gen *mig* und dem Allel *mig::aph* zu erreichen, zeigte keinen Erfolg. Im weiteren Verlauf wurden zwei Plasmide verwendet, die ein Replikon für Mycobakterien besitzen und als Schaukelvektoren verwendet werden können (Beggs *et al.* 1995; Pelicic *et al.* 1997). Es wurde zum einen das Plasmid pVE5 verwendet, welches neben dem Replikon ColE1 auch das mycobakterielle Replikon pAL5000 besitzt. Das zweite verwendete Plasmid, pGPC129, weist anstatt des pAL5000-Replikons das Replikon des *M. avium*-Plasmides pLR7 auf (Beggs *et al.* 1995). Aus dem Plasmid pGPC119 wurde das *mig::aph*-Allel als 3,2 kb großes DNA-Fragment mittels *PvuII*-Restriktion isoliert und in die *EcoRV*-Schnittstelle von pVE5 und pGPC129 inseriert. Die so konstruierten Plasmide wurden als pGPC121 und pGPC130 bezeichnet. Die Strategie wurde hier gegenüber der in 3.1.1 beschriebenen modifiziert. Nach Elektroporation der *M. avium*-Stämme A5, TMC724 und #5-8 mit 1 µg DNA pGPC121 und -130 wurden die Transformationsansätze auf 7H10-Platten gebracht, die zur Selektion der Transformanten mit Hygromycin (50 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) supplementiert waren. Nach drei Wochen wurde die Zahl der Kolonien/Transformationsansatz bestimmt. Es wurden neben den unterschiedlichen *M. avium*-Stämmen auch verschiedene Transformationsprotokolle getestet. Für die Elektroporation beschrieben Wards und Collins (1996) eine schlechtere Transformations-Effizienz bei Mycobakterien unter Verwendung eines Parallelwiderstandes von 200 Ω und favorisierten einen Widerstand von 1000 Ω. Dies konnte hier nicht bestätigt werden. Auch eine Erhöhung der Temperatur des Transformationsansatzes von 0°C auf Raumtemperatur zeigte keine Erhöhung der Transformations-Effizienz. Bei den Elektroporationen wurden 12 Kolonien mit dem Plasmid pGPC121 und 28 Kolonien mit dem Plasmid pGPC130 erhalten. Alle Kolonien wurden mittels PCR auf das Vorhandensein des *mig::aph*-Allels hin untersucht (Abbildung 3.2).

Hierbei hybridisierte ein Oligonukleotid spezifisch im Kanamycin-Resistenzgen (MIGKANRW), das andere spezifisch im *mig*-Gen (MIGKANFW). Bei den PCRs wurde ein 630 bp großes DNA-Fragment erwartet. 13 von 28 untersuchten Transformanten mit pGPC121 wurden mit dieser PCR-Methode positiv getestet, dagegen konnte nur bei drei von zwölf untersuchten Transformanten mit pGPC130 eine 630 bp große Bande amplifiziert werden. Aufgrund der niedrigen Transformationseffizienz kann vermutet werden, daß das pAL5000-Replikon (pGPC121) und das pLR7-Replikon (pGPC130) eine stabile und autonome Replikation *M. avium* nicht garantieren können und sich die Plasmide wie unter 3.1.1 in das Genom integriert haben. Ebenfalls auffällig war wiederum eine hohe Rate von spontanresistenten Kolonien.

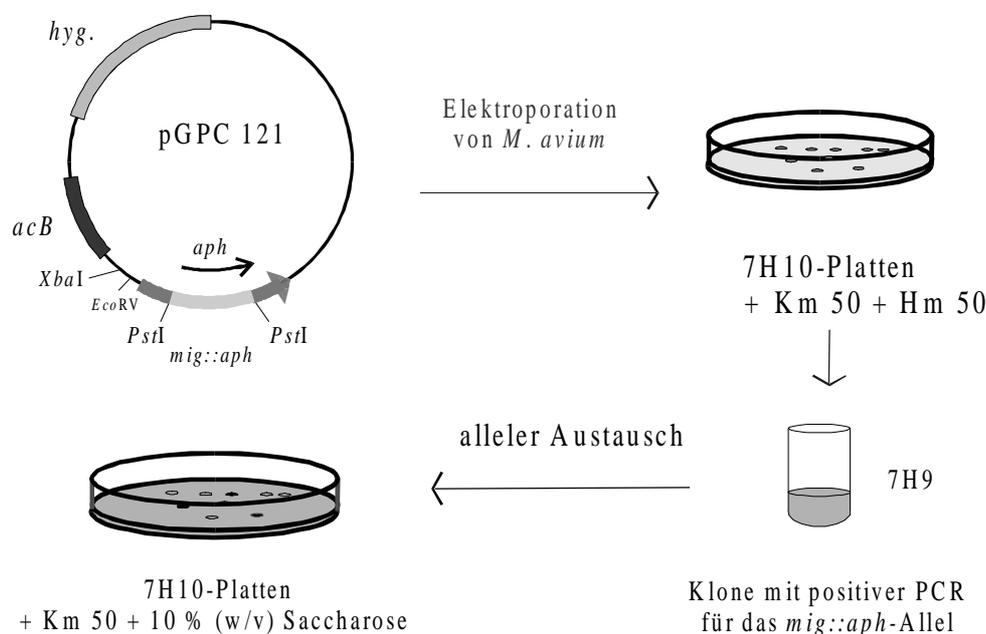


Abbildung 3.3: Darstellung der in 3.1.2 beschriebenen Rekombinationsstrategie zur Erzeugung von *mig*-Mutanten unter Verwendung eines induzierbaren Suizidvektors (siehe Text). Km50: 50 µg Kanamycin/ml; *hyg*: Hygromycin-Resistenzgen; Hm50: 50 µg Hygromycin/ml

Für einen allelen Austausch wurde je eine Kolonie (pGPC130 und pGPC121), die bei der *mig::aph*-PCR positiv war, in 7H9-Medium (mit 50 µg Kanamycin/ml supplementiert) 24 h lang subkultiviert und anschließend auf 7H10-Platten, die mit 10 % Saccharose und 50 µg Kanamycin supplementiert waren, plattiert. Da beide Plasmide das Suizidgen *sacB* besitzen und dessen Genprodukt bei Saccharose-Konzentrationen von circa 10 % für Mycobakterien toxisch ist (Pelicic *et al.* 1996), sollte ein alleler Austausch unter Verlust der Plasmid-Sequenzen erzwungen werden. Es wurde von anderen Autoren bereits für eine Steigerung der

Rate des allelen Austauschs bei Mycobakterien die Verwendung von Plasmiden mit einem thermolabilen pAL5000-Replikon (Pelicic *et al.* 1997) oder des *rpsL*-Gens als negativen Selektionsfaktor beschrieben (Sander *et al.* 1995). Bei einer anschließenden Analyse von 30 so gewonnenen Kolonien mittels Southern-Hybridisierung mit der *mig*-spezifischen DNA-Sonde konnte gezeigt werden, daß kein alleler Austausch stattgefunden hatte, sondern alle Klone lediglich das *mig*-Wildtyp-Allel aufwiesen (nicht gezeigt).

Als Alternative zu der in Abbildung 3.3 dokumentierten Strategie wurde *M. avium* A5 mit pGPC121 transformiert und der Transformationsansatz direkt auf 7H10-Platten plattiert, die neben 50 µg Kanamycin/ml auch mit 10 % Saccharose versetzt wurden. Bei dieser sogenannten „Ein-Schritt-Rekombinationsstrategie“ sollten nur die Transformanten selektiert werden, bei denen zwei Rekombinationsereignisse unter Verlust der *sacB*-Gen-tragenden Plasmid-DNA stattgefunden hatten, wodurch ein alleler Austausch des *mig*-Wildtyp-Allels gegen das *mig::aph*-Allel favorisiert wird. Es konnte aber bei keiner der 32 untersuchten Kolonien mittels *mig*-Gen-spezifischer Southern-Hybridisierung eine circa 4 kb große Bande nachgewiesen werden, wie es bei einem allelen Austausch des *mig*-Gens gegen das *mig::aph*-Allel erwartet wurde.

3.1.3 Transformation von *M. avium* mit 50 kb großen, linearen DNA-Fragmenten als Rekombinations-Substrat

Die von Balasubramanian *et al.* (1996) bei *M. tuberculosis* verwendete Technik, linearisierte, 50 kb große DNA-Fragmente mit einem inaktivierten Allel zu verwenden, um einen allelen Austausch zu erzwingen, wurde in dieser Arbeit für das *mig*-Gen benutzt. Für die Herstellung dieser circa 50 kb großen DNA-Fragmente über Konjugation wurde als Donor der *E. coli*-Stamm S17-1 λ pir und das mobilisierbare Plasmid pCVD442 benutzt, das einen vom π -Protein abhängigen Replikationsursprung R6K besitzt. Dieser Vektor wurde durch *Sma*I-Restriktion geöffnet und ein 3,2 kb großes DNA-Fragment mit dem *mig::aph*-Allel, das nach *Pvu*II-Hydrolyse aus dem Plasmid pGPC119 gewonnen wurde, wurde in pCVD442 inseriert (pGPC126). Als Rezipient wurde der Stamm *E. coli* LE392, dem das π -Protein für eine autonome Replikation von pCVD442 fehlte, mit dem Cosmid pYA1400 benutzt. Das Cosmid enthielt ein 50 kb großes DNA-Fragment aus dem Chromosom von *M. avium*, auf dem das Gen *mig* lokalisiert war. Da der Rezipientenstamm nicht das π -Protein exprimiert und auf dem Plasmid pGPC126 das durch Saccharose induzierbare *sacB*-Gen lokalisiert war, konnte nach erfolgter Konjugation auf Medien mit Saccharose und Kanamycin ein gezielter

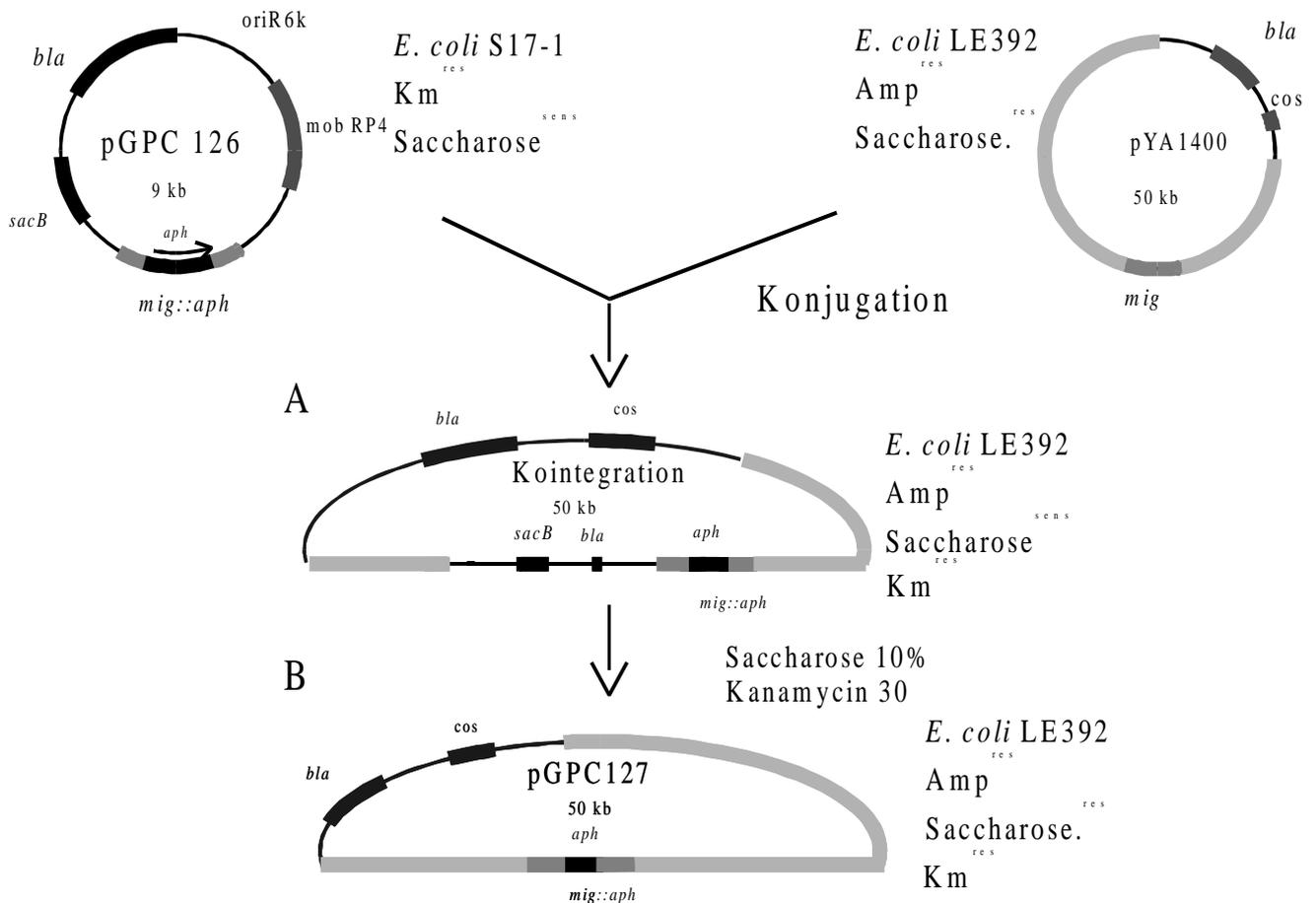


Abbildung 3.4: Herstellung langer DNA-Fragmente mit einem *mig:aph*-Allel. Nach erfolgtem DNA-Transfer von pGPC126 in den Rezipienten *E. coli* LE392 bildete sich nach der ersten homologen Rekombination das Kointegrationsprodukt (A). Dieses Cosmid vermittelt dem Rezipienten zwar eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin, aber auch eine Sensitivität gegenüber Saccharose durch das auf pGPC126 lokalisierte Gen *sacB*. Erst nach einem zweiten Rekombinationsereignis, d.h. nach Verlust von *sacB* und nach erfolgtem allelen Austausch von *mig* gegen das *mig:aph*-Allel (B), war ein Wachstum des Rezipienten auf LB-Medium mit 50 μ g Kanamycin/ml (Km50) und Saccharose (10 % (w/v)) möglich. Dieses Cosmid wurde als pGPC127 bezeichnet. Amp: Ampicillin; Km: Kanamycin; *bla*: beta-Lactamase; *aph*: Kanamycin-Resistenzgen; *sacB*: Levansucrase-Gen.

Genaustausch des *mig*-Allels auf pYA1400 gegen das *mig:aph*-Allel von pGPC126 erzielt werden (Abbildung 3.4).

Der allele Austausch von *mig* gegen das inaktivierte Allel wurde mittels Southern-Hybridisierung nachgewiesen. Hierfür wurde das Cosmid pYA1400 und die Cosmid-DNA zweier Transkonjuganten mit *Bam*HI restringiert und nach dem Transfer auf eine Nylonmembran mit einer *mig*-Gen-spezifischen DNA-Sonde hybridisiert. Bei erfolgtem allelen Austausch wurde, wie in Abbildung 3.5 zu sehen, eine Größenzunahme des zu

detektierenden DNA-Fragments von 2,8 kb auf 4,0 kb erwartet. Das erhaltene Cosmid wurde pGPC127 genannt.

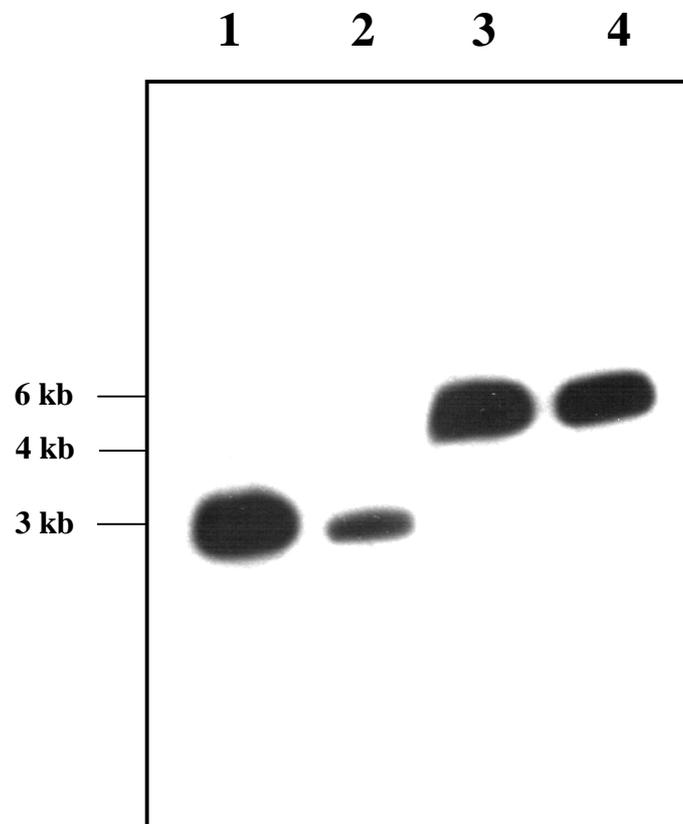


Abbildung 3.5: Southern-Hybridisierung mit *mig*-Gen spezifischer Sonde gegen *Bam*HI-behandelten pYA1400 (Spur 1 und 2) und Cosmid pGPC127 zweier Transkonjuganten (Spur 3 und 4).

Das Cosmid pGPC127 wurde durch Behandlung mit λ -Terminase linearisiert und mittels Elektroporation unter anderem in die *M. avium*-Stämme A5, TMC 724 und # 5-8 transferiert. Bei allen Stämmen wurde nach wiederholter Elektroporation und unter Verwendung unterschiedlicher Protokolle in etwa die gleiche Anzahl an Kolonien erhalten (circa 50/Ansatz). Zunächst wurden 30 Kolonien subkultiviert, die DNA isoliert und einer Southern-Hybridisierung mit der *mig* Gen spezifischen Sonde unterzogen. Alle Klone zeigten bei diesem Verfahren eine Bande auf Höhe von 2,8 kb, die dem *mig*-Wildtyp-Allel entspricht. Weitere 150 Kolonien wurden unter allen Transformanten ausgewählt und mittels PCR auf das Kanamycin-Resistenzgen hin untersucht (Abbildung 3.2). Bei nur sieben von 150 Kolonien ergab sich ein PCR-Produkt der erwarteten Größe von 600 bp. Diese sieben

Kolonien zeigten in der Southern-Hybridisierung nur das *mig*-Wildtyp-Allel. Es wurden darauf weitere 150 Kolonien subkultiviert und die genomische DNA isoliert. Um Klone, die das Kanamycin-Resistenzgen durch Rekombinationen erhalten haben, von spontanresistenten Kolonien unterscheiden zu können, wurde die genomische DNA einem sogenannten „Dot-Blot“-Verfahren unterzogen. Die so behandelte DNA wurde mit einer Sonde gegen das Kanamycin-Resistenzgen hybridisiert. Lediglich bei der DNA von 20 Klonen konnte ein Signal beobachtet werden, was bedeutet, daß circa 85 % spontanresistente Kolonien waren (Abbildung 3.6). Bei allen positiven Klonen konnte kein alleler Austausch nach einer Southern-Untersuchung mit einer *mig*-spezifischen DNA-Sonde identifiziert werden.

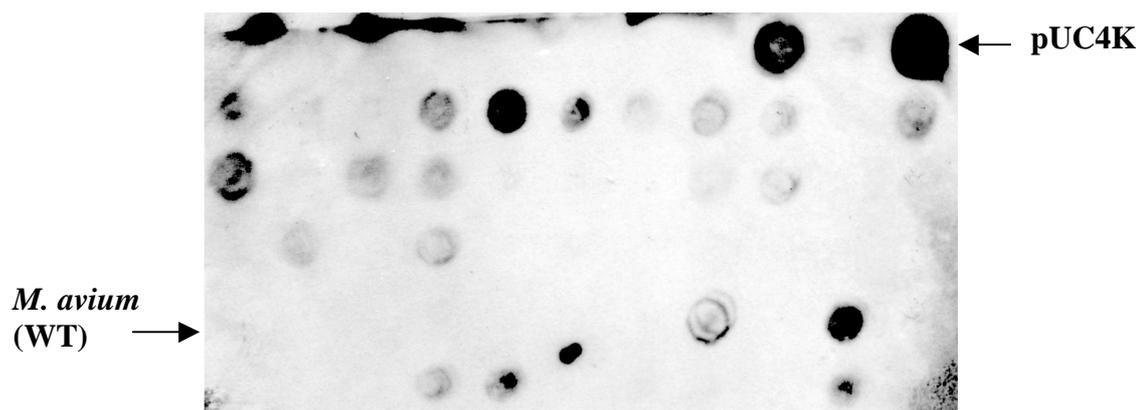


Abbildung 3.6: Darstellung eines „Dot-Blot“ hybridisiert mit einer Sonde gegen das Kanamycin-Resistenzgen (*aph*). Es sind hier 66 DNA-Proben der insgesamt 150 Kolonien dargestellt. Als positive Kontrolle wurde pUC4K mit dem Kanamycin-Resistenzgen (*aph*) verwendet und als negative Kontrolle *M. avium* Wildtyp-DNA.

3.1.4 Versuch einer gezielten Mutagenese von *M. avium* durch Plasmidintegration

Ein gezielter Genaustausch bei *M. avium* war mit den unter 3.1.1 bis 3.1.3 ausgewählten und bei anderen Mycobakterien-Arten praktikablen Methoden nicht möglich. Aufgrund der hohen Spontanresistenz-Raten scheint eine gezielte Geninaktivierung mit nur einer Selektionsmarke

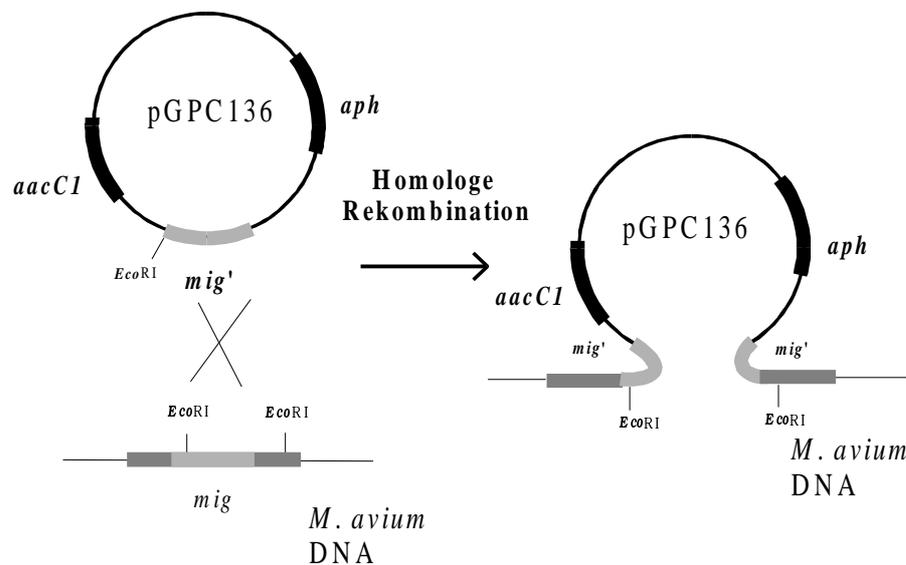


Abbildung 3.7: Prinzip der gezielten Mutagenese von *mig* durch Integration von pGPC136. Zur besseren Selektion enthält pGPC136 neben dem Kanamycin-Resistenzgen (*aph*) auch ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Gentamycin (*aacC1*).

wenig erfolgversprechend. Um das Problem der hohen Spontanresistenz-Raten zu umgehen, benutzten Batoni *et al.* 1998 zur Selektion von Plasmid-transformierten *M. avium*-Stämmen zwei Resistenzmarken.

Neben der Methode des allelen Austausches gibt es noch weitere Techniken, um Gene gezielt zu inaktivieren. Bei einer dieser alternativen Mutagenesemethoden wird das betreffende Gen durch gezielte Integration eines Plasmides inaktiviert. Hierfür wird ein Suizidplasmid mit einem 5'-und 3'-deletierten Allel dieses Gens benutzt, das durch homologe Rekombination in das chromosomale Allel integriert. Im Genom entstehen dabei zwei inaktive, deletierte Allele des Zielgens, wodurch dieses inaktiviert wird (Miller und Mekalanos *et al.* 1988).

Diese Methode wurde auch zur gezielten Inaktivierung des Gens *mig* angewendet. Hierfür wurde zunächst ein Allel von *mig* über PCR mit den Primern MIGTRUNCFW und MIGTRUNCRW aus dem Genom amplifiziert. Die Primer wurden hierbei so gewählt, daß sie innerhalb des *mig*-ORFs hybridisierten, so daß angenommen werden konnte, daß das Zielgen durch erfolgreiche Integration in das homologe Wildtyp-Allel, inaktiviert wird (Abbildung 3.7). Das amplifizierte, 660 bp große DNA-Fragment wurde in das Plasmid pCR2-1 kloniert, wodurch das Plasmid pGPC135 entstand. Anschließend wurde durch Integration des

Gentamycin-Resistenzgens *aacCI* aus dem Plasmid pBSL141 (Alexeyev *et al.* 1995) in die *Bam*HI-Schnittstelle von pGPC135 ein zweiter Selektionsmarker eingefügt, um bei *M. avium* die Anzahl spontanresistenter Kolonien zu verringern (pGPC136). Als dritter Selektionsmarker wurde in das Plasmid pGPC136 ein Streptomycin/Spectinomycin-Resistenzgen aus pHRP316 (Parales und Harwood 1993) in die *Hind*III-Erkennungsstelle inseriert (pGPC137).

Für die Transformation von *M. avium* wurde nur noch der Stamm A5 benutzt. Mit diesem Stamm sind erfolgreiche Transformationen mit gentechnisch veränderten Plasmiden publiziert worden (Beggs *et al.* 1995). Lediglich bei Transformationen von *M. avium* A5 mit pGPC136, nicht jedoch mit pGPC137, entstanden Kolonien. Bei einer anschließenden Southern-Untersuchung der entstandenen 17 Kolonien mit der *mig*-spezifischen DNA-Sonde konnte bei allen Klonen nur eine Bande mit einer Größe von 2,8 kb nachgewiesen werden, so daß pGPC136 nicht spezifisch in das Genom integriert worden war. Es kann sich aber auch um um spontanresistente Kolonien gehandelt haben.

3.1.5 Diparentale und triparentale Konjugation von Plasmiden von *E. coli* zu *M. avium*

Eine weitere Möglichkeit, rekombinante DNA in Mycobakterien zu transferieren, ist die Konjugation (Gavigan *et al.* 1995; Gavigan and Martin 1998; Dziadek *et al.* 1994; Gormley und Davies 1991). Für *M. avium* ist eine solche Technik bislang nicht gezeigt worden; hauptsächlich wurden bislang nur Schaukelplasmide und integrative Plasmide mittels Konjugation in *M. smegmatis* transferiert (Gavigan *et al.* 1995). Für eine diparentale Konjugation eignen sich der *E. coli*-Stamm S17-1 und der mobilisierbare Vektor pGPC126. *E. coli* S17-1 wurde bereits von Gavigan *et al.* 1995 für den Transfer eines Plasmides in *M. smegmatis* benutzt.

Das Plasmid pGPC126 enthält das Gen *sacB*, das unter 3.1.4 bei *E. coli* als negativer Selektionsfaktor eingesetzt wurde. Wie von Pelicic *et al.* (1996) beschrieben, wird das *sacB*-Gen auch in Mycobakterien heterolog exprimiert, und das Genprodukt ist auch für Mycobakterien unter Zugabe von Saccharose toxisch. So ist es möglich, *sacB* als negativen Selektionsfaktor bei der Konjugation einzusetzen. Als Rezipient wurde *M. avium* A5 benutzt.

Alle Transkonjuganten waren positiv bei einer *mig::aph*-Allel spezifischen PCR-Untersuchung. Die Morphologie der Kolonien unterschied sich von der Kolonief orm des *M. avium* A5 Wildtyps. Die Kolonien waren nicht opaque und domartig gewölbt, sondern transparent und zerklüftet (Abbildung 3.8). Sie stoppten in ihrem Wachstum nach 10 Tagen

und ließen sich nicht weiter subkultivieren. Ob in diesen Kolonien ein alleler Austausch stattgefunden hatte oder ob es sich in Anbetracht der instabilen Vitalität der Kolonien um einen - nach der Integration von pGPC126 - durch *sacB* verursachten Effekt handelte, konnte nicht entschieden werden.

Wurde der Konjugationsansatz auf 7H10-Platten, die nicht mit Saccharose supplementiert waren, plattiert, waren die Kolonien nicht transparent. Alle Transkonjuganten, die durch eine *mig::aph*-Allel-spezifische PCR-Untersuchung getestet wurden, waren positiv für dieses Allel

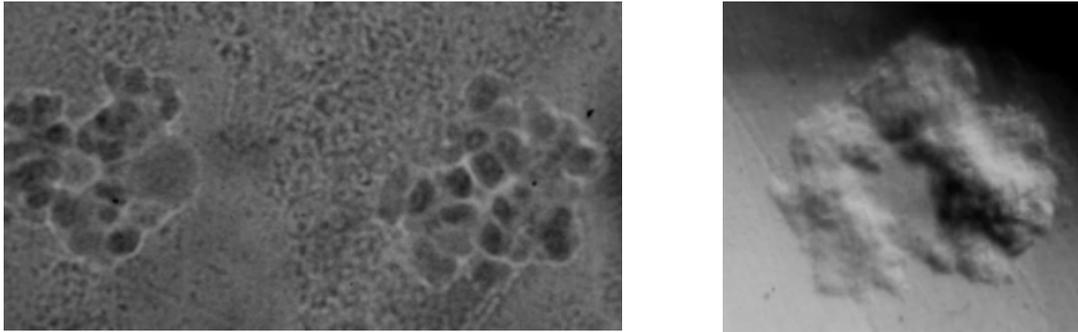


Abbildung 3.8: Transkonjuganten nach Konjugation zwischen *E. coli* S17-1 mit pGPC126 und *M. avium* A5

und ließen sich auch subkultivieren. Es wurde angenommen, daß pGPC126 in diesen Fällen durch homologe Rekombination mit dem Gen *mig* in das Genom integriert war. Von Subkulturen ausgehend wurden Verdünnungen auf 7H10-Platten ausplattiert, die mit 10 % Saccharose supplementiert waren. Mittels spezifischer PCR für das *mig::aph*-Allel (siehe oben) konnte dieses Allel nicht mehr amplifiziert werden. Auch bei Southern-Hybridisierungen mit einer *mig*-Gen spezifischen Sonde war nur die 2,8 kb große Bande für das Wildtyp-Allel sichtbar. Das Plasmid pGPC126 ging wahrscheinlich während der Subkultivierung verloren, und die Zellen wurden gegen das Antibiotikum spontanresistent. Dies ist kohärent mit den Ergebnissen, die für die Mutagenese-Strategien mit Elektroporations-Technik gemacht wurden.

Wie diese Ergebnisse zeigen, scheint durch die hohe Spontanresistenzrate von *M. avium* eine Zwei-Schritt-Mutagenese-Strategie unmöglich. Ein anderes Problem ist möglicherweise auch die hohe Rate illegitimer Rekombinationen bei Mycobakterien (Kalpana *et al.* 1991; Aldovini *et al.* 1993). Neben der diparentalen gibt es auch die triparentale Konjugation. Hier sind die für die Mobilisierung notwendigen Gene nicht auf dem Chromosom lokalisiert, sondern auf dem Plasmid pRK2013 (Figurski und Helinski 1979), so daß man keine speziellen *E. coli*-Stämme wie S17-1 für die Mobilisierung von Plasmiden benötigt. Für die triparentale Konjugation wurde der Vektor pBBR1MCS (Kovach *et al.* 1995) benutzt, der einen Transfer-

Replikationsursprung für die Konjugation besitzt. Dieses Plasmid ist ein sogenannter „Broad-Host-Range“-Vektor für Gram-negative Bakterien, der sich aber in Mycobakterien nicht autonom replizieren kann. Für die triparentale Konjugation wurde ein neues inaktiviertes Allel von *mig* konstruiert. Dafür wurde pGPC100, das *mig* auf einem 2,8 kb großen DNA-Fragment aus *M. avium* enthält, mit *EcoRI* restringiert und ein 1,2 kb großes DNA-Fragment deletiert. Durch diese Deletion wurde das Gen *mig* partiell entfernt (pGPC100-1). Anschließend wurde das *aacCI*-Gentamycin-Resistenzgen in die *EcoRI*-Erkennungsstelle inseriert (pGPC100-2), und die entstandene $\Delta mig::aacCI$ -Kassette wurde nachfolgend in die *EcoRV*-Schnittstelle von pBBR1MCS inseriert (pMigGm). Pelicic *et al.* (1996) zeigten, daß die Expression des Gens *aacCI* in Mycobakterien eine Resistenz gegen Gentamycin vermittelt und eine nützliche Resistenz-Marke ist. Es stand nun ein neues inaktiviertes Allel von *mig* zu Verfügung, das im weiteren mit $\Delta mig::aacCI$ -Allel bezeichnet wird. Das Plasmid pMigGm wurde konstruiert, um einen mobilisierbaren Vektor zur Verfügung zu haben, der sich unabhängig vom π -Protein in *E. coli* repliziert. Außerdem wurde ein neues Resistenzgen ausgewählt, da bei Gentamycin eine geringere Rate an spontanresistenten Kolonien erwartet wurde (Berger, persönliche Mitteilung). Durch die Deletion konnte sichergestellt werden, daß die Mutation nach erfolgtem allelen Austausch stabil blieb. Das *aacCI*-Gen flankierend standen nun jeweils 0,8 kb genomische DNA als Substrat für die Rekombination zu Verfügung (Abbildung 3.9A). Für eine schnelle Erkennung von Rekombinanten wurde eine PCR entwickelt, bei welcher der die Deletion flankierende Bereich des *mig*-Gens mit den Primern MIGGNFW und MIGGNRW amplifiziert werden sollte. Bei einer Amplifikation entstehen je nach Allel verschieden große PCR-Produkte, für das *mig*-Allel ein 1,5 kb großes PCR-Produkt und für das $\Delta mig::aacCI$ -Allel ein 1,1 kb großes DNA-Fragment. Hierdurch war schnell zu entscheiden, ob es sich bei den Exkonjuganten um spontanresistente Kolonien handelte, um Kolonien handelte, die das Plasmid pMigGm integriert hatten, oder ob möglicherweise ein alleler Austausch zwischen Plasmid und Genom stattgefunden hatte (Abbildung 3.9).

Nach einer triparentalen Konjugation wurden die Ansätze auf 7H10-Platten plattiert, die mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin supplementiert waren. Vorhergehende Studien zeigten, daß bei einer Konzentration von 20 μg Gentamycin pro ml Medium die Rate für spontanresistente Kolonien bei 10^{-8} lag. Die Transkonjuganten zeigten unterschiedliche Kolonieförmigkeiten, zum einen waren sie rund und opak und entsprachen der Kolonieförmigkeit des Wildtyps. Es traten aber auch Kolonien auf, die der Form nach, denen von Abbildung 3.8 sehr ähnlich waren und sich auch nicht weiter subkultivieren ließen. Bei einer PCR-Untersuchung unter Benutzung der Primer

MIGGNFW und MIGGNRW konnten aus diesen kleinen Kolonien lediglich PCR-Produkte erhalten werden, die für das $\Delta mig::aacCI$ -Allel erwartet wurden (Abbildung 3.9B; Spur7). Das Ergebnis dieser Konjugation zeigt, daß die Ursache der transparenten, nicht subkultivierbaren Kolonien, wie für die diparentale Konjugation diskutiert, nicht das Genprodukt SacB war. Bei den meisten opaquen Kolonien zeigte sich bei der PCR-Untersuchung, daß das Plasmid pMigGm in das Genom integriert war. Hier traten zwei PCR-Produkte auf, deren Größen für das *mig*-Allel (1,1 kb) und das $\Delta mig::aacCI$ -Allel (1,5 kb) spezifisch sind (Abbildung 3.9B; Spur 4 und 5). Bei diesen Kolonien kann sich ein Kointegrationsprodukt gebildet haben, das sich nach einer homologen Rekombination zwischen dem auf dem Genom lokalisierten Gen *mig* und dem $\Delta mig::aacCI$ -Allel auf pMigGm gebildet hat. Es kann sich aber auch um Kolonien handeln, bei denen das Plasmid pMigGm durch illegitime Rekombination in das Genom integriert wurde. Es traten zudem auch Kolonien auf, bei denen bei der PCR-Untersuchung ein 1,5 kb großes PCR-Produkt amplifiziert werden konnte, wobei diese Größe für das *mig*-Allel spezifisch ist (Abbildung 3.9A). Hier handelte es sich wahrscheinlich um spontanresistente Kolonien.

Die Kolonien, bei denen ein 1,1 kb großes PCR-Produkt amplifiziert werden konnte, ließen sich nicht weiter kultivieren. Dieser Phänotyp ist identisch mit dem bereits beschriebenen Phänotyp (Abbildung 3.8). Nach einer Sukultivierung der Kolonien, die bei der PCR-Untersuchung ein 1,1 kb (inaktiviertes *mig*-Gen) und ein 1,5 kb (*mig* Wildtyp) großes PCR-Produkt hatten, konnte bei einer anschließenden PCR-Untersuchung nur noch ein 1,5 kb großes PCR-Produkt amplifiziert werden. Hier könnte das Kointegrationsprodukt aufgelöst und das Wildtyp-Allel rekonstituiert worden sein. Es traten bei wiederholten diparentalen und triparentalen Konjugationsexperimenten immer wieder Kolonien auf, bei denen bei einer PCR-Untersuchung Produkte auftraten, die für einen allelen Austausch erwartet wurden. Diese Kolonien hatten alle eine transparente und/oder sehr kleine Kolonieform, der sogenannten „Pin Point“-Form (Rastogi und Barrow 1994) ähnlich. Als Beweis, daß es prinzipiell möglich ist, mittels Konjugation oder Elektroporation Gene in *M. avium* zu inaktivieren, sollte ein anderes, putativ nicht essentielles Gen inaktiviert werden.

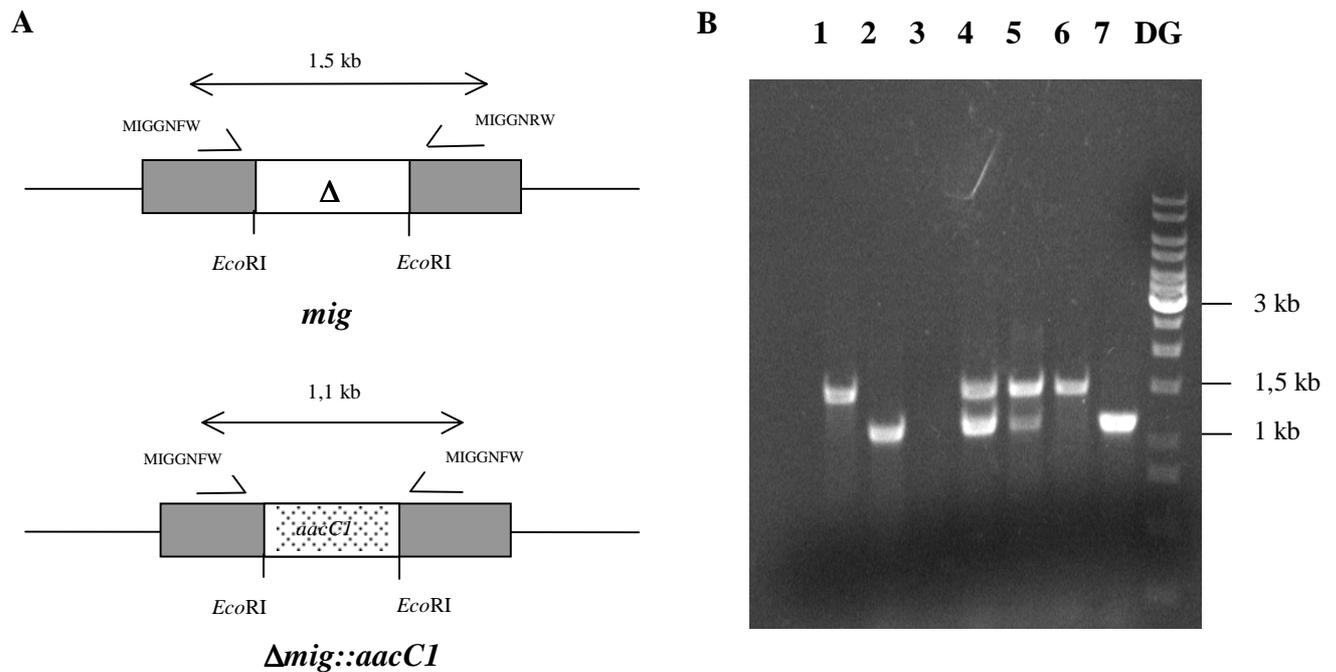


Abbildung 3.9: Triparentale Konjugation. A) Schematische Darstellung der Deletions-Mutagenese des *mig*-Gens und der anschließenden Insertion des *aacCI*-Gens ($\Delta mig::aacCI$ -Allel). Die Positionen der Oligonukleotide MIGGNFW und MIGGNRW und die Größen der PCR-Produkte, die nach Amplifikation des *mig*-Allels (1,5 kb) und des $\Delta mig::aacCI$ -Allels (1,1 kb) erwartet wurden, sind angegeben. B) PCR-Produkte nach PCR mit den Oligonukleotiden MIGGNFW und MIGGNFW Oligonukleotiden, elektrophoretisch aufgetrennt auf einem 0,9 %igen TAE-Agarosegel. Folgende Matrizen-DNA wurde amplifiziert: Spur 1, pGPC100; Spur 2, pMigGm; Spur 3, genomische *E. coli*-DNA; Spuren 4-7, Transkonjuganten aus triparentaler Konjugation; Spur 8, DNA-Größenstandard (MBI).

3.2 Versuch einer gezielten Inaktivierung des *sigE*-Gens durch allelen Genaustausch bei *M. avium*

Das *sigE*-Gen ließ sich bei *M. smegmatis* durch allelen Austausch gezielt inaktivieren und scheint, auch in Anbetracht der Tatsache, daß Mycobakterien zehn Sigmafaktoren besitzen, die zur ECF-Familie gezählt werden, nicht essentiell für Mycobakterien zu sein. So bietet sich dieses Gen für eine gezielte Inaktivierung in *M. avium* an.

Das *sigE*-Gen wurde aus *M. avium* mittels spezifischer PCR mit den Primern SIGEFW und SIGERW amplifiziert und nach Restriktion mit *Xba*I und *Xho*I in das Plasmid pGPC294 inseriert (pGPC291). Dieses 1,6 kb große PCR-Produkt enthielt neben dem 0,76 kb großen ORF für das *sigE*-Gen auch noch stromauf- und -abwärts gelegene Sequenzen. Durch eine Integration des *aacCI*-Gens in die singuläre *Xmn*I-Erkennungsstelle wurde der ORF von *sigE* gezielt unterbrochen. Hierfür wurde das 925 bp große *aacCI*-Gen durch *Bam*HI-Restriktion aus pBSL141 isoliert und nach einer Behandlung mit der T4-DNA-Polymerase in pGPC291 inseriert (pGPC292). Das so erhaltene *sigE::aacCI*-Allel wurde anschließend als *Pvu*II-Fragment in die *Sma*I-Erkennungsstelle von pBBR1MCS inseriert (pGPC293). Für die Konstruktion einer *sigE*-Mutante wurde eine Strategie gewählt, bei der das *sigE*-Allel gegen das *sigE::aacCI*-Allel ausgetauscht werden sollte. Hierfür sollte das Plasmid zum einen durch Elektroporation und zum anderen durch triparentale Konjugation in *M. avium* transferiert werden. Nach der Elektroporation von *M. avium* A5 und *M. avium* # 5-8 wurden die Ansätze auf 7H10-Platten gebracht, die mit 20 µg Gentamycin pro ml Medium versetzt waren. Für die triparentale Konjugation wurden ebenfalls die oben genannten *M. avium*-Stämme verwendet. Es entstanden über 200 Transformanten / Elektroporationsansatz und 50 Transkonjuganten / Konjugationsansatz. Hiervon wurden jeweils 40 Kolonien subkultiviert und anschließend mittels spezifischer PCR unter Benutzung der Primer SIGETESTFW und SIGETESTRW genotypisch untersucht.

Im Gegensatz dazu konnten bei den Transkonjuganten mit der hier benutzten PCR DNA-Fragmente amplifiziert werden, die 1100 bp und / oder 207 bp groß waren. Die Klone mit einem Bandenmuster von 207 bp und 1100 bp waren Transkonjuganten, die entweder nach illegitimer oder homologer Rekombination von pGPC293 entstanden sein mußten. Es konnte aber auch bei vier der 40 Transkonjuganten bei der PCR-Untersuchung nur ein 1100 bp großes DNA-Fragment amplifiziert werden. Diese Klone wurden mit M1 bis M3 und M5 bezeichnet (Abbildung 3.10B). Hier konnte angenommen werden, daß ein alleler Austausch zwischen dem auf dem Plasmid pGPC294 lokalisierten *sigE::aacCI*-Allel und dem auf dem *M. avium*-Genom lokalisierten *sigE*-Wildtyp-Allel stattgefunden hatte. Um dies zu

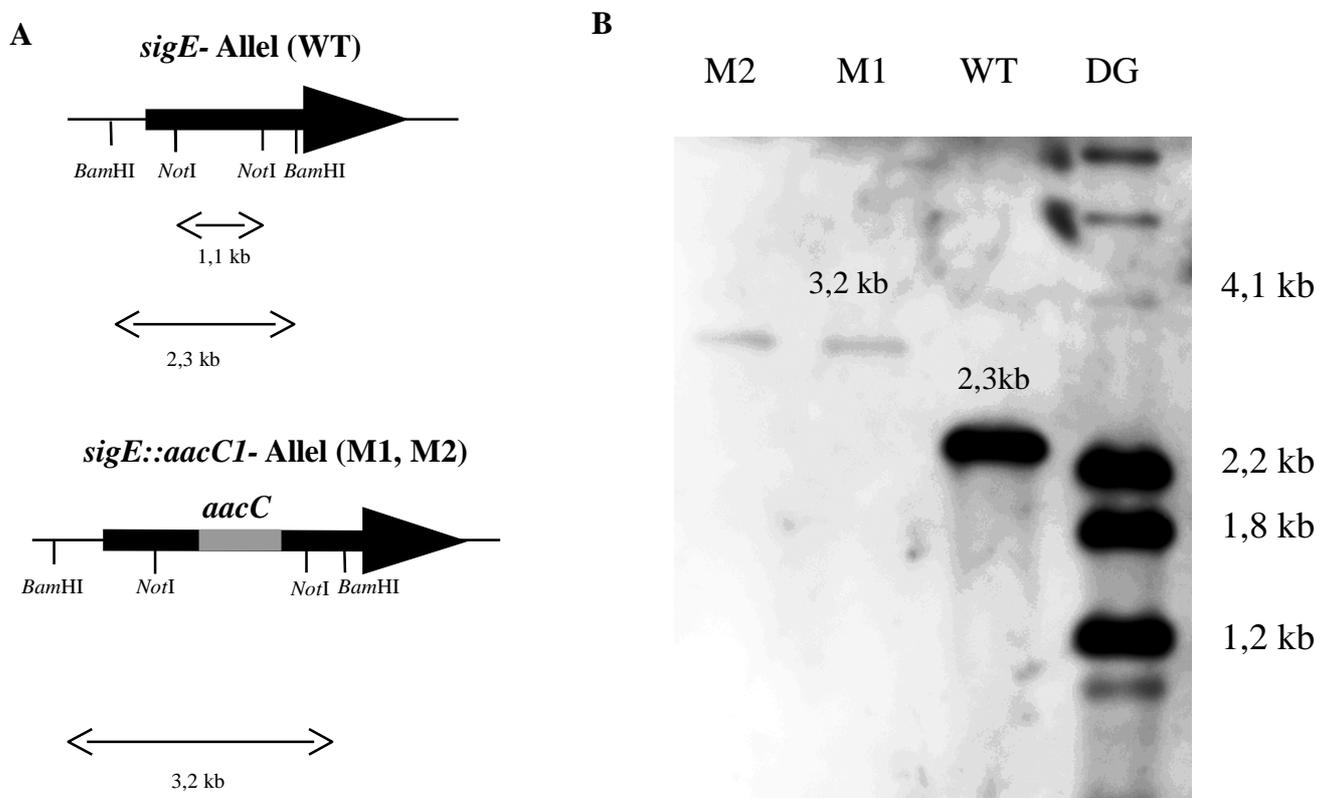


Abbildung 3.11: A) Schema der in einer Southern-Hybridisierung mit *Bam*HI-restringierter, genomischer DNA von Wildtyp und *sigE*-Mutante mit einer *sigE*-Sonde erwarteten Signalgrößen. B) Autoradiogramm nach Southern-Hybridisierung mit *sigE*-Sonde gegen die mit *Bam*HI hydrolysierte genomische DNA der *M. avium*-Transkonjuganten M1 und M2 beziehungsweise *M. avium* #5-8 (WT). In der linken Spur wurde ein Digoxygenin-markierter DNA-Größenstandard (DG) aufgetragen. Die hydrolysierten DNA-Fragmente wurden nach der Auftrennung in einer 0,8 %igen TAE-Agarosegelelektrophorese auf eine Nylon-Membran transferiert und mit der 1,1 kb großen *NotI*-Sonde hybridisiert.

bestätigen, wurde eine Southern-Hybridisierung mit einer *sigE*-spezifischen DNA-Sonde durchgeführt (Abbildung 3.11). Diese Sonde wurde durch Digoxigenin-Markierung eines 1,1 kb großen *NotI*-DNA-Fragmentes aus dem Plasmid pGPC291 konstruiert (Abbildung 3.11A). Für die Southern-Hybridisierung wurde die genomische DNA von M1, M2 und *M. avium* #5-8 isoliert und mit *Bam*HI hydrolysiert. Es wurde bei dieser Untersuchung für *M. avium* #5-8 eine Bande von circa 2,3 kb und für die drei Mutanten nach erfolgreichem allelen Austausch eine Bande von circa 3,2 kb erwartet (Abbildung 3.11A). Genau diese Bandenmuster konnten nach dieser Untersuchung beobachtet werden (Abbildung 3.11B). Es konnte bei den Mutanten M1 und M2 keine Bande bei 2,3 kb beobachtet werden. Daraus wurde geschlossen, daß ein alleler Austausch unter Verlust des genomischen *sigE*-Wildtyp-Allels stattgefunden hatte. Aufgrund der in der Southern-Hybridisierung gewonnenen Daten konnte angenommen werden, daß es sich bei den erhaltenen Klonen M1 und M2 um die gesuchte *sigE*-„knock-out“-Mutante handelte. Dieser *M. avium*-Stamm wird im weiteren als *M. avium* K007 bezeichnet. Die für *M. avium* spezifische Insertionssequenz IS1245 wurde mittels PCR nach Guerrero *et al.* (1995) bei Wildtyp und Mutante nachgewiesen (circa 425 bp; Abbildung 3.13D).

3.3 Physiologische Charakterisierung von *M. avium* K007

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten von *M. avium* K007 und *M. avium* #5-8 über einen Zeitraum von 12 Tagen beobachtet. Hierfür wurden *M. avium* #5-8 und *M. avium* K007 in 7H9-Medium bei 37°C angezogen. Die Wachstumskurven von Mutante und Wildtyp waren in den ersten drei Tagen beziehungsweise bis zu einer optischen Dichte von 0,3 bei 600 nm identisch. Danach ging die Wachstumskurve von *M. avium* K007 in eine gleichsam stationäre Phase über und stagnierte bei einem Wert von 0,3 (O.D.₆₀₀), das Wachstum von *M. avium* #5-8 ging erst bei Tag 7 bis 8 in die stationäre Phase über (O.D.₆₀₀: 0,8-1,0). In Abbildung 3.12A sind die Wachstumskurven von *M. avium* K007 und *M. avium* #5-8 bei 37°C dargestellt. Diese veränderte Wachstumskurve der Mutante konnte auch bei einer Temperatur von 30°C beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Eine Messung in der stationären Phase (Tag 10) ergab, daß die CFU für die Mutante bei $4 \cdot 10^8 \pm 1 \cdot 10^8$ (Standardabweichung) und die CFU für den Wildtyp bei $5 \cdot 10^9 \pm 5 \cdot 10^8$ lag.

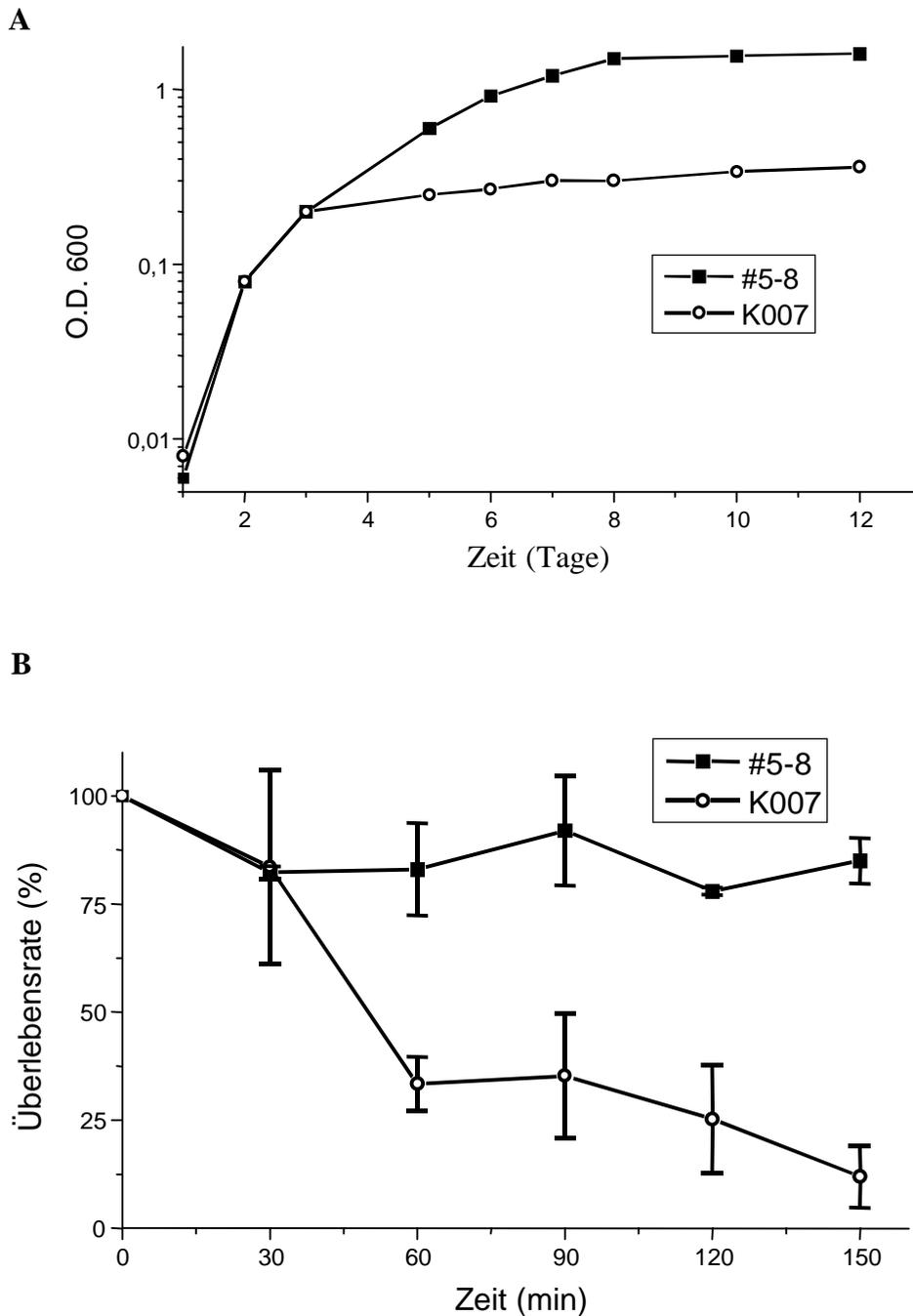


Abbildung 3.12: A) Wachstumskurven von *M. avium* #5-8 und *M. avium* K007 über 12 Tage in 7H9-Medium (37°C). B) Überlebensrate von *M. avium* #5-8 und *M. avium* K007 nach Hitzestress. Die Stämme wurden bis zur einer optischen Dichte (O.D.₆₀₀) von 0,2-0,3 in 7H9-Medium bei 37°C angezogen und mit 7H9-Medium auf eine Dichte (O.D.₆₀₀) von 0,1 verdünnt. Anschließend wurde die Temperatur auf 50°C erhöht. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung (n = 3).

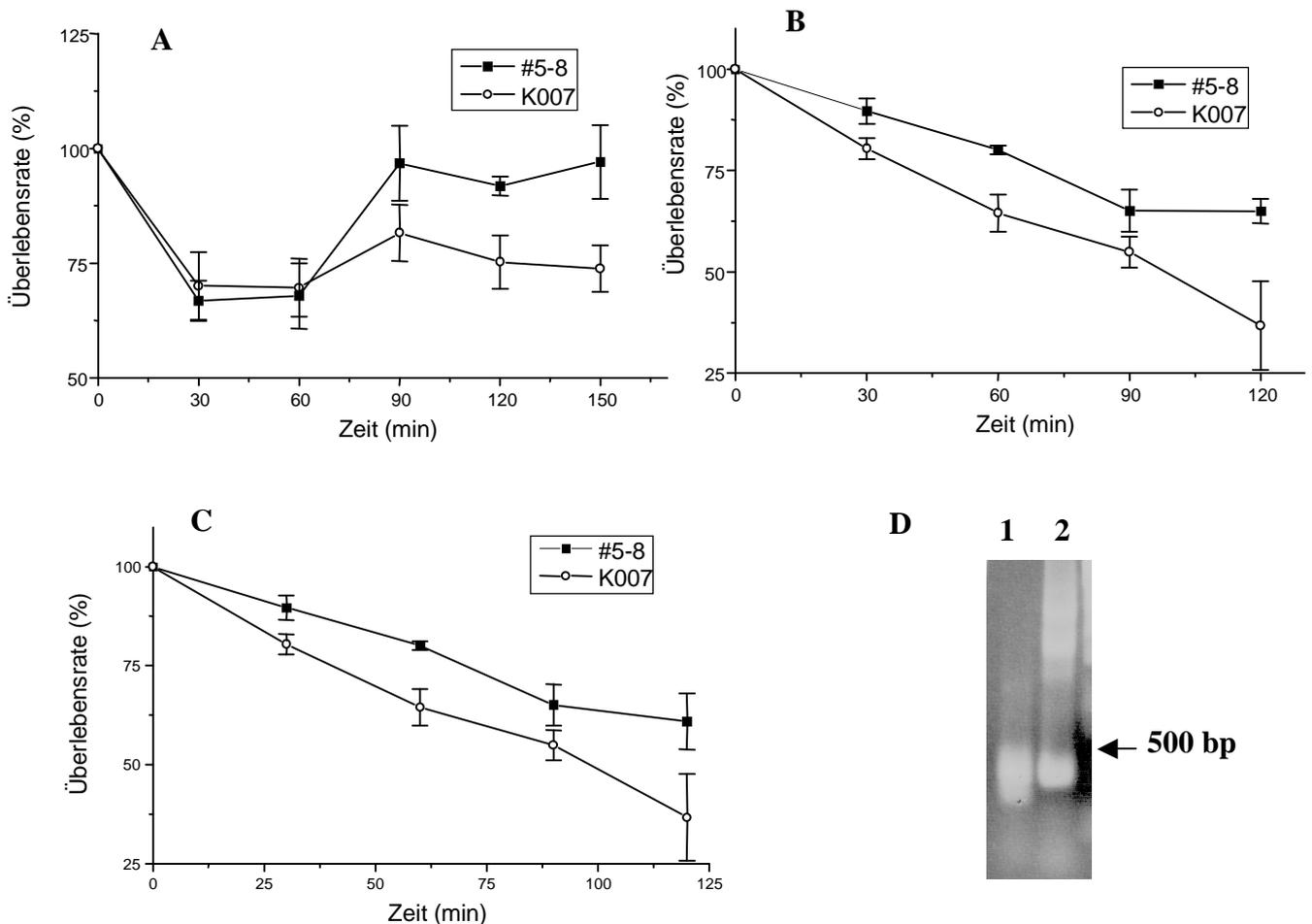


Abbildung 3.13: Überlebensrate von *M. avium* #5-8 und *M. avium* K007 bei extrazellulärem Streß. Die Stämme wurden bis zu einer optischen Dichte (O.D.₆₀₀) von 0,2 - 0,3 in 7H9-Medium bei 37 °C angezogen und mit frischem 7H9-Medium auf eine Dichte (O.D.₆₀₀) von 0,1 verdünnt. Anschließend wurden die verdünnten Kulturen folgenden Streßbedingungen unterzogen: A) Detergenzien-Streß (0,01 % SDS); B) Säure-Streß (pH 4); C) Oxidativer Streß (5 mM H₂O₂). Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung (n = 3). D) PCR-Nachweis von IS1245 nach Guerrero *et al.* (1995). Spur 1, *M. avium* K007; Spur 2, *M. avium* #5-8. Eine negative Kontrolle (hier nicht gezeigt), mit *E. coli*-DNA durchgeführt, zeigte keine PCR-Produkte.

Der mycobakterielle Sigmafaktor SigE wurde als ECF-Sigmafaktor beschrieben. Nach einer gezielten Inaktivierung von *sigE* bei *M. smegmatis* war die Überlebensrate der *sigE*-Mutante nach *in vitro*-Streß wie Hitze oder niedrigem pH-Wert geringer als die des parentalen Wildtyp-Stamms (Wu *et al.* 1997). Es wurde daher weiter untersucht, inwieweit *M. avium* K007 sensitiver für extrazellulären Streß ist als *M. avium* #5-8. Jener Stamm war deutlich sensitiver gegenüber extrazellulärem Streß wie Hitze, niedrigem pH-Wert, H₂O₂ und Detergentien. Besonders bei einer Hitzebehandlung bei 50°C war eine deutliche Verringerung der Überlebensrate *M. avium* K007 gegenüber *M. avium* #5-8 zu beobachten (Abbildung 3.12B). Die in Abbildung 3.13 dargestellten Diagramme zeigen auch für die drei weiteren

untersuchten Streßfaktoren eine abgeschwächte Überlebensrate von *M. avium* K007 gegenüber *M. avium* #5-8.

3.4 Attenuierte Virulenz von *M. avium* K007 gegenüber *M. avium* #5-8 im humanen Makrophagen-Modell (HMDM)

Bislang sind bei virulenten, langsam-wachsenden Mycobakterien noch keine alternativen Sigmafaktoren inaktiviert worden, und es ist auch nicht sehr viel darüber bekannt, welche Gene durch Mitwirkung von SigE exprimiert werden und inwieweit diese für die Virulenz verantwortlich sind. Um die Virulenz bei *M. avium* K007 näher zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein Infektionsmodell mit humanen Makrophagen („HMDM model“) benutzt (Crowle *et al.* 1986). Es wurden dafür humane Makrophagen isoliert und mit einer Infektions-Multiplizität von 10:1 (Bakterien : Makrophagen) wurden 10^6 Makrophagen infiziert. Die Makrophagen reiften vor der Infektion 5-7 Tage in Makrophagen-Medium bei 37°C heran. Es wurden drei Zeitpunkte gewählt, an denen die CFU/ 10^6 Makrophagen bestimmt wurde. Am Tag 0 wurde die Anzahl der Bakterien bestimmt, die erfolgreich von den Makrophagen phagozytiert wurden. Am Tag 1 wurde überprüft, ob die beiden Mycobakterien-Stämme nach der Phagozytose im Makrophagen überleben konnten. Schließlich wurde am Tag 5 überprüft, ob sich die Mycobakterien-Stämme in den Makrophagen vermehren konnten. In Abbildung 3.14 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt. Den Ergebnissen ist zu entnehmen, daß die CFU-Werte bei beiden *M. avium* Stämme am Tag 1 nach der Infektion gegenüber den Werten am Tag 0 konstant blieben. Jedoch konnte man am Tag 5 beobachten, daß der CFU-Wert für *M. avium* #5-8 zugenommen hatte, wohingegen der CFU-Wert für *M. avium* K007 kaum zunahm. Dieser Unterschied war signifikant (t-Test; $p < 0,05$).

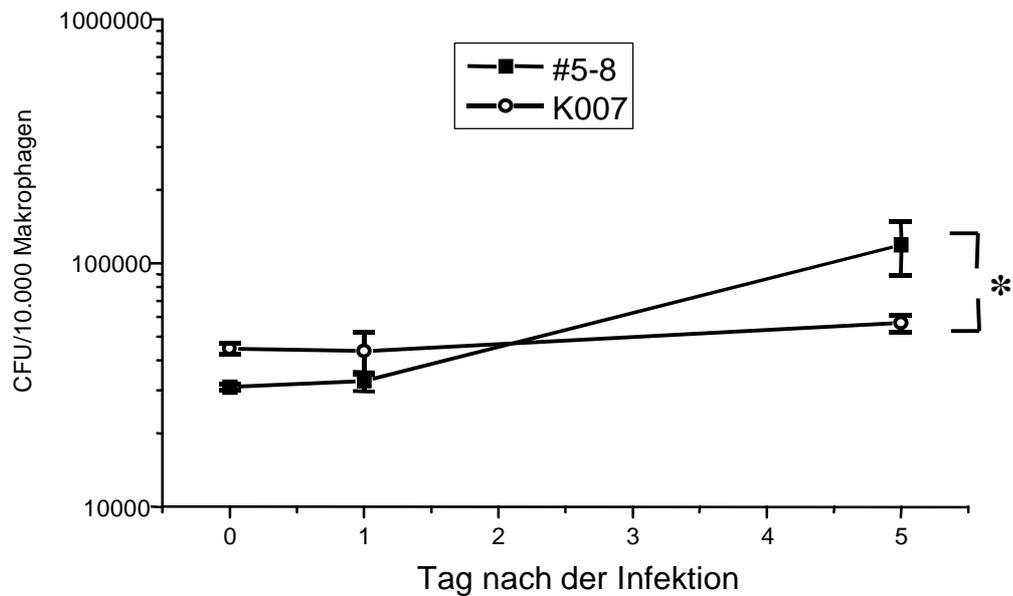


Abbildung 3.14: Überlebensrate von *M. avium* #5-8 und *M. avium* K007 nach Infektion von humanen Makrophagen. Mit einer Infektions-Multiplizität (MOI) von 10:1 wurden jeweils 10^6 Makrophagen mit den beiden Stämmen infiziert. Nach Tag 0, 1 und 5 wurden die Makrophagen lysiert und die CFU bestimmt. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichung ($n = 4$). Bei dem mit Stern markierten Tag 5 waren die CFU von *M. avium* K007 und *M. avium* #5-8 signifikant unterschiedlich (t-Test; $p < 0,05$).

3.5 Konstruktion eines aminoterminalen Mig-His₆-Fusionsproteins

Um die biochemischen Eigenschaften von Mig aufzuklären, sollte das Protein aufgereinigt werden. Das Protein Mig zeigt große Homologien zu Acyl-CoA-Synthetasen (Plum *et al.* 1997), weshalb das aufgereinigte Protein auf diese Aktivität hin getestet werden sollte. Da es sich bei *mig* um ein Makrophagen-induziertes Gen handeln soll (Plum und Clark-Curtiss 1994), ist es schwierig, das Genprodukt direkt aus *M. avium* zu isolieren (Plum, unveröffentlicht). Aus diesem Grund wurde Mig im Hinblick auf eine Anreicherung als aminoterminales His₆-Fusionsprotein heterolog in *E. coli* exprimiert.

Für die His₆-Fusion wurde der ORF von *mig* aus dem Genom von *M. avium* #5-8 mittels PCR unter Benutzung der Oligonukleotide MIGHISFW und MIGHISRW amplifiziert. Die Positionen der Oligonukleotide waren so gewählt, daß ein PCR-Produkt entstand, auf dem neben dem ORF 1 auch der ORF 3 (Abbildung 3.16) lag. Das Oligonukleotid MGHISFW lag außerdem so, daß das potentielle Signalpeptid deletiert wurde (Plum *et al.* 1997). An den 5'-Enden von MIGHISFW und MIGHISRW befanden sich Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Pst*I, so daß das circa 1,7 kb große PCR-Produkt direktional in pQE10 (Qiagen) inseriert werden konnte (pHis5). Das Plasmid pQE10 enthält einen IPTG-induzierbaren *lac*-Promotor, stromabwärts eine „Shine-Delgarno“-Sequenz mit ATG-Startcodon und sechs anschließenden Histidin-Codons, wodurch nach Fusion mit dem *mig*-ORF ein Mig-His₆-Fusionsprotein exprimiert werden konnte. Um Fehler bei der PCR auszuschließen, wurde das inserierte PCR-Produkt von pHis5 an jeder Stelle mindestens dreimal sequenziert. Die Sequenzierung belegte zudem, daß die Fusion des auf dem Plasmid pQE10 befindlichen Startcodons und der sechs Histidin-Codons mit dem ORF 1 von *mig* tatsächlich stattgefunden hatte. Die DNA-Sequenz dieser Sequenzierung wurde mit der von Plum *et al.* (1997) veröffentlichten Sequenz („GenBank-Accession“-Nummer U43598) mit dem Programm „BLAST 2 SEQUENCES“ verglichen. Hier zeigte sich, daß die beiden Sequenzen bis auf eine Deletion bei der Nukleotid-Position 1323 übereinstimmten. Dem PCR-Produkt fehlte an dieser Stelle die Base Cytosin, so daß ein Leserahmensprung entstand, der die von Plum *et al.* (1997) veröffentlichten ORFs 1 und 3 miteinander fusionierte. Hierdurch entstand ein 550 Aminosäuren kodierender ORF, im weiteren mit ORF_{*mig*} bezeichnet. Das errechnete Molekulargewicht des Genproduktes lag bei 58,6 kDa, so daß für die Überexpression in *E. coli* ein circa 60 kDa großes Genprodukt zu erwarten war. Die Überexpression wurde im *E. coli* Stamm MI5 durchgeführt. Das Mig-Fusionsprotein konnte aus dem Zell-Lysat durch Verwendung einer Säule mit Ni-NTA-Superflow (Qiagen) nativ

gereinigt werden. Die Eluate wurden anschließend auf einem 10 %igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (Abbildung 3.15A). Auf dem Gel war bei einer Größe von 60 kDa eine deutliche Bande in den Elutions-Fraktionen zu sehen. Dies entsprach dem nach der DNasequenzierung von ORF_{mig} berechneten Molekulargewicht. Auf dem Gel waren bei Fraktion 1 und 4 besonders nach einer Silberfärbung weitere Banden mit kleineren Molekulargewichten zu beobachten, bei welchen es sich um Abbauprodukte von Mig handeln kann. Es wurde außerdem eine Immunodetektion mit einem spezifischen Antikörper gegen das Mig-Protein gemacht. Wie aus Abbildung 3.15B ersichtlich ist, konnte die 60 kDa große Bande in Fraktion 2 als Mig identifiziert werden. Für die weiteren biochemischen Experimente wurde diese Fraktion verwendet.

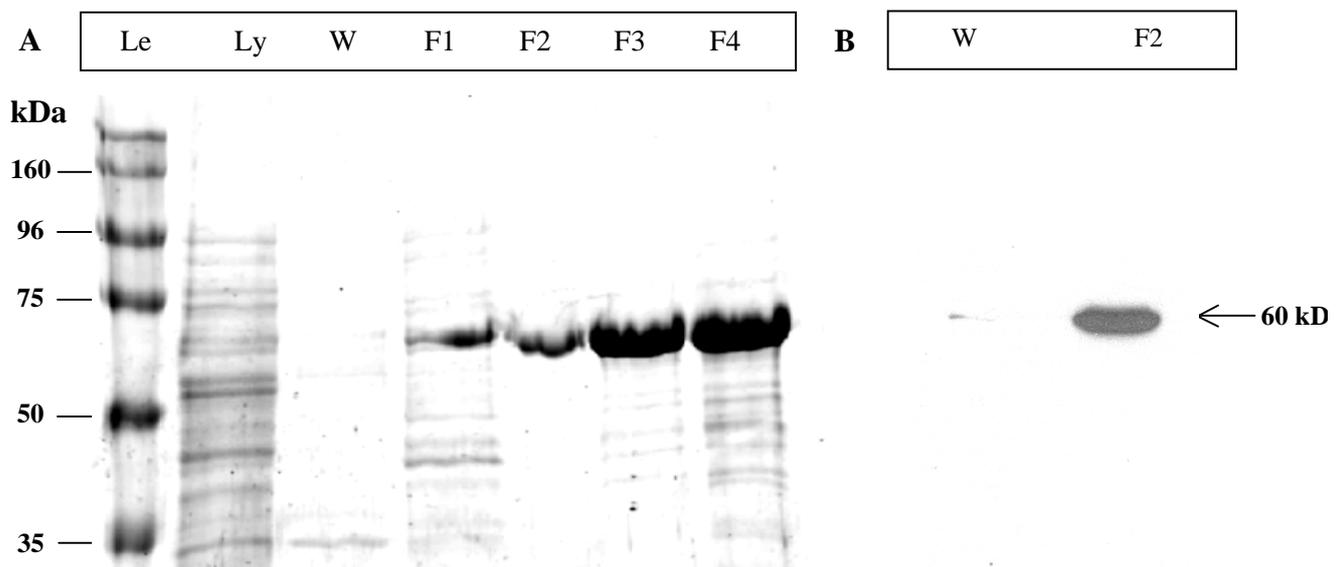


Abbildung 3.15: Überexpression und Reinigung eines aminoterminalen Mig-His₆-Fusionsproteins. A) Fusionsprotein wurde in *E. coli*-M15-Zellen überexprimiert und nach Aufschluß der Zellen durch Affinitätsreinigung mit einer Ni-NTA-Säule (Qiagen) isoliert. Auf das gezeigte 10 %ige SDS-Polyacrylamidgel wurden folgende Proben (20-80 µg Protein) aufgetragen: Le, Molekulargewichtsstandard; Ly, Zell-Lysat; W, Wasch-Fraktion; F1 - 4, Elutions-Fraktionen 1 bis 4. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. B) Immunodetektion von Mig (2 µg) in der Elutions-Fraktion 2 mit einem spezifischen Antikörper gegen Mig (siehe Text). Abgebildet ist der exponierte Röntgenfilm.

3.6 Partielle Amplifikation des *mig*-Gens aus dem Genom der *M. avium*-Stämme A5 und #5-8 und direkte Sequenzierung der PCR-Produkte

Der DNA-Bereich um die Position 1323 wurde aus dem Genom von *M. avium* A5 und #5-8 mittels PCR amplifiziert und direkt sequenziert. Dies geschah, um zu überprüfen, ob die von Plum *et al.* (1997) publizierten offenen Leserahmen ORF 1 und 3 durch einen Sequenzierfehler entstanden sind oder ob der unter 3.5 gefundene ORF_{mig} aufgrund von Fehlern während der PCR-Amplifikation entstanden ist. Für die PCR wurden die Oligonukleotide MIG1005 und MIG1549 und die *Pfu*-DNA-Polymerase benutzt, da diese DNA-Polymerase im Gegensatz zur *Taq*-DNA-Polymerase eine Korrekturlesefunktion hat. Die PCR wurde für jedem Stamm zweimal durchgeführt. Die so gewonnenen PCR-Produkte wurden anschließend direkt dreimal sequenziert, um Sequenzierfehler auszuschließen. Für die Sequenzierungen wurde das Oligonukleotid MIG1005 benutzt. Alle Sequenzierungen wurden miteinander und gegen den gleichen Bereich der von Plum *et al.* (1997) veröffentlichten *mig*-Sequenz („GenBank-Accession“-Nummer U43598) verglichen. In Abbildung 3.16 sind die Bereiche von Nukleotid 1300-1348 der veröffentlichten *mig*-Sequenz und die korrespondierenden Bereiche der hier sequenzierten PCR-Produkte und der Sequenz von ORF_{mig} miteinander verglichen worden. Hieraus wird deutlich ersichtlich, daß im Gegensatz zu der veröffentlichten Sequenz ab der Nukleotid-Position 1320 nicht die Basenfolge CGCCCGA, sondern die Basenfolge CGCCGA folgt. Dieses Ergebnis fundamantiert die unter 3.5 gemachte Annahme, daß es sich bei *mig* um ein Gen handelt, welches für ein Protein mit 550 Aminosäuren kodiert.

A

```

A5      5' -CTGTCGTCGACCATTTGGACGC-CGAGGACGTGGTGCGCACCATCGAG-3'
#5-8    5' -CTGTCGTCGACCATTTGGACGC-CGAGGACGTGGTGCGCACCATCGAG-3'
pHis5   5' -CTGTCGTCGACCATTTGGACGC-CGAGGACGTGGTGCGCACCATCGAG-3'
ORFmig      V V D H L D A E D V V R T I E
U43598    5' -CTGTCGTCGACCATTTGGACGC-CGAGGACGTGGTGCGCACCATCGAG-3'
ORF1      V V D H L D A R G R G A H H R A

```

B

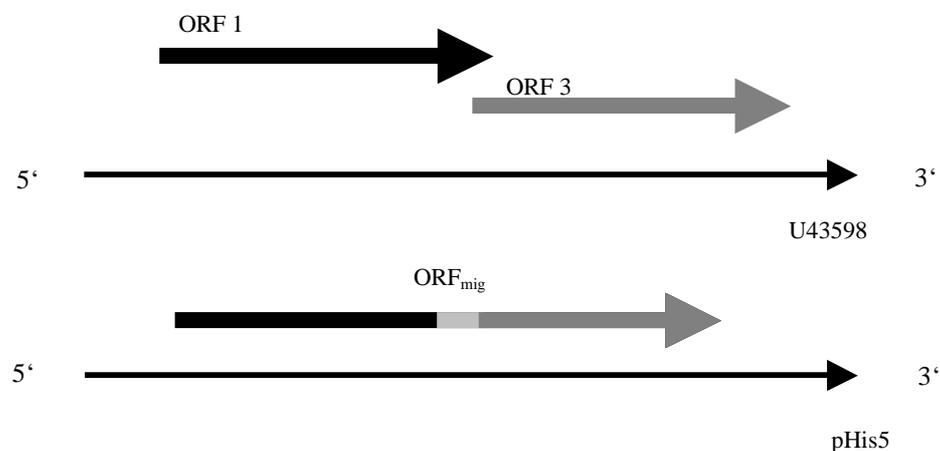


Abbildung 3.16: A) Die DNA-Sequenzen der PCR-Produkte, die mit den Oligonukleotiden MIG1005 und MIG1549 aus *M. avium* A5 und *M. avium* #5-8 amplifiziert wurden und die homologen DNA-Bereiche aus pHis5 und der veröffentlichten Sequenz (Plum *et al.* 1997). Die Deletion ist grau unterlegt, der durch die Deletion hervorgerufene Rasterschub ist unterhalb der Nukleotidsequenz als Aminosäuresequenz dargestellt. Die Teile der Aminosäuresequenzen, die sich bei ORF 1 und ORF_{mig} durch den Rasterschub unterscheiden, sind unterstrichen. B) Die aufgrund der Sequenz U43598 abgeleiteten offenen Leserahmen ORF 1 und ORF 3 und der aus der Sequenzierung von pHis5 hervorgehende ORF_{mig} sind als Schema dargestellt.

3.7 Bestimmung der Größe von Mig mittels Immunodetektion

Um die native Größe von Mig festzustellen, wurde eine Immunodetektion mit einem affinitätsgereinigten Antikörper gegen Mig durchgeführt. Hierfür wurde *M. avium* in 7H9-Medium bis zur stationären Phase angezogen. Die Kulturen wurden danach in frischem 7H9-Medium 1/10 verdünnt und erneut 24 h angezogen. Die pH-Werte wurden auf pH 7,0 oder zur pH-Induktion auf pH 5,0 eingestellt. Diese Mycobakterien-Kulturen und die Kulturen in der stationären Phase wurden aufgeschlossen und die Lysate beziehungsweise die unlöslichen Fraktionen wurden auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und danach einer

Imunodektektion unterzogen. Es ließen sich bei allen Proben deutliche Banden bei 60 kDa detektieren (siehe auch Abbildung 3.17, Spur 1-5). Interessanterweise war Mig bei der Immunodetektion auch dann nachweisbar, wenn die Zellen nicht säureinduziert waren. Das Mig-Protein ist demnach konstitutiv im Lysat und in der unlöslichen Fraktion nachweisbar und bedarf nicht einer Säureinduktion. Es traten bei den unlöslichen Fraktionen neben einer Bande von 60 kDa auch Proteinbanden von geringerer Größe auf (30-35 kDa, siehe *, Abbildung 3.17, Spur 3). Das Experiment wurde mehrmals wiederholt und es traten bei den Wiederholungen immer wieder Banden auf, die kleiner als 60 kDa waren (Detektionen nicht gezeigt). Nach Verwendung eines Lyse-Puffers ohne EDTA konnten auch kleinere Banden in der Lysat-Fraktion beobachtet werden (Abbildung 3.17, Spur 5 und 6). Es handelte sich bei den kleineren Fragmenten wahrscheinlich um Abbauprodukte des eigentlich 58,6 kDa großen Proteins. Auch bei den Immunodetektionen gegen das heterolog exprimierte Mig-His₆-Fusionsprotein aus *E. coli* waren neben einer deutlichen 60 kDa-Bande auch kleinere Protein-Banden zu beobachten (Abbildung 3.17, Spur 1). Dieses deutet daraufhin, daß das Mig-Protein keine große Stabilität besitzt.

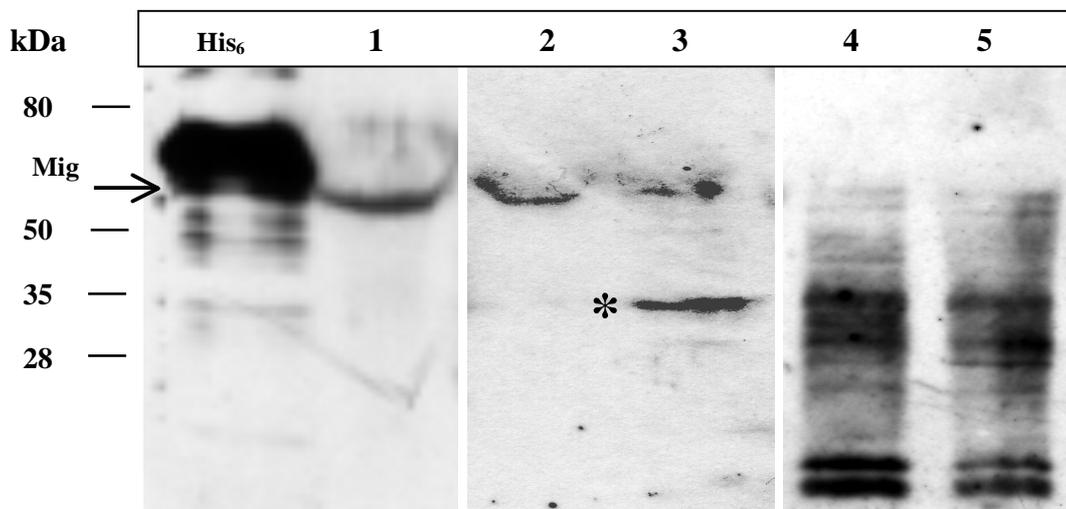


Abbildung 3.17: Immunodetektion von Mig. In den einzelnen Spuren wurden 80 µg Protein (His₆: 10 µg Protein) der folgenden Proben aufgetragen: His₆: gereinigtes Mig-His₆ Fusionsprotein, heterolog in *E. coli* exprimiert; 1, Zell-Lysat von *M. avium* aus stationärer Phase; 2, Zell-Lysat von *M. avium*, angezogen bei pH 7; 3, unlösliche Fraktion aus *M. avium*, angezogen bei pH 7; 4, Zell-Lysat von *M. avium* in stationärer Phase (Zellaufschluß mit Lysis-Puffer ohne EDTA); 5, unlösliche Fraktion aus *M. avium* aus stationärer Phase (Zellaufschluß mit Lysis-Puffer ohne EDTA). *, mögliches 30 kDa-Mig. Die Lysate und unlöslichen Fraktionen von Säure-induzierten *M. avium*-Zellen sind hier nicht dargestellt. Sie hatten das gleiche Banden-Muster wie die bei pH 7 angezogenen Zellen.

3.8. Computer-gestützte Proteinanalyse des 550 Aminosäuren großen Mig-Proteins und Homologievergleiche mit den Datenbanken Swissprot und NCBI

In dieser Arbeit wurde entdeckt, daß Mig ein 550 Aminosäuren großes Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 58,6 kDa ist. Plum *et al.* (1997) gingen bei ihrer Analyse von einem 295 Aminosäuren großen Protein mit kalkuliertem Molekulargewicht von 31,7 kDa aus. Dies erforderte eine erneute Analyse der deduzierten Proteinsequenz. Der mit PROTEAN errechnete Pi-Wert lag bei 5,29. Mit dem Programm SignalP V2.0 wurde die Aminosäure-Sequenz auf ein mögliches Signalpeptid hin untersucht (Nielsen *et al.* 1997 und 1999; Nielsen und Krogh 1998). Für die beiden Programme wurden die 70 aminoterminalen Aminosäuren von Mig benutzt. Mit dem Programm SignalP-NN für Gram-positive Bakterien wurde für die Aminosäuren 1 - 19 eine Wahrscheinlichkeit für eine Signalsequenz von 0,565 (Grenzwert: 0,44) errechnet. Dieses Programm bestimmt als wahrscheinlichen Ort für eine Abtrennung der Signalsequenz durch die Signalpeptidase die Aminosäuren 19 und 20 (VAA-A). Mit dem Programm SignalPHMM wurde eine Wahrscheinlichkeit von 0,602 (Grenzwert: 0,4) für ein Signalpeptid an dieser Position errechnet. Mig scheint somit ein Signalpeptid zu besitzen. Mit dem Programm PROTEAN wurde ein Hydrophilizitätsprofil mittels des Kyte & Doolittle-Plots berechnet. Mig hat hiernach über das ganze Protein verteilt ausgedehnte hydrophobe Sequenzen (Abbildung 3.18). Die großen hydrophoben Abschnitte lassen vermuten, daß es sich bei Mig um ein membranassoziiertes Protein handelt. Um dies weiter zu analysieren, wurden die Programme TMpred und TopPred2 zur Vorhersage von Transmembranregionen und das Programm Psort zur Vorhersage der zellulären Lokalisation des Proteins benutzt.

Tabelle 3.1: TMpred- (A) und TopPred2-Vorraussage (B) von Transmembranregionen und deren relativer Orientierung (o-i: von außen nach innen; i-o: von innen nach außen).**A**

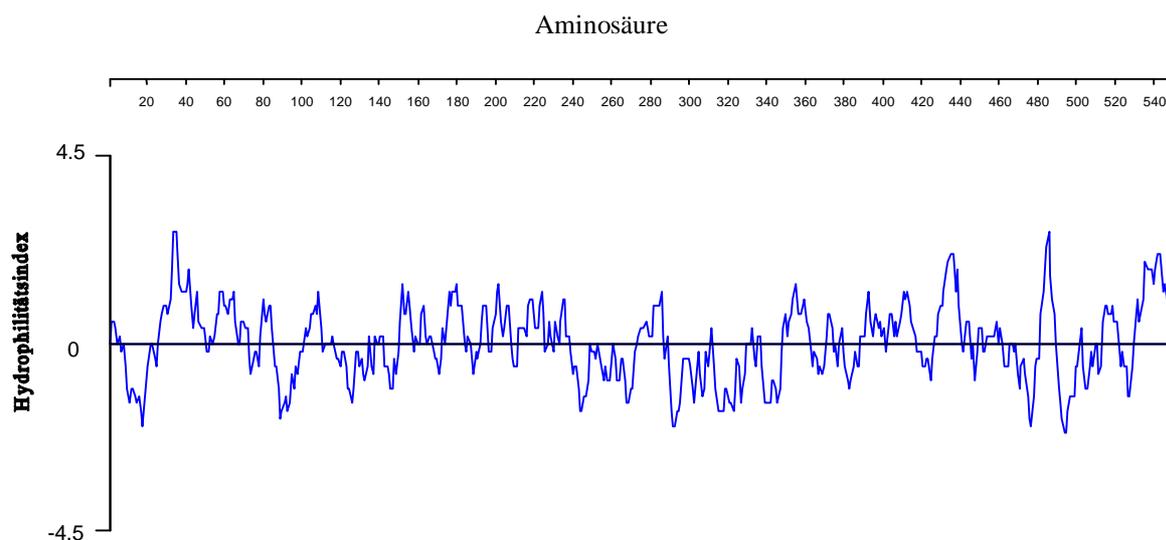
Transmembranregion	von / bis (Aminosäure-Positionen)	Wert (Grenzwert: 500)	Orientierung
Region 1	84 - 103	653	o-i
Region 2	245 - 267	889	i-o
Region 3	309 - 330	980	o-i

B

Transmembranregion	von / bis (Aminosäure-Positionen)	Wert (Grenzwert: 0,6)
Region 1	251 - 271	1,392
Region 2	311 - 331	1,070
Region 3	354 - 374	0,768

Das Programm Psort gab als Vorraussage für die Lokalisation von Mig die Zellmembran an und errechnete eine Transmembranregion zwischen den Aminosäuren 290 und 306. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, daß es sich bei Mig um ein Membranprotein handelt.

Um die Funktion von Mig näher bestimmen zu können, wurde die Proteinsequenz mit Proteinen aus zwei Datenbanken verglichen. Zunächst wurde Mig mit dem Programm ScanProsite auf Sequenzabschnitte untersucht, die bei bereits charakterisierten Proteinen oder Enzymgruppen konserviert sind. Als einziges Motiv wurde eine AMP-Bindedomäne, die sich

**Abbildung 3.18:** Hydrophilizitätsplot des Mig-Proteins nach Kyte & Doolittle unter Benutzung des Programms PROTEAN.

von den Aminosäuren 186-197 erstreckt (VLYTGGTTGMPK), gefunden. Dieses Motiv tritt bei Enzymen auf, die als CoA-Synthetasen bekannt sind, wie zum Beispiel Acyl-CoA- oder Peptidsynthetasen. Daraufhin wurde mit den BLAST-Programmen des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) nach Sequenzhomologien gesucht. Es traten gehäuft Homologien zu CoA-Ligasen für langkettige Fettsäuren und Peptid-Synthetasen auf, die alle ein AMP-Bindemotiv besitzen. Auffällig war die Homologie (41 % Identität) zu dem Protein FadD19 von *M. tuberculosis* (Cole *et al.* 1998), das mit FadD von *E. coli* verwandt ist (Fulda *et al.* 1994; Kameda und Nunn 1981). Sequenzhomologievergleiche sind mit dem Programm ClustlW gemacht worden und im Anhang C und D dargestellt. Beide Proteine sind CoA-Synthetasen für langkettige Fettsäuren (*E. coli*) oder werden als solche postuliert (*M. tuberculosis*). Alle drei Proteine besitzen an homologen Stellen eine Domäne, die als AMP-Bindungs-Motiv bekannt ist. Außerdem haben die langkettigen Fettsäure-CoA-Synthetasen mit 549 (FadD19) beziehungsweise 561 Aminosäuren (FadD) eine ähnliche Größe wie Mig (550 Aminosäuren). Hieraus wird geschlossen, daß Mig eine Acyl-CoA-Synthetase für langkettige Fettsäuren ist.

3.9. Biochemische Charakterisierung von Mig als Acyl-CoA-Synthetase

Acyl-CoA-Synthetasen sind Enzyme, die ATP für ihre Katalyse benötigen. Durch den Verbrauch von ATP und die Bildung von AMP bieten sich biochemische Methoden an, um die Ligation von CoA an unterschiedliche Fettsäuren als Substrate zu messen. Hier wurde die von Ziegler *et al.* (1989) publizierte Methode gewählt. Es wurden unterschiedliche Fettsäuren als Substrate eingesetzt. Die Konzentration der eingesetzten Substrate war abhängig von der Löslichkeit der entsprechenden Fettsäure im Reaktionsgemisch und lag zwischen 2 und 10000 μM . Es wurden zunächst nur gesättigte Fettsäuren getestet. Hier konnte keine Aktivität für Essigsäure ($\text{C}_{2:0}$) und Butansäure ($\text{C}_{4:0}$) gemessen werden. Die Aktivitäten lagen unterhalb der Hintergrundaktivität, bei der entweder nur Mig oder nur das Substrat in die Testreaktion eingesetzt wurde. Eine sehr schwache Aktivität konnte bei Pentansäure ($\text{C}_{5:0}$) gemessen werden; hier lag die Aktivität bei $8,4 \text{ nMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ Mig}$. Deutlich größere Aktivitäten waren bei den Fettsäuren zu messen, die zwischen einer Länge von $\text{C}_{6:0}$ bis $\text{C}_{14:0}$ lagen. Die größte Aktivität wurde bei Dekansäure ($\text{C}_{10:0}$) mit einer Aktivität von $497 \text{ nMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ Mig}$ bei einer Substratkonzentration von 5 mM gemessen (siehe Tabelle 3.2).

Für gesättigte Fettsäuren mit einer Länge von mehr als zehn C-Atomen konnten für die Messungen nur Konzentrationen unter 1 mM eingesetzt werden. Für Fettsäuren bis zur Tetradekansäure ($C_{14:0}$) konnten aber auch bei niedrigeren Konzentrationen Aktivitäten bestimmt werden, die deutlich über der Hintergrundaktivität lagen. Keine Aktivität konnte für die Palmitinsäure ($C_{16:0}$) gemessen werden; hier wurden Palmitinsäure Konzentrationen bis zu $200\ \mu\text{M}$ eingesetzt. Es konnte auch keine Bildung von Palmityl-CoA mit der HPLC nachgewiesen werden. Es wurde darauf verzichtet, längererkettige Fettsäuren zu untersuchen, da eine deutliche Abnahme der Aktivitäten von der Dodekansäure ($C_{12:0}$) bis zur Palmitinsäure ($C_{16:0}$) gemessen wurde. Mig scheint hauptsächlich nur mittellange Fettsäuren, deren Größen von der Butansäure ($C_{4:0}$) bis zur Myristinsäure ($C_{14:0}$) reichen, mit CoA zu ligieren.

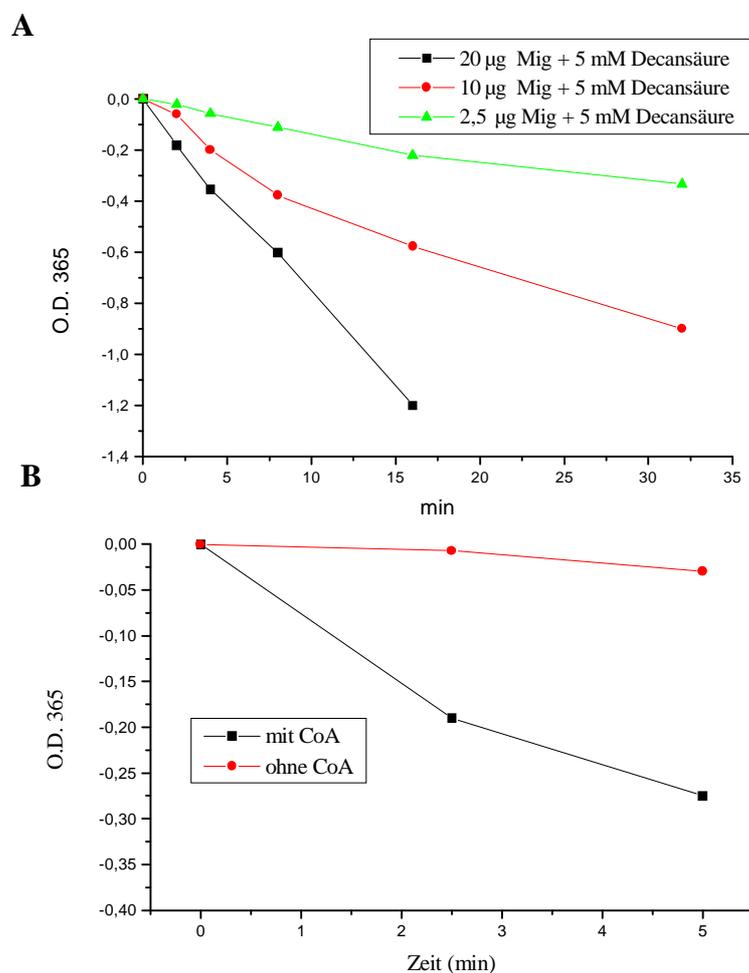


Abbildung 3.19: A) CoA-Ligase-Aktivität von Mig in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration. Es wurden 5 mM Decansäure und 5, 10 und 20 µg Mig eingesetzt. B) CoA-Ligase-Aktivität von Mig in Abhängigkeit von CoA. Es wurden 5 mM Dekansäure als Substrat eingesetzt.

Tabelle 3.2: CoA-Ligase-Aktivitäten von Mig mit unterschiedlichen gesättigten Fettsäuren bei der Verwendung des CoA-Ligase-Tests nach Ziegler *et al.* 1989

Substrat	Konzentration (μM)	Aktivität ($\text{nMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ Mig}$)	Standardabweichung ($\text{nMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ Mig}$)
Ethansäure (C _{2:0})	5000	0	0
Butansäure (C _{4:0})	5000	0	0
Pentansäure (C _{5:0})	5000	8	2,5
Hexansäure (C _{6:0})	5000	175	4,5
Heptansäure (C _{7:0})	5000	170	3,0
Oktansäure (C _{8:0})	5000	155	2,5
Dekansäure (C _{10:0})	5000	497	8,5
Dodekansäure (C _{12:0})	100	153	28
Tridekansäure (C _{13:0})	100	73	6
Tetradekansäure (C _{14:0})	100	19	0,5
Palmitinsäure (C _{16:0})	200	0	0

Es mußte nun überprüft werden, ob die Aktivitäten in diesem Test tatsächlich durch die von Mig katalysierte Ligation eines CoA-Moleküls an eine Carboxylgruppe der Fettsäuren stammte. Hierfür wurde die Abhängigkeit der in diesem Test gemessenen Aktivität von CoA und der Konzentration von Mig überprüft. Zunächst wurden absteigende Konzentrationen von Mig eingesetzt. Es zeigte sich eine Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Proteinkonzentration (Abbildung 3.19A). Ebenfalls konnte nur eine Aktivität gemessen werden, wenn im Testansatz CoA vorhanden war (Abbildung 3.19B). Beide Untersuchungen zeigen, daß die mit diesem Test gemessenen Aktivitäten von der Mig-Konzentration und der Anwesenheit von CoA abhängig sind.

Anschließend sollte untersucht werden, inwieweit sich Mig als Fettsäure-Acyl-CoA-Synthetase mit der Michaelis-Menten-Kinetik charakterisieren läßt. Hierfür wurden drei Fettsäuren (Oktansäure, Dekansäure und Dodekansäure) als Substrate in unterschiedlichen Konzentrationen in den CoA-Aktivitäts Test eingesetzt. Alle drei Substrate folgten der Michaelis-Menten-Kinetik. Exemplarisch ist in Abbildung 3.20 die Michaelis-Menten-Kinetik für die Messung mit Dekansäure als Substrat wiedergegeben.

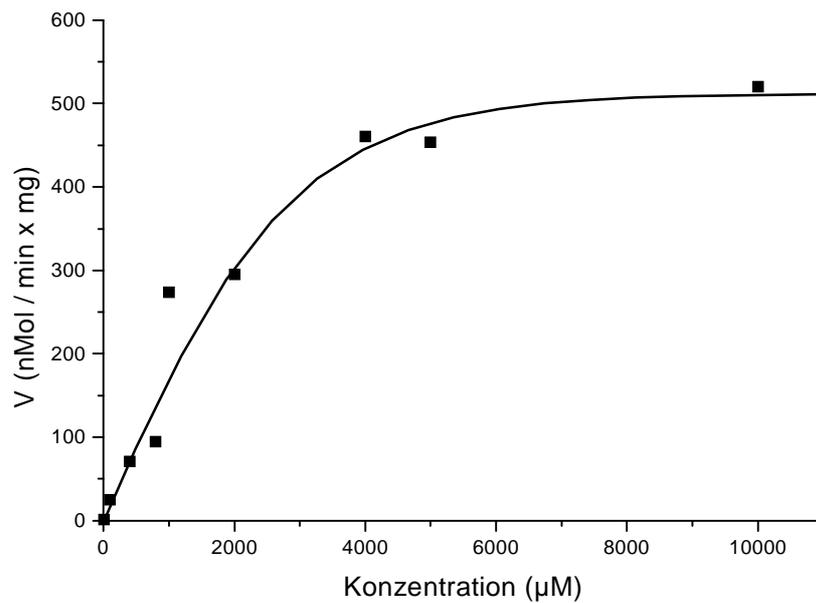


Abbildung 3.20: Michaelis-Menten-Kinetik des Mig-Proteins, exemplarisch mit der gesättigten Fettsäure Dekansäure als Substrat dargestellt.

In Tabelle 3.3 sind die für die obengenannten Fettsäuren errechneten K_m - und V_{\max} -Werte aufgeführt. Es zeigte sich hier, daß Mig zu der Dekansäure die geringste Affinität von den obengenannten Fettsäuren hatte, jedoch den höchsten V_{\max} Wert. Es wurden ebenfalls die K_m Werte für ATP und CoA ermittelt.

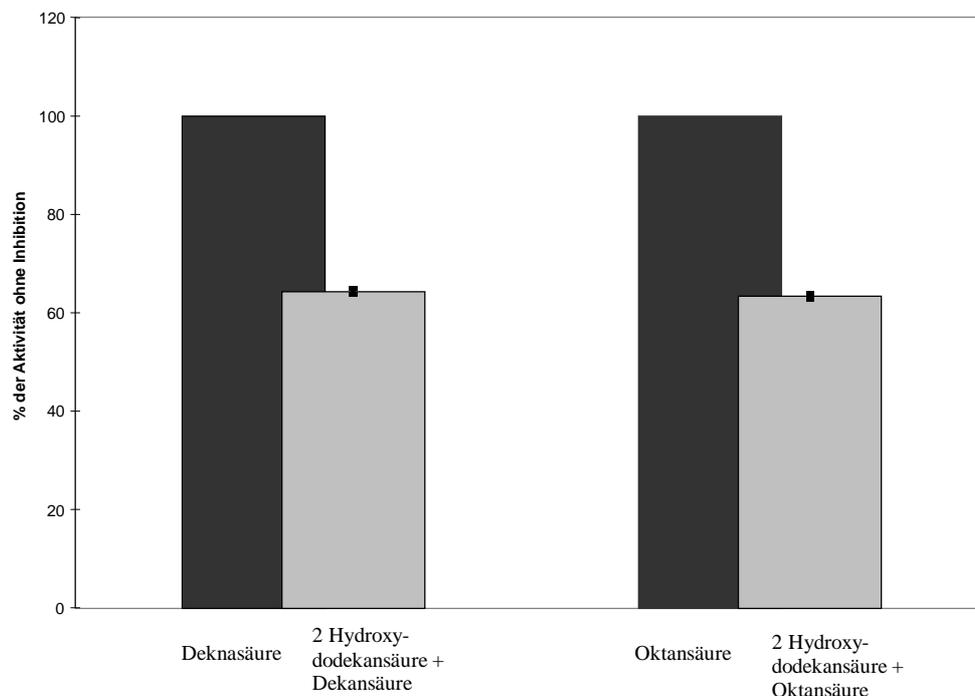


Abbildung 3.21: Inhibition der Acyl-CoA-Ligase-Aktivität durch Präinkubation mit 2-Hydroxydodekansäure. Es wurden die Fettsäuren Octansäure und Dodekansäure (100 μM) eingesetzt.

Tabelle 3.3: Biochemische Charakterisierung von Mig als Acyl-CoA-Ligase unter Verwendung der Fettsäuren Oktansäure, Dekansäure und Dodekansäure. Es wurden außerdem die Affinitäten von ATP und CoA zu Mig bestimmt.

ermittelter Wert	ATP/ CoA	Oktansäure (C _{8:0})	Dekansäure (C _{10:0})	Dodekansäure (C _{12:0})
K_m (μM)	36/ 45	285	1775	20
V_{max} (nMol x min ⁻¹ x mg ⁻¹)	-	183	510	163
Wechselzahl (min ⁻¹)	-	11	30	10

Kasuya *et al.* 1999 berichteten davon, daß sich Acyl-CoA-Ligasen, die aus der Niere von Mäusen isoliert wurden, durch 2-Hydroxydodekansäure inhibieren lassen. Auch bei Mig wurde durch Präinkubation mit dieser Substanz eine geringere Aktivität gemessen. Dies war sowohl für Oktansäure als auch für Dodekansäure der Fall; dies spricht für eine Hemmung durch 2-Hydroxydodekansäure. In den Tests wurde Mig mit 100 μM 2-Hydroxydodekansäure 15 Minuten präinkubiert; danach wurde die CoA-Ligase-Aktivität mit 100 μM Oktansäure beziehungsweise 100 μM Dodekansäure als Substratkonzentration gemessen. Die CoA-Ligase-Aktivitäten sanken hier mit beiden Fettsäuren als Substrat auf 64 % der Aktivität, die mit Mig ohne die Präinkubation mit 2-Hydroxydodekansäure gemessen wurden. Die 2-Hydroxydodekansäure alleine ist kein Substrat für die Acyl-CoA-Ligase Mig (Abbildung 3.21).

Es ist bekannt, daß Fettsäure-Acyl-CoA-Synthetasen neben gesättigten Fettsäuren auch andere Carbonsäuren wie Phenyllessigsäure oder aber auch ungesättigte Fettsäuren wie die Arachidonsäure mit CoA ligieren (Kasuya *et al.* 1999, Fernandez-Valverde *et al.* 1993). Hier wurden einige Verbindungen als Substrate für Mig getestet (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: CoA-Ligase-Aktivitäten von Mig mit unterschiedlichen Carbonsäuren als Substrat.

Substrat	Konzentration μM	Aktivität $\text{nMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}\text{Mig}$	Standardabweichung $\text{nMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}\text{Mig}$
Benzoessäure	2000	11,60	0,16
Pimelinsäure	2000	2,76	0,04
2-Amino-Benzoessäure	2000	7,18	0,10
m-Hydroxy-Benzoessäure	2000	3,86	0,06
Phenyllessigsäure	2000	0,00	0,00
2,3-Dihydroxybenzoessäure	2000	0,00	0,00
Arachidonsäure ($\text{C}_{20:4}$)	10	25,65	4,94
Linolensäure ($\text{C}_{18:3}$)	30	41,18	11,76
Ölsäure ($\text{C}_{18:1}$)	30	111,76	11,76

Wie in Tabelle 3.4 ersichtlich, hatten besonders die langkettigen, ungesättigten Fettsäuren Liolensäure, Arachidonsäure und Ölsäure als Substrate für Mig deutliche CoA-Ligase-Aktivitäten. Aber auch die anderen Substrate, zum Beispiel Benzoessäure, wurden von Mig mit CoA ligiert. Bei den Substraten Phenyllessigsäure und 2,3-Dihydroxybenzoessäure war keine Aktivität meßbar. Mig scheint damit nicht nur gesättigte Fettsäuren mit einer Länge von $\text{C}_{5:0}$ bis $\text{C}_{14:0}$ umzusetzen, sondern auch längerkettige, ungesättigte Fettsäuren wie Arachidonsäure ($\text{C}_{20:4}$) und Linolensäure ($\text{C}_{18:3}$). Keine Aktivität zeigte Mig, wenn Aminosäuren als Substrate eingesetzt wurden. Die unter 3.8 erwähnten Homologien von Mig zu den Peptidsynthetasen beruhen daher wahrscheinlich auf den Homologien, die adenylylierende Domänen von Acyl-CoA-Ligasen und Peptidsynthetasen haben.

3.10 Der 30 kDa große Aminoterminus des Mig-Proteins besitzt keine Aktivität als Acyl-CoA-Synthetase

Bei den in den Immunodetektionen (Abbildung 3.17) aufgetretenen circa 30 kDa großen Banden wurde angenommen, daß es sich um Abbauprodukte von Mig handelt. Deshalb sollte untersucht werden, ob ein circa 30 kDa großes, aminotermiales Mig-Derivat noch eine Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität besitzt. Es galt auch zu untersuchen, ob das von Plum *et al.* 1997 propagierte Mig-Protein noch eine Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität aufweist. Hierfür wurde das Plasmid pHis5 mit den Restriktionsendonukleasen *AscI* und *PstI* behandelt und der für den carboxyterminalen Bereich des Mig-Proteins kodierende Abschnitt deletiert. Das Plasmid wurde anschließend nach einer Behandlung mit der T4-DNA-Polymerase religiert (pHis9). Da pHis9 als pQE10-Derivat stromabwärts des neu entstandenen ORFs in allen 3 Leserahmen Stop-Codons besitzt, ist das carboxyterminale Ende des neu entstandenen Leserahmens terminiert. Hierdurch kodiert dieser ORF für ein circa 31 kDa großes Protein. Die Konstruktion dieses Plasmides wurde durch Sequenzierung des mutagenisierten Bereiches verifiziert.

Nach der Überexpression in *E. coli* war eine Reinigung dieses Proteins durch die Bildung von Einschlußkörpern erschwert. In einer Immunodetektion mit einem His₆-spezifischen Antikörper konnte nach Aufschluß der Zellen eine deutliche Bande mit einem Molekulargewicht von circa 30 kDa in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen werden (Abbildung 3.22B). Nur ein schwaches Signal war in der löslichen Fraktion beziehungsweise nach der Anreicherung über eine Ni-NTA-Superflow-Säule im Eluat nachzuweisen (Abbildung 3.22A). Aus einem Liter induzierter Zellen konnten nur 200 µg Mig-Protein isoliert werden. Dies war auch nur dann der Fall, wenn die IPTG-Konzentration für die Induktion des *lac*-Promotors gegenüber dem unter 2.2.25 angegebenen Wert auf 100 µM gesenkt und die Zeit für die Überexpression auf 2 h beschränkt wurde. Das isolierte, circa 30 kDa große Mig-Protein zeigte mit keinem der unter 3.9 getesteten Substrate eine Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität.

Da bei der Überexpression des 31 kDa Mig-Proteins Einschlußkörper entstanden, ist auch eine Fehlfaltung des im Lysat gelösten Proteins nicht ausgeschlossen. Um eine Inaktivität des Proteins auszuschließen, sollte ein weiteres Mig-His₆-Derivat getestet werden, das keine Einschlußkörper bei der Überexpression bildet. Hierfür wurde ein carboxyterminales Mig-His₆-Fusionsprotein benutzt, das auf dem Plasmid pGPC150 kodiert ist und in dem *E. coli*-Stamm M15 überexprimiert werden kann (Plum *et al.* 1997). Dieses Fusionsprotein ließ sich

nach seiner Anreicherung aus dem Zell-Lysat als ein circa 27 kDa großes Protein auf einem SDS-Polyacrylamidgel detektieren (Abbildung 3.22C). Aber auch dieses Protein zeigte keine Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität mit den unter 3.9 getesteten Substraten. Es läßt sich festhalten, daß ein circa 30 kDa großes Mig-Derivat keine aktive Acyl-CoA-Synthetase ist.

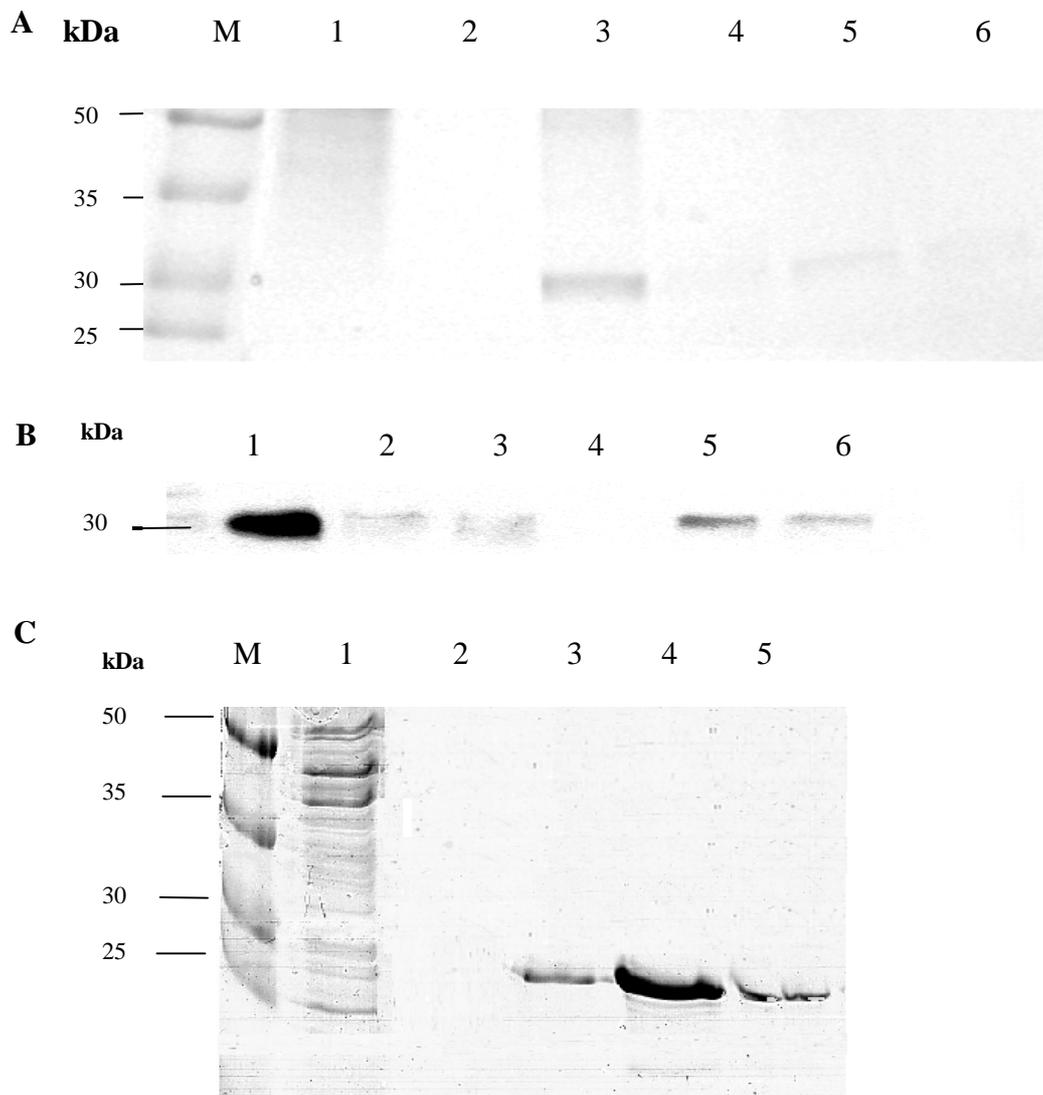


Abbildung 3.22: A) Überexpression eines 31 kDa aminoterminalen Mig-His₆-Fusionsproteins (pHis9) in *E. coli* M15. Folgende Proben (20 µg Protein) wurden auf das dargestellte 12 %ige SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen: M, Protein-Größenstandard; 1, Lysat; 2, Wasch-Fraktion; 3-6, Eluat-Fraktionen 1-4. B) Immunodetektion mit einem MRGS^{His}-Antikörper (Qiagen). Es wurden circa 20 µg Protein folgender Proben eingesetzt: 1, unlösliche Fraktion; 2, Lysat; 3, Durchlauf-Fraktion; 4, Wasch-Fraktion; 5-6, Eluat-Fraktionen 1 und 4. C) Überexpression eines carboxyterminalen Mig-His₆-Fusionsproteins (pGPC150) in *E. coli* M15. Folgende Proben (20 µg Protein) wurden auf das dargestellte 15 %ige SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen: M, Protein-Größenstandard; 1, Lysat; 2, Wasch-Fraktion; 3-5, Eluat-Fraktionen 1-3.

3.11 Expression von Mig und Charakterisierung der Stärke des *mig*-Promotors in *M. smegmatis*

Um die Funktion von Mig in Mycobakterien zu charakterisieren, wurde Mig in der schnellwachsenden und avirulenten Art *M. smegmatis* exprimiert. Über Southern-Untersuchungen wurde kein zum *mig*-Gen homologes Gen in *M. smegmatis* identifiziert (Plum, persönliche Mitteilung). Die Expression von Mig in *M. smegmatis* (pGPC200) verhalf dieser Art zu einer erhöhten Überlebensrate im Makrophagen-Infektionsmodell; in *M. smegmatis*/pGPC200 wird das Protein Mig konstitutiv exprimiert (Plum *et al.* 1997). In dieser Arbeit sollte der Einfluß einer Expression von Mig in *M. smegmatis* auf die Überlebensrate unter der Einwirkung der gesättigten Fettsäure Dekansäure untersucht werden. Als negative Kontrolle wurde *M. smegmatis*/pJC86 benutzt. Dieses Plasmid ist der Ausgangsvektor von pGPC200 ohne das *mig*-Gen. Es war bekannt, daß Dekansäure bakteriozid auf Gram-positive Bakterien wie Streptomyceten wirken kann (Banchio und Gramajo 1997). Hier konnte gezeigt werden, daß Dekansäure für die Arten *M. avium* und

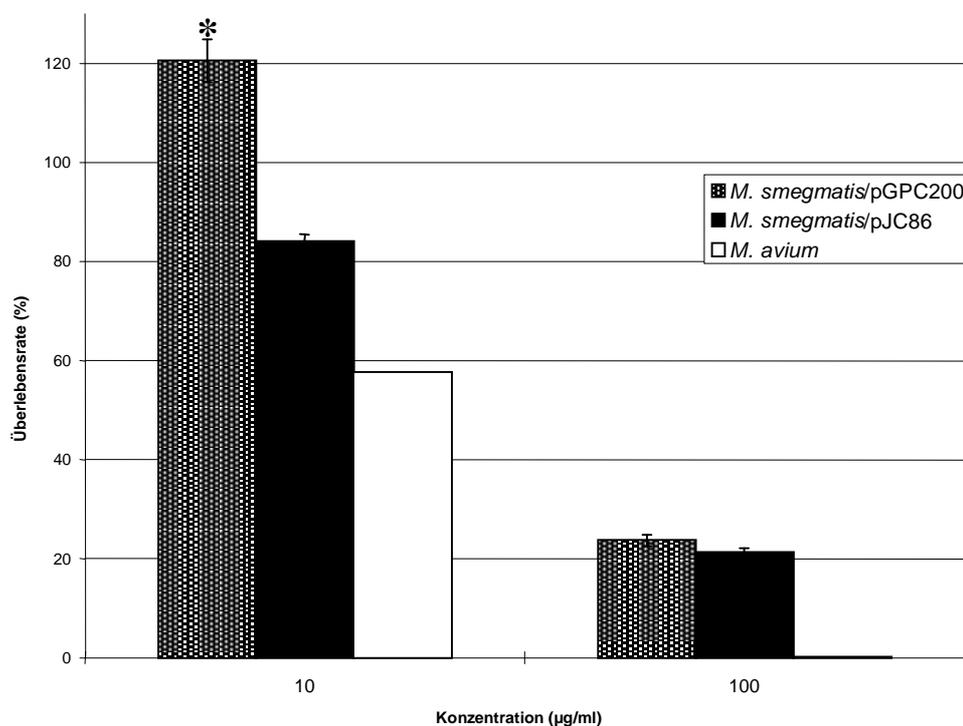


Abbildung 3.23: Überlebensrate von *M. smegmatis* und *M. avium* auf 7H10-Platten mit unterschiedlichen Dekansäure-Konzentrationen. Bei 10 µg/ml Dekansäure war die Expression von Mig in *M. smegmatis* (*M. smegmatis*/pGPC200) gegenüber dem Wildtyp (*M. smegmatis*/pJC86) mit einer erhöhten Überlebensrate verbunden. (*; t-Test $p < 0,05$). Als 100 % wurde die Überlebensrate von *M. smegmatis* und *M. avium* auf 7H10-Platten ohne Dekansäure gesetzt. Die Überlebensrate von *M. avium* lag bei 100 µg/ml Dekansäure bei nur 0,22 %. $n = 3$ (Anzahl der Experimente).

M. smegmatis toxisch ist. Die Überlebensrate von *M. smegmatis*/pGPC200 war bei einer Dekansäure-Konzentration von 10 µg/ml signifikant ($p < 0,05$) höher als von *M. smegmatis*/pJC86 (Abbildung 3.23). Dagegen war der Unterschied bei 100 µg/ml Dekansäure nicht mehr signifikant. Interessanterweise ist *M. avium* gegenüber den bakterioziden Effekten der Dekansäure deutlich sensitiver als *M. smegmatis*. Trotzdem führt die heterologe Expression von Mig zu einer erhöhten Überlebensrate bei *M. smegmatis*.

Im weiteren wurde untersucht, inwieweit der *mig*-Promotor von unterschiedlichen Fettsäuren induziert werden kann. Ein Einfluß von Fettsäuren auf die *mig*-Promotor-Aktivität kann angenommen werden, da die Regulation der Fettsäure-Synthese und des Fettsäure-Abbaus bei anderen Bakterien von der Konzentration der extrazellulären Fettsäuren abhängig ist (Zusammenfassungen bei DiRusso und Black 1999; Faergeman und Knudsen 1997). Die Untersuchungen wurden in dieser Arbeit mit *M. smegmatis* und unter Verwendung der bakteriellen Luziferase durchgeführt. Das Plasmid pGPC251 (Plum, unveröffentlicht) wurde für die Messung der *mig*-Promotor-Aktivität benutzt; hier stehen die Luziferase-Gene *luxAB* unter der Kontrolle des *mig*-Promotors. Als negative Kontrolle wurden *M. smegmatis*-Zellen mit dem Plasmid pGPC255 (Plum, unveröffentlicht) angewendet, auf dem nur die promotorlosen Gene *luxAB* lokalisiert sind. Die Luziferase-Aktivität der negativen Kontrolle lag unterhalb von 500 RLU und war damit deutlich geringer als bei *M. smegmatis*/pGPC251 in der stationären Wachstumsphase (77626 RLU). Nach Zugabe der Fettsäuren Dekansäure und Ölsäure beziehungsweise nach Ansäuerung des Mediums auf pH 5,5 und unter oxidativem Streß war die Luziferase-Aktivität leicht, aber nicht signifikant erhöht. Dagegen konnte keine deutliche Veränderung nach Zugabe von Dodekansäure detektiert werden (Tabelle 3.5A). Interessanterweise unterschied sich die Luziferase-Aktivität zwischen der Kontrolle, wobei sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase befanden ($O.D._{600} = 0,4 - 0,6$) und der stationären Phase um den Faktor 2,5 zugunsten der in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Zellen (Tabelle 3.5B).

Tabelle 3.5: A) Luziferase-Aktivität von *M. smegmatis*/pGPC251 nach 4 h Inkubation mit unterschiedlichen Fettsäuren, 10 mM H₂O₂ beziehungsweise bei einem pH-Wert von 5,5. Als Kontrolle wurde *M. smegmatis*/pGPC251 nur in LB-Medium angezogen. B) Luziferase-Aktivität von *M. smegmatis*/pGPC251 in der logarithmischen (log. Phase) und in der stationären Wachstumsphase. Angegeben sind die Mittelwerte aus zwei bis vier unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichung. *) Bei der relativen Aktivität wurden alle Aktivitäten (RLU) auf die Kontrolle bezogen; **) Bei der relativen Aktivität wurden alle Aktivitäten (RLU) auf die Aktivität in der stationären Phase bezogen.

A

Induktion	Luziferase-Aktivität	
	RLU	relative Aktivität ^{*)}
Dekansäure (C _{10:0})	321008,7	1,68
Dodekansäure (C _{12:0})	203788,1	1,07
Ölsäure (C _{18:1})	265424,6	1,39
pH 5,5	235942,5	1,24
H ₂ O ₂	235273,6	1,24
Kontrolle	190534,3	1,00

B

Wachstumsphase	Luziferase-Aktivität (RLU)	relative Aktivität ^{**)}
stationäre Phase (O.D. ₆₀₀ > 1,2)	77626 +/-24989	1,00
Kontrolle (log.-Phase) (O.D. ₆₀₀ : 0,4-0,6)	190534 +/-34819	2,45

3.12 Auffindung von möglichen Transkriptionsfaktoren mit einem bakteriellen „One-Hybrid-System“

Der in der Einleitung beschriebene *mig*-Promotor besitzt neben der erwähnten -10 Region auch mögliche Erkennungsstellen für Transkriptionsfaktoren (Abbildung 1.2). Da für *M. avium* kein Transposon-Mutagenese-System existiert, über das sich Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel Repressoren, für den *mig*-Promotor identifizieren lassen, wurde hier ein bakterielles „One Hybrid System“ benutzt. Zur Durchführung wurden zwei Vektoren unterschiedlicher Inkompatibilitäts-Klassen für *E. coli* verwendet. Bei einem der Vektoren war der *mig*-Promotor mit einem stromabwärts gelegenen Reporter-gen (*gfp* oder *lacZ*) fusioniert, durch den zweiten Vektor konnte ein Gen für einen möglichen Transkriptionsfaktors exprimiert werden. Die Expression dieses Transkriptionsfaktor sollte die Promotor-Aktivität in *E. coli* modifizieren, was über die Konzentration des Reporterproteins detektiert werden konnte.

Für die Messung der Stärke des *mig*-Promotors mit einem Reporter-gen wurde das Plasmid pBBR1MCS ausgewählt (Kovach *et al.* 1994). Der Replikationsursprung dieses Plasmides ist mit dem ColE1-Ursprung kompatibel. So konnte *E. coli* mit diesem Plasmid und einer *M. avium*-Cosmid-DNA-Bibliothek oder einer DNA-Bibliothek in einem Expressionsvektor cotransformiert werden. Das Gen für das GFP-Protein stammte aus dem Plasmid pGPC260 (Thilo, unveröffentlicht); es handelte sich dabei um das GFPmut3.

Zunächst wurde das *gfp*-Gen in den Vektor pBBR1MCS inseriert, hierfür wurden pBBR1MCS und pGPC260 mit *SacII* und *HindIII* restringiert und *gfp* in pBBR1MCS inseriert (pGFP). Die Orientierung des *gfp*-ORFs war der Orientierung des *lac*-Promotors auf pBBR1MCS entgegengesetzt. Der *mig*-Promotor wurde als 500 bp großes *BamHI*-*NotI*-Fragment in den Vektor pBluescript kloniert (pMigProm). Damit bei der Messung der *mig*-Promotorstärke mögliche stromaufwärtsliegende Promotoren nicht störten, wurde stromaufwärts des *mig*-Promotors eine Ω -Kassette (pBSL142) in die *PstI*-Erkennungsstelle inseriert, die neben einem Gentamycin-Resistenzgen auch einen Transkriptionsterminator besitzt (pMigPromOGm). Der *mig*-Promotor und die Ω -Kassette wurde mittels *SacII*-Restriktion aus pMigPromOGm isoliert und in die *SacII*-Schnittstelle von pGFP inseriert (pCM2-2). Anschließend wurden *E. coli*-Zellen mit pCM2-2 transformiert und mit einer λ -Phagen-Cosmid-Bibliothek, die jeweils circa 40-50 kb große genomische DNA-Fragmente aus *M. avium* enthielt, infiziert. Als positive Kontrolle wurde ein Plasmid verwendet (pCM2-3), bei dem das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *aacCI*-Promotors stand, durch den das Gen

konstitutiv transkribiert wurde und eine konstante Fluoreszenz gemessen werden konnte (pCM2-3). Als negative Kontrolle wurde *E. coli* mit dem Vektor pCM2-2 transformiert. Die Fluoreszenz von mehr als 500 Transformanten wurde mit einem Fluoreszenz-Photometer bestimmt; hierdurch war das Genom zu 99,99 % abgedeckt. Keine dieser Transformanten fluoreszierte stärker als die negative Kontrolle. Es konnte mit dieser Methode folglich kein Transkriptionsfaktor identifiziert werden. Dies kann unter anderem daran liegen, daß die auf den Cosmiden lokalisierten Gene nicht transkribiert wurden, da nicht alle Promotoren, die in Mycobakterien aktiv sind, auch in *E. coli* aktiv sein müssen (Bashyam *et al.* 1996). Es ist ebenfalls möglich, daß es sich bei dem gesuchten Transkriptionsfaktor um ein Repressor-Protein handelt, so daß eine Aktivierung des Promotors nicht möglich war. Aus diesem Grund wurden neue Vektoren konstruiert. Zum einen sollte anstatt einer Cosmid-Bibliothek eine Expressions-Bibliothek verwendet werden, bei der durch einen induzierbaren Promotor die Gene kontrolliert exprimiert werden können. Hierfür wurde pUC18 mit dem IPTG-induzierbaren *lac*-Promotor ausgewählt. Die Größe der genomischen DNA-Fragmente aus *M. avium* wurden mit 3-5 kb so gewählt, daß circa 15000 Kolonien untersucht werden mußten, um das circa 4000 kb große *M. avium*-Genom abzudecken. Da sich eine Handhabung des Fluoreszenz-Photometers bei einer solchen Größe als unpraktisch erweist, wurde *lacZ* anstatt *gfp* als Reportergen verwendet, wodurch eine Blau-Weiß-Selektion möglich war. Das *lacZ*-Gen wurde mit *Hind*III und *Nhe*I aus pFDY157 isoliert und entgegen der *lac*-Promotor-Orientierung mit glatten Enden in den mit *Eco*RV und *Xba*I geöffneten Vektor pBBR1MCS inseriert (pLacZ). Anschließend wurde die Ω -Kassette mit dem *mig*-Promotor aus pMigPromOGm als *Sac*II-Fragment isoliert und in der Orientierung des *lacZ*-Gens in pLacZ inseriert (pCM3). Es konnte keine β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen werden. Um einen in *E. coli* aktiven *mig*-Promotor zu erhalten, wurde in das Palindrom AAGATCTT, welches die Erkennungstelle für die Restriktionsendonuklease *Bgl*III enthält und im Bereich der -35 Region des *mig*-Promotors liegt, die *E. coli* Konsensus -35 Region (TTGACA) mittels der hybridisierten Oligonukleotide -35REGIONFW und -35REGIONRW inseriert (pCM4). Die Insertion wurde durch PCR-Amplifikation unter Benutzung der Oligonukleotide MIG173 und 472 und durch Sequenzierung des PCR-Produktes gezeigt. Dieser Promotor war aktiv und färbte *E. coli*-Zellen, die mit pCM4 transformiert waren, auf X-Gal-haltigen Platten blau. Um eine α -Komplementation einer *lacZ*-Mutante mit *lacZ'* von pUC18 auszuschließen, wurde der *E. coli*-Stamm NM554 benutzt, bei dem keine α -Komplementation möglich ist. Für die Identifizierung wurden circa 15000 *E. coli*-Kolonien, die mit pCM3 und einer *M. avium*-DNA-Expressions-Bibliothek transformiert waren, auf blaue Kolonien und 15000 *E. coli*-

Kolonien, die mit pCM4 und einer *M. avium*-DNA-Expressions-Bibliothek transformiert waren, auf weiße Kolonien hin untersucht. Nur im letzteren Ansatz wurden erfolgreich drei hellblaue bis weiße Kolonien gefunden (Abbildung 3.24). Aus diesen Kolonien konnten mittels Sequenzierung die klonierten DNA-Fragmente bestimmt und durch Vergleich mit der Datenbank (Tigr-Center) konnten die entsprechenden Abschnitte im *M. avium*-Genom identifiziert werden. Zwei Plasmide (Klone #6 und #10) hatten identische DNA-Fragmente. Zur Sequenzierung der Plasmide p#6, p#10 und p#59 wurden die Oligonukleotide M13-Forward- und M13-Reverse-Primer verwendet.

Das DNA-Fragment der Klone #6 und #10 war circa 3,7 kb, dasjenige des Klons #59 war circa 2,9 kb groß. Es wurde überprüft, ob die Klone auch noch dann eine weißliche Färbung beziehungsweise eine verminderte Galaktosidaseaktivität hatten, wenn diese nicht mit IPTG, sondern nur mit X-Gal angezogen wurden. Interessanterweise war die durch IPTG induzierte Repression der Galaktosidaseaktivität nur bei Klon #59 reversibel (relativ zu Klonen, die nur mit pCM4 und pUC18 transformiert waren). Im Anschluß hieran wurden alle möglichen ORFs, die Peptide kodieren und größer als 300 bp sind, mit den Datenbanken des NCBI und der *M. tuberculosis*-Datenbank verglichen, um durch Homologievergleiche den ORF eines möglichen Transkriptionsfaktors zu identifizieren. Für die aus Klon #59 gewonnene DNA-Sequenz wurde nur der in der Orientierung des *lac*-Promotors gefundene offene Leserahmen untersucht. Außerdem wurden alle aus den ORFs deduzierten Peptide mit dem Internet-Programm „Network Protein @nalysis“ auf ein mögliches „Helix-Turn-Helix-“ (HTH-) Motiv untersucht, welches ein häufiges DNA-Bindemotiv ist. Mit dem Internet-Programm Psort wurde die Lokalisation der Proteine untersucht. In Tabelle 3.6 sind die Ergebnisse der am Computer durchgeführten Untersuchungen aufgelistet.

Tabelle 3.6: Dargestellt sind die ORFs der DNA-Fragmente der Plasmide p#10 und p#59, die größer als 300 bp sind. Erläuterungen zu den verwendeten Internet-Programmen sind Abschnitt 2.2.24 und dem Text zu entnehmen. HTH: Helix-Turn-Helix; MTB: *M. tuberculosis*; ns: nicht signifikant; zyt.: zytoplasmatische

ORF	Größe (AS)	P _{lac} Orientierung	MTB homologe Gene (ORF)	HTH-Motiv (Signifikanz)	Lokalisation (Psort)
10-1	268	+	<i>fadB2</i>	ns	zyt. Membran
10-2	116	+	<i>orf2</i>	ns	Zytoplasma
10-3	114	+	-	ns	Zytoplasma
10-4	102	+	-	ns	Zytoplasma
10-5	350	-	Transposase	ns	zyt. Membran
10-6	300	-	RV 0940C	25%	Zytoplasma
59-1	199	+	<i>orf 01501</i>	ns	Zytoplasma

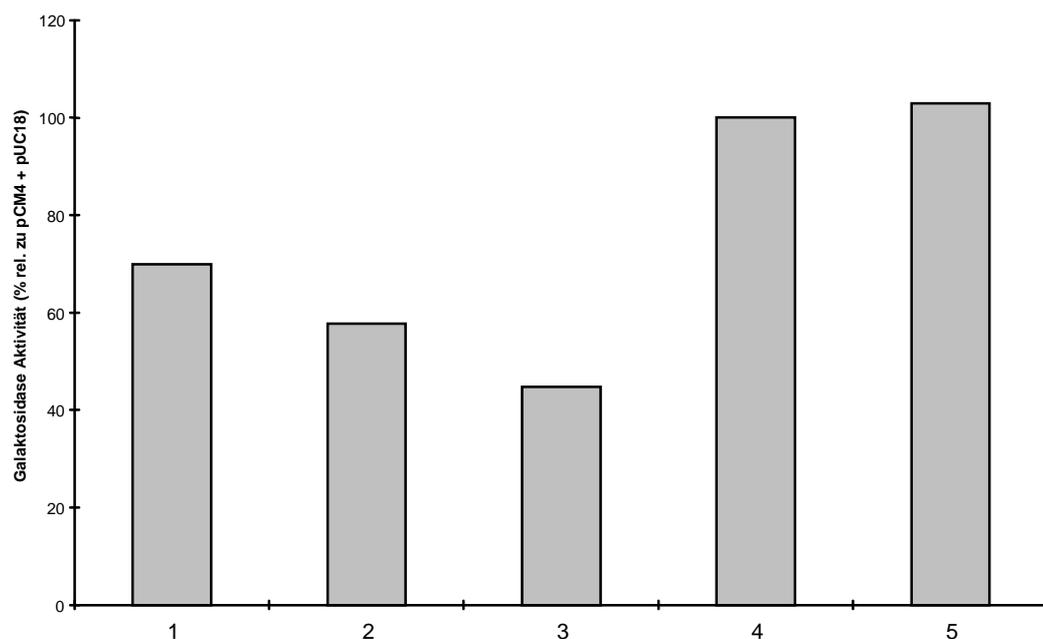
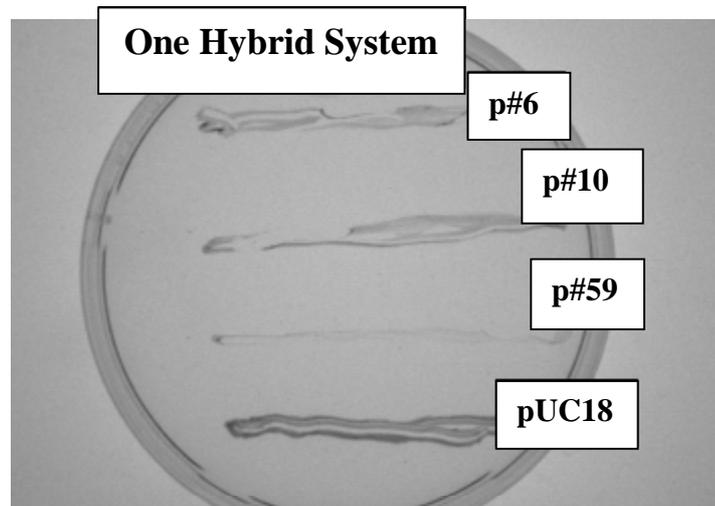


Abbildung 3.24: β -Galaktosidase-Aktivität der Klone #6 , #10 und #59 auf IPTG- und X-Gal-haltigem LB-Medium. Auf dem Foto wurden die Klone #6, #10, #59 und ein Klon, der mit pCM4 und pUC18 transformiert war ausgestrichen. Die unterschiedlichen Blaufärbungen der Klone, die mit pCM4 und entweder mit pUC18, p#6, p#10 oder p#59 transformiert waren, sind an der unterschiedliche Stärke der Graufärbung zu erkennen (siehe Fotografie). Die unterschiedlichen β -Galaktosidase-Aktivitäten ließen sich auch quantitativ bestätigen, das Diagramm stellt die unterschiedlichen Galaktosidase-Aktivitäten dar. Als 100 % wurde die Aktivität von *E. coli* genommen, der mit pCM4 und pUC18 transformiert war. Diagramm-Legende: 1: Klon #6 mit IPTG; 2: Klon #10 mit IPTG; 3: Klon #59 mit IPTG; 4: *E. coli* mit pCM4 und pUC18; 5: Klon #59 ohne IPTG

4. Diskussion

Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine Technik zu entwickeln, mit der es möglich ist, Gene bei *M. avium* gezielt zu inaktivieren. Diese langsam-wachsende Mycobakterien-Art ist für die Erforschung von mycobakteriellen Infektionen ein sehr guter Modellorganismus. So werden bei *M. avium*-Infektionen im Mausmodell in der Lunge ähnliche Granulome wie bei *M. tuberculosis*-Infektionen beim Menschen gebildet (Ehlers, persönliche Mitteilung). Im Gegensatz dazu werden nach Infektionen mit *M. tuberculosis* im Mausmodell Granulome gebildet, die sich von humanen Granulomen unterscheiden (Butler 2000). *M. avium* hat als Modellorganismus gegenüber *M. tuberculosis* zum anderen den Vorteil, daß es für Menschen nur als opportunistischer Erreger für immunsupprimierte Patienten gefährlich ist. Man kann daher mit diesen Bakterien im S2-Sicherheitsbereich anstatt des aufwendigen S3-Bereichs arbeiten. Zudem haben andere gentechnisch veränderbare Mycobakterien wie die schnell-wachsende Art *M. smegmatis* oder die langsam-wachsende Art *M. intracellulare* nicht die gleiche klinische Bedeutung wie *M. avium*.

Bis zu dieser Arbeit war noch keine gentechnisch hergestellte Mutante von *M. avium* beschrieben worden, auch eine Transformation mit einem integrativen Plasmid war in dieser Hinsicht nicht erfolgreich (Plum und Thilo, unveröffentlichte Ergebnisse). Zudem wurden bislang selten transformierte *M. avium*-Stämme mit autonom replizierenden Plasmiden beschrieben (Beggs *et al.* 1995, Foley-Thomas *et al.* 1995, Parker und Bermudez 1997, Batoni *et al.* 1998), da diese im Allgemeinen nicht stabil sind. Auch bei *M. intracellulare* ist eine stabile Transformation mit einem autonom replizierenden Plasmid nicht möglich, dennoch gelang die Konstruktion einer Mutante durch allelen Austausch (Mahenthiralingam *et al.* 1998, Marklund *et al.* 1998). Deshalb wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Strategien zur Herstellung von Mutanten bei *M. avium* getestet, die bei anderen Mycobakterien-Arten erfolgreich waren. Für den DNA-Transfer wurde entweder die Elektroporations- oder die Konjugations-Technik benutzt.

4.1 Allgemeine Probleme der Herstellung von Mutanten bei langsam-wachsenden Mycobakterien

Langsam-wachsende Mycobakterien gehören zu denjenigen Bakterien, deren Charakterisierung durch gezielte genetische Veränderung erst in den letzten Jahren möglich geworden ist (Norman *et al.* 1995). Trotz der großen Bedeutung, welche die Erforschung der

Mycobakterien seit über 100 Jahren hat, ist dies nicht erstaunlich, da die Kultivierung dieser Bakterien schwierig ist (Generationszeiten bis über 24 h) und einige Arten sich bis heute nicht *in vitro* kultivieren lassen (*M. leprae*).

Allgemein wurde eine Transformation von Mycobakterien mit Plasmid-DNA erst durch die Elektroporations-Technik und durch die Entwicklung von Plasmiden, die in Mycobakterien autonom replizieren können, möglich (Zusammenfassung bei Hatfull 1993). Durch diese Technik gelang beispielsweise bei der schnell-wachsenden Art *M. smegmatis* eine erste gezielte Inaktivierung des Gens *pyrF* durch allelen Austausch (Husson *et al.* 1990). Auch andere Techniken mit Schaukel-Plasmiden der Mycobakteriophagen D29 und TM4 und dem temperenten Mycobakteriophagen Ms6, die zur Transposon-Mutagenese benutzt wurden (Anes *et al.* 1992, Bardarov *et al.* 1997), haben in der Erforschung der Mycobakterien Fortschritte ermöglicht. Seitdem sind einige Mutanten bei *M. tuberculosis*, *M. bovis* und *M. intracellulare* hergestellt worden (Baulard *et al.* 1996; Pelicic *et al.* 1997, Marklund *et al.* 1998). Diese Mutanten wurden hauptsächlich durch den allelen Austausch eines durch ein Antibiotika-Resistenzgen unterbrochenen Allels gegen das Wildtyp-Allel im Genom erzeugt. Es wurden aber auch Mutanten mit unmarkierten Deletionen durch allelen Austausch konstruiert (Pavelka und Jacobs 1999). Als Resistenzgene werden hauptsächlich die Gene *aph* und *aacC1* benutzt, die Resistenzen gegen die Antibiotika Kanamycin und Gentamycin vermitteln. Als Vektoren für die inaktivierten Allele wurden unter anderem Suizidplasmide, induzierbare Suizidplasmide und 40-50 kb lange, lineare, genomische DNA-Fragmente verwendet (Mahenthiralingam *et al.* 1998, Pelicic *et al.* 1997, Balasubramanian *et al.* 1996).

Jedoch erwies sich die genetische Manipulation von langsam-wachsenden Mycobakterien als überaus schwierig. Ein anfängliches Problem waren die geringen Transformationseffizienzen, die mit der Elektroporations-Technik erzielt wurden. McFadden (1996) berechnete für eine singuläre Rekombination eine Rate von 10^{-3} und für einen allelen Austausch durch zwei Rekombinationsereignisse von 10^{-4} bis 10^{-6} , so daß Transformationseffizienzen benötigt werden, die bei mindestens 10^4 Transformanten pro μg DNA liegen müssen, um einen allelen Austausch zu erhalten. Eine erhöhte Effizienz der Elektroporation wird durch eine Anhebung der Temperatur der Zellen für die Elektroporation erzielt, eine Erklärung für dieses Phänomen fehlt bis heute (Wards und Collins 1996).

Ein weiteres großes Problem für einen gezielten allelen Austausch ist eine hohe illegitime Rekombinations-Rate (Kalpana *et al.* 1991, Armitige *et al.* 2000). Versuche, homologe Rekombinationen bei *M. bovis* und *M. intracellulare* zu erzielen, führten zu einer hohen Rate

an illegitimen Rekombinationen, die bis zu 80 % aller Rekombinationsereignisse betrogen (Aldovini *et al.* 1993). Andere Autoren konnten zeigen, daß homologe Rekombinationen bei langsam-wachsenden Mycobakterien bei intra- und interplasmidären Rekombinationen zwar auftreten, jedoch deutlich seltener als illegitime Rekombinationen (Baulard *et al.* 1996; Norman *et al.* 1995). Ehrlich *et al.* (1993) zeigten, daß illegitime Rekombinationen bei Mycobakterien zwischen kurzen sogenannten „mikrohomologen“ Sequenzen stattfinden. Durch Verwendung von negativen Selektionsmarken wie *sacB* und *rpsL* konnte die Rate der Rekombinationsereignisse für einen gezielten allelen Austausch erhöht werden (Sander *et al.* 1995, Pelicic *et al.* 1997).

Als drittes großes Problem ist die hohe Spontanresistenzrate bei Mycobakterien zu nennen, die bei Transformationsansätzen von *M. tuberculosis* bis zu 90 % betragen kann (Armitige *et al.* 2000). Die Ursachen für die hohe Spontanresistenzrate bei Mycobakterien sind vielfältig. Prammananan *et al.* (1999) konnten zeigen, daß die Resistenzen gegen Aminoglykoside (wie Gentamycin und Kanamycin) häufig durch eine Punktmutation in der 16S rRNA (*E. coli* Position 1408 A → G) hervorgerufen werden. Außerdem scheint die besondere Struktur der mycobakteriellen Zellwand ein Grund für eine hohe Spontanresistenzrate zu sein. Insbesondere die Mycolsäuren tragen zur hohen Diffusionsbarriere für hydrophobe (zum Beispiel Rifampin) aber auch hydrophile Agentien bei (Mdluli *et al.* 1998; Jackson *et al.* 1999).

4.2 Unterschiedliche Strategien zur Herstellung von Mutanten bei *M. avium* mit der Elektroporations-Technik

In dieser Arbeit wurden Strategien auf *M. avium* appliziert, die zuvor schon erfolgreich bei anderen langsam-wachsenden Mycobakterien zur Herstellung von Mutanten benutzt wurden. Unter 3.1.1 wurde eine Strategie mit Suizidplasmiden (pGPC119 und pGPC120) gebraucht, die bereits für die Inaktivierung von Genen in *M. intracellulare* genutzt wurde (Mahenthiralingam *et al.* 1998, Marklund *et al.* 1998). Andere Autoren benutzten ein in Mycobakterien autonom replizierendes Plasmid mit thermosensitivem Replikon und der negativen Selektionsmarke *sacB*, die einen allelen Austausch begünstigte (Pelicic *et al.* 1997). Eine adäquate Strategie wurde unter 3.1.2 verwendet. Bei einer anderen Strategie wurden lange, lineare DNA-Fragmente erfolgreich für einen allelen Austausch bei *M. tuberculosis* eingesetzt (Balasubramanian *et al.* 1996). Diese Strategie wurde in dieser Arbeit in 3.1.3 adaptiert. Hier sollte vor allem die von den Autoren beschriebene Senkung von illegitimen

Rekombinationsereignissen erzielt werden. Auf die Verwendung von linearisierten Plasmiden, die von Berthet *et al.* (1998) und Yuan *et al.* (1998) erfolgreich für einen allelen Austausch angewendet wurden, wurde hier deshalb verzichtet. Unter 3.1.4 wurde eine für Mycobakterien neuartige Strategie verwendet, da bislang noch keine Gene bei Mycobakterien durch eine einfache homologe Integration eines Suizidplasmids gezielt inaktiviert worden sind. Diese Technik bot sich zur Senkung der Spontanresistenzrate an, da für die Selektion von Transformanten mehreren Resistenzmarken verwendet werden konnten. Gegenstand der Mutagenese-Experimente war das Gen *mig*, das aufgrund erster Untersuchungen als fakultativ nicht-essentiell einzustufen war. Seine Funktion war unbekannt, so daß keine Möglichkeit bestand, entsprechende Mutanten anhand ihres Phänotyps zu identifizieren.

Mit keiner der oben erwähnten Methoden gelang die Konstruktion einer Mutante des Gens *mig*. Dieses Ergebnis läßt zwei Interpretationen zu: entweder sind die Methoden für die Herstellung von *M. avium*-Mutanten nicht geeignet oder es handelt sich bei *mig* um ein essentielles Gen. Zunächst soll jedoch auf die Probleme eingegangen werden, die bei der Elektroporations-Technik auftraten.

4.2.1 Probleme bei der Herstellung von *M. avium*-Mutanten mit der Elektroporations-Technik

Auf den hier zur Transformation verwendeten Plasmiden pGPC121 und pGPC130 sind die Replikationsursprünge der mycobakteriellen Plasmide pLR7 (pGPC130) bzw. pAL5000 (pGPC121) lokalisiert, die beide in *M. avium* autonom replizieren können (Beggs *et al.* 1995, Batoni *et al.* 1998). Beide Plasmide erwiesen sich jedoch bereits nach der ersten Subkultivierung als instabil (3.1.2). Jedoch sollten die Plasmide länger in der Zelle „bleiben“ als die Suizidplasmide, wodurch eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine homologe Rekombination erhofft wurde. Es konnten jedoch keine homologen Rekombinationen dieser Plasmide mit dem Genom beobachtet werden. Nach der Subkultivierung der Transformanten unter 3.1.2 integrierten die Plasmide entweder illegitim (siehe Abbildung 4.1B) oder die Zellen verloren sie und wurden spontanresistent. Dagegen konnten Norman *et al.* (1995) zeigen, daß unter Verwendung eines autonom replizierenden Schaukel-Plasmids eine homologe Rekombination und ein alleler Austausch bei *M. bovis* möglich war.

Bei *M. intracellulare* war es möglich, Mutanten über einen allelen Austausch herzustellen, wobei dies nur mit avirulenten Wildtyp-Stämmen möglich war, da virulente Stämme nicht

transformiert werden konnten (Mahenthiranlingam *et al.* 1998, Marklund *et al.* 1998). Mahenthiranlingam *et al.* (1998) war es möglich, durch chemische Mutagenese virulente *M. intracellulare*-Mutanten zu erzeugen, die für einen gezielten Genaustausch verwendet werden konnten. Diese Methode, transformierbare Mycobakterien zu erhalten ist aber fraglich, da man schon vor der eigentlichen Mutation ungerichtete Mutationen einfügt, die möglicherweise den besonderen Charakter eines klinisch-virulenten Stamms verändern können. Für eine gezielte Gen-Inaktivierung wurde bei *M. intracellulare* ein Suizidplasmid verwendet, und die Transformanten wurden auf den Erwerb einer Antibiotika-Resistenz hin selektiert (Mahenthiranlingam *et al.* 1998, Marklund *et al.* 1998). Die gleiche Vorgehensweise wurde unter 3.1.1 angewendet. Hier integrierte bei 47% der Transformanten das Kanamycin-Resistenzgen, dagegen waren 53 % der untersuchten Klone spontan resistent gegen Kanamycin und 28 % davon waren zudem gegen Chloramphenicol spontan resistent. Wenn man dies mit den von Mahenthiranlingam *et al.* (1998) veröffentlichten Daten vergleicht (hier konnten keine spontan resistenten Klone identifiziert werden), zeigt dies, daß *M. avium* eine deutlich höhere Spontanresistenzrate gegen Antibiotika besitzt als *M. intracellulare*. Ob bei den 47 %, die das Kanamycin-Resistenzgen erhalten hatten, dieses durch homologe oder illegitime Rekombination in das Genom integriert wurde, ist nicht weiter analysiert worden. Es konnte dagegen gezeigt werden, daß die Transformanten das Resistenzgen während des zweiten Rekombinationsschrittes (Subkultivierung) verloren hatten und spontanresistent wurden (siehe 3.1.1).

Fraglich bleibt, warum es nicht zu einer homologen Rekombination zwischen dem *M. avium*-Genom und den Plasmiden pGPC136 oder -137 unter 3.1.4 gekommen ist. Möglicherweise waren 660 bp als Substrat für eine homologe Rekombination zwischen Plasmid und Genom zu gering. Es bleibt außerdem wie für 3.1.1 festzuhalten, daß spontanresistente Kolonien gegen zwei Antibiotika bei *M. avium* relativ häufig vorkommen können.

Um Klone mit illegitimer Rekombination von spontanresistenten Kolonien zu unterscheiden, wurden unter 3.1.3 150 Kolonien subkultiviert und nach Isolierung der genomischen DNA einem sogenannten „Dot-Blot“-Verfahren unterzogen. Die so behandelte DNA wurde mit einer Sonde gegen das Kanamycin-Resistenzgen hybridisiert. Bei der DNA von 20 Klonen konnte ein Signal beobachtet werden (Abbildung 3.6). Dies bedeutet, daß bei circa 15 % aller Transformanten eine illegitime Integration des Kanamycin-Resistenzgens stattgefunden hat.

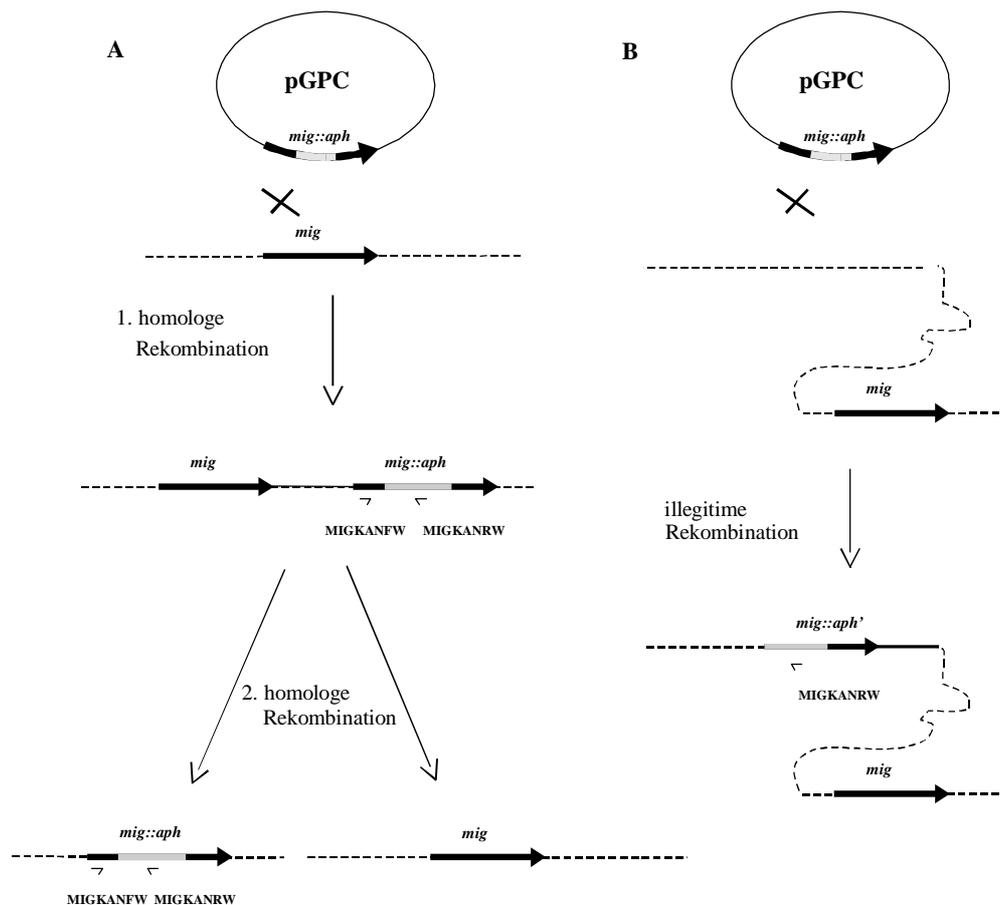


Abbildung 4.1: Darstellung möglicher Rekombinationsereignisse der pGPC-Plasmide mit dem *M. avium*-Genom. A) Potentieller alleler Austausch von *mig* gegen das *mig::aph*-Allel durch zwei homologe Rekombinationen. Von oben nach unten: nach erfolgreicher Transformation finden zwei homologe Rekombinationen zwischen *mig* und dem *mig::aph*-Allel statt, wodurch ein alleler Austausch stattfindet. B) Mögliche illegitime Rekombination zwischen den pGPC-Plasmiden und dem *M. avium*-Genom.

Die restlichen 85 % der Kolonien waren dementsprechend spontanresistent, was nahe legt, daß das größte Hindernis für einen gezielten Genaustausch die hohe Spontanresistenzrate gegen Antibiotika ist. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Balasubramanian *et al.* 1996, die bei 6 % aller Transformanten einen allelen Austausch durch Verwendung von langen linearen DNA-Fragmenten erzielen konnten.

Man nahm lange Zeit an, daß das bei RecA von langsam-wachsenden Mycobakterien vorkommende Intein, ein Protein-Intron, eine Ursache für eine hohe Rate von illegitimen Rekombinationen sein kann (McFadden 1996). Da das Protein-Spleißen ein unregelmäßiger Mechanismus ist, hätte dessen Ausbleiben eine illegitime Rekombination begünstigen können (McFadden 1996, Derbyshire *et al.* 1997, Mills *et al.* 1998). Dieses konnte aber durch neuere Experimente widerlegt werden, da bei *recA*-Mutanten von *M. smegmatis* eine Komplementation durch Expression eines *M. tuberculosis* RecA-Intein Proteins möglich war

(Frischkorn *et al.* 1998, Papavinasasundaram *et al.* 1998). Dies und die Tatsache, daß *M. avium* kein Intein im RecA-Protein besitzt (Sander, persönliche Mitteilung), macht es unwahrscheinlich, daß die in dieser Arbeit beobachtete hohe Rate an illegitimen Rekombinationen aus einer besonderen Struktur des RecA-Proteins resultiert. Vielmehr müssen andere Mechanismen existieren, die eine homologe Rekombination unterbinden, auf die es aber bislang keine Hinweise gibt.

Pelicic *et al.* 1997 hatten bei der Inaktivierung des *purC*-Gens bei *M. tuberculosis* mittels induzierbarer Suizidplasmide nur Kanamycin-resistente Transformanten erhalten, bei denen ein alleler Austausch und keine illegitime Rekombination stattgefunden hatte. Dies widerspricht den Erfahrungen, die Armitige *et al.* 2000 bei der Inaktivierung der *fbp*-Gene dieser Art gemacht hatten. Hier waren 106 von 118 Kanamycin-resistenten Kolonien spontanresistent, 10 Kolonien erhielten ein Kanamycin-Resistenzgen über illegitime Rekombination und nur 2 Kolonien waren nach homologer Integration Kanamycin-resistent geworden. Dieses Ergebnis ähnelt dem unter 3.1.3 beschriebenen Ergebnis, da auch hier die Rate an spontanresistenten Kolonien bei 85 % lag. Die Differenzen, die zwischen den Frequenzen der homologen Rekombinationen bei Pelicic *et al.* 1997 und Armitige *et al.* 2000 auftraten, können möglicherweise durch die unterschiedliche Lage der jeweiligen Gene auf dem Genom erklärt werden (Vagner und Ehrlich 1988). Diese Erklärung kann auch für das Gen *mig* bei *M. avium* gelten, bei dem keine homologe Rekombination beobachtet werden konnte.

Die mit der Elektroporations-Technik bei *M. avium* erzielten Ergebnisse lassen als Fazit festhalten, daß die Transformationseffizienz wahrscheinlich zu gering ist, um einen homologen Austausch zu erzielen. Um mittels Elektroporation Mutanten herstellen zu können, muß wahrscheinlich ein *M. avium*-Stamm isoliert werden, der eine höhere Transformationseffizienz hat und / oder bei dem eine effizientere homologe Rekombination stattfindet. Außerdem fehlt bis heute ein Replikon, daß eine stabile Transformation von MAC mit rekombinanter Plasmid-DNA ermöglicht (Mahenthiranlingam *et al.* 1998). Aufgrund dessen wurde bei *M. avium* auf den Versuch einer sogenannten „antisense“-Mutagenese, die für eine *hisD*-Mutante bei *M. smegmatis* erfolgreich war (Parish und Stoker 1997), verzichtet.

4.3 Konjugation zwischen *E. coli* und *M. avium* zur gezielten Inaktivierung von Genen

Schon in den 70'er Jahren wurde die Konjugation zwischen *M. smegmatis*-Stämmen als Gentransfer zwischen unterschiedlichen Bakterienstämmen beschrieben (Tokunaga *et al.* 1973). Es wurden auch erste Versuche unternommen, über Konjugationen genomische DNA von *E. coli* in *M. phlei* zu transferieren, um über einen Genaustausch mit *E. coli*-Genen auxotrophe Mycobakterien zu komplementieren (Slosarek *et al.* 1978). Diese Versuche waren allerdings nicht sehr erfolgreich, wobei zudem das Problem bestand, daß die Transkonjuganten damals nur phänotypisch untersucht werden konnten. Ein Gen-Transfer von genomischer DNA von den Gram-negativen *E. coli*-Zellen zu den Gram-positiven Mycobakterien war außerdem problematisch, da nicht bekannt war, ob homologe Gene für einen bestimmten Phänotyp bei beiden nicht verwandten Bakterien-Arten verantwortlich sind. Erst in den 90'er Jahren wurden di- und triparentale Konjugationen durchgeführt, um rekombinante Plasmide von *E. coli* in Mycobakterien (*M. smegmatis* und *M. fortuitum*) zu transferieren (Gormley und Davies 1991, Dziadek *et al.* 1994, Gavigan *et al.* 1995) oder aber auch zwischen verschiedenen Mycobakterien zu übertragen (Parsons *et al.* 1998). Jedoch wurde die Konjugation lediglich dazu verwendet, Schaukel-Plasmide oder Plasmide mit Transposons zu transferieren, um diese Technik als Alternative zu der bis dahin ausschließlich benutzten Elektroporation zu verwenden (Gavigan und Martin 1998). Es wurden bis zu dieser Arbeit keine Versuche unternommen, Gene bei Mycobakterien mittels Konjugation gezielt zu inaktivieren. Darüber hinaus wurden bislang noch keine Konjugationen zwischen *E. coli* und *M. avium* beschrieben, um rekombinante Plasmide mittels dieser Technik zu transferieren. Es standen also vor dieser Arbeit keine Erfahrungen zur Verfügung, ob und wie Plasmid-DNA in *M. avium* zu transferieren ist, noch ob die Konjugation eine erfolgsversprechende Methode ist, Gene bei dieser Art gezielt zu inaktivieren. Die Ergebnisse, die unter 3.1.5 und 3.2 für die Konjugationen erzielt wurden, zeigten, daß ein DNA-Transfer von *E. coli* zu *M. avium* möglich ist. Es wurde jedoch darauf verzichtet, Schaukel-Plasmide zu transferieren, da angenommen werden konnte, daß diese auch nach Konjugationen nicht stabil in *M. avium* replizieren können.

Nachdem bei Elektroporationen nach der Untersuchung unter 3.1.3 rund 85 % aller Kolonien spontanresistent waren, war es notwendig, ihren Anteil zu senken. Eine Möglichkeit hierzu besteht in der Verwendung einer anderen Technik für den DNA-Transfer, bei der weniger Zellen für eine effiziente Übertragung benötigt werden. Die Konjugation wird und wurde auch

zur Inaktivierung von Genen bei anderen Bakterienarten wie *Vibrio cholerae* verwendet (Miller und Mekalenos 1988). Diese Technik ist zudem für einen allelen Austausch vorteilhaft, da die mobilisierte Plasmid-DNA nach dem Eintritt in die Rezipientenzelle zumindest teilweise einzelsträngig vorliegt und so besser als Substrat für das RecA-Protein dient als doppelsträngige Plasmid-DNA. Hinds *et al.* (1999) konnten für langsam-wachsende Mycobakterien zeigen, daß die Wahrscheinlichkeit für eine homologe Rekombination durch Denaturierung, UV-Behandlung der DNA beziehungsweise durch Verwendung von einzelsträngiger DNA auf das vier- bis fünffache gesteigert werden kann. Ein weiterer Grund für einen gesteigerten homologen Austausch kann auch in einer erhöhten RecA-Konzentration in der Rezipienten-Zelle liegen. Auch bei Mycobakterien wird durch einzelsträngige DNA-Abschnitte eine sogenannte SOS-Antwort ausgelöst. Hierdurch findet in der Zelle eine verstärkte Synthese des RecA-Proteins statt, die durch eine verminderte Bindung des Repressors LexA an den *recA*-Promotor verursacht wird (Durbach *et al.* 1997). Mycobakterien nutzen RecA wie *E. coli* auch zur Reparatur von DNA-Schäden durch Doppel- und Einzelstrangbrüche zum Beispiel nach UV-Behandlung (Heitman *et al.* 1999, Frischkorn *et al.* 1998). Eine erhöhte RecA-Konzentration führt wahrscheinlich zu einer erhöhten Rate an homologer Rekombination und dabei auch zu einem erhöhtem allelen Austausch. Smith (1991) diskutierte in diesem Zusammenhang für *E. coli* den von RecA vermittelten „Long-Chunk-Integrations“-Mechanismus, der für 80 % aller allelen Austausche nach Konjugationen angenommen wird (Abbildung 4.2).

Nach einigen Konjugationen konnte bei bis zu 100 % aller untersuchten Exkonjuganten das *mig::aph*- oder das Δ *mig::aacCI*-Allel mittels PCR nachgewiesen werden. Nach den triparentalen Konjugationen mit pMigGm traten zwei unterschiedliche Kolonieförmigkeiten und drei unterschiedliche Produktmuster bei den PCR-Untersuchungen auf. Die glatten, opaken Kolonien waren subkultivierbar und nach PCR-Untersuchungen konnten Produkte amplifiziert werden, die entweder nur für das Wildtyp-Allel oder für das Wildtyp- und das inaktivierte Allel spezifisch waren.

Bei den letzteren handelte es sich wahrscheinlich um Kolonien, bei denen entweder eine singuläre homologe oder eine illegitime Rekombination stattgefunden hatte. Es könnte sich aber auch um Mischkolonien aus rekombinanten und spontanresistenten Zellen gehandelt haben. Nach einer Subkultivierung dieser Kolonien konnten nur PCR-Produkte amplifiziert werden, die für das Wildtyp-Allel erwartet wurden. Ähnliches wurde auch bei der Subkultivierung der Klone beobachtet, die bei 3.1.2 das Plasmid pGPC121 und pGPC130

erhalten hatten. Wenn es sich um Mischkolonien gehandelt hat, haben die spontanresistenten Wildtyp-Zellen die rekombinanten Zellen überwachsen, so daß eine Isolierung der *mig*-Mutante nicht möglich war.

Bei den glatten, opaquen Kolonien, die bei einer PCR-Untersuchung nur ein Wildtyp-Allel hatten, handelte es sich wahrscheinlich um spontanresistente Kolonien. Es könnte sich aber auch um Kolonien gehandelt haben, bei denen nach einer illegitimen Rekombination und Integration von pMigGm in das *M. avium*-Genom, mindestens eine Erkennungsstelle für die Oligonukleotide MIGKANFW, MIGGMFW oder MIGGMRW verloren gegangen ist (Abbildung 4.1B).

Es traten aber auch transparente Kolonien auf, die eine ungewöhnliche, zerklüftete Kolonieform hatten. Bei diesen Zellen konnte nach einer PCR-Untersuchung nur das inaktivierte Allel amplifiziert werden; sie ließen sich aber nicht weiter kultivieren. Hier hatte wahrscheinlich ein Genaustausch stattgefunden, da kein Wildtyp-Allel nachgewiesen werden konnte. Ähnliche Kolonieformen hatten Norman *et al.* 1995 für die *accBC*-Mutante von *M. bovis* beschrieben, die aber subkultiviert werden konnte. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, daß es sich bei dem Gen *mig* um ein zumindest teilweise essentielles Gen handelt. Wie unter 4.6 dargelegt, handelt es sich bei dem Genprodukt Mig um eine Acyl-CoA-Synthetase. Diese kann essentiell für die Lipidsynthese oder für den Abbau von Fettsäuren zur Gewinnung von Energie in einer bestimmten Wachstumsphase von *M. avium* sein (4.8). Ein sogenanntes „Gene-Rescue“-Experiment zum endgültigen Beweis der Essentialität des *mig*-Gens war nicht möglich, da eine stabile Transformation von *M. avium* mit einem Schaukel-Plasmid mit dem Gen *mig* aussichtslos erscheint. Die These, daß es sich bei *mig* um ein essentielles Gen handelt, wird auch dadurch unterstützt, daß sich die glatten, opaquen Kolonien, die bei der PCR-Untersuchung ein Wildtyp-Allel und ein inaktiviertes Allel hatten, nach Subkultivierung ihr inaktiviertes Allel verloren hatten.

Daß sich das Gen *mig* nicht durch einen allelen Austausch inaktivieren ließ kann auch an der Position dieses Gens im *M. avium*-Genom liegen. Bei einem allelen Austausch über den RecBCD-Weg-abhängigen "Long-Chunk-Integrations"-Mechanismus sind Gene bevorzugt (Abbildung 4.2), die sich in der Nähe von sogenannten "Hot-Spots" für homologe Rekombinationen befinden. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um DNA-Abschnitte, die sich in der Umgebung von Chi-Sequenzen befinden. Auch für Mycobakterien wurden solche "Hot-Spot"-Bereiche auf dem Genom diskutiert (Marklund *et al.* 1995, Mahenthiralingam *et al.*

1998). Jedoch ist noch zu wenig über die Rekombinations-Mechanismen bei Mycobakterien bekannt, um sich ein letztlisches Urteil zu erlauben.

Im Ganzen läßt sich festhalten, daß ein stabiler alleler Austausch für das Gen *mig* nicht durchführbar war.

Als Beweis, daß es prinzipiell möglich ist, mittels Konjugation in *M. avium* Gene zu inaktivieren, sollte das nicht essentielle *sigE*-Gen (Wu *et al.* 1997) inaktiviert. Die Exkonjuganten ließen sich subkultivieren, und aufgrund einer Southern-Hybridisierung konnte angenommen werden, daß es sich bei den erhaltenen Klonen M1 und M2 um die gesuchte *sigE*-„knock-out“-Mutante handelte. Die vorher durchgeführte PCR-Untersuchung kann kein hinreichendes Kriterium (3.2) für einen allelen Austausch sein, da die beiden Primer SIGETESTFW und SIGETESTRW auch mit dem Plasmid pGPC293 hybridisieren. Das für einen allelen Austausch erwartete Bandenmuster bei der PCR-Untersuchung kann eine zusätzliche Integration von pGPC293 nach illegitimer Rekombination nicht kenntlich machen. Die Southern-Hybridisierung ist dagegen eine Methode, bei der eine solche mehrfache Integration erkennbar wird.

M. avium K007 scheint die erste gentechnisch hergestellte Mutante bei diesem Organismus zu sein. Bei diesem Stamm konnte die von Guerrero *et al.* (1995) für die Spezies *M. avium* spezifische Insertionssequenz IS1245 nachgewiesen werden (Abbildung 3.13D).

Mit *M. avium* K007 wurde auch ein Tierexperiment gemacht, bei dem Mäuse mit diesem Stamm und *M. avium* #5-8 infiziert wurden. Dieses Experiment wurde in Borstel in der Arbeitsgruppe von Dr. Ehlers durchgeführt. Im Tierversuch erwies sich der Stamm *M. avium* K007 als virulenter als *M. avium* #5-8 (Ehlers, unveröffentlicht). Die DNAs der aus den Mäusen gewonnenen Mykobakterien Kolonien wurden kürzlich im Labor von Dr. Plum mittels Southern-Untersuchung auf die IS1245-Sequenz hin untersucht (Plum, persönliche Mitteilung). Hier konnte diese Sequenz nur bei der DNA aus den *M. avium* #5-8 Kolonien nachgewiesen werden, nicht jedoch aus *M. avium* K007. Diese widersprüchlichen Ergebnisse ziehen in Zweifel, ob es sich bei den aus den Mäusen als *M. avium* K007 isolierten Bakterien um die Spezies *M. avium* handelte. Jedoch konnten Beggs *et al.* (2000) im Gegensatz zu Guerrero *et al.* (1995) zeigen, daß der Besitz von IS1245 kein notwendiges Kriterium für *M. avium* ist. Der Stamm *M. avium* A5 besitzt diese Insertionssequenz zum Beispiel nicht (Beggs *et al.* 2000).

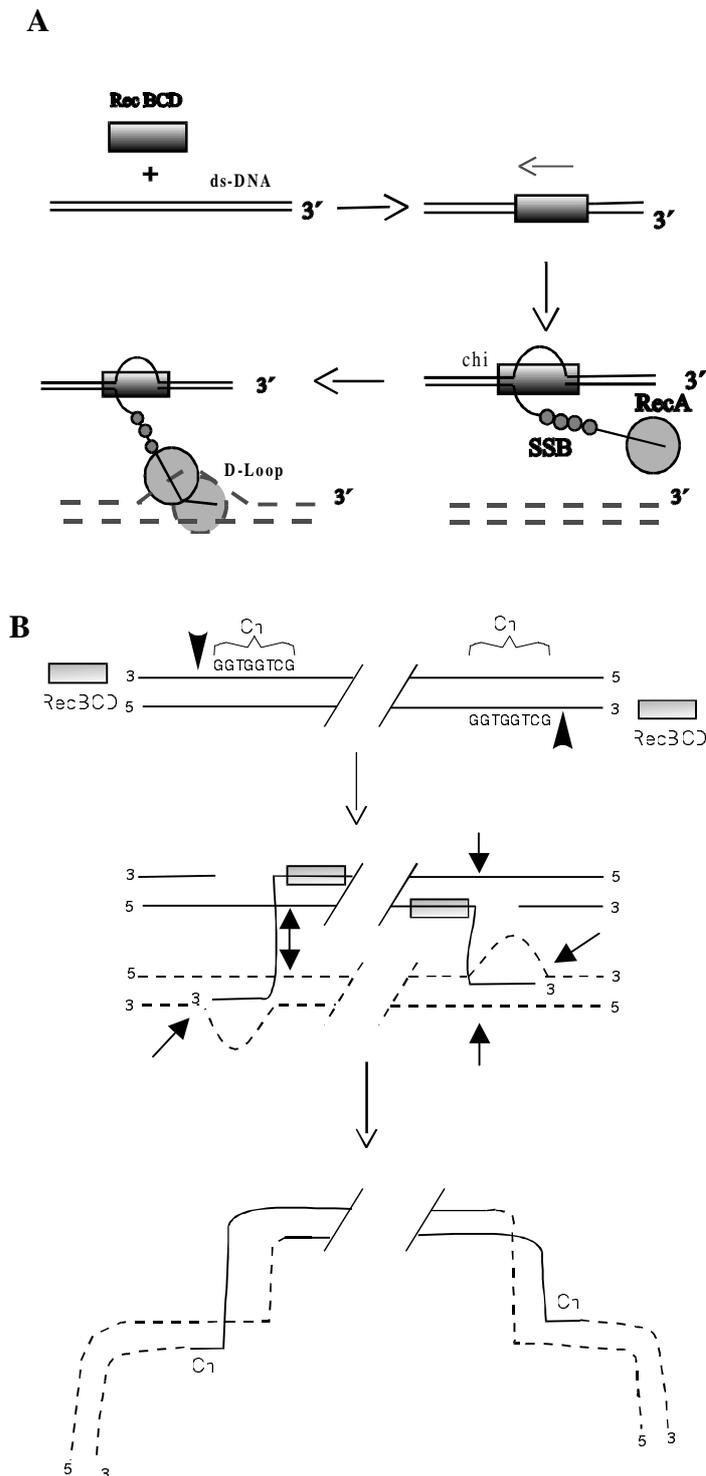


Abbildung 4.2: Stark vereinfachte Darstellung der Rekombination über den „Long-Chunk-Integrations“-Mechanismus über den RecBCD-Weg in Transkonjuganten von *E. coli*. A) Nach Bindung des RecBCD-Enzyms an ds-DNA (durchgehende Linie) gleitet das Enzym über die DNA, dabei wird diese entwunden, wobei sogenannte "DNA-Loops" entstehen. Erreicht dieser Komplex eine Chi-Sequenz auf der DNA (5'-GGTGGTC-3'), wird die DNA geschnitten und die dsDNA wird vom neu entstandenen 3'-Ende durch SSB (Einzelstrang-Bindungsproteine) und das RecA-Protein (RecA) weiter entwunden. Der so entstandene DNA-Einzelstrang wird dann vom 3'-Ende aus mithilfe des RecA-Proteins mit einem anderen, homologen ds-DNA-Abschnitt des Rezipienten (unterbrochene Linie) gepaart, wobei ein sogenannter "D-Loop" entsteht. B) Die durchgehenden Linien repräsentieren ein ds-DNA-Fragment des Donors nach der Synthese des komplementären Stranges. Dieser bildet von beiden Enden aus nach dem unter A beschriebenen Mechanismus mit der chromosomalen DNA (unterbrochene Linie) des Rezipienten zwei sogenannte D-Loops (große Pfeilspitzen markieren Schnittstelle des RecBCD-Enzyms). Die so verbundenen beiden DNA-Moleküle werden an den mit Pfeilen markierten Stellen geschnitten und durch anschließende Ligationen entsteht ein reziproker Austausch der DNA-Moleküle von Donor und Rezipient. Als Alternative kann auch ein nicht reziproker Austausch nach Replikation, die von den eingewanderten 3'-Enden aus gestartet wird, entstehen (nicht dargestellt). Abbildung nach Smith (1991).

4.4 Charakterisierung von *M. avium* K007

Mit *M. avium* K007 scheint nun erstmals eine *sigE*-Mutante von langsam-wachsenden Mycobakterien zur Verfügung zu stehen. Ihr Wachstumsverhalten unterschied sich im Gegensatz zu der *sigE*-Mutante von *M. smegmatis* unter *in vitro*-Bedingungen deutlich von dem Verhalten des entsprechenden Wildtyps (Abbildung 3.13 und 3.12) (Wu *et al.* 1997). Dieses Verhalten ist jedoch für *sigE*-Mutanten nicht außergewöhnlich, da eine *sigE*-Mutante von *Synechococcus* sp. PCC 7002 auch unter *in vitro*-Bedingungen eine veränderte Wuchskurve zeigte (Gruber und Bryant 1998). Der *M. avium*-Stamm K007 wies wie die *sigE*-Mutante von *M. smegmatis* unter extrazellulären Streßbedingungen eine deutlich geringere Überlebensrate auf. Dies ist bemerkenswert, da Mycobakterien mindestens einen weiteren ECF-Sigma-Faktor (SigH) besitzen, der in das Überleben nach extrazellulärem Streß, besonders Hitze-Streß, involviert ist (Fernandes *et al.* 1999). Manganelli *et al.* (1999) untersuchten bei *M. tuberculosis* die Transkription aller 10 Gene, die ECF-Sigmafaktoren kodieren. Die Untersuchungen zeigten, daß die Konzentration von mRNA-Transkripten von *sigE*, *sigB* und *sigH* während einer Hitze-Streß-Situation erhöht war. Die Transkription von *sigE* ist zudem während des Wachstums in SDS-haltigem Medium erhöht (Manganelli *et al.* 1999). Die hier gemachten Untersuchungen bestätigen dies, indem sie zeigen, daß SigE an einer erhöhten Überlebensrate nach Hitze- und Detergenz-Streß beteiligt ist.

Bei *E. coli* wird davon ausgegangen, daß SigE an der Kontrolle von Proteasen partizipiert, die nach Hitze-Streß durch fehlgefaltete Proteine im Periplasma induziert werden (Mecbas *et al.* 1993, Connolly *et al.* 1997). Der für *E. coli* gezeigte komplexe Mechanismus der Aktivitätskontrolle über einen Anti-Sigmafaktor läßt vermuten, daß die Kontrolle der Transkription des *sigE*-Gens eine untergeordnete Rolle bei der Regulierung von SigE-abhängigen Promotoren spielt. Hier werden die durch einen Anti-Sigmafaktor sequestrierten, inaktiven SigE-Proteine indirekt durch fehlgefaltete Proteine im Periplasma aktiviert (De Las Peñas *et al.* 1997, Missiakas *et al.* 1997, Ades *et al.* 1999). Ein solcher Mechanismus ist für den mycobakteriellen Sigma-Faktor SigE nicht bekannt.

Das *sigE*-Gen von *M. tuberculosis* wird während der Infektion im Makrophagen stärker transkribiert (Graham und Clark-Curtis 1999), so daß dieser Sigma-Faktor eine Rolle für die Virulenz von Mycobakterien spielen kann, was für den essentiellen Sigma-Faktor SigA bereits gezeigt wurde (Collins *et al.* 1995, Gomez *et al.* 1998). In dieser Arbeit war bei *M. avium* K007, bei der das *sigE*-Gen wahrscheinlich inaktiviert wurde, die Virulenz gegenüber *M.*

avium #5-8 signifikant attenuiert. Dies kann zum einen damit zusammenhängen, daß die Induktion von Proteasen, die bei extrazellulärem Streß induziert werden und für den Abbau fehlgefalteter extrazytoplasmatischer Proteine verantwortlich sind, vermindert ist (Danese und Silhavy 1997). Hierunter können sich auch bislang nicht identifizierte Virulenz-Faktoren befinden. Bei *E. coli* und *Pseudomonas* sp. konnte gezeigt werden, daß der SigE-Faktor an der Zellwandsynthese und an der Aufnahme von Eisen beteiligt ist (Angerer *et al.* 1995, Missiakas und Raina 1998, Raivio und Silhavy 1999). Der Zugang zu und die Aufnahme von Eisen spielt für das Überleben von Mycobakterien während ihrer Persistenz im Phagosom eine wichtige Rolle und ist mit der Regulation von potentiellen Virulenz-Faktoren (KatG und SOD) verknüpft (Manabe *et al.* 1999, DeVoss *et al.* 1999, Zhu *et al.* 1998, Via *et al.* 1996).

In *Streptomyces coelicolor* ist SigE für die Ausbildung einer normalen Zellwandstruktur verantwortlich (Lonetto *et al.* 1994, Paget *et al.* 1999). Möglicherweise ist der mycobakterielle SigE-Faktor auch an der Transkription von Genen beteiligt, die für die Zellwandsynthese verantwortlich sind. Hieraus läßt sich vielleicht eine Erklärung deduzieren, warum *M. avium* K007 beim Wachstum unter *in vitro*-Bedingungen nur solche Zelldichten erreicht, die einen log-Faktor kleiner sind als die Zelldichten von *M. avium* #5-8 (Abbildung 3.12A).

Bei *Bacillus subtilis* wird SigE von einem anderem alternativen Sigma-Faktor (SigK) negativ kontrolliert; hierdurch wird auch die Sporulation der Zelle beeinflußt (Ju *et al.* 1998; Zhang *et al.* 1998). Dies sind nur einige Erklärungen für die möglichen Funktionen des *M. avium*-SigE-Faktors. Es zeigt aber auch, daß die durch SigE regulierten Mechanismen komplex sind und bei Mycobakterien noch weiterer Untersuchungen bedürfen. Die ersten Untersuchungen erhärten die Vermutung, daß der Sigma-Faktor SigE eine Bedeutung für die Virulenz von Mycobakterien hat.

4.5 Größe, Stabilität und Expression von Mig

Die Größe des Mig-Proteins war lange Zeit nicht eindeutig. So deduzierten Plum *et al.* (1997) Mig nach einer Sequenzierung des entsprechenden offenen Leserahmens als ein 30 kDa großes Protein. Andererseits konnte bei heterologer Expression von Mig in *M. smegmatis* jedoch lediglich ein 60 kDa großes Protein bei einer Immunodetektion in Lysaten und unlöslichen Fraktionen nachgewiesen werden. Es gelang damals nicht, dieses Protein direkt aus *M. avium* zu reinigen, um unter anderem auch die Größe von Mig näher zu charakterisieren (Plum, unveröffentlichte Ergebnisse). Bei Western-Blot-Analysen konnten Plum *et al.* (1997) eine 30 kDa-Bande in der unlöslichen Fraktion von säureinduzierten *M. avium*-Kulturen nachweisen und bestimmten so die Größe von Mig. Um größere Mengen des Proteins reinigen zu können konstruierte Plum *et al.* (1997) ein rekombinantes Plasmid (pGPC150), auf dem ein ORF für ein Mig-Fusionsprotein mit sechs carboxyterminalen Histidin-Resten lokalisiert war. Durch diese Histidin-Reste war eine Aufreinigung über eine Ni-NTA-Säule möglich. Nach der Expression in *E. coli* und der Aufreinigung des rekombinanten Mig-His₆-Fusionsproteins konnten Plum *et al.* (1997) ein Protein mit einem Molekulargewicht von circa 28 kDa reinigen. Wurde mit den Elutions-Fractionen, die dieses Protein enthielten, eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese durchgeführt, so wurden neben der Proteinbande von circa 28 kDa auch kleinere Banden beobachtet. Diese Banden konnten anschließend bei einer Immunodetektion mit einem Mig-spezifischen Antikörper identifiziert und als Abbauprodukte des Fusionsproteins eingeordnet werden (Plum, unveröffentlichte Ergebnisse; Abbildung 4.3).

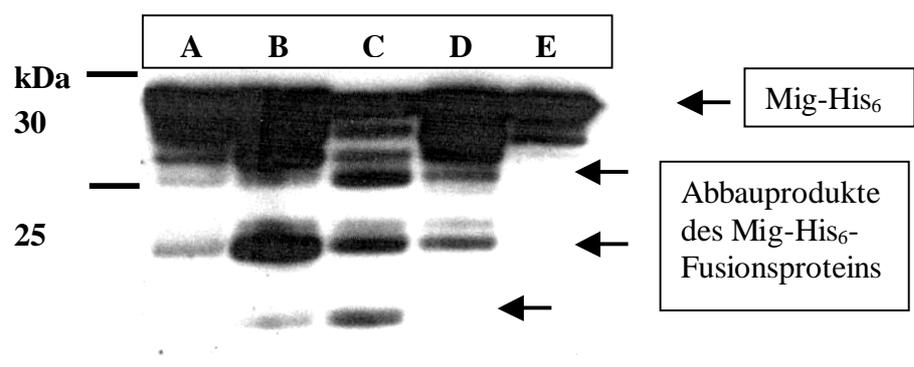


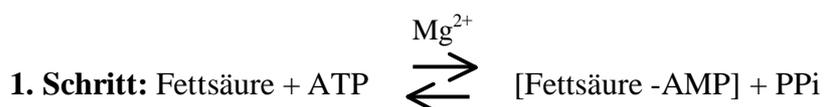
Abbildung 4.3: Immunodetektion eines circa 28 kDa großen Mig-His₆-Fusionsproteins (Mig-His₆), nach einer Aufreinigung aus *E. coli*. Die Spuren A bis E repräsentieren einzelne Fraktionen einer Elution von einer Ni-NTA-Säule mit einem imidazolhaltigen Puffer. Für die Detektion wurde der auch in dieser Arbeit verwendete, affinitätsgereinigte Mig-Antikörper benutzt. (Plum, unveröffentlicht)

In dieser Arbeit konnten bei der Aufreinigung des circa 60 kDa großen aminoterminalen Mig-His₆-Fusionsproteins unter 3.5 nach einer elektrophoretischen Auftrennung in den Elutionsfraktionen (Abbildung 3.15; Abbildung 3.17, Spur His₆) kleinere Banden detektiert werden, die als Abbauprodukte von Mig interpretiert werden müssen. Bei den Immunodetektionen, für die *M. avium*-Zellen aus pH-neutralen Kulturen fraktioniert wurden, konnte Mig als eine 60 kDa große Bande im Lysat und in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen werden (Abbildung 3.17). In der unlöslichen Fraktion traten auch hier immer wieder Abbauprodukte einer Größe von 30 - 35 kDa auf (Abbildung 3.17, Spur 3), die wahrscheinlich von Plum *et al.* (1997) als das 30 kDa große Mig interpretiert wurden. Bei den Immunodetektionen unter 3.7, bei denen die Zellen mit einem Lysispuffer ohne EDTA aufgeschlossen wurden, waren im Lysat und in der unlöslichen Fraktion auch viele Banden zwischen 20 und 35 kDa detektierbar (Abbildung 3.17, Spur 4 und 5). Dies unterstützt die Hypothese, daß es sich bei den kleineren, circa 30-35 kDa großen Banden um Abbau-Produkte des circa 60 kDa großen Mig-Proteins handelt. Alle circa 30 kDa großen Mig-His₆-Fusionsprotein-Derivate sind als Acyl-CoA-Synthetasen nicht aktiv und haben somit wahrscheinlich auch keinen biologischen Sinn für die Zelle. Diese Ergebnisse stützen die Annahme, daß Mig ein circa 60 kD großes, instabiles Protein ist, dessen Größe kohärent mit dem ORF_{mig} ist, der aus der DNA-Sequenz von pHis5 deduziert werden konnte. Diese DNA-Sequenz wurde nicht nur durch die unter 3.6 durchgeführten direkten Sequenzierungen von PCR-Produkten aus *M. avium* belegt, sondern auch durch die vom Tigr-Center im Rahmen des *M. avium*-Genomprojekts veröffentlichte Sequenz des zum *mig*-Gen homologen DNA-Abschnitts. Die von Plum *et al.* (1997) veröffentlichte DNA-Sequenz unterschied sich lediglich durch die Insertion eines Cytosin-Restes.

Die Immunodetektionen machen darüber hinaus die Annahme wahrscheinlich, daß das Gen basal exprimiert wird und eine über die Infektion von Makrophagen hinausgehende Bedeutung besitzt. Mig scheint im Gegensatz zu den von Fitzmaurice und Kolattukudy (1997) charakterisierten Acyl-CoA-Synthetasen von *M. bovis* ein sehr instabiles Protein zu sein. Aus diesem Grund war es nicht möglich, durch eine aminoterninale Sequenzierung zu überprüfen, ob das unter 3.8 postulierte Signal-Peptid im Verlauf der Reifung vom Protein entfernt wird.

4.6 Mig als Acyl-CoA-Synthetase für mittellange und gesättigte Fettsäuren

Acyl-CoA-Synthetasen für Fettsäuren ermöglichen der Zelle, externe Fettsäuren für die Lipid-Biosynthese und für die β -Oxidation nutzbar zu machen. So katalysiert die Acyl-CoA-Synthetase FadD von *E. coli* die Bindung von CoA an die Carboxylgruppe von Carbonsäuren von unterschiedlicher Länge. Mig ist in bezug auf gesättigte Fettsäuren als Substrat auf Fettsäuren mit mittlerer Länge beschränkt (Tabelle 3.2); hier werden zwischen Hexansäure ($C_{6:0}$) und Dodekansäure ($C_{12:0}$) die größten Aktivitäten erreicht. Dies steht im Gegensatz zu FadD von *E. coli*, das auch bei langkettigen Substraten wie der Stearinsäure ($C_{18:0}$) hohe Aktivitäten erreicht (Kameda und Nunn 1981; Black *et al.* 1992; Fulda *et al.* 1994). Allgemein wird bei der Ligation von CoA an die Carboxylgruppen von Fettsäuren ein ATP-Molekül verbraucht. Die Acyl-CoA-Synthetase katalysiert die Formation von Fettsäure-Acyl-CoA in einem Zwei-Schritt-Mechanismus:



Für die erste Reaktion wird Magnesium als zweiwertiges Kation benötigt. Als Zwischenprodukte entstehen PPi und ein Acyl-Adenylat (Fettsäure-AMP). Das Fettsäure-AMP-Zwischenprodukt wird durch die CoA-Synthetase stabilisiert und erst nach der Ligation von CoA an die Carbonsäure wird das fertige Produkt aus der Bindung an das Enzym entlassen. Als wichtiges Motiv besitzt Mig eine AMP-Bindedomäne, die sich von den Aminosäuren 186-197 erstreckt und als Motiv bei allen Acyl-CoA-Synthetasen und Peptidsynthetasen vorkommt. So weisen auch viele Peptidsynthetasen, Enzyme, die meist viel größer als 1000 Aminosäuren sind, Homologien zu Mig auf. Dies ist damit zu erklären, daß Peptidsynthetasen große Homologien zu Acyl-CoA-Synthetasen im Bereich der Adenylierung der Aminosäuren zeigen (Kleinkauf und von Döhren, 1996). Zu den im Blast identifizierten, mit Mig verwandten Peptidsynthetasen gehören die Pristinamycin I-Synthetase von *Streptomyces pristinaespiralis* (deCrecy-Lagard *et al.* 1997) und die Tyrocidin-Synthetase von *Bacillus brevis* (Pavela-Vranic *et al.* 1994). Diese Enzyme besitzen eine Untereinheit, die funktionell unabhängig vom Rest des Enzyms ist und eine Aminosäure-Adenylierung katalysiert (Gocht und Marahiel 1994, Stachelhaus und Marahiel 1995, Mootz und Marahiel 1997). Diese aktivierte Aminosäure wird daraufhin auf ein von der Peptidsynthetase

gebundenes Pantethein-Molekül übertragen. Die so arretierte Aminosäure wird anschließend mit einer zweiten Aminosäure kondensiert, die zuvor auf gleiche Weise an ein anderes Pantethein-Molekül auf der Peptidsynthetase übertragen wurde (Kleinkauf und Döhren 1996, Abbildung 4.4). Die Acyl-CoA-Synthetasen sind mit den Peptidsynthetasen nur in dem Sinne homolog, daß sie den gleichen Mechanismus für die Bildung eines Acyl-Adenylats benutzen (siehe oben, 1. Schritt), deshalb treten Homologien zwischen den Fettsäure-Acyl-CoA-Synthetasen und den Peptidsynthetasen auf (Fulda *et al.* 1994; Black *et al.* 1992). Sie verknüpfen aber im Gegensatz zu Peptidsynthetasen im zweiten Schritt die Fettsäure mit einem CoA-Molekül und setzen diesen Komplex daraufhin frei. Wegen ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten werden Peptidsynthetasen und Acyl-CoA-Synthetasen zusammen mit der Luziferase (Turgay *et al.* 1992; Conti *et al.* 1996) zu der Superfamilie der Adenylat-formierenden-Enzyme gerechnet, die sich anhand von Strukturähnlichkeiten in vier Klassen unterteilen läßt (Fulda *et al.* 1994): die 1. Klasse besteht hauptsächlich aus eukaryontischen Acyl-CoA-Synthetasen, die 2. Klasse aus Peptidsynthetasen, die 3. Klasse aus Acetyl-CoA-Synthetasen und die 4. Klasse aus den prokaryontischen Acyl-CoA-Synthetasen und der Luziferase.

Das Mig-Protein besitzt mehrere Transmembran-Regionen und wurde bei einer Sequenzanalyse durch das Psort-Programm als Membranprotein vorhergesagt (3.8). Die Programme Tmpred und TopPred2 berechneten zwei hochsignifikante Transmembranregionen zwischen den Aminosäuren 245-271 und 309-331 (Tabelle 3.1, Abbildung 4.5). Eine mögliche sekundäre Struktur von Mig wurde mittels PROTEAN berechnet und ist in Abbildung 4.5 wiedergegeben. Interessanterweise besitzt Mig ein aminoterminales Signal-Peptid, das für den Exprot beziehungsweise für die Integration von Proteinen in die Zytoplasmamembran verantwortlich ist (Manting und Driesen 2000; Bernstein 2000). Dieses kommt bei den verwandten Proteinen FadD19 von *M. tuberculosis* (Cole *et al.* 1998) und FadD von *E. coli* nicht vor (Black *et al.* 1992).

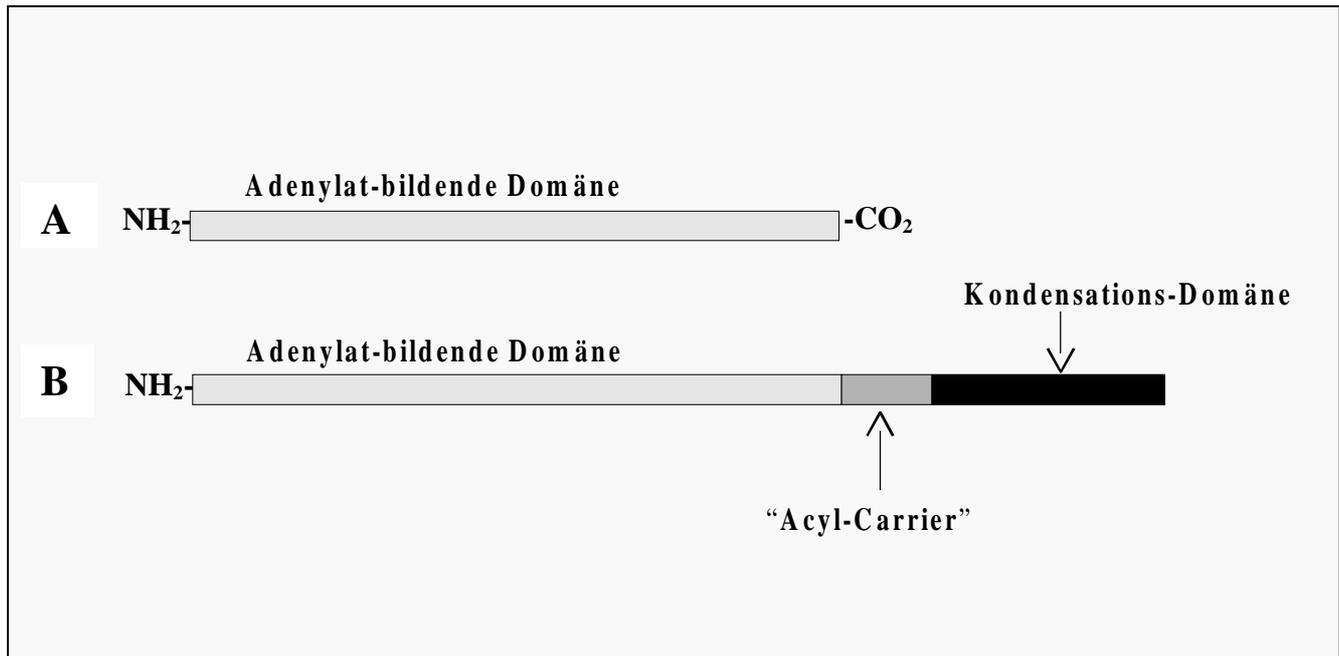


Abbildung 4.4: Vergleich einer Acyl-CoA-Synthetase und einer typischen Peptid synthetase-Untereinheit nach Kleinkauf und von Döhren 1996. Eine Acyl-CoA-Synthetase (A) besitzt wie eine Peptid synthetase-Untereinheit (B) eine Adenylat-bildende Domäne (hellgrau); hier wird bei beiden Enzymen ein Adenylat-Komplex mit dem Substrat unter Verbrauch von ATP gebildet. Bei den deutlich größeren Peptid synthetasen wird die Aminosäure auf ein Pantethein-Molekül übertragen, das an die „Acyl-Carrier“-Domäne (dunkelgrau) gebunden ist. Dieser Komplex wird dann epimerisiert und / oder mit einer weiteren Aminosäure verknüpft (schwarze Domäne). Die andere Aminosäure wurde über den gleichen Mechanismus auf einer weiteren Untereinheit des gleichen Proteins an ein Pantethein-Molekül gebunden. Bei den Acyl-CoA-Synthetasen wird zum Beispiel Dekansäure an ein CoA-Molekül geknüpft, und dieser Komplex wird freigesetzt.

Bislang wurde nur eine weitere Acyl-CoA-Synthetase aus Mycobakterien näher charakterisiert (Fitzmaurice und Kolattukudy 1997). Die Acyl-CoA-Synthetase stammt aus *M. bovis* und wurde in einem Operon entdeckt, in dem zusätzlich das Gen für die Mycocerosic-Synthase lokalisiert ist. Es konnte gezeigt werden, daß diese Acyl-CoA-Synthetase für die Synthese von Mycocerosyl-Lipiden essentiell ist (Fitzmaurice und Kolattukudy 1998). Sie besitzt jedoch keine großen Homologien zu Mig (15 % identische und 25 % ähnliche Aminosäuren), wie ein Sequenzvergleich mit ClustlW zeigte (Abbildung 4.6).

Mig	1	MSDTTIAFTVPAVAKAVAAAI	PDRELI IQGDRRYTYRQVIERSNRLAAYLHSQGLGCHTE
AcoAS	1	--MAMSVRSIPALRACACLO	PHDPAFTFMDYEQDWDGVAITLTWSQLYRRTLNVARELS
Mig	61	REALACHEVQDLLGLYANGNEFVEALLGAFARVAP-----FNVNFRYVKSELHY	
AcoAS	59	RCCSTGDRVVISAPQGLEVVVAFVFLGALQAGRIVPLSVPOGGVTDERSDSVLSDS	SPVAI
Mig	113	LLADSEATALYHAAFAPR-----VAEILPELPRLRVLIQIAD	ESGNELDGAVDYED
AcoAS	119	LTTSSAVDDVVOHVARRPGESPPSIEVDLILDLDAPNGYTFKED	EYPSTAYLQYTSGSTR
Mig	166	ALASVSAQPPPVRHCPD	DLVLYTCGTTGMPKG----VLWR--QHDIFMTSFGGRNLMTG
AcoAS	179	TPAGVVMHQVVRVNF	EQLMSCYFADIDGIPPPNSALVSWLPPFYHDMGLVIGICAPILGG
Mig	220	EPSSSIDEIVQRAASCPGTKLMILPPLIHGAAQWSVMTAITTGQ	TVVFPTVVDHLDAEDV
AcoAS	239	YPAVLTSEVVSFLQRP	ARWHELMASDFHAFSAAPNFVAFELAARRTIDDDMAGRDLGNILTI
Mig	280	VRTIEREKVMVTVVGDAMARPLVAAIEKGLADVSSLAVVANGG	ALLTPFVKQRLIEVLP
AcoAS	299	LSGSEERVQAATIKRFADRFAR--FNLQERVIRPSYGLAEATVYV	ATSKPGQPETVDFDT
Mig	340	NAVVDVGVSSETCAQMHMS	TPGAVATGTFNAGPDTFVAEDLSAILPPGHEGMGWLAAQ
AcoAS	357	ESLSAGHAKPCAGGCATSLISYMLPRSPIVRIVDS	DTCECPDGTVGEIWHGDNVNGY
Mig	400	RGYVPLGYKGDAAKTAKTFEVIDGVRMAVPGDRARHHADGHI	ELIIGRDSVCINSNGGEKIF
AcoAS	417	WQKPDESERTFGGKIVTPSPGTPEGPNLRTGD-SGFVTDGKMF	IIGRIKDLIVYGRNHS
Mig	460	VEEVEETATASHPAVADV	VACRPSERWQEVVAVALSDGAAVDAG-----ELIA
AcoAS	476	PDDIEETIQEITRGRCA	ALS-VPGDRRTEKLVAVIIEIKKRGSDQDAMARLGAIKREVT
Mig	510	HASNLSARYKLPKATVFRPV	TERSPSGKADYRWAREQAVNG-----
AcoAS	535	ALSSSHCLSVADLV	VAPGSLPIITSGKVRRGACVEQYRQDFARLDA

Abbildung 4.6: Homologievergleich der Aminosäuresequenzen von Mig aus *M. avium* und der Acyl-CoA-Synthetase AcoAS aus *M. bovis* (Fitzmaurice und Kolattukudy 1997) mit dem Programm ClustlW. Die identischen- und ähnlichen-Aminosäuren sind schwarz bzw. grau markiert.

Zur Aktivitätsbestimmung von Mig wurde in dieser Arbeit eine Methode gewählt, die indirekt die Bildung von AMP mißt und erfolgreich für die Benzoyl-CoA-Synthetasen benutzt wurde (Ziegler *et al.* 1989, Altenschmidt *et al.* 1993). Ein ähnliches Verfahren wurde auch von Tanaka *et al.* (1981) verwendet, um die Aktivität von Acyl-CoA-Synthetasen für langkettige Fettsäuren zu messen. Ein Nachteil dieser Arbeitsweise ist eine schwankende Hintergrundsaktivität, welche die Messung von schwachen Aktivitäten erschwerte. Jedoch waren die im Ergebnisteil aufgeführten Werte für die einzelnen Substrate und für den

Hintergrund über mehrere Messungen konstant, so daß auch bei geringeren Aktivitäten ($3 \text{ nMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$) gesicherte Werte mit diesem Verfahren gemessen werden konnten. Dagegen wurde aufgrund des enzymatischen Nachweisverfahrens auf eine Bestimmung der Abhängigkeit der Mig-Enzymaktivität von der Temperatur und dem pH-Wert verzichtet.

Interessanterweise konnte für Mig im Gegensatz zu anderen Acyl-CoA-Synthetasen von *E. coli* und *M. bovis* (Kameda und Nunn 1981, Fitzmaurice und Kolattukudy. 1997) keine Aktivität für Palmitinsäure ($\text{C}_{16:0}$) gemessen werden. So kann angenommen werden, daß Mig im Gegensatz zu den wenigen anderen bislang untersuchten Acyl-CoA-Synthetasen nur mittellange gesättigte Fettsäuren bis zur Tetradekansäure umsetzen kann. Die Acyl-CoA-Synthetase für mittellange Fettsäuren der Ratte besitzt auch bei Palmitinsäure als Substrat deutliche Aktivitäten. Dieses Enzym weist bei der Messung einer Kinetik mit Oktansäure eine biphasische Kurve und mit Palmitinsäure eine hyperbolische Kurve auf (Okkubo *et al.* 1992). Mig zeigte dagegen bei der Bestimmung der Kinetiken für Oktansäure, Dekansäure und Dodekansäure einen hyperbolischen Verlauf. Auch die Aktivitäts-Verläufe von Mig bei variablen CoA- und ATP-Konzentrationen für die Bestimmungen der K_m -Werte waren hyperbolisch. Die gemessenen K_m -Werte für ATP ($36 \mu\text{M}$) und CoA ($45 \mu\text{M}$) zeigten, daß die für die Testansätze eingesetzten Konzentrationen für diese beiden Substanzen im Sättigungsbereich des Enzyms lagen und somit bei den Bestimmungen der Kinetiken für die einzelnen Substrate keine Rolle mehr spielten. Mig besitzt auch die Eigenschaft, einige aromatische Substrate wie 2-Aminobenzoessäure umzusetzen (Tabelle 3.4); dies hat Mig mit anderen Acyl-CoA-Synthetasen für mittellange Fettsäuren gemeinsam. Weitere Enzyme mit diesen Eigenschaften sind in diesem Zusammenhang die AcoAS von *Pseudomonas putida* und der Ratten-Niere (Fernandez-Valverde *et al.* 1993, Kasuya *et al.* 1999). Die Funktion, auch aromatische Carbonsäuren mit CoA zu ligieren, wird bei Säugetieren mit der Entgiftung des Körpers von toxischen Benzoessäure-Derivaten und anderen heterozyklischen Kohlenwasserstoffen in Zusammenhang gebracht (Kasuya *et al.* 1999). Mig kann dagegen Phenolessigsäure nicht als Substrat verwerten, die zum Beispiel von der AcoAS von *P. putida* umgesetzt wird. Dieses Enzym kann auch im Gegensatz zu Mig Carbonsäuren umsetzen, die kürzer als Pentansäure sind (Fernandez-Valverde *et al.* 1993).

Für Mig konnte die höchste Aktivität ($510 \text{ nMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$) gemessen werden, wenn man Dekansäure als Substrat einsetzte. Jedoch hat Mig zu dieser Fettsäure eine deutlich geringere Affinität (K_m : $1775 \mu\text{M}$) als zu Oktansäure (K_m : $285 \mu\text{M}$) oder Dodekansäure (K_m : $20 \mu\text{M}$); bei diesen beiden Fettsäuren lag V_{max} bei 183 beziehungsweise $163 \text{ nMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$. Im

Gegensatz zu Mig besitzt FadD von *E. coli* deutlich größere Affinitäten zu gesättigten Fettsäuren und deutliche höhere Umsatzgeschwindigkeiten zum Beispiel für Dekansäure (FadD: Km: 4,3 μM ; V_{max} : 1250 $\text{nMol min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$) und Dodekansäure (Km: 1,6 μM ; V_{max} : 2632 $\text{nMol min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$) (Kemada und Nunn 1981). In Tabelle 4.1 sind einige ausgewählte Michaelis-Menten-Konstanten (Km) und Enzym-Aktivitäten (V_{max}) von unterschiedlichen CoA-Synthetasen mit verschiedenen Substanzen als Substrat aufgelistet.

Tabelle 4.1: Einige CoA-Synthetasen im Vergleich in bezug auf Michaelis-Menten-Konstante (Km) und maximale Enzym-Aktivität (V_{max}). Referenzen: 1) Kumeda und Nunn (1981); 2) Fitzmaurice und Kolattukudy. (1997); 3) Okkubo *et al.* (1992); 4) Kasuya *et al.* (1999); 5) Fernandez-Valverde *et al.* (1993); 6) Grogan und Huth (1986); 7) Altenschmidt *et al.* (1993); Mohamed (2000). Abkürzungen: ACoAS: Acyl-CoA-Synthetase; BCoAS: Benzoyl-CoA-Synthetase; PCoAS: Phenyllessigsäure-CoA-Synthetase; -⁺): keine Angaben in der Literatur

Enzym	Substanz	Km (μM)	V_{max} ($\text{nMol min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$)
Mig	Dodekansäure	20	163
FadD ¹⁾	Dodekansäure	1,6	2632
ACoAS (<i>M. bovis</i>) ²⁾	Dodekansäure	- ⁺	201
ACoAS (Ratte, intestinal) ³⁾	Palmitinsäure	38	2,5
ACoAS (Ratte, Niere) ⁴⁾	Hexansäure	- ⁺	4300
ACoAS (<i>P. putida</i>) ⁵⁾	Ethansäure	4000	160
ACoAS (Ratte, testikulär) ⁶⁾	Palmitinsäure	74	9
BCoAS (<i>P. spec.</i>) ⁷⁾	Benzoessäure	11	149000
PCoAS (<i>Azoarcus Evansii</i>) ⁸⁾	Phenyllessigsäure	14	48000

Eine weitere Eigenschaft des Enzyms Mig ist, daß es sich durch 2-Hydroxy-Dodekansäure inhibieren läßt. Diese Substanz kann Mig selber nicht umsetzen. Auch die Aktivität von AcoAS für mittellange Fettsäuren der Ratten-Niere wird durch diese Substanz inhibiert (Kasuya *et al.* 1999). Die Inhibierung von Mig lag aber bei 100 μM lediglich bei ca. 36%, wohingegen die Inhibierung der von Kasuya *et al.* 1999 beschriebenen Acyl-CoA-Synthetase schon bei einer 2-Hydroxy-Dodekansäure-Konzentration von 75 μM bei knapp 75 % lag.

Die ACoAS von *M. bovis* ist wie FadD von *E. coli* ein membranständiges Protein, obwohl es im Gegensatz zu Mig keine Transmembran-Regionen hat (Fitzmaurice und Kolattukudy 1997). Dieses Enzym besitzt drei Domänen, die für die Funktion des Enzyms kennzeichnend sind. Eine Domäne gilt als AMP-Bindungsstelle (Domäne I), die mit der für Mig oben beschriebenen Domäne identisch ist, und die beiden anderen Domänen (II und III) sind für die Substratspezifität verantwortlich (Fitzmaurice und Kolattukudy 1997); dieses Modell wurde erstmals von Jackowski *et al.* (1994) postuliert. Ein anderes Modell, das von Pfeiffer *et al.* 1995 für Peptidsynthetasen aufgestellt wurde, bestimmte für die Kennzeichnung der

Adenylierungs-Untereinheit neben dem hier schon besprochenen AMP-Bindemotiv noch acht weitere Motive, die für die Eigenschaften dieser Untereinheit verantwortlich sein sollen. Bei Mig konnten lediglich die AMP-Bindedomäne (3.8) und die Domäne III in dem von Jackowski *et al.* (1994) postulierten Modell klar identifiziert werden. Diese Domäne III ist mit der von Black *et al.* (1997) postulierten Domäne bei FadD von *E. coli* identisch, die für die Substratspezifität von Fettsäuren verantwortlich sein soll. Die Autoren konnten durch Mutationen, die sie in diese Domäne eingefügt hatten, feststellen, daß durch den Austausch einzelner Aminosäuren die Aktivität des Enzyms entweder für Dekansäure oder die längerkettige Ölsäure unterbunden werden konnte. In Abbildung 4.7 sind die beiden Domänen dargestellt.

Domäne I

Mig	184	IYVLYTGGTTGMPKGYLWRQ	203
FadD19	168	LYLLYTGTTGF PKGVMWRH	187
ACoAS	168	AYLQYTSSTRTPAQVVMSE	187
FadD	209	AFLLQYTGTTGVAKGA MLTH	228
AlkK	179	SSLQYTSSTTGNPKGVLYSH	198
AlkK-5	173	AFLLSYTIGTTGEPKGVWFTH	192
FAAI	273	CCIMYTSSTGEPKGVVLKH	292

Domäne III

		1	2	3	4			
Mig	422	DGVR	YAVP	GDRA	RHHADGH	IELLGRDS	446	
FadD19	407	NGVR	YAI	PGDYA	QVEEDG	TVTMLGRGS	431	
FadD	431	NG	--	WLHTGDI	VIMDESYSLR	IVDRK	455	
AlkK-5	407	GG	--	WLHTGDI	AVMDEEGYIT	IVDRK	431	
AlkK	410	DG	--	WFSTGDI	VATIDSDFMT	ICDRAK	434	
ACoAS	441	EGP	WLR	--	TGDSGTV	--	TDGKMR	464
FAA1	527	DG	--	WFKTGD	IGWEANGHLK	IIDRKK	551	
FAA2	531	DG	--	WFSTGDI	VAFIDGKGR	ISVIDRVK	555	
FAA3	567	DG	--	WFRTGDI	VEWTPK	QOLKIIDRKK	59	

Abbildung 4.7: Sequenz-Homologievergleich der Domänen I und III von Acyl-CoA-Synthetasen nach Jackowski *et al.* (1994). Die Domäne I entspricht der AMP-Bindedomäne der Adenylat-bildenden Enzyme (Fulda *et al.* 1994). Die Domäne III entspricht der von Black *et al.* (1997) postulierten Domäne, die für die Substratspezifität für Fettsäuren verantwortlich ist. Die für eine Erkennung von mittellangen (Dekansäure) und von langen (Ölsäure) Fettsäuren verantwortlichen Aminosäuren sind durch einen grauen Kasten eingerahmt. Die mit den Kästen 1 und 2 markierten Aminosäuren sind für Dekansäure spezifisch, die mit 3 und 4 markierten Aminosäuren für Ölsäure. Referenzen: ACoAS (Fitzmaurice *et al.* 1997); AlkK (van Beilen *et al.* 1992); AlkK-5 (Klenk *et al.* 1997); FAA1 (Durano *et al.* 1992); FAA2 (Johnson *et al.* 1994); FAA3 (Knoll *et al.* 1994); FadD (Black *et al.* 1992); FadD19 (Cole *et al.* 1998). Die identischen Aminosäuren sind schwarz markiert.

Mig zeigte nicht nur für mittellange, gesättigte Fettsäuren wie beispielsweise Dekansäure (C_{10:0}) als Substrat eine Aktivität, sondern auch ungesättigte Fettsäuren wie Ölsäure (C_{18:1}) oder Arachidonsäure (C_{20:4}) (Tabelle 3.4) konnten als Substrate für dieses Enzym eingesetzt werden. Interessanterweise unterscheidet sich das Motiv von Domäne III zwischen FadD und Mig deutlich. Von den jeweils zwei Aminosäuren, die für die Erkennung von Ölsäure oder Dekansäure essentiell sein sollten, ist bei Mig lediglich die Aminosäure in der Position von Kasten 2 (Abbildung 4.7, Domäne III) mit der FadD-Sequenz identisch. So ist diese Domäne zwar hochkonserviert für langkettige Fettsäure-Acyl-CoA-Synthetasen (Black *et al.* 1997; Jackowski *et al.* 1994), jedoch scheint dieser Bereich allein nicht für die Substratspezifität verantwortlich zu sein. Ansonsten hätte Mig keine Aktivitäten mehr mit den beiden Substraten zeigen dürfen. Möglicherweise nutzen Acyl-CoA-Synthetasen für mittellange Fettsäuren ein bislang unbekanntes Motiv, mit dem sie ihre Substrate erkennen. Durch Vergleiche besonders der Acyl-CoA-Synthetasen, die bislang als Synthetasen für mittellange Fettsäuren charakterisiert oder als solche postuliert wurden, konnte ein mögliches weiteres konserviertes Motiv identifiziert werden. Dieses Motiv ist carboxyterminal von der Domäne III lokalisiert und überschneidet sich mit dieser in 19 Aminosäuren. Bei dieser neu postulierten Domäne M lagen die Frequenzen der identischen Aminosäuren zwischen 14/35 (Mig) bis 26/35 (AlkK) (Abbildung 4.8). Wenn man diese Domäne in zwei Hälften teilt und die Trennungslinie zwischen die Bereiche legt, die sie in den Bereich 1, der mit der Domäne III homolog ist, und in den Bereich 2, der carboxyterminal von Domäne III liegt, teilt, unterscheiden sich die Homologien zwischen Acyl-CoA-Synthetasen für mittellange und lange Fettsäuren. Es zeigt sich, daß die Homologien im Bereich 2 bei den Acyl-CoA-Synthetasen für mittellange Fettsäuren deutlich größer sind als die im Bereich 1, die bei Acyl-CoA-Synthetasen für langkettige Fettsäuren konserviert sind (Black *et al.* 1997). Die Enzyme für die mittellangen Fettsäuren besitzen alle die vier Aminosäuren SGGE im Bereich 2 (Abbildung 4.8). Ob diese Domäne etwas mit der Substratspezifität zu tun hat, bleibt spekulativ und bedarf weiterer Untersuchungen.

Domäne M

		Bereich 1	Bereich 2	
Mig	430	GDRARHHDGHIPELLGRDSVCI	INSGGEEKIFVEEVE	464
AlkK	416	GDVATIDSDGFMITCDRAKDI	IKSGGEWISTVELE	450
Dein	455	GDIATLDERGYMHIQDRSK	DLIKSGGEWIGSVELE	489
AlkK-5	412	GDIAVMDEEGYITIVDRK	DVVKSGGEWISTLTLE	446
FadD	436	GDIAVMDEEGFLRIVDRKK	DMILVSGFNVYPNEIE	470
FadD19	415	GDYAQVEEDGTVITMLGRGSVS	INSGGEEKVYPEEVE	449
AcoAS	448	GD-SGFVTDCKMFLIGRIK	DLIVYGRNHSPDDIE	482

Abbildung 4.8: Domäne M der Acyl-CoA-Synthetasen für mittellange Fettsäuren: AlkK (van Beilen *et al.* 1992); AlkK-5 (Klenk *et al.* 1997); Dein (*Deinococcus spec.* GenBank B75265); Mig (diese Arbeit) und der Acyl-CoA-Synthetasen für langkettige Fettsäuren: FadD (Black *et al.* 1992); FadD19 (Cole *et al.* 1998); ACoAS (Fitzmaurice *et al.* 1997). Die identischen Aminosäuren sind schwarz markiert. Näheres siehe Text

Abschließend sei darauf hingewiesen, daß der Bereich 2 sich mit der Position des Motivs G von Pfeifer *et al.* (1995) überschneidet, jedoch fehlen bei Mig größere Homologien zu der dort beschriebenen Sequenz des Motivs.

4.7 Die Promotor-Region des mig-Gens und das „One-Hybrid-System“

Von den mycobakteriellen Promotoren stehen diejenigen im Mittelpunkt des Interesses, die intrazellulär im Makrophagen induziert werden, um über diese Promotoren mögliche Virulenzgene zu identifizieren (Barker *et al.* 1998, Ramakrishnan *et al.* 2000). Allgemein besitzen Mycobakterien 13 unterschiedliche Sigma-Faktoren, die für eine differentielle Transkription der Gene verantwortlich sind (DeMaio *et al.* 1996, Cole *et al.* 1998, Manganeli *et al.* 1999).

Auch die allgemeine Struktur von mycobakteriellen Promotoren wurde in den letzten Jahren untersucht (Dellagostin *et al.* 1995, Bashyam *et al.* 1996). Die mycobakteriellen RNA-Polymerasen weisen Homologien zu anderen prokaryontischen RNA-Polymerasen auf; jedoch konnte gezeigt werden, daß die RNA-Polymerasen von *E. coli* oder *Bacillus subtilis* von einigen mycobakteriellen Promotoren aus keine oder lediglich schlecht eine Transkription initiieren können (DasGupta *et al.* 1993, Preding *et al.* 1995). Die -10-Regionen der mycobakteriellen Promotoren besitzen große Homologien zu den *E. coli*-10-Regionen; für dieses Motiv wird folgende Konsensus-Sequenz angenommen: 5'-TANNAT-3' (Bashyam *et al.* 1996). Dagegen besitzen die putativen -35-Regionen keine

großen Homologien zu dem entsprechenden *E. coli*-Motiv. Sie sind bei Mycobakterien weder für die Promotorstärke essentiell noch konserviert (Kremer *et al.* 1995, Bashyam *et al.* 1996). Ein anderes Motiv, das „TGN-Motiv“, wird häufig stromaufwärts der –10-Region bei mycobakteriellen Promotoren identifiziert. Diese Sequenz ist für die Promotorstärke der sogenannten „Extended –10“ Promotoren essentiell (Kenny und Churchward 1996, Bashyam und Tyagi 1998).

In dieser Arbeit sollte eine mögliche Regulation der von Plum *et al.* (1997) postulierten Promotor-Region des *mig*-Gens untersucht werden. Ein stromaufwärts des ORF_{*mig*} gelegener DNA-Abschnitt (Nukleotide 354-431 der Sequenz U43598) wurde hierbei als ein möglicher *mig*-Promotor identifiziert. In diesem Bereich befindet sich ein 23 bp langer DNA-Abschnitt, der eine DNA-Sequenz mit einem für Mycobakterien relativ hohen AT-Gehalt von 57 % besitzt. Hier befindet sich auch eine mögliche –10-Region (5'-TAGCAT-3'), die eine starke Homologie zu der mycobakteriellen –10-Konsensus-Sequenz besitzt (Bashyam *et al.* 1996). Dieser Promotor konnte auch mit einem Promotorsuchprogramm für *E. coli*-Promotoren (NNPP) identifiziert werden.

Eine Messung der Promotorstärke des *mig*-Promotors konnte nicht in *M. avium* durchgeführt werden, da eine stabile Transformation mit dem Plasmid pGPC251 nicht möglich war. Die Messungen wurden deshalb in der schnell-wachsenden Art *M. smegmatis* durchgeführt. In vorhergehenden Untersuchungen konnte verifiziert werden, daß Promotor-Erkennung und -Spezifität bei langsam- und schnell-wachsenden Mycobakterien hochkonserviert sind (Dellagostin *et al.* 1995, Bashyam *et al.* 1996, Mulder *et al.* 1999). Aufgrund dieser Untersuchungen konnte angenommen werden, daß die mit *M. smegmatis* durchgeführten Promotorstärkemessungen mit Einschränkungen auf *M. avium* zu übertragen sind. Wie nach der Immunodetektion des Mig-Proteins aus Zellextrakten von *M. avium* Kulturen erwartet, war der Promotor von *mig* konstitutiv aktiv. Dellagostin *et al.* (1995) untersuchten konstitutive und im Makrophagen induzierte Promotoren von langsam-wachsenden Mycobakterien. Die –10-Regionen der in Mycobakterien konstitutiv aktiven Promotoren für das *hsp60*-Gen von *M. bovis* BCG und für das 28 kDa Gen von *M. leprae* waren zu der –10-Region von *mig* homolog. Dagegen zeigte die –35-Region keine großen Homologien (Abbildung 4.9). Im Gegensatz dazu war der Promotor des Makrophagen-induzierten 18 kDa Gens von *M. leprae* weder in der –10- noch in der –35-Region zu dem *mig*-Promotor homolog. Beide konstitutiv aktiven Promotoren weisen wie der *mig*-Promotor und im Gegensatz zum induzierten Promotor eine fast perfekte Homologie zu der Konsensus-Sequenz

der -10-Region von Mycobakterien auf (Abbildung 4.9). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß die *mig*-Promotor-Region eine konstitutive Aktivität besitzt.

	-35-Region	-10-Region
A <i>M. leprae</i> 18 kDa Gen	5' -TTGCAT-3'	5' -CTAT AT -3'
B <i>M. avium mig</i> Gen	5' -AGATCT-3'	5' - TAGCAT -3'
C <i>M. leprae</i> 28 kDa Gen	5' -TGCTCA-3'	5' - TACCAT -3'
D <i>M. bovis</i> BCG <i>hsp60</i> Gen	5' -TTGCAC-3'	5' - AAGAAT -3'
Konsensus-Sequenz		5' - TANNAT -3'
Konsensus-Sequenz (<i>E. coli</i>)	5' -TTGACA-3'	5' - TATAAT -3'

Abbildung 4.9: Vergleich der -10- und der -35-Regionen von nicht induzierten (C und D) und Makrophagen-induzierten Promotoren (A) (Dellagostin *et al.* 1995) mit dem von Plum *et al.* (1997) postulierten *mig*-Promotor. Konsensus-Sequenz für mycobakterielle -10-Region nach Bashyam *et al.* (1996). Identische Basen sind schwarz markiert.

Der *mig*-Promotor ließ sich leicht induzieren (Faktor 1,24) wenn *M. smegmatis*/pGPC251 in Gegenwart von H₂O₂ oder bei einem pH-Wert von 5,5 angezogen wurde, um eine Infektion im Makrophagen zu simulieren (Tabelle 3.5 A). Diese Beobachtungen bestätigen die von Plum und Clark-Curtiss (1994) beschriebenen Ergebnisse, die jedoch eine deutliche Induktion der Transkription des *mig*-Gens während einer mycobakteriellen Infektion im Makrophagen konstatierten. Der Effekt der Induktion war in dieser Arbeit zwar nicht signifikant, jedoch konnten Batoni *et al.* (1998) zeigen, daß der *hsp60*-Promotor von *M. bovis*, der von Dellagostin *et al.* (1995) als rein konstitutiver Promotor charakterisiert wurde, in *M. avium* nach der Infektion im Maus-Makrophagen um den Faktor 3 induziert wird. Genau wie der *mig*-Promotor in dieser Arbeit ließ sich der *hsp60*-Promotor in *M. avium* nur leicht induzieren wenn die *M. avium*-Zellen in Gegenwart von H₂O₂ angezogen wurden (Batoni *et al.* 1998). Dies kann damit zusammenhängen, daß das (die) Signal(e) für eine Induktion eines Makrophagen-induzierten Promotors artspezifisch ist (sind). So sind zum Beispiel die Arten *M. avium* und *M. tuberculosis* gegenüber einem erniedrigten pH-Wert unterschiedlich sensitiv (Gomes *et al.* 1999b, 1.3). Auch auf oxidativen Streß können unterschiedliche Mycobakterien-Arten aufgrund ihrer spezifischen Zellwandstruktur unterschiedlich sensitiv reagieren (4.8.2). Die *mig*-Promotoraktivität war auch dann erhöht (Dekansäure: Faktor 1,68), wenn *M. smegmatis*/pGPC251 in Gegenwart von Fettsäuren angezogen wurde. Dies ist mit dem *fadD*-Promotor von *E. coli* vergleichbar, der in Gegenwart von Fettsäuren um das zwei- bis dreifache induziert wird (Faergeman und Knudsen 1997, Di Russo und Black 1999). Die Induktion in der *E. coli*-Zelle geschieht durch aktivierte Fettsäuren (zum Beispiel durch

Palmityl-CoA), die durch Bindung an FadR, ein Repressor-Protein des *fadD*-Promotors, eine geringere Affinität zwischen Promotor und FadR verursachen (Faergeman und Knudsen 1997). Allgemein dient das FadR-Protein als Regulator für die Transkription der Gene des Fettsäurestoffwechsels bei *E. coli* (Farewell *et al.* 1996).

Im Gegensatz zu der Aktivität des *fadD*-Promotors in *E. coli*, die in der stationären gegenüber der logarithmischen Wachstumsphase um das 10-fache erhöht ist (Farewell *et al.* 1996), ist der *mig*-Promotor während der logarithmischen Wachstumsphase um das 2,5-fache gegenüber der stationären Wachstumsphase erhöht (Tabelle 3.5B). Dies hängt möglicherweise mit dem hohen Bedarf an Fettsäuren bei Mycobakterien zusammen; der Anteil von Lipiden am Zelltrockengewicht liegt hier bei über 40 % gegenüber 5 % bei *E. coli* (Fritsche 1990). Es kann darüber hinaus auch damit zusammenhängen, daß *M. avium* während der logarithmischen Wachstumsphase Fettsäuren zur Energie-Gewinnung katabolisiert (McCarthy und Ashbaugh 1981, 4.8).

Interessanterweise konnten auf dem *mig*-Promotor drei DNA-Sequenzen identifiziert werden, die homolog zu den Erkennungs-Sequenzen für den Repressor FadR auf dem *fadD*-Promotor von *E. coli* sind (Black *et al.* 1992). Dies ist um so erstaunlicher wenn man den GC-Gehalt dieser beiden Spezies vergleicht, der bei *E. coli* bei 50 % und bei Mycobakterien bei 65 % liegt. Eine dieser möglichen Operator-Sequenzen (O.D.B) liegt genau wie die Sequenz O.D.1 des *fadD*-Promotors auf der -10-Region, so daß die potentielle Bindungsstelle für dieses Regulator-Protein sich mit einer Erkennungsstelle der RNA-Polymerase überschneidet (Fulda *et al.* 1994). In diesem Bereich der *E. coli*-RNA-Polymerase sind große Homologien zu der mycobakteriellen RNA-Polymerase bekannt (Bashyam *et al.* 1996). Die anderen beiden Sequenzen O.D.A und O.D.C haben mit der von Black und diRusso (1994) beschriebenen Konsensus-Sequenz acht beziehungsweise sieben der zwölf hochkonservierten Nukleotide gemeinsam. Da der genaue Startpunkt für den von Plum *et al.* (1997) postulierten *mig*-Promotor wegen des hohen GC-Gehaltes durch Starterverlängerungs-Experimente nicht gefunden werden konnte (Plum, persönliche Mitteilung), wurde mit dem Programm NNPP der Startpunkt der Transkription errechnet. Die in Abbildung 4.10 beschriebenen Positionen beziehen sich auf diesen errechneten Startpunkt der Transkription (Abbildung 1.2).

O.D.1 (-29 bis -13)	5'-AGCTGGTATGATGAGTT-3'
O.D.2 (-115 bis -99)	5'-GGCTGGTCCGCTGTTTC-3'
O.D.A (-165 bis -149)	5'-GGCTGTTCCGGCATGGTG-3'
O.D.B (-14 bis +2)	5'-CGCTAGCATGACGGCGG-3'
O.D.C (+36 bis +52)	5'-TGATGGTCCGCCTGCTA-3'
Konsensus-Sequenz	5'-ANCTGGTCNGANCNGTN-3'

Abbildung 4.10: Identifizierte und für die *mig*-Promotor-Region prognostizierte Bindestellen für FadR bei *E. coli* und ein potentielles FadR-Protein von *M. avium*. Die Sequenzen für O.D.1 und O.D.2 stammen aus Black *et al.* (1992), die Konsensus-Sequenz aus Black und DiRusso (1994).

Ein weiterer Punkt dieser Arbeit war die Identifizierung eines Gens bei *M. avium*, das an die hier untersuchte Promotor-Region binden kann und einen Einfluß auf die Regulation hat. Da *M. avium* bis zum Sommer 2000 noch nicht vollständig sequenziert war, ist es bislang unklar, ob dieser Organismus ein homologes Gen für ein FadR-Regulator-Protein besitzt. Es sind aber auch weitere an den *mig*-Promotor bindende Proteine denkbar, da diese Promotor-Region neben den potentiellen FadR-Bindestellen auch Palindrome besitzt (Abbildung 1.2). Da eine Transposon-Mutagenese wegen der schlechten und instabilen Transformation dieser Spezies nicht möglich war, wurde ein „One-Hybrid-System“ in *E. coli* durchgeführt, um einen möglichen Regulator der *mig*-Promotor-Region zu identifizieren. Hierbei wurde versucht, über eine Cosmid- beziehungsweise Expressions-Bibliothek *mig*-Promotor-Derivate, die mit einem Reporter gen fusioniert waren, entweder zu hemmen oder zu aktivieren. Hierbei wurde versucht, den Wildtyp-Promotor, der in *E. coli* inaktiv ist, zu induzieren und einen in *E. coli* aktiven *mig*-Promotor, der eine inserierte Konsensus-Sequenz für die -35-Region von *E. coli* besaß, zu hemmen.

Bei diesem Test konnten lediglich Klone identifiziert werden, die den mutagenisierten und aktiven *mig*-Promotor auf pCM4 inhibierten. Dagegen konnte bei einer Anzahl von Klonen, die das *M. avium*-Genom zu über 99,99 % abdeckten, kein Klon identifiziert werden, der den Wildtyp-Promotor in *E. coli* aktivieren konnte. So kann angenommen werden, daß die auf den Plasmiden kodierten möglichen Transkriptionsfaktoren wahrscheinlich Repressoren sind.

Drei Klone konnten identifiziert werden, die eine abgeschwächte Galaktosidase-Aktivität zeigten, und von denen zwei Klone identische genomische DNA-Fragmente aufwiesen (#6 und #10). Dieser Effekt war bei den beiden identischen Klonen nicht durch IPTG induzierbar. Dies

spricht dafür, daß das (die) inserierte(n) Gen(e) für die Repression von einem konstitutiv aktiven Promotor abgelesen wird (werden), der auf dem klonierten DNA-Fragment lokalisiert ist. Dieser Promotor ist entweder auf dem inserierten DNA-Fragment oder wie unter 3.12 ausgeführt in entgegengesetzter Orientierung zum *lac*-Promotor auf dem Plasmid pUC18 lokalisiert. Dagegen konnte bei Klon #59 keine verminderte Galaktosidase-Aktivität auf IPTG-freiem Medium nachgewiesen werden. Hier war die Galaktosidase-Aktivität von Klon #59 identisch mit derjenigen von *E. coli*-Zellen, die mit den Plasmiden pUC18 und pCM4 transformiert waren. Die Inhibierung der Galaktosidase-Aktivität durch IPTG lag zwischen 35 und 50 %. Da der Effekt der Inhibierung bei Klon #59 durch Zugabe und Weglassen von IPTG reversibel war, wurden bei diesem Klon nur offene Leserahmen gesucht, welche die gleiche Orientierung wie P_{lac} von pUC18 hatten. Es konnte kein Leserahmen identifiziert werden, die große Homologien zu FadR oder anderen Transkriptionsfaktoren aufweisen.

Trotzdem weisen einige Leserahmen interessante Eigenschaften auf (Tabelle 3.6). Zunächst besitzt das von ORF 10-6 deduzierte Protein eine errechnete Wahrscheinlichkeit von 25 % für ein „Helix-turn-Helix-Motiv“, welches ein typisches DNA-Bindemotiv ist und bei anderen DNA-bindenden Proteinen vorkommt (Dodd und Egan 1990). Dieses Protein hat zu einem hypothetischen 31,8 kDa Protein (RV0940C) von *M. tuberculosis* die größten Homologien. Ein weiteres interessantes Protein wird durch ORF10-5 kodiert. Es besitzt zwar keine DNA-bindenden Motive, jedoch besitzt es 71 % identische Aminosäuren mit der Transposase (Y13470) von *M. tuberculosis*; hierbei könnte es sich um eine DNA-bindende Domänen handeln. Dieses Protein wurde allerdings durch das Programm Psort als Membranprotein lokalisiert. Auf dem Plasmid von Klon #59 existiert nur ein offener Leserahmen, der in der Orientierung des *lac*-Promotors liegt und ein Peptid kodiert, das größer als 100 Aminosäuren ist. Dieses Peptid besitzt kein DNA-bindendes Motiv wie ORF 10-6. Es ist mit einem hypothetischen Protein von *M. tuberculosis* verwandt, dem keine Funktion zugeordnet werden konnte. Die Proteine, die durch die offenen Leserahmen 10-3 und 10-4 kodiert werden, weisen keine Homologien zu anderen Proteinen auf. Das Peptid, das durch den ORF 10-1 kodiert wird, hat Homologien zu *fadB1* von *M. tuberculosis*, dessen Genprodukt möglicherweise an der Biosynthese von Fettsäuren beteiligt ist und von Psort als Membranprotein lokalisiert wurde. Eine Homologie zu ORF2 von *M. tuberculosis* hat das Peptid des offenen Leserahmens 10-2, dessen Funktion und Bedeutung aber unbekannt ist. Ob eines oder mehrere Proteine, die mit dem „One-Hybrid-System“ gefunden wurden, etwas mit der Transkriptionsregulation der hier untersuchten Promotor-Region zu tun haben, bleibt unklar. Im Anschluß an diese Arbeit

sind noch weitere Untersuchungen notwendig. Hier wird zu untersuchen sein, ob die einzelnen gefundenen offenen Leserahmen überhaupt in *M. avium* exprimiert werden und ob die Genprodukte Affinitäten zu dieser Promotor-Region haben. Das beschriebene Experiment sollte in diesem Zusammenhang auch nur untersuchen, ob ein „One-Hybrid-System“ in *E. coli* mit einem Promotor von einem Gram-positiven Mycobakterium möglich ist. Hierbei ergab sich, daß man mit dieser Methode Expressionsplasmide mit DNA-Sequenzen aus Mycobakterien in *E. coli* identifizieren kann, die für eine Modifizierung der Promotorstärke eines mycobakteriellen Promotors, der *in trans* auf einem weiteren kompatiblen Plasmid lokalisiert ist, verantwortlich sind. Hierdurch wurde die Anzahl der möglichen und zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren für diese Promotor-Region eingeschränkt.

4.8 Die Bedeutung von Mig

4.8.1 Mig in Zusammenhang mit der Synthese von Fettsäuren und Lipiden

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Mig eine Acyl-CoA-Synthetase für mittellange gesättigte (bis C_{14:0}) und ungesättigte Fettsäuren ist, aber auch mit aromatischen Carbonsäuren einen Thioester mit CoA bilden kann. Das Gen *mig* wird wie die Immunodetektionen in *M. avium* und die Promotorstärke-Messungen in *M. smegmatis* gezeigt haben, konstitutiv exprimiert. Unsicher dagegen ist die Bedeutung von Mig für die *M. avium*-Zelle.

Es wurde bislang außer Mig nur eine einzige andere mycobakterielle Acyl-CoA-Synthetase charakterisiert. Dieses Enzym von *M. bovis* wurde in einem Gen-Komplex lokalisiert, der für die Synthese von Mycocerosyl-Lipiden verantwortlich ist (Fitzmaurice und Kolattukudy 1997). Die Synthetase konnte inaktiviert werden, und es konnte gezeigt werden, daß sie für die Synthese von Mycocerosyl-Lipiden der Zellhülle von *M. bovis* notwendig ist (Fitzmaurice und Kolattukudy 1998).

Allgemein haben Fettsäure-Acyl-CoA-Synthetasen eine wichtige Bedeutung für die Synthese und den Abbau von Fettsäuren (DiRusso und Black 1999, Kunau *et al.* 1995). Es ist noch nicht sehr viel über die Fettsäuresynthese und die Synthese von Zellwand-Lipiden von Mycobakterien bekannt. Möglicherweise haben viele oder einzelne Lipide für das Überleben von Mycobakterien eine große Bedeutung, so daß ein Fehlen einer Acyl-CoA-Synthetase für die Zelle letal sein kann. Die in dieser Arbeit unternommenen Versuche, das Gen *mig* zu inaktivieren, führten in einigen Fällen zu Kolonien, die eine ungewöhnliche Kolonieform hatten (Abbildung 3.8) und nicht subkultivierbar waren. Durch eine PCR-Untersuchung konnte gezeigt werden, daß diese das inaktivierte *mig*-Allel erhalten hatten. Möglicherweise handelte

es sich hierbei um die gewünschten Mutanten, die aber nicht lebensfähig waren, weil Mig essentiell für das Wachstum ist. Diese Interpretation steht nicht im Widerspruch zu der Beobachtung, daß das Gen *mig* konstitutiv exprimiert wird und daß es um den Faktor 2,5 induziert wird, wenn die Zellen sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden, in der sehr viele Fettsäuren metabolisiert werden (McCarthy und Ashbaugh 1981). Jedoch verbleibt die These, daß *mig* ein essentielles Gen ist, im Bereich der Spekulation, da ein Beweis für dessen Essentialität nicht gemacht werden konnte, da es unmöglich war, *M. avium* stabil mit Plasmiden zu transformieren.

Die Fettsäuresynthese ist ein wichtiger Teil des Metabolismus von Mycobakterien. Mycobakterien nehmen Fettsäuren während des *in vivo*-Wachstums in der Wirtszelle als Lipide oder auch als langkettige Alkane aus der Umwelt auf. Sie benutzen diese für ihren Lipidstoffwechsel, wobei die *de novo*-Synthese von Fettsäuren inhibiert wird (Ascenzi und Vestal 1978, Wheeler und Ratledge 1988). Man nimmt an, daß die bislang nicht *in vitro* kultivierbare Art *M. leprae* keine Fettsäuren *de novo* synthetisieren kann und bestimmte Fettsäuren aus der Umwelt aufnehmen muß, um wachsen zu können (Wheeler und Ratledge 1988, Wheeler *et al.* 1990). Andere Mycobakterien wie *M. avium* sind in der Lage, organische Substanzen, wie Glukose, für den Fettsäurestoffwechsel zu nutzen (Wheeler und Ratledge 1988). Die Fettsäuresynthese von Mycobakterien ist darüber hinaus komplizierter als bei den meisten anderen Bakterien, da sie zwei Fettsäure-Synthetase-Komplexe (FAS I und FAS II) besitzen (Bloch 1977). Es konnten einige an der Fettsäuresynthese beteiligten Enzyme charakterisiert werden; in diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß in FAS I nur gesättigte Fettsäuren bis zu einer Länge von C_{24:0} hergestellt werden und daß die längerkettigen Fettsäuren von FAS II synthetisiert werden (Bloch 1977, Peterson und Bloch 1977, Norman *et al.* 1994). In diesem Jahr konnte gezeigt werden, daß Isoniazid, ein Antibiotikum gegen Mycobakterien, die Synthese von langkettigen Fettsäuren (FAS II) inhibiert und so Mycobakterien abtötet (Marrakchi *et al.* 2000). Vilcheze *et al.* (2000) konnten durch Inaktivierung von *inhA*, dessen Genprodukt (Enoyl-Acyl-Carrier-Protein-Reduktase) ein Bestandteil des FAS II ist, einen ähnlichen Effekt wie mit Isoniazid erzielen. Hierbei konnte beobachtet werden, wie sich die Zellmorphologie bis hin zur Zell-Lyse veränderte (Vilcheze *et al.* 2000). Dies zeigt, daß eine gezielte Störung der Fettsäuresynthese zu letalen Effekten in der Struktur der Zellwand bei Mycobakterien führen kann. Eine denkbare zentrale Bedeutung von Mig als Acyl-CoA-Synthetase in der Zellwandsynthese kann bei einer Inaktivierung zur Störung der Fettsäuresynthese führen, so daß essentielle Lipide nicht mehr gebildet werden

können, wodurch die mögliche Letalität einer *mig*-Mutante zu erklären ist. Welche Bedeutung Lipide für die Zellwand von Mycobakterien und für die Virulenz haben soll unter 4.8.2 erläutert werden.

4.8.2 Zellmembran und Zellwand von Mycobakterien und ihre Bedeutung für die Virulenz

Die Zellmembran der Mycobakterien unterscheidet sich in ihrer Grundstruktur nicht sehr von der anderer Bakterien. Polare Lipide, hauptsächlich Phospholipide, bilden zusammen mit Proteinen eine doppelte Lipidschicht. Als Phospholipide kommen hauptsächlich Phosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamine und Phosphatidylinositole mit ihren Manosiden, auch als PIMs bezeichnet, vor. Die PIMs sind ein vorherrschender Bestandteil der Plasmamembran und bilden auch die Lipid-Basis des LAM (Lipoarabinomannan) (Brennan 1988, siehe unten). Andere Komponenten der Zellmembran sind Polyterpene, denen eine Schutzfunktion gegen photolytische Schädigung zugeschrieben wird (Brennan 1988).

Das Gerüst der Zellwand besteht aus einem Arabinogalaktan-Peptidoglycan-Komplex, wobei mit dem verzweigten Arabinogalaktan Mycolsäure-Reste verestert sind (Misaki *et al.* 1974, Kotani *et al.* 1959, Brennan und Nikaido 1995; Christensen *et al.* 1999). Die Mycolsäuren sind α -Alkyl- β -Hydroxy-Fettsäuren, die ein sehr hohes Molekulargewicht besitzen und deutlich größer sind (C₇₀-C₉₀) als die Mycolsäuren anderer Arten (Minnikin 1982). Außerdem besitzen sie in der Hauptkette (Meromycolsäure) ein bis zwei Gruppen von Doppelbindungen oder Cyclo-Propanringen, die gleichsam „Knoten“ in das Fettsäuremolekül einfügen können (Liu und Nikaido 1998). Es wird angenommen, daß die Hydrocarbonketten der Mycolsäuren eine parallel geordnete Struktur bilden, die durch die intramolekularen Cyclopropanringe oder Doppelbindungen modifiziert sind (Minnikin 1982). Christensen *et al.* (1999) konnten mittels molekularer Sonden eine kohärente Lipid-Domäne außerhalb der Zytoplasmamembran direkt nachweisen.

Weitere wichtige Bestandteile der Zellwand sind das bereits erwähnte LAM und die Glycopeptidolipide (GPL). Das LAM ist über Phosphatidylinositol mit der Zellmembran verknüpft. Es besteht aus einer Mannose-Kette, an die ein verzweigtes Arabinan kovalent gebunden ist. Dieses Arabinan besteht aus verzweigten und linearen Ketten aus Arabinose-Resten (McNeil und Brennan 1991; Brennan und Nikaido 1995; Chatterjee *et al.* 1991). Darüber hinaus konnten aus einigen *M. tuberculosis*-Stämmen LAMs isoliert werden, bei denen einige Enden der Arabinose-Reste mit Mannose-Resten versehen waren (ManLAM). Es

unterscheidet sich dadurch vom LAM von *M. smegmatis*, das diese substituierten Mannose-Reste nicht besitzt und auch als AraLAM bezeichnet wird (Chatterjee *et al.* 1992a und b; Venisse *et al.* 1993; Prinzi *et al.* 1993).

GPL, auch als C-Mykosid bekannt, ist der wichtigste Bestandteil der Zellwand von *M. avium* und *M. intracellulare* (Chatterjee 1989). Die GPLs sind zusammen mit den Lipooligosacchariden und den Glycopeptidolipiden auf der äußeren Seite der Zellwand lokalisiert und bilden mit den Mycolsäuren des Arabinogalaktan eine Art doppelte Lipidschicht (Otto Holst, persönliche Mitteilung). Die GPLs lassen sich in zwei Gruppen, in die nicht-spezifischen (ns)GPLs und in die Spezies-spezifischen (ss)GPLs einteilen (Inderlied und Nash 1997). In den letzten Jahren konnte ein Genkomplex (*ser2*) identifiziert werden, der für die Synthese der ssGPLs des Serotyps 2 von *M. avium* verantwortlich ist (Belisle *et al.* 1991; Mills *et al.* 1994; Eckstein *et al.* 1998). Die GPLs sind von besonderem Interesse, da die Expression unterschiedlicher GPL-Profile mit der klinischen Virulenz von *M. avium*-Stämmen zusammenhängen (Belisle und Brennan 1994; Khoo *et al.* 1999). GPLs werden auch für die unterschiedlichen Kolonieform bei *M. avium* verantwortlich gemacht, wobei rauhe Kolonien keine GPLs besitzen (Belisle *et al.* 1993; Riviere *et al.* 1996). Ebenfalls auffällig ist, daß die Zellwand der virulenteren transparenten *M. avium*-Stämme eine geringere GPL-Konzentration besitzt (Belisle und Brennan 1994).

Als letzte Eigenschaft der mycobakteriellen Zellhülle wird die Bildung einer Kapsel während der Infektion des Makrophagen angenommen (Rastogi und Barrow 1994, Brennan und Nikaido, 1995), in der neben GPLs auch größere Peptide und Oligosaccharide nachgewiesen wurden (Daffe und Draper 1998, Rastogi und Barrow 1994). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen der *M. avium*-Phagosomen von humanen Makrophagen konnte diese Kapsel als eine elektronentransparente Zone (ETZ) beobachtet werden, die mit der fehlenden Phagosom-Lysosom-Reifung in Zusammenhang gebracht wird (Inderlied und Nash 1997, Rastogi und Barrow 1994).

Bestandteile der mycobakteriellen Zellwand scheinen auch immunmodulierende Eigenschaften auf die Abwehrmechanismen des Wirtes zu haben (Rastogi und Barrow, 1994). So können GPLs durch Makrophagen nur langsam degradiert werden, und auch deren Degradationsprodukte können in der Wirtszelle weiter persistieren, so daß diese mit den Makrophagen direkt reagieren und / oder mit diesen zu den Lymphknoten gelangen (Harmsen *et al.* 1985, Hooper *et al.* 1986). Hier können GPLs oder deren Bestandteile (Lipopeptide, Lipide) die Makrophagen verlassen und mit Zellen des Immunsystems in Kontakt kommen.

Das sogenannte β -Lipid, ein Abbauprodukt von GPL (Brennan und Goren, 1979), hat eine immunsupprimierende Wirkung, die mit einer erhöhten Zunahme von *M. avium* im Makrophagen korreliert (Barrow *et al.* 1993). Im Gegensatz dazu stimuliert GPL in einer Makrophagenkultur die Synthese von TNF- α (Barrow *et al.* 1993). Interessanterweise sind *M. avium*-Stämme mit glatt-transparenter Kolonieform virulenter als Stämme mit glatt-opaquer Form und besitzen im Durchschnitt einen geringeren Prozentsatz an GPLs in ihrer Zellwand (Belisle und Brennan 1994). Auch das LAM hat immunmodulierende Eigenschaften, indem es die Sekretion von IL-12, TNF- α und IL-1 β stimuliert (Zhang *et al.* 1993, Rom *et al.* 1995, Henderson *et al.* 1996, Yoshida und Koide 1997). Jedoch stimuliert das bei schnellwachsenden und avirulenten Mycobakterien vorkommende AraLAM die Produktion von TNF- α deutlich stärker als das bei virulenten *M. tuberculosis*-Stämmen vorkommende ManLAM (Chatterjee *et al.* 1992, Roach *et al.* 1993). Durch dieses LAM wird auch eine Makrophagen-Aktivierung durch IFN- γ inhibiert (Sibley *et al.* 1988). Neuere Untersuchungen zeigten außerdem, daß LAM eine IL-4 Sekretion bei CD19⁺/B220⁺ Knochenmarks-Stammzellen induziert (Collins *et al.* 1998), die von Makrophagen gebildeten Superoxid-Anionen gezielt abfangen kann (Ghosh *et al.* 1998) und die Aufnahme von Mycobakterien durch Makrophagen vermindert (Fietta *et al.* 2000).

4.8.3 Mig in Zusammenhang mit dem Abbau von extrazellulären Fettsäuren und der Virulenz

Eine weitere wichtige Funktion von Acyl-CoA-Synthetasen ist die Aktivierung von Fettsäuren für die β -Oxidation. Mycobakterien katabolisieren vor allem während der logarithmischen Wachstumsphase Triglyzeride, um Energie zu gewinnen und die Abbauprodukte als Kohlenstoffquelle zu verwenden (McCarthy und Ashbaugh 1981, Bishai 2000). Über die Aufnahme von extrazellulären Fettsäuren in die Mycobakterien-Zelle ist nicht viel bekannt. Eine Untersuchung bei den verwandten Streptomycceten zeigte, daß langkettige Fettsäuren aktiv in die Zelle aufgenommen werden, wohingegen mittellange Fettsäuren, zum Beispiel Dekansäure, passiv in die Zelle diffundieren (Banchio und Gramajo 1997).

Eine neueste Studie zeigte, wie essentiell Fettsäuren für die Persistenz von *M. tuberculosis* im Makrophagen von Granulomen sind (McKinney *et al.* 2000). Eine Inaktivierung der Isocitrat-Lyase führte zu einer stark verminderten Virulenz dieser Bakterien. Die Isocitrat-Lyase gehört zusammen mit der Malat-Synthetase zu dem Glyoxylsäure-Zyklus, der eine Verbindung zwischen dem Fettsäureabbau und der Gewinnung von Glukose herstellt (Bishai 2000).

Mycobakterien verfügen mit dem Glyoxylsäure-Zyklus über ein Enzymsystem, das ihnen den Aufbau von C₄-Dicarbonsäuren aus C₂-Verbindungen ermöglicht. Der Glyoxylsäure-Zyklus ist kein eigenständiger Stoffwechselweg, sondern eng mit Reaktionen des Tricarbonsäure-Zyklus gekoppelt. Die Isocitrat-Lyase und die Malat-Synthetase verhindern die CO₂-generierenden Schritte des Tricarbonsäure-Zyklus und führen zu einer Synthese von Succinat aus zwei Molekülen Acetyl-CoA, einem Endprodukt der Oxidation von Fettsäuren. Das Succinat selbst ist ein Precursor für die Gluconeogenese, die unter anderem für die Bildung von Zuckermolekülen von Zellwandpolymeren benötigt wird. Genau dieser Synthese-Weg war nach der Inaktivierung der Isocitrat-Lyase bei *M. tuberculosis* unterbrochen, so daß eine Synthese von Zuckern aus Fettsäuren nicht mehr möglich war (McKinney *et al.* 2000). Anhand dieses Beispiels soll die Bedeutung einer Acyl-CoA-Synthetase, die für den Abbau von Fettsäuren und damit auch indirekt für die Synthese von Zuckern bei Mycobakterien benötigt wird, verdeutlicht werden.

Dies soll auch unter dem Punkt berücksichtigt werden, daß Plum und Clark-Curtiss (1994) *mig* als ein Gen charakterisierten, das nach fünf Tagen im Makrophagen erhöht transkribiert wird. Hierbei können durchaus Bedingungen geherrscht haben, bei denen die Energiegewinnung ausschließlich über den Abbau von Fettsäuren erfolgt. Da zur Zeit das Genom von *M. avium* sequenziert wird, konnte auf DNA-Sequenzen zurückgegriffen werden, die 8 kb stromauf- und -abwärts des *mig*-Gens liegen. Gene, die in einem Gen-Komplex zusammen liegen, stehen auch physiologisch häufig in einem engen Zusammenhang. Als Beispiel ist das Gen der bereits oben beschriebenen Acyl-CoA-Synthetase von *M. bovis* zu nennen, das in einem Gen-Komplex mit den Genen für die Mycerosyl-Lipid-Synthese liegt und auch für die Synthese dieser Lipide essentiell ist (Fitzmaurice und Kolattukudy 1997 und 1998). Es konnten nur wenige offene Leserahmen in der Umgebung des *mig*-Gens identifiziert werden, die für Peptide kodieren, die größer als 100 Aminosäuren sind und zu Enzymen bekannter Funktion starke Homologien aufweisen. Zwei putative Gene gehören zum Lipid-Metabolismus; sie kodieren dabei für eine Propionyl-CoA-Carboxylase und für ein Protein, das für den Transfer von Lipiden verantwortlich ist. Beide Genprodukte stehen in Zusammenhang mit dem Abbau von Fettsäuren. Der Propionyl-CoA-Carboxylase kommt eine Aufgabe bei der Entsorgung von Propionyl-CoA, einem Endprodukt der β -Oxidation, und bei der Synthese von Succinyl-CoA zu, das wiederum durch den Tricarbonsäure-Zyklus metabolisiert wird. Dies verdeutlicht, daß Mig wahrscheinlich am Abbau von Fettsäuren beteiligt ist (Abbildung 4.11).

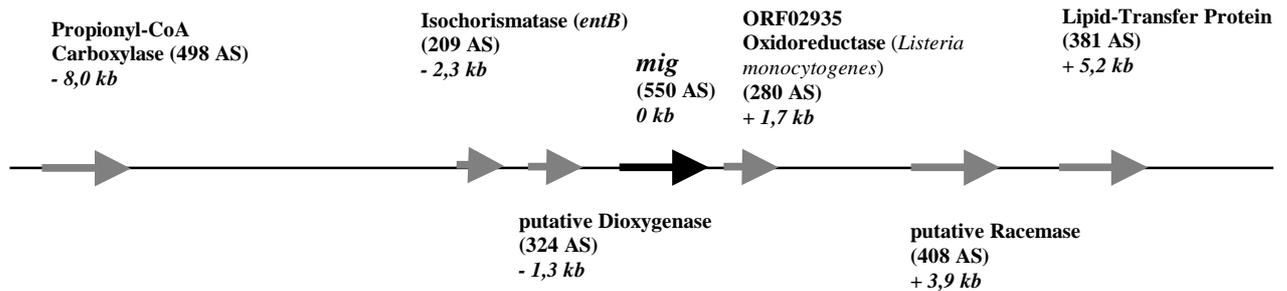


Abbildung 4.11: Offene Leserahmen, die stromaufwärts und stromabwärts des Gens *mig* lokalisiert sind. Es sind nur Leserahmen eingetragen worden, welche die gleiche Orientierung wie das Gen *mig* haben, größer als 300 bp sind und starke Homologien zu einem Genprodukt bekannter Funktion aufweisen. Es wurde hierfür das Blast-Programm des NCBI verwendet. Die Zeichnung ist nicht maßstabsgetreu, die Abstände der einzelnen ORFs zu dem Start-Codon von *mig* sind kursiv angegeben. Ebenfalls ist die Größe des durch den jeweiligen ORF kodierten Proteins in Aminosäuren (AS) aufgeführt.

In älteren Studien konnte gezeigt werden, daß gesättigte und ungesättigte Fettsäuren toxisch für langsam- und schnell-wachsende Mycobakterien sind (Saito *et al.* 1984; Kanetsuna 1985). Saito und Tomioka (1988) konnten zeigen, daß *M. avium*-Stämme mit glatter, opaquer Kolonieförmigkeit deutlich sensibler auf Fettsäuren reagieren als glatte, transparente Stämme, die darüber hinaus eine größere Virulenz besitzen. Dies galt für die Fettsäuren Dekansäure (C_{10:0}), Dodekansäure (C_{12:0}), Ölsäure (C_{18:1}) und Linolensäure (C_{18:3}). Alle Fettsäuren sind auch Substrate für Mig, so daß ihr Abbau durch dieses Enzym eingeleitet werden könnte. Interessanterweise konnte durch die Überexpression von Mig in *M. smegmatis* die Überlebensrate auf Dekansäure-haltigem 7H10-Medium signifikant erhöht werden (Abbildung 3.23). Dekansäure wirkt auch auf andere Bakterien-Arten wie *Streptomyces coelicolor* toxisch (Banchio und Gramajo 1997). Ähnliche Effekte wie sie in dieser Arbeit für Dekansäure ermittelt wurden, hatten Plum *et al.* (1997) auch für die Expression von Mig in *M. smegmatis* während der Infektion von Makrophagen gezeigt.

In den letzten Jahren wurden Fettsäuren auch als bakteriozide Effektormoleküle von Makrophagen angenommen, die additiv die Wirkung von aktiven Sauerstoffen und reaktiven Stickstoff-Intermediaten verstärken (Yamada *et al.* 1987, Tomioka *et al.* 1997, Akaki *et al.* 1997). Es konnte gezeigt werden, daß Makrophagen nach Induktion durch Lipopolysaccharide (LPS) über eine Aktivierung von Phospholipase A₂ Öl- und Arachidonsäure freisetzen (Balboa *et al.* 1999, Balsinde *et al.* 2000). Arachidonsäure wird ebenfalls von Mig als Substrat für die Bildung von Thioestern mit CoA benutzt. Arachidonsäure ist darüber hinaus auch eine Vorstufe für die Synthese von Leukotrienen; dies konnte zum Beispiel für die Synthese von

Leukotrien D₄ nach Infektion mit *Salmonella typhimurium* gezeigt werden (Pace *et al.* 1993). Hieraus ist eine weitere Funktion von Mig während der Infektion im Makrophagen denkbar. Durch die Aktivierung von extrazellulären Fettsäuren durch Mig als Acyl-CoA-Synthetase kann ein Abbau dieser bakterioziden Substanzen eingeleitet werden, so daß Mig mit einer erhöhten Überlebensrate von *M. avium* gekoppelt sein kann. Möglicherweise ist hierdurch die leicht erhöhte Überlebensrate von *M. smegmatis*-Zellen, die Mig heterolog exprimieren, im Makrophagen-Modell zu erklären (Plum *et al.* 1997). In diesem Rahmen kann auch noch weiter spekuliert werden, inwieweit eine Mig-Aktivität durch CoA-Ligation an Abbauprodukte des Tryptophan-Katabolismus (zum Beispiel 2-Amino-Benzoesäure) die Induktion der Apoptose bei Makrophagen inhibieren kann (Pais und Appelberg 2000). Insgesamt ist es aber wahrscheinlich, daß Mig als Acyl-CoA-Synthetase den Metabolismus von bakterioziden, freien Fettsäuren einleitet, indem es hierfür diese Substanzen durch Ligation eines CoA-Moleküls an die Fettsäuren aktiviert.

In diesem Jahr wurden Untersuchungen publiziert, ob die Protein-Sekretion bei Mycobakterien den gleichen Kriterien folgt wie bei Gram-negativen Bakterien (Wiker *et al.* 2000, Gomez *et al.* 2000). Die Studien haben dies belegt, so daß Mig aufgrund des mit den Computer-Programmen postulierten Signalpeptids wahrscheinlich zu einem mycobakteriellen Sekretions-Apparat transportiert wird, bevor das gereifte Protein in die Zellmembran gelangt. In diesem Punkt unterscheidet sich Mig von der membranlokalisierten Acyl-CoA-Synthetase von *M. bovis*, die kein Signalpeptid besitzt (Fitzmaurice und Kolattukudy 1997). Möglicherweise können bei Mycobakterien Membranproteine im Gegensatz zu der von Gomez *et al.* 2000 postulierten Weise auch nicht über den Sekretionsapparat, sondern auf alternative Weise über SRP („Signal-Recognition-Protein“) in die Membran transportiert werden. Membranproteine können möglicherweise aber auch über den Sekretionsapparat transportiert werden, wobei das Signalpeptid nicht abgespalten wird (Bernstein 2000). Ein letzter Beweis, wie und wo Mig lokalisiert ist, ist nicht möglich, da das Mig-Protein in *M. avium* keine große Stabilität besitzt (Abbildung 3.17), worin es sich von der von Fitzmaurice und Kolattukudy (1997) charakterisierten Acyl-CoA-Synthetase unterscheidet. In Abbildung 4.12 ist abschließend ein erstes Modell aufgezeichnet, das eine Übersicht darüber gibt, wie Mig reguliert wird und welche Bedeutung Mig für den Metabolismus von Fettsäuren haben kann.

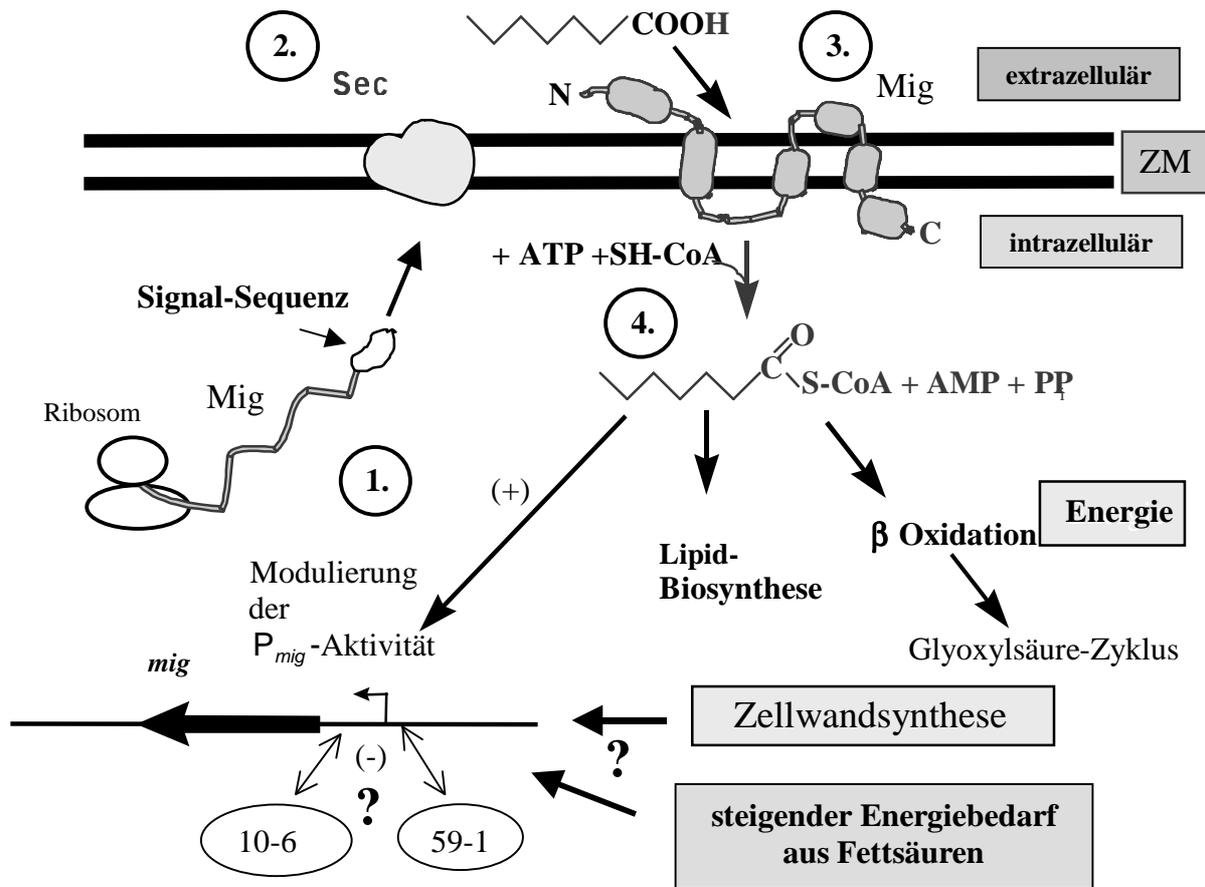


Abbildung 4.12: Modell der Funktion und Regulation von Mig. 1. Das *mig*-Gen wird konstitutiv transkribiert und translatiert. Die Promotor-Aktivität ist während der logarithmischen Wachstumsphase, aber auch nach Induktion mit Fettsäuren, bei saurem pH-Wert und bei oxidativem Streß erhöht. 2. Nach der Translation wird das 550 Aminosäuren lange Mig-Protein mithilfe des Signalpeptids über den Sekretionsapparat (Sec) zur Zellmembran transportiert (Gomez *et al.* 2000). 3. Mig ist hydrophob und besitzt hochwahrscheinliche Transmembran-Regionen, so daß es als Acyl-CoA-Synthetase in der Zellmembran lokalisiert sein kann. Das Protein ist instabil und zerfällt in kleinere Fragmente, die keine Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität mehr besitzen. Mig aktiviert aromatische Carbonsäuren, mittellange, gesättigte Fettsäuren und langkettige, ungesättigte Fettsäuren, die bakteriozide Wirkungen haben können. 4. Die aktivierten Fettsäuren können dann für die Lipid-Biosynthese, zur Energie-Gewinnung durch β-Oxidation beziehungsweise für die Synthese von Polymeren der Zellwand verwendet werden. Außerdem wird die *mig*-Promotor-Region, die durch die mögliche Repressoren 10-6 und 59-1 reprimiert wird, durch Fettsäuren aktiviert. Die Wachstumsphase der Kultur bestimmt möglicherweise durch erhöhte Zellwandsynthese und Metabolisierung von Lipiden ebenfalls die Promotor-Aktivität. ZM, Zytoplasmamembran

5. Anhang

Anhang A: DNA-Sequenz U43598 mit den offenen Leserahmen ORF1 und ORF2 (Plum *et al.* 1997)

```

GGATCCGCTGTGGACCGTCCGCCGCCCGGCACGTCGAGGACGCTGCGCGGTGCTGGACGG 60
CCACCAGGTTCCCGAAGCGGTGTCGCCGCCCGGGCGGGTTCATCGAACTGCCCGGCTCGG 120
CCACCCGCTGTCGCCCGGTGGACCGTCCGCCGACTCCGGCGCGCACGGCGTCACCATGCA 180
GGGGCATTTCACCCGATCGCACGTGGGGCGCAACAACGCCGTGCACGGCGGCATGATCCC 240
GCTCTACTACGACTGGCTGTTCCGGCATGGTGGTGTCCGGCGCGAACTGTCCACCCACGCG 300
CACCGCCTTCTACACGTGGATTACCGCAACGTACCCCGATCGACGCGCCGCTGACGGC 360
GCACGGCCGCATCACCGACGTCGACGGCCGAAGATCTTCATCTCCGCTAGCATGACGGC 420
                                     -10-Region
GGCCGACGGCAGCTGCTCAGTGAGGCCACCGCCTGATGGTCCGCTGTACCCCAACA480
                                     Start ORF1
GCCGTGAGAGGCAAGATGTCCGACACCACAACAGCATTACGGTACCGGGGTGCGCAAG 540
S.D. (ORF1) M S D T T T A F T V P A V A K 15
Signalpeptid
GCCGTCGCGGCCGCGATTCCCGACCGGAGCTGATCATCCAGGGCGACCGTGCCTACACC 600
A V A A A I P D R E L I I Q G D R R Y T 35
TACCGGCAAGTGATCGAACCGTCAACCGGCTCGCCGCTATCTGCACTCCAGGGTCTG 660
Y R Q V I E R S N R L A A Y L H S Q G L 55
GGATGCCACACCGAGCGCGAGGCGCTGGCCGCCACGAGGTGGCCAGGACCTGCTCGGC 720
G C H T E R E A L A G H E V G Q D L L G 75
CTCTACCGCTACAACGGGAACGAATTCGTCAAGCGCTGCTGGGCGCCTTCGCTGCGCGC 780
L Y A Y N G N E F V E A L L G A F A A R 95
GTCGCCCCGTTCAACGTCAACTTCCGCTACGTCAAAAGCGAACTGCACTACCTGCTCGCG 840
V A P F N V N F R Y V K S E L H Y L L A 115
GACTCCGAGGGCAGCCGCGTATCTACCACGGCGGCTTCGCGCCCCGGGTGGCCGAGATC 900
D S E A T A L I Y H A A F A P R V A E I 135
CTGCCCGAGCTGCCGCGCTTCGGGTGCTCATCCAGATCGCCGACGAGTGGGCAACGAA 960
L P E L P R L R V L I Q I A D E S G N E 155
TTACTCGACGGCGCAGTGGATTACGAGGACGCGTGGCGTGGTGTCCGCGCAGCCACCA 1020
L L D G A V D Y E D A L A S V S A Q P P 175
CCGGTGGCGCACTGTCCGACGACCTGTACGTGCTGTACCCGGCGCACCCAGGGAATG 1080
P V R H C P D D L Y V L Y T G G T T G M 195
-
                                     AMP-Binde-Domaene
CCCAAGGGCGTGTGTGGCGTCAGCACGACATCTTCATGACATCCTTCGGGGGGCGCAAC 1140
P K G V L W R Q H D I F M T S F G G R N 215
CTGATGACCGGGCGCCCTCGTCTCGATCGACGAGATCGTGCAGCGCCGCGCTGCGC 1200
L M T G E P S S S I D E I V Q R A A S G 235
CCGGGGACCAAGCTGATGATCCTCGCCCGCTGATCCACGGCGCGCCCAAGTGGAGCGTG 1260
P G T K L M I L P P L I H G A A Q W S V 255
ATGACGGCGATCACGACCGGCCAGACGGTCTTCCCCACTGTCGTCGACCATTTGGAC 1320
M T A I T T G Q T V V F P T V V D H L D 275
                                     Start ORF3
GCCGGAGGACGTGGTGCACCATCGAGCGGGAAAAAGGTATGGTGGTGACGGTGGTGGG 1380
A R G R G A H H R A G K G H G G D G G G 295
                                     S.D. (ORF3) M V V T V V G 7
TGACCGCATGGCGCGCCCGTTGGTCCGCGCCATCGAGAAGGGGATCGCCGACGTGTCGTC 1440
Stop 296
D A M A R P L V A A I E K G I A D V S S 27
GCTGGCCGTGGTGGCAACGGCGCGGTTGCTGACCCGTTCTGCAAGCAGCGCTTGAT 1500
L A V V A N G G A L L T P F V K Q R L I 47
CGAGGTGCTGCCGAACCGGTTGGTCTGACGGCGTGGGTGCTCGGAGACCGGGCGCA 1560
E V L P N A V V D G V G S S E T G A A Q 67
GATGACCAACATGTCAGCCCGGGCGGTGGCGACCGGCACCTTCAACCGCCGGCCCGGA 1620
M H H M S T P G A V A T G T F N A G P D 87
CACCTTCGTGGCGGCCGAGACCTGTCCGCGATCCTGCCGCCGGGCACGAGGGGATGGG 1680
T F V A A E D L S A I L P P G H E G M G 107
CTGGTTGGCCAGCGGGCTATGTCCCGCTCGGGTACAAGGGCGATGCCGCAAGACCGC 1740
W L A Q R G Y V P L G Y K G D A A K T A 127
CAAGACCTTCCGGTTCATCGACGGGTGCGCTACGCGGTGCCGGGCGACCGGGCACGCCA 1800
K T F P V I D G V R Y A V P G D R A R H 147
CCACGCCGACGCCATATCGAGCTGCTGGGCCGACTCCGTGTGCATCAATCCGGCGG1860
H A D G H I E L L G R D S V C I N S G G 167
CGAGAAGATTTTCGTGAGGAGTTCGAGACGGCCATCGCGTGCATCCCGCGGTGGCCGA 1920
E K I F V E E V E T A I A S H P A V A D 187
CGTGGTGGTGGCCGACGGCCGAGTGAACGGTGGGGCCAGGAAGTTCGTCGCCGTGGTCCG 1980
V V A G R P S E R W G Q E V V A V V A 207
GCTGTCCGACGGCGTCCCGTCCGACCGGAGAATTGATCGCCACGCATCGAATTCGCT 2040
L S D G A A V D A G E L I A H A S N S L 227
GGCGCGTACAAGCTTCCCAAGCGCATCGTGTCCGTCCGGTGCATCGAGCGCAGCCCGTC 2100
A R Y K L P K A I V F R P V I E R S P S 247
GGGCAAGGCCGATTACCGGTGGCGCGGAGCAGCGGTGAACGGATGAAACCCGCTGGG 2160
G K A D Y R W A R E Q A V N G * 263
CCGACCGCTTTTAGGCTAGGAGCACACCGATGAAGTACCAAGGGCGGGTCCGCGGTGGTCA
ATGTCGCGGCTCCGACATCGACGACAACGGCCTGGCCGAAACCCAGCGCTGTCGCGTC
CCGACAGGTACCGCATATCGCGTCCGCTGACGTGGCGGACCGGGATCGGGTGTGGGCTTCG
CCGATGAGGTGCGCCGAAGCACGGACCCGCCCTCGATGGTGTCAACAACCGCGCGTCG

```

Anhang B: DNA-Sequenz U43598 korrigiert nach dieser Arbeit mit dem offenen Leserahmen ORF_{mi}

GGATCCGCTGTGGACCGTCGCCGCCCGGCACGTCGAGGACGCTGCGCGGTGCTGGACGG
CCACCAGGTTCCCGAAGCGGTGTCGCCGCCCGGGCGGGTCAATCGAACTGCCCGGCTCGG
CCACCCTGCTGCCCGCTGGACCGTCGCCGACTCCGGCGCGCACGGCGTCACCATGCA
GGGCATTTACCCCGATCGCACGTCGGCGGCAACAACGCCGTGCACGGCGGCATGATCCC
GCTCTACTACGACTGGCTGTTCCGCATGGTGGTGTCCGGCGGAACTGTCCACCACCGCG
CACCCTTCCACAGTGGATTACCGCAACGTCACCCCGATCGACGCGCGCTGACGGC
GCACGGCGCATCACCGATCGACGCGCGCAAGATCTTCATCTCCGC **TAGCAT** GACGGC
-10 motif
GGCCGACGGCACGCTGCTCAGTGAGGCCACCGCCTGATGGTCCGCTGTACCCACCA
GCCGT**GAGAGGCAAGATG**TCCGACACCACAACAGCATTCACGGTACCGGGCGTCCGGAAG 540
SD **M S D T T T A F T V P A V A R K** 15
Signalsequenz
GCCGTCGCGGCCGCGATTCCCGACCGCGAGCTGATCATCCAGGGCGACCGTCCGTACACC 600
A V A A A I P D R E L I I Q G D R R Y T 35
TACCGCAGGTGATCGAACGGTCAACCGGCTCGCCGCTATTCGCACCTCCAGGGTCTG 660
Y R Q V I E R S N R L A A Y L H S Q G L 55
GGATGCCACACCGAGCGCGAGGCGTGGCCGGCCACGAGGTGGGCCAGGACCTGCTCGGC 720
G C H T E R E A L A G H E V G Q D L L G 75
CTCTACCGGTACAACGGGAACGAATTCGTGGAAGCGCTGCTGGCGCCCTTCGCTGCCGCG 780
L Y A Y N G N E F V E A L L G A F A A R 95
GTCGCCCGGTTCAACGTCAACTTCCGCTACGTCAAAAGCGAACTGCACTACCTGCTCGCG 840
V A P F N V N F R Y V K S E L H Y L L A 115
GACTCCGAGGGCACCGCGCTGATCTACCACGCGCGTTCGCGCCCGGGTGGCCGAGATC 900
D S E A T A L I Y H A A F A P R V A E I 135
CTGCCGAGCTGCCGCGGCTTCGGGTGCTCATCCAGATCCCGACGAGTCCGGCAACGAA 960
L P E L P R L R V L I Q I A D E S G N E 155
TTACTCGACGGCGAGTGGATTACGAGGACGCGTGGCGTGGTGTCCGCGCAGCCACCA 1020
L L D G A V D Y E D A L A S V S A Q P P 175
CCGGTGGCGCACTGTCCGGACGACCTGTACGTGCTACACCGGGCGCACCCACGGGAATG 1080
P V R H C P D D L Y **V L Y T G G T T G M** 195
- **AMP binding domain signature**
CCAAGGGCGTGTGTGGCGTCCAGCACGACATCTTCATGACATCCTTCGGGGGCGCAAC 1140
P K G V L W R Q H D I F M T S F G G R N 215
CTGATGACCGGGAGCCCTCGTCGATCGACGAGATCGTGCAGCGCGCCGCTGTCG 1200
L M T G E P S S S I D E I V Q R A A S G 235
CCGGGGACCAAGCTGATGATCCTGCGCCGCTGATCCACGGCGCCAGTGGAGCGT 1260
P G T K L M I L P P L I H G A A Q W S V 255
ATGACCGCGATCACGACCGGCCAGCGGTGCTTCCCCACTGTGCTCGACCATTTGGAC 1320
M T A I T T G Q T V V F P T V V D H L D 275
GCCGAGGACGTGGTGGCACCATCGAGCGGAAAAGGTCATGGTGGTGACGGTGGT **GGG**T 1380
A E D V V R T I E R E K V M V V T V V G 295
stop 30 kd
GACCGATGGCGCGCCGTTGGTCCGGCCATCGAGAAGGGGATCGCCGACGTGTCGTCG 1440
D A M A R P L V A A I E K G I A D V S S 315
CTGGCCGTTGGTGGCAACGGCGCGCGTGTGACCCCGTTGCTCAAGCAGCGCTTGATC 1500
L A V V A N G G A L L T P F V K Q R L I 335
GAGGTGCTGCCGAACCGGTGGTCTGTCGACGGCGTCCGGTCTGCGGACCCGGGGCGCAG 1560
E V L P N A V V V D G V G S S E T G A Q 355
ATGACCCATGTGACGCCCGGGCGGTGGCGACCGGCACCTTCAACCGCCGCGCCGGAC 1620
M H H M S T P G A V A T G T F N A G P D 375
ACCTTCGTGGCGCCGAGGACCTGTCGGCGATCCTGCCCGCGGGCACGAGGGGATGGGC 1680
T F V A A E D L S A I L P P G H E G M G 395
TGTTGGCCACGCGCGCTATGTCCGCTCGGGTACAAGGGCGATGCCGCCAAGACCGCC 1740
W L A Q R G Y V P L G Y K G D A A K T A 415
AAGACCTTCCGGTCAATCGACGGGTGCGCTACGCGGTGCCGGGCGACCGGGCACGCCAC 1800
K T F P V I D G V R Y A V P G D R A R H 435
CACGCCGACGGCCATATCGAGCTGCTGGGCCGCGACTCCGTGTGCATCAATTCCGGCGGC 1860
H A D G H I E L L G R D S V C I N S G G 455
GAGAAGATTTTCGTCGAGGAGGTGAGACGGCCATCGCGTCGCATCCCGCGGTGGCCGAC 1920
E K I F V E E V E T A I A S H P A V A D 475
GTGGTGGTGGCCGACGGCCGAGTGAACGGTGGGGCCAGGAAGTCTGTCGCGTGGTTCGCG 1980
V V V A G R P S E R W G Q E V V A V V A 495
CTGTCCGACGGCGCTGCCGTCGACGCCGAGAAATTGATCGCCACGCATCGAATTCGCTG 2040
L S D G A A V D A G E L I A H A S N S L 515
GCGGCTACAAGCTTCCCAAGGCGATCGTGTCCGTCGGTGTGATCGAGCGCAGCCCGTCG 2100
A R Y K L P K A I V F R P V I E R S P S 535
GGCAAGGCCGATTACCGGTGGCGCGCAGCAGCGGTGAACGGATGAAACCCGCTGGGG 2160
G K A D Y R W A R E Q A V N G * 551
CCGAGCGCTTTTAGGCTAGGAGCACACCGATGAAGTACCAAGGGCGGGTCCGGTGGTCA
ATGTCGGCGGCTCCGACATCGACGACAACGGCCTGGCCGAAACCCAGGCGCTGTCGCGTC
CCGGACAGGTACGCCATATCGCTCGACGTGGCGGACCGGGATGCGGTGCTGGGCTTCG
CCGATGAGGTGCGCCGCAAGCACGACCCGCTCGATGGTGTCAACAACCGCGCGCTG

Anhang C: Sequenz-Homologie-Vergleich von Mig mit den homologen Enzymen FadD19 und FadD26 von *M. tuberculosis* und FadD von *E. coli*. Alle Enzyme werden zu den Acyl-CoA Synthetasen gezählt (Fulda *et al.* 1994; Black *et al.* 1992). Alle vier Enzyme besitzen das für die Adenylat formierenden Enzyme typische AMP-Bindung-Motiv (grauer Kasten). Die identischen Aminosäuren sind schwarz markiert.

Mig	1	-----MSDITTAFT-----VPAVAKAVAA
FadD19	1	-----MAVALN-----IADLAEHAID
Ecoli	1	-----MKKVWLNRYPADVPTEINPDYQSLVDMFEQSV
FadD26	1	MAWSVQTGTFQSGGDVPTCDPTGVRVRKHKHSEKAEWEYKAMPVTDKSVPSLLQERAD
Mig	20	AIPDRELIIGDRRYTYRQVIERSNRLAAYLHSQGLGCHTEREALAGHEVGODLLGLYAY
FadD19	17	AVPDRVAVICGDEQITYAQLEDKANRLAHHLLIDQGVQK-----DKVGLYCR
Ecoli	35	RYADQPAFVNMGEVMTFRKLEERSRAFAAYLQOGLGLKK-----GDRVALMMP
FadD26	61	QQPDSTAVTYIDYGSDPKGFADSLTWSQVYSRACIIAEELKLCG-----LPGDRVAVLAP
Mig	80	NGNEFVEALLCAFAARVAPFNVN---FRYKSELHYLLADSEATALIYHAAFAPRVAEIL
FadD19	64	NRIETIVLAMLCTVKACAILVNVN---FRYVTEGELRYLFDNSDMVALVHERRYADRVANVL
Ecoli	83	NLLQYPVALFGILRAGMIVNVN---PLYTPRELEHQLNDSGASATVIVSNFAHTLEKVV
FadD26	116	QGLEYYLAFALCALQAGFLAVPLSTPOVGIHDDRVSAVLQDSKPVAILTTSSVVGVDVTKYA
Mig	137	P--ELPRLRVLIQIADESG-NELLDGAVDYEDALASVSAQPPPVRHCDDIYVLYTGGTT
FadD19	121	P--DTPHVRTILVVEDGSDQYRRYGGVEFYSAIAAGSPERDFGERSADAIYLLYTGTT
Ecoli	140	D--KTAVQHVILTRMGDQL-STAKGTVNVFVKYIKRLVPKYHLPDAISFRSALHNGYRM
FadD26	176	ASHDQQPAPVVEVLLLDLSPRQMPAFSRQHTGAAAYLQYTSGSTRTIPAGVIVSHINVIA
Mig	194	GMPKGVLRQHDIFMTSFGGRN-LMTGEPSSSIDETVORAASGPGTKLMILPPLIHGAAQ
FadD19	179	GFPKGVWRHEDIYRVLFGGTD-FATGEFVKDEYDLAKAAAANPPMIRYPIPPMIHGATQ
Ecoli	197	QYVKPELVPEDLAFLOYTCGTTGVAKCAMLTHRNMLANLEQVNTATYGPLLHPGKELVITA
FadD26	236	NVTQSYGYFGDPAKIPTEGTVVSWLPLYHDMGILGICAPLVARRRAMLMSPMFLRRA
Mig	253	WSVMTAIIIGQTVVFPVVDHL-----DAEDVVRTIEREKVMVVTVVGDMARPLVAAI
FadD19	238	SATWMAIFSGQITVLAPFN-----ADEVVRTIHKHKVNLIFFTGDAMARPLVDAL
Ecoli	257	LPLYHIFALTINCLIFTELGQNLLITNPRDIPGLVKEKAKYPFTAITGVNTLFNALLNN
FadD26	296	RWMQLLATSCRCFSAAPNFAFELAVRRTSDQDMAGLDLRDVGIVSGSERIHVATVRRFI
Mig	307	EKG-IADVSSLAVVANGGALLTFVVKORLIEVLPNAVVDGVSSETGAQMHHMSTPCAV
FadD19	289	VKNDYDLSSLFLASTAALFSPSKEKLELLPNRVIDSIGSETGFCGTSVVAAGQA
Ecoli	317	KEFQQLDFSSLHLISAGGMPVQVVAERWVKTGQYLLLEGYGLTECAPLVSVPYDIDYH
FadD26	356	ERFAPVNLSPTAIRPSYGLAEATLYVAAPEAGAAPKTVRFDYEQLTAGQARPCGIDGSVG
Mig	366	ATCTFNAGPDT---FVAADLSAIIPPGHEGMCWL AQRGYVPLGYKGDAAKTAKTFPVID
FadD19	349	HGGGPRVRIDHR--TVVLDLDDGNEVTPGSGMRGVIAKKNIPVGGYKDEKKTAEFTRTIN
Ecoli	377	SGSISGLPVESTE--AKLVDDDNEVPPGQPGELCVKGPQVMLGYWQRPDAITDEIIRNG-
FadD26	416	TELLISYCSDPDPSSVRIVNPEITMVENPPGVVGE-IWVHGdhvTMGYWQKPKQTAQVFDACL
Mig	423	GV-----RMAVPGDRARHHDGHEILLGRDSCVINSGGEKIFVEEVETAIASHPAVA
FadD19	407	GV-----RMAIPGDYAOVEEDGTVMLGRGSVSINSGGEKVYPPEEVEAALKGHPDVF
Ecoli	433	-----WLHTGDIAMDEEGFLRIVDRKKDMILVSGFNVPNEIEDVVMQHPGVQ
FadD26	475	VDPAPAAPEGPWLRTGDLGVIS-DGELFIMGRIKDLIVDGRNHYPDDIEATIQEITGGR
Mig	475	DVVVACRPSERWQEVVAVVALSDG--AAVDAGELIAHASNSLARYKLPKATVFRPVIER
FadD19	459	DALVVGVEDPRYGOQVAAVQARPG--CRPSLAELDSFVRSEIAGYKVPKSLWVDFEVRK
Ecoli	482	EVAAVGVPSGSSGEAVKIFVVKD---PSLITEESLVTFCRRQLTGYKVP-KVEFRDELPK
FadD26	534	-AAAVAVDDITEQLVAIEFKRRGSTAEVVMKLRVSKREVTSAISKSHSLRVADLVLV
Mig	533	SPSGKADYRWAREQAVNG-----
FadD19	517	SPAGKPDYRWAKEQTEARPADDVHAGHVTSGG--
Ecoli	538	SNVCKILRREIRDEARCKVDNKA-----
FadD26	593	SPGSIPIITTSKIRRSACVRYRSDGFKRLDVAV

Anhang D: Vergleich der Aminosäure Sequenzen von Mig, FadD19 (Cole *et al.* 1998) und FadD (Black *et al.* 1992, Fulda *et al.* 1994) mit dem Programm ClustlW. In der unteren Reihe ist eine Konsensus-Sequenz dargestellt. Die identischen Aminosäuren sind schwarz markiert.

```
Mig      1  -----MSDTTFTAFT-----VPAVAKAVAAAI PDRELI IQGDRRYTYRQVIERSNR
FadD19  1  -----MAVALN-----IADLAEHAI DAVPDRVAVICGDEQLTYAQLEDKANR
Ecoli   1  MKKVWLNRYPADVPTETINPDYQSLVDMFEQSVARYADQPAFVNMGEVMTFRKLEERSRA
Konsensus 1  dm taln v dvae iaaipDr aiiqgde lTyrqleersnr
```

```
Mig      46  LAAYLHSQGLGCHTEREALAGHEVGGDLGLYAYNGNEFVEALLGAFARVAPFNVNFRY
FadD19  43  LAHHLIDQGVQKD-----DKVGLYCRNRIETVIAMLGIVKAGAILVNVNFRY
Ecoli   61  FAAYLQQGLGK-----GDRVALMMPNLLQYPVALFGILRAGMIVNVNPLY
Konsensus 61  lAayL qgl kh DkvgLy N iefviAllGivkAgvilvNVNfrY
```

```
Mig      106  VKSELHYLLADSEATALYHAAFAPRVAEILPELPRLRVLIQIADSESG-NELLDGAVDYE
FadD19  90  VEGELRYLFDNSDMVALVHERRYADRVANVLPDTPHVRTILVVEDGSDQDYRRYGGVEFY
Ecoli   109  TPRELEHQINDSGASATVIVSNFAHTLEKVDKTAVQHVILTRMGDQL-STAKGTVVNFV
Konsensus 121  v ELhyll dSeatAlv fA rva vlpetprlrvil i des r gaVdf
```

```
Mig      165  DALASVSAQPPPVRICPDDLYVLYTGTTGMPKGVLRQHDIFMTSFGGRN-LMTGEPSS
FadD19  150  SAIAAGSPERDFGERSADAIYLLYTGTTGFPKGVWRHEDIYRVLFGGTD-FATGEFVK
Ecoli   168  VKYIKRLVPKYHLPDAISFRSALHNGYRMOYVKPELVPELAFI OYTGTTGVAKCAMLT
Konsensus 181  ala s r v h d lyvLytGttgfpKgvLwr edifm fGGt latGe vs
```

```
Mig      224  SIDELVQRAASCPGTKLMILPPLIHGAAQWSMTAITTGQTVVFPTVVDHL-----DAE
FadD19  209  DEYDLAKAAAANPPIRYPILPPMIHGATQSATWMAIFSGQTVLAFEFN-----AD
Ecoli   228  HRNMLANLEQVNTATYGPLLHPGKELVVTALPLYHIFALTINCLIFIEIGGQNLLITNPRD
Konsensus 241  elaq aa np milPplihgatq vw ai tgqt vl ev ad
```

```
Mig      278  DVVRTIEREKVMVTVVGDAMARPLVAAIEKG-IADVSSLAVANGGALLTPFVKORLIE
FadD19  260  EVVRTIHKHKVNLFFFTGDAMARPLVDALVKGNDYDLSLFLASTAALFSPSIEKELIE
Ecoli   288  IPGLVKELAKYPFTAITGVNTLFNALLNNKEFQQLDFSSLHL SAGGGMPVQOVVAERWVK
Konsensus 301  dv rtier Kv vv vtGdamarplv ai kgn DvSSL lvA ggalltp vkerlie
```

```
Mig      337  VLPNAVVDG VGSSETG AQMHMSTPGAVATGTFNAGPDT-FVAAEDLSAILPPGHEGMG
FadD19  320  LLPNRVITDSTIGSSETGFGGTSVVAAGQAHGCGPRVRIDHRTVVLDDDGNEVKPGSGMRG
Ecoli   348  LTGQYLL EGYGLTECAPLVSVPYDIDYHSGSIGLPVPSIEAKLVDDDDNEVPPGQPGE-
Konsensus 361  llpn vv d vgssetg m g gg pdt vvlDd nevppG g g
```

```
Mig      396  WLAQRCYVPLGYKGDAAKTAKTFPVIDGVRYAVPGDRARHHADGHI ELLGRDSVCINSGG
FadD19  380  VIAKKNIPVGYKDEKKTAEFRTINGVRYAIPGDYAQVEEDGTVMLGRGSV SINS GG
Ecoli   407  LCVKGPQVMLGYWQRPDATDEIINKG----WLHTGDI AVMD EEF LRIVDRKKDMILVSG
Konsensus 421  vlakrgnvp lGYy d kTaetfr i gvryavpGD A veedG i llgR sv InsgG
```

```
Mig      456  EKLVVEEVETALASHPAVADV VVAGRPSE RWGEVVAVVALSDGAAVDAGELIAHASNSL
FadD19  440  EKVYPEEVEEAAIKGHPDVFDAIVVGVDPDRYGGQVAAVVQARPGCRPSLAELDSFVRSEI
Ecoli   463  FNVYPNETEDVMQHPGVQEVAAVGVPSGSSGEAVKIFVVKKD-PSLTEESLVTF CRRL
Konsensus 481  ekvypeEvE ai HPaV dvvvvGvPs rwGq V avV rdg vs geLisf r l
```

```
Mig      516  ARYKLPKATVFRPVIERSPSGKADYRWAREQAVNG-----
FadD19  500  AGYKVPRLWFVDEKRS PAKPDYRWAKEQTEARPADDVHAGHVTSGG
Ecoli   522  TGYKVP-KVEFRDEL PKSNVVKILRLRELRDEARGKVDNKA-----
consensus 541  agYKvPk i Frdei rSp GK dyRwareqa ar
```

Anhang E: rekonstruiertes *M. avium* DNA-Fragment aus dem Plasmid p#59 (+-Strang)

TCGGCCATGTCGATCACCCGCTTCTGGTGTGGTGCCTTCCGGGGCTGCAATTTTCGATGC 60
CCGGAATGATGGACACCATCCTCAATCTCGGGATGAACAGCAGCATCGAGGAGGCGCTGG 120
CTGCCGAGACCGGCGACGCACGCTACGCCGCCGACACCCGGCACC GGTTACCGAGCAGT 180
TCACCAGAGTTGTGGCGTTCGAGCCGCCGAAAACCACTGGGAACAACCTCGATCTGGCTA 240
TCCGGGCGGTGTTGGAATCGTGAATTTCCAAGCGGGCCCTCGCATATCGCCGTTCTCATG 300
GCATTTCCCGACGACGGCGGCACTGCTGTCACGGTGCAGGCCATGGTCTTTGGCAATCTCG 360
ATGACCGCTCGGGCACCGGAGTGCTCTTCTCTCGCGACCCGCTGTCCGGGGCCGCGCAGC 420
CCTACGGTGAATGGTTGCCCGTGGTCAGGGCGAGGACGTGGTCTCGGGCCGCAAAGACG 480
CCCTGCACCTTGACCACCTTGCCGCAACCATGCCGTCTGTGCACCGGGATCTGCTTGCCG 540
CCGCAGCCACGCTCGAACGTCACGGTCGTGACATGCAAGACATCGAATTCACGGTGCAGT 600
CCGGGAAGCTGTGGCTGTTGCAATCCCGCGCGGCCAAACGGTCCCCGCAGGCGGCTCTGC 660
GCTGCGCGGTGCAGCTGCAGCGCGAAGGCGTGATCAGCACCAAGGAGGCGCTCGACCGCC 720
TCACCGCTGAACACGTCCCGC GACTGCAGCGCCCCACCCTCGACCCCGCCGCTGTGCAG 780
CCTCTCCCCCGTTCGCCTCGGGCAAACCCGCCTCCCCGGGCATCGCCACAGGCCTCGTGC 840
TCATCGATGCCGACGAGGCCGAAGACCTTGCCGACAAGGGTCGCGCGGTGATCTTGGCCC 900
GGCCCACCACCGATCCCGATGACGTGCGCCGCATGTCCGCGTCCGGTGGCCGTCGTAACCG 960
AATTGGGTGGCTCCACTTCGCATGCCGCGGTTCGTGTGCCGCGAGATGGCGGTTCCCTGCG 1020
TAGTTGGCTGCGGCATGGACTCGGTGACCGCCCTGGCCGGTCCGGTTCGTCACAGTCGACG 1080
CAGACACCGGCACCGTGCACCTCGGCGAGCTGCCGGTTCGTCCCTTGCTGGAAGCAGATG 1140
ACGAGGATCTGCGCACCATCGAACGGTGGTTGCGCGACGACCTAGAAAACCTACGACCCCA 1200
GCTATGACGTGCTGGCGCTGATCGAACGGCGCCAGCAGCGCGGAGCAACGCGGTGACCAC 1260
TGTCGCTTTCCATGCTGGAGCCCCTGGACGCTCCGCTCCTCCGCCCGACCACCTCGACGC 1320
GCGATGCTTCATCAACTGGACAAAAAGAACTGGGACTACACGATGGCACTTCTGAACAAA 1380
CTAGATTCCGCCACTCTCGCGGGACGTCTCTCGCCGTGGCTGGCTGATACCCTCGCGGTT 1440
TCCGGCGAGGTCACACTGAACAACATCGAAATCCCCACAGCGAGTGGAATGTCCAGTGAG 1500
ACGGTTCTGTTTCGAGGCTGTGTGGGACAACGATGGCCAGCGCAACACGCGCGGGCTGGTA 1560
GTCCGTATCCCGCCGAGTGGCGAGGGCCTGTTTTCCCGACTACGACATCGCTCGAGAAGGC 1620
CGCGTGATGGCCGTTGTTCGCGGCGCATTCGAGGCGGCGGTCCCCGGCGTTCGTGGCCGCA 1680
GAGCTCACCGGCGAGGTTCTAGGGGGCCCCTTTTCTGCTGCTGGAGCGCGCCTACGGCCGC 1740
GTCCCTAGCGACGACCCACCGTTTCGTGACCGGTGGCTGGGTCGTTGACCTGACGCCCGAA 1800
CAGCGGGCGACGATGTTTCGACAACGCGTTGCGCACGATCGCCGCCATCCAAAAGGTCGAT 1860
CCGGCAGCAGTCGGACTCGACGACCTTGGCCGCAGTGGCGTCCGGCAAACAGTCCTTCAC 1920
CGAGAGGTCGAGTACTGGCGGAACTTTTACCTCTGGGCCGCCGACGGTCGCCCCAATCCC 1980
ACTATCGATGCCGCTTCGAAAAGCTCTCGCAAGCAATTCCAACGCAGACCGGTCCACTG 2040

GTGATTTCTTGGGGGATGCACGATTCGGAAATCTCATGTTTCGCTGATGACCTCACCGTC 2100
 TCAGGCGTCTTCGACTGGGAAATGGCGACTCTGGGCCCATCCGAAGTGGACTTCGGCTAC 2160
 TTCCTCTTCTTTGACCGCGTCTACTCATCGGGGCTGGGATTGCCGAGGCTAGACGGATTTC 2220
 CCGGAGCGCGCCCATGCCATCGCACGTTTCGAGGAACTCACTGGCCGCCGAACGGAGAAC 2280
 CTTGAATGGTACGAAGCCTGGGGGGCGCTACGCGGGGCAATTCTTCTGCAGCGTGTCCGGC 2340
 AATCTGCTAATCAGCCAAGGCCTTCTCCCACCGGAGGCTGACATGCCCTTCAACAATCCT 2400
 GCATCCCAGGTTCTTGCCAGCTTGCTCGAACTGCCGCCGCCGGCCGGACAAACCGGCTGG 2460
 ATCACCGGCAATCGATGATCACGACGACCTGATGGCGTCGGCCAGACTCAACGGGGATCC 2520
 GACCGACTCTATCGTCTAAAGGAGCTACTCGCCGATTCGCCGTCGGGACTCAATCCGAGT 2580
 CCACGGCACATGCCAACTTCGGAGCAGCCACCGTACACCGCGAAAGTTAGTATTTCCCGG 2640
 CAAGAATAAGGTTTATGCCTATGCCACGACCAGATAGGTTGTTCGCAGAACGAATGTCAGC 2700
 GCTTATACATTCGATAGTAATTCTTGTACCAAGCTTGACCAACCGGAAGTACACACCGTA 2760
 GACATATGCTCGTGCAGAATGAAAACGCAGTCCCGTACCGGATCTCAGTGCTTATCTGA 2820
 TTGCCGTCGCGTGGTGTTCGCACCTCCCGCGGATCGCGTCGACGAGACGGGCGCCCGAA 2880
 CCGTCGCTCAAGGCATCGAAGACGGGGTGGCAGCGGAGCGTCTGGGCTTCGCCAATGTCT 2940

ORF 59-1

Startpunkt: 1159 ((-)-Strang)

MVRRSSSSASSKGRGTGSSPRCTVPVSASTVTTRPARAVTESMPQPTTQGTALSRHTTAAC 60
 EVEPPNSVTTATDADMAATSSGSVVGRAKITARPLSARSSASSASMTTRPVAMPGEAGLP 120
 EATGGEAATAAGSRVGRCSARTCSAVRRSSASLVLITPSRCSCTAQRRAACGDRLAARDC 160
 NSHSFPDCTVNSMSCMRP 199

Anhang F: Rekonstruiertes *M. avium* DNA-Fragment aus dem Plasmid p#10 (+-Strang)

CGCGCCGATCTGCCGGTTGTGCTGAAACTAGAACACGTTCTAATGTCGTGTGACGACCCC 60
 TTCAGGAAGGCAGATGACGTGCGGTTTACCTACGCAGAGGCGATGACGGACTTTAGGTAC 120
 TACATCCCGCTGGCCAAGGCCGCCGAGGCCGGGTACCACGCCATGACGATCGCCGAC 180
 AGCATCGCCTACCCCTTCGAATCCGACTCGAAGTACCCCTACACCCGGACGGCAGCCGG 240
 GAGTTCTTGGACGGCAAGGAATTCATCGAAACCTTCGTTCTCACATCGGCATTGGGCGCG 300
 GTGACCTCGAAGCTGCGGTTCAACTTCTTCGTGCTGAAGCTGCCGATCCGGCCACCGGCG 360
 TTGGTGGCCAAGCAGATTGGGTGCGTGGCCGCCATGACCCGACAACCGAGTGGGTTTCGGC 420
 GTCGGCACCAGCCCGTGGCCCCGAGGACTACGAGTTGCTGGGCGTGCCCTTCGCCAGGCGC 480
 GGCAAGCGGATGGACGAATGCATCGAGATCATCCAGGGTCTCACCACCGGTGAGTACTTC 540
 GAATTCCACGGCGAGTTCTACGACATTCCCAAGACCAAGATGACGCCGGCCCCCACCAG 600
 CCGATCCCGGTCCTGGTCGGCGGGCAGCCGACGCCGCGCTGCGGCGTGCCGCACGGCTG 660
 GACGGCTGGATGCACGGCGGGGACCCGGAGGAGCTCGACCACCTCCTTGCCAAGCTC 720
 AAGCGGTTCCGCGAGGAAGCCGGCAAGACCGGGCCGTTTCGAGATCCACGTCATCTCCGCC 780
 GACGCCTACACCCCGGACGGCATCAAACGGCTCGAGGACAAGGGCGTCACCGACGTGATC 840
 GTGGGCTTCCGCATTCCCTACATCAAGGGCAAAGACACCGAGCCGCTGGACACCAAGATC 900
 CGCAATCTGGAGATGTTCCGCCGAGAACGTGATCGCGAAGGTCTGACCGGACGTGCCAAA 960
 CCCAAGCGTCACAGCGCTTTACAGGGGGTCCACCTCGGCGCTCGCTTCTCCCGGTGCG 1020
 CCAGGGCGGCCTCGGCCGGTGTGTTGGTGAACCCGGACAGGATCTGGGTGCGGTTCTCCA 1080
 GCTCGATCGCGTGGCGCAGGCTGGGCGCGTTCGAGCGCCGCGTTGAGGCCGATCTTGGTCT 1140
 GCCACACGCCATAAGCGTTGTTCTCGGCGATCGAGCGGGCCAACCGCAGCGCGGGGCA 1200
 TCAGCTGATCGGGCGCGACGACCTCGTGCACCAGCCTGATGCGATAGGCCTCGGCCGCGT 1260
 CGATGATGCGGCCGGTGAGCATCAGCTCGCGGGCCACGCCGGCGCCGACGATTTTGGGCA 1320
 GCAGATAGCTGGTGCCATGTCCATCGACGAGAAGCCGGCCTTGATGAACACCGAACCGA 1380
 ACCGGGCCTGCTCCGAGGCCACCCGATATCGCTGACCAACGCGAACGCCAGCCCGCCGC 1440
 CGACGGCGACGCCGTTGACCGCGGCGATCACCCGGATATCGAGCTCGTAGATCCGGGTGT 1500
 ACAGGCTGGCCAGCCGGACCTGGGCGTCGTAGTTGACCTTGAACGCCGGGGTGGTCCGGT 1560
 TGTTCGCGTCCACGGCCGGCCGGTGCCTCAGATCGGCGCCGGCGCAGAATCCCGGC 1620
 CCGCGCCGGTGAGGACCGCCACCCGGTGGTCACCGGTGTCCAGCACGTCCAGGGCCTCGT 1680
 GGACACCGTCGATCAGCGAGCCGTCGATGGCGTTGAGGCGTTCGGCCGGTTCAGGGTGA 1740
 TGCAGGCGATGTCGTCGTCGAGGGTCGCGAATTCCTACTGCGGGCATAGGTGAACCGTAAG 1800
 CGACACCGCGGCAGTTCAACGACCCGGCATAGCATGCACTCAGTGTGAGGGTGAGGTGCC 1860
 GCAGGAGGTTGCGGTGGTTGGATCCTGATCACCTGGTGTCTGGCTCATAGCCTGCCTGCC 1920
 GCCTTCGGGTTGGCGTTCATGCGTTTTGTTCGGCACCGGGTGTGAAGGACCGGCCGGCGTG 1980
 ACTTGATAGGAGCGTGGTACCGCCCCACTGAGGTTTTGTCCGCCGACCGGCCAACCGTC 2040
 ACCTCACAGTGAAGGAGGCAACCACCATGGTTGTTGTTGGAGCCGATGTCCACAAGCACA 2100
 CCCATACCTTTGTTGCTGTCGACGAGGTGGGGCGCAAGCTTGGCGAGAAGACCGTCAAAG 2160
 CGCTGACGAGTGGCCACGCCGAGGCGGTGATGTGGGCGCGGGAGCGCTTTGGAGCCCAGG 2220

TGGTGTGGGCGATTGAGGACTGCCGGCATCTGTTCGGCGCGGTTGGAACGTGATCTGCTCA 2280
 CGGCCGGCCAGCAGGTGGTGCGGGTACCACCGAAGTTGATGGCCCAGGCCCGGGCCAGTG 2340
 CGCGCACGCGGGGCAAGTCTGATCCGATCGATGCGCTAGCGGTTGCGCGGGGATTCTTTC 2400
 GAGAACCCGACCTGCCGGTAGCTTCCCATGACAAAAGTGTCTCGCGAACTTAAGCTGCTGG 2460
 TGGATCGGCGGGAAGTGCTTGTGGCACAACGGACTGCGATGATCAATCGGCTGCGTTGGC 2520
 GAGTTCACGAACTTGATCCCGAACGTGCCCCCGGTCCGGCCTCATTGGATCGTGGCAAAC 2580
 ACCGTACCTGTTGGGCGCCTGGTTGGCGACCGTTCCCGGTCTGGTCGCCGAGCTGGCCC 2640
 GCGATGAGCTCGCCGACATCACCCGGCTAACTGAAGCGATCAACGCACTGGCCAAGCGGA 2700
 TCGTTTCGCGAGTGCACGCGTTGCCCTGCGTTGTTGGCGATGCCCGGGTGCGCCGAGC 2760
 TGACCGCAGCCAAGCTCGTTCGGGGAAACCGCCGAGTGACCCGATTCAAAGCGAGGCCG 2820
 CCTTCGCCCGGCATGCCGGCGTAGCGCCTGTCCAGTGTGGTTCGGGCAACACCGCCGGCC 2880
 GGGTCCGAATGACCCGCTCGGGCAACCGACAACCTCAACGCCGCCCTGCACCGCATCGCGA 2940
 TCACCCAGATCCGCCTCGAGGGCCTCGGACAGACCTATTACCGTCACCGGCTAGCAGCCG 3000
 GTGACTCCAATCCCGAAGCCCTGCGCTGCCTCAAACGCCGCCTGGCCCGCATCATCTTCG 3060
 GCCACCTCCACACCGACCATCAACACCGAACTCAGCCTTGCCAAACGGCAGCGGCTTGAC 3120
 ATAGGAGAAAACGCATGACACGCAGCGAGGGTGATACCTGGAACCTGGCCAGCAGCGTCGG 3180
 CGCCACCGCGACCATGGTTCGCCCGCCGCGCGCGCGGCCGCGACCCGGCGTCCGCGGCCGGT 3240
 CCTCACCGACGAGTACGCCGAGCCGTTGGTCCGCGCCGTCGGATTGGACGTGTTACCAA 3300
 GTTGGCGAGCGGCGAGCTCGATCCCGACGATCTCGAGCGCGACGTCCGATTCCGCCGCAT 3360
 GGTCGACACATTCGCGGCCCGCGGCCGGTTCTACGACGACTACTTCGCCGCGGCCGGCAA 3420
 GGCAGGCCTACGCCAGGTGGTCATCGTGGCGTTCGGGGCTGGACGCCCGGCCGTACCGGCT 3480
 TTCCTGGCCGGCGGGGACGACGGTGTATGAGATCGACCAGCCCGAGGTGATCGCGTTCAA 3540
 GACCGCGACGCTGTTCGCGGATCGGTGCGGCCCCGACGCGCCGAGCTGCGCACCATCGGCAT 3600
 CGACCTGCGCCAGGATTGGCCGGCGGCGCTGCAGGACGCCGGCTTCGATGCCGCGCAGCC 3660
 CACCGCGTGGCTGGCCGAGGGGGTGCTCATCGGGTTTCTGCCGCCGGAGGCCGAGGTTTCG 3720
 GCTGCTCGACTCGATCACCC 3740

ORF 10-1

Startpunkt: Nukleotid 1786 ((-)-Strang)

MPAVEFATLDDDIACITLNRPERLNAIDGSLIDGVHEALDVLDTGDHRVAVLTGAGRGC 60
 AGADLSGTGRPWTRNKPTTPAFKVNDAQVRLASLYTRIYELDIPVIAAVNGVAVGGGLA 120
 FALVSDIRVASEQARFGSVFIKAGFSSMDMGTSYLLPKIVGAGVARELMLTGRIIDAAEA 160
 YRIRLVHEVVAPDQLMPAALRLARSIAENNAYGVWQTKIGLNAALDAPSLRHAI ELENRT 220
 QILSGFTNNPAEAA LAHREKRAPRDPL 268

ORF 10-2

Startpunkt: Nukleotid 2935 ((-)-Strang)

MRCRAALSCRLPERVIRTRPAVLPDHTGTGATPACRAKAASLLNRVTPAVSPTSLAAVS 60
 AHPGIANNAGATVRTREPIRLASALIASVSRVMSASSSRASSATRPGTVANQAPNR 116

ORF 10-3

Startpunkt: Nukleotid 2249 ((-)-Strang)

MPAVLNRPHHLGSKALPRPHHRLGVATRQRFDGLLAKLAPHLVDSNKGMLVLDIGSNNI 60
 HGGCLLHCEVTVGPVGGQTSVGAVPRSYQVTPAGPSHPVPTKRMNANPKAAGRL 114

ORF 10-4

Startpunkt: Nukleotid 3360 ((-)-Strang)

MRANPTSRSRSSGSSSPLANLVNTSNPTARTNGSAYSSVRTGRGRRVAAARAAATMVAV 60
 PTLARFQVSPSLRVMRFSYVKPLPFGKAEFGVDGRCGGGR 102

ORF 10-5

Startpunkt: Nukleotid 2067 (+-Strang)

MVVVGADVHKHTHTFVAVDEVGRKLGEKTVKALTSGHAEAVMWARERFQAQVVAIEDC 60
 HLSARLERDLLTAGQQVVRVPPKLMARASARTRGKSDPIDALAVARGFLREPDLPVA 120
 HDKVSRELKLLVDRREVLVAQRTAMINRLRWRVHELDPERAPGPASLDRGKHRHLLGAW 180
 ATPVGLVAELARDELADITRLTEAINALAKRIGSRVRTVAPALLAMPGCAELTAAKLVG 240
 TAGVTRFKSEAAFARHAGVAPVPVWSGNTAGRVRMTRSGNRQLNAALHRIAITQIRLEG 300
 GQTYRRHRLAAGDSNPEALRCLKRRLARIIFGHLHTDHQHRTQPCQTAAA 350

ORF 10-6

Startpunkt: Nukleotid 43 (+-Strang)

MSCDDPFRKADDVRFITYAEAMTDFRYIPLAKAAEAAGYHAMTIADSIAYPFESDSKYP 60
 TPDGSREFLDGKEFIETFVLTALGAVTSKLRNFVFLKLP IRPPALVAKQIGSLAAMT 120
 NRVGFGVGTSPWPEDYELLGVPPFARRGKRMDECIEIIQGLTTGEYFEFHGEFYDIPKTK 180
 TPAPTKPIPVLVGGHADAALRRAARLDGWMHGGDPEELDHLAKLKRFRFREEAGKTGPF 240
 IHVISADAYTPDGIKRLKEDKGVTDVIVGFRIPIYIKGKDTEPLDTKIRNLEMFAENVIK 300

Summary

This thesis describes the characterization of the potential virulence genes *mig* (*macrophage induced gene*) and *sigE* (member of the family of ECF sigma factors) of *Mycobacterium avium*.

The first step was the development of an adequate mutagenesis system, as gene targeting had not been successfully achieved in *M. avium* before. Strategies that have been applied successfully for allelic exchange in other mycobacteria were investigated. Inactivated alleles were created by inserting antibiotic resistance genes into the wild-type gene that was targeted for gene inactivation. Various DNA-recombination substrates like suicide plasmids, shuttle-plasmids or long linear DNA molecules were transferred into *M. avium* cells for allelic exchange by the electroporation technique. Due to problems with high rates of illegitimate recombination, spontaneous resistance and low transformation efficiency, all strategies failed. For this reason, conjugation was applied as another method for DNA-transfer into *M. avium* for the first time. In this work, the applicability of this method for targeted gene inactivation of the *sigE* gene in *M. avium* was demonstrated. However, this procedure could reveal no viable exconjugants after probable targeted inactivation of the *mig* gene. Moreover, viable exconjugants were detected where an integration of an inactivated *mig* allele could be shown by PCR analysis. After subsequent subcultivation, the exconjugants lost the integrated inactivated allele entirely. It was concluded that *mig* is an essential gene for *M. avium*. This hypothesis could not be verified, as *M. avium* had failed to be transformed stable with shuttle plasmids. Therefore, no gene-rescue experiments are possible for this species. Another explanation for failed allelic exchange could be a disadvantageous position of *mig* on the genome.

Analysis of the *sigE* mutant revealed that the gene product is not only involved in increasing the survival rates during extracytoplasmic stress. In the human macrophage model of infection, the *sigE* mutant showed significantly attenuated virulence compared to the wild-type strain.

Mig was further characterized by biochemical methods. A plasmid with a histidin-tagged fusion protein was constructed for expression of Mig in *E. coli*. Mig was detected as a 60 kDa protein after expression and purification of the recombinant gene product. The recombinant histidin-tagged gene and *mig* from *M. avium* were sequenced. This revealed that the *mig* gene encodes a 550 amino acid protein (58,6 kDa) instead of a 295 amino acid protein (30 kDa) predicted before (Plum *et al.* 1997). A 60 kDa Mig protein was detected in both the soluble

and insoluble fractions of *M. avium* cultures without acidification of the media in a western-blot analysis with an antibody specific for Mig. This illustrated that *mig* is expressed constitutively. In further western-blot analyses, decomposition products of Mig with a size of 30 to 35 kDa were detected in the insoluble fractions of *M. avium* cells. Therefore, two 30 kDa derivatives of Mig were expressed as histidin-tagged fusion proteins in *E. coli*. All fusion proteins were analysed for activity with an acyl-CoA-synthetase assay. This assay was chosen because of the homology of the 550 amino acid Mig, the acyl-CoA-synthetases FadD19 from *Mycobacterium tuberculosis* and FadD from *E. coli*. Moreover, the computer programs Psort, Tmpred and TopPred2 predicted that the 58,6 kDa Mig is a membrane protein. Among the three investigated proteins, only the 58,6 kDa Mig exhibited detectable activity as an acyl-CoA-synthetase with saturated medium chain fatty acids, unsaturated long chain fatty acid and aromatic carbon acids as substrates. This demonstrates that Mig is an acyl-CoA-synthetase.

The predicted *mig* promoter was characterized in *Mycobacterium smegmatis*. The promoter was constitutively active, which is in agreement with earlier western-blot analyses. The strength of the promoter was dependent on the growth phase and could be slightly increased by fatty acids, especially decanic acid. The expression of Mig in *M. smegmatis* resulted in an increased survival rate after incubation with toxic decanic acid.

Putative transcription-regulatory proteins were discovered for the *mig* promoter using a "one-hybrid-System" in *E. coli*. In this experiment, an ORF could be identified, that encoded a protein with a putative DNA binding domain. This protein and the deduced proteins of other detected open reading frames are candidates for repressor molecules of the *mig* promoter.

6. Referenzen

- Ades, S.E., Connolly, L.E., Alba, B.M. und Gross, C.A. 1999. The *Escherichia coli* σ^E -dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti- σ factor. *Genes Dev* **13**: 2449-2461
- Akaki, T., Sato, K., Shimizu, T., Sano, C., Kajitani, H., Dekio, S. und Tomioka, H. 1997. Effector molecules in expression of the antimicrobial activity of macrophages against *Mycobacterium avium* complex: roles of reactive nitrogen intermediates, reactive oxygen intermediates, and free fatty acids. *J Leukocyte Biol* **62**: 795-804
- Alexeyev, M.F., Shokolenko, I.N., Croughan T.P. 1995. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and *in vitro* deletion/insertion mutagenesis. *Gene* **160**: 63-67
- Aldovini, A., Husson, R.N. und Young, R.A. 1993. The *uraA* locus and homologous recombination in *Mycobacterium bovis* BCG. *J Bacteriol* **175**: 7282-7289
- Altare, F., Durandy, A., Lammas, D., Emile, J. -F., Lamhamedi, S., Le Deist, F., Drysdale, P., Jouanguy, E., Döffner, R., Bernaudin, F., Jeppsson, O., Gollob, J.A., Meinel, E., Segal, A.W., Fischer, A., Kumararatne, D. und Casanova, J.-L. 1998. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science* **280**: 1432-1435
- Altenschiedt, U., Oswald, B., Steiner, E., Herrmann, H. und Fuchs, G. 1993. New aerobic benzoate oxidation pathway via benzoyl-coenzyme A and 3-hydroxybenzoyl-coenzyme A in a denitrifying *Pseudomonas* sp. *J Bacteriol* **175**: 4851-4858
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402
- Amara, R.R. und Satchidanandam, V. 1997. Differential immunogenicity of novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens derived from live and dead bacilli. *Infect Immun* **65**: 4880-4882
- Armstrong, J.A. und Hart, P.D. 1971. Response of cultured macrophages to *M. tuberculosis* with observations of fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med* **134**: 713-740
- Anes, E., Portugal, I. und Moniz-Pereira, J. 1992. Insertion into the *Mycobacterium smegmatis* genome of the *aph* gene through lysogenization with the temperate mycobacteriophage Ms6. *FEMS Microbiol Lett* **95**: 21-26
- Angerer, A., Enz, S., Ochs, M. und Braun, V. 1995. Transcriptional regulation of ferric citrate transport in *Escherichia coli* K-12. Fecl belongs to a new subfamily of σ^{70} -type factors that respond to extracytoplasmic stimuli. *Mol Microbiol* **18**: 163-174
- Appelberg, R., Castro, A.G., Pedrosa, J. und Minoprio, P. 1994. Role of interleukin-6 in the induction of protective T-cells during mycobacterial infections in mice. *Immunology* **82**: 361-364
- Appelberg, R., Leal, I.S., Pais, T.F., Pedrosa, J. und Flórido, M. 2000. Differences in resistance of C57BL/6 and C57BL/10 mice to infection by *Mycobacterium avium* are independent of gamma interferon. *Infect Immun* **68**: 19-23
- Armitige, L.Y., Jagannath, C., Wanger, A.R. und Norris, S.J. 2000. Disruption of the genes encoding antigen 85A and antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: effect on growth in culture and in macrophages. *Infect Immun* **68**: 767-778
- Arruda, S., Bomfirm, G., Knights, R., Huima-Byron, T. und Riley, L.W. 1993. Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science* **261**: 1454-1457
- Ascenzi, J.M. und Vestal, J.R. 1979. Regulation of fatty acid biosynthesis by hydrocarbon substrates in *Mycobacterium convolutum*. *J Bacteriol* **137**: 384-390
- Astarié-Dequeker, C., N'Diaye, E.-N., Le Cabec, V., Rittig, M.G., Prandi, J. und Maridonneau-Parini, I. 1999. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infect Immun* **67**: 469-477
- Balasubramanian, V., Pavelka, M.S.Jr., Bardarov, S.S., Martin, J., Weisbrod, T.R., McAdam, R.A., Bloom, B.R. und Jacobs, W.R.Jr. 1996. Allelic exchange in *Mycobacterium tuberculosis* with long linear recombination substrates. *J Bacteriol* **178**: 273-279
- Balboa, M.A., Balsinde, J., Johnson, C.A. und Dennis, E.A. 1999. Regulation of arachidonic acid mobilization in lipopolysaccharide-activated P388D₁ macrophages by adenosine triphosphate. *J Biol Chem* **274**: 36764-36768
- Balcewicz-Sablinska, M.K., Gan, H.X. und Remold, H.G. 1999. Interleukin 10 produced by macrophages inoculated with *Mycobacterium avium* attenuates mycobacteria-induced apoptosis by reduction of TNF- α activity. *J Infect Dis* **180**: 1230-1237
- Balcewicz-Sablinska, M.K., Keane, J., Kornfeld, H. und Remold, H.G. 1998. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. *J Immunol* **161**: 2636-2641
- Balsinde, J., Balboa, M.A., Yedgar, S. und Dennis, E.A. 2000. Group V phospholipase A₂-mediated oleic acid mobilization in lipopolysaccharide-stimulated P388D₁ macrophages. *J Biol Chem* **275**: 4783-4786
- Banchio, D. und Gramajo, H.C. 1997. Medium- and long-chain fatty acid uptake and utilization by *Streptomyces coelicolor* A3(2): first characterization of a Gram-positive bacterial system. *Microbiology* **143**: 2439-2447

- Bange, F.-C., Brown, A.M. und Jacobs, W.R.Jr. 1996. Leucine auxotrophy restricts growth of *Mycobacterium bovis* BCG in macrophages. *Infect Immun* **64**: 1794-1799
- Bardarov, S., Kriakov, J., Carriere, C., Yu, S., Vaamonde, C., McAdam, R.A., Bloom, B.R., Hatfull, G.F. und Jacobs, W.R.Jr. 1997. Conditionally replicating mycobacteriophages: a system for transposon delivery to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 10961-10966
- Barker, L.P., Brooks, D.M. und Small, P.L.C. 1998. The identification of *Mycobacterium marinum* genes differentially expressed in macrophage phagosomes using promoter fusions to green fluorescent protein. *Mol Microbiol* **29**: 1167-1177
- Barker, K., Fan, H., Carroll, C., Kaplan, G., Barker, J., Hellmann, W. und Cohn, Z.A. 1996. Nonadherent cultures of human monocytes kill *Mycobacterium smegmatis*, but adherent cultures do not. *Infect Immun* **64**: 428-433
- Barker, L.P., George, K.M., Falkow, S. und Small, P.L.C. 1997. Differential trafficking of live and dead *Mycobacterium marinum* organisms in macrophages. *Infect Immun* **65**: 1497-1505
- Barrow, W.W., Carvalho de Sousa, J.P., Davis, T.L., Wright, E.L., Bachelet, M. und Rastogi, N. 1993. Immunomodulation of human peripheral blood mononuclear cells by defined lipid fractions of *Mycobacterium avium*. *Infect Immun* **61**: 5286-5293
- Bashyam, M.D., Kaushal, D., Dasgupta, S.K. und Tyagi, A.K. 1996. A study of the mycobacterial transcriptional apparatus: identification of novel features in promoter elements. *J Bacteriol* **178**: 4847-4853
- Bashyam, M.D. und Tyagi, A.K. 1998. Identification and analysis of 'extended -10' promoters from mycobacteria. *J Bacteriol* **180**: 2568-2573
- Batoni, G., Maisetta, G., Florio, W., Freer, G., Campa, M. und Senesi, S. 1998. Analysis of the *Mycobacterium bovis* *hsp60* promoter activity in recombinant *Mycobacterium avium*. *FEMS Microbiol Lett* **169**: 117-124
- Baulard, A., Kremer, L. und Loch, C. 1996. Efficient homologous recombination in fast-growing and slow-growing mycobacteria. *J Bacteriol* **178**: 3091-3098
- Beggs, M.L., Crawford, J.T. und Eisenach, K.D. 1995. Isolation and sequencing of the replication region of *Mycobacterium avium* plasmid pLR7. *J Bacteriol* **177**: 4836-4840
- Beggs, M.L., Stevanova, R., Eisenach, K.D. 2000. Species Identification of *Mycobacterium avium* Complex Isolates by a variety of molecular techniques *J Clin Microbiol* **38**: 508-512
- Behr-Perst, S.I., Munk, M.E., Schaberg, T., Ulrichs, T., Schulz, R.-J. und Kaufmann, S.H.E. 1999. Phenotypically activated $\gamma\delta$ T lymphocytes in the peripheral blood of patients with tuberculosis. *J Infect Dis* **180**: 141-149
- Belisle, J.T. und Brennan, P.J. 1994. Molecular basis of colony morphology in *Mycobacterium avium*. *Res Microbiol* **146**: 237-242
- Belisle, J.T., McNeil, M.R., Chatterjee, D., Inamine, J.M. und Brennan, P.J. 1993. Expression of the core lipopeptide of the glycopeptidolipid surface antigens in rough mutants of *Mycobacterium avium*. *J Biol Chem* **268**: 10510-10516
- Belisle, J.T., Pascopella, L., Inamine, J.M., Brennan, P.J. und Jacobs, W.R.Jr. 1991. Isolation and expression of a gene cluster responsible for biosynthesis of the glycopeptidolipid antigens of *Mycobacterium avium*. *J Bacteriol* **173**: 6991-6997
- Benini, J., Ehlers, E.M. und Ehlers, S. 1999. Different types of pulmonary granuloma necrosis in immunocompetent vs. TNFRp55-gene-deficient mice aerogenically infected with highly virulent *Mycobacterium avium*. *J Pathol* **189**: 127-137
- Bermudez, L.E. 1991. Infection of 'nonprofessional phagocytes' with *Mycobacterium avium* complex. *Clin Immunol Immunop* **61**: 225-235
- Bermudez, L.E. 1993. Production of transforming growth factor- β by *Mycobacterium avium*-infected human macrophages is associated with unresponsiveness to IFN- γ . *J Immunol* **150**: 1838-1845
- Bermudez, L.E. und Kaplan, G. 1995. Recombinant cytokines for controlling mycobacterial infections. *Trends Microbiol* **3**: 22-31
- Bermudez, L.E. und Young, L.S. 1994. Factors affecting invasion of HT-29 and HEp-2 epithelial cells by organisms of the *Mycobacterium avium* complex. *Infect Immun* **62**: 2021-2026
- Bernstein, H.D. 2000. The biogenesis and assembly of bacterial membrane proteins. *Curr Opin Microbiol* **3**: 203-209
- Berredige, M. 1997. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol* **499**: 291-306
- Berthet, F.X., Lagranderie, M., Gounon, P., Laurent-Winter, C., Ensergueix, D., Chavarot, P., Thouron, F., Maranghi, E., Pelicic, V., Portnoï, D., Marchal, G. und Gicquel, B. 1998. Attenuation of virulence by disruption of the *Mycobacterium tuberculosis* *erp* gene. *Science* **282**: 759-762
- Birnboim H. und Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523
- Bishai, W. 2000. Lipid lunch for persistent pathogen. *Nature* **406**: 683-685
- Black, P.N. und DiRusso, C.C. 1994. Molecular and biochemical analyses of fatty acid transport, metabolism and gene regulation in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1210**: 123-145

- Black, P.N., DiRusso, C.C., Metzger, A.K. und Heimert, T.L. 1992. Cloning, sequencing, and expression of the *fadD* gene of *Escherichia coli* encoding acyl coenzyme A synthetase. *J Biol Chem* **267**: 25513-25520
- Black, P.N., Zhang, Q., Weimar, J.D. und DiRusso, C.C. 1997. Mutational analysis of a fatty acyl-coenzyme A synthetase signature motif identifies seven amino acid residues that modulate fatty acid substrate specificity. *J Biol Chem* **272**: 4896-4903
- Bloch, K. 1977. Control mechanisms for fatty acid syntheses in *Mycobacterium smegmatis*. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **45**: 1-84
- Bloom, B.R. und Murray, C.J.L. 1992. Commentary on reemergent killer. *Science* **257**: 1055-1064
- Bodmer, T., Miltner, E. und Bermudez, L.E. 2000. *Mycobacterium avium* resists exposure to the acidic conditions of the stomach. *FEMS Microbiol Lett* **182**: 45-49
- Brennan, P.J. 1988. *Mycobacterium* and other actinomycetes. In: Microbial Lipids, Vol. 1 (Ratledge, C. und Wilkinson, S.G., Hrsg.), pp. 251 - 278, Academic Press, London
- Brennan, P.J. und Goren, M.B. 1979. Structural studies on the type-specific antigens and lipids of the *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum* serocomplex. *J Biol Chem* **254**: 4205-4211
- Brennan, P.J. und Nikaido, H. 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* **64**: 29-63
- Brettle, R.P. 1997. *Mycobacterium avium intracellulare* infection in patients with HIV or AIDS. *J Antimicrob Chemother* **40**: 156-160
- Brown, D.H., Lafuse, W.P. und Zwilling, B.S. 1997. Stabilized expression of mRNA is associated with mycobacterial resistance controlled by *Nramp1*. *Infect Immun* **65**: 597-603
- Butler, D. 2000. New fronts in an old war. *Nature* **406**: 670-672
- Calpham, D. 1995. Calcium signaling. *Cell* **80**: 259-268
- Camacho, L.R., Ensergueix, D., Perez, E., Gicquel, B. und Guilhot, C. 1999. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* **34**: 257-267
- Canaday, D.H., Ziebold, C., Noss, E.H., Chervenak, K.A., Harding, C.V. und Boom, W.H. 1999. Activation of human CD8⁺ $\alpha\beta$ TCR⁺ cells by *Mycobacterium tuberculosis* via an alternate class I MHC antigen-processing pathway. *J Immunol* **162**: 372-379
- Casadevall, A. und Pirofski, L.-A. 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immunol* **67**: 3703-3713
- Champsi, J.H., Bermudez, L.E. und Young, L.S. 1994. The role of cytokines in mycobacterial infection. *Biotherapy* **7**: 187-193
- Chan, J., Tanaka, K., Carrol, D., Flynn, J.L. und Bloom, B.R. 1995. Effects of nitric oxide inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **63**: 736-740
- Chan, J., Xing, Y., Magliozzo, R. und Bloom, B.R. 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* **175**: 1111-1122
- Chatfield, S., Strahan, K., Pickard, D., Charles, I., Hormaeche, C.E. und Dougan, G. 1992. Evaluation of *Salmonella typhimurium* strains harbouring defined mutations in *htrA* and *aroA* in the murine salmonellosis model. *Microb Pathog* **12**: 145-151
- Chatterjee, D., Bozic, C.M., McNeil, M.R. und Brennan, P.J. 1991. Structural features of the arabinan component of the lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **266**: 9652-9660
- Chatterjee, D., Hunter, S.W., McNeil, M., Jardine, I. und Brennan, P.J. 1989. Structure and function of mycobacterial glycolipids and glycopeptidolipids. *Acta Leprologica* **7**: 81-84
- Chatterjee, D., Lowell, K., Rivoire, B., McNeil, M.R. und Brennan, P.J. 1992. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. Capping with mannosyl residues in some strains. *J Biol Chem* **267**: 6234-6239
- Chatterjee, D., Roberts, A.D., Lowell, K., Brennan, P.J. und Orme, I.M. 1992. Structural basis of capacity of lipoarabinomannan to induce secretion of tumour necrosis factor. *Infect Immun* **60**: 1249-1253
- Christensen, H., Garton, N.J., Horobin, R.W., Minnikin, D.E. und Barer, M.R. 1999. Lipid domains of mycobacteria studied with fluorescent molecular probes. *Mol Microbiol* **31**: 1561-1572
- Chubb, A.J., Woodman, Z.L., Da Silva Tatley, F.M.P.R., Hoffmann, H.J., Scholle, R.R. und Ehlers, M.R.W. 1998. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* signal sequences that direct the export of a leaderless β -lactamase gene product in *Escherichia coli*. *Microbiology* **144**: 1619-1629
- Cirillo, J.D., Falkow, S., Tompkins, L.S. und Bermudez, L.E. 1997. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun* **65**: 3759-3767
- Clark, J.M. 1988. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **16**: 9677-9686

- Clemens, D.L. und Horwith, M.A. 1995. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med* **181**: 257-270
- Clemens, D.L. und Horwitz, M.A. 1996. The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin. *J Exp Med* **184**: 1349-1355
- Cohavy, O., Harth, G., Horwitz, M., Eggena, M., Landers, C., Sutton, C., Targan, S.R. und Braun, J. 1999. Identification of a novel mycobacterial histone H1 homologue (HupB) as an antigenic target of pANCA monoclonal antibody and serum immunoglobulin A from patients with Crohn's disease. *Infect Immun* **67**: 6510-6517
- Cole, S.T. und viele andere Autoren 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544
- Collins, D.M. 1996. In search of tuberculosis virulence genes. *Trends Microbiol* **4**: 426-430
- Collins, D.M., Kawakami, R.P., De Lisle, G.W., Pascopella, L., Bloom, B.R. und Jacobs, W.R.Jr. 1995. Mutation of the principal σ factor causes loss of virulence in a strain of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8036-8040
- Collins, H.L., Schaible, U.E. und Kaufmann, S.H.E. 1998. Early IL-4 induction in bone marrow lymphoid precursor cells by mycobacterial lipoarabinomannan. *J Immunol* **161**: 5546-5554
- Connolly, L., De Las Peñas, A., Alba, B.M. und Gross, C.A. 1997. The response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is controlled by partially overlapping pathways. *Genes Dev* **11**: 2012-2021
- Conti, E., Franks, N.P. und Brick, P. 1996. Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* **4**: 287-298
- Cox, D., Lee, D.J., Dale, B.M., Calafat, J. und Greenberg, S. 2000. A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 680-685
- Crowle, A.J., Dahl, R., Ross, E. und May, M.H. 1991. Evidence that vesicles containing living, virulent *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium* in cultured human macrophages are not acidic. *Infect Immun* **59**: 1823-1831
- Crowle, A.J., Tsang, A.Y., Vatter, A.E., und May, M.H. 1986. Comparison of 15 laboratory and patient-derived isolates of *Mycobacterium avium* for ability to infect and multiply in cultured human macrophages. *J Clin Microbiol* **24**: 812-821
- Daffé, M. und Draper, P. 1998. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol* **39**: 131-203
- Danese, P.N. und Silhavy, T.J. 1997. The σ^E and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of peiplasmic protein-folding enzymes in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **11**: 1183-1193
- Dannenberg, A.M. und Rook, G.A.W. 1994. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses – dual mechanisms that control bacillary multiplication. In: Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control (Bloom, B.R., Ed.), pp. 459-483. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- DasGupta, S.K., Bashyam, M.D. und Tyagi, A.K. 1993. Cloning and assessment of mycobacterial promoters by using a plasmid shuttle vector. *J Bacteriol* **175**: 616-622
- De Chastellier, C. und Thilo, L. 1997. Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle. *Eur J Cell Biol* **74**: 49-62
- De Chastellier, C., Fréhel, C., Offredo, C. und Skamene, E. 1993. Implication of phagosome-lysosome fusion in restriction of *Mycobacterium avium* growth in bone marrow macrophages from genetically resistant mice. *Infect Immun* **61**: 3775-3784
- De Crécy-Lagard, V., Blanc, V., Gil, P., Naudin, L., Lorenzon, S., Famechon, A., Bamas-Jacques, N., Couzet, J. und Thibaut, D. 1997. Pristinamycin I biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis*: molecular characterization of the first two structural peptide synthetase genes. *J Bacteriol* **179**: 705-713
- De Jong, R., Altare, F., Haagen, I.-A., Elferink, D.G., de Boer, T., van Breda Vriesman, P.J.C., Kabel, P.J., Draaisma, J.M.T., van Dissel, J.T., Kroon, F.P., Casanova, J.-L. und Ottenhoff, T.H.M. 1998. Severe mycobacterial and *Salmonella* infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science* **280**: 1435-1438
- De Las Peñas, A., Connolly, L. und Gross, C.A. 1997. The σ^E -mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of σ^E . *Mol Microbiol* **24**: 373-385
- Dellagostin, O.A., Esposito, G., Eales, L.-J., Dale, J.W. und McFadden, J.J. 1995. Activity of mycobacterial promoters during intracellular and extracellular growth. *Microbiology* **141**: 1785-1792
- DeMaio, J., Zhang, Y., Ko, C., Young, D.B. und Bishai, W.R. 1996. A stationary-phase stress-response sigma factor from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 2790-2794
- Derbyshire, V., Wood, D.W., Wu, W., Dansereau, J.T., Dalggaard, J.Z. und Belfort, M. 1997. Genetic definition of a protein-splicing domain: functional mini-inteins support structure predictions and a model for intein evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 11466-11471

- Deretic, V. und Fratti, R.A. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Mol Microbiol* **31**: 1603-1609
- Desjardins, M., Huber, L.A., Parton, R.G.F. und Griffiths, G. 1994. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with endocytic apparatus. *J Cell Biol* **124**: 677-688
- Devereux, J., Haeblerli, P. und Smithies, O. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl Acid Res* **12**: 387-395
- De Voss, J.J., Rutter, K., Schroeder, B.G. und Barry, C.E. 1999. Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. *J Bacteriol* **181**: 4443-4451
- DiRusso, C.C. und Black, P.N. 1999. Long-chain fatty acid transport in bacteria and yeast. Paradigms for defining the mechanism underlying this protein-mediated process. *Mol Cell Biochem* **192**: 41-52
- Dodd, I.B. und Egan, J.B. 1990. Improved detection of helix-turn-helix DNA-binding motifs in protein sequences. *Nucl Acid Res* **18**: 5019-5026
- Doherty, T.M., Seder, R.A. und Sher, A. 1996. Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *J Immunol* **156**: 735-741
- Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K. und Mattick, J.S. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* **19**: 4008
- Donnenberg, M.S. und Kaper, J.B. 1991. Construction of an *aeae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* **59**: 4310-4317
- Dorman, S.E. und Holland, S.M. 1998. Mutation in the signal-transducing chain of the interferon- γ receptor and susceptibility to mycobacterial infection. *J Clin Invest* **101**: 2364-2369
- Duronio, R.J., Knoll, L.J. und Gordon, J.I. 1992. Isolation of a *Saccharomyces cerevisiae* long chain fatty acyl:CoA synthetase gene (FAA1) and assessment of its role in protein N-myristoylation. *J Cell Biol* **117**: 515-529
- Durbach, S.I., Andersen, S.J. und Mizrahi, V. 1997. SOS induction in mycobacteria: analysis of the DNA-binding activity of a LexA-like repressor and its role in DNA damage induction of the *recA* gene from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **26**: 643-653
- Dürbaum-Landmann, I., Gercken, J., Flad, H.-D. und Ernst, M. 1996. Effect of in vitro infection of human monocytes with low numbers of *Mycobacterium tuberculosis* bacteria on monocyte apoptosis. *Infect Immun* **64**: 5384-5389
- Dziadek, J., Sajduda, A., Golanska, E., Brzostek, A. und Jaworski, A. 1994. Methods of introduction of foreign DNA into mycobacteria. *Acta Microbiologica Polonica* **43**: 233-239
- Eckstein, T.M., Silbaq, F.S., Chatterjee, D., Kelly, N.J., Brennan, P.J. und Belisle, J.T. 1998. Identification and recombinant expression of a *Mycobacterium avium* rhamnosyltransferase gene (*rtfA*) involved in glycopeptidolipid biosynthesis. *J Bacteriol* **180**: 5567-5573
- Ehlers, S. 1999. Immunity to tuberculosis: a delicate balance between protection and pathology. *FEMS Immunol Med Mic* **23**: 149-158
- Ehlers, S., Benini, J., Kutsch, S., Endres, R., Rietschel, E.T. und Pfeffer, K. 1999a. Fatal granuloma necrosis without exacerbated mycobacterial growth in tumor necrosis factor receptor p55 gene-deficient mice intravenously infected with *Mycobacterium avium*. *Infect Immunol* **67**: 3571-3579
- Ehlers, S., Kutsch, S., Benini, J., Cooper, A., Hahn, C., Gerdes, J., Orme, I., Martin, C. und Rietschel, E.T. 1999b. NOS2-derived nitric oxide regulates the size, quantity and quality of granuloma formation in *Mycobacterium avium*-infected mice without affecting bacterial loads. *Immunology* **98**: 313-323
- Ehrlich, S.D., Bierne, H., d'Alencon, E., Vilette, D., Petranovic, M., Noirot, P. und Michel, B. 1993. Mechanisms of illegitimate recombination. *Gene* **135**: 161-166
- Eriks, I.S. und Emerson, C.L. 1997. Temporal effect of tumor necrosis factor alpha on murine macrophages infected with *Mycobacterium avium*. *Infect Immun* **65**: 2100-2106
- Ernst, J.D. 1998. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **66**: 1277-1281
- Faergeman, N.J. und Knudsen, J. 1997. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem J* **323**: 1-12
- Falkow, S. 1997. What is a pathogen? *ASM News* **63**: 359-365
- Farewell, A., Diez, A.A., DiRusso, C.C. und Nyström, T. 1996. Role of the *Escherichia coli* FadR regulator in stasis survival and growth phase-dependent expression of the *uspA*, *fad*, and *fab* genes. *J Bacteriol* **178**: 6443-6450
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B. 1983. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**: 6-13
- Feng, C.G., Bean, A.G.D., Hooi, H., Briscoe, H. und Britton, W.J. 1999. Increase in gamma interferon-secreting CD8⁺, as well as CD4⁺, T cells in lungs following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **67**: 3242-3247
- Fernandes, N.D., Wu, Q.-L., Kong, D., Puyang, X., Garg, S. und Husson, R.N. 1999. A mycobacterial extracytoplasmic sigma factor involved in survival following heat shock and oxidative stress. *J Bacteriol* **181**: 4266-4274

- Fernández-Valverde, M., Reglero, A., Martínez-Blanco, H., Luengo, J.M. 1993. Purification of *Pseudomonas putida* acyl coenzyme A ligase active with a range of aliphatic and aromatic substrates. *Appl Environ Microb* **59**: 1149-1154
- Ferrari, G., Langen, H., Naito, M. und Pieters, J. 1999. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* **97**: 435-447
- Fesus, L., Thomazy, V., Autuori, F., Ceru, M.P., Tarsca, E. und Piacenetti, M. 1989. Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action. *FEBS Lett* **245**: 150-154
- Fietta, A., Francioli, C. und Grassi, G.G. 2000. Mycobacterial lipoarabinomannan affects human polymorphonuclear and mononuclear phagocyte functions differently. *Haematologica* **85**: 11-18
- Figurski, D.H. und Helinski, D.R. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 1648-1652
- Fitzmaurice, A.M. und Kolattukudy, P.E. 1997. Open reading frame 3, which is adjacent to the mycocerosic acid synthase gene, is expressed as an acyl coenzyme A synthase in *Mycobacterium bovis* BCG. *J Bacteriol* **179**: 2608-2615
- Fitzmaurice, A.M. und Kolattukudy, P.E. 1998. An acyl-CoA synthase (*acoas*) gene adjacent to the mycocerosic acid synthase (*mas*) locus is necessary for mycocerosyl lipid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* BCG. *J Biol Chem* **273**: 8033-8039
- Flesch, I.E. und Kaufmann, S.H.E. 1990. Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4 and tumor necrosis factor. *Infect Immun* **58**: 2675-2677
- Flesselles, B., Anand, N.N., Remani, J., Loosmore, S.M. und Klein, M.H. 1999. Disruption of the mycobacterial cell entry gene of *Mycobacterium bovis* BCG results in a mutant that exhibits a reduced invasiveness for epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* **177**: 237-242
- Flórido, M., Gonçalves, A.S., Silva, R.A., Ehlers, S., Cooper, A.M. und Appelberg, R. 1999. Resistance of virulent *Mycobacterium avium* to gamma interferon-mediated antimicrobial activity suggests additional signals for induction of mycobacteriostasis. *Infect Immun* **67**: 3610-3618
- Flynn, J.L., Chan, J., Triebold, K.J., Dalton, D.K., Stewart T.A. und Bloom, B.R. 1993. An essential role of interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* **178**: 2249-2254
- Foley-Thomas, E.M., Whipple, D.L., Bermudez, L.E. und Barletta, R.G. 1995. Phage infection, transfection and transformation of *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Microbiology* **141**: 1173-1181
- Fratazzi, C., Arbeit, R.D., Carini, C. und Remold, H.G. 1997. Programmed cell death of *Mycobacterium avium* serovar 4-infected human macrophages prevents the mycobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. *J Immunol* **158**: 4320-4327
- Fratazzi, C., Arbeit, R.D., Carini, C., Balcewicz-Sablinska, M.K., Keane, J., Kornfeld, H. und Remold, H.G. 1999. Macrophage apoptosis in mycobacterial infections. *J Leukocyte Biol* **66**: 763-764
- Fréhel, C., De Chastellier, C., Lang, T. und Rastogi, N. 1986. Evidence for inhibition of fusion of lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *Mycobacterium avium*. *Infect Immun* **52**: 252-262
- Fréhel, C., Offredo, C. und De Chastellier, C. 1997. The phagosomal environment protects virulent *Mycobacterium avium* from killing and destruction by clarithromycin. *Infect Immun* **65**: 2792-2802
- Frischkorn, K., Sander, P., Scholz, M., Teschner, K., Prammananan, T. und Böttger, E.C. 1998. Investigation of mycobacterial *recA* function: protein introns in the RecA of pathogenic mycobacteria do not affect competency for homologous recombination. *Mol Microbiol* **29**: 1203-1214
- Fritsche, W. 1990. Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag Jena
- Fulda, M., Heinz, E. und Wolter, F.P. 1994. The *fadD* gene of *Escherichia coli* K12 is located close to *rmd* at 39.6 min of the chromosomal map and is a new member of the AMP-binding protein family. *Mol Gen Genet* **242**: 241-249
- García, R.C., Banfi, E. und Pittis, M.G. 2000. Infection of macrophage-like THP-1 cells with *Mycobacterium avium* results in a decrease in their ability to phosphorylate nucleolin. *Infect Immun* **68**: 3121-3128
- Gavigan, J.-A. und Martin, C. 1998. Conjugating DNA into mycobacteria. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 101: Mycobacteria Protocols (Parisch, T. und Stoker, N.G., Hrsg.), pp 119-128. Humana Press Inc., Totowa, NJ
- Gavigan, J.-A., Guilhot, C., Gicquel, B. und Martin, C. 1995. Use of conjugative and thermosensitive cloning vectors for transposon delivery to *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett* **127**: 35-39
- Gercken, J., Pryjma, J., Ernst, M. und Flad, H. -D. 1994. Defective antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*-infected monocytes. *Infect Immun* **62**: 3472-3478
- Ghosh, S., Pal, S., Das, S., Dasgupta, S.K. und Majumdar, S. 1998. Lipoarabinomannan induced cytotoxic effects in human mononuclear cells. *FEMS Immunol Med Mic* **21**: 181-188

- Gish, W. und States, D.J. 1993. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat Genet* **3**: 266-272
- Gocht, M. und Marahiel, M.A. 1994. Analysis of core sequences in the D-Phe activation domain of the multifunctional peptide synthetase TycA by site-directed mutagenesis. *J Bacteriol* **176**: 2654-2662
- Gomes, M.S., Flórido, M., Pais, T.F. und Appelberg, R. 1999a. Improved clearance of *Mycobacterium avium* upon disruption of the inducible nitric oxide synthase gene. *J Immunol* **162**: 6734-6739
- Gomes, M.S., Paul, S., Moreira, A.L., Appelberg, R., Rabinovitch, M. und Kaplan, G. 1999b. Survival of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* in acidified vacuoles of murine macrophages. *Infect Immun* **67**: 3199-3206
- Gomez, M., Doukhan, L., Nair, G. und Smith, I. 1998. *sigA* is an essential gene in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **29**: 617-628
- Gomez, M., Johnson, S. und Gennaro, M.L. 2000. Identification of secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis* by a bioinformatic approach. *Infect Immun* **68**: 2323-2327
- Gormley, E.P. und Davies, J. 1991. Transfer of plasmid RSF1010 by conjugation from *Escherichia coli* to *Streptomyces lividans* and *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **173**: 6705-6708
- Graham, J.E. und Clark-Curtiss, J.E. 1999. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCORS). *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 11554-11559
- Grogan, W.M. und Huth, E.G. 1986. HPLC measurement of testicular long chain acyl-CoA synthetases with different substrate specificities. *Lipids* **21**: 11-16
- Gruber, T.M. und Bryant, D.A. 1998. Characterization of the alternative σ -factors SigD and SigE in *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. SigE is implicated in transcription of post-exponential-phase-specific genes. *Arch Microbiol* **169**: 211-219
- Guerrero, C., Bernasconi, C., Burki, D., Bodmer, T. und Telenti, A. 1995. A novel Insertion Element from *Mycobacterium avium*, IS1245, Is a specific target for Analysis of strain relatedness *J Clin Microbiol* **33**: 304-307
- Guérin, I. und De Chastellier, C. 2000. Pathogenic mycobacteria disrupt the macrophage actin filament network. *Infect Immun* **68**: 2655-2662
- Haas, A. 1998. Reprogramming the phagocytic pathway – intracellular pathogens and their vacuoles (Review). *Mol Membr Biol* **15**: 103-121
- Haas, A. und Goebel, W. 1992. Microbial strategies to prevent oxygen-dependent killing by phagocytes. *Free Radical Research Communications* **16**: 137-157
- Hackam, D.J., Rotstein, O.D., Zhang, W.-J., Demareux, N., Woodside, M., Tsai, O. und Grinstein, S. 1997. Regulation of phagosomal acidification. *J Biol Chem* **272**: 29810-29820
- Hackam, D.J., Rotstein, O.D., Zhang, W.-J., Gruenheid, S., Gros, P. und Grinstein, S. 1998. Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein1 (Nramp1) impairs phagosomal acidification. *J Exp Med* **188**: 351-364
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühlendorfer, I. und Tschäpe, H. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* **23**: 1089-1097
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580
- Harley, C.B. und Reynolds, R.P. 1987. Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucl Acids Res* **15**: 2343-2361
- Harmsen, A.G., Muggenburg, B.A., Snipes, M.B. und Bice, D.E. 1985. The role of macrophages in particle translocation from lungs to lymph nodes. *Science* **230**: 1277-1280
- Harth, G., Clemens, D.L. und Horwitz, M.A. 1994. Glutamine synthetase of *Mycobacterium tuberculosis*: extracellular release and characterization of its enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 9242-9346
- Harth, G. und Horwitz, M.A. 1997. Expression and efficient export of enzymatically active *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase in *Mycobacterium smegmatis* and evidence that the information for export is contained within the protein. *J Biol Chem* **272**: 22728-22735
- Harth, G. und Horwitz, M.A. 1999a. Export of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* superoxide dismutase is dependent upon both information in the protein and mycobacterial export machinery. *J Biol Chem* **274**: 4281-4292
- Harth, G. und Horwitz, M.A. 1999b. An inhibitor of exported *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase selectively blocks the growth of pathogenic mycobacteria in axenic culture and in human monocytes: extracellular proteins as potential novel drug targets. *J Exp Med* **189**: 1425-1435
- Harth, G., Zamecnik, P.C., Tang, J.-Y., Tabatadze, D. und Horwitz, M.A. 2000. Treatment of *Mycobacterium tuberculosis* with antisense oligonucleotides to glutamine synthetase mRNA inhibits glutamine synthetase activity, formation of the poly-L-glutamate/glutamine cell wall structure, and bacterial replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 418-423
- Hatfull, G.F. 1993. Genetic transformation of mycobacteria. *Trends in Microbiology* **1**: 310-314
- Hayashi, T., Rao, S.P., Meylan, P.R., Kornbluth, R.S. und Catanzaro, A. 1999. Role of CD40 ligand in *Mycobacterium avium* infection. *Infect Immun* **67**: 3558-3565

- Heitman, J., Ivanenko, T. und Kiss, A. 1999. DNA nicks inflicted by restriction endonucleases are repaired by a RecA- and RecB-dependent pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **33**: 1141-1151
- Henderson, B., Poole, S. und Wilson, M. 1996. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol Rev* **60**: 316-341
- Hess, J. und Kaufmann, S.H.E. 1999. Live antigen carriers as tools for improved anti-tuberculosis vaccines. *FEMS Immunol Med Mic* **23**: 165-173
- Hess, J., Grode, L., Hellwig, J., Conradt, P., Gentschev, I., Goebel, W., Ladel, C. und Kaufmann, S.H.E. 2000. Protection against murine tuberculosis by an attenuated recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain that secretes the 30-kDa antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *FEMS Immunol Med Mic* **27**: 283-289
- Heym, B., Stavropoulos, E., Honore, N., Domenech, P., Saint-Joanis, B. und Wilson, T.M. 1997. Effects of overexpression of the alkyl hydroperoxidase reductase AhpC on the virulence and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **65**: 1395-1401
- Heuner, K., Brand, B.C. und Hacker, J. 1999. The expression of the flagellum of *Legionella pneumophila* is modulated by different environmental factors *FEMS Microbiol. Lett.* **175**: 69-77
- Hill, A.V.S. 1998. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu Rev Immunol* **16**: 593-617
- Hinds, J., Mahenthalingam, E., Kempell, K.E., Duncan, K., Stokes, R.W., Parish, T. und Stoker, N.G. 1999. Enhanced gene replacement in mycobacteria. *Microbiology* **145**: 519-527
- Holsti, M.A. und Allen, P.M. 1996. Processing and presentation of an antigen of *Mycobacterium avium* require access to an acidified compartment with active proteases. *Infect Immun* **64**: 4091-4098
- Hooper, L.C., Johnson, M.M., Khera, V.R. und Barrow, W.W. 1986. Macrophage uptake und retention of radiolabelled glycopeptidolipid antigens associated with the superficial L₁ layer of *Mycobacterium intracellulare* serovar 20. *Infect Immun* **54**: 133-141
- Horsburgh, C.R.Jr. 1991. *Mycobacterium avium* complex in the acquired immunodeficiency syndrom (AIDS). *N Engl J Med* **324**: 1332-1338
- Howard, A.D. und Zwillig, B.S. 1998. Cytokine production by CD4 and CD8 T cells during the growth of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Clin Exp Immunol* **113**: 443-449
- Husson, R.N., James, B.E. und Young, R.A. 1990. Gene replacement and expression of foreign DNA in mycobacteria. *J Bacteriol* **172**: 519-524
- Inderlied, C.B. und Nash, K.A. 1997. Microbiology and *in vitro* susceptibility testing. In: Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria, pp 109-140. American Thoracic Society, New York
- Inderlied, C.B., Kemper, C.A. und Bermudez, L.E.M. 1993. The *Mycobacterium avium* complex. *Clin Microbiol Rev* **6**: 266-310
- Jackowski, S., Jackson, P.D. und Rock, C.O. 1994. Sequence and function of the *aas* gene in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**: 2921-2928
- Jackson, M., Raynaud, C., Lanéelle, A., Guilhot, C., Lauren t-Winter, C., Ensergueix, D., Gicquel, B. und Daffé, M. 1999. Inactivation of the antigen 85C gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. *Mol Microbiol* **31**: 1573-1587
- Jacobs, W.R.Jr., Kalpana, G.V., Cirillo, J.D., Pascopella, L., Snapper, S.B., Udani, R.A., Jones, W., Barletta, R.G. und Bloom, B.R. 1991. Genetic systems for mycobacteria. *Meth Enzymol* **204**: 537-555
- Jagirdar, J. und Zagzag, D. 1996. Pathology and insights into pathogenesis of tuberculosis. In: Tuberculosis (Rom, W.N. und Garay, S., Eds.) pp. 467-482. Little, Brown and Co., Boston, MA.
- Johnson, D.R., Knoll, L.J., Rowley, N. und Gordon, J.I. 1994. Genetic analysis of the role of *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA synthetase genes in regulating protein N-myristoylation. *J Biol Chem* **269**: 18037-18046
- Johnson, K., Charles, I., Dougan, G., Pickard, D., O'Gaota, P., Ali, T., Miller, I. und Hormaecha, C. 1991. The role of a stress response protein in *Salmonella typhimurium* virulence. *Mol Microbiol* **5**: 401-407
- Ju, J., Luo, T. und Haldenwang, W.G. 1998. Forespore expression and processing of the SigE transcription factor in wild-type and mutant *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **180**: 1673-1681
- Jungblut, P.R., Schaible, U.E., Mollenkopf, H.-J., Zimny-Arndt, U., Raupach, B., Mattow, J., Halada, P., Lamer, S., Hagens, K. und Kaufmann, S.H.E. 1999. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microbiol* **33**: 1103-1117
- Kalpana, G.V., Bloom, B.R. und Jacobs, W.R.Jr. 1991. Insertional mutagenesis and illegitimate recombination in mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 5433-5437
- Kameda, K. und Nunn, W.D. 1981. Purification and characterization of acyl coenzyme A synthetase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **256**: 5702-5707
- Kanetsuna, F. 1985. Bactericidal effect of fatty acids on mycobacteria, with particular reference to the suggested mechanism of intracellular killing. *Microbiol Immunol* **29**: 127-141

- Kasuya, F., Igarashi, K. und Fukui, M.** 1999. Characterization of a renal medium chain acyl-CoA synthetase responsible for glycine conjugation in mouse kidney mitochondria. *Chem-Biol Interact* **118**: 233-246
- Kaufmann, S.H.E.** 1999. Cell-mediated immunity: dealing a direct blow to pathogens. *Curr Biol* **9**: R97-R99
- Keane, J., Balcewicz-Sablinska, M.K., Remold, H.G., Chupp, G.L., Meek, B.B., Fenton, M.J. und Kornfeld, H.** 1997. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun* **65**: 298-304
- Kenney, T.J. und Churchward, G.** 1996. Genetic analysis of the *Mycobacterium smegmatis rpsL* promoter. *J Bacteriol* **178**: 3564-3571
- Kho, K.-H., Jarboe, E., Barker, A., Torrelles, J., Kuo, C.-W. und Chatterjee, D.** 1999. Altered expression profile of the surface glycopeptidolipids in drug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium avium* complex. *J Biol Chem* **274**: 9778-9785
- Kleinkauf, H. und von Döhren, H.** 1996. A nonribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur J Biochem* **236**: 335-351
- Klenk, H.P., Clayton, R.A., Tomb, J., White, O. und weitere Autoren.** 1997. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**: 364-370
- Knoll, L.J., Johnson, D.R. und Gordon J.I.** 1994. Biochemical studies of three *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA synthetases, Faa1p, Faa2p, and Faa3p. *J Biol Chem* **269**: 16348-16356
- Kotani, S., Kitaura, T., Hirano, T. und Tanaka, A.** 1959. Isolation and chemical composition of the cell walls of BCG. *Biken J* **2**: 129-141
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M. und Peterson, K.M.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176
- Kremer, L., Baulard, A., Estaquier, J., Content, J., Capron, A. und Locht, C.** 1995. Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* 85A antigen promoter region. *J Bacteriol* **177**: 642-653
- Kunau, W.-H., Dommès, V. und Schulz, H.** 1995. β -Oxidation of fatty acids in mitochondria peroxisomes and bacteria: a century of continued progress. *Prog. Lipid Res.* **34**: 267-342
- Kusner, D.J., Hall, C.F. und Schlesinger, L.S.** 1996. Activation of phospholipase D is tightly coupled to the phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* or opsonized zymosan by human macrophages. *J Exp Med* **184**: 585-595
- Ladel, C.H., Blum, C., Dreher, A., Reifenberg, K., Kopf, M. und Kaufmann, S.H.E.** 1997a. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. *Infect Immun* **65**: 4843-4849
- Ladel, C.H., Szalay, G., Riedel, D. und Kaufmann, S.H.E.** 1997b. Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. *Infect Immun* **65**: 1936-1938
- Laemli, U.K.** 1970. Cleavage of the structural protein during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lagier, B., Pelicic, V., Lecossier, D., Prod'homme, G., Raugier, J., Guilhot, C., Gicquel, B. und Hance, A.J.** 1998. Identification of genetic loci implicated in the survival of *Mycobacterium smegmatis* in human mononuclear phagocytes. *Mol Microbiol* **29**: 465-475
- Lavigne, M., Herbert, M., Kolb, A. und Buc, H.** 1992. Upstream curved sequences influence the initiation of transcription at the *Escherichia coli* galactose operon. *J Mol Biol* **224**: 293-306
- Leusen, J.H.W., Verhoeven, A.J. und Roos, D.** 1996. Interactions between the component of the human NADPH oxidase: a review about the intrigues in the phox family. *Frontiers in Bioscience* **1**: 72-90
- Lim, E.M., Raugier, J., Timm, J., Torrea, G., Murray, A., Gicquel, B. und Portnoi, D.** 1995. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA sequences encoding exported proteins by using *phoA* gene fusions. *J Bacteriol* **177**: 59-65
- Liu, J. und Nikaido, H.** 1999. A mutant of *Mycobacterium smegmatis* defective in the biosynthesis of mycolic acids accumulates meromycolates. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 4011-4016
- Lonetto, M.A., Brown, K.L., Rudd, K.E. und Buttner, M.J.** 1994. Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase σ factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 7573-7577
- Mahairas, G.G., Sabo, P.J., Hickey, M.J., Singh, D.C. und Stover, C.K.** 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* **178**: 1274-1282
- Mahenthiralingam, E., Marklund, B.-I., Brooks, L.A., Smith, D.A., Bancroft, G.J. und Stokes, R.W.** 1998. Site-directed mutagenesis of the 19-kilodalton lipoprotein antigen reveals no essential role for the protein in the growth and virulence of *Mycobacterium intracellulare*. *Infect Immun* **66**: 3626-3634
- Malik, Z.A., Denning, G.M. und Kusner, D.J.** 2000. Inhibition of Ca^{2+} signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. *J Exp Med* **191**: 287-302
- Manabe, Y.C., Saviola, B.J., Sun, L., Murphy, J.R. und Bishai, W.R.** 1999. Attenuation of virulence in *Mycobacterium tuberculosis* expressing a constitutively active iron repressor. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 12844-12848

- Mangan, D.F. und Wahl, S.M. 1991. Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines. *J Immunol* **147**: 3408-3412
- Manganelli, R., Dubnau, E., Tyagi, S., Kramer, F.R. und Smith, I. 1999. Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **31**: 715-724
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Manting, E.H. und Driesen, A.J. 2000. Escherichia coli translocase: the unravelling of a molecular machine. *Mol Microbiol* **37**: 226-238
- Marklund, B.-I., Mahenthalingam, E. und Stokes, R.W. 1998. Site-directed mutagenesis and virulence assessment of the *katG* gene of *Mycobacterium intracellulare*. *Mol Microbiol* **29**: 999-1008
- Marklund, B.-I., Speert, D.P. und Stokes, R.W. 1995. Gene replacement through homologous recombination in *Mycobacterium intracellulare*. *J Bacteriol* **177**: 6100-6105
- Marrakchi, H., Lann elle, G. und Qu emard, A. 2000. InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. *Microbiology* **146**: 289-296
- Marston, B.J. und Shinnick, T.M. 1996. Differentially expressed genes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Ann N Y Acad Sci* **797**: 32-41
- Matsumoto, H., Suzuki, K., Tsuyuguchi, K., Tanaka, E., Amitani, R., Maeda, A., Yamamoto, K., Sasada, M. und Kuze, F. 1997. Interleukin-12 gene expression in human monocyte-derived macrophages stimulated with *Mycobacterium bovis* BCG: cytokine regulation and effect of NK cells. *Infect Immun* **65**: 4405-4410
- McCarthy, C. und Ashbaugh, P. 1981. Factors that affect the cell cycle of *Mycobacterium avium*. *Rev Infect Dis* **3**: 914-925
- McFadden, J. 1996. Recombination in mycobacteria. *Mol Microbiol* **21**: 205-211
- McKinney, J.D., H oner zu Bentrup, K., Mu oz-Elias, E.J., Miczak, A., Chen, B., Chan, W.-T., Swenson, D., Sacchetti, J.C., Jacobs, W.R.Jr. und Russell, D.G. 2000. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* **406**: 735-738
- McNeil, M.R. und Brennan, P.J. 1991. Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Res Microbiol* **142**: 451-463
- Mdluli, K., Swanson, J., Fischer, E., Lee, R.E. und Barry, C.E. 1998. Mechanisms involved in the intrinsic isoniazid resistance of *Mycobacterium avium*. *Mol Microbiol* **27**: 1223-1233
- Meyer, M., von Gr unberg, P.W.R., Knoop, T., Hartmann, P. und Plum, G. 1998. The macrophage-induced gene *mig* as a marker for clinical pathogenicity and in vitro virulence of *Mycoacterium avium* complex strains **66**: 4549-4552
- Mecenas, J., Rouviere, P.E., Erickson, J.W., Donohue, T.J. und Gross, C.A. 1993. The activity of σ^E , an *Escherichia coli* heat-inducible σ -factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev* **7**: 2618-2628
- Mekalanos, J.J. 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* **174**: 1-7
- Miller, V.L. und Mekalanos, J.J. 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J Bacteriol* **170**: 2575-2583
- Miller, B.H. und Shinnick, T.M. 2000. Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* genes involved in resistance to killing by human macrophages. *Infect Immun* **68**: 387-390
- Mills, J.A., McNeil, M.R., Belisle, J.T., Jacobs, W.R.Jr. und Brennan, P.J. 1994. Loci of *Mycobacterium avium ser2* gene cluster and their functions. *J Bacteriol* **176**: 4803-4808
- Mills, K.V., Lew, B.M., Jiang, S.-Q. und Paulus, H. 1998. Protein splicing in *trans* by purified N- and C-terminal fragments of the *Mycobacterium tuberculosis* RecA intein. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3543-3548
- Minnikin, D.E. 1982. Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. In: The biology of the Mycobacteria, Vol. 1. Physiology, Identification and Classification (Ratledge, C. und Stanford, J., Hrsg.), pp 95-184. Academic Press, London
- Misaki, A., Seto, N. und Azuma, I. 1974. Structure and immunological properties of D-arabino-D-galactan isolated from cell walls of *Mycobacterium* species. *J Biochem* **76**: 15-27
- Missiakas, D. und Raina, S. 1998. The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol Microbiol* **28**: 1059-1066
- Missiakas, D., Mayer, M.P., Lemaire, M., Georgopoulos, C. und Raina, S. 1997. Modulation of the *Escherichia coli* σ^E (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins. *Mol Microbiol* **24**: 355-371
- Mohamed, M.E.-S. 2000. Biochemical and molecular characterization of phenylacetate-coenzyme A ligase, an enzyme catalyzing the first step in aerobic metabolism of phenylacetic acid in *Azoarcus evansii*. *J Bacteriol* **182**: 286-294

- Mole, S.E., Iggo, R.D. und Lane, D.P. 1989. Using the polymerase chain reaction to modify expression plasmids for epitope mapping. *Nucleic Acids Res* **17**: 3319
- Montali, R.J., Bush, M., Cromie, R., Holland, S.M., Maslow, J.N., Worley, M., Witebsky, F.G. und Phillips, T.M. 1998. Primary *Mycobacterium avium* complex infections correlate with lowered cellular immune reactivity in Matschie's tree kangaroos (*Dendrolagus matschiei*). *J Infect Dis* **178**: 1719-1725
- Mootz, H.D und Marahiel, M.A. 1997. The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J Bacteriol* **179**: 6843-6850
- Mopather, M.E. und Sanger, J.G. 1984. *In vitro* interaction of *Mycobacterium avium* with intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **45**: 67-73
- Mulder, M.A., Zappe, H. und Steyn, L.M. 1999. The *Mycobacterium tuberculosis katG* promoter region contains a novel upstream activator. *Microbiology* **145**: 2507-2518
- Murray, H.W. 1988. Survival of intracellular pathogens within human mononuclear phagocytes. *Semin Hematol* **25**: 101-111
- Nakai, K. und Kanehisa, M. 1992. A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* **14**: 897-911
- Nau, G.J., Guilfoile, P., Chupp, G.L., Berman, J.S., Kim, S.J., Kornfeld, H. und Young, R.A. 1997. A chemoattractant cytokine associated with granulomas in tuberculosis and silicosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 6414-6419
- Nielsen, H., Brunak, S. und von Heijne, G. 1999. Machine learning approaches to the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. *Prot Eng* **12**: 3-9
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. und von Heijne, G. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Prot Eng* **10**: 1-6
- Norman, E., De Smet, K.A.L., Stoker, N.G., Ratledge, C., Wheeler, P.R. und Dale, J.W. 1994. Lipid synthesis in mycobacteria: characterization of the biotin carboxyl carrier protein genes from *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis*. *J Bacteriol* **176**: 2525-2531
- Norman, E., Dellagostin, O.A., McFadden, J. und Dale, J.W. 1995. Gene replacement by homologous recombination in *Mycobacterium bovis* BCG. *Mol Microbiol* **16**: 755-760
- Ohkubo, Y., Mori, S., Ishikawa, Y., Shirai, K., Saito, Y. und Yoshida, S. 1992. Presence and properties of acyl coenzyme A synthetase for medium-chain fatty acids in rat intestinal mucosa. *Digestion* **51**: 42-50
- Pace, J., Hayman, M.J. und Galán, J.E. 1993. Signal transduction and invasion of epithelial cells by *S. typhimurium*. *Cell* **72**: 505-514
- Paget, M.S.B., Chamberlin, L., Atrih, A., Foster, S.J. und Buttner, M.J. 1999. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor σ^E is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **181**: 204-211
- Pais, T.F. und Appelberg, R. 2000. Macrophage control of mycobacterial growth induced by picolinic acid is dependent on host cell apoptosis. *J Immunol* **164**: 389-397
- Papavinasandaram, K.G., Colston, M.J. und Davis, E.O. 1998. Construction and complementation of a *recA* deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis* reveals that the intein in *Mycobacterium tuberculosis recA* does not affect RecA function. *Mol Microbiol* **30**: 525-534
- Parales, R.E. und Harwood C.S. 1993. Construction and use of a new broad-host-range *lacZ* transcriptional fusion vector, pHRP309, for Gram⁻ bacteria. *Gene* **133**: 23-30
- Parish, T. und Stoker, N.G. 1997. Development and use of a conditional antisense mutagenesis system in mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **154**: 151-157
- Parker, A.E. und Bermudez, L.E. 1997. Expression of the green fluorescent protein (GFP) in *Mycobacterium avium* as a tool to study the interaction between mycobacteria and host cells. *Microb Pathogenesis* **22**: 193-198
- Parsons, L.M., Jankowski, C.S. und Derbyshire, K.M. 1998. Conjugal transfer of chromosomal DNA in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **28**: 571-582
- Pavela-Vrancic, M., Pfeifer, E., van Liempt, H., Schäfer, H.-J., von Döhren, H. und Kleinkauf, H. 1994. ATP binding in peptide synthetases: determination of contact sites of the adenine moiety by photoaffinity labeling of tyrocidine synthetase 1 with 2-azidoadenosine triphosphate. *Biochemistry* **33**: 6276-6283
- Pavelka, M.S.Jr. und Jacobs, W.R.Jr. 1999. Comparison of the construction of unmarked deletion mutations in *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin, and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv by allelic exchange. *J Bacteriol* **181**: 4780-4789
- Pelicic, V., Jackson, M., Reyrat, J.-M., Jacobs, W.R.Jr., Gicquel, B. und Guilhot, C. 1997. Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 10955-10960
- Pelicic, V., Reyrat, J.-M. und Gicquel, B. 1996. Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J Bacteriol* **178**: 1197-1199

- Peterson, D.O. und Bloch, K. 1977. *Mycobacterium smegmatis* fatty acid synthetase. Long chain transacylase chain length specificity. *J Biol Chem* **252**: 5735-5739
- Pfeifer, E., Pavela-Vrancic, M., von Döhren, H. und Kleinkauf, H. 1995. Characterization of tyrocidine synthetase 1 (TY1): requirement of posttranslational modification for peptide biosynthesis. *Biochemistry* **34**: 7450-7459
- Pitt, A., Mayorga, L.S., Schwartz, A.L. und Stahl, P.D. 1992. Transport of phagosomal components to an endosomal compartment. *J Biol Chem* **267**: 126-132
- Plum, G. and Clark-Curtiss, J.E. 1994. Induction of *Mycobacterium avium* gene expression following phagocytosis by human macrophages. *Infect Immun* **62**: 476-83
- Plum, G., Brenden, M., Clark-Curtiss, J.E., and Pulverer, G. 1997. Cloning, sequencing, and expression of the mig gene of *Mycobacterium avium*, which codes for a secreted macrophage-induced protein. *Infect Immun* **65**: 4548-57
- Prammananan, T., Sander, P., Springer, B. und Böttger, E.C. 1999. RecA-mediated gene conversion and aminoglycoside resistance in strains heterozygous for rRNA. *Antimicrob Agents Ch* **43**: 447-453
- Preding, M., Doukhan, L., Nair, G. und Smith, I. 1995. Characterization of RNA polymerase and two sigma-factor genes from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **15**: 355-366
- Prinzis, S., Chatterjee, D. und Brennan, P.J. 1993. Structure and antigenicity of lipoarabinomannan from *Mycobacterium bovis* BCG. *J Gen Microbiol* **139**: 2649-2658
- Ragno, S., Estrada, I., Butler, R. und Colston, M.J. 1997. Regulation of macrophage gene expression following invasion by *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunol Lett* **57**: 143-146
- Ragno, S., Estrada-Garcia, I., Butler, R. und Colston, M.J. 1998. Regulation of macrophage gene expression by *Mycobacterium tuberculosis*: down-regulation of mitochondrial cytochrome *c* oxidase. *Infect Immun* **66**: 3952-3958
- Raivio, T.L. und Silhavy, T.J. 1999. The σ^E and Cpx regulatory pathways: overlapping but distinct envelope stress responses. *Curr Opin Microbiol* **2**: 159-165
- Ramakrishnan, L., Federspiel, N.A. und Falkow, S. 2000. Granuloma-specific expression of mycobacterium virulence proteins from the glycine-rich PE-PGRS family. *Science* **288**: 1436-1439
- Rastogi, N. und Barrow, W.W. 1994. Cell envelope constituents and the multifaceted nature of *Mycobacterium avium* pathogenicity and drug resistance. *Res Microbiol* **146**: 243-251
- Reddy, V.M. und Kumar, B. 2000. Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human respiratory epithelial cells. *J Infect Dis* **181**: 1189-1193
- Riedel, D.D. und Kaufmann, S.H.E. 1997. Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with *Mycobacterium tuberculosis* and lipoarabinomannan. *Infect Immun* **65**: 4620-4623
- Rindi, L., Lari, N. und Garzelli, C. 1999. Search for genes potentially involved in *Mycobacterium tuberculosis* virulence by mRNA differential display. *Biochem Bioph Res Co* **258**: 94-101
- Rivera-Marrero, C.A., Burroughs, M.A., Masse, R.A., Vannberg, F.O., Leimbach, D.L., Roman, J. und Murtagh, J.J.Jr. 1998. Identification of genes differentially expressed in *Mycobacterium tuberculosis* by differential display PCR. *Microb Pathogenesis* **25**: 307-316
- Rivière, M., Puzo, G., Wright, E.L. und Barrow, W.W. 1996. A unique phenylalanine-containing lipopeptide isolated from a rough-colony variant of *Mycobacterium avium*. *Eur J Biochem* **241**: 682-690
- Roach, T.I.A., Barton, C.H., Chatterjee, D. und Blackwell, J.M. 1993. Macrophage activation: lipoarabinomannan from avirulent and virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially induces the early genes c-fos, KC, JE, and tumor necrosis factor- α^1 . *J Immunol* **150**: 1886-1896
- Rom, W.N., Schluger, N., Law, K., Condos, R., Zhang, Y., Weiden, M., Harkin, T. und Tchou-Wong, K.-M. 1995. Human host response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Schweiz Med Wochenschr* **125**: 2178-2185
- Rosat, J.-P., Grant, E.P., Beckman, E.M., Dascher, C.C., Sieling, P.A., Frederique, D., Modlin, R.L., Porcelli, S.A., Furlong, S.T. und Brenner, M.B. 1999. CD1-restricted microbial lipid antigen-specific recognition found in the CD8⁺ $\alpha\beta$ T cell pool. *J Immunol* **162**: 366-371
- Russel, D.G., Dant, J. und Sturgill-Koszycki, S. 1996. *Mycobacterium avium*- and *Mycobacterium tuberculosis*-containing vacuoles are dynamic, fusion-competent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from the host cell plasmalemma. *J Immunol* **156**: 4764-4773
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Ehrlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Saito, H. und Tomioka, H. 1988. Susceptibilities of transparent, opaque, and rough colonial variants of *Mycobacterium avium* complex to various fatty acids. *Antimicrob Agents Ch* **32**: 400-402

- Saito, H., Tomioka, H. und Yoneyama, T. 1984. Growth of group IV mycobacteria on medium containing various saturated and unsaturated fatty acids. *Antimicrob Agents Ch* **26**: 164-169
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sander, P., Meier, A. und Böttger, E.C. 1995. *rpsL*⁺: a dominant selectable marker for gene replacement in mycobacteria. *Mol Microbiol* **16**: 991-1000
- Sarmiento, A. und Appelberg, R. 1996. Involvement of reactive oxygen intermediates in tumor necrosis factor alpha-dependent bacteriostasis of *Mycobacterium avium*. *Infect Immun* **64**: 3224-3230
- Shinnick, T.M., King, C.H. und Quinn, F.D. 1995. Molecular biology, virulence, and pathogenicity of mycobacteria. *Am J Med Sci* **309**: 92-98
- Sibley, L.D., Hunter, S.W., Brennan, P.J. und Krahenbuhl, J.L. 1988. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. *Infect Immun* **56**: 1232-1236
- Silva, R.A., Pais, T.F. und Appelberg, R. 1998. Evaluation of IL-12 in immunotherapy and vaccine design in experimental *Mycobacterium avium* infections. *J Immunol* **161**: 5578-5585
- Simon R., O'Connell, M., Labes, M. und Pühler, A. 1986. Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of *Rhizobia* and other gram-negative bacteria. *Meth Enzymol* **118**: 640-659
- Šlosárek, M., Koničková-Radochová, M. und Koniček J. 1978. Genetic transfers in mycobacteria. *Folia Microbiol* **23**: 140-151
- Smith, G.R. 1991. Conjugational recombination in *E. coli*: myths and mechanisms. *Cell* **64**: 19-27
- Smith, R.F., Wiese, B.A., Wojzynski, M.K., Davison, D.B., Worley, K.C. 1996. BCM Search Launcher – an integrated interface to molecular biology data base search and analysis services available on the World Wide Web. *Genome Res* **6**: 454-462
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517
- Stachelhaus, T. und Marahiel, M.A. 1995. Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS Microbiol Lett* **125**: 3-14
- Stenger, S., Hanson, D.A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K.R., Froelich, C.J., Ganz, T., Thoma -Uszynski, S., Melian, A. und Bogdan, C. 1998. An antimicrobial activity of cytolytic T-cells mediated by granulysin. *Science* **282**: 121-125
- Sturgill-Koszycki, S., Haddix, P.L. und Russell, D.G. 1997. The interaction between *Mycobacterium* and the macrophage analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* **18**: 2558-2565
- Sturgill-Koszycki, S., Schaible, U.E. und Russell, D.G. 1996. *Mycobacterium*-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *EMBO J* **15**: 6960-6968
- Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P.H., Chakraborty, P., Haddix, P.L., Collins, H.L., Fok, A.K., Allen, R.D., Gluck, S.L., Heuser, J. und Russell, D.G. 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* **263**: 678-681
- Tanaka, T., Hosaka, K. und Numa, S. 1981. Long-chain acyl-CoA synthetase from rat liver. *Meth Enzymol* **71**: 334-341
- Teitelbaum, R., Cammer, M., Maitland, M.L., Freitag, N.E., Condeelis, J. und Bloom, B.R. 1999. Mycobacterial infection of macrophages results in membrane-permeable phagosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 15190-15195
- Tizard, M., Bull, T., Millar, D., Doran, T., Martin, H., Sumar, N., Ford, J. und Hermon -Taylor, J. 1998. A low GC content genetic island in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *silvaticum* with homologous genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* **144**: 3413-3423
- Tokunaga, T., Mizuguchi, Y. und Suga, K. 1973. Genetic recombination in mycobacteria. *J Bacteriol* **113**: 1104-1111
- Tomioka, H., Sato, K., Sano, C., Akaki, T., Shimizu, T., Kajitani, H. und Saito, H. 1997. Effector molecules of the host defence mechanism against *Mycobacterium avium* complex: the evidence showing that reactive oxygen intermediates, reactive nitrogen intermediates, and free fatty acids each alone are not decisive in expression of macrophage antimicrobial activity against the parasites. *Clin Exp Immunol* **109**: 248-254
- Triccas, J.A., Berthet, F.-X., Pelicic, V. und Gicquel, B. 1999. Use of fluorescence induction and sucrose counterselection to identify *Mycobacterium tuberculosis* genes expressed within host cells. *Microbiology* **145**: 2923-2930
- Turgay, K., Krause, M. und Marahiel, M.A. 1992. Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Mol Microbiol* **6**: 529-546
- Ulrichs, T., Munk, M.E., Mollenkopf, H., Behr-Perst, S., Colangeli, R., Gennaro, M.L. und Kaufmann, S.H.E. 1998. Differential T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 in tuberculosis patients and healthy donors. *Eur J Immunol* **28**: 3949-3958
- Vagner, V. und Ehrlich, S.D. 1988. Efficiency of homologous DNA recombination varies along the *Bacillus subtilis* chromosome. *J Bacteriol* **170**: 3978-3982

- van Beilen, J.B., Eggink, G., Enequist, H., Bos, R. und Witholt, B. 1992. DNA sequence determination and functional characterization of the OCT-plasmid-encoded *alkJKL* genes of *Pseudomonas oleovorans*. *Mol Microbiol* **6**: 3121-3136
- Venisse, A., Berjeaud, J.-H., Chaurand, P., Gilleron, P. und Puzo, G. 1993. Structural features of lipoarabinomannan from *Mycobacterium bovis* BCG. Determination of molecular mass by laser desorption mass spectrometry. *J Biol Chem* **268**: 12401-12411
- Via, L.E., Curcic, R., Mudd, M.H., Dhandayuthapani, S., Ulmer, R.J. und Deretic, V. 1996. Elements of signal transduction in *Mycobacterium tuberculosis*: in vitro phosphorylation and in vivo expression of the response regulator MtrA. *J Bacteriol* **178**: 3314-3321
- Via, L.E., Deretic, D., Ulmer, R.J., Hibler, N.S., Huber, L.A. und Deretic, V. 1997. Arrest of mycobacterial maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by *rab5* and *rab7*. *J Biol Chem* **272**: 13326-13331
- Via, L.E., Fratti, R.A., McFalone, M., Pagán-Ramos, E., Deretic, D. und Deretic, V. 1998. Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation. *J Cell Sci* **111**: 897-905
- Vilchèze, C., Morbidoni, H.R., Weisbrod, T.R., Iwamoto, H., Kuo, M., Sacchetti, J.C. und Jacobs, W.R.Jr. 2000. Inactivation of the *inhA*-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASI end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **182**: 4059-4067
- von Heijne G. 1992. Membrane protein structure prediction, hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* **225**: 487-494
- Wallis, R.S., Ellner, J.J., Shiratsuchi, H. 1992. Macrophages, mycobacteria and HIV: the role of cytokines in determining mycobacterial virulence and regulating viral replication. *Res Microbiol* **143**: 398-405
- Wards, B.J. und Collins, D.M. 1996. Electroporation at elevated temperatures substantially improves transformation efficiency of slow-growing mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **145**: 101-105
- Wayne, L.G. und Sramek, H.A. 1992. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin Microbiol Rev* **5**: 1-25
- Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M. und Parlati, F. 1998. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**: 759-772
- Wei, J., Dahl, J.L., Moulder, J.M., Roberts, E.A., O'Gaora, P., Young, D.B. und Friedman, R.L. 2000. Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene that enhances mycobacterial survival in macrophages. *J Bacteriol* **182**: 377-384
- Wheeler, P.R. und Ratledge, C. 1988. Use of carbon sources for lipid biosynthesis in *Mycobacterium leprae*: a comparison with other pathogenic mycobacteria. *J Gen Microbiol* **134**: 2111-2121
- Wheeler, P.R., Bulmer, K. und Ratledge, C. 1990. Enzymes for biosynthesis *de novo* and elongation of fatty acids in mycobacteria grown in host cells: is *Mycobacterium leprae* competent in fatty acid biosynthesis? *J Gen Microbiol* **136**: 211-217
- Wiele, B., Ottenhoff, T.H.M., Steenwijk, T.M., Franken, K.L.M.C., De Vries, R.R.P. und Langerhans, J.A.M. 1997. Increased intracellular survival of *Mycobacterium smegmatis* containing the *Mycobacterium leprae* thioredoxin-thioredoxin reductase gene. *Infect Immun* **65**: 2537-2541
- Wiker, H.G., Wilson, M.A. und Schoolnik G.K. 2000. Extracytoplasmic proteins of *Mycobacterium tuberculosis* – mature secreted proteins often start with aspartic acid and proline. *Microbiology* **146**: 1525-1533
- Wilkens, K. und Rüger, W. 1994. Transcription from early promoters. In: Karam, J.D., Drake, J.W., Kreuzer, K.N., Mosig, G., Hall, D.H., Eiserling, F.A., Black, L.W., Spicer, E.K., Kutter, E., Carlson, K. und Miller, A. (Hrsg.). Molecular biology of bacteriophage T4. ASM Press; Washington D.C., pp. 132-141
- Wilson, T.M., de Lisle, G.W. und Collins, D.M. 1995. Effect of *inhA* and *katG* on isoniazid resistance and virulence of *Mycobacterium bovis*. *Mol Microbiol* **15**: 1009-1015
- Wilson, K.J. und Yunan, P.M. 1989. Protein and peptide purification. In: Findlay JBC, Geisow MJ (Hrsg.) Protein sequencing, a practical approach. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, pp 1-4
- Wren, B.W., Stabler, R.A., Das, S.S., Butcher, P.D., Mangan, J.A., Clarke, J.D., Casali, N., Parish, T. und Stoker, N.G. 1998. Characterization of a haemolysin from *Mycobacterium tuberculosis* with homology to a virulence factor of *Serpulina hyodysenteriae*. *Microbiology* **144**: 1205-1211
- Wu, H.-S., Kolonoski, P., Chang, Y.Y. und Bermudez, L.E. 2000. Invasion of the brain and chronic central nervous system infection after systemic *Mycobacterium avium* complex infection in mice. *Infect Immun* **68**: 2979-2984
- Wu, Q.-L., Kong, D., Lam, K. und Husson, R.N. 1997. A mycobacterial extracytoplasmic function sigma factor involved in survival following stress. *J Bacteriol* **179**: 2922-2929
- Yamada, Y., Saito, H., Tomioka, H. und Jidoi, J. 1987. Relationship between the susceptibility of various bacteria to active oxygen species and to intracellular killing by macrophages. *J Gen Microbiol* **133**: 2015-2021
- Yoshida, A. und Koide, Y. 1997. Arabinofranosyl-terminated and mannosylated lipoarabinomannans from *Mycobacterium tuberculosis* induce different levels of interleukin-12 expression in murine macrophages. *Infect Immun* **65**: 1953-1960
- Young, D.B. und Garbe, T.R. 1991. Lipoprotein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* **142**: 55-65

-
- Young, D.B., Kaufmann, S.H.E., Hermans, P.W. und Thole, J.E.** 1992. Mycobacterial protein antigens: a compilation. *Mol Microbiol* **6**: 133-145
- Yuan, Y., Crane, D.D., Simpson, R.M., Zhu, Y.Q., Hickey, M.J., Sherman, D.R. und Barry, C.E.** 1998. The 16-kDa α -crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9578-9583
- Zhang, B., Struffi, P. und Kroos, L.** 1998. σ^k can negatively regulate *sigE* expression by two different mechanisms during sporulation of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**: 4081-4088
- Zhang, Y., Doerfler, M., Lee, T.C., Guillemin, B. und Rom, W.N.** 1993. Mechanisms of stimulation of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α by *Mycobacterium tuberculosis* components. *J Clin Invest* **91**: 2076-2083
- Zhu, W., Arceneaux, J.E.L., Beggs, M. L., Rowe Byers, B., Eisenach, K.D. und Lundrigan, M.D.** 1998. Exochelin genes in *Mycobacterium smegmatis*: identification of an ABC transporter and two non-ribosomal peptide synthetase genes *Mol Microbiol* **29**: 629-639
- Ziegler, K., Buder, R., Winter, J. und Fuchs, G.** 1989. Activation of aromatic acids and aerobic 2-aminobenzoate metabolism in a denitrifying *Pseudomonas* strain. *Arch Microbiol* **151**: 171-176

Danksagung

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von September 1997 bis Juli 2000 am Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Universität zu Köln unter der Anleitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. G. Plum durchgeführt.

Mein erster Dank gilt Frau Prof. Dr. Karin Schnetz für die Betreuung meiner Arbeit und viele anregenden Diskussionen. Herrn Priv.-Doz. Dr. G. Plum gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor, die Bereitstellung der Sachmittel, für hilfreiche Diskussionen und für vieles mehr. Frau Priv.-Doz. Dr. Christine Kocks danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats meiner Arbeit. Herrn Prof. Dr. M. Kroenke danke ich dafür, daß ich an seinem Institut meine praktischen Arbeiten durchführen durfte.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern des Hygiene-Instituts für ihre vielen, nicht zählbaren Hilfeleistungen im Laufe meiner Arbeitszeit am Institut. Im Besonderen möchte ich Herrn Sven Berger für seine ständige Diskussionsbereitschaft und Kollegialität danken. Des weiteren möchte ich Frau Martina Wolke für die Bereitstellung der Mycobakterien-Stämme, diverser Plasmide und für die Antikörper gegen das Protein Mig herzlichst danken. Frau Dr. Batoni, Pisa, Italien, danke ich für die Bereitstellung eines *M. avium*-Stammes. Mein nächster Dank gilt Frau Christiane Haefs für die Hilfe bei diversen Sequenzierungen. Außerdem möchte ich mich speziell bei Herrn Dr. K. Bernardo, Herrn Dr. O. Krut, Frau Dr. J. Jürgensmeier und allen weiteren wissenschaftlichen Mitarbeitern für ihre Diskussionsbereitschaft bedanken.

Meinen „Fach-Freunden“ Dr. Andreas Urban, Ruhr-Universität Bochum, und Dr. Werner Howad, Universität Oxford, England, danke ich für nützliche Ratschläge und wissenschaftliche Diskussionen.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BmBF) danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich bei allen Beteiligten des Verbundprojektes „Mycobakterielle Infektionen“.

Zum Schluß möchte ich mich bei meiner Familie für die tolle Unterstützung während meiner Studienzeit bedanken. Mein letzter Dank gilt Merle für ihre großartige Unterstützung und für sehr viel mehr...

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Karin Schnetz betreut worden.

Datum:

Unterschrift:

Lebenslauf

Name:

Christian Oliver Morszeck

Geburtsdatum:

15. November 1970 in Essen

Wohnort:

Am Ardey 7; 45134 Essen

Familienstand:

ledig

Staatsangehörigkeit:

deutsch

Ausbildung:

- 1977 bis 1981 Besuch der „Grundschule an der Von Einem Straße“ in Essen

- 1981 bis 1990 Besuch des Stadtwald-Gymnasiums in Essen mit dem Abschluß: Abitur

- Vom Wintersemester 1990/91 bis zum Wintersemester 1995/96 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum mit Abschluß: Dipl. Biologe Diplomarbeit wurde am Lehrstuhl der Biologie der Mikroorganismen angefertigt

Thema:

„Molekularbiologische Untersuchungen zur Stärke von frühen Promotoren des Bakteriophagen T4“

-Praktikum am Diabetes Forschungs- Institut in Düsseldorf vom 1. Juni 1997 bis 5. September 1997

-Promotionstudium im Fach Genetik an der Universität zu Köln vom Sommersemester 1999 bis voraussichtlich Wintersemester 2000/2001 Aufnahme der praktischen Arbeiten am 6. September 1997

Thema:

„Entwicklung einer Strategie zur gezielten Inaktivierung von Genen in *Mycobacterium avium* und Charakterisierung der potentiellen Virulenz-Gene *sigE* und *mig*“

Zivildienst:

Ableistung des Zivildienstes am Institut für Laboratoriumsmedizin und Mikrobiologie des Elisabeth-Krankenhauses in Essen vom 2. Mai 1996 bis 31. Mai 1997