

Charakterisierung von Genen des
Zellwandstoffwechsels (Rv1500, *hddA*) und der
Nitratassimilation (*glnR*) von *Mycobacterium
tuberculosis*

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von
Dipl.-Biol. Sven Malm
geboren am 6.12.1979 in Hannover

Referent: Prof. Dr. Franz-Christoph Bange

Koreferent: Prof. Dr. Otto Holst

Tag der Promotion: 02.02.2009

Die vorliegende Arbeit "Charakterisierung von Genen des Zellwandstoffwechsels (Rv1500, *hddA*) und der Nitratassimilation (*glnR*) von *Mycobacterium tuberculosis*" wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Franz-Christoph Bange am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Medizinischen Hochschule Hannover in dem Zeitraum von Juli 2005 bis Oktober 2008 angefertigt.

Publikationen:

Oxygen status of lung granulomas in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice Aly S.; Wagner K.; Keller C.; Malm S.; Malzan A.; Brandau S.; Bange F.C.; Ehlers S. J Pathol 2006

In vitro and *in vivo* characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* mutant deficient in glycosyltransferase Rv1500 Malm,S.; Walter,K.; Engel,R.; Maass,S.; Pfau,S.; Hubner,G.; Lindner,B.; Holst,O.; Ehlers,S.; Bange,F.C. Int J Med Microbiol 2008

The roles of the nitrate reductase NarGHJI, the nitrite reductase NirBD, and the response regulator GlnR in nitrate assimilation of *Mycobacterium tuberculosis* Malm, S.; Tiffert, Y.; Micklinghoff, J.; Schulze, S.; Joost, I.; Weber, I.; Horst, S.; Ackermann, B.; Schmidt, M.; Wohlleben, W.; Ehlers, S.; Geffers, R.; Reuther, J.; Bange, F.C. Microbiology 2008, accepted

Abstracts:

NarGHJI and NirB mediate assimilation of nitrate and nitrite in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG Jäger, T.; Stellmann, J.; Herrmann, T.; Malm, S.; Sedlacek, L.; Bange, F.C.

Zweite gemeinsame Konferenz der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Göttingen, 2005

Determination of the biochemical and morphological properties of a *Mycobacterium tuberculosis* strain carrying a deletion in glycosyltransferase Rv1500 Malm, S.; Engel, R.; Hübner, G.; Lindner, B.; Holst, O.; Bange, F.C.

7th International Conference on the Pathogenesis of Mycobacterial Infections, Stockholm, Schweden, 2008

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation

„Charakterisierung von Genen des Zellwandstoffwechsels (Rv1500, *hddA*) und der Nitratassimilation (*glnR*) von *Mycobacterium tuberculosis*“

selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den

(Unterschrift)

Name: Sven Malm

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Glossar	X
1. Zusammenfassung	1
2. Abstract	2
3. Einleitung	3
3.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> – Taxonomische Einordnung, Pathogenese und Epidemiologie	3
3.2 Die mykobakterielle Zellwand und ihre Bedeutung für die Wirt-Pathogen-Interaktion	8
3.3 Die Bedeutung von Rv1500 für die Zellwandsynthese von <i>Mycobacterium marinum</i>	15
3.4 HddA – eine Phosphokinase von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mit Beteiligung an der Zellwandsynthese?	16
3.5 Regulation der Nitratassimilation von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> durch GlnR	18
4. Material und Methoden	20
4.1 Bakterienstämme	20
4.2 Plasmide und Vektoren	20
4.3 Primer	21
4.4 Nährmedien	22
4.4.1 Nährmedien für <i>Escherichia coli</i>	22
4.4.2 Nährmedien für <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
4.4.3 Zusätze für Nährmedien	23
4.5 Lösungen und Puffer	24
4.6 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	28
4.7 Kultivierung von <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	28

4.8	Molekularbiologische Methoden	29
4.8.1	Präparation von DNA	29
4.8.1.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	29
4.8.1.2	Plasmid-Mini-Präparation mit dem NucleoSpin®Plasmid-Kit von Macherey-Nagel	30
4.8.1.3	Plasmid-Midi-Präparation mit dem GeneElute™-Kit von Sigma.....	30
4.8.1.4	Präparation genomischer DNA von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ...	30
4.8.1.5	Präparation genomischer DNA mit Glasbeads für die PCR.....	31
4.8.1.6	Hitzeextraktion genomischer DNA für die PCR	31
4.8.2	Restriktionsspaltung.....	32
4.8.3	Agarose-Gelelektrophorese	32
4.8.4	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	33
4.8.4.1	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	33
4.8.4.2	Aufreinigen von DNA aus Lösungen	33
4.8.5	Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA	33
4.8.6	Bestimmung der DNA-Konzentration	34
4.8.6.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	34
4.8.6.2	Konzentrationsbestimmung mittels Agarose-Gelelektrophorese	34
4.8.7	Ligation	34
4.8.8	Glykogenfällung	35
4.8.9	Herstellung elektrokompetenter <i>Escherichia coli</i>	35
4.8.10	Transformation von DNA in <i>Escherichia coli</i> mittels Elektroporation .	35
4.8.11	Transformation von DNA in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mittels Elektroporation	36
4.8.12	Polymerase-Kettenreaktion	37
4.8.13	Sequenzierung	37
4.8.14	Herstellung, Markierung und Quantifizierung einer Hybridisierungssonde	38

4.8.15	Southern Blot.....	39
4.8.16	Generierung der Deletionsmutanten von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	41
4.8.16.1	Levansucrase-vermittelte Negativselektion für intrachromosomale Rekombination.....	41
4.8.16.2	Generierung der Rv1500-Deletionsmutante	42
4.8.16.3	Generierung der <i>hddA</i> -Deletionsmutante	43
4.8.17	Klonierung von <i>nirBD</i> unter einen heterologen Promoter durch Fusions-PCR.....	43
4.8.18	RNA-Präparation von <i>M. tuberculosis</i> und cDNA-Synthese zum Nachweis von Rv1500 auf mRNA-Ebene.....	45
4.8.19	Untersuchung des Transkriptoms durch Microarray-Technologie	46
4.8.19.1	Kulturbedingungen.....	46
4.8.19.2	Präparation der RNA	47
4.8.19.3	cDNA-Synthese	47
4.8.19.4	cDNA-Fragmentierung und Markierung.....	48
4.8.19.5	Hybridisierung.....	48
4.8.19.6	Färbung und Detektion	49
4.8.20	Real-Time PCR.....	50
4.9	<i>In-vitro</i> Charakterisierung	52
4.9.1	Ziehl-Neelsen Färbung	52
4.9.2	Untersuchung der Koloniemorphologie auf Kongo Rot-haltigen Nährböden.....	52
4.9.3	Lysin-Ruthenium-Rot Einbettung zur Darstellung von <i>M. tuberculosis</i> in der Elektronenmikroskopie.....	52
4.9.4	Empfindlichkeitstestung gegenüber Detergenz-Stressbedingungen.....	53
4.9.4.1	Wachstumskurve und Lebendkeimzahlbestimmung von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ Rv1500 in 7H9-Medium mit 0,02 % und 0,1 % SDS	53

4.9.4.2	Wachstumskurve und Lebendkeimzahlbestimmung von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ <i>hddA</i> in 7H9-Medium mit 0,01 %, 0,04 % und 0,1 % SDS	54
4.9.5	Wachstum von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv Δ glnR::pSMA37 in MB-Medium mit 10 mM KNO ₃	55
4.10	Biochemische Charakterisierung.....	55
4.10.1	Neutralzuckerbestimmung	55
4.10.2	Lipidextraktion	57
4.10.3	Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie	58
4.10.4	Analyse der Zucker und Fettsäuren der nach Bligh und Dyer gewonnenen Lipidextrakte.....	58
4.10.5	Fourier-Transform-Ion-Cyclotron-Resonanz Massenspektrometrie (FT-ICR MS)*	59
4.11	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Infektionsstudien*	59
4.11.1	<i>In vitro</i> Infektionsstudien	59
4.11.2	<i>In vivo</i> Infektionsstudien	60
4.11.3	Statistik.....	61
5.	Ergebnisse	62
5.1	Charakterisierung der Rv1500 Deletionsmutante von <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	62
5.1.1	Genomische Situation und Generierung der Deletionsmutante	62
5.1.2	Analyse der Phosphatidylinositolmannosid-Expression in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv und <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv Δ Rv1500.....	63
5.1.3	Färbeverhalten der Rv1500 Deletionsmutante in der Säurefesten-Färbung nach Ziehl-Neelsen	67
5.1.4	Untersuchung der Koloniemorphologie von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ Rv1500 auf Kongo-Rot-haltigen Nährböden	67
5.1.5	Charakterisierung der Rv1500 Deletionsmutante unter Detergenz-Stressbedingungen	68
5.1.6	Bestimmung der Neutralzucker.....	70

5.1.7	Nachweis von Rv1500 auf mRNA-Ebene in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	71
5.1.8	Charakterisierung von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv Δ Rv1500 in Makrophagen und im Maus-Infektionsmodell der Tuberkulose*	72
5.2	Deletion von <i>hddA</i> in <i>M. tuberculosis</i> H37Rv und Charakterisierung der Deletionsmutante	75
5.2.1	Genomische Situation und Generierung der Deletionsmutante	75
5.2.2	Lichtmikroskopische Charakterisierung der <i>hddA</i> -Deletionsmutante	76
5.2.3	Elektronenmikroskopie.....	77
5.2.4	Wachstum von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv Δ <i>hddA</i> und <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv auf mit Kongo-Rot supplementierten Nährböden.....	77
5.2.5	Sensitivität von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv Δ <i>hddA</i> gegenüber Detergenz.....	79
5.2.6	Virulenz von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv Δ <i>hddA</i> im Maus-Infektionsmodell*	81
5.3	Die Bedeutung von GlnR für die Nitratassimilation von <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	83
5.3.1	Klonierung von <i>nirBD</i> in einen mykobakteriellen Expressionsvektor und Komplementierung einer <i>glnR</i> -Deletionsmutante von <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	83
5.3.2	Nachweis der GlnR-vermittelten Regulation der Expression der Nitritreduktase <i>nirB</i> durch Microarray-Technologie und Real-Time PCR.....	87
6.	Diskussion	90
6.1	Evaluierung der Bedeutung von Rv1500 für den Zellwandmetabolismus von <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	90
6.2	Charakterisierung der <i>hddA</i> -Deletionsmutante von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	95
6.3	Die Rolle von GlnR als Regulator der Nitratassimilation von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	98

7. Literaturverzeichnis.....	103
8. Anhang.....	117
8.1 Chemikalien und Lösungsmittel.....	117
8.2 Nährmedien.....	119
8.3 Enzyme.....	119
8.4 Kits.....	119
8.5 DNA-Standards.....	120
9. Danksagung.....	121
11. Lebenslauf.....	123

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersichtsdarstellung der mykobakteriellen Zellwand	9
Abbildung 2: Der Mykolsäure-Arabinogalacan-Peptidoglycan-Komplex	9
Abbildung 3: Syntheseweg der polaren PIM, LM und LAM	12
Abbildung 4: Stoffwechselwege zur Nukleotidaktivierung von Glycero-manno-heptose	17
Abbildung 5: Fusions-PCR	44
Abbildung 6: 5 kb genomischer Sequenz um den Rv1500 Genlokus	62
Abbildung 7: Southern Blot zur Bestätigung der Deletion von Rv1500 in <i>M. tuberculosis</i>	62
Abbildung 8: 2D-HPTLC der Lipidextrakte von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv und <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ Rv1500	63
Abbildung 9: <i>M. tuberculosis</i> H37Rv und <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ Rv1500 gefärbt nach Ziehl-Neelsen.....	67
Abbildung 10 Koloniemorphologie von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ Rv1500 und <i>M. tuberculosis</i> H37Rv auf Kongo-Rot-haltigen Nährböden	68
Abbildung 11: Wachstumskurve von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ Rv1500 und <i>M.</i> <i>tuberculosis</i> H37Rv unter Detergenz-Stressbedingungen	69
Abbildung 12: Lebendkeimzahlbestimmung unter SDS-Stressbedingungen.....	70
Abbildung 13: Neutralzuckerbestimmung von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv und <i>M.</i> <i>tuberculosis</i> H37Rv Δ Rv1500	71
Abbildung 14: Detektion der Rv1500 mRNA-Expression durch cDNA-Synthese und PCR-Analyse	71
Abbildung 15: Induktion der Cytokin-Induktion durch <i>M. tuberculosis</i> H37Rv und <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ Rv1500 <i>in vitro</i> und Replikationsfähigkeit im Maus- Infektionsmodell.....	73
Abbildung 16: Schematische Darstellung von 6 kb genomischer Sequenz um den <i>hddA</i> -Genort	75
Abbildung 17: Southern Blot zur Bestätigung der Deletion von <i>hddA</i> in <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	75
Abbildung 18: Ziehl-Neelsen-Färbung von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv und <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ <i>hddA</i>	76
Abbildung 19: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ <i>hddA</i> und <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	78

Abbildung 20: Koloniemorphologie von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ <i>hddA</i> auf Kongo-Rot-haltigen Nährböden	79
Abbildung 21: Wachstumskurven von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ <i>hddA</i> und <i>M. tuberculosis</i> H37Rv unter Detergenz-Stressbedingungen	80
Abbildung 22: Lebendkeimzahlbestimmung von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ <i>hddA</i> unter Detergenz-Stressbedingungen	81
Abbildung 23: Lebendkeimzahlbestimmung von Mutante und Wildtyp aus der Lunge aerosolinfizierter C57BL/6 Mäuse.....	82
Abbildung 24: Nitratassimilation von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	83
Abbildung 25: Klonierung von <i>nirB</i> unter den heterologen <i>hsp60</i> -Promoter.....	85
Abbildung 26: Agarose-Gel der PCR zum Nachweis des Replikationsursprungs von <i>E. coli</i>	86
Abbildung 27: Nitratassimilation von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ <i>glnR</i> transformiert mit <i>nirB</i>	87
Abbildung 28: Microarray-Expressionsanalyse von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ <i>glnR</i> und <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	88
Abbildung 29: Relative Expressionsanalyse von <i>nirB</i> in <i>M. tuberculosis</i> H37Rv im Vergleich zu <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ <i>glnR</i> durch semiquantitative Real-Time PCR	89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bakterienstämme	20
Tabelle 2: Plasmide	20
Tabelle 3: Vektoren	21
Tabelle 4: Primer	21
Tabelle 5: Antibiotika	24
Tabelle 6: Vorherrschende Fettsäuren der Chloroform-Extrakte	64
Tabelle 7: Massenspektrometrische Bestimmung der dominierenden PI- und PIM-Spezies der Chloroformphasen der Bligh-Dyer Extrakte (ESI FT-ICR-Massenspektrum) von Mtb H37Rv und Mtb H37Rv Δ Rv1500	65

Glossar

2D-HPTLC	Zweidimensionale HPTLC
A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
ADS	Albumin Dextrose Supplement
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrom
AP	Alkalische Phosphatase
Ara	Arabinose
AraLAM	Lipoarabinomannan ohne Kappe
BCG	Bacille Calmette Guérin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	Complementary DNA
DC	Dendritic Cells
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
dest. H ₂ O	destilliert, entspricht hier vollentsalztem Wasser, ggf. sterilisiert
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-triphosphat
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ESI	Electrospray-Ionisierung
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
EtOH	Ethanol
<i>f</i>	Furanose
FT-ICR MS	Fourier-Transform-Ion-Cyclotron-Resonanz Massenspektrometrie
G	Guanin
Gal	Galactose
GC	Gaschromatographie
GDP	Guanosindiphosphat
Glc	Glucose

HAc	Essigsäure
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
IFN- γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaare
KBE	Koloniebildende Einheiten
KG60	Kieselgel 60
LAM	Lipoarabinomannan
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
<i>m/z</i>	Masse/Ladung
Man	Mannose
ManLAM	Lipoarabinomannan mit Mannose-Kappe
MAP	Mykolsäure-Arabinogalactan-Peptidoglycan
MDR-TB	Multi Drug Resistent Tuberculosis
MeOH	Methanol
MHC	Major Histocompatibility Complex
MNC	Mononuclear Cells
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	Messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Reduzierte Form des NAD ⁺
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ncRNA	non coding RNA
OADC	Oleic Acid Albumin Dextrose Catalase
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
<i>p</i>	Pyranose
PA	Primäraffekt
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction

PI	Phosphatidylinositol
PILAM	Lipoarabinomannan mit PI-Kappe
PIM	Phosphatidylinositolmannosid
PK	Primärkomplex
ppm	Parts Per Million
Rha	Rhamnose
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Real-Time PCR
Sp-A	Surfactant Protein A
T	Thymin
TGF- β	Tumor Growth Factor β
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
u	Unit
UDP	Uridindiphosphat

1. Zusammenfassung

Die Zellwandsynthese von *Mycobacterium tuberculosis*, sowie die Assimilation von Nährstoffen im Wirt durch den Pathogen sind essentiell für die Pathogenese der Tuberkulose.

Rv1500 ist bei *M. marinum* an der Synthese von Phosphatidylinositolmannosiden (PIM), einem wesentlichen Bestandteil der mykobakteriellen Zellwand, beteiligt. Die Transkription von Rv1500 wurde bei *M. tuberculosis* auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Es wurde eine Mutante von *M. tuberculosis* mit einer Deletion in Rv1500 generiert, die wie der Wildtyp Phosphatidylinositol (PI), PIM₂, AcPIM₂, Ac₂PIM₂ und AcPIM₆ produzierte. Weder Ac₂PIM₅ noch Ac₂PIM₇ wurden gefunden. Weitere Untersuchungen deuteten auf eine Unversehrtheit der mykobakteriellen Zellwandintegrität. Infektionsexperimente in Makrophagen und im Mausmodell der Tuberkulose zeigten, dass die Deletion von Rv1500 keinen Einfluss auf die intrazelluläre Replikation von *M. tuberculosis* hat. Es konnte die Bedeutung von Rv1500 für die Synthese von PIM in *M. tuberculosis* H37Rv geklärt werden.

hddA ist bei einigen Bakterien an der LPS- und Kapselsynthese, und somit ebenfalls am Aufbau der Zellwand, beteiligt. Eine Mutante von *M. tuberculosis* mit einer Deletion in *hddA* wurde generiert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der *hddA*-Deletionsmutante von *M. tuberculosis* H37Rv zeigten Veränderungen im Bereich der Zellwand. Resistenz von Mutante und Wildtyp gegenüber Detergenz, Koloniemorphologie auf Kongo-Rot-haltigen Nährböden, sowie die Säurefestigkeit nach Ziehl-Neelsen hingegen waren identisch. Die Mutante zeigte im Maus-Infektionsmodell die gleiche Virulenz wie der Wildtyp.

GlnR wurde bei *M. tuberculosis* als zentraler Regulator der Nitratassimilation, die durch die Gene *narGHJI* und *nirBD* vermittelt wird, postuliert. Eine *glnR*-Deletionsmutante von *M. tuberculosis*, wurde mit *nirBD* unter der Kontrolle eines heterologen, GlnR-unabhängigen, Promotors transformiert. Der rekombinante Stamm war wie der Wildtyp in der Lage Nitrat zu assimilieren. Die Transkriptomanalyse der *glnR*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp bestätigte, dass *nirBD*, nicht aber *narGHJI* durch GlnR reguliert wird. Es wurden weitere GlnR-abhängige Gene identifiziert.

Schlagworte: *Mycobacterium tuberculosis*, Zellwand, Nitratassimilation

2. Abstract

Cell wall synthesis of *Mycobacterium tuberculosis*, and assimilation of nutrients from the host by the pathogen are essential for the pathogenesis of tuberculosis.

In *M. marinum*, it was suggested that the homologue of Rv1500 of *M. tuberculosis* is involved in the synthesis of phosphatidylinositol mannosides (PIM), and thus plays a key role in cell wall synthesis. Transcription of Rv1500 mRNA was demonstrated in *M. tuberculosis*. A mutation of Rv1500 was generated in *M. tuberculosis*. We found phosphatidylinositol (PI), PIM₂, AcPIM₂, Ac₂PIM₂, and AcPIM₆ in both wild type and the mutant, and were unable to detect Ac₂PIM₇ or Ac₂PIM₅ in either strain. Further analyses indicated that cell wall synthesis was not affected by the mutation. Infection of macrophages and mice did not result in impairment of intracellular replication or virulence. Thus we clarified the role of Rv1500 in the synthesis of PIM of *M. tuberculosis*.

hddA is crucial for the synthesis of LPS and capsule in various bacteria, and thus is also involved in cell wall synthesis. A *hddA* mutant of *M. tuberculosis* was generated. Electron microscopy of the mutant strain showed an alteration in cell surface properties, whereas acid-fastness, growth on Congo-red containing agar plates, and resistance to detergent stress conditions remained unaffected by the mutation. Virulence was identical for the mutant and wild type in a mouse model of tuberculosis.

GlnR in *M. tuberculosis* was suggested to act as a central regulator in nitrate assimilation, which is mediated by the combined action of *narGHJI* and *nirBD*, by controlling expression of *nirBD*. To test this hypothesis, *nirBD* under the control of a heterologous, GlnR-independent promoter was transformed into the *glnR*-mutant of *M. tuberculosis*. The recombinant strain regained the ability to assimilate nitrate. Whole gene expression analysis of the mutant and the wild type identified additional, GlnR-dependent genes.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, cell wall, nitrate assimilation

3. Einleitung

3.1 *Mycobacterium tuberculosis* – Taxonomische Einordnung, Pathogenese und Epidemiologie

Mycobacterium tuberculosis ist einer der bedeutendsten bakteriellen Krankheitserreger. An einer Infektion mit *M. tuberculosis* starben 2006 weltweit etwa 1,7 Millionen Menschen, von denen 12 % mit HIV koinfiziert waren (World Health Organisation, 2008). Etwa ein Drittel der Weltbevölkerung ist latent infiziert, und das Risiko, eine aktive Erkrankung zu entwickeln, beträgt 10 % (Rook *et al.*, 2005). Die Inzidenz lag im Jahr 2006 bei 9,2 Millionen Neuerkrankungen und die Prävalenz der aktiven Tuberkulose belief sich auf 14,4 Millionen Fälle. Eine halbe Millionen Menschen waren im Jahr 2006 mit MDR-TB Stämmen infiziert. Dabei handelt es sich um Stämme, die mindestens Resistenzen gegen Isoniazid und Rifampicin aufweisen (World Health Organisation, 2008).

Mycobacterium tuberculosis wurde 1882 von Robert Koch als der Erreger der Tuberkulose identifiziert. Koch gelangen die Isolierung des Bakteriums aus tuberkulösem Material und die Anzucht in Reinkultur. Robert Koch konnte durch die Infektion von Meerschweinchen mit dem Mikroorganismus Tuberkulose erzeugen und anschließend den Erregernachweis auf mikroskopischer und kultureller Ebene führen (Wiesmann, 1978).

Mykobakterien besitzen eine stäbchenförmige Morphologie mit einem Durchmesser von etwa 0,4 μm und einer Länge von 3-4 μm . Ihre Zellwand besitzt Merkmale grampositiver Bakterien, kann jedoch nicht in der Gram-Färbung dargestellt werden. Aufgrund ihrer lipidreichen Zellwand, die vor allem durch die Mykolsäuren charakterisiert wird, zeigt sich ein säurefestes Färbeverhalten in der Färbung nach Ziehl-Neelsen. Bei der säurefesten Färbung dringt der in Phenol gelöste basische Farbstoff Fuchsin während des langsamen Erhitzens des Ausstrichs in die Zellen ein (Wiesmann, 1978). Bei der Färbung kommt es wahrscheinlich zu ionischen Wechselwirkungen zwischen der Carboxylgruppe der Mykolsäuren und einer Aminogruppe des Fuchsins, deren Stickstoffatom eine positive Partialladung trägt. Mykobakterien lassen sich mit Säure-Alkohol nicht entfärben (Madigan *et al.*, 2001; Schlegel, 1985). Bei Mykolsäuren handelt es sich um komplexe verzweigteketten

Hydroxylipide. Mykobakterielle Mykolsäuren unterscheiden sich von denen anderer *Genera*, wie zum Beispiel *Corynebacterium* und *Nocardia*. *Nocardia* erscheinen im Direktpräparat schwach säurefest und verlieren bei Subkultivierung weiter diese Eigenschaft. Bei den mykobakteriellen Mykolsäuren handelt es sich um die längsten Mykolsäuren mit einer Kettenlänge zwischen 70 und 90 Kohlenstoffatomen. Es gibt weitere Unterschiede, die die Konformation und die biochemischen Eigenschaften beeinflussen (Brennan und Nikaido, 1995; Pfyffer und Vincent, 2006).

Phylogenetisch ist die Gattung *Mycobacterium* der Familie der *Mycobacteriaceae* und der Ordnung der *Actinomycetales* zuzuordnen. Die Gattung vereint mehr als 100 Spezies, die alle einen GC-Gehalt von 61 bis 71 % aufweisen. Mykobakterien sind unbewegliche, nicht-sporulierende, aerobe oder mikroaerophile Bakterien (Pfyffer und Vincent, 2006). Man unterscheidet die Gruppe der langsam wachsenden von den schnell wachsenden Arten. Schnell wachsende Mykobakterien brauchen bis zu zehn Tage, langsam wachsende Arten bis zu sechs Wochen, bis sie Kolonien auf festen Nährmedien gebildet haben (Parish und Stoker, 1998). Eine weitere Charakterisierung der Mykobakterien kann aufgrund der Fähigkeit zur Ausbildung von Pigmenten erfolgen. Es ergibt sich eine Einteilung in drei Gruppen: nicht Pigment bildende, photochromogene und scotochromogene Bakterien. Photochromogene Mikroorganismen bilden Pigmente nur, wenn sie im Licht kultiviert werden, und Scotochromogene bilden Pigmente auch dann, wenn sie im Dunkeln inkubiert werden. *Mycobacterium tuberculosis* zählt zu den nicht-pigmentierten Mykobakterien (Madigan *et al.*, 2001).

Die drei wichtigsten Spezies des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes sind *M. tuberculosis*, *M. bovis* und *M. africanum*, deren Klinik der Infektion nicht unterscheidbar ist. Die anderen Vertreter des *Genus Mycobacterium* werden als nicht-tuberkulöse, oder früher als atypische, Mykobakterien bezeichnet (Fuehner *et al.*, 2007). Die Übertragung des Erregers der Tuberkulose, *M. tuberculosis*, erfolgt fast ausschließlich über die Luft. Infektios sind Aerosole, die beim Husten, Niesen und Sprechen gebildet werden. *Mycobacterium tuberculosis* ist dabei in den kleinen, 1-5 µm großen Partikeln der Aerosole enthalten. Wegen ihrer geringen Größe können die Partikel für Stunden in der Luft bleiben und beim Atmen bis in den Alveolarraum vordringen. Die Bakterien werden dort von Alveolarmakrophagen phagozytiert (Fuehner *et al.*, 2007; Frieden *et al.*, 2003). *Mycobacterium tuberculosis*

besitzt mehrere Mechanismen, um in die alveolären Makrophagen zu gelangen. So nutzt der Erreger beispielsweise zwei Mechanismen zur Opsonisierung mit den Faktoren C3b und C3bi über den klassischen und alternativen Weg des Komplementsystems, beziehungsweise C2a zur Generierung von opsonisch aktivem C3b. Auf diese Weise opsonierte Bakterien können über die Rezeptoren CR1, CR3 und CR4 an Makrophagen binden. An den Rezeptor CR3 bindet *M. tuberculosis* über zwei Bindedomänen. Opsonierte Bakterien binden an die C3bi-Bindedomäne, während nicht opsonierte Bakterien über Polysaccharide der Kapsel an der β -Glucan-Bindestelle in der Nähe des C-Terminus von CD11b binden können (Ernst, 1998; Ferguson *et al.*, 2004). Lipoarabinomannan ist ein Ligand des Mannoserezeptors (Ernst, 1998). So konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass klinische *M. tuberculosis*-Isolate mit verkürztem und stark verzweigtem ManLAM weniger effektiv in Makrophagen aufgenommen wurden. Dieser Effekt wurde durch die kompetitive Blockierung des Mannoserezeptors mit einem spezifischen Antikörper bestätigt (Torrelles *et al.*, 2008). Die exponierte unterschiedliche Substitution mit Mannose-, Phosphatidylinositol- (PI) oder Arabinoseresten des Lipoarabinomannan (LAM) bedingt auch speziesabhängige Unterschiede im Infektionsverlauf. Dieser Ligand kann sowohl mit dem Mannoserezeptor von Makrophagen als auch mit DC-SIGN dendritischer Zellen wechselwirken (Kang *et al.*, 2005; Tailleux *et al.*, 2003).

Intrazelluläre Pathogene, die Makrophagen als Wirtszelle besiedeln, haben verschiedene Abwehrstrategien entwickelt. Während *Listeria* und *Shigella* aus den Phagosomen in das Zytosol gelangen, adaptieren sich zum Beispiel *Leishmania* und *Coxiella* an das bakterizide Milieu im Lysosom und vermehren sich dort. Mykobakterien verbleiben ebenfalls Phagosom. Sie blockieren die Phagosomen-Lysosomen-Verschmelzung beziehungsweise die Reifung zur aktiven lysosomalen Vakuole und verhindern so den Aufbau eines bakteriziden Milieus. Mit *M. tuberculosis* besiedelte Phagosomen entwickeln sich nicht über ein frühes Reifungsstadium hinaus. So bleibt beispielsweise der pH-Wert im Lumen bei 6,4. Es konnte gezeigt werden, dass unter anderem Lipoarabinomannan, Trehalose-Dimycolat (Cord-Faktor) und Sulfolipide von *M. tuberculosis* die Phagosomen-Lysosomen-Verschmelzung verhindern. Ferner findet eine umfangreiche Adaptation des Transkriptoms statt (Rohde *et al.*, 2007). So wurden insgesamt 585 Gene von *M. tuberculosis* H37Rv nach 4 und/oder 24 Stunden in THP-1-Makrophagen differentiell

reguliert (Fontan *et al.*, 2008). Das Immunsystem besitzt jedoch auch Mechanismen, um dieser Einflussnahme durch den Erreger zu begegnen. Beispiele dafür sind die Aktivierung des Makrophagen mit IFN- γ vor der Aufnahme der Bakterien sowie Autophagie (Rohde *et al.*, 2007).

Mycobacterium tuberculosis kann sich im Inneren der Makrophagen und dendritischen Zellen zunächst vermehren. Beim Zerfall bakterienhaltiger Zellen werden die Erreger von anderen Makrophagen phagozytiert, die daraufhin Zytokine freisetzen und eine lokale Entzündung induzieren. Der Entzündungsherd wird Primäraffekt (PA) genannt. Aus dem PA gelangen die Erreger wahrscheinlich mit infizierten Phagozyten in die regionalen Lymphknoten. Schließlich kommt es zur Induktion einer T-Zell vermittelten Immunantwort. Der Lymphknoten schwillt an. Dieses Stadium der Erkrankung aus PA mit beteiligtem Lymphknoten wird im Rahmen der Primärinfektion als Primärkomplex (PK) bezeichnet. Gleichzeitig kommt es zur Bildung von Granulomen und zur Aktivierung von Makrophagen. Die Primärtuberkulose verläuft in 90 % der Fälle bis zur Ausbildung des PK und stellt klinisch keine Krankheit dar. Immunsupprimierende Faktoren können ein Voranschreiten der Krankheit, einhergehend mit der Vergrößerung des Lungenherdes und Pleuraergüssen durch Eindringen des Erregers in den Pleuraspalt, bewirken. Weiterhin kann es zu einer Generalisierung der Tuberkulose kommen, die zur Granulombildung auch in anderen Organen als der Lunge führen kann. In 10 % der Tuberkulose-Infektionen kommt es zur postprimären Tuberkulose. Darunter versteht man die Reaktivierung einer latenten Tuberkulose. Der Grund dafür ist ein immunologisches Ungleichgewicht nach der Entwicklung des PK. Die Aktivierung von Makrophagen über INF- γ durch spezifisch stimulierte T-Zellen führt zur Ausschüttung von TNF- α und anderen Zytokinen, die eine verkäsende Nekrose der Granulomenzentren zur Folge hat. Bei einer Verflüssigung der Nekrose, abgekapselt durch das Granulom, kommt es zur Kavernenbildung. Die Kaverne bietet ein gutes Milieu für die Vermehrung von *M. tuberculosis*. Gewebeschäden sind Folge einer überschießenden Immunreaktion. Erreicht die Nekrose einen Bronchus, kommt es zur bronchogenen Ausbreitung in der Lunge und zur offenen Tuberkulose (Fuehner *et al.*, 2007).

Symptomatisch stellt sich die Tuberkulose häufig unspezifisch dar. Zu nennen sind etwa das Auftreten von Fieber, Nachtschweiß, Abgeschlagenheit und

Gewichtsverlust. Später kommt es zu unterschiedlich ausgeprägtem Husten. In seltenen Fällen kann es zu einer Atmungsinsuffizienz kommen (Fuehner *et al.*, 2007). Eine ausgeprägte Bakterienlast der Lunge kann hierbei auch zu einer tuberkulösen Pneumonie und zum Tod des Patienten führen. Zudem kann es zu einem chronischen Verlauf dieser Form der Tuberkulose kommen, bei dem von unbehandelten Erkrankten eine dauerhafte Infektionsgefahr ausgeht. Am häufigsten verläuft die Tuberkulose ausschließlich pulmonal. Die Korrelation von AIDS und Tuberkulose bewirkte jedoch eine Zunahme der extrapulmonalen Tuberkulose (Fuehner *et al.*, 2007).

Die Therapie der Tuberkulose dauert etwa 6 Monate. Es wird in der Regel eine Kombinationstherapie durchgeführt. In der initialen Phase wird die Behandlung mit den Medikamenten Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid und Ethambutol für 2 Monate, gefolgt von Isoniazid und Rifampicin für 4 Monate, empfohlen. Die lange Therapiedauer, das Vorkommen resistenter *M. tuberculosis*-Stämme und auch die Behandlung mit HIV koinfizierter Patienten stellt neue therapeutische Herausforderungen, denen man mit der Generierung und Erprobung neuer Antibiotika begegnen muss (Maartens und Wilkinson, 2007).

Gegen die Tuberkulose ist zwar ein Lebendimpfstoff verfügbar, seine Wirksamkeit in der Prävention der Lungen-Tuberkulose beim erwachsenen Menschen, der häufigsten Form der Tuberkulose, ist jedoch unvollständig. Andererseits vermittelt dieser Impfstoff einen 100%igen Schutz gegen die häufigste Form der Tuberkulose bei Säuglingen und Kleinkindern, der Miliar-Tuberkulose mit begleitender Meningitis. Der attenuierte Lebendimpfstamm wurde nach über 230 *in-vitro*-Passagen von Albert Calmette und Camille Guérin Anfang des letzten Jahrhunderts isoliert. Ihnen zu Ehren wurde er *M. bovis Bacille Calmette Guérin* (BCG) genannt (Kaufmann, 2000; Magdalena *et al.*, 1998). Aufgrund der unzureichenden protektiven Wirkung der Immunisierung mit *M. bovis* BCG ist es notwendig, einen verbesserten Impfstoff zu entwickeln. In den letzten Jahren wurden einige Kandidaten für klinische Studien ausgewählt, von denen jedoch noch keiner zur Marktreife gelangte (Maartens und Wilkinson, 2007).

Grundlage dieser Arbeit ist der *M. tuberculosis* Stamm H37Rv, der ursprünglich als Variante des *M. tuberculosis* Stammes H37 beschrieben wurde. Der Stamm H37 wurde 1905 von E. R. Baldwin aus dem Sputum eines 19jährigen isoliert (Steenken

et al., 1934). Steenken *et al.* zeigten 1934 durch vielfaches Passagieren unter verschiedenen Kulturbedingungen, morphologische Untersuchungen und Charakterisierung im Tiermodell, dass es sich bei diesem Isolat um eine Mischkultur zweier Varianten des H37 Stammes handelte. Diese zunächst R und S (resistent und sensitiv gegenüber bestimmten Faktoren (Steenken *et al.*, 1934)) benannten Varianten sind heute bekannt als die Stämme H37Ra und H37Rv (Allen, 1998). Bei der Variante S beziehungsweise H37Rv handelt es sich um den virulenteren Mikroorganismus (Steenken *et al.*, 1934).

3.2 Die mykobakterielle Zellwand und ihre Bedeutung für die Wirt-Pathogen-Interaktion

Komponenten der Zellwand sind bedeutende Virulenzfaktoren von *M. tuberculosis*. Es konnte gezeigt werden, dass sie eine wichtige Rolle bei der Wirt-Pathogen-Interaktion spielen (Karakousis *et al.*, 2004). Die Struktur der Zellwand des Genus *Mycobacterium* ist einzigartig. Abbildung 1 zeigt eine Übersichtsdarstellung der mykobakteriellen Zellwand. Wie andere Bakterien besitzt *M. tuberculosis* eine Plasmamembran, die die Zelle umgibt und an die sich die komplexe Zellwand anschließt. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen stellt sich die äußere elektronenundurchlässige Schicht der Membran etwas dicker dar als die innere. Dieses asymmetrische Erscheinungsbild beruht wahrscheinlich auf mit der äußeren Schicht assoziierten Kohlenhydraten (Brennan und Nikaido, 1995). Das Gerüst der Zellwand bildet der Mykolsäure-Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplex (MAP-Komplex) (Abbildung 2). Er setzt sich zusammen aus querverbundenem Peptidoglycan und stellt sich als ein einziges, die Zelle umgebendes Makromolekül dar. Das Peptidoglycan ist mit Arabinogalactan kovalent über Phosphoryl-*N*-Acetylglucosaminosyl-Rhamnosyl-Einheiten vernetzt. Das Arabinogalactan wiederum ist mit verschiedenen α -Alkyl-, β -Hydroxymykolsäuren verestert (Crick *et al.*, 2001).

Das Peptidoglycan besteht aus alternierenden *N*-Acetylglucosamineinheiten und modifizierten Muraminsäureresten. Es weist bei *M. tuberculosis* einige strukturelle Besonderheiten auf. Die typische funktionelle *N*-Acetylgruppe ist weiter zu einer *N*-Glycolylgruppe oxidiert. Des Weiteren sind die Muraminsäurereste mit L-Alanyl-D-Isoglutaminyl-meso-Diaminopimelyl-D-Alanin-Seitenketten substituiert. Die

Vernetzung kann sowohl über zwei meso-Diaminopimelinsäurereste (DAP) als auch über DAP und D-Alaninreste erfolgen (Crick *et al.*, 2001).

Abbildung 1: Übersichtsdarstellung der mykobakteriellen Zellwand

Grauer Balken: Plasmamembran; PIMs > Phosphatidylinositolmannoside; LM > Lipomannan; LAM > Lipoarabinomannan; Mykolsäure-Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplex; grün: Porine; freie Lipide oder Glykoproteine; nicht dargestellt sind die Kapsel und damit assoziierte Zellwandkomponenten (Quesniaux *et al.*, 2004).

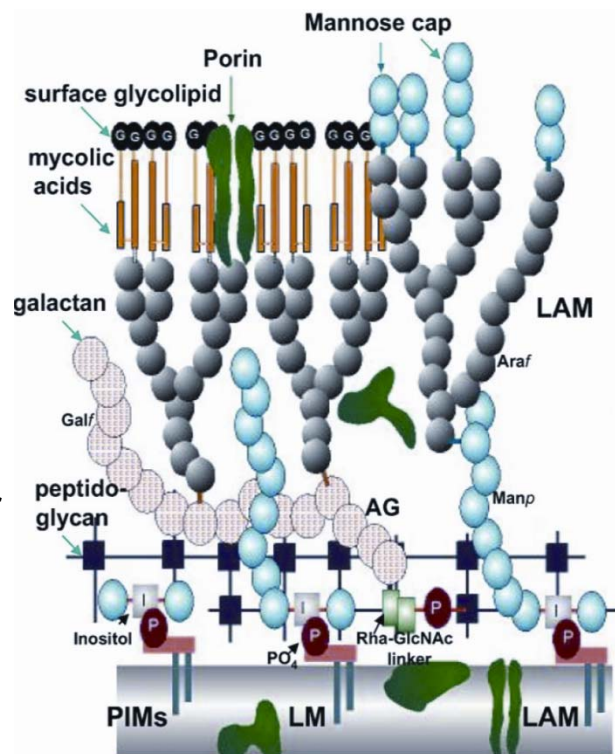
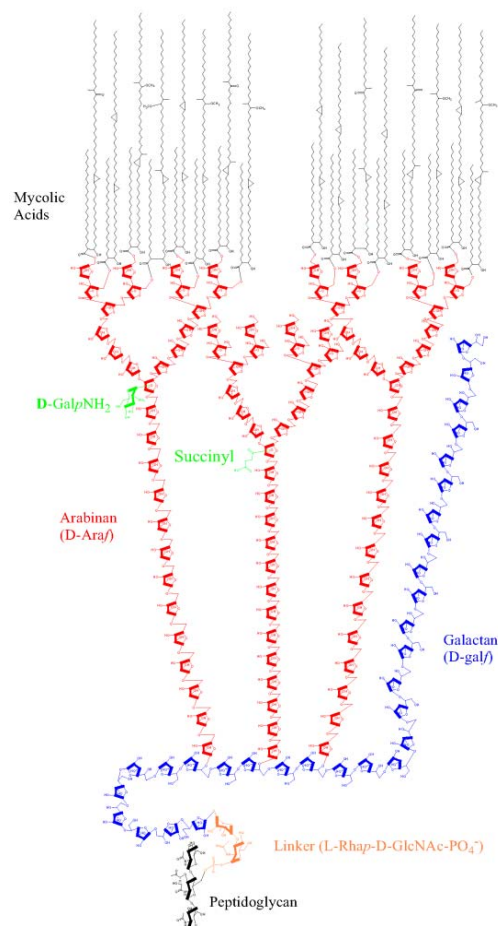


Abbildung 2: Der Mykolsäure-Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplex

Zentraler Bestandteil ist das Arabinan (rot); das Galactan (blau) ist mit drei Arabinose-Seitenketten versehen und über das Verbindungsstück (orange) mit Peptidoglycan verbunden; die Mykolsäuren sind schwarz dargestellt; die Substituenten D-GalpNH₂ und der Succinylrest sind grün dargestellt (Bhamidi *et al.*, 2008).



Auch das Arabinogalactan von *M. tuberculosis* ist einzigartig. Seine Monomere Arabinose und Galactan weisen eine Furanose-Konfiguration auf (Crick *et al.*, 2001). Die meisten Monosaccharide liegen als sechsgliedrige Ringform, als Pyranose, vor. Furanosen entstehen, wenn anstatt der 5-Hydroxygruppe die 4-Hydroxygruppe bei der Ringbildung mit der Aldehydgruppe reagiert (Hart, 1989). Das Arabinan des MAP-Komplexes weist zusätzlich Succinyl- und D-GalpNH₂-Reste auf (Bhamidi *et al.*, 2008). Das Galactan ist über eine Phosphodiesterbindung mit einigen Muraminsäureresten des Peptidoglykans verbunden. Die Bindung erfolgt dabei über das Phosphat eines α -L-Rhap-(1→3)- α -D-GlcNAc-(1→P)-Verbindungsstücks (Crick *et al.*, 2001).

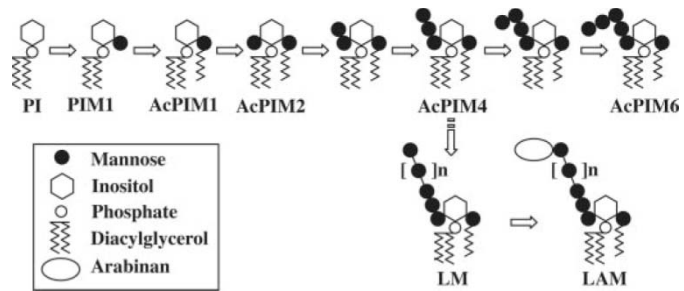
Eine Kapsel bildet den äußeren Abschluss der mykobakteriellen Zellwand (Crick *et al.*, 2001). Es wurden bisher drei verschiedene Polysaccharide in dem Kapselmaterial nachgewiesen: Glucan, Arabinomannan und Mannan (Schwebach *et al.*, 2001; Schwebach *et al.*, 2002; Lemassu und Daffe, 1994). Die genaue biologische Funktion des Kapselmaterials ist noch nicht geklärt. Denkbar wäre, dass die Kapsel einen Schutz vor enzymatischen Verdau nach der Phagozytose bietet. Darüber hinaus zeigen Kapselkomponenten immunmodulatorische Aktivität. Es konnten unterschiedliche Kapselfraktionen aus verschiedenen *M. avium*-Stämmen isoliert werden, die zum einen acylierte Polysaccharide und zum anderen Arabinomannane enthielten. Für *M. avium*, ein fakultativ intrazelluläres humanpathogenes Bakterium, konnte gezeigt werden, dass die immunstimulatorische Aktivität von der Acylierung der Komponente abhängt. Die nicht acylierten Arabinomannane zeigten *in vitro* eine geringere immunmodulatorische Wirkung als die acylierten Polysaccharide, während sowohl die Lipoglycan- als auch die Arabinomannanfraktion eine anti-tumor zytotoxische Aktivität in humanen MNC (mononuclear cells) induzierten (Wittkowski *et al.*, 2007). α -Glucan von *M. tuberculosis* verursacht während der Reifung von Monozyten zu dendritischen Zellen (DC) einen veränderten Phänotyp, der sich unter anderem durch eine verminderte Expression von CD1-Molekülen auszeichnet (Gagliardi *et al.*, 2007). Zumindest bei der Infektion mit intakten Bakterien besteht hier ein Unterschied zwischen *M. tuberculosis* und *M. avium* (Mariotti *et al.*, 2004; Gagliardi *et al.*, 2007). Auch LAM, LM und PIM scheinen zum Teil kapselassoziiert zu sein (Nigou *et al.*, 1997; Wittkowski *et al.*, 2007).

Zusätzlich enthält die mykobakterielle Zellwand eine Vielzahl lipidhaltiger Verbindungen wie Phthiocerol Dimycocerosat (PDIM), Lipomannan (LM), Lipoarabinomannan (LAM), Sulfolipide und das 19 kDa Lipoprotein (Karakousis *et al.*, 2004), sowie Lipide, deren Struktur auf Trehalose aufbaut, wie Trehalose-6,6-Dimycolat (Cord Faktor), Acyltrehalosen und Lipooligosaccharide (LOS) (Brennan und Nikaido, 1995).

Phosphatidylinositolmannoside, LM und LAM sind ubiquitäre Bestandteile der Zellwand aller mykobakterieller Spezies. Lipoarabinomannan ist ein über Phosphatidylinositol (PI) in der Plasmamembran nicht kovalent verankertes Lipoglycan (Karakousis *et al.*, 2004). Es besitzt ein Mannan-Grundgerüst, das aus α -1,6-verbundenen Mannoseresten in Pyranosekonfiguration besteht, und Oligoarabinosyl-Seitenketten. Bei *M. tuberculosis* ist das Mannan an Position C-2 mit einer einzelnen Mannoseeinheit substituiert. Größe und Verzweigung unterscheiden sich bei den verschiedenen Mykobakterienspezies. Das Arabinanpolymer besteht aus einem α -1,5-verbundenen Arabinofuranosyl-Gerüst, das mit verzweigten Hexa-Arabinofuranosiden und linearen Tetra-Arabinofuranosiden versehen ist (Briken *et al.*, 2004). Sein Anteil macht 0,5 % der Zellmasse aus (Karakousis *et al.*, 2004). Der strukturelle Aufbau von LAM variiert zwischen den mykobakteriellen Spezies. So ergibt sich eine Einteilung in drei Klassen: LAM mit einer Mannose-Kappe (ManLAM), LAM mit einer Phospho-*myo*-Inositol-Kappe (PILAM) und AraLAM, das keine Kappe aufweist und demnach durch endständige Arabinosereste gekennzeichnet ist. ManLAM wurde bei den virulenten *M. tuberculosis* Stämmen H37Rv und Erdman sowie den avirulenten Stämmen H37Ra und *M. bovis* BCG gefunden. PILAM wurde in schnell wachsenden Mykobakterien wie *M. smegmatis* und *M. fortuitum* und AraLAM bei *M. chelonae* nachgewiesen. ManLAM besitzt eine mono-, di- oder trimannosidische Kappe. Die dimannosidischen Kappen bilden den Hauptanteil. ManLAM enthält etwa 50 Mannopyranosen und 60 Arabinofuranosen (Briken *et al.*, 2004; Karakousis *et al.*, 2004). Wie erwähnt, gibt es in der Plasmamembran sowohl verankertes „zellständiges“ ManLAM als auch exponierteres, leichter zu extrahierendes „kapselständiges“ ManLAM. Sie unterscheiden sich in ihrem PI-Anker und dem Ausmaß der Substitution des endständigen Arabinans mit Mannose-Kappen sowie ihren immunologischen Eigenschaften. Die Unterschiede in der biologischen Aktivität zwischen den verschiedenen LAM-Spezies werden vor allem

Abbildung 3: Syntheseweg der polaren PIM, LM und LAM

Schematische Darstellung der Synthese dreifach acylierter PIM, beziehungsweise LM und LAM; bei AcPIM₄ spaltet sich der Weg zwischen der Synthese polarer PIM und LM beziehungsweise LAM auf (Morita *et al.*, 2006)



auf die Mannose-Kappe und strukturelle Abweichungen innerhalb des PI-Ankers zurückgeführt (Nigou *et al.*, 1997; Karakousis *et al.*, 2004).

Chatterjee *et al.* postulierten, dass es sich bei LM und LAM um multiglykosylierte PIMs handelt. Von der strukturellen Verwandtschaft dieser Verbindungen schlossen sie auf eine biosynthetische Verwandtschaft (Chatterjee *et al.*, 1992). Phosphatidylinositolmannoside liegen überwiegend als Di- und Hexamannoside vor (Gilleron *et al.*, 2001). Die Bildung von PIM₂ wird von den Mannosyltransferasen PimA (Rv2610c) und PimB (Rv0557) katalysiert. PimA ermöglicht die Anlagerung einer Mannopyranose an das *myo*-Inositol des PI. Als Substrat dient GDP-Mannose. Das Produkt dieser Reaktion ist PIM₁. Eine weitere Mannopyranose wird durch PimB hinzugefügt. In dem klinischen *M. tuberculosis*-Isolat CDC1551 wird der nächste Mannosylierungsschritt von PimC katalysiert (Berg *et al.*, 2007). PimE (Rv1159) ist an der Synthese von PIM₅ beteiligt und vermittelt den Transfer eines Mannoserestes auf PIM₄ (Morita *et al.*, 2006). Diese und weitere Reaktionen führen zur Bildung der PIMs mit höheren Molekulargewichten und schließlich zu LM und LAM, deren Biosynthese noch nicht vollständig geklärt ist. Morita *et al.* berichteten, dass es sich bei vierfach mannosylierten PIM um die Verbindung handelt, bei der sich der Biosyntheseweg zu polaren PIMs, beziehungsweise LM und LAM aufspaltet (Morita *et al.*, 2004) (Abbildung 3). So besitzt das metabolische Endprodukt PIM₆ zwei terminale Mannosereste; diese sind über α -1,2-glykosidische Bindungen miteinander verknüpft, die in LM und LAM nicht vorkommen. Lipomannan und LAM sind α -1,6-glykosidisch verbunden und weisen als Verzweigung nur einzelne α -1,2-gebundene Mannosereste auf (Chatterjee *et al.*, 1992; Morita *et al.*, 2004; Morita *et al.*, 2006).

Lipoarabinomannan (Karakousis *et al.*, 2004) und PIM (Apostolou *et al.*, 1999; de la Salle *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2004; Gilleron *et al.*, 2003) modulieren die Immunantwort des Wirtes. Abhängig von der Komposition der endständigen Kappenstruktur und dem Grad der Acylierung kann der immunmodulatorische Effekt von

LAM proinflammatorisch oder antiinflammatorisch sein (Nigou *et al.*, 2001). So kann AraLAM, aber nicht ManLAM, die Chemotaxis von Makrophagen und Monozyten induzieren (Bernardo *et al.*, 1998). Überdies ist AraLAM ein effektiverer Induktor für chemotaktische Faktoren wie Pentraxin-3 (PTX-3) (Vouret-Craviari *et al.*, 1997). Die Mannose-Kappe von *M. tuberculosis* könnte also dazu dienen, die frühe Immunantwort auf eine mykobakterielle Infektion, die auf der Aktivierung von Granulozyten basiert, zu unterdrücken (Karakousis *et al.*, 2004). Die Acylierung von LAM spielt eine Rolle bei der Aktivierung der Tyrosinkinase Hck in menschlichen neutrophilen Granulozyten (Karakousis *et al.*, 2004). Das hat eine erhöhte Expression des Tumornekrosefaktors zur Folge (Astarie-Dequeker *et al.*, 2000). Weiterhin ist AraLAM potenter bei der Induktion des Tumornekrosefaktors α (TNF- α) in Makrophagen als ManLAM (Dahl *et al.*, 1996). Außerdem wird die Synthese des Transkriptionsfaktors NF-KB, der die Expression von TNF- α in Makrophagen reguliert, von AraLAM im Vergleich zu ManLAM verstärkt induziert (Brown und Taffet, 1995).

ManLAM ist nicht nur ineffektiver bei der Stimulierung des Immunsystems, es regelt die Immunantwort zum Teil auch herunter. Es schwächt die Expression von TNF- α und IL-12 in menschlichen mononukleären Phagozyten. Ferner stimuliert ManLAM die Expression von SHP-1, einer Tyrosinphosphatase, die an der Abmilderung der Immunantwort der Makrophagen beteiligt sein könnte (Knutson *et al.*, 1998). Außerdem ist ManLAM nicht in der Lage die Toll-Like-Rezeptor-abhängige Produktion von IL-12 zu induzieren (Means *et al.*, 1999). Weiterhin findet die Expression des Tumor-Wachstumsfaktors TGF- β sowohl in Anwesenheit von AraLAM als auch ManLAM statt (Dahl *et al.*, 1996). Diese kann die Aktivierung der Makrophagen und T-Zellen verhindern und zu einer Immunantwort des Typs Th2 führen, die gegen *M. tuberculosis* ineffektiv ist (Karakousis *et al.*, 2004). Zudem konnte gezeigt werden, dass ManLAM inhibitorisch auf dendritische Zellen wirkt. So konnte ManLAM von *M. bovis* BCG die Produktion von IL-12 menschlicher dendritischer Zellen, die mit LPS stimuliert wurden, unterdrücken. Der Verlust der Mannose-Kappe oder des PI-Ankers hebt diesen inhibitorischen Effekt auf (Nigou *et al.*, 2001). ManLAM kann die T-Zell Proliferation und Aktivierung *in vitro* unterdrücken. Das konnte besonders für das ManLAM von *M. tuberculosis* gezeigt werden (Moreno *et al.*, 1988).

Lipoarabinomannane haben vielschichtige Effekte auf das Immunsystem des Wirtes. So konnte gezeigt werden, dass sich selbst die bereits erwähnten „membranständigen“ und „kapselassoziierten“ ManLAM-Spezies von *M. bovis* BCG in ihrer Wirkung auf die IL-8- und TNF- α -Produktion unterscheiden (Nigou *et al.*, 1997).

Letztendlich wird die Rolle der Lipoarabinomannane für den Infektionsverlauf weiterhin kontrovers diskutiert. Appelmelk *et al.* revidierten vor kurzem die allgemeine Auffassung, dass die Mannose-Kappe von LAM essentiell für die Immunmodulation im Infektionsverlauf ist. Es wurden bei diesem Ansatz Mutanten in den homologen Genen zu Rv1635c in *M. marinum* und *M. bovis* BCG erstellt, die nicht in der Lage sind, terminale Kappen-Motive auszubilden. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutation in *M. marinum* keinen Effekt auf das Überleben in Makrophagen hatte, während im geringen Maß Bindung und Eintritt in die Makrophagen reduziert waren. Im Zebrafisch-Infektionsmodell verhielt sich die *M. marinum* Mutante wie der Wildtyp. Auch die Bindung von *M. bovis* BCG an DC-SIGN scheint nicht ausschließlich durch ManLAM vermittelt zu werden. Weiterhin ist die Fähigkeit, die Freisetzung von IL-10 zu induzieren, im Vergleich zum Wildtyp in der *M. bovis* BCG Mutante nicht verändert. Im Maus-Infektionsmodell für *M. bovis* BCG zeigten die Mutante und der Wildtyp keinen Unterschied im Infektionsverlauf, nur in der Leber war bei der Mutante ohne Mannose-Kappe an Tag 21 ein leichter Anstieg der koloniebildenden Einheiten zu verzeichnen (Appelmelk *et al.*, 2008).

Auch wenn die genauen Mechanismen der Zellwandsynthese und die Wechselwirkungen mit dem Immunsystem des Wirtes noch nicht im Detail geklärt sind, scheinen die einzigartigen und reichhaltig vorhandenen Zellwandkomponenten für die intrazelluläre Persistenz von *M. tuberculosis* und bei der Vermittlung von Resistenz gegen exogene Stressoren von großer Bedeutung zu sein. Da Zellwandkomponenten häufig essentiell für Wachstum und Überleben sind, eignen sie sich in besonderem Maße für die Entwicklung neuer Wirkstoffe zur Behandlung der Tuberkulose. Ein prominentes Beispiel ist Ethambutol, das auf die Arabinogalactansynthese wirkt (Takayama und Kilburn, 1989).

3.3 Die Bedeutung von Rv1500 für die Zellwandsynthese von *Mycobacterium marinum*

Alexander *et al.* haben ein Gen identifiziert, das für eine Glykosyltransferase codiert. Ihre Ergebnisse ließen vermuten, dass es sich bei Rv1500 um eine Mannosyltransferase handelt, die fünffach mannosyliertes PIM in siebenfach mannosyliertes PIM durch die Addition zweier Mannosereste an Ac₂PIM₅ überführt. Die Autoren bezeichneten das Gen daher als *pimF* (Alexander *et al.*, 2004).

In ihrer Studie erstellten Alexander und Mitarbeiter mittels Transposonmutagenese eine Deletionsmutantenbibliothek von *M. marinum* und betrachteten auf Agarplatten gewachsene Klone hinsichtlich ihrer Koloniemorphologie. Die Hypothese war, dass eine Veränderung im Zellwandaufbau mit einer veränderten Koloniemorphologie einhergehen würde. Ein Klon mit einem auffällig transparenten Koloniesaum wurde weiter untersucht. Die Wachstumsrate, das Erscheinungsbild in der Lichtmikroskopie und die Sensitivität gegenüber Antibiotika waren nicht verändert. Die Sequenzanalyse des vom Transposon inaktivierten Gens ergab eine Homologie zu Rv1500 von *M. tuberculosis* H37Rv (86 % auf Aminosäureebene). Die von *pimF* kodierte Glykosyltransferase gehört zur Familie 2 nach der CAZy-Klassifikation. In der 2D-HPTLC-Analyse der polaren Lipide akkumulierte eine Zellwandkomponente, während eine andere nicht mehr gebildet wurde. In massenspektrometrischen Analysen wurden diese Substanzen als Ac₂PIM₅ beziehungsweise Ac₂PIM₇ identifiziert. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Mutante in ihrer Fähigkeit zur LAM/LM-Synthese eingeschränkt ist und in einem reduzierten Ausmaß in Makrophagen aufgenommen wird. Dieser Phänotyp konnte durch die Transformation des offenen Leserahmens Rv1500 von *M. tuberculosis* komplementiert werden. Aus diesen Ergebnissen wurde postuliert, dass Rv1500 für eine Mannosyltransferase codiert, die Ac₂PIM₇ synthetisiert und dafür Ac₂PIM₅ als Substrat nutzt (Alexander *et al.*, 2004).

Eine spätere Arbeit zu Rv1500 zeigte von der ursprünglichen Studie abweichende Ergebnisse. Im Wesentlichen wurde hier die katalytische Aktivität von *pimF*/Rv1500 in *M. marinum* als Glykosyltransferase beschrieben, die an der Synthese von Lipooligosacchariden beteiligt ist. Daraufhin wurde *pimF* als *losA* bezeichnet (Burguiere *et al.*, 2005).

Ein Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von Rv1500 als mögliche Mannosyltransferase im Zellwandmetabolismus von *M. tuberculosis* H37Rv zu klären.

3.4 HddA – eine Phosphokinase von *Mycobacterium tuberculosis* mit Beteiligung an der Zellwandsynthese?

Glycero-manno-heptose ist im LPS der meisten gramnegativen Bakterien weit verbreitet. Glycero-manno-heptose ist Bestandteil von Kapseln, dem O-Antigen sowie dem Glycananteil von Glykoproteinen der S-Schicht (Valvano *et al.*, 2002). Kneidinger *et al.* konnten die GDP-Aktivierung von D-Glycero-D-manno-heptose auch in dem grampositiven thermophilen Bakterium *Aneurinibacillus thermoaerophilus* aufklären (Kneidinger *et al.*, 2001).

D-Glycero-D-manno-heptose wurde in unterschiedlichen anomeren Konfigurationen nachgewiesen. So wurde zum Beispiel bei *Helicobacter pylori* D-Glycero-D-manno-heptose mit dem anomeren Substituenten in α -Konfiguration, bei *Plesiomonas shigelloides* D-Glycero- β -D-manno-heptose, gefunden (Aspinall *et al.*, 1997; Czaja *et al.*, 2000).

Die biologische Bedeutung der aktivierten Heptose ist vielfältig. So zeigten *E. coli* K-12 Mutanten, denen Heptose im LPS fehlte, eine erhöhte Sensitivität gegenüber Novobiocin und anderen Substanzen. Es wurden Defekte bei der Konjugation sowie der Adsorption von Bakteriophagen beobachtet (Tamaki *et al.*, 1971). Heptose-defiziente Mutanten von *Haemophilus influenzae* zeigten eine reduzierte Virulenz (Zwahlen *et al.*, 1985; Helander *et al.*, 1988). Glycero-manno-heptose wurde auch in glykosilierten Proteinen der S-Schicht von *A. thermoaerophilus* nachgewiesen (Kosma *et al.*, 1995), ferner in Pili-Strukturen, Adhäsinen, Flagellen und sezernierten Exoenzymen. Die Glykosylierung oberflächlich exponierter Proteine kann Adhärenz, Umgehung der Immunantwort und verstärkte Resistenz gegen Proteolyse vermitteln (Valvano *et al.*, 2002).

Kneidinger *et al.* beschrieben für den GDP-D-Glycero- α -D-manno-heptose-Stoffwechselweg von *A. thermoaerophilus* und die ADP-Aktivierung von L-Glycero- β -D-manno-heptose in *E. coli* eine Kinase/Phosphatase-Kaskade (Kneidinger *et al.*, 2001; Kneidinger *et al.*, 2002). Es können zwei Arme des Stoffwechselweges unterschieden werden: Der D- α -D-Heptose-Weg und der L- β -D-Heptose-Weg (Abbildung 4). Der Hauptunterschied liegt in der Spezifität des Kinase- und des Nukleotidyltransferase-Schrittes. Beide Wege gleichen sich in den von der Isomerase und der Phosphatase katalysierten Schritten. Der im Folgenden beschriebene Weg scheint auch bei *M. tuberculosis* vorhanden zu sein (Valvano *et al.*, 2002). Dabei wird Sedoheptulose-7-phosphat aus dem Pentosephosphatweg mit Hilfe der Sedoheptulose-7-phosphat-Isomerase zu D-Glycero-D-manno-heptose-7-phosphat isomerisiert. HddA, eine D-Glycero- α -D-manno-heptose-7-phosphat-Kinase, katalysiert die Übertragung einer Phosphatgruppe auf D-Glycero- α -D-manno-heptose-7-phosphat. Es resultiert D-Glycero- α -D-manno-heptose-1,7-bisphosphat. HddA ist spezifisch für das D- α -D-Heptose Anomer. Die D- α , β -D-Heptose-1,7-bisphosphat-Phosphatase GmhB entfernt im nächsten Schritt die Phosphatgruppe an Position C7. Dieses Enzym kann beide möglichen Anomere als Substrat nutzen. Bei HddC handelt es sich um die D-Glycero- α -D-manno-heptose-1-phosphat-Guanylyltransferase. Ihre Aktivität resultiert in der Bildung von GDP-aktivierter Heptose, die von Glykosyltransferasen als Substrat genutzt wird. Bei *M. tuberculosis* konnte noch nicht geklärt werden, in welchen Strukturen D-Glycero- α -D-manno-heptose enthalten ist (Valvano *et al.*, 2002).

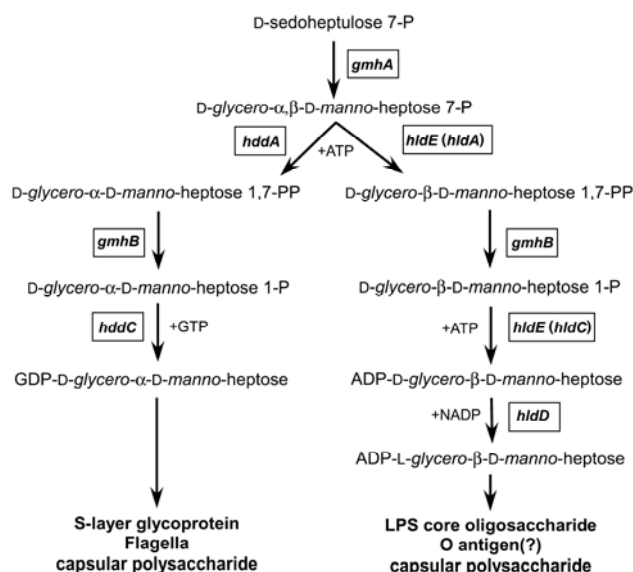


Abbildung 4: Stoffwechselwege zur Nukleotidaktivierung von Glycero-manno-heptose

Es wurden homologe Gene des linken Arms des Stoffwechselweges in *M. tuberculosis* gefunden (Valvano *et al.*, 2002)

HddA als erstes spezifisches Enzym des GDP-D-Glycero-D-manno-heptose-Weges mit zentraler Bedeutung für die GDP-Aktivierung an Position 1 der Heptose wurde ausgewählt, um im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit die Bedeutung dieses Stoffwechselweges für *M. tuberculosis* zu klären.

3.5 Regulation der Nitratassimilation von *Mycobacterium tuberculosis* durch GlnR

Mycobacterium tuberculosis hat im infizierten Gewebe nur einen begrenzten Zugang zu Nährstoffen (Munoz-Elias und McKinney, 2006). Nitrat wird im Gewebe spontan aus Stickstoffmonoxid (NO), dem Produkt der Stickstoffmonoxid-Synthase, gebildet (Bogdan, 2001). Die Assimilation von Stickstoff ist essentiell für das Überleben von *M. tuberculosis in vitro* und *in vivo*. Bereits vor mehr als 40 Jahren wurde dieser Aspekt des mykobakteriellen Metabolismus beschrieben (DeTurk und Bernheim, 1958; Virtanen, 1960; Hedgecock und Costello, 1962). Die molekularen Mechanismen der Nitratassimilation blieben jedoch zunächst ungeklärt.

Der erste Schritt bei der Nitratassimilation ist die Reduktion von Nitrat (NO_3^-) zu Nitrit (NO_2^-). In *Bacillus subtilis* wird die assimilatorische Nitratreduktion durch ein spezielles zytoplasmatisches Enzym vermittelt. Eine andere, membrangebundene Nitratreduktase reduziert ebenfalls Nitrat zu Nitrit. Dieser Stoffwechselweg dient der Nitratatmung und ermöglicht die Generierung von ATP unter anaeroben Bedingungen, wobei Nitrat den Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor ersetzt. Das auch als respiratorische Nitratreduktase bezeichnete Enzym wird von dem *narGHJI*-Gencluster kodiert. NarJ spielt eine essentielle Rolle bei der Generierung und Stabilisierung der quaternären Struktur der funktionellen Nitratreduktase aus den Untereinheiten NarG, NarH und NarI. Seine Expression wird unter anaeroben Bedingungen induziert (Glaser *et al.*, 1995; Gennis und Stewart, 1996; Nakano und Zuber, 1998). Vergleichende Genomanalysen von *M. tuberculosis* und *B. subtilis* zeigten, dass *M. tuberculosis* Gene mit 30 % bis 50 % Homologie auf Aminosäureebene zu *narGHJI* von *B. subtilis* besitzt. Es konnte gezeigt werden, dass NarGHJI von *M. tuberculosis* Nitrat nicht nur unter anaeroben, sondern auch unter aeroben Bedingungen zu Nitrit reduziert (Weber *et al.*, 2000; Stermann *et al.*, 2004). Auch Sohaskey und Wayne berichteten, dass die Expression von *narGHJI* unabhängig von anaeroben Wachstumsbedingungen ist (Sohaskey und Wayne,

2003). Da *M. tuberculosis* keine Gene für eine distinkte assimilatorische Nitratreduktase aufweist, war die initiale Hypothese, dass *narGHJI* auch die assimilatorische Reduktion von Nitrat vermittelt. Der Nachweis wurde für NarG bereits geführt (Malm *et al.*, 2008, accepted).

Der zweite Schritt bei der Nitratassimilation ist die Reduktion von Nitrit (NO_2^-) zu Ammonium (NH_4^+). *nirBD* von *E. coli* zeigt eine 40%ige bis 50%ige Homologie auf Aminosäureebene zu Genen von *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998). *nirBD* kodiert für eine Sirohäm-abhängige NADH-Nitritreduktase, einem Enzym, das Nitratassimilation in verschiedenen Bakterien und Pilzen vermittelt (Lin und Stewart, 1998). Nur in *E. coli* und anderen Enterobakterien wird diese Nitritreduktase unter anaeroben Bedingungen induziert, wobei sie nicht der Nitratassimilation, sondern der Detoxifizierung von Nitrit dient, das aus der respiratorischen Nitratreduktion akkumuliert (Gennis und Stewart, 1996). NirBD vermittelt in *M. tuberculosis* im Rahmen der Nitratassimilation die Reduktion von Nitrit zu Ammonium (Malm *et al.*, 2008, accepted).

Die Regulation der Nitratassimilation hängt von der Verfügbarkeit der präferierten Stickstoffquelle ab, beispielsweise Ammonium, und könnte dann von der Regulation eines generellen Regulators für den Stickstoffmetabolismus abhängig sein. Andererseits könnte die Regulation auch spezifisch für einen Stoffwechselweg sein und dann von der Verfügbarkeit eines Induktors wie Nitrat abhängen. In zwei Aktinobakterien, *Corynebacterium* und *Streptomyces*, ist der Regulationsmechanismus der Stickstoffassimilation aufgeklärt worden. In *Corynebacterium glutamicum* ist hierfür der Regulator AmtR verantwortlich (Beckers *et al.*, 2005; Burkovski, 2007). In *Streptomyces coelicolor* kontrolliert GlnR die Regulation der Gene für den Stickstoffmetabolismus (Wray *et al.*, 1991; Fink *et al.*, 2002; Tiffert *et al.*, 2008). Die Regulation der Nitratassimilation in *M. tuberculosis* wurde bisher noch nicht entschlüsselt.

Ziel dieses Teilprojektes war es, die Rolle von GlnR (kodiert von Rv0818) bei der Regulation der assimilatorischen Nitritreduktase NirBD zu klären.

4. Material und Methoden

4.1 Bakterienstämme

Die im Folgenden aufgeführten Bakterienstämme wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Bakterienstamm	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> HB101	Promega GmbH, Mannheim
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	ATCC 25618
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37RvΔRv1500	diese Arbeit
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37RvΔhddA	diese Arbeit
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37RvΔglnR	AG Bange, Medizinische Hochschule Hannover (MHH)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37RvΔglnR::pSMA37	diese Arbeit

Tabelle 1: Bakterienstämme

4.2 Plasmide und Vektoren

Die in Tabelle 2 und 3 aufgelisteten Plasmide und Vektoren wurden während dieser Arbeit hergestellt oder verwendet.

Plasmid	Selektionsmarker	Verwendungszweck, Besonderheiten	Herkunft
pSM32	Kanamycin	Plasmid beinhaltet <i>nirBD</i>	AG Bange, MHH
pSM74	Kanamycin	Plasmid beinhaltet Rv1500	AG Bange, MHH
pSMA7	Ampicillin, Hygromycin, <i>sacB</i>	Konstrukt zur Herstellung der <i>hddA</i> -Mutante	AG Bange, MHH
pSMA28	Hygromycin, Kanamycin, <i>sacB</i>	Konstrukt zur Herstellung der Rv1500-Mutante	diese Arbeit
pSMA37	Kanamycin	<i>nirBD</i> -Expressionsvektor	diese Arbeit

Tabelle 2: Plasmide

Vektor	repliziert in <i>E. coli</i>	repliziert in Mykobakterien	genomische Integration in Mykobakterien	Selektionsmarker	Herkunft
pMV261	ja	ja	nein	Hygromycin	Labor W. R. Jacobs, Albert Einstein College of Medicine (AECOM), New York
pYUB657	ja	nein	nein	Hygromycin, <i>sacB</i>	Labor W. R. Jacobs, AECOM, New York

Tabelle 3: Vektoren

4.3 Primer

In Tabelle 4 sind die Primer aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit in PCR-Reaktionen eingesetzt wurden.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
hddACoint3	agtcacctcacgaagaggc
hddACoint4	agacgtggaaccgtactcg
nirB-ANYF	ccggattcggcccagatc
nirB-ANYR	cttcagctcgcccttgg
nirBFus#1	tccggaggaatcactccgca-atg-cctacggctgggagttcg
nirBFus#2	gactcgatcgactcggtagcg
oriE1	ctgcgcgtaatctgctg
oriE2	ggtaactatcgtcttgagtc
pimFCoint1	tctgatcgactcagactgg
pimFCoint2	gaagaacaccgagctcacc
rrs-ANYF	gggtctctgggcagtaactg
rrs-ANYR	gtggactaccagggtatctaactcct
Rv0115 1	gtcaaccggaatctcgaacc
Rv0115 2	ccggtacgcgccaagtgc
Rv1500-1	cgctctcgatcgtaacg
Rv1500-2	ttcctcaaccaaccgccg
Rv1500_Seq#1	cctggatcgaacgagtcc
Rv1500_Seq#2	cttgacactgatcgagcg
261Fus#1	tggtggcatccgtggc
261Fus#2	cgcgaactcccagccgtagg-cat-tgcaagtgattcctcc

Tabelle 4: Primer

4.4 Nährmedien

4.4.1 Nährmedien für *Escherichia coli*

LB-Agar (1000 ml)

Es wurden 35 g LB-Agar abgewogen, in 1000 ml dest. H₂O gelöst und autoklaviert.

LB-Bouillon (1000 ml)

Es wurden 20 g LB-Basis in 1000 ml dest. H₂O gelöst und autoklaviert.

4.4.2 Nährmedien für *Mycobacterium tuberculosis*

Middlebrook 7H10-Agar (1000 ml)

19 g Middlebrook 7H10 Agar wurden in dest. H₂O gelöst. Das Volumen wurde so gewählt, dass nach der Zugabe der Supplemente ein Volumen von 1000 ml erreicht wurde. Dann wurde der 7H10-Agar autoklaviert und anschließend 0,5 % Glycerin und 10 % ADS oder OADC zugegeben.

Middlebrook 7H9-Bouillon (1000 ml)

4,7 g Middlebrook 7H9-Basis wurde in 900 ml dest. H₂O gelöst und nach Zugabe von 10 % ADS oder OADC, 0,05 % Tween 80 und 0,5 % Glycerin sterilfiltriert.

MB-Medium für Komplementationsversuch (Kapitel 5.3.1) (1000 ml)

784 ml (794 ml) dest. H₂O (Volumen in Klammern: Kontrolle ohne Zugabe von KNO₃)

100 ml Basic Salt Solution

2 ml Spurenelemente-Lösung

100 ml ADS

2,5 ml 20 % Tween 80

10 ml 1 M KNO₃ (für die Kontrolle keine Zugabe von KNO₃)

0,5 ml 1 M MgCl₂

0,5 ml 1 M CaCl₂

MB-Medium für Expressionsanalysen (Kapitel 5.3.2) (1000 ml)

829,5 ml dest. H₂O

100 ml Basic Salt Solution

2 ml Spurenelemente-Lösung
10 ml 50 % Glycerin
2,5 ml 20 % Tween 80
50 ml 20 % D-Glucose
5 ml 1 M KNO₃
0,5 ml 1 M MgCl₂
0,5 ml 1 M CaCl₂

4.4.3 Zusätze für Nährmedien

ADS (1000 ml)

8,1 g NaCl und 20 g Dextrose wurden in 950 ml dest. H₂O gelöst. Im Anschluss wurde portionsweise 50 g Rinderalbumin Fraktion V eingerührt und die Lösung sterilfiltriert.

OADC

Ölsäure/Albumin/Dextrose/Katalase-Supplement, Becton Dickinson

Basic Salt Solution (1000 ml)

10 g KH₂PO₄, 25 g Na₂HPO₄ und 20 g K₂SO₄ wurden nacheinander in 950 ml dest. H₂O gelöst und sterilfiltriert.

Spurenelemente-Lösung (1000 ml)

40 mg ZnCl₂, 200 mg FeCl₂ x 6H₂O, 10 mg CuCl₂ x 4H₂O, 10 mg MnCl₂ x 4H₂O, 10 mg Na₂B₄O₇ x 10H₂O, 10 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4H₂O wurden in 1000 ml dest. H₂O gelöst und sterilfiltriert.

Kongo-Rot

Kongo-Rot wurde in dest. H₂O gelöst, sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren 7H10-Agarplatten zugesetzt (100 µg ml⁻¹).

Antibiotika

Die in Tabelle 5 aufgeführten Antibiotika wurden zur Selektion in den angegebenen Konzentrationen den Nährmedien zugesetzt.

Antibiotikum	Konzentration im Medium [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	
	<i>E. coli</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Ampicillin	100	-
Hygromycin	50-100	50
Kanamycin	50	25

Tabelle 5: Antibiotika

4.5 Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer für die Southern Blot-Analyse:

10 × Blocking-Lösung (100 ml)

10 g Blocking-Reagenz wurden mit 100 ml Puffer 1 gemischt (entspricht 10 % (w/v)), autoklaviert und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert. Vor der Verwendung wurde die Lösung mit einem Magnetrührer durchmischt.

DNA I-Lösung (1000 ml)

Es wurden 87,7 g NaCl abgewogen, in 950 ml dest. H₂O gelöst und 50 ml einer 10 M NaOH-Stammlösung hinzugegeben. Die Lösung wurde autoklaviert.

DNA II-Lösung (1000 ml)

Es wurden 87,7 g NaCl abgewogen, in 500 ml einer 2 M Stammlösung Tris-HCl pH 7,5 gelöst und mit dest. H₂O auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde vor dem Gebrauch autoklaviert.

Hybridisierungslösung

Es wurden 500 ml einer Na₂HPO₄ Stammlösung pH 7,2, 350 ml einer 20%igen SDS-Stammlösung und 2 ml einer 0,5 M EDTA-Stammlösung pH 8,0 gemischt und mit dest. H₂O auf 1000 ml aufgefüllt.

Puffer 1 (1000 ml)

Es wurden 11,6 g Maleinsäure und 8,8 g NaCl in dest. H₂O gelöst, der pH-Wert mit NaOH-Plätzchen auf 7,5 eingestellt und mit dest. H₂O auf 1000 ml aufgefüllt. Dieser Puffer wurde autoklaviert.

Puffer 2 (1000 ml)

Zur Herstellung von Puffer 2 wurde die 10 × Blocking-Lösung 1:10 mit Puffer 1 verdünnt. In diesem Fall wurden 100 ml Blocking-Lösung mit 900 ml Puffer 1 gemischt.

Puffer 3 (1000 ml)

12,1 g Tris und 5,8 g NaCl wurden in dest. H₂O gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 9,5 eingestellt und mit dest. H₂O auf 1000 ml aufgefüllt. Anschließend wurde der Puffer autoklaviert.

20 × SSC-Puffer (1000 ml)

175,3 g NaCl und 88,3 g Natriumcitrat-Dihydrat wurden in ungefähr 800 ml dest. H₂O gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 7,4 eingestellt und mit dest. H₂O auf 1000 ml aufgefüllt. Daraufhin wurde der Puffer autoklaviert.

Waschpuffer (1000 ml)

Dieser Puffer setzt sich aus Puffer 1 und 0,3 % Tween 20 zusammen. Also wurden 1000 ml Puffer 1 mit 3 ml Tween 20 gemischt.

Wash-I-Lösung

Es wurden 2 ml einer 0,5 M EDTA-Stammlösung pH 8,0, 80 ml einer 0,5 M Na₂HPO₄-Stammlösung pH 7,2 und 250 ml einer 20%igen SDS-Stammlösung gemischt und mit dest. H₂O auf 1000 ml aufgefüllt.

Wash-II-Lösung (1000 ml)

Um diese Lösung anzusetzen wurden 2 ml einer 0,5 M EDTA-Stammlösung pH 8,0, 80 ml einer 0,5 M Na₂HPO₄-Stammlösung pH 7,2 und 50 ml einer 20%igen SDS-Stammlösung miteinander vermischt und mit dest. H₂O auf 1000 ml aufgefüllt.

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese:

10 × Ladepuffer (1 ml)

1 ml 10 × Ladepuffer ist ein Gemisch aus 0,1 ml Bromphenolblau (1 %), 0,1 ml Xylencyanol (1 %), 50 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 und 0,1 % SDS, das mit 50%igem

Glycerol auf 1 ml aufgefüllt wird. Nach dem gründlichen Mischen ist der Puffer für den Gebrauch bereit.

50 × TAE-Puffer (1000 ml)

242 g Tris wurden in dest. H₂O gelöst. Nach der Zugabe von 57 ml Eisessig und 100 ml 0,5 M EDTA-Stammlösung (pH 8,0) wurde mit dest. H₂O auf 1000 ml aufgefüllt. Anschließend wurde der Puffer autoklaviert. Der TAE-Puffer wurde für die Gel-Elektrophorese 1 × konzentriert eingesetzt.

Präparation genomischer DNA von Mycobacterium tuberculosis:

Lyse-Puffer

Diese Lösung setzte sich zusammen aus 25 mM Tris-HCl pH 9,5, 10 mM EDTA und 50 mM Glucose. Als Lösungsmittel diente dest. H₂O.

Cetrimid-Lösung

4,1 g NaCl wurden in 90 ml dest. H₂O gelöst. Unter Rühren wurden 10 g Cetrimide (Cetyltrimethylammoniumbromid) hinzugefügt.

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 1 M EDTA (pH 8,0). Der TE-Puffer wurde 1:10 mit dest. H₂O verdünnt.

Lipidextraktion:

PBS (1000 ml)

6,675 g Na₂HPO₄ und 6 g NaCl wurden zunächst in ungefähr 700 ml H₂O gelöst. 1,704 g KH₂PO₄ und 2 g NaCl wurden anschließend in etwa 200 ml H₂O gelöst, beide Ansätze vereint, der pH-Wert überprüft. Beziehungsweise auf pH 7,2 eingestellt, auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert.

Färbereagenz für die Dünnschichtchromatographie:

Färbung nach Hannessian

Es wurden 942 ml H₂O vorgelegt und unter Rühren mit 58 ml H₂SO₄, 1 g Ce(SO₄) × 4H₂O und 50 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ × 4H₂O versetzt.

Puffer für die RNA-Extraktion:

GTC-Puffer

5 M GTC, 0,5 % (w/v) *n*-Laurylsarkosin und 0,7 % (w/v) Natriumcitrat wurden in DEPC-H₂O gelöst, auf das gewünschte Volumen aufgefüllt und anschließend mit 0,7 % β-Mercaptoethanol versetzt.

Lösungen für die Microarray-Hybridisierung und Detektion der gebundenen cDNA:

12 × MES-Puffer (1000 ml)

64,61 g MES-Hydrat und 193,3 g MES-Natriumsalz wurden in 800 ml H₂O gelöst und das Volumen auf 1000 ml eingestellt. Der pH-Wert sollte zwischen 6,5 und 6,7 liegen. Anschließend wurde der Puffer durch einen 0,2 µm Filter filtriert.

2 × Hybridisierungslösung (50 ml)

8,3 ml 12 × MES-Puffer wurden mit 17,7 ml 5 M NaCl, 4,0 ml 0,5 M EDTA, 0,1 ml 10 % Tween 20 und 19,9 ml H₂O gemischt. Die Lagerung erfolgte vor Licht geschützt bei 4°C.

2 × Färbepuffer (250 ml)

41,7 ml 12 × MES-Puffer wurden mit 92,5 ml, 5 M NaCl, 2,5 ml 10 % Tween 20 und 113,3 ml H₂O gemischt und filtriert. Die Lösung wurde bei 4°C und vor Licht geschützt gelagert.

Wasch-Puffer A (1000 ml)

300 ml 20 × SSPE wurden mit 1,0 ml 10 % Tween 20 und 699 ml H₂O gemischt und filtriert.

Wasch-Puffer B (1000 ml)

83,3 ml 12 × MES-Puffer, 5,2 ml 5 M NaCl, 1,0 ml 10 % Tween 20 und 910,5 ml H₂O wurden zusammengegeben, gemischt und filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C und vor Licht geschützt.

Streptavidin-Lösung (400 µl)

200 µl 2 × Färbepuffer, 180 µl H₂O, 16 µl BSA (50 mg ml⁻¹) und 4 µl Streptavidin (1 mg ml⁻¹) wurden zusammenpipettiert und gemischt.

Antikörper-Lösung (400 µl)

200 µl 2 × Färbepuffer, 176 µl H₂O, 16 µl BSA (50 mg ml⁻¹), 4 µl Ziegen-IgG (10 mg ml⁻¹) und 4 µl biotinylierter Anti-Streptavidin Antikörper (0,5 mg ml⁻¹) wurden zusammenpipettiert und gemischt.

SAPE-Lösung (Streptavidin-Phycoerythrin) (400 µl)

200 µl 2 × Färbepuffer, 180 µl H₂O, 10 µl BSA (50 mg ml⁻¹) und 4 µl SAPE (1 mg ml⁻¹) wurden gemischt und vor Licht geschützt bis zur Verwendung aufbewahrt.

4.6 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Medium. Das Kulturvolumen richtete sich nach dem Verwendungszweck der Kultur und variierte zwischen 5 ml und 500 ml. Als Inokulum dienten Volumina von 10 µl bis 50 µl einer Stammkultur oder eine einzelne von einer Agarplatte überführte Kolonie. Wenn Resistenzgene im Bakterium vorhanden waren, wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator.

4.7 Kultivierung von *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis H37Rv und davon abgeleitete Deletionsmutanten wurden in der Regel in 7H9-Medium oder auf 7H10-Agarplatten unter S3-Bedingungen kultiviert. Flüssigkulturen bis 15 ml wurden in Vierkant-Kulturflaschen bei 80 rpm im auf 37°C temperierten Schüttelinkubator angezüchtet. Größere Volumina von 50 ml bis 100 ml wurden in Roll-Kulturflaschen in Roller-Einheiten bei etwa 20 rpm und 37°C kultiviert. Die Bebrütung von mit Aluminiumfolie eingewickelten Agarplatten erfolgte im Brutschrank bei 37°C für drei bis sechs Wochen. Die Inokula richteten sich nach dem Ausgangsmaterial, Kulturvolumen und den Maßgaben des Versuchs. Sofern ein Selektionsdruck bei der Kultivierung erforderlich war, wurde das Nährmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum beziehungsweise mit Saccharose versehen. Für Wachstums- und

Expressionsanalysen der Stoffwechselmutante wurde ein Minimalmedium mit definierter Stickstoffquelle verwendet.

4.8 Molekularbiologische Methoden

4.8.1 Präparation von DNA

4.8.1.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte meist mit Hilfe der kommerziell erhältlichen Puffer 1-3 der Firma QIAGEN®. Der Isolierung liegt folgendes Prinzip zugrunde: Hochmolekulare DNA denaturiert unter alkalischen Bedingungen irreversibel. Die niedermolekulare Plasmid-DNA kann dagegen bei Neutralisierung des Puffers renaturieren und durch Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Fällung mit Ethanol isoliert werden.

Zunächst wurden 2 × 1,5 ml einer 5 ml Übernachtskultur von *E. coli* für 5 min bei 10000 × *g* abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die geernteten Zellen mit 150 µl Resuspensionspuffer (QIAGEN® Puffer 1) resuspendiert. Nach der Zugabe von 150 µl Lysepuffer (QIAGEN® Puffer 2) wurde der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Neutralisierung des Ansatzes erfolgte durch die Zugabe von 150 µl Neutralisierungspuffer (QIAGEN® Puffer 3). Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis wurden die Zelltrümmer und Proteine bei 10000 × *g* für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, Volumenverhältnisse) extrahiert. Dafür wurden 450 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol hinzugegeben, der Ansatz mit dem Vortexer durchmischt und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte durch die Zugabe von 1 ml absoluten Ethanol und die Inkubation des Ansatzes für 30 min bei -70°C. Anschließend wurde die gefällte DNA bei 10000 × *g* für 5 min pelletiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 500 µl 70%igen Ethanol gewaschen, wieder 5 min bei 10000 × *g* zentrifugiert, der Überstand erneut verworfen und das Pellet getrocknet. Das Pellet wurde in 30-50 µl dest. H₂O aufgenommen.

4.8.1.2 Plasmid-Mini-Präparation mit dem NucleoSpin®Plasmid-Kit von Macherey-Nagel

Das Prinzip des Zellaufschlusses ist identisch mit dem der Plasmidpräparation aus 4.8.1.1. Es handelt sich um alkalische Lyse. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer und des SDS-Präzipitates wird die DNA jedoch an eine Silicamembran gebunden, Salze, lösliche zelluläre Komponenten und andere Verunreinigungen durch einen Waschschrift mit einem alkoholischen Puffer entfernt und schließlich die Plasmid-DNA mittels eines Elutionspuffers eluiert. Diese Plasmid-Präparation wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Es kann eine Ausbeute von bis zu 40 µg DNA erreicht werden.

4.8.1.3 Plasmid-Midi-Präparation mit dem GeneElute™-Kit von Sigma

Das GeneElute™-Kit von Sigma wurde verwendet, wenn eine größere Menge DNA gebraucht wurde, und die Kapazität der Säulen des Mini-Präparations-Kits von Macherey-Nagel nicht ausreichte. Die Plasmid-Isolierung erfolgt analog der Mini-Präparation. Es wurden 40 ml einer *E. coli* Übernachtskultur eingesetzt. Die Plasmid-DNA wurde mit 1 ml Elutionspuffer eluiert. Das Volumen wurde anschließend in der Vakuum-Heizzentrifuge eingeeengt. Es können bis zu 300 µg DNA pro Präparation gewonnen werden. Es wurde das Protokoll des Herstellers befolgt.

4.8.1.4 Präparation genomischer DNA von Mycobacterium tuberculosis

Dieses Verfahren zur Präparation genomischer DNA von *M. tuberculosis* erlaubt die Extraktion qualitativ hochwertiger genomischer DNA. Diese DNA ist dazu geeignet zum Beispiel Southern-Blot Analysen durchzuführen, ist aber zeitaufwendiger als die Verfahren, die unter 4.8.1.5 und 4.8.1.6 aufgeführt sind.

Als Ausgangsmaterial für diese Präparation dienten 10 ml *M. tuberculosis*-Kultur, die zunächst für 10 min abgekocht wurden. Dann wurde die Suspension für 20 min bei $1982 \times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 1 ml Lyse-Puffer resuspendiert und der Ansatz auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Anschließend wurden die Ansätze für 10 min bei $15000 \times g$ zentrifugiert, die Überstände verworfen, die Pellets in je 225 µl Lyse-Puffer resuspendiert und 25 µl Lysozym (10 mg ml^{-1} in TE-Puffer) hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 80 rpm im Schüttelinkubator für 16 bis 20 Stunden über Nacht. Dann wurde den

Ansätzen 50 µl 10 % SDS und 25 µl Proteinase K (10 mg ml⁻¹) zugesetzt, jeweils durch Schwenken gemischt und bei 55°C im Heizblock für 40 min inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde den Proben 100 µl 5 M NaCl und 80 µl auf 65°C vorgewärmte Cetrimid-Lösung zugesetzt. Daraufhin folgten ein weiterer Inkubationsschritt von 10 min bei 65°C im Wasserbad und anschließend die Zugabe von 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v). Die Ansätze wurde dann für 5 min bei 15000 × g zentrifugiert und die wässrige Phase (ca. 450 µl) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurde diese Extraktion mit je 450 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) wiederholt und die wässrigen Phasen vereint. Dann wurde die DNA aus der wässrigen Phase mit 280 µl Isopropanol für mindestens 5 min bei etwa 22°C gefällt und die DNA für 10 min bei 15000 × g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, für 5 min bei 15000 × g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei 37°C getrocknet. Die DNA wurde dann bei 4°C für 16 bis 20 Stunden in 25 µl dest. H₂O gelöst. Es wurde bei dieser Präparation immer durch vorsichtiges Schwenken gemischt, um intakte genomische DNA zu erhalten.

4.8.1.5 Präparation genomischer DNA mit Glasbeads für die PCR

Bei dieser Präparation wurden die bakteriellen Zellen 10 min abgekocht und anschließend mit Glasbeads (212-300 microns) (Sigma-Aldrich) in einer Kugelmühle aufgeschlossen. Nach der Inaktivierung von 1 ml Kultur wurde die Bakteriensuspension für 10 min bei 15000 × g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 100 µl dest. H₂O resuspendiert und ca. 60 µl der Glasbeads hinzugefügt. Der Zellaufschluss erfolgte bei 30 Hz für 1 min. Anschließend wurden die Glasbeads sowie die Zelltrümmer bei 15000 × g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

4.8.1.6 Hitzeextraktion genomischer DNA für die PCR

Wenn auch eine geringere DNA-Ausbeute für die nachfolgenden Analysen ausreichend war, wurde die Extraktion durch Hitze durchgeführt. Dazu wurde 1 ml der Bakteriensuspension 10 min abgekocht, 5 min bei 15000 × g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, erneut abgekocht und Aliquots des Überstandes in PCR-Reaktionen als Matrize eingesetzt.

4.8.2 Restriktionsspaltung

Restriktionsspaltungen wurden durchgeführt, um präparierte DNA zu identifizieren, zu charakterisieren und für Klonierungen zu fragmentieren. Um die Identität von DNA zu kontrollieren, wurden 2-5 μl DNA einer Plasmid-Präparation in einen Restriktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 15-25 μl eingesetzt. Weiter wurden 1-2 u Enzym sowie der entsprechende Puffer und gegebenenfalls BSA hinzugefügt. Das Gesamtvolumen wurde durch die Zugabe von dest. H_2O erreicht. In präparativen Ansätzen wurde bis zu 4 μg DNA und mindestens 1 u pro 1 μg DNA eingesetzt. Insgesamt überschritt das Enzymvolumen nie 10 % des Gesamtvolumens. Das Gesamtvolumen betrug maximal 50 μl . Die Ansätze wurden mindestens für 1 Stunde bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert.

4.8.3 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Gel-Elektrophorese werden DNA-Fragmente ihrer Größe und Ladung nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Entscheidend ist die Siebstruktur der Agarose, die kleineren Fragmenten einen geringeren Widerstand bietet. Der Trennbereich eines 1%igen Agarose-Gels liegt bei 0,5 kb bis 7 kb. Es wurden Agarosekonzentrationen von 0,8 % bis 1,2 % eingesetzt. Die DNA migriert aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode.

Um ein 1%iges Agarosegel herzustellen, wurde 1 g Agarose in 100 ml 1 \times TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und in eine Gießvorrichtung gegossen. Die Proben wurden mit Ladepuffer versehen und bei einer Spannung von 12 V cm^{-1} aufgetrennt. Das Gel war in der Gelkammer stets von 1 \times TAE-Puffer bedeckt. Die Laufzeit betrug meist 60 Minuten. Es wurde immer ein Größenstandard aufgetragen. Nach dem Lauf wurde die DNA mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid gefärbt und anschließend die Hintergrundfärbung durch eine Entfärbung im Wasserbad minimiert. Die Detektion der Banden und die Dokumentation erfolgten unter UV-Licht.

4.8.4 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

4.8.4.1 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Nach der Elektrophorese und dem Färben des Agarose-Gels konnte die gewünschte Bande mittels eines Größenstandards identifiziert und auf dem UV-Tisch mit einem Skalpell ausgeschnitten werden.

Die Aufreinigung erfolgte mit dem NucleoSpin[®] Extract II-Kit von Macherey-Nagel. Dabei wird das Gelstück in einem Puffer mit chaotropen Salzen (Puffer NT) bei 50°C aufgelöst und der Ansatz über eine Silicamembran gereinigt. Nach einem Waschschriff und dem Trockenzentrifugieren der Säule wurde die DNA eluiert. Es wurde das Protokoll des Herstellers befolgt.

4.8.4.2 Aufreinigen von DNA aus Lösungen

Auch zum Aufreinigen von PCR-Amplifikaten und zum Aufreinigen und Umpuffern von Restriktionsansätzen und anderen enzymatischen Reaktionsansätzen wurde das NucleoSpin[®] Extract II-Kit von Macherey-Nagel verwendet. Es wurde der Probe direkt Puffer NT im Verhältnis 2:1 zugesetzt. Dann wurde der Ansatz wie unter 4.8.4.1 beschrieben behandelt. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

4.8.5 Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA

Die Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA wird durchgeführt um die Religation des Vektors ohne die Aufnahme des Inserts zu verhindern. In dieser Arbeit wurde dazu die Antarctic Phosphatase genutzt.

Beispiel für einen Reaktionsansatz:

50 µl DNA

6 µl Antarctic Phosphatase Puffer (10 ×)

1 µl Antarctic Phosphatase (5 u)

1 µl Antarctic Phosphatase (5 u) nach 15 min Inkubation bei 37°C

2 µl dest. H₂O

Insgesamt wurde der Ansatz 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Reaktion wurde durch eine Inkubation des Ansatzes für 5 min bei 65°C gestoppt.

4.8.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

4.8.6.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die DNA wurde 1:30 mit dest. H₂O verdünnt. Der Leerwert wurde mit dest. H₂O festgelegt. Die Messung erfolgte bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum für DNA, bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum für Proteine und bei 320 nm. Das Verhältnis E_{260}/E_{280} und die Extinktion bei 320 nm sind ein Maß für die Reinheit der DNA. Die Formel zur Berechnung der Konzentration lautet:

$$c [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times V \times F$$

V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor (50 für doppelsträngige DNA)

4.8.6.2 Konzentrationsbestimmung mittels Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Konzentrationsbestimmung mittels eines Agarose-Gels wurde das Gel mit 5 µl eines Massenstandards und Aliquots der Proben beladen. Des Weiteren wurde wie unter 4.8.3 beschrieben verfahren.

4.8.7 Ligation

Man unterscheidet zwischen Ligationen von DNA mit stumpfen und mit kohäsiven Enden.

Die einzusetzende Menge Insert-DNA wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Masse Insert [ng]} = \text{Masse Vektor [ng]} / \text{Faktor} \times 5 \text{ (bzw. 3)}^*$$

(für die Ligation mit kohäsiven Enden)*

$$\text{Faktor} = \text{Vektorgröße [kb]} / \text{Insertgröße [kb]}$$

Das Gesamtvolumen eines Ligationsansatzes betrug immer 20 µl. Es wurden 1 µl T4-Ligase [400 u] und 2 µl T4-Ligase-Puffer, die entsprechenden Volumina Vektor und Insert sowie gegebenenfalls dest. H₂O eingesetzt. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 22°C, aber auch bis zu etwa 16 Stunden bei 16°C inkubiert.

4.8.8 Glykogenfällung

Bei der Glykogenfällung wurde die DNA des Ligationsansatzes gereinigt und ankonzentriert. Zunächst wurde der Ligationsansatz kurz zentrifugiert, 80 µl dest. H₂O und 100 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) hinzugegeben und gemischt. Es folgte die Zentrifugation des Ansatzes bei 10000 × g für 5 min. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Phenolphase erneut 50 µl dest. H₂O pipettiert und gemischt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 5 min bei 10000 × g wurden beide wässrigen Phasen vereint. Die Fällung wurde mit 15 µl 5 M NaCl, 15 µl dest. H₂O, 2 µl Glykogen und 540 µl absoluten Ethanol durchgeführt. Es wurde 15 min bei 10000 × g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 250 µl 70%igen Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in der Vakuum-Heizzentrifuge getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 6 µl dest. H₂O aufgenommen. Es wurden für die Transformation 2 µl verwendet.

4.8.9 Herstellung elektrokompenter *Escherichia coli*

500 ml LB-Medium wurden mit 2,5 ml einer 5 ml *E. coli* HB101 Übernachtskultur beimpft. Die Kultur wurde bei 37°C in einem Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Dann wurde die Kultur für 15 min auf Eis gestellt. Der Kolben wurde zwischendurch geschwenkt. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden in der auf 4°C gekühlten Zentrifuge bei 3000 × g für 20 min geerntet. Danach wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem dest. H₂O gewaschen. Dann wurden die Bakterien jeweils wieder bei 3000 × g für 20 min pelletiert. Der dritte Waschschrift wurde mit 10%igem Glycerol durchgeführt. Nach der Zentrifugation wurden die Bakterien in 10%igem Glycerol aufgenommen und aliquotiert. Die elektrokompenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70°C gelagert.

4.8.10 Transformation von DNA in *Escherichia coli* mittels Elektroporation

Die elektrokompenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und Elektroporationsküvetten vorgekühlt. Es wurden 50 µl kompetente *E. coli* und 2 µl DNA, die durch eine Glykogenfällung konzentriert und gereinigt wurde, gemischt und luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wurde bei

2,5 kV, 400 Ω und 25 μ F durchgeführt. Danach wurden die Zellen sofort in 1 ml LB-Medium ohne Zusätze aufgenommen und 1 Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Dieser Schritt dient der Expression der Resistenzgene. Dann erfolgte das Ausplattieren auf Agarplatten, denen das entsprechende Antibiotikum zugesetzt wurde. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

Der Vektor ohne Insert diente als Positivkontrolle, Zellen ohne DNA als Negativkontrolle und dephosphorylierter Vektor als Kontrolle für die Häufigkeit von Religationsereignissen. Es wurden 2 μ l der Religationskontrolle transformiert.

4.8.11 Transformation von DNA in *Mycobacterium tuberculosis* mittels Elektroporation

Für die Elektroporation von *M. tuberculosis* wurden 300 bis 1000 ng in dest. H₂O gelöste DNA verwendet. In der Regel wurden Kulturen von 70 ml in Roller-Kulturflaschen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 1,0 bei 37°C inkubiert, für 10 min bei 1982 \times g geerntet, dreimal mit dem Ausgangsvolumen sterilem 10%igem Glycerin gewaschen und anschließend das Bakterienpellet in einem Zehntel des Ausgangsvolumens 10%igem Glycerin resuspendiert. Ein zusätzlicher Hitzeschock verbessert die Transformationseffizienz. Daher wurden die Elektroporationsküvetten im Heizblock auf 50°C vorgeheizt. 400 μ l der Bakteriensuspension wurden mit DNA versetzt, in die Elektroporationsküvetten pipettiert und für 1 min bei 50°C inkubiert. Danach erfolgte die Elektroporation bei 2,5 kV, 1000 Ω und 25 μ F. Um die Transformationseffizienz und die Qualität der Transformation abschätzen zu können, wurden als Positivkontrolle ein entsprechender Vektor und als Negativkontrolle ein Ansatz ohne die Zugabe von DNA transformiert. Die Bakterien wurden sofort in 1 ml 7H9-Medium überführt und für 16 bis 24 Stunden bei 37°C im Schüttelinkubator bei 80 rpm inkubiert. Anschließend wurden etwa 400 μ l des Kulturüberstandes verworfen und 700 μ l der Transformationsansätze auf 7H10-Agarplatten ausplattiert, die entweder mit dem passenden Antibiotikum oder Saccharose versehen waren. Von der Positivkontrolle wurden in der Regel zusätzlich Verdünnungen ausplattiert. Nach etwa vier Wochen konnten die Platten begutachtet und gegebenenfalls Klone in Kultur genommen werden.

4.8.12 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der PCR können bestimmte DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Es werden Primer, eine DNA-Matrize, dNTPs sowie eine Polymerase und der entsprechende Puffer benötigt. Es wurde die *Taq*- oder *Pfu*-Polymerase benutzt. Das typische PCR-Programm besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt. Die Annealingtemperatur lag in dem Bereich von 4°C unter der Schmelztemperatur der Primer bis maximal zu der Temperatur, die der Schmelztemperatur entsprach. Bei Primern mit einer Länge um 20 bp kann man näherungsweise die Schmelztemperatur mit folgender Formel bestimmen:

$$T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$$

Die PCR-Ansätze wurden in einem Reinraum zusammenpipettiert.

Beispiel für einen Ansatz (50 µl):

0,5 µl Primer 1 (1 pM)

0,5 µl Primer 2 (1 pM)

2,5 µl dNTPs (0,2 mM)

5 µl Reaktions-Puffer (10 ×)

0,25 µl *Taq*-Pol (1,25 u) (alternativ: 1 µl Turbo-*Pfu*-Polymerase (2,5 u))

x µl DNA

x µl dest. H₂O

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	94°C	2 min	1 Zyklus
Denaturierung	94°C	1 min	
Annealing	T _m weniger 0°C bis 4°C	2 min	35 Zyklen
Elongation	72°C	ca. 1 min/1 kb	
Finale Elongation	72°C	2 min	1 Zyklus

4.8.13 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden nach Sanger durchgeführt. Dieses Verfahren basiert auf einer Kettenabbruch-Polymerisierung, die durch die Zugabe von unterschiedlich markierten Didesoxyribonukleotidtriphosphaten (ddNTP) herbeigeführt wird. In dem

Ansatz sind ebenfalls Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP), DNA, Primer und eine DNA-Polymerase enthalten. Die Auftrennung der unterschiedlich langen, je nach endständiger Base unterschiedlich markierten Fragmente, erfolgt mit einer Auflösung von einem Nukleotid durch ein langes denaturierendes Polyacrylamid-Gel.

In der Regel wurden in einen 10 µl Sequenzierungsansatz bis zu 100 ng DNA, 10 pmol des Sequenzierungsprimers, 1 µl Big Dye[®]-Reaktionsgemisch (Applied Biosystems) und ein entsprechendes Volumen H₂O eingesetzt. Dann wurden die Ansätze in einem Thermocycler bei folgendem Programm inkubiert:

95°C	1 min	1 Zyklus
95°C	10 sec	
51°C	5 sec	25 Zyklen
60°C	4 min	
15°C		

Anschließend wurden die Sequenzierungsansätze mit den CentriSep Spin Columns von Princeton Separation nach Herstellerangaben aufgereinigt. Von dem Eluat wurden meist 5 µl mit 35 µl H₂O gemischt und für die Sequenzierung verwendet.

In einigen Fällen wurde von diesem Protokoll abgewichen, beziehungsweise es wurde erweitert. Wenn eine genomische Zielsequenz bestimmt werden sollte, wurde zunächst eine PCR-Reaktion zur Amplifikation der Matrize der späteren Sequenzierung durchgeführt. Mit dem Produkt wurde dann nach der Auftrennung im Agarose-Gel und einer Gelextraktion wie zuvor beschrieben verfahren. Zirkuläre Plasmide wurden gegebenenfalls mittels eines Restriktionsenzym linearisiert. Bei Bedarf wurden die linearisierten Plasmide nach der Agarose-Gelaufreinigung durch eine Glykogenfällung ankonzentriert und dann in die Didesoxy-Markierungsreaktion eingesetzt.

4.8.14 Herstellung, Markierung und Quantifizierung einer Hybridisierungssonde

Die Hybridisierungssonden wurden mit Hilfe der von der Firma MWG-Biotech AG synthetisierten Primerpaare mittels PCR amplifiziert. Als Matrize diente genomische DNA von *M. tuberculosis* H37Rv. Nach der Überprüfung durch Agarose-Gelelektrophorese wurden die Amplifikate mit dem NucleoSpin[®] Extract II-Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt.

Die Markierung wurde mit dem DIG DNA Labeling and Detection-Kit von Boehringer Mannheim durchgeführt. Die DNA wurde in kochendem Wasser 10 min denaturiert und danach sofort auf Eis gestellt. Auf Eis wurden 2 µl Hexanukleotid-Mix, 2 µl DIG-Markierungs-Mix und 1 µl Klenow-Enzym hinzugefügt. Die Markierungsreaktion erfolgte über Nacht bei 37°C. Am nächsten Tag wurde die Reaktion durch die Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA gestoppt. Anschließend wurde die Sonde mit 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl 96 % Ethanol bei -20°C gefällt. Nach der Zentrifugation bei 11000 × g für 15 Minuten wurde das Pellet mit 50 µl 70 % Ethanol gewaschen, 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet getrocknet. Die Sonde wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

Das Prinzip dieser Markierung beruht auf dem Einbau von dUTP, an das das Steroidhaptan Digoxigenin (DIG) gekoppelt ist. Diese Reaktion wird katalysiert durch das Klenow-Enzym, das die Hexanukleotide als Primer nutzt (*random primed*). Die Detektion erfolgt durch Chemilumineszenz. Dabei bindet ein Anti-Digoxigenin-Antikörper an die markierte Sonde. An den Antikörper ist das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt. Unter alkalischen Bedingungen dephosphoryliert das Enzym das zugegebene Substrat CSPD[®] zu einem instabilen Zwischenprodukt, das unter Lichtemission zu einem stabilen Endprodukt zerfällt. Diese Lichtemissionen können auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden. Quantifiziert wurde die Markierung der Sonde, indem die Sonde unverdünnt und in den Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 und 1:100000 auf eine Nylonmembran aufgetragen wurde. Es wurde jeweils 1 µl aufgetupft. Als Referenz-DNA diente markierte DNA aus dem Kit. Sie lag in den Konzentrationen 1 ng µl⁻¹, 0,1 ng µl⁻¹, 10 pg µl⁻¹, 1 pg µl⁻¹ und 0,1 pg µl⁻¹ vor. Es wurde auch jeweils 1 µl auf die Membran pipettiert. Die Entwicklung der Membran erfolgte analog dem Protokoll zur Entwicklung von Nylonmembranen bei Southern Blot-Analysen. Die Quantifizierung ermöglicht eine Dosierung der Sonde bei Hybridisierungsreaktionen. Vor jeder Hybridisierung muss die Sonde durch Aufkochen und Abkühlen denaturiert werden. Die Sonden wurden bei -20°C gelagert und konnten mehrfach verwendet werden.

4.8.15 Southern Blot

Der Southern Blot dient dazu, DNA-Fragmente, die mittels Gelelektrophorese entsprechend ihrer Länge getrennt wurden, auf einer Membran zu fixieren, um später

durch Hybridisierung mit markierten Sonden einzelne DNA-Fragmente spezifisch nachweisen zu können.

Der erste Schritt bestand darin, die zu untersuchende DNA in einem Restriktionsverdau zu schneiden und in einem Agarose-Gel aufzutrennen. Bei der Fotodokumentation des gefärbten Gels wurde ein Zentimetermaßstab, der bündig auf Höhe der Taschen abschloss, mit aufgenommen. Der Maßstab dient der späteren Identifizierung der Hybridisierungssignale. Das Agarosegel wurde dann 30 min in DNA I-Lösung geschwenkt. Die DNA I-Lösung denaturiert die DNA. Nach dem Spülen des Gels mit Wasser wurde es 30 min in DNA II-Lösung neutralisiert. Die DNA wurde mittels eines Vakuumblottes auf eine Nylonmembran transferiert. Die mit $2 \times$ SSC-Puffer angefeuchtete Membran wurde in die Blot-Vorrichtung gelegt. Eine Folie dichtete die Ränder ab. Das Gel wurde luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Um das Gel herum wurde $2 \times$ SSC-Puffer verteilt. Auf das Gel wurde $20 \times$ SSC-Puffer gegossen. Der Transfer wurde bei 600 mbar durchgeführt und war nach 90 min beendet. Vor dem Abbau des Blots wurde die Position der Taschen des Gels als auch die Orientierung der Membran markiert. Anschließend wurde die DNA durch UV-Bestrahlung (*crosslinken*) auf der Membran fixiert. Dann wurde die Membran mit 20 ml Hybridisierungspuffer pro 100 cm^2 bei 65°C prähybridisiert um den Hintergrund zu eliminieren, der durch unspezifische Bindung der Sonde an die Nylonmembran entsteht. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 65°C durchgeführt. 2,5 ml Hybridisierungslösung pro 100 cm^2 Membranfläche wurden mit der entsprechenden Sonde versetzt, und in das Hybridisierungsrohr gegeben. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal 30 min mit Wash I-Lösung und zweimal 30 min mit Wash II-Lösung gewaschen. Im Anschluss an die Hybridisierung wurde mit der Chemilumineszenzdetektion begonnen. Im Schüttelwasserbad wurde die Membran zunächst 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Dann wurde sie 30 min in Puffer 2 geschwenkt und 30 min mit 50 ml pro 100 cm^2 Puffer 2 mit DIG-AP-Konjugat, 1:10000 verdünnt, inkubiert. Nach drei zehnminütigen Waschschritten mit Waschpuffer wurde die Membran schließlich für 5 min in Puffer 3 äquilibriert. Dann wurde die Membran in Folie eingeschweißt. Eine Seite blieb offen, um 6 bis 8 Tropfen CSPD hineingeben zu können. Die Flüssigkeit wurde auf der Membran verrieben und der Ansatz etwa 7 min im Dunkeln inkubiert. Dann wurde die überschüssige Flüssigkeit herausgedrückt, die Membran vollständig eingeschweißt und 15 min bei 37°C inkubiert. In einer Filmkassette wurde ein Röntgenfilm auf die

Membran gelegt. Die Expositionszeit war variabel und richtete sich nach der erwarteten Stärke des Hybridisierungssignals. Nach der Exposition wurde der Film entwickelt.

4.8.16 Generierung der Deletionsmutanten von *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

4.8.16.1 Levansucrase-vermittelte Negativselektion für intrachromosomale Rekombination

Die Generation von Deletionsmutanten von *M. tuberculosis* erfolgt im Wesentlichen in zwei Schritten. Grundlage hierfür ist die homologe Rekombination zwischen dem das inaktivierte Gen flankierenden etwa 1000 bp des transformierten Vektors und den homologen Sequenzen neben dem Wildtyp-Genort. Aufgrund der geringen Transformations- und Rekombinationseffizienz dieses Mikroorganismus liegt die Wahrscheinlichkeit eines Doppel-Crossover-Ereignisses bei ungefähr 1×10^{-6} . Daher wird zunächst für die Integration des Vektors selektiert und in einem zweiten Schritt dann für die intrachromosomale Rekombination, bei der schließlich das Wildtyp-Gen gegen das deletierte ausgetauscht wird.

Die zur Herstellung von Deletionsmutanten transformierten Konstrukte besitzen die Selektionsmarker Hygromycin-Resistenz und das *sacB*-Gen. Des Weiteren enthalten sie ein deletiertes Gen sowie flankierende Wildtypsequenzen. Es fehlt ihnen ein Replikationsursprung für Mykobakterien (*oriM*). Das *sacB*-Gen codiert für das Enzym Levansucrase von *Bacillus subtilis*. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse von Saccharose und die Synthese von Levanen, Fruktose-Polymeren mit einem hohen Molekulargewicht. Die Levane sind toxisch für zum Beispiel *E. coli*, *Corynebacterium glutamicum* und auch für Mykobakterien. Das *sacB*-Gen kann unter dem Promotor von *Bacillus subtilis* in Mykobakterien exprimiert werden, und ermöglicht so die Nutzung des *sacB*-Gens als negativen Selektionsmarker in *M. tuberculosis* (Pelicic *et al.*, 1996).

Daher wurde nach der Transformation zunächst auf Hygromycin-haltigen 7H10-Agarplatten für die Integration des Konstruktes selektiert. Von solchen Platten in Kultur genommene Klone wurden dann ohne weiteren Selektionsdruck kultiviert. Hierbei kommt es zur intrachromosomalen Rekombination und damit auch zur Ausschleusung des Wildtyp-Gens und der Vektorsequenz aus dem Chromosom.

Aliquots dieser Kulturen wurden dann seriell verdünnt, auf Agarplatten mit 2 % Saccharose ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Bei diesem Schritt wird gegen das Vorhandensein des *sacB*-Gens, und damit der Vektorsequenzen, selektiert. Die Möglichkeit einer Mutation im *sacB*-Gen wird durch die Überprüfung der Hygromycinsensitivität der Klone ausgeschlossen. Dafür wurden Klone, die auf Saccharose-haltigen Nährböden wachsen können, auf 7H10-Platten ohne und mit Hygromycin überführt. Bei diesem *Screening*-Verfahren wurden Klone, die sensitiv gegenüber Hygromycin waren, für die weitere Analyse des Genotyps ausgewählt, das heißt in Kultur genommen, und die genomische DNA präpariert.

4.8.16.2 Generierung der Rv1500-Deletionsmutante

Die Vektoren pSM74 und pYUB657 dienten als Ausgangsmaterial für die Klonierung der Selektionsmarker Hygromycin-Resistenz und *sacB*. Diese Vektoren standen zur Beginn der Arbeiten in der Arbeitsgruppe zur Verfügung. Rv1500 wurde aus einer Cosmid-Bibliothek von *M. tuberculosis* H37Rv (Bange *et al.*, 1999) isoliert. Von dem Cosmid wurde ein 3925 bp umfassendes *Bam*HI/*Bgl*II-Fragment subkloniert und mit *Bgl*II und *Psh*AI enzymatisch deletiert. Nach der Subklonierung wurde Rv1500 durch eine Sequenzierung überprüft. Die Deletion mit *Bgl*II und *Psh*AI umfasst 321 bp und verursacht keine Verschiebung des Leserahmens. Bei diesem Konstrukt handelt es sich um pSM74. Zur Generierung der Deletionsmutante musste dieser Vektor im Folgenden mit den Selektionsmarkern Hygromycin-Resistenz und dem Gen für die Levansucrase versehen werden. Daher wurde ein *Xba*I-Fragment aus pYUB657 in die *Xba*I-Schnittstelle von pSM74 kloniert. Der resultierende Vektor wurde pSMA28 genannt und in *M. tuberculosis* H37Rv transformiert. Die Selektion auf Hygromycin-haltigen Nährböden brachte mehrere Klone hervor, in denen ein Single-Crossover stattgefunden hatte. Die Integration von pSMA28 in das Chromosom über homologe Rekombination wurde durch eine PCR-Analyse mit dem Primer-Paar pimFCoint1 und 2 und Southern Blot Hybridisierung mit einer Sonde überprüft, die mit Hilfe der Primer Rv1500-1 und Rv1500-2 amplifiziert wurde. Die Inkubation der Kointegranen ohne Selektionsdruck, das Ausplattieren auf Saccharose-haltigen 7H10-Agarplatten, sowie das Screening auf Sensitivität gegenüber Hygromycin resultierte in der Isolierung von Klonen, in denen intrachromosomale Rekombination stattgefunden hatte. Die erfolgreiche Deletion von Rv1500 wurde durch die PCR mit den Primern pimFCoint1

und 2 sowie Southern Blot mit der mit Rv1500-1 und -2 amplifizierten Sonde und *Sma*I-verdauter genomischer DNA nachgewiesen.

4.8.16.3 Generierung der *hddA*-Deletionsmutante

Der Vektor pSMA7, dessen Klonierung bereits zu Beginn der Arbeit abgeschlossen war, stellte sowohl das deletierte Gen *hddA* inklusive eines flankierenden Bereiches zur homologen Rekombination als auch die zuvor schon erwähnten Selektionsmarker zur Generierung einer *M. tuberculosis* Deletionsmutante bereit. Wie auch Rv1500 wurde *hddA* aus einer Cosmid-Bibliothek von *M. tuberculosis* H37Rv isoliert. Dann wurde ein 4153 bp umfassendes *EcoRV/Scal*-Fragment aus dem Cosmid pSMA23 herausgeschnitten und in den mit *EcoRV* geöffneten pBSK-Vektor kloniert. Anschließend erfolgte die Deletion mit den Restriktionsenzymen *Aat*II und *Stu*I (Vektor pSMA5). Die Deletion umfasst 612 bp, ist *in frame* und wurde durch eine Sequenzierung bestätigt. Daraufhin wurde das *sacB*-Gen und die Hygromycin-Resistenz des pYUB657 mittels eines *Bam*HI/*Spe*I-Fragments auf den mit *Bam*HI und *Spe*I geschnittenen pSMA5 übertragen. Daraus resultierte das Konstrukt pSMA7, das in *M. tuberculosis* H37Rv transformiert wurde. Die chromosomale Integration von pSMA7 sowie anschließend die erfolgreiche Deletion von *hddA* auf dem Chromosom von *M. tuberculosis* H37Rv wurde durch die PCR-Analyse mit den Primern *hddA*Coint3 und 4 und einen Southern Blot mit einer *hddA*-spezifischen Sonde, die mit dem Primer-Paar Rv0115 1 und 2 amplifiziert wurde, nachgewiesen.

4.8.17 Klonierung von *nirBD* unter einen heterologen Promoter durch Fusions-PCR

Um eine GlnR-unabhängige Expression von *nirBD* zur Komplementierung des Phänotyps der *glnR*-Deletionsmutante zu gewährleisten, musste *nirBD* unter einen konstitutiv exprimierten heterologen Promoter kloniert werden. Es wurde die Fusions-PCR als Methode gewählt, weil es damit möglich war, die Expression von *nirBD* vom ursprünglichen Startcodon des *hsp60*-Gens beginnen zu lassen.

Es wurden daher Primer zur Amplifikation eines Teilbereiches von *nirB* mit 5'-Überhängen entworfen, die komplementär zu dem an das Startcodon des *hsp60*-Gens des mykobakteriellen Expressionsvektors pMV261.hyg angrenzenden 5'-regulatorischen Bereich waren. Ferner wurden Primer zur Amplifikation des *hsp60*-Promoterbereiches eingesetzt, die 5'-Überhänge besaßen. Diese umfassten die ersten 23 Basenpaare von *nirB*. Die PCR mit dem Primer-Paar 261Fus#1 und 261Fus#2 und dem Vektor pMV261.hyg als Matrize resultierte in einem Amplifikat von 446 bp, während die PCR mit dem Primer-Paar nirBFus#1 und nirBFus#2 mit pSM32 als Matrize 711 bp von *nirB* inklusive des Startcodons und des Überhangs amplifizierte. Die Produkte dieser Reaktionen wurden zugleich als Primer und Matrize in einer PCR zusammen mit den terminalen Primern 261Fus#1 und nirBFus#2 eingesetzt. Das Fusions-Produkt von 1116 bp umfasst natürliche interne *KpnI*-Schnittstellen von *nirB* und dem 5'-regulatorischem Bereich des *hsp60* und wurde mit

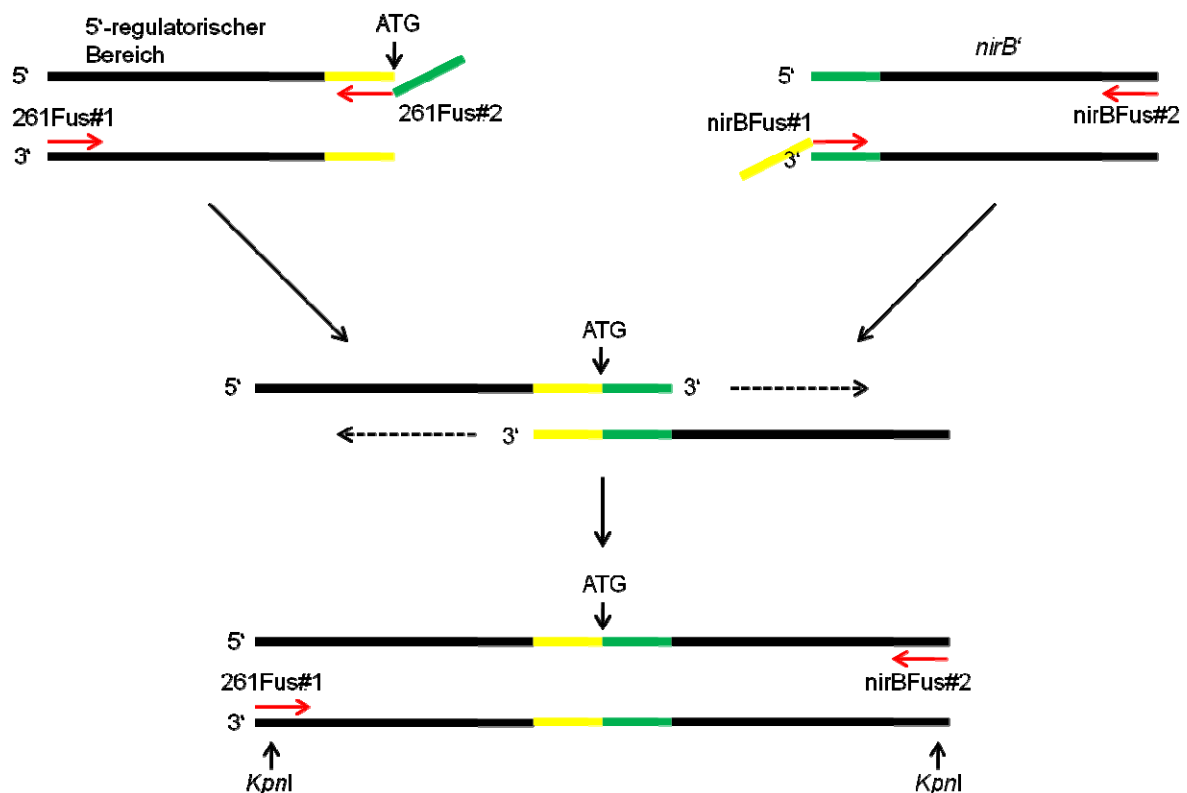


Abbildung 5: Fusions-PCR

In einer ersten PCR wurde der 5'-regulatorische Bereich von *hsp60* des PMV261.hyg-Vektors mit den Primern 261Fus#1 und 261Fus#2 amplifiziert. Dabei wurden durch 261Fus#2 Bereiche komplementär zu den ersten Basen von *nirB* generiert. Nach dem gleichen Prinzip wurde ein Teil von *nirB* mit komplementären Bereichen zu dem Promoterbereich amplifiziert. Die Produkte wurden in einer Fusions-PCR als Matrize eingesetzt, bei der es zur Hybridisierung der komplementären Überhänge kommt, und die DNA-Polymerase die freien 3'-Enden zur Initiierung der DNA-Synthese nutzt. Mit Hilfe der terminalen Primer 261Fus#1 und nirBFus#2 konnte in dieser letzten Reaktion das Fusionskonstrukt in ganzer Länge amplifiziert werden. Das Resultat ist, dass das Start-Codon des *hsp60* identisch mit dem des *nirB* ist.

KpnI verdaut und in den mit *KpnI* geöffneten pSM32 kloniert. Abbildung 5 zeigt das allgemeine Prinzip dieser Klonierungsstrategie. Ein Teil von pSM32 wurde dabei eliminiert. Das Konstrukt, pSMA37, wurde in *M. tuberculosis* H37Rv Δ *glnR* transformiert und Klone, die auf Kanamycin-haltigen 7H10-Platten wachsen konnten, in Kultur genommen, und die Aufnahme des Expressionsvektors pSMA37 durch eine analytische PCR mit dem Primer-Paar oriE1 und oriE2 zur Amplifikation des Replikationsursprungs von *E. coli* bestätigt.

4.8.18 RNA-Präparation von *M. tuberculosis* und cDNA-Synthese zum Nachweis von Rv1500 auf mRNA-Ebene

Der Nachweis von Rv1500 auf mRNA-Ebene in *M. tuberculosis* H37Rv erfolgte durch die reverse Transkription von RNA-Präparationen und anschließender PCR-Analyse mit spezifischen Primern und der cDNA als Matrize.

10-15 ml Kultur aus der exponentiellen Wachstumsphase wurden mit dem gleichen Volumen GTC-Puffer vermischt und für 15 min bei 20-22°C inkubiert und anschließend für 15 min bei 4°C und etwa 5000 × *g* geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Trizol (Invitrogen) resuspendiert und für weitere 15 min bei 20-22°C inkubiert. Dann wurden die Ansätze in Lysis Matrix B-Reaktionsgefäße überführt und in einem Hybaid Ribolyser FastPrep FP120 (jetzt: MP FastPrep 120A, MP Biomedicals) für 40 Sekunden bei der Geschwindigkeit 6.0 aufgeschlossen. Die Präparation bestand im Wesentlichen aus zwei Schritten: Zunächst wurde die RNA von DNA und Proteinen durch eine Chloroform/Trizol Extraktion getrennt. Dann wurden die Ansätze nach einem DNase I-Verdau mit dem NucleoSpin[®] RNA II-Kit (Macherey-Nagel) weiter aufgereinigt.

Also wurden nach dem Zellaufschluss zunächst die Zelltrümmer und Silica-Partikel abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden 300 µl Chloroform hinzugegeben, geschüttelt und 5 min bei 20-22°C inkubiert. Währenddessen wurden die Ansätze gelegentlich durch Invertieren gemischt. Dann wurde eine Phasentrennung durch Zentrifugation für 5 min bei 15000 × *g* herbeigeführt, die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 500 µl 96 % EtOH (-20°C) für mindestens 30 min bei -20°C gefällt. Die RNA wurde anschließend in der Zentrifuge für 15 min bei 4°C und 15000 × *g* pelletiert, das Pellet mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen, wieder für 15 min bei 4°C und

15000 × *g* zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und in 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Aliquots wurden zur Qualitätskontrolle eingefroren. Der restliche Ansatz wurde aufgeteilt und eine mögliche DNA-Kontamination der RNA-Präparation durch einen DNase I-Verdau (NEB) minimiert. Es wurden je 44,5 µl RNA mit 5,5 µl DNase I-Puffer und 5 µl DNase I (5 u) vermischt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Dann erfolgte die Aufreinigung der Proben mit dem NucleoSpin® RNA II-Kit (Macherey-Nagel) nach den Empfehlungen des Herstellers.

Die cDNA-Synthese wurde mit ungefähr 1-3 µg RNA durchgeführt. Die RNA wurde dazu mit 1 µl Random Primer (0,5 µg µl⁻¹) (Promega) und DEPC-H₂O bei einem Gesamtvolumen von 12 µl für 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis für 2 min heruntergekühlt. Dann wurden 4 µl 5 × M-MLV Reverse Transkriptase-Puffer (Promega), 2 µl 100 mM DTT, 1 µl 10 mM dNTPs (NEB), 0,4 µl Rnasin (40 u µl⁻¹) (Promega) und 0,6 µl DEPC-H₂O hinzugegeben, die Ansätze für 2 min bei 42°C inkubiert, dann 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase RNase H minus point mutant (Promega) hinzugefügt, 30 min bei 42°C inkubiert, 40 µl DEPC-H₂O hinzupipettiert und die Reverse Transkriptase bei 90°C für 2 min inaktiviert. Um falsch-positive Signale aufgrund einer DNA-Kontamination in der folgenden PCR-Analyse ausschließen zu können wurden Ansätze mitgeführt, denen anstelle der Reversen Transkriptase DEPC-H₂O zugegeben wurde („no RT-Kontrolle“).

4.8.19 Untersuchung des Transkriptoms durch Microarray-Technologie

4.8.19.1 Kulturbedingungen

Das Transkriptom von der *glnR*-Deletionsmutante und *M. tuberculosis* H37Rv Wildtyp wurde untersucht, um das Ausmaß der GlnR-vermittelten Regulation zu bestimmen. Beide Stämme wurden zunächst in 7H9-Medium bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 und 1,0 kultiviert. Dann wurden die Bakterien für 10 min bei 1982 × *g* geerntet, dreimal mit dem Ausgangsvolumen MB-Medium mit 5 mM KNO₃ gewaschen, die optische Dichte bei 600 nm mit MB-Medium mit 5 mM KNO₃ auf ungefähr 0,7 eingestellt und Aliquots von 15 ml bei 37°C und 80 rpm im Schüttelinkubator für etwa 18 Stunden beziehungsweise 48 Stunden inkubiert.

4.8.19.2 Präparation der RNA

15 ml der Kulturen wurden nach 18 oder 48 Stunden Inkubation mit dem gleichen Volumen GTC-Puffer für 15 min bei 20-22°C inkubiert und danach für 15 min bei 4°C und etwa 5000 × g geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Trizol (Invitrogen) resuspendiert und für weitere 15 min bei 20-22°C inkubiert. Dann wurden die Ansätze in Lysis Matrix B-Reaktionsgefäße überführt und in einem Hybaid Ribolyser FastPrep FP120 (jetzt: MP FastPrep 120A, MP Biomedicals) für 40 Sekunden bei der Geschwindigkeit 6.0 aufgeschlossen. Nach dem Zellaufschluss wurden die Zelltrümmer und Silica-Partikel abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden 300 µl Chloroform hinzugegeben, geschüttelt und 5 min bei 20-22°C inkubiert. Währenddessen wurden die Ansätze gelegentlich durch Invertieren gemischt. Dann wurde eine Phasentrennung durch Zentrifugation für 5 min bei 15000 × g herbeigeführt, die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 500 µl 70 % EtOH gemischt. Anschließend wurde die RNA weiter mit dem RNeasy Mini-Kit (Qiagen) nach den Empfehlungen des Herstellers präpariert. Es erfolgte ein DNaseI-Verdau für eine Stunde auf der Säule, die Elution erfolgte mit 50 µl RNase-freiem Wasser. Das Eluat wurde anschließend nochmals auf die Säule für eine weitere Elution pipettiert. Um die Kontamination durch genomische DNA zu minimieren wurde ein zweiter DNase I-Verdau (NEB) durchgeführt. Es wurden je 50 µl Eluat mit 6 µl DNase I-Puffer und 4 µl DNase I (4 u) vermischt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung dieser Ansätze mit dem RNeasy Mini-Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurden photometrisch bestimmt. Die RNA wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.8.19.3 cDNA-Synthese

Die gleichen Mengen RNA von Mutante und Wildtyp (zwischen 3 und 10 µg) wurden in die cDNA-Synthese eingesetzt. Es wurden zunächst die RNA, 2 µl einer 1:400 Verdünnung des GeneChip® Poly-A-RNA Control Kit (Affymetrix), 1125 ng Random Primer (Invitrogen) zusammengegeben und mit DEPC-H₂O auf 30 µl aufgefüllt, 10 min bei 70°C inkubiert, für 10 min auf 25°C abgekühlt und dann mit 12 µl First Strand-Puffer (Invitrogen), 3 µl 10 mM DTT (Invitrogen), 0,5 mM dNTPs (Invitrogen) und 25 u Superscript II Reverse Transkriptase (Invitrogen) bei einem Gesamtvolumen von 60 µl versetzt. Es erfolgte eine Inkubation der Ansätze für 10

min bei 25°C, 60 min bei 37°C, 60 min bei 42°C, 10 min bei 70°C und eine Abkühlung auf 4°C am Ende des Programms. Reste der RNA wurden durch die Zugabe von 0,25 M NaOH und einer weiteren Inkubation für 30 min bei 65°C degradiert. Danach wurden die Reaktionsansätze durch die Addition von 0,25 M HCl neutralisiert. Die cDNA wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

4.8.19.4 cDNA-Fragmentierung und Markierung

Die Konzentration der cDNA wurde photometrisch bestimmt und 3 µg der DNase I-Fragmentierung zugeführt. Die Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 50 µl setzten sich zusammen aus einem entsprechenden Volumen gelöster cDNA, 5 µl One Phor All-Puffer (Amersham, jetzt GE Healthcare), 3 µl DNase I (0,4 U µl⁻¹; Verdünnung in One Phor All-Puffer) (Pierce) und wurden mit DEPC-H₂O auf 50 µl aufgefüllt. Die Fragmentierung erfolgte bei 37°C für 10 min. Danach wurde die DNase I für 10 min bei 98°C inaktiviert und die Proben auf 4°C heruntergekühlt.

Die fragmentierte cDNA wurde mit dem GeneChip® DNA Labeling Reagent (Affymetrix) markiert. Es wurden in eine Markierungsreaktion neben 40 µl der fragmentierten cDNA 12 µl 5 × Reaktionspuffer, 2,4 µl des GeneChip® DNA Labeling Reagent (Affymetrix), 0,8 U Terminale Transferase (Promega) und DEPC-H₂O bis zu einem Gesamtvolumen von 60 µl eingesetzt. Die Ansätze wurden eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA gestoppt.

Die Markierungseffizienz wurde durch einen Gel Shift Assay überprüft. Dazu wurden 3 µl der markierten cDNA mit 12 µg Neutravidin (2 mg ml⁻¹ in PBS) 5 min bei 20-22°C inkubiert. Es wurden dann diese Ansätze sowie je 3 µl der korrespondierenden unmarkierten fragmentierten cDNA auf ein 2 % Agarose-Gel mit 10 µl 1 × SYBR Gold aufgetragen. Die Markierungseffizienz ließ sich anhand der Verschiebung der Bande von unmarkierter cDNA im Vergleich zur markierten cDNA abschätzen.

4.8.19.5 Hybridisierung

Es wurden Microarrays verwendet, die speziell für *M. tuberculosis* H37Rv von der Firma Affymetrix angefertigt wurden. Die Auswahl der Sondensequenzen wurde auf der Grundlage des sequenzierten Genoms von *M. tuberculosis* H37Rv getroffen (Cole *et al.*, 1998). Ein Sondenpaar besteht aus einer *perfect match*-Sonde und einer

mismatch-Sonde, die von der *perfect match*-Sonde in einem Nukleotid abweicht. Auf dem Chip sind 44033 Sonden gebunden, die 4003 kodierende Sequenzen umfassen. Ferner sind 7902 Sonden gebunden, die 1413 intergenische Sequenzen repräsentieren.

Der erste Schritt bei der Hybridisierung war die Prähybridisierung der Chips mit 1 × Hybridisierungslösung bei 50°C für 20 min bei 60 rpm in einem Affymetrix GeneChip® Hybridisierungssofen 640. Währenddessen wurden die Hybridisierungsansätze vorbereitet. 44,5 µl der markierten cDNA wurden mit 65 µl 2 × Hybridisierungslösung, 2,2 µl 3 nM B2 Kontroll-Oligo (Affymetrix), 6,5 µl 20 × Eukaryotic Hybridization Controls (Affymetrix), 9,2 µl DMSO, 1,3 µl 50 mg ml⁻¹ BSA (Invitrogen) und 1,3 µl Salmon Testes DNA 10 mg ml⁻¹ (Sigma-Aldrich) vermischt und für 5 min bei 99°C und anschließend für 5 min bei 45°C inkubiert. Die Hybridisierung der Chips wurde in dem Affymetrix GeneChip® Hybridisierungssofen 640 bei 50°C und 60 rpm für 16 Stunden vorgenommen.

4.8.19.6 Färbung und Detektion

Die Färbung wurde nach den Empfehlungen von Affymetrix in der GeneChip® Fluidics Station 450 nach dem modifizierten FlexMidi_euk2v3-Programm für *Pseudomonas aeruginosa* durchgeführt:

Post-Hybridisierung;	10 Zyklen mit 2 Waschungen pro Zyklus mit Wasch-
Waschschritt 1	Puffer A bei 25°C
Post-Hybridisierung;	4 Zyklen mit 15 Waschungen pro Zyklus mit Wasch-
Waschschritt 2	Puffer B bei 50°C
1. Färbung	600 Sekunden in Streptavidin-Lösung bei 25°C
Post-Färbung; Waschschritt	10 Zyklen mit 4 Waschungen pro Zyklus mit Wasch-
	Puffer A bei 30°C
2. Färbung	600 Sekunden in Antikörper-Lösung bei 25°C
3. Färbung	600 Sekunden in SAPE-Lösung bei 25°C
Finaler Waschschritt	15 Zyklen mit 4 Waschungen pro Zyklus bei 30°C, finale
	Temperatur 25°C

Anschließend wurden die Microarrays mit dem GeneChip® Scanner 3000 von Affymetrix gescannt. Die Analyse der Daten wurde mit der Affymetrix GCOS 1.4 Software durchgeführt. Die Experimente wurden normalisiert, indem die durchschnittliche Signalstärke der Zielsequenzen auf 150 gesetzt wurde, oder die Einstellungen der GCOS 1.4 Software übernommen wurden. Die Signalintensitäten

der unabhängigen Messungen der *glnR*-Deletionsmutante und des Wildtyps bei 18 und 48 Stunden wurden gruppiert und mit Hilfe des t-Tests statistisch verglichen. Pro Stamm und Zeitpunkt lagen zwei Microarray-Datensätze vor. Der Filter für die Bewertung der Ergebnisse wurde bei $p < 0,05$ und einer Expressionsänderung > 5 gesetzt.

4.8.20 Real-Time PCR

Die Regulation der *nirBD*-Expression durch *glnR* wurde weiterhin durch relative Quantifizierung durch Real-Time PCR mit einer *nirB* spezifischen Sonde bestätigt. Es wurden TaqMan[®] MGB-Sonden verwendet, die von Applied Biosystems auf der Grundlage der zur Verfügung gestellten Sequenz von *nirB* entworfen wurden (Cole *et al.*, 1998). Es wurde den Empfehlungen zur Planung und Durchführung von TaqMan[®] Gene Expression Assays der Firma Applied Biosystems entsprochen. Ein Assay enthielt zwei Primer, *nirB*-ANYF und *nirB*ANYR, die spezifisch für die Zielsequenz waren, sowie die TaqMan[®] MGB FAM[™] markierte Sonde *nirB*-ANYM1 (5'-ctcgtgcaacaacgtc).

Die Präparation der RNA erfolgte wie schon für den Microarray beschrieben. Es wurden Kulturen der Stämme *M. tuberculosis* H37Rv Δ *glnR* und *M. tuberculosis* H37RV verwendet, die in MB-Medium mit 5 mM KNO₃ für 18 Stunden inkubiert wurden.

Für die cDNA-Synthese wurden 2 μ g RNA als Substrat eingesetzt. Zudem enthielt ein Ansatz 1 μ l Random Primer (3 μ g μ l⁻¹) (Invitrogen), 1 μ l dNTPs (10 mM dNTP-Mix) (Invitrogen) und wurde mit DEPC-H₂O auf 13 μ l aufgefüllt und für 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt und 4 μ l First-Strand-Puffer (5 \times) (Invitrogen) und 2 μ l 0,1 M DTT (Invitrogen) hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubation der Ansätze für 2 min bei 25°C wurde 1 μ l Superscript II Reverse Transkriptase (200 u μ l⁻¹) (Invitrogen) zugegeben. Es wurden jeweils Kontrollen mitgeführt, denen anstatt der reversen Transkriptase 1 μ l DEPC-H₂O zugesetzt wurde, um den Gehalt an genomischer DNA der Proben abschätzen zu können. Dann wurde folgendes Thermoprogramm für die cDNA-Synthese angewendet: 10 min 25°C, 50 min 42°C und 15 min 70°C.

Die Normalisierung der Real-Time PCR erfolgte auf das *rrs*-Gen, das als *housekeeping*-Gen für die ribosomale 16S RNA kodiert. Von ihm wird angenommen,

dass es nicht von GlnR reguliert wird. Die Primer für die RT-PCR waren *rrs*-ANYF und *rrs*-ANYR, und die Sonde war *rrs*-ANYM2 (5'-tccccacgctttcg).

Die cDNA wurde für die *nirB*-spezifischen Reaktion immer 1:10 verdünnt, für die *rrs*-spezifischen Reaktionen 1:10000 verdünnt eingesetzt. Für die Standardkurven, anhand derer die relative Quantifizierung vorgenommen werden konnte, wurde für jeden RT-PCR Lauf ein cDNA-Pool angelegt, von dem serielle Verdünnungen angefertigt wurden. Von jeder Probe beziehungsweise Verdünnung wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Es wurden alle cDNA-Proben sowohl als Matrize für *nirB*-spezifische Reaktionen als auch *rrs*-spezifische Reaktionen eingesetzt.

Die Ansätze für die RT-PCR enthielten 5 µl der cDNA, 25 µl TaqMan® Universal PCR-Mastermix, 2,5 µl *nirB*- oder *rrs*-Assay Mix (20 ×) und 17,5 µl DEPC-H₂O. Alle Reagenzien waren von Applied Biosystems.

Die RT-PCR wurde im AbiPrism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. Das Thermoprogramm wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers gewählt:

Initiale Phase	50°C	2 min	1 Zyklus
	95°C	10 min	
Denaturierung	95°C	15 sec	40 Zyklen
Annealing/Elongation	60°C	1 min	

Es wurden zwei unabhängige Experimente mit der RNA zweier unabhängiger Anzuchten und Präparationen durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte nach den Richtlinien von Applied Biosystems (Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR). Es wurden zunächst Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Anschließend wurden die semiquantitativen Daten mit Hilfe der Daten des mitgeführten Kalibrators *rrs* normalisiert. Aus diesen Werten wurde schließlich die x-fache Expressionsänderung zwischen Mutante und Wildtyp, sowie deren Standardabweichung kalkuliert.

4.9 *In-vitro* Charakterisierung

4.9.1 Ziehl-Neelsen Färbung

Für die säurefeste Färbung nach Ziehl-Neelsen wurden zunächst Aliquots von Bakteriensuspensionen durch Hitze inaktiviert, ein Tropfen auf einen Objektträger gegeben und an der Luft getrocknet. Das Präparat wurde hitzefixiert, indem es dreimal durch die Flamme eines Bunsenbrenners gezogen wurde. Dann wurde eine Ziehl-Neelsen-Färbelösung (Becton Dickinson) auf die Probe gegeben und mit dem Bunsenbrenner vorsichtig erwärmt. Nach 10 min wurde das Präparat dann mit HCl in EtOH (0,75 %) entfärbt, mit Methylblau gegengefärbt und anschließend mit H₂O gespült. Die getrockneten Präparate wurden schließlich im Lichtmikroskop bei tausendfacher Vergrößerung durchmustert.

4.9.2 Untersuchung der Koloniemorphologie auf Kongo Rot-haltigen Nährböden

Mycobacterium tuberculosis H37Rv, *M. tuberculosis* H37RvΔRv1500 und *M. tuberculosis* H37RvΔhddA wurden bis zum Erreichen der späten exponentiellen Wachstumsphase in Middlebrook 7H9-Medium, supplementiert mit ADS, Glycerol und 0,05 % Tween 80 bei 37°C und 80 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Zwei Mikroliter der Zellsuspension wurden punktuell mit Hilfe einer Mikroliterpipette auf 7H10-Agarplatten mit ADS, Glycerol und Kongorot (100 µg ml⁻¹) aufgebracht. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C über einen Zeitraum von etwa drei bis vier Wochen.

4.9.3 Lysin-Ruthenium-Rot Einbettung zur Darstellung von *M. tuberculosis* in der Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden Kulturen mit einer OD₆₀₀ von 0,11 (*M. tuberculosis* H37RvΔhddA) und 0,39 (*M. tuberculosis* H37Rv) verwendet, die in 60 ml 7H9-Medium mit 0,1 % Tween 80 kultiviert wurden, um Aggregatbildung zu vermeiden. 40 ml der Kulturen wurden in der Zentrifuge bei 1982 × g für 15 Minuten geerntet und die Überstände verworfen.

1. Fixierung:

Kurz vor der Fixierung wurde dem Cacodylatpuffer mit 0,075 % Ruthenium-Rot 2 % Formaldehyd und 2,5 % Glutaraldehyd sowie 75 mM Lysin-Acetat zugesetzt. Das Bakterienpellet des letzten Zentrifugationsschrittes wurde gründlich in etwa dem 100fachen Volumen des Pellets durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Dann erfolgte eine Inkubation für 20 Minuten auf Eis. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurden die Bakterienzellen bei $1982 \times g$ für 10 min pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 0,075 % Ruthenium-Rot in Cacodylat resuspendiert und 10 min bei $3180 \times g$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser letzte Schritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

2. Fixierung:

Bei der zweiten Fixierung wurde das Pellet gründlich durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in 0,075 % Ruthenium-Rot + 2 % Formaldehyd + 2,5 % Glutaraldehyd resuspendiert. Diese Fixierung erfolgte für 16 bis 20 Stunden bei 4°C.

3. Fixierung:

Nach drei Waschschritten mit 0,075 % Ruthenium-Rot in Cacodylat wurde das Pellet in 1 % Osmium in 0,075 % Ruthenium-Rot in Cacodylat aufgenommen, eine Stunde auf Eis inkubiert, einmal mit 0,075 % Ruthenium-Rot in Cacodylat gewaschen und die Bakterien in Einbettungsharz eingebettet.

Die 3. Fixierung und die Elektronenmikroskopie erfolgte im Labor von Dr. Manfred Rohde, HZI Braunschweig.

4.9.4 Empfindlichkeitstestung gegenüber Detergenz-Stressbedingungen

4.9.4.1 Wachstumskurve und Lebendkeimzahlbestimmung von *M. tuberculosis* H37RvΔRv1500 in 7H9-Medium mit 0,02 % und 0,1 % SDS

Vorkulturen von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis* H37RvΔRv1500 wurden in 7H9-Medium mit 10 % OADC bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase kultiviert, auf eine OD₆₀₀ von etwa 0,12 bis 0,13 eingestellt und mit steriltfiltriertem 10 % SDS versetzt, so dass die Kulturen eine Konzentration von 0,02 %, beziehungsweise 0,1 % SDS, bei einem Gesamtvolumen von 15 ml aufwiesen. Als

Kontrolle wurden Ansätze ohne die Zugabe von SDS mitgeführt. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 37°C und 80 rpm im Schüttelinkubator. An Tag 0, 1, 2, 4, 5, 7, 8 und 9 wurde von Aliquots die optische Dichte bei 600 nm als Doppelwert bestimmt und die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen wurden berechnet.

An Tag 4 des Versuchs wurde zusätzlich eine Lebendkeimzahlbestimmung durchgeführt, indem Aliquots der Ansätze ohne SDS und mit 0,1 % SDS verdünnt und auf 7H10-Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C inkubiert wurden. Es wurden Doppelbestimmungen vorgenommen und die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die statistische Bewertung erfolgte mit Hilfe des t-Test (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

4.9.4.2 Wachstumskurve und Lebendkeimzahlbestimmung von *M. tuberculosis H37Rv* Δ hddA in 7H9-Medium mit 0,01 %, 0,04 % und 0,1 % SDS

Mycobacterium tuberculosis H37Rv und *M. tuberculosis* Δ hddA wurden in je 10 bis 15 ml 7H9-Medium, supplementiert mit ADS, 0,5 % Glycerol und 0,05 % Tween 80, bis zum Erreichen der späten exponentiellen Wachstumsphase inkubiert. 7H9-Medium wurde mit Aliquots der Vorkulturen beimpft, so dass die optische Dichte bei 600 nm 0,09-0,10 bei einem Gesamtvolumen von 15 ml entsprach. Die SDS-Konzentration wurde mit einer 10%igen SDS-Lösung auf die Endkonzentrationen 0,01 %, 0,04 % und 0,1 % eingestellt. Als Kontrolle wurden Ansätze ohne die Zugabe von SDS mitgeführt. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 37°C und 80 rpm im Schüttelinkubator. Die optische Dichte wurde an Tag 0, 1, 3, 4, 5, 6 und 7 von Aliquots der Kulturen bestimmt. Es wurden Doppelwerte gemessen und in dem Graphen der Mittelwert \pm Standardabweichung aufgetragen.

Mycobacterium tuberculosis H37Rv und *M. tuberculosis* H37Rv Δ hddA wurden zur Lebendkeimzahlbestimmung in 7H9-Medium, supplementiert mit ADS, 0,5 % Glycerol und 0,05 % Tween 80, bis zum Erreichen der späten exponentiellen Wachstumsphase beziehungsweise der frühen stationären Wachstumsphase bei 37°C in der Roller-Einheit inkubiert. Diese Kulturen wurden zu Beginn des Versuches auf eine optische Dichte von 0,11 bis 0,14 eingestellt und Aliquots von jeweils 1 ml in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Ansätze mit SDS in den Endkonzentrationen 0,01 %, 0,04 % und 0,1 % versehen. Als Kontrolle wurden Ansätze ohne SDS mitgeführt. Nach einem beziehungsweise 4 Tagen bei 37°C im

Schüttelinkubator bei 80 rpm wurden Verdünnungen von Aliquots der Ansätze als Doppelbestimmungen auf 7H10-Agarplatten zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten ausplattiert. Es wurden Mittelwerte von Doppelwerten gebildet und es wurde die Standardabweichung berechnet. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des t-Tests statistisch bewertet (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

4.9.5 Wachstum von *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Δ glnR::pSMA37 in MB-Medium mit 10 mM KNO₃

Vorkulturen der Stämme *M. tuberculosis* H37Rv Δ glnR, *M. tuberculosis* H37Rv Δ glnR::pSMA37 und *M. tuberculosis* H37Rv wurden in 7H9-Medium mit 10 % OADC bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,6 bis 0,7 bei 37°C und 80 rpm im Schüttelinkubator kultiviert, 12 ml der Kulturen für 15 min bei 1982 \times g geerntet, *M. tuberculosis* H37Rv Δ glnR und *M. tuberculosis* H37Rv Δ glnR::pSMA37 dreimal mit 15 ml MB-Medium mit 10 mM KNO₃ und *M. tuberculosis* H37Rv dreimal mit MB-Medium ohne Stickstoffquelle gewaschen und anschließend jeweils mit dem gleichen Medium auf eine OD₆₀₀ von etwa 0,12 bei einem Gesamtvolumen von 15 ml eingestellt. Die so präparierten Kulturen wurden bei 37°C und 80 rpm im Schüttelinkubator inkubiert und die optische Dichte bei 600 nm an Tag 0, 4, 10 und 16 als Doppelwert bestimmt. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die statistische Bewertung wurde mit dem t-Test vorgenommen und p-Werte $\leq 0,05$ als signifikant bewertet.

4.10 Biochemische Charakterisierung

4.10.1 Neutralzuckerbestimmung

Zur quantitativen Bestimmung der Komposition der Zucker von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis* H37Rv Δ Rv1500 wurde eine Neutralzuckerbestimmung mit Hilfe gekoppelter Gaschromatographie und Massenspektrometrie durchgeführt.

Mutante und Wildtyp wurden unter Standardbedingungen kultiviert. Der erste Schritt nach der Wägung der lyophilisierten Bakterien bei der Neutralzuckerbestimmung war die Hydrolyse der Proben mit 2 M TFA. Es wurden etwa 1,2 bis 1,8 mg der Zellen in Bördelgläser überführt und mit je 2 ml 2 M TFA für 2 Stunden bei 120°C hydrolysiert. Alle 30 min wurden die Proben im Ultraschallbad kurz beschallt. In Abhängigkeit von

der eingesetzten Zell-Trockenmasse wurde den Ansätzen eine definierte Masse Xylose (10 oder 15 µg) als interner Standard zugesetzt. Anschließend wurden die Proben im Rotationsverdampfer bis zur Trockenheit evaporiert. Der Niederschlag wurde dann viermal mit 1 ml 40 % Ether/Hexan gewaschen um die Lipide zu entfernen und nach dem letzten Waschschrift unter Stickstoff trockengeblasen. Anschließend wurden die Proben in 0,5 ml H₂O gelöst und 300 µl NaBH₄ (10 mg ml⁻¹) zur Reduktion der Carbonylfunktion hinzugefügt und bei 20-22°C im Dunkeln für 16 bis 20 Stunden inkubiert. Nach der Zugabe des NaBH₄ sollten die Ansätze schäumen und einen alkalischen pH-Wert haben. Nach der Inkubationszeit wurde tropfenweise 2 M HCl zur Neutralisierung des überschüssigen NaBH₄ zugegeben, bis die Ansätze nicht mehr schäumten. Anschließend wurden sie im Rotationsverdampfer bis zur Trockenheit eingengt. Die getrockneten Proben wurden anschließend dreimal mit 5 % Essigsäure in Methanol gewaschen und jeweils im Rotationsverdampfer getrocknet. Während des letzten Schrittes der Neutralzuckeraufbereitung für die GC-MS-Analyse wurden die Proben peracetyliert. Dazu wurde der Niederschlag in 200 µl Acetanhydrid aufgenommen, für 15 min bei 85°C inkubiert und unter Stickstoff trockengeblasen. Dann wurden 200 µl Pyridin und 100 µl Acetanhydrid hinzugegeben, 30 min bei 85°C inkubiert und die Ansätze erneut unter Stickstoff getrocknet. Schließlich wurden die Proben in CHCl₃ aufgenommen und standen so zur Analyse im Gaschromatographen und Massenspektrometer bereit.

Für diese Arbeiten wurde ein Hewlett Packard GC5890 Gaschromatograph verwendet. Die Probenaufgabe erfolgte in eine KAS-Injektionseinheit (Gerstel, Mühlheim). Die gaschromatographisch aufgetrennten Substanzen wurden in einem Hewlett Packard MSD5970 Massenspektrometer detektiert. Die Initialtemperatur des KAS-Programmes lag bei 50°C und wurde um 10°C pro Sekunde erhöht, bis eine Temperatur von 220°C erreicht wurde. Diese Temperatur wurde für eine Minute gehalten. Die Auftrennung der Substanzen erfolgte im Gaschromatographen auf einer Ultra-1 Säule (Agilent, 12 m × 0,2 mm) bei einer initialen Temperatur von 120°C für 3 min, die dann graduell mit 5°C min⁻¹ bis auf 320°C erhöht wurde. Die finale Temperatur wurde 10 min gehalten. Die Ionisierung der Proben erfolgte im Massenspektrometer durch den Beschuss der Probe mit Elektronen bei 70 eV.

Es wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt. Aus den Peakflächen des Gaschromatogramms und der Mitführung des internen Standards Xylose ließen sich die Massen der einzelnen Zucker und damit auch die Stoffmenge pro Milligramm Trockengewicht [nmol mg^{-1}] berechnen.

4.10.2 Lipidextraktion

Die Extraktion der Lipide zur Analyse der PIM wurde nach dem Protokoll von Bligh und Dyer durchgeführt (Bligh und Dyer, 1959). Kulturen der Rv1500-Deletionsmutante und des Wildtyps wurden bis zum Erreichen der späten exponentiellen Wachstumsphase inkubiert. 50 ml der Bakteriensuspension wurden für 15 min bei $1982 \times g$ geerntet, zweimal mit PBS pH 7,2 gewaschen, das Pellet in 10 ml PBS aufgenommen und 10 min abgekocht und anschließend autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden die Bakterien erneut durch Zentrifugation geerntet, das Pellet in 5 ml H_2O aufgenommen und durch eine Ultraschallbehandlung für 10 min auf Leistungsstufe 6 (Branson Sonifier B12) aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben in einen Erlenmeyerkolben überführt und die Zentrifugenröhrchen zur Optimierung der Ausbeute mit 3 ml H_2O gespült. Diese 3 ml wurden mit den 5 ml der aufgeschlossenen Zellen vereinigt. Die Proben wurden dann mit 30 ml $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:2, v/v) versetzt, geschüttelt, für 45 min im Ultraschallbad (Jürgens Bandelin Sonorex TK52 Transistor) beschallt, 10 ml CHCl_3 und 10 ml H_2O hinzugegeben, geschüttelt und eine Phasentrennung durch Zentrifugation für 15 min bei $7741 \times g$ herbeigeführt. Diese Extraktion wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Die Chloroformphasen wurden jeweils abgenommen und vereinigt. Um die Ausbeute der PIM zu maximieren, wurden die Sedimente der Interphase mit je 2 ml, 2 ml und 1 ml $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1, v/v) gewaschen. Die Chloroformphasen wurden zunächst getrocknet, anschließend mit 2 ml, 2 ml und 1 ml $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1, v/v) gelöst und mit den Interphase-Extrakten vereinigt. Die Extrakte wurden anschließend über einen Sartorius Minisart RC-15-Filter filtriert und die Probengläser und die Filtrationsapparatur dreimal mit je 1 ml $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1, v/v) gespült. Danach wurden die Extrakte bis zur Trockenheit eingedampft und in einem definierten Volumen $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1, v/v) gelöst.

4.10.3 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

Die Analyse der Lipidextrakte erfolgte zunächst mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie (2D-HPTLC). Aliquots der Extrakte wurden punktuell auf Kieselgel 60 HPTLC-Platten (Merck) aufgetragen und in der ersten Dimension mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (24:12:2,4, Volumenverhältnisse) und in der zweiten Dimension mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{Essigsäure}$ (20:1,5:3:12,5, Volumenverhältnisse) entwickelt. Nach dem Trocknen wurden die Platten in die Hannessian-Färbelösung getaucht, getrocknet und auf 150°C erhitzt. Substanzen wie Phosphatidylinositol (PI) erschienen dunkelblau auf hellblauem Hintergrund. Phosphatidylinositol wurde in Referenzchromatogrammen, mit kommerziell erhältlichem PI (Sigma) als Standard, identifiziert. Die Anwesenheit von Phosphatgruppen wurde mit Hilfe des Molybdän-Blau-Reagenz von Sigma-Aldrich überprüft.

4.10.4 Analyse der Zucker und Fettsäuren der nach Bligh und Dyer gewonnenen Lipidextrakte

20 μl -Aliquots der Lipidextrakte wurden unter Stickstoff getrocknet und mit 200 μl 2 M HCl/MeOH für eine Stunde bei 85°C hydrolysiert, und erneut unter Stickstoff bis zur Trockenheit eingengt. Dann wurden die Proben mit 50 μl Pyridin und 25 μl Acetanhydrid versetzt und für 30 min bei 85°C inkubiert. Die Proben wurden getrocknet und in Chloroform gelöst, bevor sie der gekoppelten Analyse mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) zugeführt wurden.

Die Fettsäuren der Chloroformphase mussten vor der GC-MS Analyse unter alkalischen Bedingungen hydrolysiert werden. Daher wurden Aliquots der Extrakte mit 1 M NaOH in $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v) für drei Stunden bei 85°C behandelt. Anschließend wurden die Ansätze mit 1 M HCl neutralisiert und die Lipide wurden dreimal mit CHCl_3 extrahiert. Daraufhin wurden die Carboxylgruppen der Lipide mit Diazomethan methyliert, die Fettsäuremethylester in CHCl_3 gelöst und wie unter 4.10.1 beschrieben mittels GC-MS analysiert.

4.10.5 Fourier-Transform-Ion-Cyclotron-Resonanz Massenspektrometrie (FT-ICR MS)*

**Die Durchführung dieser Messung wurden in der Laborgruppe Immunchemie des Forschungszentrum Borstel von PD Dr. Buko Lindner und Göran Hübner durchgeführt.*

Die Zusammensetzung der PIM der Chloroformphase wurde durch die Fourier-Transform-Ion-Cyclotron-Resonance Massenspektrometrie (FT-ICR MS) bestimmt. Bei dem verwendeten Massenspektrometer handelte es sich um ein Apex-Qe Hybrid Instrument (Bruker Daltonics, Bremen), das mit einer 7 Tesla Magnet und einer Apollo II Ionenquelle ausgestattet war. Die Steuerung erfolgte über die apexControl 2.0.0beta Software (Bruker Daltonics, Bremen). Alle Messungen wurden im negativen Ionen-Modus durchgeführt. Die Proben wurden durch Elektrospray-Ionisierung (ESI) ionisiert und die Auswertung der Daten erfolgte mit der Data Analysis 3.4 Software (Gauss-Glättung: Glättung mit 1,0 Punkten, 1 Zyklus) (Bruker Daltonics, Bremen).

50 µg der getrockneten Proben wurden in 100 µl CHCl₃/MeOH/H₂O (60:35:8, Volumenverhältnisse) aufgenommen. 10 µl dieser Lösung wurden mit 300 µl 2-Propanol/H₂O/Triethylamin (25:25:0.03, Volumenverhältnisse) gemischt, der pH-Wert mit Essigsäure auf 9 eingestellt und mit einer Flussrate von 2 µl min⁻¹ in die Ionenquelle injiziert. Die Messungen wurden durchgeführt, wie vom Hersteller des Massenspektrometers empfohlen. Für die MS/MS-Analysen wurde ein Vorläufer-Ion in der Q-Zelle selektiert und in der ICR-Zelle durch Infrarot Multiphotonen Dissoziation (IRMPD) für 200 ms fragmentiert.

4.11 *In vitro* und *in vivo* Infektionsstudien*

**Die im Folgenden beschriebenen Methoden wurden von der Arbeitsgruppe Molekulare Infektiologie um Prof. Dr. S. Ehlers, Forschungszentrum Borstel, durchgeführt.*

4.11.1 *In vitro* Infektionsstudien

Die Makrophagen und dendritischen Zellen wurden aus Knochenmarksstammzellen der Maus isoliert. Dazu wurden sie in DMEM (PAA, Linz, Österreich) mit 10 %

fötalem Rinderserum, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 1 mM Natriumpyruvat (Life Technologies, Karlsruhe) und 50 ng ml⁻¹ rhM-CSF inkubiert. Unter diesen Bedingungen differenzierten die Stammzellen in Knochenmark-Makrophagen (Keller *et al.*, 2004).

Die dendritischen Zellen wurden hergestellt, indem die Knochenmarksstammzellen in RPMI 1640-Medium (Biochrom, Berlin) mit 100 U ml⁻¹ Penicillin, 100 µg ml⁻¹ Streptomycin (Biochrom, Berlin), 10 % fötales Rinderserum, 2 mM L-Glutamin (Life Technologies, Karlsruhe), 50 µM β-Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen) und 20 ng ml⁻¹ rmGM-CSF kultiviert wurden (Lutz *et al.*, 1999). Zellzählungen und Viabilitätskontrollen wurden durch den Trypan-Blau Ausschluss vorgenommen. Es wurden jeweils 5 × 10⁵ Zellen in 24-well Platten ausgesät. Als Richtlinie für die MOI wurden 1 bis 0,3 koloniebildenden Einheiten (KBE) des jeweiligen *M. tuberculosis*-Stammes auf eine dendritische Zelle und 3 oder 1 KBE auf einen Makrophagen festgelegt. Die Infektionsdosis wurde für jedes einzelne Experiment bestimmt. Abweichungen sind in den entsprechenden Legenden der Abbildungen angegeben. Als bestätigte MOI wurde das KBE-Inokulum pro Makrophage bezeichnet. Zellen, die mit LPS (10 ng ml⁻¹) infiziert wurden, dienten als Positivkontrollen für diesen Versuch, während uninfizierte Zellen die Negativkontrollen darstellten. Die Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF-α) und IL12p40 Sekretion wurde durch einen ELISA-Test bestimmt. Die intrazelluläre Replikation der Bakterien in Makrophagen wurde über sechs Tage durch die Lyse der Makrophagen und das Ausplattieren von Verdünnungen der Ansätze auf 7H10-Agar supplementiert mit 10 % BSA ermittelt.

4.11.2 *In vivo* Infektionsstudien

Um den Effekt der Mutationen auf den Infektionsverlauf *in vivo* untersuchen zu können, wurden weibliche, 6-8 Wochen alte, spezifisch pathogenfreie C57BL/6 Mäuse über ein Aerosol mit *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* H37RvΔRv1500 und *M. tuberculosis* H37RvΔhddA infiziert. Die Infektionsdosen lagen bei 400 KBE und wurden einen Tag nach der Infektion bestätigt. Die Haltung der Tiere erfolgte in individuell belüfteten Käfigen (IVC, Ebeco, Castrop-Rauxel). An den Tagen 1, 21 und 70 nach der Infektion wurden die Lungen von fünf Tieren entnommen, gewogen und homogenisiert. Von den Homogenisaten wurden serielle Verdünnungen angefertigt und auf 7H10-Agar mit 10 % BSA ausplattiert. Alle Experimente waren in

Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz und genehmigt vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume (Kiel).

4.11.3 Statistik

Alle Daten werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben und wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U-Test statistisch bewertet. Das Signifikanzniveau wurde bei $p \leq 0,05$ festgelegt.

5. Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der Rv1500 Deletionsmutante von *Mycobacterium tuberculosis*

5.1.1 Genomische Situation und Generierung der Deletionsmutante

Die Abbildung 6 zeigt die genomische Organisation um Rv1500 auf dem Chromosom von *M. tuberculosis*. Das Gen wird flankiert von Rv1499 und Rv1501, deren Funktion nicht bekannt ist (Cole *et al.*, 1998). Diese Gene könnten potentiell in einem Operon organisiert sein. Es wurde ein 321 bp Fragment innerhalb des ORF Rv1500 deletiert. Es handelt sich hierbei um eine Deletion, die nicht den Leserahmen verschiebt, um Polareffekte auszuschließen, die sich auf die Expression von distalen Genen auswirken. Der Genotyp der Mutante wurde mit Hilfe einer PCR- und einer Southern Blot-Analyse bestätigt. Der Verdau der genomischen DNA mit *Sma*I, das einmal innerhalb des deletierten Fragmentes schneidet, resultierte in einem Fragment von 1192 bp für den Wildtyp und 6639 bp für die Mutante (Abbildung 7).

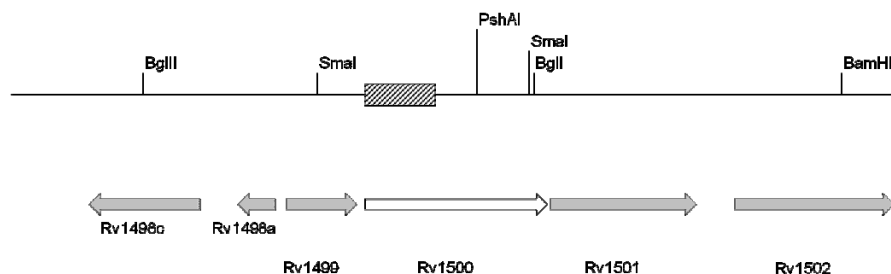
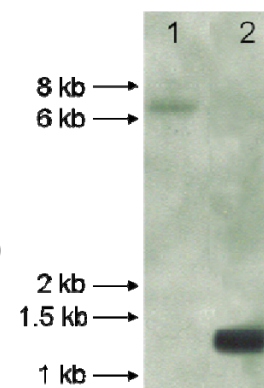


Abbildung 6: 5 kb genomischer Sequenz um den Rv1500 Genlokus

Das *BglII/Bam*HI-Fragment wurde für die Subklonierung verwendet. Eine 321 bp umfassende Deletion wurde mittels eines *Psh*AI/*Bgl*II-Verdau eingeführt. Die Sonde für die Southern Blot-Hybridisierung ist als schraffierte Box dargestellt. Der Verdau der genomischen DNA wurde mit *Sma*I durchgeführt und ergab ein 1192 bp Fragment für den Wildtyp und ein 6639 bp Fragment für die Rv1500 Deletionsmutante.

Abbildung 7: Southern Blot zur Bestätigung der Deletion von Rv1500 in *M. tuberculosis*

Spur 1: Rv1500 Deletionsmutante; Spur 2: *M. tuberculosis* Wildtyp. Der Verdau der genomischen DNA mit *Sma*I ergab für die Mutante ein Fragment von 6639 bp und für den Wildtyp von 1192 bp.



5.1.2 Analyse der Phosphatidylinositolmannosid-Expression in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv und *Mycobacterium tuberculosis* H37RvΔRv1500

Wie in der Einleitung beschrieben, wurde für Rv1500 von *M. tuberculosis* zunächst die Funktion einer Mannosyltransferase postuliert, die die Synthese von Ac₂PIM₇ aus Ac₂PIM₅ durch die Addition zweier Mannosereste katalysiert. Der Phänotyp einer *M. marinum*-Mutante mit einer Deletion in dem homologen Gen von Rv1500 ließ sich mit Rv1500 von *M. tuberculosis* H37Rv zum Wildtyp-Phänotyp komplementieren (Alexander *et al.*, 2004). Das Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die Rolle von Rv1500 bei der Expression der unterschiedlichen PIM-Spezies in *M. tuberculosis* zu klären. Dazu wurden die Lipide und Glykolipide, inklusive der verschiedenen PIMs, aus mit Ultraschall aufgeschlossenen Zellen nach dem Protokoll von Bligh und Dyer extrahiert (Bligh und Dyer, 1959). Die Chloroformphase des Dreiphasensystems wurde für die weiteren Analysen verwendet.

Ein erster Vergleich des PIM- und Lipidexpressionsschemas der Mutante und des Wildtyps erfolgte mittels 2D-HPTLC. Die nach Größe und Affinität zur stationären Phase aufgetrennten Substanzen wurden durch die Färbung der Platten nach Hanessian detektiert (Abbildung 8). Diese Färbung färbt neben PI und PIMs auch

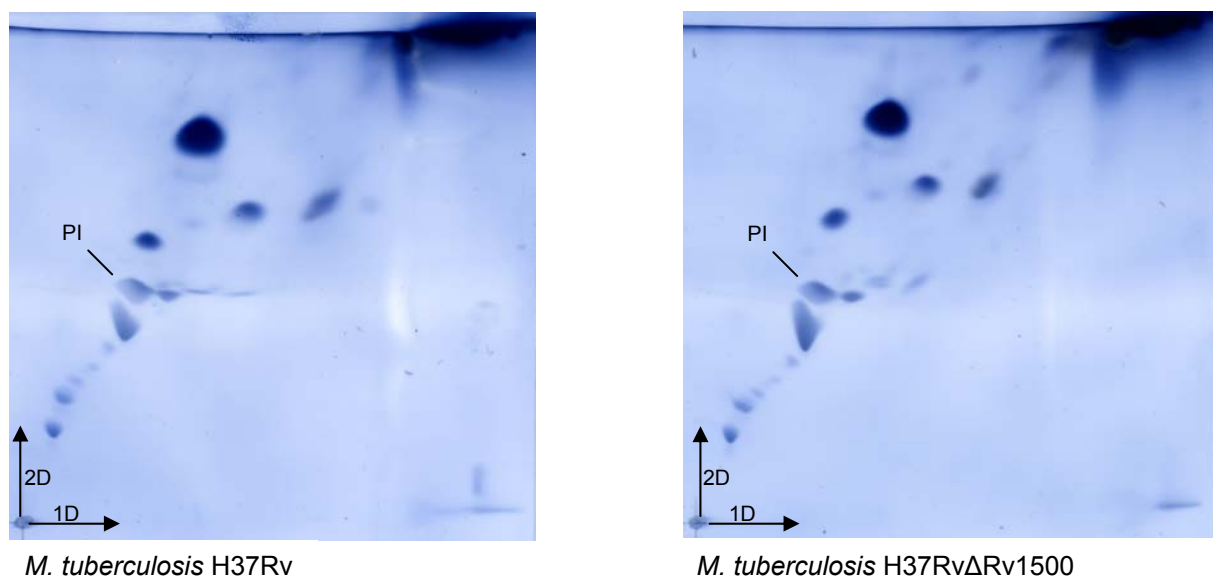


Abbildung 8: 2D-HPTLC der Lipidextrakte von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis* H37RvΔRv1500

8/200 der Extrakte wurden auf KG60-HPTLC Platten (Merck) aufgetragen; 1. Dimension CHCl₃/MeOH/H₂O (24:12:2,4, Volumenverhältnisse), 2. Dimension CHCl₃/MeOH/H₂O/HAc (20:1,5:3:12,5, Volumenverhältnisse); die Färbung der Platten erfolgte nach Hanessian; die Pfeile zeigen die Laufrichtung; Phosphatidylinositol ist mit PI bezeichnet.

weitere Substanzklassen. Durch Referenz-HPTLC mit kommerziell erhältlichem PI als Standard, konnte sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante PI identifiziert werden. Der Bereich zwischen dem Auftragungspunkt und dem Bereich um PI umfasst den Hauptteil der PIM-Spezies. Die vorherrschenden Substanzen waren auch mit dem Molybdän-Blau-Sprühreagenz (Sigma-Aldrich) nachzuweisen, was die Anwesenheit von phosphorhaltigen Verbindungen impliziert. Die Chromatogramme der Chloroformphasen des Wildtyp und der Mutante zeigten eine unveränderte Substanzkomposition der Extrakte.

Tabelle 6: Vorherrschende Fettsäuren der Chloroform-Extrakte	Kettenlänge	Anzahl Doppelbindungen
Mittels GC-MS detektierte	C16	0
vorherrschende Fettsäuren der	C17	0
Chloroform-Extrakte des Wildtyps	C18	0
und der Rv1500 Deletionsmutante	C18	1
	C18	2
	C19	0

Um die unterschiedlichen PIM-Spezies beider Stämme zu identifizieren, wurden massenspektrometrische Untersuchungen unfragmentierter PIMs durchgeführt. Zunächst mussten jedoch die möglichen Substituenten in den Extrakten bestimmt werden, um später die molekularen Massen den einzelnen PIM-Spezies zuordnen zu können. Gekoppelte Gaschromatographie/Massenspektrometrie ermöglichte die Identifizierung von sechs vorherrschenden Fettsäuren, Mannose und Inositol. Bei den Fettsäuren handelt es sich um gesättigte und einfach sowie zweifach ungesättigte Fettsäuren: C16:0, C17:0, C18:0, C18:1, C18:2 und C19:0 (Tabelle 6).

Daraufhin wurden Aliquots der Chloroformphasen mittels ESI FT-ICR Massenspektrometrie analysiert. Die gemessenen m/z -Werte entsprechen dem monoisotopischen Signal des einfach geladenen deprotonierten Molekül-Ions ($[M-H]^-$) und konnten anschließend rechnerisch den Massen der unterschiedlichen PIM-Spezies zugeordnet werden. In Tabelle 7 sind die im negativen Modus gemessenen Masse-Ladungszahlen der 16 stärksten Signale von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis* H37Rv Δ Rv1500 aufgeführt. M_6 konnte PI zugeordnet werden, das mit einer C16:0 und einer C19:0 Fettsäure substituiert ist. $AcPIM_2$, acyliert mit zwei C16:0 und einer C19:0, Ac_2PIM_2 mit zwei C16:0 und zwei C19:0 und $AcPIM_6$ versehen mit zwei C16:0 und einer C19:0 korrespondieren mit den Signalen M_{13} , M_{15}

	m/z [M-H] ⁻ (H37Rv; ΔRv1500)	relative Abundanz (H37Rv; ΔRv1500)	Massengenauigkeit (ppm) (H37Rv; ΔRv1500)	Abgeleitete Zusammen- setzung	Interpretation
M₁	613.3364; 613.3366	0.54; 0.62	0.98; 1.24	pho; ino; glycerol; C19:0	PI
M₂	823.5346; 823.5351	3.01; 2.61	0.42; 1.10	pho; ino; glycerol; C16:0; C17:0	PI
M₃	835.5352; 835.5360	5.87; 5.86	1.24; 2.09	pho; ino; glycerol; C16:0; C18:1	PI
M₄	847.5357; 847.5359	0.63; 0.62	1.75; 2.04	pho; ino; glycerol; C17:0; C18:2	PI
M₅	849.5512; 849.5516	3.84; 4.06	1.62; 2.05	pho; ino; glycerol; C17:0; C18:1	PI
M₆	851.5657; 851.5663	100.00; 100.00	0.27; 0.90	pho; ino; glycerol; C16:0; C19:0	PI
M₇	863.5663; 863.5668	1.97; 2.08	0.93; 1.49	pho; ino; glycerol; C18:0; C18:1	PI
M₈	865.5826; 865.5834	1.78; 1.98	1.62; 2.56	pho; ino; glycerol; 2 × C18:0	PI
M₉	879.5971; 879.5977	0.42; 0.40	0.38; 1.07	pho; ino; glycerol; C18:0; C19:0	PI
M₁₀	1139.7502; 1139.7525	2.41; 3.14	nicht berechnet	-	nicht zugeordnet, kein PIM
M₁₁	1175.6674; 1175.6688	0.75; 0.77	3.17; 2.03	pho; ino; glycerol; 2 × hex; C16:0; C19:0	PIM ₂
M₁₂	1403.9927; 1403.9943	5.16; 6.04	nicht berechnet	-	nicht zugeordnet, kein PIM
M₁₃	1413.8997; 1413.9024	8.56; 8.88	0.79; 1.11	pho; ino; glycerol; 2 × hex; 2 × C16:0; C19:0	AcPIM ₂
M₁₄	1441.9331; 1441.9352	1.75; 2.06	0.66; 2.13	pho; ino; glycerol; 2 × hex; C16:0; C18:0; C19:0	AcPIM ₂
M₁₅	1694.1830; 1694.1852	0.43; 0.39	3.28; 4.56	pho; ino; glycerol; 2 × hex; 2 × C16:0; 2 × 19:0	Ac ₂ PIM ₂
M₁₆	2062.1161; 2062.1286	0.52; 0.63	1.93; 8.01	pho; ino; glycerol; 6 × hex; 2 × C16:0; C19:0	AcPIM ₆

Tabelle 7: Massenspektrometrische Bestimmung der dominierenden PI- und PIM-Spezies der Chloroformphasen der Bligh-Dyer Extrakte (ESI FT-ICR-Massenspektrum) von Mtb H37Rv und Mtb H37RvΔRv1500

Die gemessenen Masse-Ladungszahlen entsprechen dem monoisotopischen Signal des einfach geladenen, deprotonierten Molekül-Ions ([M-H]⁻); die relativen Abundanzen wurden aus der Intensität des signalstärksten isotopischen Signals eines jeden Moleküls berechnet, indem sie mit dem höchsten Signal der Messung (M₆) in Relation gesetzt wurden; die Massengenauigkeit wurde aus dem theoretischen Wert der abgeleiteten Zusammensetzung ermittelt; Abkürzungen: pho, phosphoryl; ino, inositol; glycerol, glyceryl; hex, hexoses; C_n:x, Acylgruppen; n, Anzahl der Kohlenstoffatome; x, Anzahl der Doppelbindungen.

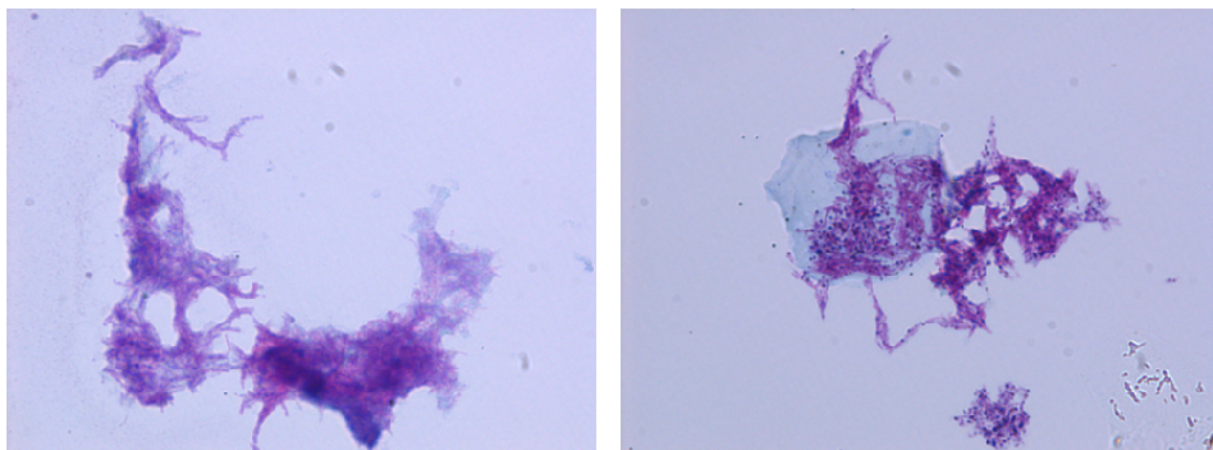
und M_{16} . Die Signale M_{11} und M_{14} entsprechen PIM_2 mit einer C16:0 und einer C19:0 und $AcPIM_2$ mit den Fettsäuren C16:0, C18:0 und C19:0. Die Masse-Ladungszahlen von M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , M_5 , M_7 , M_8 und M_9 unterscheiden sich in Inkrementen von 14.016 oder 2.016. Das liegt an der Variation der Fettsäurezusammensetzung, wie zum Beispiel der Kettenlänge und der Anzahl der Doppelbindungen, sowie der Anzahl der Fettsäuren mit dem das PI substituiert ist. Die molekulare Zusammensetzung, die sich aus den ermittelten Massen ableiten lässt, ist in Tabelle 7 dargestellt. Bei M_1 handelt es sich um PI substituiert mit einer C19:0 Fettsäure. M_2 , M_3 , M_4 , M_5 , M_7 , M_8 , und M_9 sind zweifach acylierte PI Spezies. Sie sind mit einer C16:0 und einer C17:0, einer C16:0 und einer C18:1, einer C17:0 und einer C18:2, einer C17:0 und einer C18:1, einer C18:0 und einer C18:1, zwei C18:0, beziehungsweise einer C18:0 und einer C19:0 verestert. Die Molekül-Ionen, die den Masse-Ladungszahlen M_{10} und M_{12} entsprechen, können auf Grundlage der Messdaten nicht zugeordnet werden. Weiterführende MS/MS-Experimente legen nahe, dass es sich um eine lipidähnliche Struktur handelt, bei der es sich jedoch nicht um PIM handeln kann. Neben den hier beschriebenen Substanzen waren andere Verbindungen nur in geringer Quantität nachweisbar, von deren Massen keine den rechnerisch ermittelten Massen von Ac_2PIM_5 oder Ac_2PIM_7 entsprach.

Bei der Untersuchung der Lipidextrakte konnten sowohl für *M. tuberculosis* H37Rv als auch für *M. tuberculosis* H37Rv Δ Rv1500 PI, PIM_2 und unterschiedlich acyliertes $AcPIM_2$ sowie Ac_2PIM_2 und $AcPIM_6$ in gleicher Quantität nachgewiesen werden. Ac_2PIM_7 oder Ac_2PIM_5 konnten in einem Fall detektiert werden.

5.1.3 Färbeverhalten der Rv1500 Deletionsmutante in der Säurefesten-Färbung nach Ziehl-Neelsen

Da für die Deletionsmutante *M. tuberculosis* H37Rv Δ Rv1500 bisher kein PIM-vermittelter Phänotyp nachweisbar war, ergab sich die Frage, ob Rv1500 für eine Glykosyltransferase codiert, die an der Synthese anderer Zellwandkomponenten beteiligt ist. Eine Veränderung in der Zellwandkomposition im Allgemeinen könnte sich auf die Zellwandintegrität und das Färbeverhalten auswirken. Daher wurde nun ein Ansatz verfolgt, der etwas unspezifischer eine mögliche Veränderung der Mutante in diesem Bereich enthüllen sollte.

Zunächst wurden Wildtyp und Mutante in der Färbung nach Ziehl-Neelsen verglichen (Abbildung 9). Die Präparate zeigen deutlich, dass sowohl die Mutante als auch der Wildtyp säurefest sind und somit rot gefärbt sind. Auch die für *M. tuberculosis* typischen kordelartigen Aggregate sind bei beiden Stämmen deutlich zu erkennen.



M. tuberculosis H37Rv

M. tuberculosis H37Rv Δ Rv1500

Abbildung 9: *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis* H37Rv Δ Rv1500 gefärbt nach Ziehl-Neelsen

Lichtmikroskopische Aufnahme, 1000 \times vergrößert

5.1.4 Untersuchung der Kolonimorphologie von *M. tuberculosis* H37Rv Δ Rv1500 auf Kongo-Rot-haltigen Nährböden

Die Überexpression der Glykosyltransferase Gtf3, die an der Glykosylierung von Glykopeptidolipiden beteiligt ist, führte in *M. smegmatis* zu einer Veränderung der Kolonimorphologie auf Kongo-Rot-haltigen Nährböden (Deshayes *et al.*, 2005). Auch für einige Stämme des *M. avium-intracellulare*-Komplexes wurden unterschiedliche Morphotypen auf Kongo-Rot-haltigen Agarplatten nachgewiesen (Cangelosi *et al.*, 1999). Kongo-Rot scheint als Farbstoff also dafür geeignet zu sein,

die Variabilität verschiedener Stämme aufgrund von Unterschieden in oberflächlich exponierten Makromolekülen zu detektieren.

Daher wurden Kongo-Rot-haltige Nährböden punktuell mit einer Bakteriensuspension inokuliert und die Morphologie makroskopisch gemustert. Sowohl der Wildtyp als auch die Mutante erschienen rot mit einer rauen und trockenen Textur (Abbildung 10). Auch hier war kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und Mutante zu erkennen.

Abbildung 10: Koloniemorphologie von *M. tuberculosis* H37Rv Δ Rv1500 und *M. tuberculosis* H37Rv auf Kongo-Rot-haltigen Nährböden

Wachstum von *M. tuberculosis* H37Rv Wildtyp und Rv1500 Deletionsmutante auf 7H10-Agarplatten supplementiert mit Kongo-Rot ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$); jeweils $2 \mu\text{l}$ Bakteriensuspension aus der späten exponentiellen Wachstumsphase wurden punktuell aufgetragen und die Nährböden bei 37°C inkubiert.



5.1.5 Charakterisierung der Rv1500 Deletionsmutante unter Detergenz-Stressbedingungen

Eine Veränderung in der Zusammensetzung von Strukturkomponenten könnte sich auf die Integrität der Zellwand und damit auch auf die Resistenz gegen Stressbedingungen wie die Anwesenheit von Detergenzien im Nährmedium auswirken. Aus diesem Grund wurde der Effekt von SDS auf die Replikationsrate und Viabilität untersucht. So wurden Wildtyp und Mutante in 7H9-Medium mit 0,02 %, 0,1 % und ohne SDS als Kontrolle inkubiert und an Tag 0, 1, 2, 4, 5, 7, 8 und 9 die optische Dichte bei 600 nm gemessen (Abbildung 11). Die Mutante zeigte wie der Wildtyp in den Kontrollansätzen ohne SDS den charakteristischen Verlauf einer bakteriellen Wachstumskurve: Nach einer kurzen Anlaufphase bis Tag 1 folgte eine stabile exponentielle Wachstumsphase bis etwa Tag 5. Dann setzte eine Verlangsamung der Replikation bis zum Beginn der stationären Phase an Tag 7 ein. Die Replikationsrate beider Stämme in Anwesenheit von 0,02 % SDS war etwa halb

so hoch. Über den Verlauf des Experimentes lassen sich nicht die charakteristischen Phasen der zuvor beschriebenen Wachstumskurve erkennen. Das Wachstum erreichte Maximalwerte von etwa 1,0 an Tag 9 im Gegensatz zur Kontrollkurve, die an Tag 9 Werte von etwa 1,6 erreichte. Bei einer SDS-Konzentration von 0,1 % fand kein bakterielles Wachstum mehr statt. Unter den genannten drei Bedingungen verhält sich *M. tuberculosis* H37Rv Δ Rv1500 wie der Wildtyp.

Um abschätzen zu können wie sich die Anwesenheit von SDS im Nährmedium auf die Viabilität von Mutante und Wildtyp auswirkt, wurde zusätzlich eine Lebendkeimzahlbestimmung durchgeführt. So wurden an Tag 4 Aliquots der Kulturen mit 0,1 % SDS verdünnt und ausplattiert, um die koloniebildenden Einheiten zu bestimmen (Abbildung 12). Als Kontrolle wurden die Ansätze verwendet, die nicht mit SDS supplementiert waren. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante. Die Differenz zwischen den Ansätzen mit und ohne SDS beträgt etwa 1×10^2 KBE ml⁻¹ bei einem Gesamtniveau von etwa 1×10^8 KBE ml⁻¹ für die Kontrollansätze und 1×10^6 KBE ml⁻¹ für die Ansätze mit 0,1 % SDS.

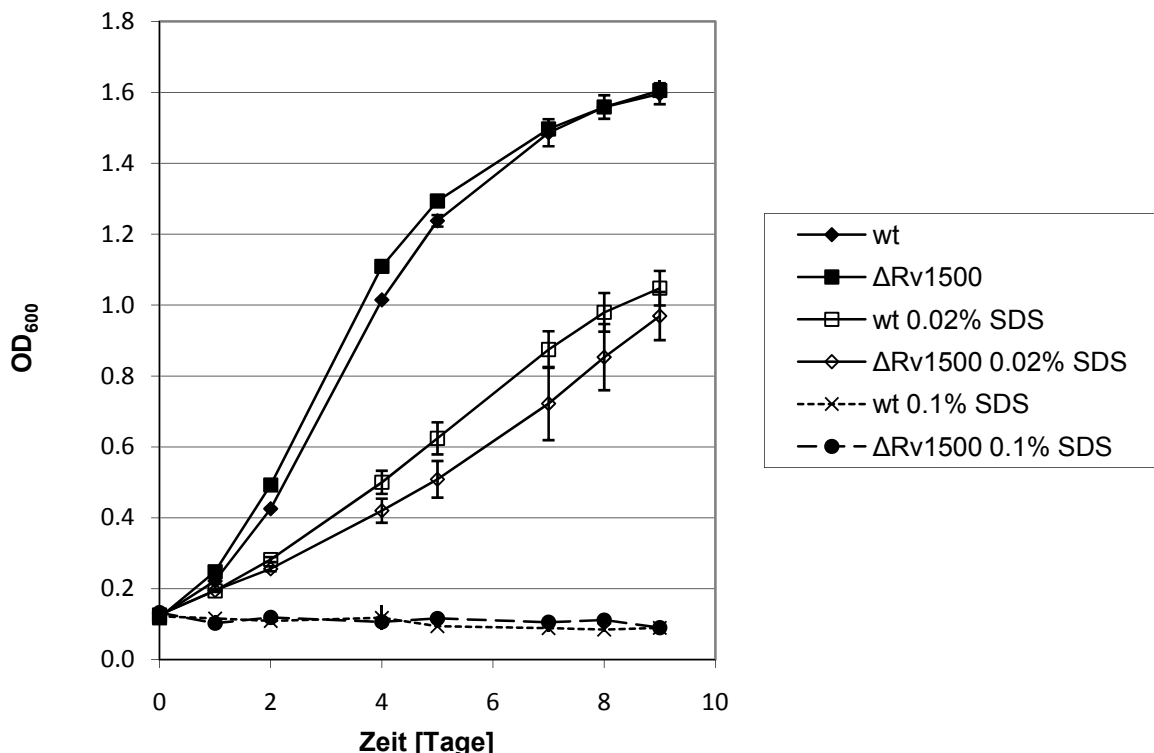


Abbildung 11: Wachstumskurve von *M. tuberculosis* H37Rv Δ Rv1500 und *M. tuberculosis* H37Rv unter Detergenz-Stressbedingungen

M. tuberculosis H37Rv Δ Rv1500 und *M. tuberculosis* H37Rv wurden in 7H9-Medium mit 0,02 %, 0,1 %, beziehungsweise ohne SDS kultiviert und die optische Dichte bei 600 nm bestimmt; pro Messpunkt wurden Mittelwerte aus Doppelbestimmungen gebildet; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

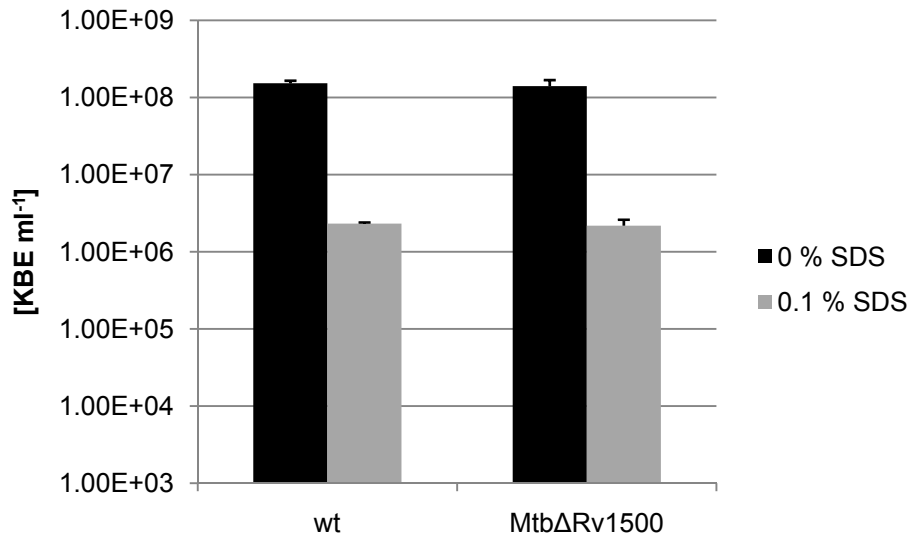


Abbildung 12: Lebendkeimzahlbestimmung unter SDS-Stressbedingungen

Lebendkeimzahlbestimmung der Rv1500 Deletionsmutante und des Wildtyps unter Detergenz-Stressbedingungen; koloniebildende Einheiten wurden in Ansätzen mit 0,1 % SDS und ohne SDS als Kontrolle an Tag 4 bestimmt, indem Aliquots verdünnt und auf 7H10-Agarplatten ausplattiert wurden; der Grafik zu Grunde liegen Mittelwerte von Doppelbestimmungen; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

5.1.6 Bestimmung der Neutralzucker

Eine quantitative Neutralzuckerbestimmung sollte mögliche Unterschiede in der Zusammensetzung der hauptsächlich vorhandenen Neutralzucker der Zellen der Mutante im Vergleich zu denen des Wildtyps enthüllen. Die Blockade in einem Stoffwechselweg zur Glykosylierung von Zellwandkomponenten könnte sich schließlich durch Rückkopplung auf die Konzentration der Zucker auswirken.

Die Zucker Arabinose, Mannose, Glukose und Galaktose waren in detektierbaren Konzentrationen in den Proben vorhanden. Die quantitative Auswertung der Ergebnisse ergab für *M. tuberculosis* H37Rv folgende Konzentrationen: Arabinose 419,9 nmol mg⁻¹, Mannose 329,5 nmol mg⁻¹, Glukose 494,3 nmol mg⁻¹ und Galaktose 182,9 nmol mg⁻¹. Für *M. tuberculosis* H37RvΔRv1500 wurden entsprechend die Konzentrationen Arabinose 377,1 nmol mg⁻¹, Mannose 280,2 nmol mg⁻¹, Glukose 465,8 nmol mg⁻¹ und Galaktose 139,2 nmol mg⁻¹ ermittelt. Die Untersuchung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,02$ (Abbildung 13).

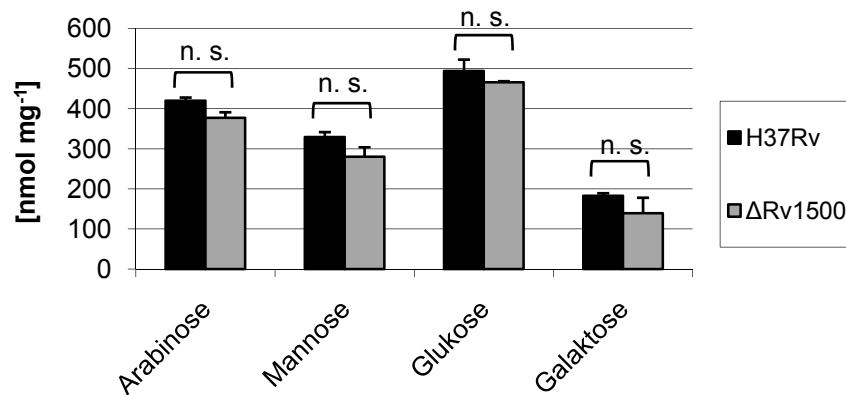


Abbildung 13: Neutralzuckerbestimmung von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis* H37RvΔRv1500

Lyophilisierte Proben wurden mit 0,1 M HCl hydrolysiert, mit NaBH₄ reduziert und acetyliert; anschließend wurden die Zucker mittels GC-MS analysiert; die Quantifizierung erfolgte rechnerisch aus der Integration der entsprechenden Signale; die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an; die Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante sind nicht signifikant (n.s.) (t-Test, Signifikanzniveau $\alpha = 0,02$).

5.1.7 Nachweis von Rv1500 auf mRNA-Ebene in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Da die Deletion von Rv1500 keinen Effekt auf das Glykolipidexpressionsprofil und die PIM-Synthese, sowie die immunogenen Eigenschaften der Bakterien und das Infektions- und Replikationsverhalten *in vivo* hat, ergab sich die Frage, ob Rv1500 im Wildtyp exprimiert wird. Daher wurde der Nachweis von Rv1500 auf mRNA-Ebene geführt. Abbildung 14A zeigt klar ein Transkript für Rv1500 in *M. tuberculosis* H37Rv. Darüber hinaus konnte durch die Extraktion der RNA, cDNA-Synthese und anschließender PCR mit dem Coint-Primer-Paar ein verkürztes Transkript für die

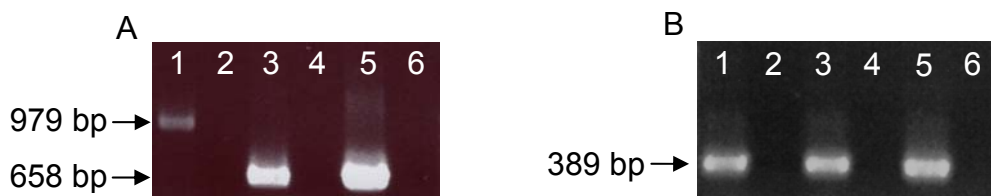


Abbildung 14: Detektion der Rv1500 mRNA-Expression durch cDNA-Synthese und PCR-Analyse

(A) PCR mit Primer-Paar Coint-1 und Coint-2 (B) PCR mit Primer-Paar Rv1500-1 und Rv1500-2; jeweils: Spur 1 *M. tuberculosis* H37Rv, Spur 2 *M. tuberculosis* H37Rv „no RT-Kontrolle“, Spur 3 *M. tuberculosis* H37RvΔRv1500, Spur 4 *M. tuberculosis* H37RvΔRv1500 „no RT-Kontrolle“, Spur 5 PCR Positivkontrolle (pSMA28), Spur 6 PCR Negativkontrolle.

Mutante nachgewiesen werden. Rv1500 wird sehr wahrscheinlich mit Rv1501 kotranskribiert, weil der Primer Coint-2 innerhalb dieses Gens bindet. Für die PCR mit der Wildtyp-cDNA wurde ein Produkt von 979 bp, für die Deletionsmutante ein Produkt von 658 bp erwartet. Dieses Ergebnis wurde durch eine weitere PCR mit dem Primer Paar Rv1500-1 und Rv1500-2 bestätigt (Abbildung 14B). Hier resultierte die Amplifikation in einem Produkt von 389 bp sowohl für den Wildtyp als auch für die Mutante. Zusätzlich wurde Rv1500 sequenziert, um eine Mutation in dem Gen des *M. tuberculosis* H37Rv-Laborstammes auszuschließen.

5.1.8 Charakterisierung von *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Δ Rv1500 in Makrophagen und im Maus-Infektionsmodell der Tuberkulose*

**Die dem Kapitel 5.1.8 zu Grunde liegenden Daten wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Stefan Ehlers, Forschungszentrum Borstel, im Rahmen einer Kooperation generiert.*

Als Konsequenz der Inaktivierung eines potentiell an der Synthese von Zellwandkomponenten beteiligten Gens könnte, wie zum Teil für die *M. marinum* Mutante von Alexander *et al.* gezeigt worden ist (Alexander *et al.*, 2004), die Invasivität für Makrophagen herabgesetzt, die Fähigkeit zur Induktion zur Freisetzung bestimmter Zytokine verändert oder die Mutante im Maus-Infektionsmodell attenuiert sein. Mögliche Effekte in diesem Zusammenhang wurden auch für die Rv1500 Deletionsmutante von *M. tuberculosis* in Betracht gezogen und experimentell abgeklärt.

Zunächst wurde die Aufnahme und Replikationsfähigkeit der Bakterien in Makrophagen untersucht. Dazu wurden aus dem Knochenmark isolierte Makrophagen mit der Mutante und dem Wildtyp infiziert. Es wurde eine Lebendkeimzahlbestimmung vier Stunden nach der Infektion vorgenommen, um die Invasivität abschätzen zu können. Nach sechs Tagen wurde die intrazelluläre Bakteriendichte erneut bestimmt, um ein Maß für die Replikationsfähigkeit zu erhalten. Die Aufnahme der Mutante in Makrophagen war effizienter als die Aufnahme des Wildtyps. Die intrazelluläre Replikationsrate war jedoch bei beiden Stämmen gleich (Abbildung 15A).

Als nächstes wurde die Zytokin-Induktion durch *M. tuberculosis* H37Rv Δ Rv1500 mit der des Wildtyps verglichen. Wie aus Abbildung 15B hervorgeht, produzierten

infizierte Makrophagen nach vier und 24 Stunden gleiche Mengen TNF- α als Antwort auf die Infektion mit beiden Stämmen. Auch die IL12p40 Produktion nach Infektion mit unterschiedlichen MOI zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante (Abbildung 15C).

Im Maus-Infektionsmodell wurde untersucht, ob die Deletion von Rv1500 einen Effekt auf die Virulenz von *M. tuberculosis* in einer komplexeren *in vivo* Infektionssituation hat. C57BL/6 Mäuse wurden via Aerosol mit Wildtyp und Mutante infiziert und die Lebendkeimzahl in der Lunge im Infektionsverlauf bestimmt. Beide Stämme zeigten den für *M. tuberculosis* typischen Infektionsverlauf. Nach einer exponentiellen

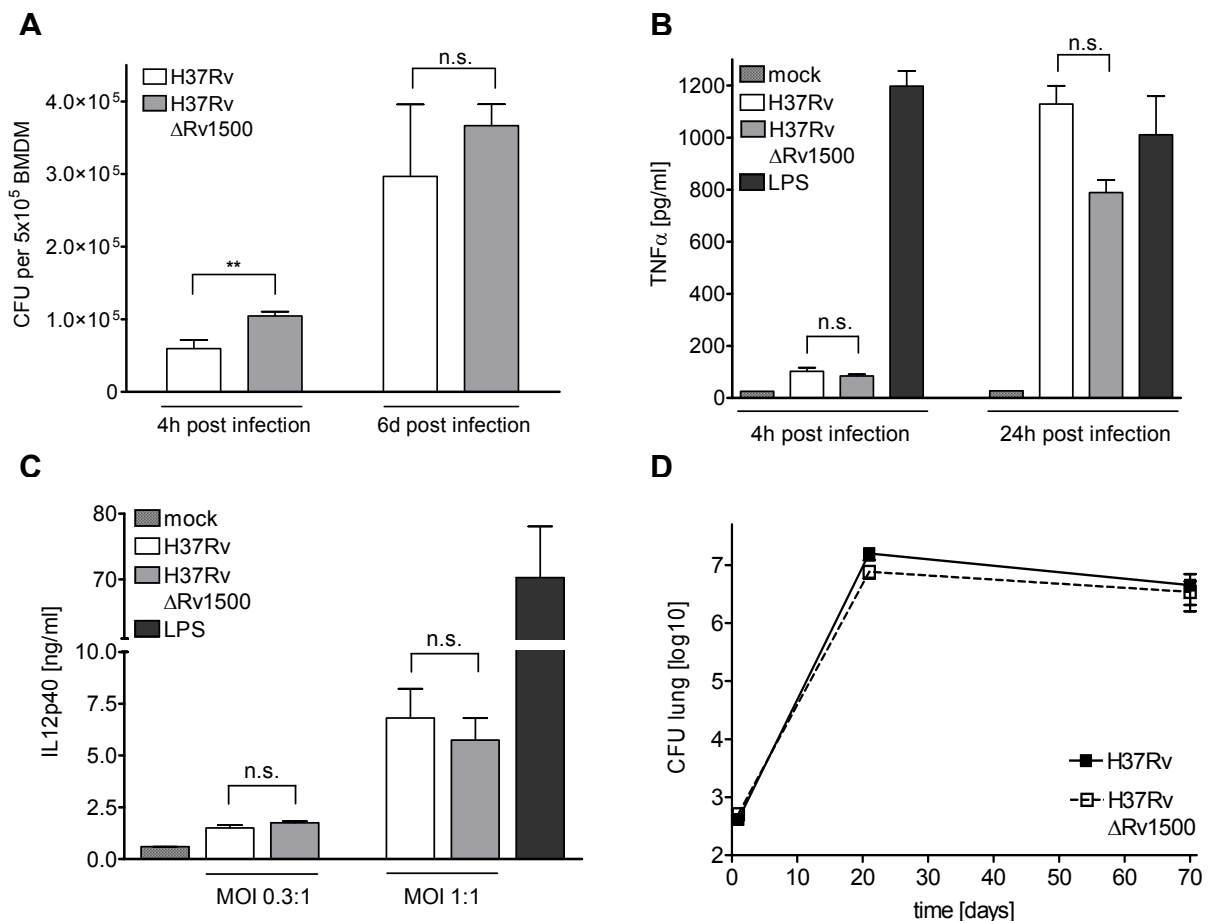


Abbildung 15: Induktion der Cytokin-Induktion durch *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis* H37Rv Δ Rv1500 *in vitro* und Replikationsfähigkeit im Maus-Infektionsmodell

(A) Aufnahme und Replikation des Wildtyps (bestätigte MOI 0,4:1) und der Mutante (bestätigte MOI 0,6:1) in Knochenmark-Makrophagen (B) TNF- α Sekretion von Knochenmark-Makrophagen, die mit LPS, Wildtyp und Mutante (MOI 3:1) stimuliert wurden oder nicht stimuliert wurden (Negativkontrolle) (C) IL12p40 Sekretion von Knochenmark-Dendritischen Zellen stimuliert mit LPS, Wildtyp und Mutante (MOI 0,3:1 und MOI 1:1) und unstimuliert (Negativkontrolle) (D) Lebendkeimzahlbestimmung aus der Lunge mit Wildtyp und Mutante aerosolinfizierter C57BL/6 Mäuse. Infektionsdosen: 417 CFU für den Wildtyp und 508 CFU für die Mutante; Abkürzungen: CFU, colony forming units (koloniebildende Einheiten); h, hours (Stunden); d, days (Tage); MOI, multiplicity of infection; n.s., nicht signifikant; *p \leq 0,05; **p \leq 0,005.

Wachstumsphase zu Beginn des Versuchs erreichte die Replikationsrate ein Plateau nach drei Wochen und Persistenz auf diesem Niveau bis Tag 70 (Abbildung 15D). Histopathologische Präparate zeigten für beide Stämme die gleiche Kinetik und das gleiche Ausmaß granulomatöser Veränderungen.

5.2 Deletion von *hddA* in *M. tuberculosis* H37Rv und Charakterisierung der Deletionsmutante

5.2.1 Genomische Situation und Generierung der Deletionsmutante

HddA als mögliche Phospho-Kinase mit Bedeutung für die GDP-Aktivierung von D-Glycero-D-manno-heptose wurde ausgewählt, um strukturelle Auswirkungen potentieller Glykosylierungsdefekte zu identifizieren. In Abbildung 16 ist die genomische Situation um das Gen *hddA* (Rv0115) schematisch dargestellt. Der abgebildete Bereich umfasst 6 kb. *hddA* ist höchstwahrscheinlich mit *gmhA* (Rv0113) und *gmhB* (Rv0114) und eventuell auch *gca* (Rv0112) in einem Operon organisiert, zumal sich das Stopp-Codon von *gmhB* und das Start-Codon von *hddA* die letzte beziehungsweise erste Base teilen. Die Organisation in einem Operon erscheint vor dem Hintergrund sinnvoll, dass für *gmhA*, *gmhB* und *hddA* Funktionen in dem gleichen Stoffwechselweg postuliert wurden. Für GmhA wurde die Funktion einer Sedoheptulose-7-phosphat-Isomerase, für GmhB die Funktion einer D- α,β -D-Heptose-1,7-bisphosphat-Phosphatase postuliert (Valvano *et al.*, 2002). Von Gca wird angenommen, dass es sich um eine GDP-D-Mannose-Dehydratase handelt (Cole *et al.*, 1998).

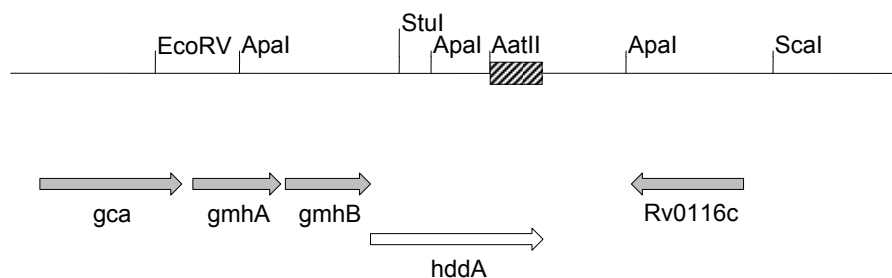
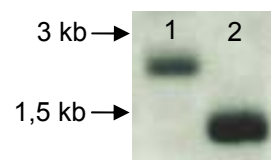


Abbildung 16: Schematische Darstellung von 6 kb genomischer Sequenz um den *hddA*-Genort
Das *EcoRV/Scal*-Fragment wurde subkloniert und für die weiteren Klonierungsschritte verwendet; ein 612 bp umfassendes *Stul/AatII*-Fragment von *hddA* wurde *in frame* deletiert; der Southern Blot zur Bestätigung der Deletion wurde mit *Apal*-verdauter genomischer DNA durchgeführt; die Sonde für die Southern Blot-Hybridisierung ist als schraffierte Box dargestellt.

Abbildung 17: Southern Blot zur Bestätigung der Deletion von *hddA* in *M. tuberculosis* H37Rv

Spur 1 *M. tuberculosis* H37Rv Δ *hddA*, Spur 2 *M. tuberculosis* H37Rv; die genomische DNA wurde mit *Apal* verdaut; für die Mutante wurde eine Bande bei 2599 bp, für den Wildtyp bei 1311 bp erwartet.

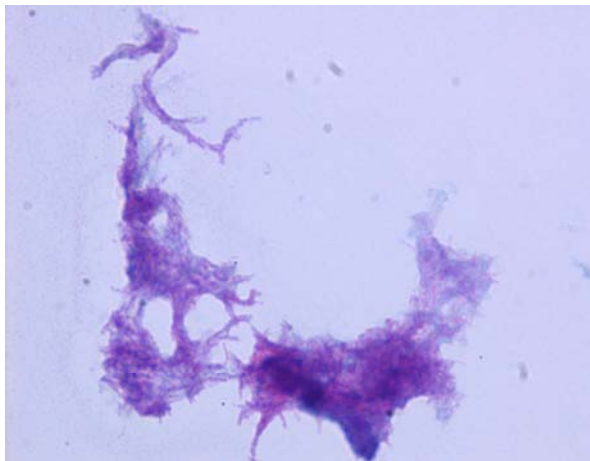


Die Deletion in *hddA* umfasst 612 bp und verursacht keine Verschiebung des Leserahmens. Der Genotyp wurde mittels PCR- und Southern Blot-Analyse bestätigt. Die genomische DNA wurde für den Southern Blot mit dem Restriktionsenzym *Apal* verdaut. Dieser Verdau resultierte für den Wildtyp in einem Fragment von 1311 bp und für die Deletionsmutante in einem Fragment von 2599 bp, die mit der entsprechenden Sonde im Blot detektiert wurden (Abbildung 17).

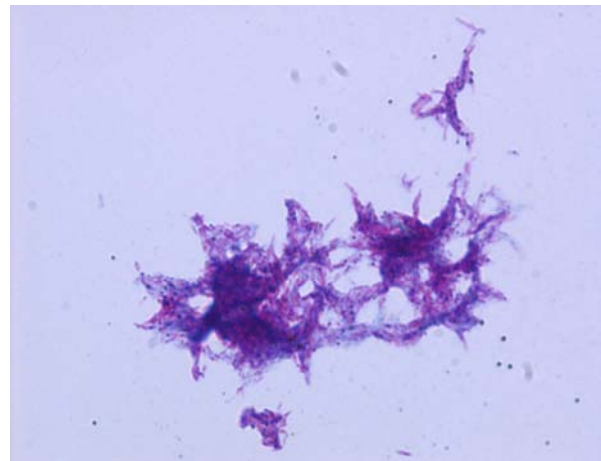
5.2.2 Lichtmikroskopische Charakterisierung der *hddA*-Deletionsmutante

Die Säurefestigkeit in der Ziehl-Neelsen-Färbung wird durch die typische Struktur der mykobakteriellen Zellwand verursacht. Daher wurde zunächst auch die *hddA*-Deletionsmutante von *M. tuberculosis* H37Rv auf ihre Säurefestigkeit geprüft.

Die Betrachtung der Präparate bei 1000 × Vergrößerung zeigte säurefeste Bakterien, die kordelartig aggregiert waren (Abbildung 18). *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis* H37Rv Δ *hddA* glichen sich in dieser Eigenschaft in mehreren Präparationen. Die Säurefestigkeit und Fähigkeit zur Aggregatbildung wurde durch die Inaktivierung des Gens *hddA* nicht verändert.



M. tuberculosis H37Rv



M. tuberculosis H37Rv Δ *hddA*

Abbildung 18: Ziehl-Neelsen-Färbung von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. tuberculosis* H37Rv Δ *hddA*

Lichtmikroskopische Aufnahme; 1000 × vergrößert

5.2.3 Elektronenmikroskopie

Nukleotid-aktivierte Heptosen konnten bei verschiedenen Mikroorganismen in unterschiedlichen zellwandassoziierten Strukturen nachgewiesen werden (Valvano *et al.*, 2002). Ein Beispiel hierfür wäre die Kapsel, die elektronenmikroskopisch darstellbar ist. Daher wurden *M. tuberculosis* H37Rv Δ *hddA* und *M. tuberculosis* H37Rv für die Elektronenmikroskopie fixiert und untersucht.

Die Abbildung 19 zeigt mehrere repräsentative Aufnahmen der Deletionsmutante und des Wildtyps. Man erkennt stäbchenförmige Zellen, die häufig zu Aggregaten zusammengelagert sind. Man sieht sowohl bei der Mutante als auch beim Wildtyp punktuell aufgelagerte Strukturen, die gleichmäßig auf der Oberfläche der Zellen verteilt sind. Bei gleicher Durchführung der Präparation der bakteriellen Zellen zeigt die Mutante jedoch deutlich kleinere Auflagerungen. Die Textur der Oberfläche erscheint bei der *hddA*-Deletionsmutante glatter.

5.2.4 Wachstum von *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Δ *hddA* und *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv auf mit Kongo-Rot supplementierten Nährböden

Wie in Kapitel 5.1.4 beschrieben, kann ein verändertes Glykosylierungsmuster von exponierten Molekülen eine alterierte Koloniemorphologie auf Kongo-Rot-haltigen Nährböden zur Folge haben. Daher wurde auch die *hddA*-Deletionsmutante von *M. tuberculosis* H37Rv hinsichtlich ihrer Morphologie auf solchen Agar-Platten untersucht.

Es wurden analog zu dem unter 5.1.4 beschriebenen Versuch Kongo-Rot-haltige Nährböden punktuell mit *M. tuberculosis* H37Rv Δ *hddA* und *M. tuberculosis* H37Rv inokuliert und die Morphologie begutachtet. Sowohl der Wildtyp als auch die Mutante erschienen rot mit einer rauen und trockenen Textur (Abbildung 20).

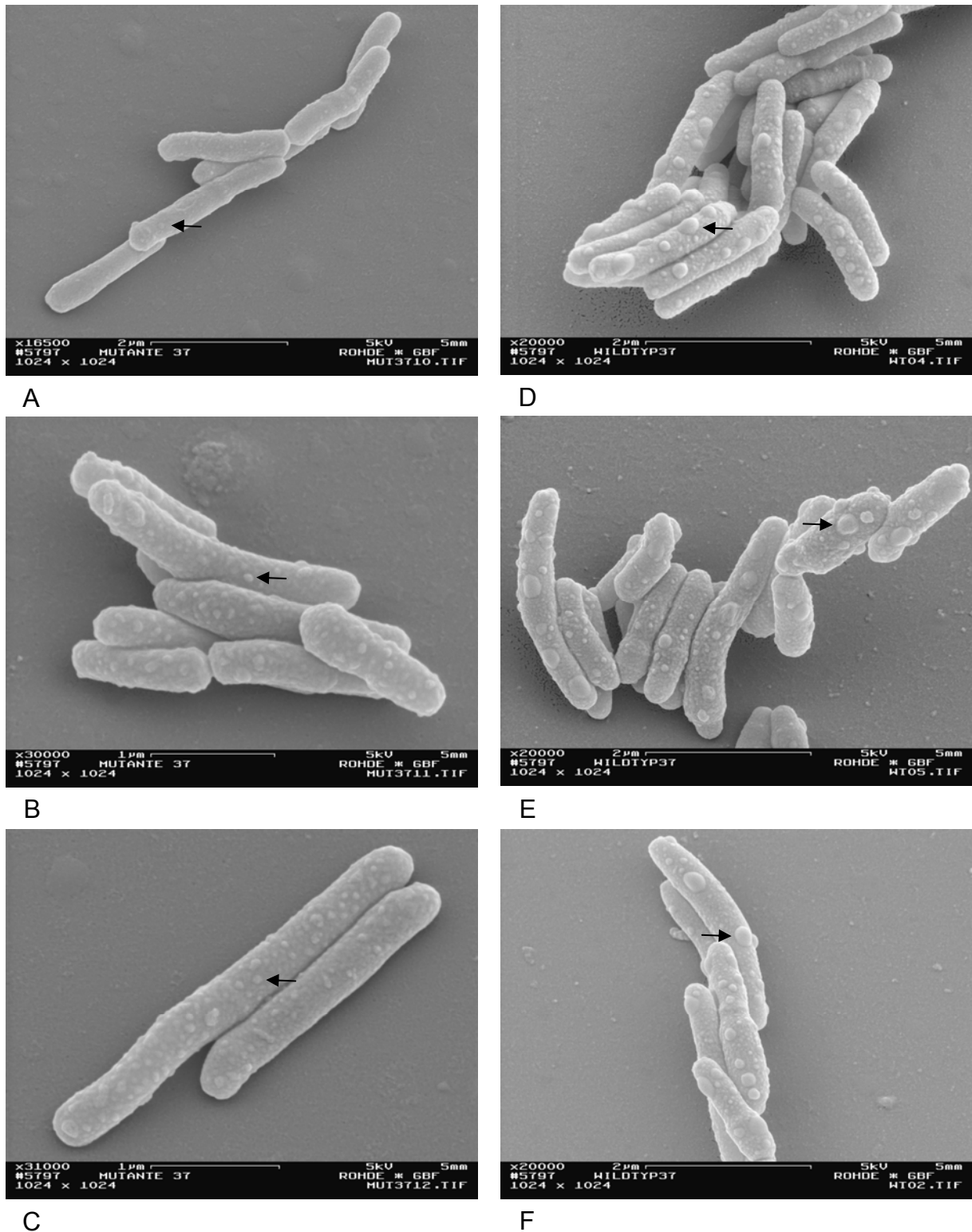


Abbildung 19: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *M. tuberculosis* H37Rv Δ *hddA* und *M. tuberculosis* H37Rv

Die Abbildungen 19A-C zeigen die *hddA*-Deletionsmutante von *M. tuberculosis*, die Abbildungen 19D-F den Wildtyp; die Pfeile weisen exemplarisch auf einige der Auflagerungen; ein Größenmaßstab ist jeweils unten im Bild angezeigt.

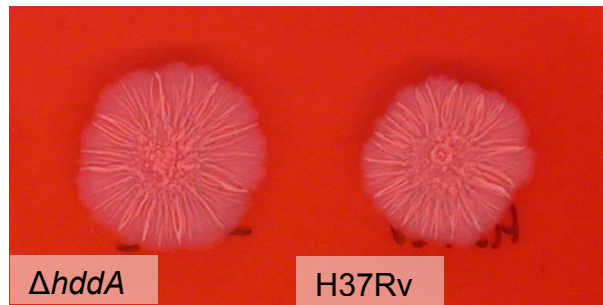


Abbildung 20: Koloniemorphologie von *M. tuberculosis* H37RvΔ*hddA* auf Kongo-Rot-haltigen Nährböden

Wachstum von *M. tuberculosis* H37RvΔ*hddA* und Wildtyp auf 7H10-Agarplatten supplementiert mit Kongo-Rot ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$); jeweils $2 \mu\text{l}$ Bakteriensuspension aus der späten exponentiellen Wachstumsphase wurden punktuell aufgetragen und die Nährböden bei 37°C inkubiert.

5.2.5 Sensitivität von *Mycobacterium tuberculosis* H37RvΔ*hddA* gegenüber Detergenz

Da die Ergebnisse aus den elektronenmikroskopischen Untersuchungen die anfängliche Hypothese, dass *hddA* bei *M. tuberculosis* eine Rolle bei der Synthese von Oberflächenstrukturen spielt, zunächst untermauert, wurde auch die *M. tuberculosis* H37RvΔ*hddA* Mutante in hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber SDS getestet.

Die Aufnahme von Wachstumskurven von Mutante und Wildtyp in Gegenwart von 0,01 %, 0,04 % und 0,1 % SDS sollte zunächst einen Effekt der Mutation auf die Replikationsrate der Bakterien *in vitro* klären (Abbildung 21). Als Wachstumskontrolle wurden Ansätze ohne Supplementierung mit SDS mitgeführt. Über einen Zeitraum von sieben Tagen zeigten sowohl die Mutante als auch der Wildtyp bei einer Konzentration von 0,01 % SDS im Nährmedium vergleichbare Replikationsraten. Die Wachstumskurven bei dieser Konzentration glichen denen der Wachstumskontrollen und ließen sowohl eine Anlaufphase, eine exponentielle Wachstumsphase als auch den Beginn der stationären Phase erkennen. An Tag 7 wurde eine optische Dichte bei 600 nm von etwa 1,4 bis 1,5 erreicht. Bei Konzentrationen von 0,04 % SDS und 0,1 % SDS war kein bakterielles Wachstum zu detektieren. Kulturen, deren SDS-Konzentration bei 0,04 % lag, verblieben stationär bis Tag 7 auf einem leicht höheren Niveau als die Kulturen, die mit 0,1 % SDS supplementiert waren. Die Wachstumskurven der *hddA*-Deletionsmutante und des Wildtyps waren unter allen Bedingungen annähernd deckungsgleich.

Um zu klären, wie sich die unterschiedlichen SDS-Konzentrationen auf die Viabilität der Bakterien auswirken, wurde eine Lebendkeimzahlbestimmung analog zu den zuvor beschriebenen Versuchsbedingungen an Tag 4 durchgeführt (Abbildung 22). Die Wachstumskontrollen erreichten während dieses Versuchs Werte von etwa 1×10^7 KBE ml^{-1} . Auf einem ähnlichen hohen Niveau waren die Werte für die Ansätze mit 0,01 % SDS. Die Mutante erreichte in Gegenwart von 0,04 % SDS noch etwa $1,2 \times 10^5$ KBE ml^{-1} und der Wildtyp etwa $3,3 \times 10^5$ KBE ml^{-1} . Etwas niedriger waren die Werte für die Ansätze mit einer SDS-Konzentration von 0,1 %. Sie lagen bei $1,4 \times 10^4$ KBE ml^{-1} für *M. tuberculosis* H37Rv Δ hddA und $6,3 \times 10^4$ KBE ml^{-1} für *M. tuberculosis* H37Rv. Zwischen Mutante und Wildtyp bestand kein signifikanter Unterschied (t-Test, $\alpha = 0,05$). Diese Daten sind in Übereinstimmung mit den Verläufen der Wachstumskurven aus Abbildung 21.

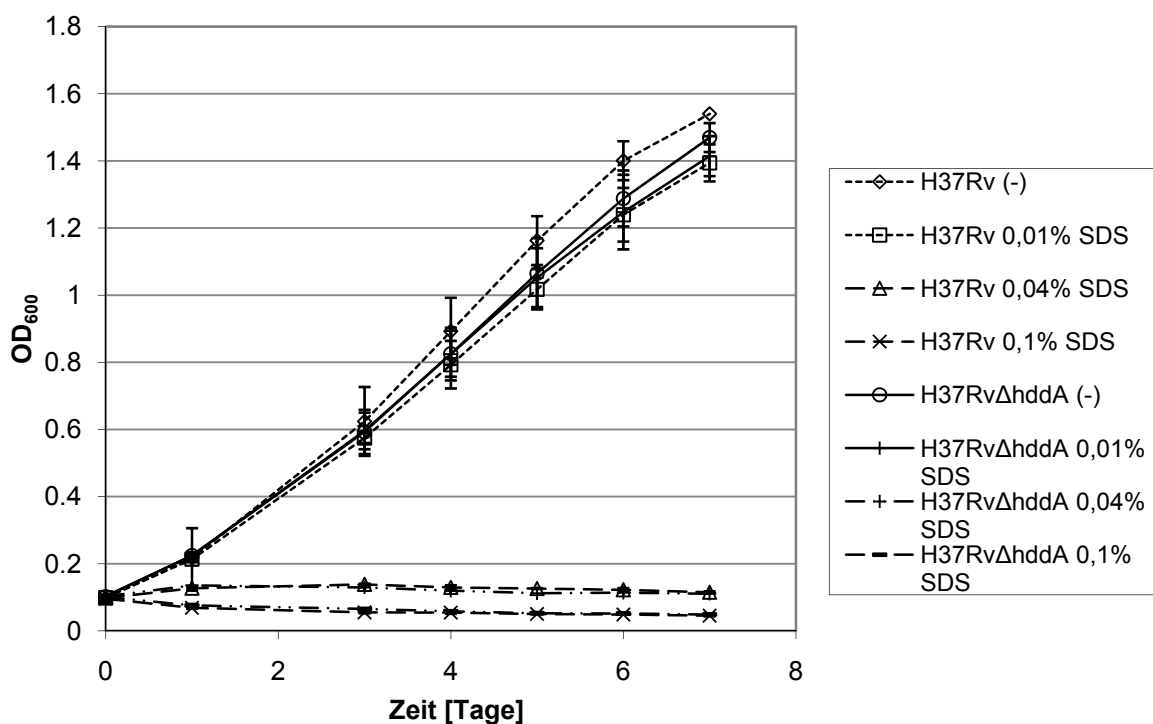


Abbildung 21: Wachstumskurven von *M. tuberculosis* H37Rv Δ hddA und *M. tuberculosis* H37Rv unter Detergenz-Stressbedingungen

Bakteriensuspensionen der Mutante und des Wildtyps in 7H9-Medium wurden mit 0,01 %, 0,04 %, beziehungsweise 0,1 % SDS versehen und die optische Dichte bei 600 nm an Tag 0, 1, 3, 4, 5, 6 und 7 gemessen; als Wachstumskontrolle wurden Ansätze ohne SDS mitgeführt; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

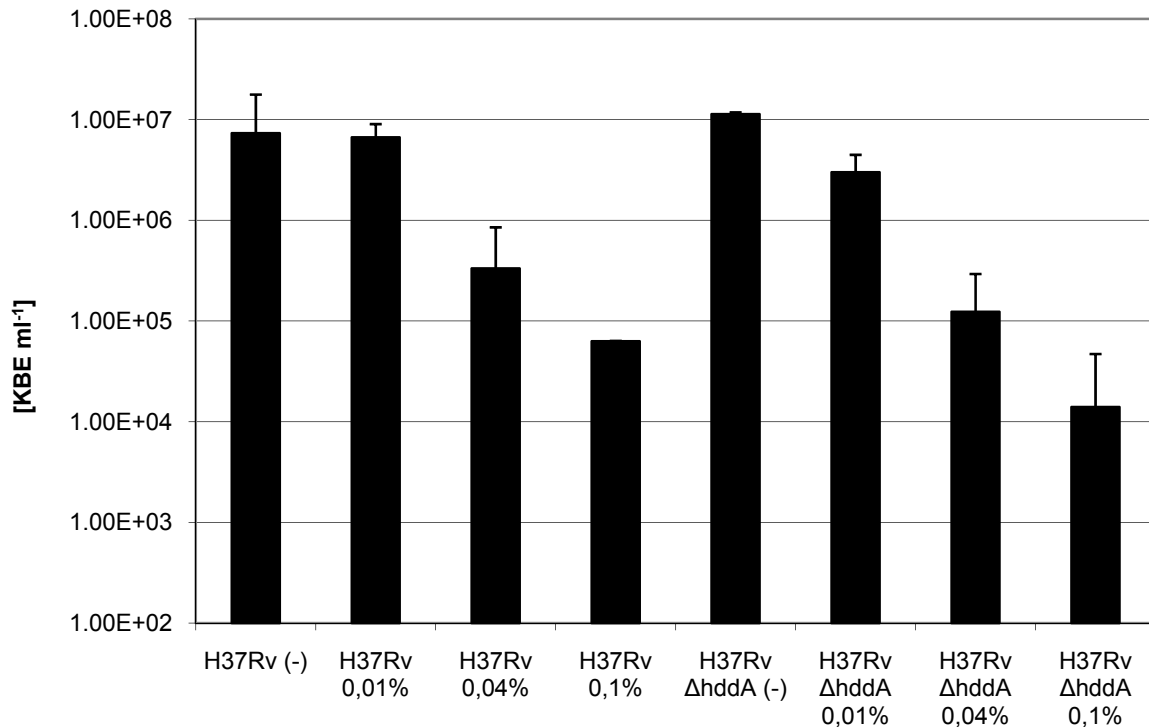


Abbildung 22: Lebendkeimzahlbestimmung von *M. tuberculosis* H37RvΔhddA unter Detergenz-Stressbedingungen

Koloniebildende Einheiten wurden in Ansätzen mit 0,01 %, 0,04 % und 0,1 % SDS und ohne SDS als Kontrolle an Tag 4 bestimmt, indem Aliquots verdünnt und auf 7H10-Agarplatten ausplattiert wurden; der Grafik zu Grunde liegen Mittelwerte von Doppelbestimmungen; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

5.2.6 Virulenz von *Mycobacterium tuberculosis* H37RvΔhddA im Maus-Infektionsmodell*

*Die in Kapitel 5.2.6 beschriebenen Ergebnisse wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Stefan Ehlers, Forschungszentrum Borstel, generiert.

Der Effekt der Mutation in *hddA* auf die Virulenz von *M. tuberculosis* wurde im Maus-Infektionsmodell untersucht. C57BL/6 Mäuse wurden via Aerosol mit Mutante und Wildtyp infiziert und die Bakterienlast der Lunge nach drei Wochen und an Tag 70 bestimmt. Der Infektionsverlauf beider Stämme war fast identisch und typisch für eine Infektion mit *M. tuberculosis*. Nach einer exponentiellen Replikation zu Beginn des Versuchs stagnierte sie nach drei Wochen und Mutante sowie Wildtyp persistierten auf diesem Niveau bis Tag 70 (Abbildung 23).

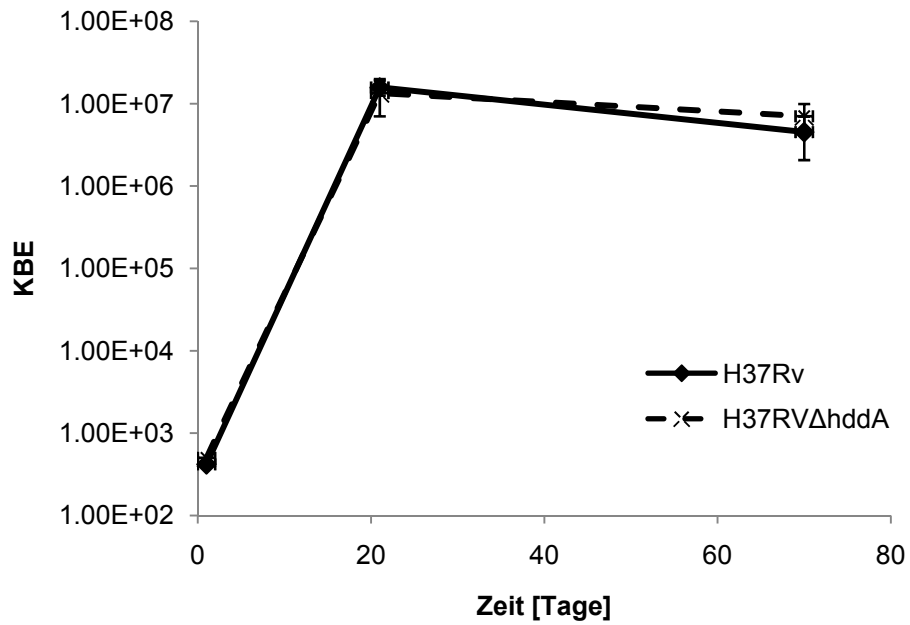


Abbildung 23: Lebendkeimzahlbestimmung von Mutante und Wildtyp aus der Lunge aerosolinfizierter C57BL/6 Mäuse.

Infektionsdosen: 417 CFU für den Wildtyp und 501 CFU für die Mutante; Abkürzungen: KBE, koloniebildende Einheiten.

5.3 Die Bedeutung von GlnR für die Nitratassimilation von *Mycobacterium tuberculosis*

5.3.1 Klonierung von *nirBD* in einen mykobakteriellen Expressionsvektor und Komplementierung einer *glnR*-Deletionsmutante von *Mycobacterium tuberculosis*

Aus Vorarbeiten mit einer *M. tuberculosis glnR*-Deletionsmutante ergab sich die Hypothese, dass GlnR eine Rolle bei der Nitratassimilation spielt. So konnte zunächst der Phänotyp einer *M. smegmatis* Mutante, die ihre Fähigkeit verloren hatte, auf Nitrat als alleiniger Stickstoffquelle zu wachsen, mit Rv0818 von *M. tuberculosis* H37Rv komplementiert werden. Sequenzvergleiche zeigten, dass eine Homologie zu *glnR* von *S. coelicolor* besteht. Eine *glnR*-Mutante von *M. tuberculosis* war nicht mehr in der Lage, Nitrat oder Nitrit zu assimilieren, und vermehrte sich daher nicht auf Nitrat oder Nitrit als alleiniger Stickstoffquelle. Darüber hinaus akkumulierte die Mutante Nitrit, wenn sie in Medien mit Nitrat kultiviert wurde. Diese Befunde führten zu der Hypothese, dass GlnR die Nitratassimilation durch die positive Regulation der Nitritreduktase steuert. Um die Hypothese zu beweisen, sollte *nirBD* konstitutiv in GlnR exprimiert werden. Abbildung 24 zeigt eine Übersichtsdarstellung der vorgeschlagenen Nitratassimilation von *M. tuberculosis* H37Rv.

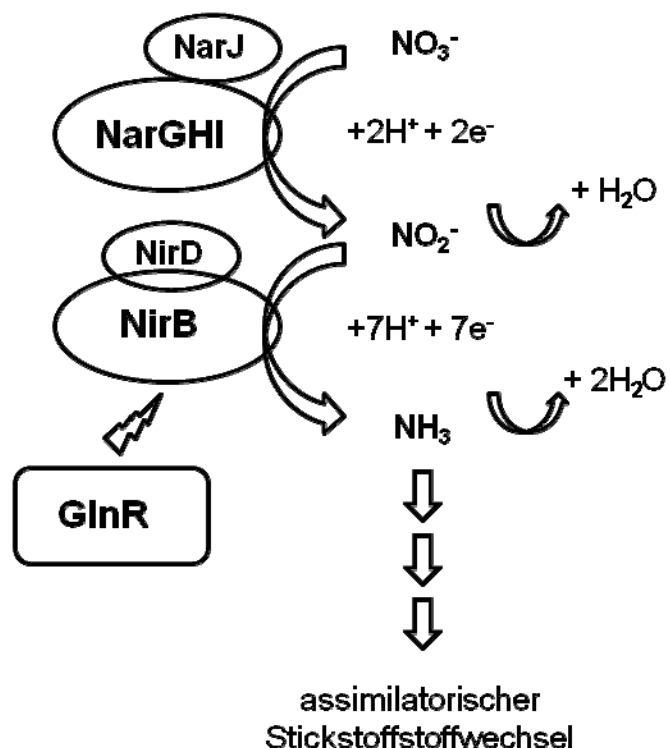
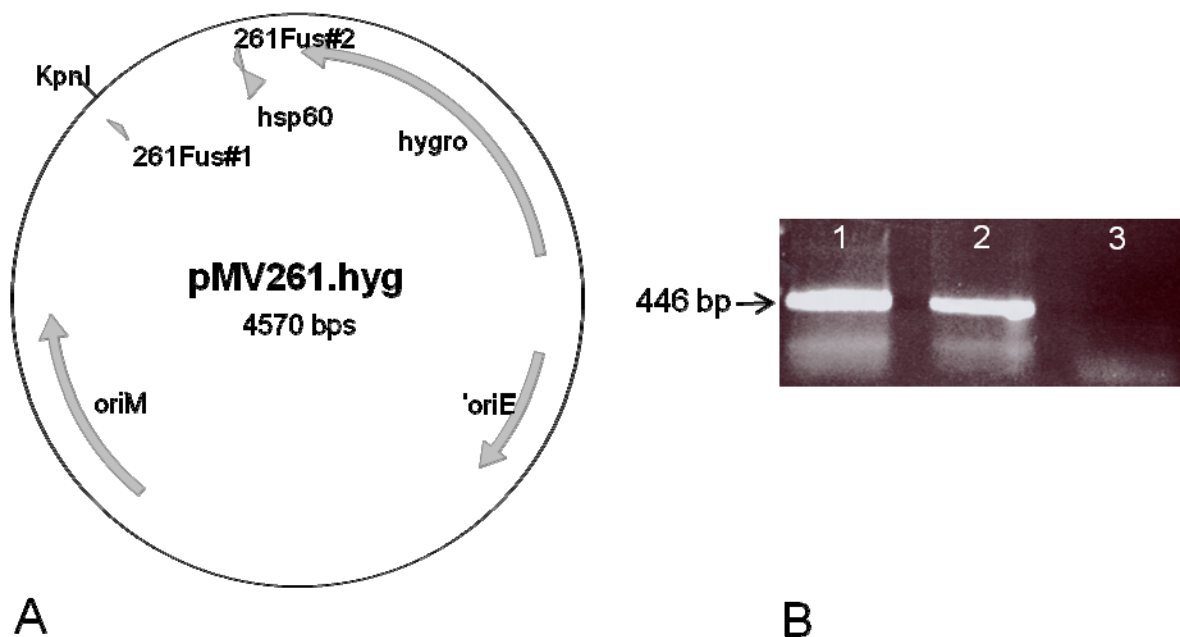


Abbildung 24: Nitratassimilation von *M. tuberculosis* H37Rv

Der erste Schritt der Nitratassimilation ist die Reduktion von Nitrat (NO_3^-) zu Nitrit (NO_2^-) durch die Nitratreduktase NarGHJI. Die von dem Regulator GlnR positiv regulierte Nitritreduktase NirBD reduziert Nitrit anschließend zu Ammoniak (NH_3), das für den weiteren Stickstoffmetabolismus der Zelle zur Verfügung steht.

Dazu wurde zunächst der *hsp60*-Promoter des mykobakteriellen Expressionsvektors pMV.261.hyg mittels PCR amplifiziert. In Abbildung 25 sind die Matrizen und Amplifikate der Reaktionen dargestellt. Eine weitere PCR mit pSM32 als Matrize resultierte in einem *nirB*-Amplifikat. Mittels der entsprechenden 5'-Überhänge dieser Fragmente konnte in einer dritten PCR-Reaktion ein Fusionskonstrukt generiert werden, das nach der Klonierung in pSM32 einen Vektor zur Expression von *nirBD* in *M. tuberculosis* darstellte. pSM32 basiert auf dem promoterlosen, integrativen mykobakteriellen Vektor pMV306.kan. Abbildung 25 zeigt die entsprechenden Vektorkarten und Agarose-Gele der PCR-Reaktionen. Abbildung 25A zeigt pMV261.hyg mit den Primern 261Fus#1 und 261Fus#2, die der Amplifikation des Promoterbereiches dienten, sowie die *KpnI*-Schnittstelle, mit der später das Fusionskonstrukt in pSM32 gesetzt wurde. Abbildung 25B zeigt das Agarose-Gel mit dem PCR-Fragment von 446 bp. In Abbildung 25C ist die Vektorkarte von pSM32 dargestellt. Mit den Primern *nirBFus#1* und *nirBFus#2* wurde ein 711 bp umfassender Bereich von *nirB* amplifiziert (Abbildung 25D). Auch hier sind entsprechend *KpnI*-Schnittstellen eingezeichnet. Abbildung 25E zeigt das Fusionskonstrukt der dritten PCR-Reaktion. Durch diese Methode war es möglich, *nirBD* direkt mit dem Startcodon des *hsp60* zu fusionieren und so bestmögliche Voraussetzungen für eine Expression von *nirBD* unter der Kontrolle des *hsp60*-Promoters zu schaffen.



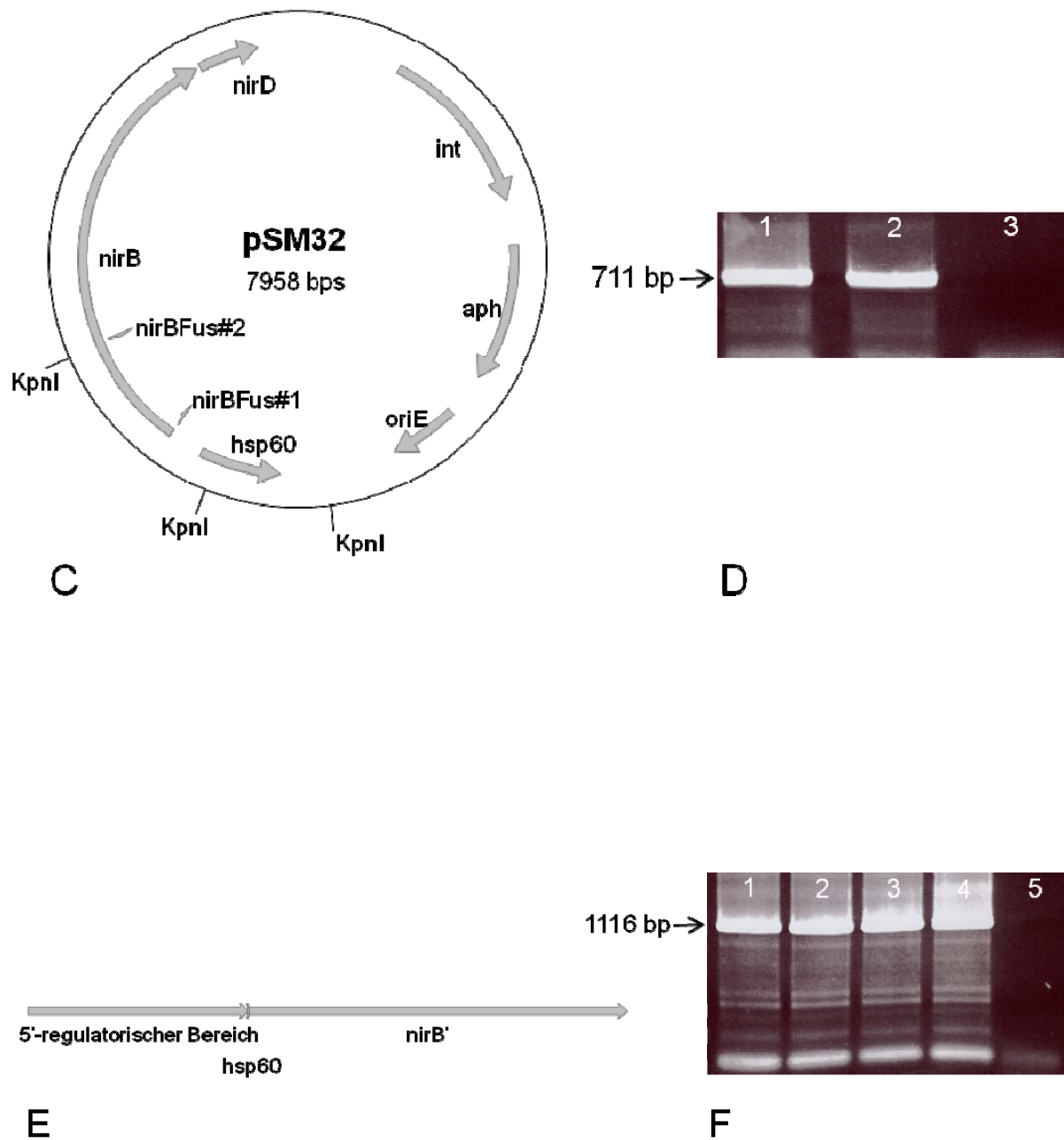


Abbildung 25: Klonierung von *nirB* unter den heterologen *hsp60*-Promoter

A pMV261.hyg mit den Primern 261Fus#1 und 261Fus#2 zur Amplifikation des 5'-regulatorischen Bereichs von *hsp60*; *KpnI*-Schnittstelle für die spätere Klonierung des Konstruktes; B Agarose-Gel der PCR; Spur 1 und 2 präparative Ansätze der Reaktion, Spur 3 Negativkontrolle; die PCR resultierte in einem Amplifikat von 446 bp; C pSM32 mit den Primern *nirBFus#1* und *nirBFus#2* zur Amplifikation eines Teilbereiches von *nirB*, die eine *KpnI*-Schnittstelle für die spätere Klonierung des Konstruktes umfassen D präparatives Agarose-Gel der PCR; 711 bp umfassendes Amplifikat in Spur 1 und 2, Spur 3 Negativkontrolle E Fusionskonstrukt aus der dritten PCR-Reaktion mit den Primern 261Fus#1, *nirBFus#2* und den Amplifikaten aus den Reaktionen 1 und 2, verdaut mit *KpnI*, wurde es in den mit *KpnI*-geöffneten pSM32-Vektor kloniert F präparatives Agarose-Gel der Fusions-PCR (Amplifikat 1116 bp); Spur 1-4 PCR-Amplifikat, Spur 5 Negativkontrolle.

Das Fusionskonstrukt pSMA37 wurde in *M. tuberculosis* H37Rv Δ *glnR* transformiert. Die Integration des Plasmids wurde durch die Durchführung einer analytischen PCR nachgewiesen. Abbildung 26 zeigt das Agarose-Gel einer PCR-Reaktion zur Amplifikation des Replikationsursprungs von *E. coli*, der nur auf dem integrativen Vektor, nicht aber dem Genom von *M. tuberculosis* vorhanden ist. Die transformierte Mutante *M. tuberculosis* H37Rv Δ *glnR*::pSMA37 wurde hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Assimilation von Nitrat untersucht. Abbildung 27 zeigt ein Balkendiagramm, in dem das Wachstum von *M. tuberculosis* H37Rv Δ *glnR*, *M. tuberculosis* H37Rv Δ *glnR*::pSMA37 und *M. tuberculosis* H37Rv Wildtyp in MB-Medium mit 10 mM Nitrat als alleiniger Stickstoffquelle gegeneinander aufgetragen sind. Die optische Dichte bei 600 nm wurde als Kenngröße für bakterielles Wachstum gewählt und an Tag 0, 4, 10 und 16 bestimmt. Sowohl die *glnR*-Deletionsmutante als auch der Wildtyp ohne Stickstoffquelle verzeichneten zunächst an Tag 4 eine Zunahme der optischen Dichte um etwa 0,12 Einheiten und nahmen an Tag 10 und 16 wieder ab, um schließlich auf dem Anfangsniveau zu stagnieren. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Δ *glnR*::pSMA37 dagegen zeigte im Verlauf des Experiments stetiges Wachstum und erreichte an Tag 16 eine optische Dichte von etwa 0,55. Bereits an Tag 4 war der Unterschied im bakteriellen Wachstum zwischen der *glnR*-Deletionsmutante und der Mutante transformiert mit *nirBD* unter der Kontrolle des heterologen *hsp60*-Promoters signifikant. Die Expression von *nirBD* in *M. tuberculosis* H37Rv Δ *glnR* komplementiert den Verlust der Fähigkeit zur Nitratassimilation der Mutante.

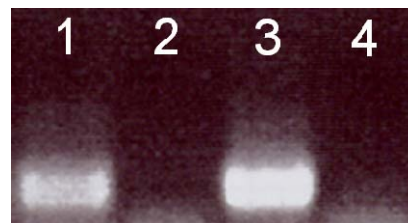


Abbildung 26: Agarose-Gel der PCR zum Nachweis des Replikationsursprungs von *E. coli*
 Spur 1: Mtb H37Rv Δ *glnR*::pSMA37; Spur 2: Mtb H37Rv; Spur 3: Positivkontrolle (pMV261.hyg); Spur 4: Negativkontrolle; das Amplifikat des oriE umfasst 277 bp.

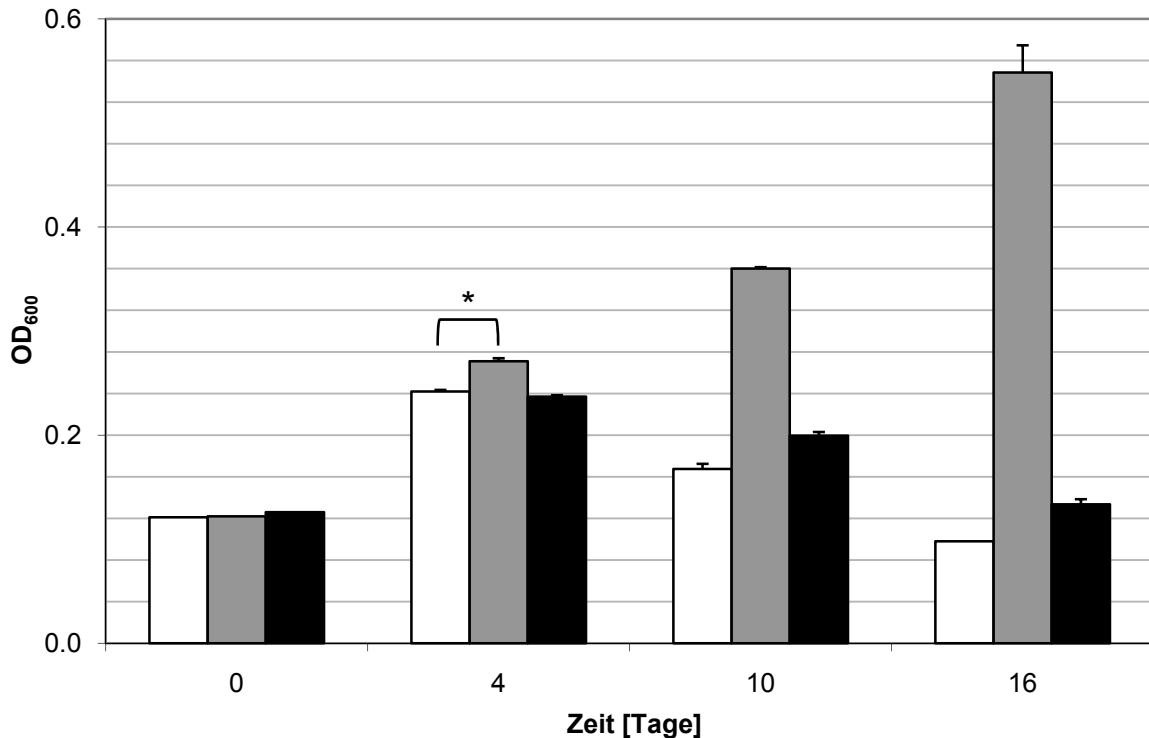


Abbildung 27: Nitratassimilation von *M. tuberculosis* H37RvΔglnR transformiert mit *nirB*
M. tuberculosis H37RvΔglnR (weiße Balken) und *M. tuberculosis* H37RvΔglnR::pSMA37 (graue Balken) wurden in MB-Medium mit 10 mM KNO₃ als alleiniger Stickstoffquelle kultiviert; an Tag 0, 4, 10 und 16 wurden Doppelwerte der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt; als Kontrolle wurde *M. tuberculosis* H37Rv ohne Zugabe einer Stickstoffquelle mitgeführt (schwarze Balken); die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an; bereits an Tag 4 war der Unterschied zwischen *glnR*-Deletionsmutante und *M. tuberculosis* H37RvΔglnR::pSMA37 signifikant (* $p \leq 0,005$; t-Test).

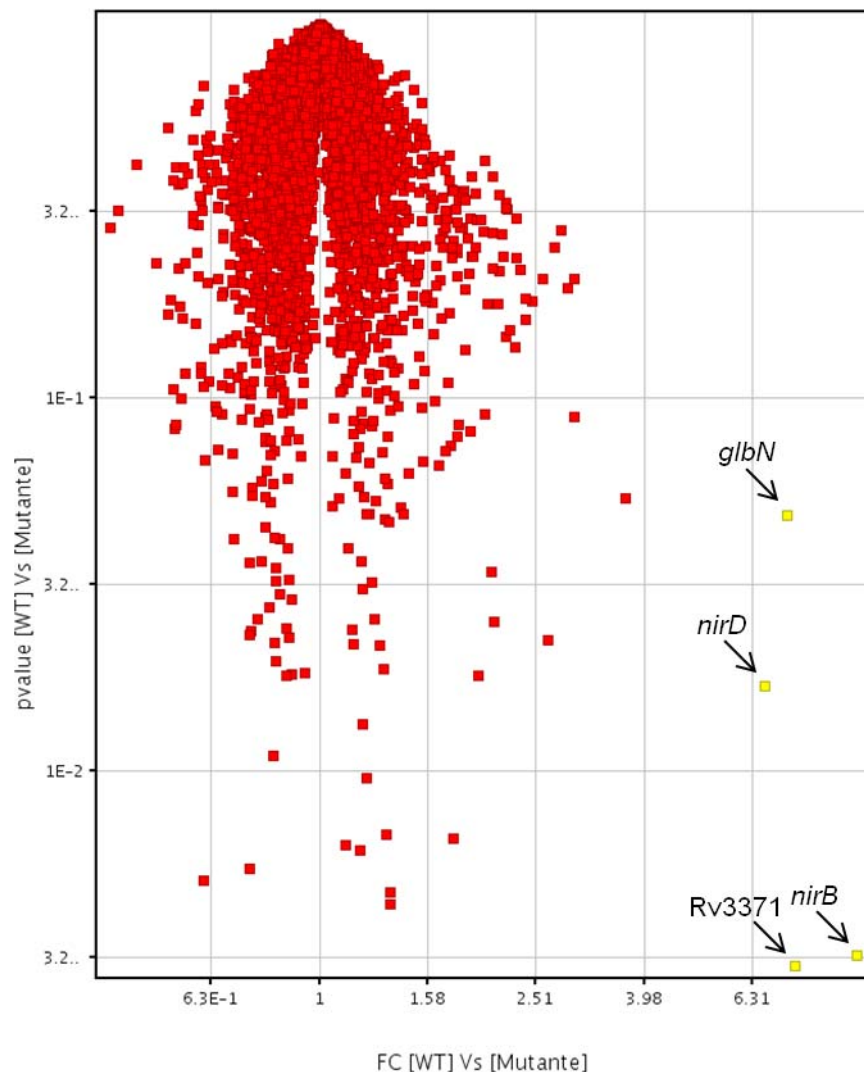
5.3.2 Nachweis der GlnR-vermittelten Regulation der Expression der Nitritreduktase *nirB* durch Microarray-Technologie und Real-Time PCR

Der direkte Nachweis der GlnR-vermittelten Regulation der Expression der Nitritreduktase *nirB* wurde mittels Microarray-Technologie und Real-Time PCR geführt. *Mycobacterium tuberculosis* H37RvΔglnR und *M. tuberculosis* H37Rv wurden in 7H9-Medium bis zum Erreichen der späten exponentiellen Wachstumsphase kultiviert, die Kulturen in MB-Medium mit 5 mM KNO₃ als alleiniger Stickstoffquelle gewaschen und anschließend in MB-Medium mit 5 mM KNO₃ für etwa 18 Stunden und 48 Stunden inkubiert, die RNA präpariert und diese schließlich für die weiterführende Analyse durch Microarrays und Real-Time PCR aufbereitet.

Für die Microarray-Analyse wurde ein speziell für *M. tuberculosis* H37Rv von der Firma Affymetrix hergestellter Chip verwendet. Auf diesem Chip sind 44033 Sonden gebunden, die 4003 kodierende Sequenzen repräsentieren. In Abbildung 28 sind die Ergebnisse in einem Punktdiagramm dargestellt. Dieser Darstellung liegen die Daten

von jeweils vier unabhängigen Experimenten zu Grunde: von *M. tuberculosis* H37Rv Δ *glnR* und *M. tuberculosis* H37Rv Wildtyp jeweils zwei Datensätze für den Zeitpunkt 18 Stunden und den Zeitpunkt 48 Stunden. Die Daten wurden zusammengefasst und statistisch auf der Grundlage des t-Tests Mutante und Wildtyp verglichen. Der Filter für die Auswertung wurde sehr stringend bei $p < 0,05$ und mehr als fünffacher Expressionsänderung gesetzt. Unter diesen Bedingungen wurden vier Gene als eindeutig von GlnR reguliert identifiziert. Wie erwartet, befand sich unter diesen Genen *nirB* (Rv0252) ($p = 0,003$; 9,8fach stärker im Wildtyp exprimiert) und *nirD* (Rv0253) ($p = 0,017$; 6,6fach stärker im Wildtyp exprimiert), die für die Nitritreduktase kodieren. Ferner wurden *glnN* (Rv1542c) ($p = 0,049$; 7,3fach) und Rv3371 ($p = 0,003$; 7,5fach) positiv durch GlnR-reguliert gefunden. *glnN* kodiert wahrscheinlich in *M. tuberculosis* für ein Globin, die Funktion von Rv3371 ist nicht bekannt (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>).

Abbildung 28:
Microarray-Expressionsanalyse von *M. tuberculosis* H37Rv Δ *glnR* und *M. tuberculosis* H37Rv
 Punktdiagramm eines Gruppenvergleichs vier unabhängiger Datensätze (*M. tuberculosis* H37Rv Δ *glnR* und *M. tuberculosis* H37Rv Wildtyp jeweils zwei Datensätze für den Zeitpunkt 18 Stunden und 48 Stunden); die Daten wurden gruppiert und statistisch auf der Grundlage des t-Tests Mutante und Wildtyp verglichen; es wurden die absolute Expressionstärke des Wildtyps im Verhältnis zur Mutante in x-facher Veränderung (FC = fold change) gegen die p-Werte der Statistik aufgetragen; gelb markiert und durch Pfeile und Genbezeichnung identifiziert wurden Gene, deren p-Werte $< 0,05$ waren und deren absoluter Expressionsunterschied > 5 war.

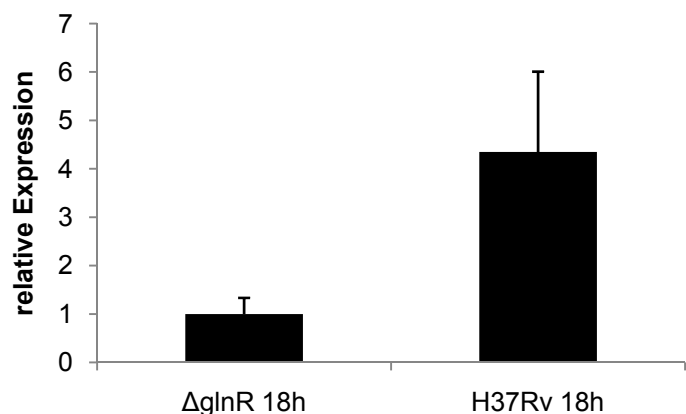


Um diese Microarray-Daten und den Nachweis der positiven Regulation der Expression von *nirB* zu verifizieren, wurde eine Real-Time PCR-Analyse mit einer *nirB*-spezifischen Sonde durchgeführt. Abbildung 29 zeigt ein Säulendiagramm zum Vergleich der Expression von *nirB* in *M. tuberculosis* H37Rv Δ *glnR* und *M. tuberculosis* H37Rv nach 18 Stunden Inkubation in MB-Medium mit 5 mM KNO₃. Diesem Diagramm liegen die Daten von zwei unabhängigen Experimenten zu Grunde. Es wurde eine 4,3fach stärkere Expression von *nirB* im Wildtyp als in der *glnR*-Deletionsmutante detektiert.

Sowohl in Wachstumsstudien mit *M. tuberculosis* H37Rv Δ *glnR*::pSMA37 als auch mit Hilfe von Microarray- und Real-Time PCR-Analysen konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Expression des Nitritreduktase-Gens *nirB* von GlnR positiv reguliert wird.

Abbildung 29: Relative Expressionsanalyse von *nirB* in *M. tuberculosis* H37Rv im Vergleich zu *M. tuberculosis* H37Rv Δ *glnR* durch semiquantitative Real-Time PCR

Dargestellt ist die relative Expression von Mutante und Wildtyp nach 18 Stunden Inkubation in MB-Medium mit 5 mM KNO₃; die Daten von zwei unabhängigen Experimenten wurden gemittelt, normalisiert und die relative Expressionsänderung sowie die Standardabweichungen (siehe Fehlerindikatoren) berechnet



6. Diskussion

6.1 Evaluierung der Bedeutung von Rv1500 für den Zellwandmetabolismus von *Mycobacterium tuberculosis*

Eine Vielzahl von Veröffentlichungen berichten von Mutanten, die in ihrer Zellwandsynthese beeinträchtigt und in ihrer Virulenz verändert sind. Die Deletion der Lipoprotein Signal Peptidase A resultiert zum Beispiel in einer verminderten Replikationsrate und geringerer Induktion von pathologischen Befunden in der Lunge (Sander *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu verstärkt die Expression von phenolischen Glykolipiden in der Zellwand von bestimmten *M. tuberculosis* Beijing-Stämmen die Virulenz durch die Herunterregulierung der protektiven Immunantwort (Reed *et al.*, 2004).

Sogar geringe Modifikationen in der Struktur der Mykolsäuren, so wie die defekte Cyclopropanierung von Trehalose Dimycolat, können in der Modulation der Zytokin-Ausschüttung bei gleichzeitiger Veränderung der Replikationsrate der Bakterien in der Lunge und Granulombildung führen (Rao *et al.*, 2005).

Glykosylierte, insbesondere mannosylierte mykobakterielle Zellwandkomponenten haben einen Einfluss auf die Wechselwirkungen zwischen Wirt und Pathogen im Verlauf der Infektion. So unterdrückt zum Beispiel das LAM virulenter *M. tuberculosis*-Stämme mit einer Mannose-Kappe die T-Zell-Proliferation *in vitro*, beeinflusst die Expression von TNF- α und IL-12 und ist im Gegensatz zu LAM mit endständigen Arabinoseresten nicht in der Lage, die Toll-Like Rezeptor abhängige IL-12 Produktion zu induzieren (Brown *et al.*, 1995; Dahl *et al.*, 1996; Means *et al.*, 1999; Nigou *et al.*, 2001; Briken *et al.*, 2004; Karakousis *et al.*, 2004). Phosphatidylinositolmannoside induzieren die Rekrutierung von natürlichen Killer-T-Zellen im Maus-Infektionsmodell und initiieren damit die Bildung von Granulomen (Apostolou *et al.*, 1999). PIM₂ und PIM₆ stimulieren die Produktion von TNF- α durch Makrophagen über den Toll-Like Rezeptor 2 (Gilleron *et al.*, 2003). Nach dem Verdau mit lysosomaler α -Mannosidase stimuliert PIM₆ CD1b-spezifische T-Zellen (de la Salle *et al.*, 2005), und schließlich ist die Interaktion des Mannose-Rezeptors von Makrophagen zumindest teilweise für die Aufnahme der Bakterien durch Phagozytose verantwortlich (Schlesinger *et al.*, 1994).

Kürzlich wurde die Bedeutung der Mannose-Kappe als Virulenzfaktor bei mykobakteriellen Infektionen neu diskutiert. Appelmelk *et al.* fanden Unterschiede zwischen den Ergebnissen aus Studien mit aufgereinigtem LAM und einer Mutante von *M. bovis* BCG, die nicht in der Lage war, endständige Mannose-Motive auszubilden (Appelmelk *et al.*, 2008). Das verdeutlicht die Vielschichtigkeit der Wirt-Pathogen-Interaktion und unterstreicht die Bedeutung der gezielten Mutagenese bei der Erforschung bakterieller Virulenzdeterminanten. Wie auch aus der vorliegenden Arbeit hervorgeht, ist es weiterhin von enormer Bedeutung Verständnis über Strukturkomponenten und Infektionsverläufe in unmittelbarer Arbeit mit dem Pathogen zu generieren. Daten aus Studien mit apathogenen oder bedingt pathogenen Modellorganismen lassen sich nur begrenzt übertragen.

Alexander *et al.* schlossen aus den Untersuchungen mit der *pimF*-Deletionsmutante von *M. marinum*, dass das Produkt dieses Gens an der Synthese von Ac_2PIM_7 und aufgrund der metabolischen Verwandtschaft auch an der Synthese von LAM beteiligt ist. Für die Beteiligung von *pimF/Rv1500* an der Synthese von LAM sprach neben den Ergebnissen aus Western-Blot Analysen mit einem LAM-spezifischen Antikörper unter anderem, dass die Mutante weniger effektiv in Makrophagen aufgenommen wurde als der Wildtyp (Alexander *et al.*, 2004).

Eine spätere Arbeit über *pimF* von *M. marinum* revidierte die Ergebnisse der initialen Studie von Alexander *et al.* So konnte gezeigt werden, dass *pimF* nicht an der Mannosylierung von PIM, sondern der Glykosylierung von Lipooligosacchariden (LOS) beteiligt ist. Lipooligosaccharide sind phosphatfreie Glykolipide. Die Basis von LOS ist Trehalose, die mit Lipiden substituiert ist. In *M. marinum* wurden vier verschiedene LOS-Spezies detektiert, die mit steigender Polarität LOS-I, LOS-II, LOS-III und LOS-IV genannt wurden. Es konnte durch die Inaktivierung von *pimF/losA*, MM2309 und MM2332 in *M. marinum* eine metabolische Verwandtschaft nachgewiesen werden (Burguiere *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2007). Bei LOS-I handelt es sich um ein Pentasaccharid, das die Kernstruktur der LOS darstellt. LOS-II ist ein Heptasaccharid, LOS-III ein Octasaccharid und LOS-IV schließlich ein Decasaccharid. Rv1500 ist in *M. marinum* in der Lage, zwei Zuckerreste auf LOS-III zu übertragen und somit die Synthese von LOS-IV zu katalysieren. *pimF* von *M. marinum* wurde daher *losA* genannt (Burguière *et al.*, 2005). Bei MM2309 handelt es sich um eine UDP-Glucose Dehydrogenase, die UDP-D-Glucose in UDP-D-

Gluconsäure überführt. Die UDP-D-Gluconsäure kann anschließend zu UDP-D-Xylose decarboxyliert werden. Da LOS-II durch die Addition eines Xylose-Restes und eines unbekanntes Zuckers gebildet wird, akkumuliert in der MM2309-Mutante von *M. marinum* LOS-I. Die Funktion von MM2332 ist noch nicht genau bekannt. Die Inaktivierung dieses Gens in *M. marinum* führte jedoch zu einer Akkumulation eines Intermediates zwischen LOS-I und LOS-II. Die Transformation der Mutante mit dem intakten Gen führte zur Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps (Ren *et al.*, 2007). Die vollständige Komposition des Zucker-Rückgrates ist noch nicht geklärt. Lipooligosaccharide wurden in *M. kansasii*, *M. gastri*, *M. szulgai*, *M. malmoeense* und *M. goodii* nachgewiesen (Besra *et al.*, 1993; Gilleron *et al.*, 1993; Gilleron und Puzo, 1994; Hunter *et al.*, 1983; Hunter *et al.*, 1985 41; Hunter *et al.*, 1988; McNeil *et al.*, 1987). Unter den Stämmen des *M. tuberculosis*-Komplexes scheint *M. canettii* der einzige Stamm zu sein, der LOS ausbildet (Daffe *et al.*, 1991). *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv scheint diese Verbindung nicht zu besitzen, auch wenn Diacyltrehalosen nachgewiesen werden konnten, bei denen es sich um reduzierte Formen der LOS handelt (Besra *et al.*, 1992).

Der Vergleich des für die LOS-Synthese verantwortlichen Genclusters von *M. marinum* mit der korrespondierenden Region auf dem Genom von *M. tuberculosis* H37Rv zeigt, dass einige Gene, die möglicherweise an der LOS-Synthese beteiligt sind, bei *M. tuberculosis* H37Rv fehlen (Burguiere *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2007). Aber andererseits kann Rv1500 von *M. tuberculosis* H37Rv in der *M. marinum*-Deletionsmutante den Wildtyp-Phänotyp wieder herstellen. Das heißt, auch wenn das Gen nicht für eine nicht-redundante Mannosyltransferase in *M. tuberculosis* H37Rv kodiert, so hat es doch in *M. marinum* die Funktion einer Glykosyltransferase (Alexander *et al.*, 2004; Burguiere *et al.*, 2005).

Kremer *et al.* berichteten, dass PimC von *M. tuberculosis* CDC1551 bei der Bildung von AcPIM₃ beteiligt ist. Die Autoren entdeckten AcPIM₃ in Membran-Präparationen eines *M. smegmatis*-Stammes, der mit *pimC* von *M. tuberculosis* CDC1551 transformiert wurde. Die Deletion des zu *pimC* homologen Gens in *M. bovis* BCG führte jedoch nicht zu einem Phänotyp, der in der PIM-, LM- oder LAM-Synthese Defekte aufwies. Die Autoren postulierten kompensatorische Stoffwechselwege für *M. bovis* BCG (Kremer *et al.*, 2002). Es war ein Ziel dieser Arbeit, den Effekt der gezielten Deletion von Rv1500 in *M. tuberculosis* H37Rv auf die PIM-Synthese zu

untersuchen. Die Inaktivierung des Gens hatte keinen Einfluss auf die Synthese von PIMs *in vitro*. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Zytokin-Induktion durch *M. tuberculosis* H37Rv Δ Rv1500 und Replikation in dendritischen Zellen und Makrophagen auf dem Niveau des Wildtyps erfolgte. Auch die bakterielle Last in der Lunge aerosolinfizierter Mäuse war im Infektionsverlauf mit der des Wildtyps nahezu identisch.

Das Fehlen eines Phänotyps in den *in vitro* und *in vivo* Experimenten untermauert die Hypothese, dass PIM und LAM nicht von der Inaktivierung von Rv1500 betroffen sind. Zusätzlich wird diese Annahme durch die Studien über die Integrität der Zellwand gestützt. Denn schon verhältnismäßig geringe Veränderungen an Strukturkomponenten können sich deutlich auf die Zellintegrität und Funktion der Zelle auswirken. Ein Beispiel dafür ist eine *kasB*-Mutante von *M. marinum*. Bei KasB handelt es sich um die β -ketoacyl-acyl carrier protein-Synthase B, deren genetische Deletion das Fehlen von zwei bis vier Kohlenstoffatomen am proximalen Ende der α -, Methoxy- und Keto-Mykolate der mero-Mykolatkette zur Folge hat. Zudem wurde ein leicht verändertes Verhältnis der drei verschiedenen Mykolate zueinander beschrieben. Die Mutante zeigte eine veränderte Morphologie, sowohl wenn sie in flüssigem Nährmedium kultiviert wurde, als auch bei Wachstum auf Agarplatten. Außerdem war die Fähigkeit zur Ausbildung von kordelartigen Strukturen herabgesetzt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, dass die Ultrastruktur der Zellwand nicht verändert war. Deutlich betroffen von der Mutation war jedoch unter anderem die Sensitivität gegenüber dem Detergenz SDS. Es wurde hier die Sensitivität der Mutante in Anwesenheit von 0,01 %, 0,05 %, 0,1 % und 0,5 % SDS im Vergleich zu Wildtyp und Mutante komplementiert mit *kasB* von *M. tuberculosis* bestimmt, indem die Bakterien in 7H9-Medium mit der entsprechenden SDS-Konzentration für vier Tage inkubiert und anschließend die Lebendkeimzahl auf 7H10-Agarplatten bestimmt wurde. Auch die Säurefestigkeit als Eigenschaft der Mykobakterien war in der *kasB*-Mutante vermindert (Gao *et al.*, 2003). Diese Effekte beruhen eindeutig auf der veränderten Lipidkomposition oder Zellwandarchitektur der Mutante. Eine neuere Publikation beschreibt den Phänotyp einer *kasB*-Deletionsmutante von *M. tuberculosis* CDC1551 (Bhatt *et al.*, 2007). Diese Mutante glich der *M. marinum* Transposonmutante mit einem Defekt in *kasB*. So hat auch in der *M. tuberculosis* CDC1551-Mutante die genetische Inaktivierung der β -ketoacyl-acyl carrier protein-Synthase B eine Verkürzung der Mero-

Mykolatkette zur Folge. Im Gegensatz zu *M. marinum* fehlen jedoch bis zu sechs Kohlenstoffatome. Ein weiterer Unterschied besteht in einer reduzierten Ausbildung von trans-Cyclopropan Strukturen innerhalb der Mero-Mykolate. *In vivo* war die bakterielle Replikation in Lunge, Leber und Milz deutlich reduziert. Dagegen persistierte die Mutante über 600 Tage in den C57BL/6-Mäusen ohne Symptome einer Tuberkulose-Infektion hervorzurufen (Bhatt *et al.*, 2007). Bei Rv1500 handelt es sich um eine funktionelle Glykosyltransferase, die in *M. marinum* den LOS-IV-defizienten Phänotyp komplementieren kann; deshalb lag zunächst die Vermutung nahe, dass in *M. tuberculosis* H37Rv von dem Produkt von Rv1500 wenn nicht LOS, dann andere Zellwandkomponenten glykosyliert werden könnten, deren Fehlen oder unvollständige Synthese sich auf die Zellwandintegrität auswirken könnte. Als *Screening* dafür wurde unter anderem ebenfalls die Sensitivität gegenüber SDS gewählt. Sowohl bei diesem Ansatz, als auch der Bestimmung der Säurefestigkeit nach Ziehl-Neelsen und der Untersuchung der Koloniemorphologie auf Kongo-Rot-haltigen Nährböden war zwischen Mutante und Wildtyp kein Unterschied erkennbar. Das spricht entweder dafür, dass keine Zellwandkomponenten von der Mutation betroffen sind, die eine Veränderung der Komposition der Strukturkomponenten oder Architektur der Zellwand zur Folge haben, oder dass kompensatorische Mechanismen die Manifestierung eines entsprechenden Phänotyps verhindern. Für die zweite Hypothese spricht die Möglichkeit, dass es sich bei der von Rv1500 kodierten Glykosyltransferase um ein Enzym mit geringer Substratspezifität handeln könnte, die die Glykosylierung anderer Verbindungen katalysieren könnte. Eine weitere mögliche, aber eher unwahrscheinliche Hypothese ist, dass es sich bei Rv1500 um ein Relikt eines in *M. tuberculosis* H37Rv nicht mehr aktiven Stoffwechselweges handelt. Dagegen spricht jedoch sowohl die erhaltene Funktionalität des Enzyms, die ohne Selektionsvorteil sicherlich von natürlichen Mutationen betroffen wäre, als auch die Expression der mRNA, die das Vorliegen eines inaktiven Gens ausschließt. Es konnte jedoch für Pseudogene von *M. leprae* eine Transkription nachgewiesen werden (Suzuki *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurde auch *noncoding* RNA (nc-RNA) beschrieben, die regulatorische Funktionen haben kann (Eddy, 2001). Regulatorische oder andere Funktionen als Ribozym könnten gegen die natürliche Mutation von Rv1500 selektieren. Die erfolgreiche Detektion der Transkription von Rv1500 in *M. tuberculosis* H37Rv, sowie die Transkription und Translation des Gens in *M. marinum* (Alexander *et al.*, 2004) machten weitere

Experimente zum Nachweis der Funktionalität jedoch nicht zwingend und führten überzeugend zur Ablehnung der Pseudogen- oder Ribozym-Hypothese.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm handelt es sich um den bekannten *M. tuberculosis* H37Rv-Stamm. Um ausschließen zu können, dass es sich bei dem Laborstamm um eine natürliche Mutante von Rv1500 handelt, wurde dieses Gen sequenziert. Die Sequenzanalyse ergab keinen Unterschied zwischen der experimentell bestimmten Sequenz und der von Cole *et al.* veröffentlichten (Cole *et al.*, 1998).

Somit bleibt die Rolle von Rv1500 im Metabolismus von *M. tuberculosis* H37Rv zunächst unklar. Die kontrovers geführte Diskussion über die Beteiligung des Gens bei der Synthese von PIM in dem Pathogen *M. tuberculosis* H37Rv konnte dagegen erstmals eindeutig geklärt werden. Auch wenn einige der Gene des LOS-Syntheseweges, wie von Burgière *et al.* und Ren *et al.* vorgeschlagen wurde, in *M. tuberculosis* H37Rv fehlen oder inaktiv sind (Burguiere *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2007), so bleibt doch festzustellen, dass es sich bei Rv1500 um ein funktionelles Gen handelt, das normal exprimiert wird. So bleibt für die Zukunft zu klären, welche Verbindungen durch das Produkt von Rv1500 in *M. tuberculosis* H37Rv glykosyliert werden, und welche Gene die Deletion des Gens kompensieren.

6.2 Charakterisierung der *hddA*-Deletionsmutante von *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Glykosyltransferasen nutzen im Wesentlichen zwei unterschiedliche Substrate für die Glykosylierung. In Mykobakterien handelt es sich dabei um Decaprenyl-phosphat gebundene Zucker und Nukleotid-diphosphat-aktivierte Zucker. Vornehmlich werden folgende Polyprenyl-phosphat Donoren genutzt: β -D-Glucosyl-1-monophosphoryl-decaprenol (C50-P-Glc), β -D-Mannosyl-1-monophosphoryl-decaprenol (C50-P-Man) und β -D-Arabinofuranosyl-1-monophosphoryl-decaprenol (C50-P-Araf). Bekannte Nukleotid-aktivierte Zuckerdonoren sind UDP- α -D-GlcPNAc, UDP- α -D-Glcp, UDP- α -D-Galp, UDP- α -D-Galf und GDP- α -D-Manp sowie dTDP- β -Rhap (Berg *et al.*, 2007).

Eidels und Osborn schlugen 1971 für die Nukleotidaktivierung von L-Glycero-D-manno-heptose in *Salmonella typhimurium* einen aus vier Schritten bestehenden Mutase-Stoffwechselweg vor. Dabei wird Sedoheptulose-7-phosphat durch die

Phosphoheptose-Isomerase in D-Glycero-D-manno-heptose-7-phosphat umgewandelt. Die Mutasereaktion vermittelt dann den intramolekularen Transfer der Phosphatgruppe auf den Kohlenstoff in C1-Position. Daraufhin erfolgt die Bindung eines Nukleotiddiphosphates über eine Phosphodiesterbindung an die Heptose (Eidels und Osborn, 1971). Später stellte sich heraus, dass es sich um ADP handelt (Valvano *et al.*, 2002). Der letzte Schritt dieses Stoffwechselweges besteht in der Epimerisierung von ADP-D-Glycero-D-manno-heptose zu ADP-L-Glycero-D-manno-heptose (Eidels und Osborn, 1971).

Kneidinger *et al.* beschrieben für *A. thermoaerophilus* einen Stoffwechselweg zur GDP-Aktivierung von D-Glycero- α -D-manno-heptose (Kneidinger *et al.*, 2001). Valvano *et al.* postulierten aufgrund von Homologien zu *A. thermoaerophilus*, dass dieser Stoffwechselweg auch bei *M. tuberculosis* vorhanden sein könnte (Valvano *et al.*, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Gen *hddA* (Rv0115) mit Homologie zur D-Glycero-D-manno-heptose-7-phosphat-Kinase deletiert, um die Bedeutung für den Zellwandmetabolismus von *M. tuberculosis* H37Rv zu untersuchen.

Es wird angenommen, dass Sedoheptulose-7-phosphat als Substrat dieses Stoffwechselweges aus dem Pentosephosphatweg stammt (Valvano *et al.*, 2002). Der Pentosephosphatweg dient dazu, NADPH bei der Oxidation von Glucose-6-phosphat zu Ribose-5-phosphat zu erzeugen. Der Pentosephosphatweg katalysiert auch die gegenseitige Umwandlung von Zuckern mit drei, vier, fünf, sechs und sieben Kohlenstoffatomen in einer Reihe nichtoxidativer Reaktionen. Zwei NADPH werden bei der Umwandlung von Glucose-6-phosphat in Ribulose-5-phosphat erzeugt. Über ein Endiol wird Ribulose-5-phosphat zu Ribose-5-phosphat isomerisiert. Der Pentosephosphatweg und die Glykolyse sind über die Transketolase und Transaldolase miteinander verbunden. Wenn mehr NADPH benötigt wird als Ribose-5-phosphat, wird Ribose-5-phosphat durch die Transketolase und die Transaldolase in Glycerinaldehyd-3-phosphat und Fructose-6-phosphat umgewandelt. Diese Enzyme rufen eine reversible Verkettung zwischen dem Pentosephosphatweg und der Glykolyse hervor. Es entstehen zwei Hexosen und eine Triose aus drei Pentosen. Die erste der Reaktionen, die den Pentosephosphatweg mit der Glykolyse verbindet, ist die Bildung von Glycerinaldehyd-3-phosphat und Sedoheptulose-7-phosphat aus zwei Pentosen. Es folgen weitere Reaktionen, bei denen auch Sedoheptulose-7-phosphat mit

Glycerinaldehyd-3-phosphat weiter umgesetzt werden kann (Stryer, 1983). Für den D-Glycero-D-Manno-Heptose-Stoffwechsel ist jedoch nur Sedoheptulose-7-Phosphat von Bedeutung. Diese Verbindung wird in den zuvor vorgestellten Reaktionen umgesetzt und aktiviert.

Glycero-manno-heptose wurde zum Beispiel in der S-Schicht von *A. thermoaerophilus* (Kosma *et al.*, 1995) und der Kapsel von *Burkholderia mallei* nachgewiesen (Deshazer *et al.*, 2001). Glycero-gluco-heptose kommt in dem Kapselpolysaccharid von *Campylobacter jejuni* vor (Karlyshev *et al.*, 2005). Die wahrscheinlich bekannteste Glycero-manno-heptose-haltige Verbindung ist das Lipopolysaccharid (LPS) von gramnegativen Bakterien. Es konnte beispielsweise im LPS von *E. coli* K12 W3100 L-glycero-D-manno-Heptose in der inneren und äußeren Kernregion gefunden werden (Holst *et al.*, 1991).

Es gibt eine Veröffentlichung, die die Existenz einer S-Schicht in Mykobakterien beschreibt. So wurde für *M. bovis* BCG in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Gefrierschnitten eine parakristalline Schicht dargestellt (Lounatmaa und Brander, 1989).

Die Ausbildung einer Kapsel bei Mykobakterien ist unumstritten (Daffe und Etienne, 1999). In dem Kapselmaterial von *M. avium* zum Beispiel wurden die Monosaccharide Arabinose, Mannose, Glukose, Galaktose und zwei unterschiedliche O-Methylhexosen gefunden (Wittkowski *et al.*, 2007). Heptose konnte nicht nachgewiesen werden. Die Kapsel von *M. tuberculosis* enthält hauptsächlich Glucan, Arabinomannan und Mannan (Schwebach *et al.*, 2001; Schwebach *et al.*, 2002; Lemassu und Daffe, 1994), sowie einige Proteine und Lipid-haltige Verbindungen (Daffe und Etienne, 1999). Sie wirkt antiphagozytotisch (Stokes *et al.*, 2004). Die mykobakterielle Kapsel ist eine elektronenmikroskopisch darstellbare Struktur. Das auch in dieser Arbeit verwendete Ruthenium-Rot hat sich dabei als gutes Fixans herausgestellt (Stokes *et al.*, 2004). Daher wurden nach der Charakterisierung nach Ziehl-Neelsen, die identische Morphotypen zeigte, elektronenmikroskopische Aufnahmen von *M. tuberculosis* H37Rv Δ hddA und *M. tuberculosis* H37Rv angefertigt, um eine mögliche Veränderung der Deletionsmutante im Aufbau ihrer Zellwand darzustellen. Es waren beim Wildtyp deutlich größere Auflagerungen auf der Zelloberfläche zu erkennen. Die vorliegenden Daten erlauben keine Mutmaßungen über die Identität der aufgelagerten Substanz. Des Weiteren kann

nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass eventuell die Präparation der Bakterien aus leicht unterschiedlichen Wachstumsphasen einen Einfluss auf das Experiment hatte. Aber sowohl bei der *hddA*-Deletionsmutante als auch bei dem Wildtyp wurden die Bakterien aus der beginnenden exponentiellen beziehungsweise exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Ein Effekt auf die Darstellung der Zellwand erscheint so unwahrscheinlich. Die Kultivierung der Mikroorganismen in Flüssigkultur mit Tween 80 resultiert jedoch auch in der Auswaschung bestimmter oberflächlich exponierter Zellwandkomponenten (Ortalo-Magne *et al.*, 1996). Es sollte jedoch die Bildung von Zellaggregaten wegen der besseren Darstellbarkeit der Zellen in der Elektronenmikroskopie vermieden werden. Aus diesem Grund wurde auf die Zugabe von Tween 80 nicht verzichtet.

Um den Effekt der Mutation auf die Zellwandsynthese näher charakterisieren zu können, wurde die Koloniemorphologie auf Kongo-Rot-haltigen Nährböden und Wachstum und Viabilität unter Detergenz-Stressbedingungen untersucht. *M. tuberculosis* H37Rv Δ *hddA* und *M. tuberculosis* H37Rv verhielten sich bei diesen Experimenten gleich.

Die Tatsache, dass die Existenz von Heptose bei *M. tuberculosis* H37Rv noch nicht beschrieben wurde, stellt die Charakterisierung der Deletionsmutante vor eine Herausforderung. Ein breiter physiologischer und biochemischer Ansatz könnte helfen, das Substrat der Phosphat-Kinase HddA in *M. tuberculosis* H37Rv einzugrenzen und später zu identifizieren. Einen Hinweis auf einen möglichen Effekt der Inaktivierung von *hddA* in *M. tuberculosis* H37Rv lieferte die Analyse der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

6.3 Die Rolle von GlnR als Regulator der Nitratassimilation von *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Bei der Nitritreduktase NirBD von *E. coli* handelt es sich um ein NADH-abhängiges Enzym, das aus zwei Untereinheiten besteht. Unter anaeroben Bedingungen wird NADH im Kontext der Nitratatmung zu NAD⁺ oxidiert und Nitrit, das als Zwischenprodukt akkumuliert, durch die Reduktion detoxifiziert (Gennis und Stewart, 1996). Die Funktion der meisten NAD(P)H-abhängigen Nitritreduktasen ist jedoch assimilatorisch und ihre enzymatische Aktivität ist ohne die Ausbildung quaternärer Strukturen gegeben (Lin und Stewart, 1998).

Auch die Nitritreduktase NirBD von *M. tuberculosis* H37Rv dient der Nitratassimilation (Malm *et al.*, 2008, accepted). Es wurden in *S. coelicolor* homologe Gene zu *nirBD* von *M. tuberculosis* H37Rv gefunden (SCO2486-SCO2488). Im Gegensatz dazu scheint *Corynebacterium glutamicum*, ein weiterer Organismus der Ordnung *Actinomycetales*, keine Nitritreduktase mit Homologie zu *nirBD* von *M. tuberculosis* H37Rv zu besitzen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Für *S. coelicolor* konnte die Nitratassimilation via Nitrit nachgewiesen werden. Das Vorhandensein der *nirBD*-Homologe legt den Schluss nahe, dass diese Gene für die assimilatorische Nitritreduktase kodieren könnten (Tiffert *et al.*, 2008).

Die Inaktivierung von *glnR* in *S. coelicolor* führte dazu, dass die Mutante nicht in der Lage war, Nitrat über Nitrit zu Ammonium zu reduzieren, während die Assimilation von Stickstoff über Ammonium als einziger zur Verfügung gestellter Stickstoffquelle möglich war. Es konnte gezeigt werden, dass der Regulator GlnR von *S. coelicolor* als Aktivator des Gens *nirB* fungiert (Tiffert *et al.*, 2008).

Die *glnR*-Deletionsmutante von *M. tuberculosis* H37Rv, die im Rahmen dieses Teilprojektes in Hinblick auf die Regulation der Nitratassimilation untersucht wurde, konnte ebenfalls nicht auf Nährmedien mit Nitrat als alleiniger Stickstoffquelle wachsen. Der Phänotyp von *M. tuberculosis* H37Rv Δ *glnR* konnte weiterhin mit *glnR* von *S. coelicolor* komplementiert werden (Malm *et al.*, 2008, accepted). Das deutet stark auf eine konservierte Funktion von NirBD und GlnR im Metabolismus dieser beiden Mikroorganismen. Da die *glnR*-Deletionsmutante von *M. tuberculosis* H37Rv wie der Wildtyp in der Lage war in Nährmedien mit Ammonium als alleiniger Stickstoffquelle zu wachsen und bei Wachstum in Nährmedien mit Nitrat als alleiniger Stickstoffquelle Nitrit akkumulierte, wurde postuliert, dass GlnR die Expression der Nitritreduktase *nirBD* reguliert. Sequenzanalysen und EMSA-Versuche ergaben, dass im 5'-regulatorischen Bereich von *nirBD*, jedoch nicht im 5'-regulatorischen Bereich der Nitratreduktase *narGHJI*, eine Bindestelle für GlnR vorhanden ist (Malm *et al.*, 2008, accepted). Die Ergebnisse der Komplementierung des Phänotyps der *glnR*-Deletionsmutante mit *nirBD* unter der transkriptionellen Kontrolle des heterologen *hsp60*-Promoters bei Wachstum in Medium mit Nitrat als alleiniger Stickstoffquelle, die Microarray-Analysen des Transkriptoms im Vergleich Mutante und Wildtyp sowie die Daten der Real-Time PCR zeigen klar die Positiv-Regulation von *nirB* durch GlnR und erklären eindeutig das Defizit in der Nitratassimilation und

die Akkumulation von Nitrit bei Wachstum in Nährmedien mit Nitrat als alleiniger Stickstoffquelle.

Weiterhin zeigt die Analyse des Transkriptoms von *M. tuberculosis* H37Rv Δ *glnR* und *M. tuberculosis* H37Rv bei Wachstum in Nährmedium mit Nitrat als alleiniger Stickstoffquelle unter stringenten statistischen Vorgaben, dass die Expression weiterer drei Gene eindeutig durch GlnR positiv reguliert wird: *nirD* ($p = 0,017$; 6,6fach stärker im Wildtyp exprimiert), *glnN* ($p = 0,049$; 7,3fach) und Rv3371 ($p = 0,003$; 7,5fach). *glnN* kodiert wahrscheinlich in *M. tuberculosis* für ein Hämoglobin, die Funktion von Rv3371 ist nicht bekannt. Die Ergebnisse zeigten, dass *nirB* am stärksten der Regulation von GlnR unterliegt ($p = 0,003$; 9,8fach stärker im Wildtyp exprimiert). Eine Regulation von *narGHJI* durch GlnR kann auf Grundlage dieser Daten ausgeschlossen werden. Das ist in Übereinstimmung mit Sohaskey und Wayne, die für *narGHJI* eine konstitutive Expression postulierten (Sohaskey und Wayne, 2003). Das macht Sinn, wenn man die Bedeutung dieses Genclusters für die Anaerobiose bedenkt. Sollte die positive Regulation der Expression durch GlnR von dem Vorhandensein präferierter Stickstoffquellen abhängig sein, müsste unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit bevorzugter Stickstoffquellen die Expression von *narGHJI* im Rahmen der Nitratatmung durch einen weiteren Mechanismus hochreguliert werden. Andererseits wäre die Akkumulation von Nitrit durch die Reduktion von Nitrat bei fehlender Nitritreduktase-Aktivität wegen der Toxizität negativ für das Wachstum der Bakterien unter diesen Bedingungen und suggeriert eine Expression der Nitritreduktase sobald Nitrat reduziert wird. An dieser Stelle könnten jedoch auch andere Mechanismen eingreifen. So wurde für *Salmonella typhimurium* postuliert, dass die Nitratreduktase NarGHI bei sinkender Nitratkonzentration dazu übergeht aus Nitrit Stickstoffmonoxid zu bilden. Dieses wird dann von dem Flavohämoglobin Hmp unter aeroben Bedingungen durch die Überführung in Nitrat oder Distickstoffmonoxid detoxifiziert (Poole, 2005; Gilberthorpe und Poole, 2008). Bei *C. glutamicum*, einem Organismus, von dem nur die respiratorische Reduktion von Nitrat bekannt ist, wird die Expression von *narKGHJI* unter aeroben Bedingungen von dem Regulator ArnR herunterreguliert. Rv2621c von *M. tuberculosis* H37Rv weist eine, wenn auch geringe, Homologie zu ArnR auf (28 % Identität auf Aminosäure-Ebene) (Nishimura *et al.*, 2008). Unter diesen Bedingungen scheint in *C. glutamicum* keine weitere Reduktion des Nitrits zu Ammonium stattzufinden, was in einer Akkumulation des Nitrits resultiert (Takeno *et al.*, 2007).

Durch die Repression der Expression könnten so zum einen Ressourcen in der Biosynthese der Enzyme gespart, zum anderen der Toxifizierung durch Nitrit vorgebeugt werden. Interessanterweise ist *hmp*, das für das Flavohämoglobin kodiert, von ArnR koreguliert (Nishimura *et al.*, 2008). Hier könnte eine Parallele zu *glnN* und dessen Regulation durch GlnR von *M. tuberculosis* H37Rv bestehen, denn auch für GlnN von *M. bovis* BCG konnte die Stickstoffmonoxid-detoxifizierende Aktivität nachgewiesen werden; generell ist eine Vielzahl bakterieller Hämoglobine an der Detoxifizierung von Stickstoffmonoxid beteiligt (Ouellet *et al.*, 2002; Poole, 2005). Eine Koregulation des Gens mit Genen der Nitratrespiration und Nitratassimilation erscheint so sinnvoll. Weiterführende Microarray-Experimente unter Optimierung beispielsweise der Kulturbedingungen und zunehmender statistischer Validierung durch die Vergrößerung der Anzahl der gruppierten Arrays könnten klären, ob unter weniger stringent gewählten Bedingungen die Expression von Genen, zusätzlich zu den zuvor genannten, schwach durch GlnR reguliert wird. Die Berücksichtigung der Anaerobiose könnte zusätzlich interessante Erkenntnisse bezüglich des Stickstoffmetabolismus beziehungsweise den Verbleib reaktiver Stickstoff-Spezies bringen.

Der molekulare Mechanismus der Regulation von GlnR ist nicht bekannt. Normalerweise werden OmpR-ähnliche Regulatoren phosphoryliert. So wird OmpR von der Sensorkinase EnvZ als Teil eines Sensor/Effektor-Paares an einem konservierten Aspartat (Asp-55) phosphoryliert. Das führt wahrscheinlich zu einer Veränderung der Bindungsaffinität zu DNA (Delgado *et al.*, 1993).

Bei GlnR handelt es sich um einen Regulator, von dem keine Kopplung an eine Sensorkinase bekannt ist. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass GlnR von einer noch unbekannt Kinase modifiziert wird, da auch GlnR an seinem N-Terminus ein konserviertes Aspartat aufweist. Die Sequenzanalyse des Genoms von *M. tuberculosis* wies auf ein weiteres Gen (Rv2884), das eine Homologie zu *glnR* von *S. coelicolor* aufweist, hin. Zusätzlich zu *glnR* besitzt *S. coelicolor* das Gen *glnRII* (Fink *et al.*, 2002). Die Inaktivierung dieses Gens führt nicht zu einem *glnR*-vermittelten Phänotyp. Das zeigt, dass es sich bei GlnR in *S. coelicolor* um den zentralen Regulator des Nitratstoffwechsels handeln muss. Die Rolle von Rv2884 ist unbekannt und lässt sich auch nicht aufgrund der Homologie-Studien von *S. coelicolor* ableiten.

Die Expression von *glnR* in *S. coelicolor* ist von der Verfügbarkeit bestimmter Stickstoffquellen abhängig. So konnte keine mRNA für *glnR* in Bakterien nachgewiesen werden, wenn die Kultivierung in einem Komplexmedium stattgefunden hatte. Das Wachstum unter Stickstoff-limitierten Bedingungen dagegen resultierte in der Expression des Regulators (Tiffert *et al.*, 2008). *glnR*-spezifische Expressionsanalysen mit *M. tuberculosis* H37Rv unter verschiedenen Kulturbedingungen könnten in Zukunft dazu beitragen den Mechanismus der Induktion der Expression dieses Gens aufzuklären und die Abhängigkeit der Regulation der Nitratassimilation von Umwelteinflüssen zu definieren.

Für GlnR von *S. coelicolor* wurde eine zentrale Bedeutung für den Stickstoffstoffwechsel nachgewiesen. GlnR wirkt hier als transkriptioneller Aktivator der Gene *glnA*, *glnII*, *nirB* und *amtB*, während die Expression der Gene *ureA*, *gdhA*, SCO0255, SCO0888 und SCO2404 reprimiert wird (Tiffert *et al.*, 2008). In *M. tuberculosis* H37Rv wurden zunächst vier Gene identifiziert, die eindeutig positiv von GlnR reguliert werden. Eine essentielle Rolle spielt der Regulator bei der Nitratassimilation, indem die Expression der Nitritreduktase *nirBD* entscheidend aktiviert wird.

7. Literaturverzeichnis

Alexander,D.C., Jones,J.R., Tan,T., Chen,J.M., and Liu,J. (2004). PimF, a mannosyltransferase of mycobacteria, is involved in the biosynthesis of phosphatidylinositol mannosides and lipoarabinomannan. *J Biol Chem* 279, 18824-18833.

Allen,B. (1998). Mycobacteria - General Culture Methodology and Safety Considerations. In *Mycobacteria Protocols*, T.Parish and N.Stoker, eds. (Totowa: Humana Press Inc.), pp. 15-30.

Apostolou,I., Takahama,Y., Belmant,C., Kawano,T., Huerre,M., Marchal,G., Cui,J., Taniguchi,M., Nakauchi,H., Fournie,J.J., Kourilsky,P., and Gachelin,G. (1999). Murine natural killer T (NKT) cells [correction of natural killer cells] contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 96, 5141-5146.

Appelmelk,B.J., den Dunnen,J., Driessen,N.N., Ummels,R., Pak,M., Nigou,J., Larrouy-Maumus,G., Gurcha,S.S., Movahedzadeh,F., Geurtsen,J., Brown,E.J., Eysink Smeets,M.M., Besra,G.S., Willemsen,P.T., Lowary,T.L., van Kooyk,Y., Maaskant,J.J., Stoker,N.G., van der,L.P., Puzo,G., Vandenbroucke-Grauls,C.M., Wieland,C.W., van der,P.T., Geijtenbeek,T.B., van der Sar,A.M., and Bitter,W. (2008). The mannose cap of mycobacterial lipoarabinomannan does not dominate the *Mycobacterium*-host interaction. *Cell Microbiol* 10, 930-944.

Aspinall,G.O., Monteiro,M.A., Shaver,R.T., Kurjanczyk,L.A., and Penner,J.L. (1997). Lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* serogroups O:3 and O:6-structures of a class of lipopolysaccharides with reference to the location of oligomeric units of D-glycero-alpha-D-manno-heptose residues. *Eur J Biochem* 248, 592-601.

Astarie-Dequeker,C., Nigou,J., Puzo,G., and Maridonneau-Parini,I. (2000). Lipoarabinomannans activate the protein tyrosine kinase Hck in human neutrophils. *Infect Immun* 68, 4827-4830.

Bange,F.C., Collins,F.M., and Jacobs,W.R. (1999). Survival of mice infected with *Mycobacterium smegmatis* containing large DNA fragments from *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* 79, 171-180.

Beckers,G., Strosser,J., Hildebrandt,U., Kalinowski,J., Farwick,M., Kramer,R., and Burkovski,A. (2005). Regulation of AmtR-controlled gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: mechanism and characterization of the AmtR regulon. *Mol Microbiol* 58, 580-595.

Berg,S., Kaur,D., Jackson,M., and Brennan,P.J. (2007). The glycosyltransferases of *Mycobacterium tuberculosis* - roles in the synthesis of arabinogalactan, lipoarabinomannan, and other glycoconjugates. *Glycobiology* 17, 35-56R.

Bernardo,J., Billingslea,A.M., Blumenthal,R.L., Seetoo,K.F., Simons,E.R., and Fenton,M.J. (1998). Differential responses of human mononuclear phagocytes to mycobacterial lipoarabinomannans: role of CD14 and the mannose receptor. *Infect Immun* 66, 28-35.

Besra GS, Bolton RC, McNeil MR, Ridell M, Simpson KE, Glushka J, Halbeek Hv, Brennan PJ, and Minnikin DE (1992). Structural elucidation of a novel family of acyltrehaloses from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 31, 9832-9837.

Besra GS, McNeil MR, Khoo K-H, Dell A, Morris HR, and Brennan PJ (1993). Trehalose-containing lipooligosaccharides of *Mycobacterium gordonae*: presence of a mono-O-methyltetra-O-acyltrehalose "core" and branching in the oligosaccharide backbone. *Biochemistry* 32, 12705-12714.

Bhamidi,S., Scherman,M.S., Rithner,C.D., Prenni,J.E., Chatterjee,D., Khoo,K.H., and McNeil,M.R. (2008). The identification and location of succinyl residues and the characterization of the interior arabinan region allow for a model of the complete primary structure of *Mycobacterium tuberculosis* mycolyl arabinogalactan. *J Biol Chem* 283, 12992-13000.

Bhatt,A., Fujiwara,N., Bhatt,K., Gurcha,S.S., Kremer,L., Chen,B., Chan,J., Porcelli,S.A., Kobayashi,K., Besra,G.S., and Jacobs,W.R., Jr. (2007). Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 104, 5157-5162.

BLIGH,E.G. and DYER,W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.

- Bogdan,C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2, 907-916.
- Brennan,P.J. and Nikaido,H. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* 64, 29-63.
- Briken,V., Porcelli,S.A., Besra,G.S., and Kremer,L. (2004). Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol Microbiol* 53, 391-403.
- Brown,M.C. and Taffet,S.M. (1995). Lipoarabinomannans derived from different strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially stimulate the activation of NF-kappa B and KBF1 in murine macrophages. *Infect Immun* 63, 1960-1968.
- Burguiere,A., Hitchen,P.G., Dover,L.G., Kremer,L., Ridell,M., Alexander,D.C., Liu,J., Morris,H.R., Minnikin,D.E., Dell,A., and Besra,G.S. (2005). LosA, a key glycosyltransferase involved in the biosynthesis of a novel family of glycosylated acyltrehalose lipooligosaccharides from *Mycobacterium marinum*. *J Biol Chem* 280, 42124-42133.
- Burkovski,A. (2007). Nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*: proteins, mechanisms, signals. *J Microbiol Biotechnol* 17, 187-194.
- Cangelosi,G., Palermo,C., Laurent,J., Hamlin,A., and Brabant,W. (1999). Colony morphotypes on Congo red agar segregate along species and drug susceptibility lines in the *Mycobacterium avium*-intracellulare complex. *Microbiology* 145, 1317-1324.
- Chatterjee D, Hunter SW, McNeil M, and Brennan PJ (1992). Lipoarabinomannan - multiglycosylated form of the mycobacterial mannosylphosphatidylinositols. *J Biol Chem* 267, 6228-6233.
- Cole,S.T., Brosch,R., Parkhill,J., Garnier,T., Churcher,C., Harris,D., Gordon,S.V., Eiglmeier,K., Gas,S., Barry,C.E., Tekaia,F., Badcock,K., Basham,D., Brown,D., Chillingworth,T., Connor,R., Davies,R., Devlin,K., Feltwell,T., Gentles,S., Hamlin,N., Holroyd,S., Hornsby,T., Jagels,K., Barrell,B.G., and . (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537-544.

Crick,D.C., Mahapatra,S., and Brennan,P.J. (2001). Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology* 11, 107R-118R.

Czaja,J., Jachymek,W., Niedziela,T., Lugowski,C., Aldova,E., and Kenne,L. (2000). Structural studies of the O-specific polysaccharide from *Plesiomonas shigelloides* strain CNCTC 113/92. *Eur J Biochem* 267, 1672-1679.

Daffe M, McNeil M, and Brennan PJ (1991). Novel type-specific lipooligosaccharides from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 30, 378-388.

Daffe,M. and Etienne,G. (1999). The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tuber Lung Dis* 79, 153-169.

Dahl,K.E., Shiratsuchi,H., Hamilton,B.D., Ellner,J.J., and Toossi,Z. (1996). Selective induction of transforming growth factor beta in human monocytes by lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 64, 399-405.

de la Salle H, Mariotti S, Angenieux C, Gilleron M, Garcia-Alles LF, Malm D, Berg T, Paoletti S, Maître B, Mouray L, Salamero J, Cazenave JP, Hanau D, Mori L, Puzo G, and Libero GD (2005). Assistance of microbial glycolipid antigen processing by CD1e. *Science* 310, 1321-1324.

Delgado,J., Forst,S., Harlocker,S., and Inouye,M. (1993). Identification of a phosphorylation site and functional analysis of conserved aspartic acid residues of OmpR, a transcriptional activator for *ompF* and *ompC* in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 10, 1037-1047.

Deshayes,C., Laval,F., Montrozier,H., Daffé,M., Etienne,G., and Reytrat,J. (2005). A Glycosyltransferase Involved in Biosynthesis of Triglycosylated Glycopeptidolipids in *Mycobacterium smegmatis*: Impact on Surface Properties. *J Bacteriol* 187, 7283-7291.

Deshazer,D., Waag,D.M., Fritz,D.L., and Woods,D.E. (2001). Identification of a *Burkholderia mallei* polysaccharide gene cluster by subtractive hybridization and demonstration that the encoded capsule is an essential virulence determinant. *Microb Pathog* 30, 253-269.

DeTurk,W.E. and Bernheim,F. (1958). Effects of ammonia, methylamine and hydroxylamine on the adaptive assimilation of nitrite and nitrate by a mycobacterium. *J Bacteriol* 75, 691-696.

Eddy,S. (2001). Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat Rev Genet* 2, 919-929.

Eidels,L. and Osborn,M.J. (1971). Lipopolysaccharide and aldoheptose biosynthesis in transketolase mutants of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 68, 1673-1677.

Ernst,J.D. (1998). Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 66, 1277-1281.

Ferguson,J.S., Weis,J.J., Martin,J.L., and Schlesinger,L.S. (2004). Complement protein C3 binding to *Mycobacterium tuberculosis* is initiated by the classical pathway in human bronchoalveolar lavage fluid. *Infect Immun* 72, 2564-2573.

Fink,D., Weissschuh,N., Reuther,J., Wohlleben,W., and Engels,A. (2002). Two transcriptional regulators GlnR and GlnRII are involved in regulation of nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 46, 331-347.

Fischer,K., Scotet,E., Niemeyer,M., Koebernick,H., Zerrahn,J., Maillet,S., Hurwitz,R., Kursar,M., Bonneville,M., Kaufmann,S.H., and Schaible,U.E. (2004). Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 101, 10685-10690.

Fontan,P., Aris,V., Ghanny,S., Soteropoulos,P., and Smith,I. (2008). Global transcriptional profile of *Mycobacterium tuberculosis* during THP-1 human macrophage infection. *Infect Immun* 76, 717-725.

Frieden,T.R., Sterling,T.R., Munsiff,S.S., Watt,C.J., and Dye,C. (2003). Tuberculosis. *Lancet* 362, 887-899.

Fuehner,T., Stoll,M., Bange,F.C., Welte,T., and Pletz,M.W. (2007). Klinik der Lungentuberkulose. *Der Pneumologe* 4, 151-162.

Gagliardi,M.C., Lemassu,A., Teloni,R., Mariotti,S., Sargentini,V., Pardini,M., Daffe,M., and Nisini,R. (2007). Cell wall-associated alpha-glucan is instrumental for *Mycobacterium tuberculosis* to block CD1 molecule expression and disable the function of dendritic cell derived from infected monocyte. *Cell Microbiol* 9, 2081-2092.

Gao,L.Y., Laval,F., Lawson,E.H., Groger,R.K., Woodruff,A., Morisaki,J.H., Cox,J.S., Daffe,M., and Brown,E.J. (2003). Requirement for *kasB* in *Mycobacterium* mycolic acid biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy. *Mol Microbiol* 49, 1547-1563.

Gennis,R.B. and Stewart,V. (1996). Respiration. In *Escherchia coli* and *Salmonella*, F.C.Neidhardt, ed. (Washington D.C.: ASM), pp. 217-261.

Gilberthorpe,N.J. and Poole,R.K. (2008). Nitric oxide homeostasis in *Salmonella typhimurium*: roles of respiratory nitrate reductase and flavohemoglobin. *J Biol Chem* 283, 11146-11154.

Gilleron M and Puzo G (1994). Lipooligosaccharidic antigens from *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium gastri*. *Glycoconj J* 12, 298-308.

Gilleron M, Vercauteren J, and Puzo G (1993). Lipooligosaccharidic antigen containing a novel C4-branched 3,6-dideoxy- α -hexopyranose typifies *Mycobacterium gastri*. *J Biol Chem* 268, 3168-3179.

Gilleron,M., Quesniaux,V.F., and Puzo,G. (2003). Acylation state of the phosphatidylinositol hexamannosides from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and its implication in Toll-like receptor response. *J Biol Chem* 278, 29880-29889.

Gilleron,M., Ronet,C., Mempel,M., Monsarrat,B., Gachelin,G., and Puzo,G. (2001). Acylation state of the phosphatidylinositol mannosides from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin and ability to induce granuloma and recruit natural killer T cells. *J Biol Chem* 276, 34896-34904.

Glaser,P., Danchin,A., Kunst,F., Zuber,P., and Nakano,M. (1995). Identification and Isolation of a Gene Required for Nitrate Assimilation and Anaerobic Growth of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 177, 1112-1115.

Hart,H. (1989). Organische Chemie - ein kurzes Lehrbuch. (Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH).

Hedgecock,L.W. and Costello,R.L. (1962). Utilization of nitrate by pathogenic and saprophytic mycobacteria. J. Bacteriol. 84, 195-205.

Helander,I.M., Lindner,B., Brade,H., Altmann,K., Lindberg,A.A., Rietschel,E.T., and Zahringer,U. (1988). Chemical structure of the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* strain I-69 Rd-/b+. Description of a novel deep-rough chemotype. Eur J Biochem 177, 483-492.

Holst,O., Zahringer,U., Brade,H., and Zamojski,A. (1991). Structural analysis of the heptose/hexose region of the lipopolysaccharide from *Escherichia coli* K-12 strain W3100. Carbohydr Res 215, 323-335.

Hunter SW, Barr VL, McNeil M, Jardine I, and Brennan PJ (1988). Trehalose-containing lipooligosaccharide antigens of Mycobacterium sp.: presence of a mono-O-methyltri-O-acyltrehalose "core". Biochemistry 27, 1549-1556.

Hunter SW, Jardine I, Yanagihara DL, and Brennan PJ (1985). Trehalose-containing lipooligosaccharides from mycobacteria: structures of the oligosaccharide segments and recognition of a unique *N*-acylkanosamine-containing epitope? Biochemistry 24, 2798-2805.

Hunter SW, Murphy RC, Clay K, Goren MB, and Brennan PJ (1983). Trehalose-containing lipooligosaccharides - a new class of species-specific antigens from mycobacterium. J Biol Chem 258, 10481-10487.

Kang,P.B., Azad,A.K., Torrelles,J.B., Kaufman,T.M., Beharka,A., Tibesar,E., Desjardin,L.E., and Schlesinger,L.S. (2005). The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. J Exp Med 202, 987-999.

Karakousis,P.C., Bishai,W.R., and Dorman,S.E. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. Cell Microbiol 6, 105-116.

Karlyshev,A.V., Champion,O.L., Churcher,C., Brisson,J.R., Jarrell,H.C., Gilbert,M., Brochu,D., St Michael,F., Li,J., Wakarchuk,W.W., Goodhead,I., Sanders,M., Stevens,K., White,B., Parkhill,J., Wren,B.W., and Szymanski,C.M. (2005). Analysis of *Campylobacter jejuni* capsular loci reveals multiple mechanisms for the generation of structural diversity and the ability to form complex heptoses. *Mol Microbiol* 55, 90-103.

Kaufmann,S.H. (2000). Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nat Med* 6, 955-960.

Keller C, Lauber J, Blumenthal A, Buer J, and Ehlers S (2004). Resistance and susceptibility to tuberculosis analysed at the transcriptome level: lessons from mouse macrophages. *Tuberculosis* 84, 144-158.

Kneidinger,B., Graninger,M., Puchberger,M., Kosma,P., and Messner,P. (2001). Biosynthesis of nucleotide-activated D-glycero-D-manno-heptose. *J Biol Chem* 276, 20935-20944.

Kneidinger,B., Marolda,C., Graninger,M., Zamyatina,A., McArthur,F., Kosma,P., Valvano,M.A., and Messner,P. (2002). Biosynthesis pathway of ADP-L-glycero-beta-D-manno-heptose in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184, 363-369.

Knutson,K.L., Hmama,Z., Herrera-Velit,P., Rochford,R., and Reiner,N.E. (1998). Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis* promotes protein tyrosine dephosphorylation and inhibition of mitogen-activated protein kinase in human mononuclear phagocytes. Role of the Src homology 2 containing tyrosine phosphatase 1. *J Biol Chem* 273, 645-652.

Kosma,P., Wugeditsch,T., Christian,R., Zayni,S., and Messner,P. (1995). Glycan structure of a heptose-containing S-layer glycoprotein of *Bacillus thermoaerophilus*. *Glycobiology* 5, 791-796.

Kremer,L., Gurcha,S.S., Bifani,P., Hitchen,P.G., Baulard,A., Morris,H.R., Dell,A., Brennan,P.J., and Besra,G.S. (2002). Characterization of a putative alpha-mannosyltransferase involved in phosphatidylinositol trimannoside biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J* 363, 437-447.

Lemassu,A. and Daffe,M. (1994). Structural features of the exocellular polysaccharides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J* 297 (Pt 2), 351-357.

Lin,J.T. and Stewart,V. (1998). Nitrate assimilation by bacteria. *Adv Microb Physiol* 39, 1-30, 379.

Lounatmaa,K. and Brander,E. (1989). Crystalline cell surface layer of *Mycobacterium bovis* BCG. *J Bacteriol* 171, 5756-5758.

Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rössner S, Koch F, Romani N, and Schuler G (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from bone marrow. *Immunol Methods* 223, 77-92.

Maartens,G. and Wilkinson,R.J. (2007). Tuberculosis. *Lancet* 370, 2030-2043.

Madigan,M.T., Martinko,J.M., and Parker,J. (2001). *Brock Mikrobiologie*. (Berlin: Spektrum Akademischer Verlag).

Magdalena,J., Supply,P., and Locht,C. (1998). Specific differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 36, 2471-2476.

Mariotti,S., Teloni,R., Iona,E., Fattorini,L., Romagnoli,G., Gagliardi,M.C., Orefici,G., and Nisini,R. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* diverts alpha interferon-induced monocyte differentiation from dendritic cells into immunoprivileged macrophage-like host cells. *Infect Immun* 72, 4385-4392.

McNeil M, Tsang AY, McClatchy JK, Stewart C, Jardine I, and Brennan PJ (1987). Definition of the surface antigens of *Mycobacterium malmoense* and use in studying the etiology of a form of mycobacteriosis. *J Bacteriol* 169, 3312-3320.

Means,T.K., Lien,E., Yoshimura,A., Wang,S., Golenbock,D.T., and Fenton,M.J. (1999). The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J Immunol* 163, 6748-6755.

Moreno,C., Mehlert,A., and Lamb,J. (1988). The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T cell proliferation. *Clin Exp Immunol* 74, 206-210.

Morita,Y.S., Patterson,J.H., Billman-Jacobe,H., and McConville,M.J. (2004). Biosynthesis of mycobacterial phosphatidylinositol mannosides. *Biochem J* 378, 589-597.

Morita,Y.S., Sena,C.B., Waller,R.F., Kurokawa,K., Sernee,M.F., Nakatani,F., Haites,R.E., Billman-Jacobe,H., McConville,M.J., Maeda,Y., and Kinoshita,T. (2006). PimE is a polyprenol-phosphate-mannose-dependent mannosyltransferase that transfers the fifth mannose of phosphatidylinositol mannoside in mycobacteria. *J Biol Chem* 281, 25143-25155.

Munoz-Elias,E.J. and McKinney,J.D. (2006). Carbon metabolism of intracellular bacteria. *Cell Microbiol* 8, 10-22.

Nakano,M.M. and Zuber,P. (1998). Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annu Rev Microbiol* 52, 165-190.

Nigou,J., Gilleron,M., Cahuzac,B., Bounery,J.D., Herold,M., Thurnher,M., and Puzo,G. (1997). The phosphatidyl-myo-inositol anchor of the lipoarabinomannans from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin. Heterogeneity, structure, and role in the regulation of cytokine secretion. *J Biol Chem* 272, 23094-23103.

Nigou,J., Zelle-Rieser,C., Gilleron,M., Thurnher,M., and Puzo,G. (2001). Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol* 166, 7477-7485.

Nishimura,T., Teramoto,H., Vertes,A.A., Inui,M., and Yukawa,H. (2008). ArnR, a novel transcriptional regulator, represses expression of the narKGHJI operon in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* 190, 3264-3273.

Ortalo-Magne,A., Lemassu,A., Laneelle,M.A., Bardou,F., Silve,G., Gounon,P., Marchal,G., and Daffe,M. (1996). Identification of the surface-exposed lipids on the cell envelopes of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacterial species. *J Bacteriol* 178, 456-461.

Ouellet,H., Ouellet,Y., Richard,C., Labarre,M., Wittenberg,B., Wittenberg,J., and Guertin,M. (2002). Truncated hemoglobin HbN protects *Mycobacterium bovis* from nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 99, 5902-5907.

Parish, T. and Stoker, N.G. (1998). Mycobacteria - Bugs and Bugbears. In Mycobacteria Protocols, (Totowa: Humana Press Inc.), pp. 1-13.

Pellicic, V., Reyrat, J.M., and Gicquel, B. (1996). Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. J Bacteriol 178, 1197-1199.

Pfyffer, G.E. and Vincent, V. (2006). Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections. Edward Arnold Ltd).

Poole, R.K. (2005). Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in bacteria. Biochem Soc Trans 33, 176-180.

Quesniaux, V., Fremont, C., Jacobs, M., Parida, S., Nicolle, D., Yermeev, V., Bihl, F., Erard, F., Botha, T., Drennan, M., Soler, M.N., Le Bert, M., Schnyder, B., and Ryffel, B. (2004). Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. Microbes Infect 6, 946-959.

Rao V, Fujiwara N, Porcelli SA, and Glickman MS (2005). *Mycobacterium tuberculosis* controls host immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule. J Exp Med 201, 535-543.

Reed MB, Domenech P, Manca C, Su H, Barczak AK, Kreiswirth BN, Kaplan G, and Barry CE III (2004). A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. Nature 431, 84-87.

Ren, H., Dover, L.G., Islam, S.T., Alexander, D.C., Chen, J.M., Besra, G.S., and Liu, J. (2007). Identification of the lipooligosaccharide biosynthetic gene cluster from *Mycobacterium marinum*. Mol Microbiol 63, 1345-1359.

Rohde, K., Yates, R.M., Purdy, G.E., and Russell, D.G. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* and the environment within the phagosome. Immunol Rev 219, 37-54.

Rook, G.A., Dheda, K., and Zumla, A. (2005). Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. Nat Rev Immunol 5, 661-667.

Sander, P., Rezwan, M., Walker, B., Rampini, S.K., Kroppenstedt, R.M., Ehlers, S., Keller, C., Keeble, J.R., Hagemeyer, M., Colston, M.J., Springer, B., and Bottger, E.C. (2004). Lipoprotein processing is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol 52, 1543-1552.

Schlegel,H.G. (1985). Allgemeine Mikrobiologie. (Stuttgart: Georg Thieme Verlag).

Schlesinger LS, Hull SR, and Kaufman TM (1994). Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. J Immunol 152, 4070-4079.

Schwebach,J.R., Casadevall,A., Schneerson,R., Dai,Z., Wang,X., Robbins,J.B., and Glatman-Freedman,A. (2001). Expression of a *Mycobacterium tuberculosis* arabinomannan antigen *in vitro* and *in vivo*. Infect Immun 69, 5671-5678.

Schwebach,J.R., Glatman-Freedman,A., Gunther-Cummins,L., Dai,Z., Robbins,J.B., Schneerson,R., and Casadevall,A. (2002). Glucan is a component of the *Mycobacterium tuberculosis* surface that is expressed *in vitro* and *in vivo*. Infect Immun 70, 2566-2575.

Sohaskey,C.D. and Wayne,L.G. (2003). Role of *narK2X* and *narGHJI* in hypoxic upregulation of nitrate reduction by *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol 185, 7247-7256.

Steenken,W., Oatway,W., and Petroff,S. (1934). Biological Studies of the Tubercle Bacillus III. Dissociation and Pathogenicity of the R and S Variants of the Human Tubercle Bacillus (H37). J Exp Med 60, 515-540.

Stermann,M., Sedlacek,L., Maass,S., and Bange,F.C. (2004). A promoter mutation causes differential nitrate reductase activity of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. J Bacteriol 186, 2856-2861.

Stokes,R.W., Norris-Jones,R., Brooks,D.E., Beveridge,T.J., Doxsee,D., and Thorson,L.M. (2004). The glycan-rich outer layer of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages. Infect Immun 72, 5676-5686.

Stryer,L. (1983). Biochemie. (Braunschweig: Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH), pp. 256-272.

Suzuki,K., Nakata,N., Bang,P.D., Ishii,N., and Makino,M. (2006). High-level expression of pseudogenes in *Mycobacterium leprae*. FEMS Microbiol Lett 259, 208-214.

Tailleux,L., Schwartz,O., Herrmann,J.L., Pivert,E., Jackson,M., Amara,A., Legres,L., Dreher,D., Nicod,L.P., Gluckman,J.C., Lagrange,P.H., Gicquel,B., and Neyrolles,O. (2003). DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J Exp Med* 197, 121-127.

Takayama,K. and Kilburn,J.O. (1989). Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 33, 1493-1499.

Takeno,S., Ohnishi,J., Komatsu,T., Masaki,T., Sen,K., and Ikeda,M. (2007). Anaerobic growth and potential for amino acid production by nitrate respiration in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 75, 1173-1182.

Tamaki,S., Sato,T., and Matsushashi,M. (1971). Role of lipopolysaccharides in antibiotic resistance and bacteriophage adsorption of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 105, 968-975.

Tiffert,Y., Supra,P., Wurm,R., Wohlleben,W., Wagner,R., and Reuther,J. (2008). The *Streptomyces coelicolor* GlnR regulon: identification of new GlnR targets and evidence for a central role of GlnR in nitrogen metabolism in actinomycetes. *Mol Microbiol* 67, 861-880.

Torrelles,J.B., Knaup,R., Kolareth,A., Slepushkina,T., Kaufman,T.M., Kang,P.B., Hill,P., Brennan,P.J., Chatterjee,D., Belisle,J.T., Musser,J.M., and Schlesinger,L.S. (2008). Identification of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with altered phagocytosis by human macrophages due to a truncated lipoarabinomannan. *J Biol Chem*. [Epub ahead of print]

Valvano,M.A., Messner,P., and Kosma,P. (2002). Novel pathways for biosynthesis of nucleotide-activated glycerol-manno-heptose precursors of bacterial glycoproteins and cell surface polysaccharides. *Microbiology* 148, 1979-1989.

Virtanen,S. (1960). A study of nitrate reduction by mycobacteria. *Acta Tuberc Scand* 47, 1-116.

Vouret-Craviari,V., Matteucci,C., Peri,G., Poli,G., Introna,M., and Mantovani,A. (1997). Expression of a long pentraxin, PTX3, by monocytes exposed to the mycobacterial cell wall component lipoarabinomannan. *Infect Immun* 65, 1345-1350.

Weber,I., Fritz,C., Ruttkowski,S., Kreft,A., and Bange,F.C. (2000). Anaerobic nitrate reductase (*narGHJI*) activity of *Mycobacterium bovis* BCG *in vitro* and its contribution to virulence in immunodeficient mice. *Mol Microbiol* 35, 1017-1025.

Wiesmann,E. (1978). *Medizinische Mikrobiologie*. (Stuttgart: Georg Thieme Verlag).

Wittkowski,M., Mittelstadt,J., Brandau,S., Reiling,N., Lindner,B., Torrelles,J., Brennan,P.J., and Holst,O. (2007). Capsular arabinomannans from *Mycobacterium avium* with morphotype-specific structural differences but identical biological activity. *J Biol Chem* 282, 19103-19112.

World Health Organisation. WHO Report 2008 - Global Tuberculosis Control. 2008.

Wray,L.V., Jr., Atkinson,M.R., and Fisher,S.H. (1991). Identification and cloning of the *glnR* locus, which is required for transcription of the *glnA* gene in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* 173, 7351-7360.

Zwahlen,A., Rubin,L.G., Connelly,C.J., Inzana,T.J., and Moxon,E.R. (1985). Alteration of the cell wall of *Haemophilus influenzae* type b by transformation with cloned DNA: association with attenuated virulence. *J Infect Dis* 152, 485-492.

8. Anhang

8.1 Chemikalien und Lösungsmittel

20 × Eukaryotic Hybridization Controls	AFFYMETRIX
20 × <i>nirB</i> -Assay-Mix	APPLIED BIOSYSTEMS
20 × <i>rrs</i> -Assay-Mix	APPLIED BIOSYSTEMS
2-Morpholinoethansulfonsäure-Hydrat (MES-Hydrat)	SIGMA-ALDRICH
2-Morpholinoethansulfonsäure- Natriumsalz (MES-Natriumsalz)	SIGMA-ALDRICH
Acetanhydrid	FLUKA
Agarose	EUROGENTEC
Ampicillin	BOEHRINGER MANNHEIM
Anti-DIG-AP	ROCHE
Anti-Streptavidin Antikörper, biotinyliert	VECTOR LABORATORIES
B2 Kontroll-Oligo	AFFYMETRIX
Big Dye [®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing-Reagenz	APPLIED BIOSYSTEMS
Blocking-Reagenz	ROCHE
Bovines Serum Albumin (BSA) (50 mg ml ⁻¹)	INVITROGEN
Bovines Serum Albumin Fraktion V	APPLICHEM
Bromphenolblau	SIGMA-ALDRICH
Cacodylat	SIGMA-ALDRICH
Calciumchlorid-Dihydrat	FLUKA
Cer-(IV)-sulfat-tetrahydrat	ROTH
Cetrimide (Cetyltrimethylammoniumbromid)	APPLICHEM
Chloroform	ROTH
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	FLUKA
CSPD [®]	ROCHE
D-Glucose	APPLICHEM
Diazomethan	SIGMA-ALDRICH
Diethylether	MERCK
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	APPLICHEM
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA-ALDRICH
Dinatriumhydrogenphosphat	APPLICHEM
Dithiothreitol	INVITROGEN
dNTPs	STRATAGENE
dNTPs	INVITROGEN
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	MERCK
Essigsäure	APPLICHEM
Ethanol (96 %)	J.T. BAKER
Ethidiumbromid	APPLICHEM
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	MERCK
Formaldehyd	SIGMA
GeneChip [®] DNA Labeling Reagent	AFFYMETRIX
GeneChip [®] Poly-A-RNA Control Kit	AFFYMETRIX

Glutaraldehyd	ROTH
Glycerin	APPLICHEM
Glykogen	ROCHE
Goat IgG	SIGMA-ALDRICH
Guanidinisothiocyanat (GTC)	SIGMA-ALDRICH
Hexan	MERCK
Hygromycin	ROCHE
Isopropanol	MERCK
Kaliumdihydrogenphosphat	MERCK
Kaliumnitrat	FLUKA
Kaliumsulfat	MERCK
Kanamycin	MERCK
Kongo-Rot	ROTH
Kupferchlorid-Tetrahydrat	MERCK
Lithiumchlorid	MERCK
Lysin-Acetat	SIGMA-ALDRICH
Magnesiumchlorid	SIGMA-ALDRICH
Maleinsäure	SIGMA-ALDRICH
Manganchlorid-Tetrahydrat	SIGMA-ALDRICH
Methanol	ROTH
Molybdenum-Blue-Spray Reagent	SIGMA-ALDRICH
Natriumborhydrid	MERCK
Natriumchlorid	MERCK
Natriumhydroxid	SIGMA-ALDRICH
Neutravidin	PIERCE
n-Laurylsarcosin-Natriumsalz	SIGMA-ALDRICH
One Phor All Puffer	AMERSHAM, jetzt GE-HEALTHCARE
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	ROTH
Phosphatidylinositol	SIGMA-ALDRICH
Pyridin	FLUKA
Random Primer	PROMEGA
Random-Primer	INVITROGEN
Ruthenium-Rot	SIGMA-ALDRICH
Saccharose	APPLICHEM
Salmon Testes DNA	SIGMA-ALDRICH
Salzsäure (36-38 %)	J.T. BAKER
Schwefelsäure	ROTH
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	APPLICHEM
Streptavidin	PIERCE
Streptavidin-Phycoerythrin	MOLECULAR PROBES
SYBR Gold	INVITROGEN
TaqMan Universal PCR-Mastermix	APPLIED BIOSYSTEMS
Tb-Carbol-Fuchsin	BECTON DICKINSON
Tb-Methylenblau	BECTON DICKINSON
Trifluoressigsäure	MERCK
Trinatriumcitrat-Dihydrat	SIGMA-ALDRICH
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	APPLICHEM
Trizol	INVITROGEN
Tween 20	SIGMA-ALDRICH
Tween 80	SIGMA-ALDRICH

Xylencyanol
 Xylose
 Zinkchlorid
 β-Mercaptoethanol

APPLICHEM
 SIGMA-ALDRICH
 FLUKA
 SIGMA-ALDRICH

8.2 Nährmedien

LB-Agar, Lennox (Difco™)
 LB-Broth-Base (Difco™)
 Middelbrook 7H9-Medium
 Middlebrook 7H10-Agar
 OADC

BECTON DICKINSON
 BECTON DICKINSON
 BECTON DICKINSON
 BECTON DICKINSON
 BECTON DICKINSON

8.3 Enzyme

Antarctic Phosphatase
Apal
 DNase I
 DNase I
KpnI
 Lysozym
 M-MLV Reverse Transcriptase RNase H
 minus point mutant
 Proteinase K
 Rnasin
SmaI
 Superscript II Reverse Transcriptase
 T4-DNA-Ligase
Taq-Polymerase
 Terminale Transferase
 Turbo *Pfu*-Polymerase
XbaI

NEW ENGLAND BIOLABS
 NEW ENGLAND BIOLABS
 NEW ENGLAND BIOLABS
 PIERCE
 PROMEGA
 MERCK
 PROMEGA

 MERCK
 PROMEGA
 NEW ENGLAND BIOLABS
 INVITROGEN
 NEW ENGLAND BIOLABS
 NEW ENGLAND BIOLABS
 PROMEGA
 STRATAGENE
 NEW ENGLAND BIOLABS

8.4 Kits

CentriSep Spin Columns
 DIG DNA Labeling and Detection Kit
 Lysis-Matrix-B Reaktionsgefäße
 Lysis-Puffer P2
 Neutralisierungspuffer P3
 NucleoSpin® ExtractII-Kit
 NucleoSpin® Plasmid-Kit
 NucleoSpin® RNAII-Kit
 Plasmid-Midi Gene Elute™-Kit

PRINCETON SEPARATIONS
 BOEHRINGER MANNHEIM
 QBIOGENE
 QIAGEN
 QIAGEN
 MACHEREY-NAGEL
 MACHEREY-NAGEL
 MACHEREY-NAGEL
 SIGMA-ALDRICH

QIAquick PCR Purification-Kit
Resuspensionspuffer P1
RNeasy Mini-Kit

QIAGEN
QIAGEN
QIAGEN

8.5 DNA-Standards

Smart ladder
1 kb DNA ladder
100 bp DNA ladder
2 log DNA ladder

EUROGENTEC
NEW ENGLAND BIOLABS
NEW ENGLAND BIOLABS
NEW ENGLAND BIOLABS

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Franz-Christoph Bange für die Überlassung des interessanten Themas, sowie dem Vertrauen, das er mir entgegenbrachte.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Otto Holst für die lehrreiche und produktive Zeit, die ich als Gast in seinem Labor verbringen durfte. Regina Engel danke ich für die Unterstützung im Labor und die ideenreichen Diskussionen.

Prof. Dr. Stefan Ehlers danke ich für die Planung und Durchführung der *in vitro* und *in vivo* Infektionsstudien. Den Mitarbeitern Dr. Kerstin Walter, Silvia Maass und Dr. Christine Keller seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Erhebung der Daten und die unkomplizierte Zusammenarbeit.

Ferner bin ich Dr. Buko Lindner und Göran Hübner für die Aufnahme der FT-ICR Massenspektren sehr dankbar, ohne die die Zuordnung der PIM nicht möglich gewesen wäre.

Dr. Manfred Rohde gilt mein Dank für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der *hddA*-Deletionsmutante.

Dr. Robert Geffers gilt mein Dank für die Bereitstellung der Infrastruktur für die Microarray-Analysen, sowie dem wissenschaftlichen Austausch bei der Auswertung der Rohdaten.

Ich danke Prof. Dr. Sebastian Suerbaum, dass ich in seinem Institut diese Arbeit anfertigen durfte.

Dr. Jens Reuther danke ich für die Inspiration bezüglich der Fusionsklonierung.

Weiterhin danke ich Sarah Horst, Julia Micklinghoff und Mascha Schmidt für die Unterstützung im Laboralltag, sowie den ehemaligen Mitarbeitern der Tuberkulose-Arbeitsgruppe in Hannover, mit denen ich gemeinsam ein Stück des Weges gehen durfte, und generell all jenen, mit denen man von Zeit zu Zeit ein motivierendes und inspirierendes Wort wechselt.

Ich danke Christian Schlag für die spontane Bereitschaft, diese Arbeit Korrektur zu lesen.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern für die bedingungslose Unterstützung,
und für das Gefühl, auf dem richtigen Weg zu sein.

11. Lebenslauf

Name:	Sven Malm
Geburtsort:	Hannover
Geburtsdatum:	6. Dezember 1979
Wohnort:	Apenrader Str. 46 30165 Hannover
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Schulbildung:	
1986-1990	Grundschule Mengendamm, Hannover
1990-1992	Orientierungsstufe Röntgenstraße, Hannover
1992-1999	Gymnasium Leibnizschule, Hannover Abschluss: Abitur
Hochschulbildung:	
Oktober 1999 – Oktober 2004	Studium der Biologie, Leibniz Universität Hannover
Oktober 2004 – Juli 2005	Diplomarbeit, unter der Leitung von Prof. Dr. Franz- Christoph Bange am Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Medizinische Hochschule Hannover (MHH) Abschluss: Diplom
Juli 2005 – Oktober 2008	Promotionsarbeit, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Franz- Christoph Bange, Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, MHH