Aus der Molekularen Mykobakteriologie

Forschungszentrum Borstel

Leibniz - Zentrum für Medizin und Biowissenschaften

Abteilung Klinische Medizin

Direktor: Prof. Dr. med. Peter Zabel

Genetische und biologische Diversität klinischer Isolate des *Mycobacterium tuberculosis* Komplex

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

Aus der Technisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät

Vorgelegt von

Susanne Homolka geb. Kretschmer

aus Prenzlau

Lübeck 2010

1. Berichterstatter / Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Schaible

2. Berichterstatter / Berichterstatterin: PD Dr. rer. nat. Stefan Niemann

Tag der mündlichen Prüfung: 05.03.2010

Zum Druck genehmigt.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung 1

2 Einleitung 2

2.1 Tuberkulose 2

2.1.1 Geschichte der Tuberkulose 2

2.1.2 Aktuelle Epidemiologie der Tuberkulose 4

2.1.3 Tuberkuloseinfektion 5

2.1.4 Therapie der Tuberkulose 6

2.2 Die Erreger der Tuberkulose - *Mycobacterium tuberculosis* Komplex 8

2.2.1 Mykobakterien 8

2.2.2 *Mycobacterium tuberculosis* Komplex 9

2.2.3 Genetische Diversität von *M. tuberculosis* Komplex Stämmen 11

2.2.4 Biologische Diversität von *M. tuberculosis* Komplex Stämmen 14

2.2.5 *M. tuberculosis* Komplex Stämme und die Immunantwort 16

2.3 Zielsetzung 17

3 Materialien und Methoden 18

3.1 Materialien 18

3.1.1 Bakterienstämme 18

3.1.2 Zelllinien und murine Makrophagen 18

3.1.3 Primer 19

3.1.4 Nährmedien und Zusätze 21

3.1.5 Puffer und Lösungen für die Infektion von murinen Makrophagen 23

3.1.6 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden 23

3.1.6.1 Puffer und Lösungen für DNA - Arbeiten 23

3.1.6.3 Puffer und Lösungen für den humanen TNFα - ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) 25

3.2 Methoden 26

3.2.1 Mikrobiologische Methoden 26

3.2.1.1 Kultivierung von *M. tuberculosis* Komplex Stämmen in Flüssigkultur 26

3.2.1.2 Bestimmung der optischen Dichte (OD) 27

3.2.1.3 Ziehl - Neelsen Färbung 27

3.2.1.4 Bestimmung der Lebendkeimzahl von *M. tuberculosis* Komplex Stämmen 28

3.2.1.5 Bestimmung des Wachstumsprofils von *M. tuberculosis* Komplex Stämmen in Flüssigkultur 29

3.2.2 Zellbiologische Arbeiten 29

3.2.2.1 Arbeiten mit der THP1 - Zelllinie 29

3.2.2.2 Arbeiten mit murinen Makrophagen 30

3.2.3 Molekularbiologische Arbeiten 33

3.2.3.1 DNA - Arbeiten 33

3.2.3.2 RNA - Arbeiten 37

3.2.3.3 Immunologische Arbeiten 42

4 Ergebnisse 43

4.1 Genetische Diversität von *M. tuberculosis* Komplex Stämmen 43

4.1.1 Mutationen in Zellwand - assoziierten Genen 49

4.1.2 Mutationen in Reaktivierungsgenen *(resusciation factors)* 53

4.1.3 Mutationen in Stoffwechselgenen 55

4.1.4 Mutationen in Antigenen 58

4.1.5 Mutationen in *pe* und *ppe* Genen 58

4.1.6 Mutationen in Resistenzgenen 59

4.1.7 Virulenz - assoziierte Gene 60

4.2 Biologische Diversität von *M. tuberculosis* Komplex Stämmen 67

4.2.1 Wachstums - und Transkriptionsanalysen in Flüssigkulturmedium - *in vitro* 68

4.2.2 Wachstums - und Transkriptionsanalysen in murinen Makrophagen - *in vivo* 73

4.3 Analyse des immunmodulatorischen Potentials von *M. tuberculosis* Komplex Stämmen 83

5 Diskussion 87

5.1 Genetische Diversität 87

5.1.1 Diversität in Strukturgenen 90

5.1.2 Diversität in Reaktivierungsgenen 90

5.1.3 Diversität in Stoffwechselgenen 91

5.1.4 Diversität in Genen mit immunmodulatorischer Bedeutung 92

5.1.5 Diversität in Virulenz - assoziierten Genen 93

5.2 Wachstumsanalysen klinischer *M. tuberculosis* Komplex Stämme 95

5.3 Transkriptionsanalysen 96

5.3.1 Transkriptionsanalysen in Flüssigkulturmedium 96

5.3.2 Transkriptionsanalysen in murinen Makrophagen 99

5.5 Ausblick 103

Abbildungsverzeichnis 125

Tabellenverzeichnis 132

Abkürzungsverzeichnis 133

Anhang 136

A Referenzkollektion 136

B Übersicht der für die Sequenzanalyse verwendeten Gene 138

C Übersicht der genotypspezifischen Mutationen aus Abbildung 4.1 139

D Materialien 141

E Abkürzungen Aminosäuren 148

Danksagung 149

Publikationen 150

Erklärung 152

1 Zusammenfassung

Die Tuberkulose ist mit jährlich 1,8 Mio. Todesfällen auch heute noch die häufigste, zum Tode führende, bakterielle Infektionskrankheit. Zu den Erregern der Tuberkulose zählen neben den primär humanpathogenen Stämmen *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum* und *M. canettii* auch die primär tierpathogenen Erreger *M. bovis, M. caprae*, *M. pinnipedii* und *M. microti*, die zum *Mycobacterium tuberculosis* Komplex (MTBK) zusammengefasst werden. Durch molekulare Typisierungsmethoden konnten MTBK Stämme in zwei phylogenetische Gruppen, sechs Hauptlinien und einer Vielzahl von Genotypen klassifiziert werden. Ob diese populationsbiologische Diversität allerdings mit pathobiologischen Merkmalen klinischer Isolate korreliert, ist noch nicht untersucht worden. Zur Analyse dieser Fragestellung wurde im Rahmen dieser Arbeit die genetische und biologische Diversität von klinischen MTBK Isolaten in verschiedenen Modellsystemen untersucht.

Die Sequenzanalyse von 29 Genen in 61 MTBK Stämmen ergab eine Vielzahl von phylogenetisch informativen Sequenzvariationen. Durch den Nachweis von Mutationen, die spezifisch für größere phylogenetische Gruppen oder Genotypen sind, konnte die in der Literatur beschriebene Populationsstruktur des MTBKs zum ersten Mal basierend auf Sequenzdaten bestätigt werden. Darüber hinaus wurde ein sequenzbasierter Assay entwickelt, der eine Differenzierung fast aller in dieser Arbeit untersuchten Stämme durch die Sequenzierung von nur fünf Genen ermöglicht.

In einem weiteren Schritt wurden Wachstumsanalysen von klinischen MTBK Stämmen durchgeführt. In Flüssigkulturmedium konnten keine Wachstumsunterschiede nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden in murinen Makrophagen, in Abhängigkeit des Aktivierungszustandes der Wirtszelle, Wachstumsunterschiede für einzelne Genotypen identifiziert, die einen Zusammenhang zwischen dem genetischen Hintergrund eines Stammes und seiner intrazellulären Fitness postulieren.

Die Genexpressionsanalysen in Flüssigkulturmedium ergaben gruppen - und genotypspezifische Genexpressionsmuster, die die Phylogenie von MTBK Stämmen auch auf transkriptioneller Ebene reflektiert. Im murinen Makrophagen - Modellsystem wurden mehr als 15 % aller Gene der untersuchten Stämme genotypspezifisch exprimiert. Umso bedeutender ist die gleichzeitige Identifizierung eines intrazellulären *Core* Transkriptoms, das alle Gene umfasst, die in den untersuchten Stämmen im Makrophagen reguliert wurden. Weiterhin zeigten MTBK Stämme ein unterschiedliches TNFα induzierendes Potential, wodurch eine stammspezifische Modulation der Immunantwort belegt wird.

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse geben einen ersten Einblick in das Zusammenspiel von genetischer und biologischer Variabilität klinischer Isolate und bieten erste Erklärungsansätze für pathobiologische Eigenschaften vonTuberkuloseerregern.

2 Einleitung

2.1 Tuberkulose

2.1.1 Geschichte der Tuberkulose

Tuberkulöse Erkrankungen lassen sich anhand von Skelettfunden, die charakteristische Wirbelkörperdestruktionen der Brustwirbelsäule aufwiesen, bis in die neolithische Zeit zurückverfolgen. Molekularbiologische Untersuchungen an ägyptischen und kolumbianischen Mumien bestätigten das Auftreten von Tuberkuloseerkrankungen in der prähistorischen Zeit (110,136). Eine systematische Beschreibung klinischer Symptome und Verlaufsformen der Tuberkulose erfolgte erstmalig durch Hippokrates (460 - ca. 370 v. Chr). Er beobachtete und dokumentierte nicht nur pulmonale, spezifische Läsionen als pathologische Merkmale, sondern prägte auch den noch heute verwendeten Begriff Phthisis (Schwindsucht) (118). Als Therapie schlug er eine medikamentöse Behandlung mit Nießwurz, Linsentrank und Brechmitteln sowie allgemeine Maßnahmen zur körperlichen Kräftigung wie Spaziergänge vor (140). Die Infektiosität der Erkrankung wurde jedoch erst von Aristoteles (384 - 322 v. Chr.) erkannt. Die hippokratischen Richtlinien zur Diagnose und Therapie der Tuberkulose galten Jahrhunderte lang.

Erst ab dem 17. Jahrhundert konnten durch anatomische Untersuchungen innerer Organe wesentliche Fortschritte in der Diagnostik und Therapie der Tuberkulose erzielt werden. Silvius de la Boë zeigte 1679 erstmalig einen Zusammenhang zwischen knotigen Veränderungen der Lunge (Tuberkeln) und der Erkrankung (158). Im Jahr 1689 beschrieb Richard Morton die Tuberkelbildung als Vorstufe der Lungentuberkulose. In den folgenden Jahren entfachte jedoch durch die zunehmenden pathologisch - anatomischen Erkenntnissen eine kontroverse Diskussion über die Ursache des Krankheitsbildes und der Infektiösität der Erkrankung, die erst durch den deutschen Arzt Robert Koch 1882 mit dem Nachweis des Tuberkuloseerregers beendet wurde.

Robert Koch erkannte mit Hilfe einer bestimmten Färbemethode über Methylenblau und Bismarckbraun charakteristische Bakterien in allen tuberkulös veränderten Organen. Der Erreger der Tuberkulose, *Mycobacterium tuberculosis,* war damit identifiziert. Das Färbeverfahren wurde später durch Franz Ziehl und Adolf Neelsen modifiziert und kommt auch heute noch als Ziehl - Neelsen Färbung zum Nachweis von Mykobakterien zur Anwendung (Abb. 2.1).

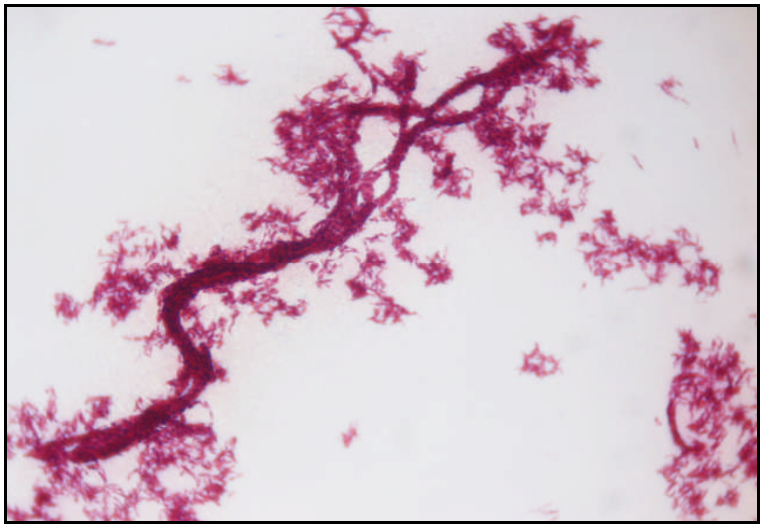


Abb. 2.1 Ziehl - Neelsen Färbung eines Präparats aus der Reinkultur von *M. tuberculosis*. Die rot angefärbten Stäbchen bilden zopfartige Strukturen. (Quelle: eigenes Präparat).

Weiterhin gelang es Robert Koch, Tuberkulin aus Mykobakterien zu isolieren, welches 1908 von Felix Mendel und Charles Mantoux zur intrakutanen Injektion als diagnostischer Nachweis weiterentwickelt wurde. Dreizehn Jahre später setzten Abert Calmette und Camille Guérin erstmalig einen BCG (Bacille Calmette - Guérin) Impfstamm ein, der durch 230 *in vitro* Passagen aus *Mycobacterium bovis* generiert wurde. In Deutschland wurde die BCG Impfung 1942 als Vorsorgemaßnahme gegen Tuberkulose eingeführt. Dreiundvierzig Jahre später wurde sie aufgrund des rapiden Rückgangs der Tuberkulose und Meldungen von Impfkomplikationen sowie der Nachweis der geringen Wirksamkeit wieder eingestellt (158).

Mit der Entdeckung und Einführung von Chemotherapeutika in den 50 er und 60 er Jahren des 20. Jahrhunderts sowie durch verbesserte diagnostische Methoden aber auch durch gesundheitspolitische Maßnahmen konnte ein erheblicher Rückgang der Tuberkulosefallzahlen beobachtet werden (69). Eine erneute Trendwende zeigte sich jedoch schon in den 80 er Jahren, bei der erstmalig wieder ein Anstieg der Tuberkuloseerkrankungen verzeichnet wurde (17,128). Als Reaktion darauf wurde 1993 von der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation*, WHO) der globale Notstand ausgerufen (36). Im Jahr 2006 erarbeitete die WHO zusammen mit einer Vielzahl von internationalen, öffentlichen und privaten Organisationen im Rahmen des so genannten *Stop TB Partnership* einen globalen Plan zur Bekämpfung der Tuberkulose. Das Ziel ist es, die Anzahl der weltweiten Tuberkuloseerkrankungen bis 2015 zu halbieren (175).

2.1.2 Aktuelle Epidemiologie der Tuberkulose

Die Tuberkulose ist neben Malaria und HIV die weltweit häufigste, zum Tode führende Infektionskrankheit (35) und stellt damit auch heute noch eine große, medizinische und gesundheitspolitische Herausforderung dar. Laut Schätzungen der WHO ist ein Drittel der Weltbevölkerung mit dem Tuberkuloseerreger infiziert und 10 % dieser Menschen werden im Laufe ihres Lebens erkranken. Der WHO Report 2009 zur globalen Kontrolle der Tuberkulose beschrieb 9,27 Mio. Neuerkrankungen für 2007 und verzeichnete damit einen erneuten Anstieg im Vergleich zum Vorjahr (172). Die globale Inzidenz erhöhte sich auf insgesamt 140 Neuerkrankungen/100.000 Einwohner. Am stärksten betroffen sind große Teile von Afrika und der westpazifische Raum sowie einige Länder Mittelamerikas (Abb. 2.2). Unter den Hochinzidenzländern zeigten Indien, China, Indonesien, Nigeria und Südafrika die höchsten Fallzahlen (172). Insgesamt verstarben 2007 1,78 Mio. Menschen an Tuberkulose, von denen 456.000 HIV positiv waren (172). Koinfektionen mit HIV erschweren die Therapiemöglichkeiten und sind vor allem in Afrika die häufigste Todesursache bei AIDS - Patienten.

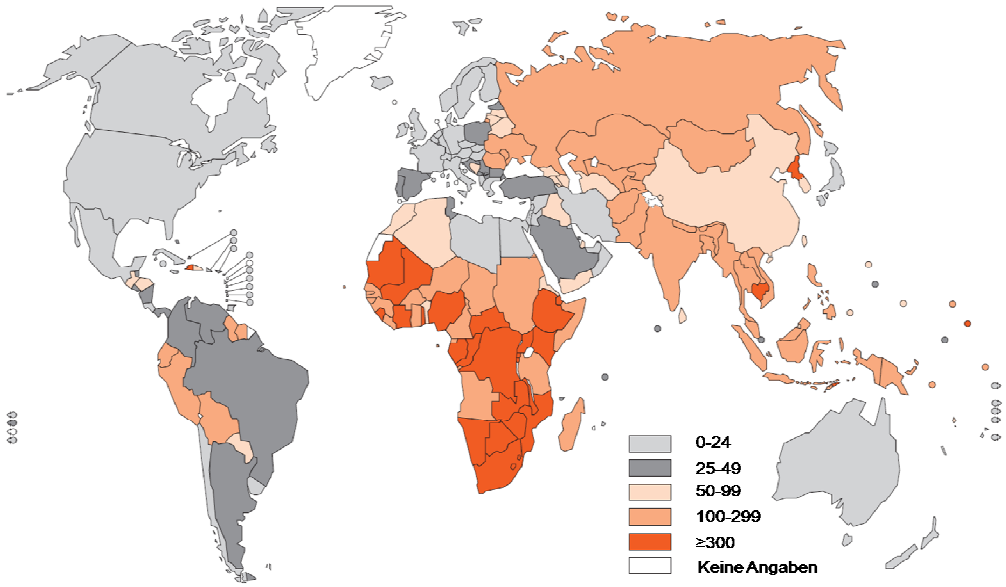


Abb. 2.2 Weltweit geschätzte Tuberkulose - Inzidenz (Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner) für das Jahr 2007. (Quelle: WHO 2009 (172)).

In Deutschland wurden 2007 5020 Neuerkrankungen gemeldet, was einer Inzidenzrate von 6,1 Neuerkrankungen/100.000 Einwohner entspricht (14). Insgesamt wurden 139 Todesfälle registriert (14). Damit setzt sich in Deutschland der in den letzten Jahren rückläufige Trend weiter fort.

Ein zunehmendes Problem bei der Behandlung von Tuberkulose ist das Auftreten von resistenten Stämmen. Laut WHO machte im Jahr 2006 der Anteil an resistenten Stämmen unter den Neuinfektionen in manchen Gebieten wie z.B in Aserbaidschan und Uzbekistan über 50 % aus (176). In 13 WHO Regionen vor allem in osteuropäischen Ländern wurden Resistenzraten von über 30 % bestätigt. In Deutschland hingegen lässt sich auch für 2007 ein rückläufiger Trend erkennen. In 11,7 % der gemeldeten Fälle konnten Resistenzen gegenüber mindestens eines der fünf wichtigsten Erstrangmedikamente nachgewiesen werden (14).

Weltweit gesehen erhöhte sich der Anteil von Stämmen, die gegen die beiden Erstrangmedikamente Isoniazid und Rifampicin resistent waren, erschreckend. Diese als multiresistent bezeichneten Stämme (*multidrug - resistant*, MDR) treten vorrangig in Ländern der ehemaligen Sowjetunion und in China auf. Insgesamt gehen weltweit ca. 5 % der Neuerkrankungen auf Infektionen mit MDR Stämmen zurück (176). In Deutschland wurden für 2007 66 MDR Fälle bestätigt, was einer MDR Rate von ca. 2 % entspricht (14).

Im Herbst 2006 wurden erstmalig so genannte XDR Fälle (*extensively drug - resistant*) beschrieben (56). Diese Stämme weisen Resistenzen gegenüber Isoniazid, Rifampicin sowie gegenüber mindestens einem der Fluorchinolone und eines der injizierbaren Zweitrangmedikamente (*second line drugs*) Amikacin, Kanamycin oder Capreomycin auf. Im Februar 2008 konnten laut WHO in 45 Ländern XDR Stämme nachgewiesen werden, die weltweit für ca. 40.000 Erkrankungen verantwortlich waren (172). Am häufigsten traten XDR Stämme in Ländern der früheren Sowjetunion auf. Auch in Deutschland wurden erstmalig XDR Fälle bestätigt (44).

2.1.3 Tuberkuloseinfektion

Die Erreger der Tuberkulose werden durch Tröpfcheninfektionen von Mensch zu Mensch übertragen. In der Lunge werden sie von Alveolarmakrophagen und dendritischen Zellen rezeptorvermittelt aufgenommen, können aber von diesen nicht immer abgetötet werden. Es wird eine lokale proinflammatorische Immunantwort induziert, die zur Rekrutierung weiterer Zellen der Immunabwehr führt. Diese Zellen bilden das so genannte Granulom oder den Tuberkel. Im Inneren des Granuloms befinden sich die infizierten Makrophagen, die von so genannten Riesenzellen und nicht infizierten Makrophagen umgeben sind. Den äußeren Mantel des Granuloms bilden Lymphozyten (61). Durch die Ausbildung des Granuloms wird die Infektion lokal eingegrenzt. Die Tuberkuloserreger reagieren auf diese effiziente Immunantwort mit einer Veränderung des Aktivitätszustandes, bei der die Stoffwechselaktivität und die Replikationsraten stark eingeschränkt werden (181).

In diesem als Dormanz bezeichneten Zustand können Mykobakterien viele Jahre im Wirt überleben (85,179), ohne ein Krankheitsbild hervorzurufen (latente Tuberkulose) (181). Kommt es zu einer Veränderung des Immunstatus des Wirts z.B. im zunehmenden Alter oder durch Koinfektionen mit HIV, kann die Granulomstruktur nicht aufrecht erhalten werden. Die Freisetzung infektiöser Erreger in die Atemwege, aus der der für die aktive Tuberkulose typische Husten resultiert, ermöglicht dem Pathogen, einen neuen Wirt über den Aerosolweg zu infizieren (164).

2.1.4 Therapie der Tuberkulose

Durch die Entwicklung und Einführung von Chemotherapeutika zählt die sensible Tuberkulose heute zu den behandelbaren Krankheiten. Zur Vorbeugung einer Resistenzentwicklung muss immer eine Kombinationstherapie aus mehreren Antibiotika angewendet werden. Die WHO empfiehlt daher folgende Standardtherapie mit den so genannten Erstrangmedikamenten Isoniazid (INH), Rifampicin (RMP), Ethambutol (EMB) und Pyrazinamid (PZA) (174):

- Initiale Phase: tägliche Behandlung mit vier Antituberkulotika (INH, RIF, EMB, PZA) in einem Zeitrahmen von zwei Monaten
- Stabilisierungsphase: wöchentliche Behandlung (3x) mit zwei Antituberkulotika (INH, RMP) in einem Zeitrahmen von vier Monaten oder tägliche Behandlung mit zwei Antituberkulotika (INH, EMB) in einem Zeitrahmen von sechs Monaten

Wahlweise kann Streptomycin (SM) ein Erstrangmedikament ersetzen. Bei Vorliegen einer Resistenz oder bei Unverträglichkeit des Chemotherapeutikums wird auf Reservemedikamente (Zweitrangmedikamente) zurückgegriffen. Dazu zählen u.a. die Fluorchinolone Moxifloxacin, Gatifloxacin und Ofloxacin und die injizierbaren Antituberkulotika Amikacin, Capreomycin und Kanamycin sowie Protionamid, Ethionamid, Rifabutin, Cycloserin und Tetracyclin (37).
Die Wirkmechanismen der Antibiotika lassen sich in bakterizid (irreversible Hemmung), bakteriostatisch (reversible Hemmung) und sterilisierend unterscheiden. Eine Übersicht der Wirkungsweisen der Erstrangmedikamente befindet sich in Tabelle 2.1.

Tab. 2.1 Wirkmechanismen von Erstrangmedikamenten.

Antibiotika	Entdeckungsjahr	Wirkmechanismus	Wirkung
Isoniazid	1952	bakterizid	Inhibierung der Mykolsäuresynthese
Rifampicin	1966	bakterizid und sterilisierend	Inhibierung der Transkription
Ethambutol	1961	bakteriostatisch	Inhibierung der Arabinansynthese
Pyrazinamid	1952	bakterizid und sterilisierend	Ansäuerung des Zytoplasmas, verringert Energiegewinnung über protonenmotorische Kraft
Streptomycin	1944	bakterizid	Inhibierung der Proteinbiosynthese

(Quelle: modifiziert nach Zhang und Telenti (182); Check *et al.* (22))

Wie unter 2.1.2 beschrieben, wird die Behandlung der Tuberkulose zunehmend durch das Auftreten resistenter Stämme erschwert. Ursachen dafür sind Therapiefehler und eine mangelnde Komplianz der Patienten. Zusätzlich trägt die Übertragung von MDR Stämmen zur Verbreitung von MDR - Tuberkulose bei.

Aufgrund starker Nebenwirkungen und der langanhaltenden Dauer der Therapie wird die Behandlung von Patienten oftmals frühzeitig abgebrochen. Daher empfahl die WHO 1999 ein DOTS Therapiekonzept (*directly observed treatment short course*), bei dem die Einnahme der Medikamente unter Aufsicht erfolgt (173). Damit sollen Heilungschancen verbessert und Resistenzentwicklungen entgegen gewirkt werden.

2.2 Die Erreger der Tuberkulose - *Mycobacterium tuberculosis* Komplex

2.2.1 Mykobakterien

Die Erreger der Tuberkulose sind der Gattung *Mycobacterium* zuzuordnen, die rund 147 obligat pathogene, fakulativ pathogene als auch apathogene Arten umfasst (http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html). Zusammen mit den Erregern der Lepra, *Mycobacterium leprae,* zählen die Tuberkulosebakterien zu den obligat pathogenen Mykobakterien. Taxonomisch betrachtet gehören sie zu der Familie der *Mycobacteriaceae* und der Ordnung *Actinomycetales*. Die Gram - positiven, aeroben Bakterien zeigen eine schlanke, gerade bis leicht gekrümmte Stäbchenform. Sie sind unbeweglich und bilden keine Sporen. Die Stäbchenbakterien sind etwa 1 bis 4 µm lang und 0,3 bis 0,6 µm breit (134).

Mykobakterien werden oft als säurefest bezeichnet. Dieser Begriff geht auf den Nachweis von Mykobakterien über die Ziehl - Neelsen Färbung zurück. Dabei werden Zellen mit Karbolfuchsin gefärbt und anschließend durch eine Säurebehandlung entfärbt. Nach einer Gegenfärbung mit Methylenblau erscheinen Mykobakterien im Gegensatz zu allen anderen Methylenblaugefärbten Bakterien rot. Mykobakterien werden aufgrund des besonderen Aufbaus ihrer Zellwand durch die Säurebehandlung nicht entfärbt.

Die mykobakterielle Zellhülle besteht aus drei Hauptkomponenten: der Plasmamembran, einem Peptidoglykan - Arabinogalaktan - Mykolsäurekomplex sowie einer aus Proteinen und Polysacchariden bestehenden Kapsel (Abb. 2.3, (30)). Die Einzigartigkeit beruht auf dem Peptidoglykan - Arabinogalaktan - Mykolsäurekomplex. Arabinogalaktan bindet zum einen kovalent an Peptidoglykan (30). Zum anderen ist es über Esterbindungen mit Mykolsäuren verknüpft (104). Mykolsäuren sind langkettige Fettsäuren, die aus 60 bis 90 C - Atomen bestehen und damit eine Permeabilitätsbariere bilden (65,115). Beispielhaft verleihen Mykolsäuren gegenüber hydrophilen Antibiotika wie Beta - Lactame eine natürliche Resistenz (76).

Weitere wichtige Bestandteile der mykobakteriellen Zellwand sind die Phosphatidylinositol - Mannoside (PIMs) und das Lipoarabinomanan (LAM). Diese biologisch aktiven Glykolipide sind direkt mit der Plasmamembran verankert. Über unterschiedliche Mannosylierungsmuster tragen sie zu entscheidenden, mykobakteriellen Pathogenitätsmerkmalen bei (40,41,43,65). Eine variable Mannosylierungsstruktur und daraus resultierende Pathogenitätsmerkmale könnten auf unterschiedliche PIM und LAM Synthesewege, die auf genomische Sequenzvariationen mykobakterieller Arten beruhen, zurückzuführen sein.

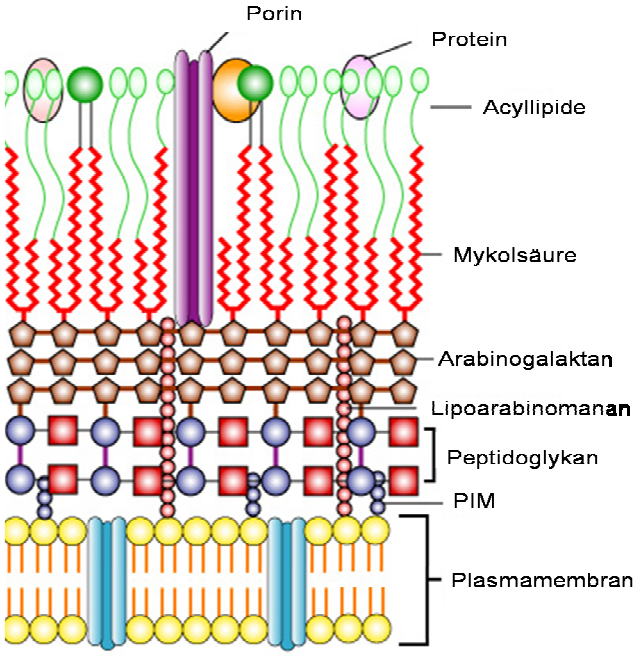


Abb. 2.3 Aufbau der mykobakteriellen Zellwand. PIM: Phosphatidylinositol - Mannosid (Quelle: modifiziert nach http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit1; Dr. Gary Kaiser).

2.2.2 *Mycobacterium tuberculosis* Komplex

Zu den Erregern der Tuberkulose zählen neben *M. tuberculosis*, *M. africanum* und *M. canettii* auch die tierpathogenen Erreger *M. bovis, M. caprae*, *M. pinnipedii* und *M. microti*, die zum *Mycobacterium tuberculosis* Komplex (MTBK) zusammengefasst werden (148). Global betrachtet gilt *M. tuberculosis* als Haupterreger tuberkulöser Erkrankungen beim Menschen. Aber auch *M. africanum* Stämme sind für eine Vielzahl von Tuberkuloseinfektionen besonders in bestimmten Regionen Afrikas verantwortlich (74,112). Im Gegensatz dazu wurden *M. canettii* Stämme bislang nur vereinzelt von Patienten in Ostafrika isoliert (123,167).

Tierpathogene Erreger besitzen im Allgemeinen ein breiteres Wirtsspektrum. So können *M. bovis* Stämme neben Infektionen bei Rindern, Wildschweinen, Nashörnern oder Dachsen auch Erkrankungen im Menschen verursachen (46,138). *M. caprae* Stämme wurden hauptsächlich aus Ziegen und Schafen isoliert (7,8), aber auch Infektionen von Menschen, Rindern und anderen Tieren sind beschrieben (31,90,121). *M. microti* konnte hauptsächlich aus kleinen Nagern wie der Erdmaus und beim Menschen isoliert werden (51,114,147). *M. pinnipedii* Stämme führen zu tuberkulösen Erkrankungen in Seelöwen und Robben (87).

Stämme des MTBKs weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit auf (99,9 %) (15,67). Daher beruhte die Differenzierung klinischer Isolate viele Jahre lang ausschließlich auf phänotypische und morphologische Eigenschaften. Zum Beispiel können *M. bovis* und *M. caprae* Stämme über die PZA - Empfindlichkeitstestung differenziert werden (113). Morphologische Merkmale wie eugones und dysgones Wachstum auf Löwenstein - Jensen Kulturmedium ermöglichen ebenfalls eine Klassifizierung von MTBK Stämmen. *M. tuberculosis* Stämme zeigen ein eugones Wachstum mit trockenen, krümeligen Kolonien. *M. africanum*, *M. canettii* und *M. bovis* Isolate bilden hingegen feuchte, farblose Kolonien und werden als dysgon bezeichnet.

Eine detaillierte Differenzierung von klinischen Isolaten wurde durch die Entwicklung und Einführung molekularer Typisierungsmethoden wie IS*6110* RFLP (*insertion sequence* 6110 *restriction fragment length polymorphism*) Fingerprinting, Spoligotypisierung (*spacer oligonucleotide typing*) oder MIRU - VNTR (*mycobacterial interspersed repetitive units - variable number of tandem repeats*) ermöglicht (78,154,166). Dadurch können Stämme des MTBKs in so genannte Genotypen und phylogenetische Linien klassifiziert werden (16,177). Zum Beispiel beinhaltet die SpoDB4 Datenbank (http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/bd_myco.html) derzeit basierend auf ca. 40.000 klinischen Isolaten aus 122 Ländern 1939 Spoligomuster, die 62 Linien beschreiben (16). Weiterhin definierten Wirth *et al.* 2008 die phylogenetischen Gruppen 1 und 2 (*clade 1 and 2*; (177)). Zur phylogenetischen Gruppe 1 gehören mit Ausnahme von *M. tuberculosis* EAI (*East African Indian*) Stämmen alle *M. tuberculosis* Isolate. Die phylogenetische Gruppe 2 wird durch *M. africanum, M. canettii* und *M. tuberculosis* EAI sowie allen tierpathogenen Erregern gebildet (177).

Häufig vorkommende *M. tuberculosis* Genotypen, die oftmals nach dem Isolierungsort benannt wurden, sind Beijing, Cameroon, Haarlem, Dehli/CAS (*Dehli/Central Asian*) und LAM (*Latin - American - Mediterranean*) aber auch Uganda und Ghana (177). Viele dieser Genotypen werden in weiteren Subgruppen unterteilt (16). *M. africanum* Stämme werden in West African 1 und in West African 2 Stämme unterschieden (112). Abbildung 2.4 zeigt einen Ähnlichkeitsstammbaum basierend auf MIRU - VNTR und Spoligotypisierungdaten. Dargestellt sind ausgewählte Beispiele unterschiedlicher Genotypen von Stämmen des MTBKs mit ihren jeweiligen Spoligomustern.

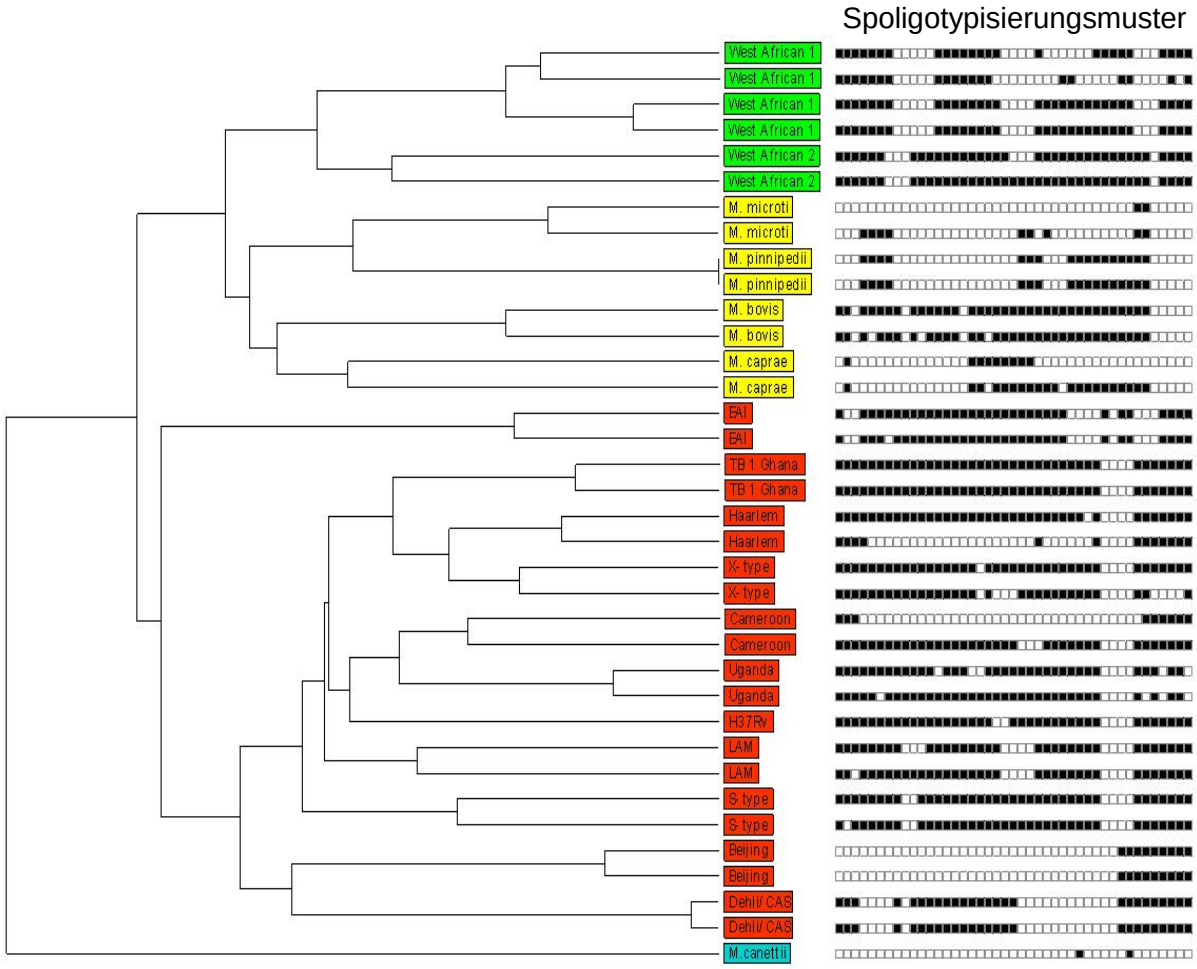


Abb. 2.4 Ähnlichkeitsstammbaum basierend auf MIRU - VNTR (24 Loci) und Spoligotypisierungsdaten (43 Spacer) von 36 Stämmen verschiedener Genotypen. (*UPGMA tree*; http://www.miru-vntrplus.org) Grün: *M. africanum*; Gelb: tierpathogene Erreger; Rot: *M. tuberculosis*; Blau: *M. canettii.* CAS: *Central Asian* Genotyp*;* EAI: *East African Indian* Genotyp; LAM: *Latin - American - Mediterranean* Genotyp.

2.2.3 Genetische Diversität von *M. tuberculosis* Komplex Stämmen

Das Guanin - und Cytosin - reiche Genom von *M. tuberculosis* Stämmen hat eine Größe von ca. 4,4 Mbp und kodiert für ungefähr 4000 Genen (58). Wie vergleichende Genomstudien zeigten, weisen Stämme des MTBKs eine Sequenzidentität von 99,9 % auf (48,58). Diese geringe genetische Diversität resultiert aus dem geringen phylogenetischen Alter und der strikten Klonalität mykobakterieller Erreger (177). Im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien finden horizontaler Gentransfer und Rekombinationsereignisse in MTBK Stämmen nur selten statt (71,155).

Sreevatsan *et al.* beschrieben 1997 basierend auf der Sequenzanalyse von 26 Strukturgenen in 842 klinischen Isolaten 32 Mutationen, von denen 30 zu keiner Veränderung in der Aminosäuresequenz führten (151). Aufgrund dieser geringen Sequenzvariabilität wurden Stämme des MTBKs nach Sreevatsan *et al.* in lediglich drei großen phylogenetischen Gruppen eingeteilt. Als phylogenetische Marker wurden Mutationen in Codon 463 des *katG* und in Codon 95 des *gyrA* Gens beschrieben (151).

Durch die Entschlüsselung des *M. tuberculosis* H37Rv Genoms (27) und vergleichende Analysen der Referenzstämme H37Rv und *M. bovis* BCG Pasteur konnten variable Regionen (*regions of difference,* RD) im mykobakteriellen Genom nachgewiesen werden (62). Über den Nachweis von 20 dieser großen Sequenzpolymorphismen (*large sequence polymorphism*, LSP) in 100 klinischen Isolaten gelang es Brosch *et al.* 2002, Stämme des MTBKs in verschiedene phylogenetische Gruppen einzuteilen (15). Zum Beispiel lassen sich *M. tuberculosis* und *M. canettii* Isolate von *M. africanum* und tierpathogenen Erregern über die RD9 Region unterscheiden. Alle *M. tuberculosis* und *M. canettii* Isolate weisen diese Region auf, während *M. africanum*, *M. microti* und *M. bovis* eine Deletion zeigen (15).

Eine umfangreiche Studie zur genetischen Diversität basierend auf LSP Analysen in 875 klinischen Isolaten veröffentlichten Gagneux *et al.* 2006 (55). Darin wurde nachgewiesen, dass *M. tuberculosis* und *M. africanum* Isolate in sechs Hauptlinien unterschieden werden können (Abb. 2.5), die sich über die RD9, TbD1 und *pks15/1* Region definieren lassen (55).

Eine Vielzahl der weltweit vorkommenden *M. tuberculosis* Stämme gehören der so genannten *Euro - American* Linie an (Abb. 2.5, *M. tuberculosis* Linie 4). Dazu zählen beispielsweise die Genotypen Haarlem, Uganda, Cameroon oder LAM. Diese Stämme weisen die RD9 Region auf ($RD9^+$), zeigen aber Deletionen der TbD1 Region ($TbD1^-$) und im *pks15/1* Gen (*pks15/1*$^-$) (29).

Die *M. tuberculosis* Linie 1, zu denen Isolate des EAI Genotyps zählen, zeigen keine Deletionen in RD9, TbD1 und *pks15/1,* sie sind also $RD9^+$, $TbD1^+$ und *pks15/1*$^+$. Stämme dieser Linie werden über Deletionen in der RD239 Region definiert. Klinische Isolate der Linien *M. tuberculosis* 2 und 3 (Abb. 2.5), zu denen die Genotypen Beijing und Dehli/CAS zuzuordnen sind, werden als $RD9^+$, $TbD1^-$ und $pks15/1^+$ beschrieben (29).

M. africanum Isolate und tierpathogene Stämme sind $RD9^-$ und $TbD1^+$. West African 1 und West African 2 Stämme unterscheiden sich im *pks15/1* Gen. Stämme des West African 1 Genotyps zeigen im Gegensatz zu West African 2 Stämme keine Deletion (29).

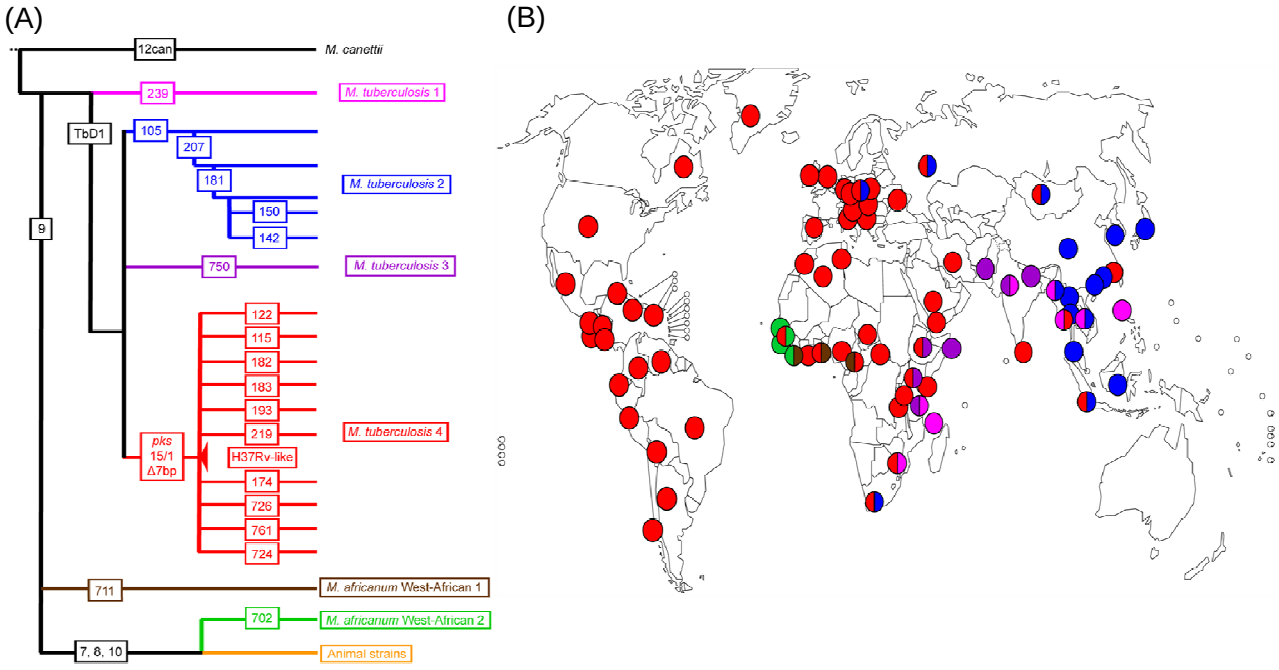


Abb. 2.5 Globale Populationsstruktur und geographische Verteilung von MTBK Stämmen. (A) LSPs definieren sechs phylogenetische Hauptlinien. (B) Geographische Verteilung der sechs Hauptlinien. (Quelle: Comas *et al.* 2009 (29)).

Gagneux *et al.* bestätigten einen Zusammenhang zwischen phylogenetischen Linien und ihrem Vorkommen in bestimmten geographischen Regionen (Abb. 2.5 (55)). So gehören z.B. in Asien die Mehrheit der Stämme zu den EAI und Beijing Genotypen, während in Europa Stämme der *Euro - American* Linie am häufigsten vertreten sind. Weiterhin wurde postuliert, dass klinische Isolate des MTBKs spezifisch an bestimmte humane Populationen adaptiert sind und dass daher die genetische Diversität gerade in Hinblick auf die Entwicklung neuer Impfstoffe oder Medikamente nicht vernachlässigt werden darf (55).

LSPs können als valide Marker für die Klassifizierung von phylogenetischen Gruppen genutzt werden. Jedoch haben sie für phylogenetische Analysen auch eine Reihe von Nachteilen. Zum einen ist die Unterscheidungsfähigkeit stark eingeschränkt. Zum anderen geben LSP Daten im Gegensatz zu Sequenzdaten basierend auf Einzelbasenaustauschen (*single nucleotide polymorphism,* SNP) keine Auskunft über die genetische Distanz von Stämmen.

Nach der Studie von Sreevatsan *et al.* führten Baker *et al.* 2004 eine Multi - Locus Sequenzanalyse (MLSA) von sieben konstitutiv exprimierten Genen in 225 klinischen Isolaten durch, um informative Sequenzvariationen zu bestimmen (9,151). Dabei konnten 37 synonyme SNPs identifiziert werden, die *M. tuberculosis* in vier Hauptlinien unterteilte.

Basierend auf der Analyse von 36 SNPs in 5069 Isolaten konnten Gutacker *et al.* nachfolgend neun phylogenetische Linien bestimmen und ebenfalls einen Zusammenhang mit ihrer geographischen Verteilung beobachten (66). Eine ähnliche Studie, in der 159 SNPs in 219 Stämmen untersucht wurden, veröffentlichte Filliol *et al.* im selben Jahr (47). Auch hier konnte nachgewiesen werden, dass das Vorkommen von MTBK Stämmen mit bestimmten geographischen Regionen korreliert (47).

Diese Studien zeigten, dass die genetische Diversität von Stämmen des MTBKs größer sein könnte als urprünglich angenommen. Darüber hinaus lässt die Korrelation genotypspezifischer Varianten mit bestimmten geographischen Regionen einen ersten Zusammenhang zwischen genetischer Diversität und biologischer Variabilität klinischer Isolate vermuten.

Eine systematische Analyse der genomischen Variabilität klinischer Isolate basierend auf einer Stammkollektion, welche die gesamte geographische Diversität des MTBKs abdeckt, ist bislang noch nicht durchgeführt worden. Die meisten Studien basieren auf lokalen Kollektionen klinischer Isolate, wobei die eingeschlossenen, phylogenetischen Linien stark von der jeweiligen Studienregion abhängen. Weiterhin ist die Frage nach den phänotypischen Konsequenzen und der klinischen Relevanz der genetischen Diversität von Stämmen des MTBKs gerade in Hinblick auf SNPs mit funktioneller Bedeutung nicht geklärt.

2.2.4 Biologische Diversität von *M. tuberculosis* Komplex Stämmen

Schon vor über 50 Jahren veröffentlichten Collins und Smith, dass sich *M. tuberculosis* Isolate in ihrer Virulenz und ihren phänotypischen Eigenschaften unterscheiden (28). Zahlreiche Studien in Tierinfektionsmodellen folgten, die einen Zusammenhang zwischen bestimmten Stämmen und einem virulenz - assoziierten Phänotyp bestätigten (10,11,63,64,99,109). Eine Korrelation bestimmter Genotypen mit phänotypischen Merkmalen wurde jedoch erst durch die populationsbiologische Klassifizierung von MTBK Stämmen ermöglicht.

Tierexperimentelle Analysen und Untersuchungen im Zellkultursystem von *M. tuberculosis* Beijing HN878, der für eine Vielzahl von Infektionen in Los Angeles und Houston verantwortlich war (12), beschrieben beispielsweise einen hypervirulenten Phänotyp (100-102,180). Dass auch andere klinische Isolate des Beijing Genotyps mit einem hypervirulenten Phänotyp assoziiert sein können, wurde in verschiedenen Studien bestätigt (38,94,96,122).

Eine erste mögliche Erklärung der Hypervirulenz lieferte Reed *et al.* 2004. Es konnte gezeigt werden, dass Beijing Isolate eine funktionelle Polyketidsynthase (*pks15/1*) besitzen, die essentiell für die Synthese eines immunmodulatorischen Virulenzfaktors ist, dem phenolischen Glykolipid (PGL) (129).

Stämme der *Euro - American* Linie hingegen weisen eine 7 bp Deletion in *pks15/1* auf, die zu einer inaktiven Polyketidsynthase führt und damit die PGL Synthese ausschließt (129). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nicht alle Beijing Stämme PGL synthetisieren können und somit in weitere Untergruppen differenziert werden muss (130)

Stämme des Beijing Genotyps wie HN878 überexprimieren zudem das DosR Regulon, welches u.a. an der Regulation einer Triacylglyzeridsynthase beteiligt ist (130). Dadurch kommt es im Vergleich zu Nicht - Beijing Isolaten zur verstärkten Synthese von Triglyzeriden unter areoben *in vitro* Kulturbedingungen (91). Es wurde vermutet, dass diese als zusätzliche Energiequelle unter nährstoffarmen Bedingungen, wie sie beim Übertragungsprozess vorliegen, genutzt werden können und dadurch eine höhere Transmission von Beijing Stämmen erlauben (91).

Die Bedeutung der genetischen Diversität für phänotypische Eigenschaften von MTBK Stämmen spiegelt sich auch im Erwerb von Resistenzmutationen wider. Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Mutationen, die eine Resistenz gegenüber den Erstrangmedikamenten verursachen, zu einem Fitnessverlust führen (54). Dieser Fitnessverlust ist jedoch nicht nur abhängig von der Sequenzveränderung selbst, sondern steht auch im Zusammenhang mit dem genetischen Hintergrund eines Stammes, der diese Mutation erwirbt (53,165). Die phylogenetische Linie oder Gruppe, zu der ein MTBK Stamm gehört, spielt somit in Hinblick auf den Erwerb von Resistenzmutationen eine entscheidene Rolle und ist dementsprechend von erheblicher, klinischer Bedeutung.

Weiterhin zeigten Studien einen Zusammenhang zwischen dem Genotyp und dem klinischem Phänotyp eines Stammes (19,20,32,98,161). De Jong *et al.* beschrieben 2008, dass bestimmte *M. tuberculosis* Genotypen im Vergleich zu *M. africanum* Stämmen häufiger zu einer aktiven Tuberkulose progressieren (32). Es wurde vermutet, dass sich *M. africanum* Stämme mit einer längeren Latenzphase evolutionär an eine verhältnismäßig geringe Wirtsdichte in Afrika anpassten. Im Gegensatz dazu nutzten *M. tuberculosis* Stämme die hohe Populationsdichte in Ballungszentren in Europa und Amerika, um eine Vielzahl von Neuinfektionen zu verursachen (32).

Einen weiteren Zusammenhang zwischen MTBK Genotypen und der Ausprägung der Tuberkuloseerkrankung beschrieben Thwaites *et al.* in ihrer 2008 veröffentlichten Studie, in der eine Korrelation zwischen pulmonaler oder meningealer Tuberkulose und der Infektion mit bestimmten Genotypen gezeigt werden konnte (161). Stämme der *Euro - American* Linie führten seltener zu extrapulmonalen Erkrankungen als Erreger anderer phylogenetischer Linien (161).

Wie anhand dieser wenigen Studien mit ausgewählten klinischen Isolaten verdeutlicht wurde, scheint die genetische Variabiltät von MTBK Stämmen eine entscheidene Rolle hinsichtlich der Biologie und Pathologie der Tuberkulose zu spielen. Die molekularen Grundlagen, die diese biologische Diversität bedingen, sind jedoch bislang weitgehend unverstanden.

2.2.5 *M. tuberculosis* Komplex Stämme und die Immunantwort

Pathogene Mykobakterien sind in der Lage, die Phagosom - Lysosom Fusion im Makrophagen, die zur Abtötung intrazellulärer Keime führt, zu arrestieren (135). Die wesentliche Funktion infizierter Makrophagen besteht darin, die intrazellulären Mykobakterien an einer weiteren Ausbreitung zu hindern und gleichzeitig mykobakterielle Antigene zur Aktivierung einer adaptiven Immunantwort spezifischen T - Zellen zu präsentieren (124). Über die Sekretion von Zytokinen wie Interleukin IL12 oder IL18 wird eine schützende Helfer - T - Zellantwort (Th1) induziert. Th1 Zellen produzieren u.a. Interferon γ (IFNγ) und Tumornekrosefaktor α (TNFα). Die synergistisch wirkenden Zytokine aktivieren die Makrophagen, intermediäre Sauerstoff - (*reactive oxygen intermediate*, ROI) und Stickstoffradikale (*reactive nitrogen intermediate*, RNI) zu bilden, die die intrazellulären Mykobakterien angreifen (97). Die Erreger erfahren im Verlauf der Infektion veränderte intrazelluläre Bedingungen und müssen sich dementsprechend an verschiedene Umgebungen anpassen, um eine Infektion zu etablieren.

TNFα ist maßgeblich an der Rekrutierung von Immunzellen über die Sekretion von Chemokinen beteiligt und spielt somit eine entscheidene Rolle bei der Granulombildung. Eine ineffektive Th1 Antwort führt zur veränderten Granulomstruktur und ist damit von klinischer Bedeutung.

Insgesamt führt die Interaktion von verschiedenen Zelltypen zur Ausbildung einer erfolgreichen Kontrolle der Infektion, wobei die Kommunikation durch einen komplexen Zytokin - Cocktail erfolgt. Die Modulation dieser Immunantwort durch die Pathogene ist ein potentiell wichtiger Pathogenitätsmechanismus, der ein „Erfolgsprinzip“ von MTBK Stämmen darstellen könnte.

In diesem Zusammenhang haben erste Studien gezeigt, dass klinische Isolate ein unterschiedliches, immunmodulatorisches Potential besitzen, über das sie die Immunantwort in unterschiedlicher Weise beeinflussen (82,96,101,160). Zum Beispiel zeigten Manca *et al.* 2004, dass klinische Isolate des Beijing Genotyps eine geringere TNFα Antwort in humane Monozyten induzieren als Nicht - Beijing Isolate (100). Im Gegensatz dazu beschrieben Chacon - Salinas *et al.* 2005, dass die Infektion mit Beijing Stämmen im Vergleich zu *M. canettii* und H37Rv zu einer erhöhten Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie TNFα führte (21). Tierexperimentelle Arbeiten von López *et al.* ergaben ebenfalls eine höhere TNFα Induktion bei Infektionen mit Beijing Stämmen (96).

Die wenigen beschriebenen Studien fokussierten sich vorrangig auf die Analyse des immunmodulatorischen Potentials von Stämmen des Beijing Genotyps im Vergleich zu Referenzstämmen. Dies resultiert vermutlich aus der in der Literatur diskutierten Hypervirulenz von Beijing Isolaten. Eine systematische Analyse genotypspezifischer Unterschiede von Stämmen des MTBKs hinsichtlich der Modulation der Immunantwort ist jedoch noch nicht durchgeführt worden.

2.3 Zielsetzung

Wie zuvor beschrieben, wurde die genetische Diversität von MTBK Stämmen und ihre klinischen Konsequenzen viele Jahre lang als vernachlässigbar betrachtet und nicht systematisch analysiert. Erst in den letzten Jahren konnte, basierend auf modernen, molekularbiologischen Typisierungsmethoden, die globale Populationsstruktur des MTBKs besser beschrieben und eine Vielzahl von Genotypen und phylogenetischen Linien identifiziert werden. Systematische Studien zur Beschreibung der genetischen Variabilität von Stämmen unterschiedlicher Genotypen und mögliche funktionelle Konsequenzen z.B. für die Wirt - Pathogen Interaktion sind allerdings noch nicht durchgeführt worden. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die genetische und biologische Diversität von klinischen MTBK Isolaten analysiert werden.

I. Zunächst sollte die genetische Diversität von MTBK Stämmen durch vergleichende Sequenzanalysen einer umfangreichen Referenzkollektion klinischer Isolate untersucht werden.

II. Zur Analyse der biologischen Diversität klinischer Isolate wurden folgende Fragestellungen betrachtet:

- Zeigen Stämme verschiedener Genotypen Wachstums - und Genexpressionsunterschiede in Flüssigkulturmedium?
- Verändert sich das Wachstumsprofil und die Genexpressionsantwort klinischer Isolate im intrazellulären System?
- Welchen immunmodulatorischen Einfluss besitzen Stämme verschiedener Genotypen auf die Wirtszelle?

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

Alle im Folgenden nicht aufgelisteten Materialien und Gebrauchslösungen (Enzyme, Chemikalien, Kits, Verbrauchsmaterialien und Geräte) sowie deren Hersteller und Bestellnummern sind im Anhang D zusammengefasst.

3.1.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit zur Untersuchung der genetischen und biologischen Diversität verwendete Referenzkollektion klinischer Isolate umfasst 58 Vertreter der weltweit am häufigsten vorkommenden Spezies und Genotypen des MTBKs. Alle Mykobakterienstämme sind in Vorarbeiten am Nationalen Referenzzentrum in Borstel phäno - und genotypisch charakterisiert worden. Die vorhandenen Referenzstämme H37Rv, CDC1551, *M. bovis* ATCC sowie *M. africanum* ATCC wurden in die Analyse mit einbezogen. Eine detailierte Beschreibung der einzelnen Stämme hinsichtlich der Spezies, ihres Genotyps und der Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung gegenüber den Erstrangmedikamenten befindet sich im Anhang A.

3.1.2 Zelllinien und murine Makrophagen

Für die Analyse des immunmodulatorischen Potentials verschiedener MTBK Stämme wurde die human monozytische THP1 - Zelllinie verwendet. Die THP1 - Zelllinie wurde durch die DSMZ GmbH (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) zur Verfügung gestellt.

Die Transkriptom - und Wachstumsanalysen klinischer Isolate erfolgten in murinen Makrophagen, die aus dem Knochenmark von C57Bl/6 Mäusen isoliert wurden. Die tierexperimentellen Arbeiten wurden im Labor von Prof. Dr. David Russell an der Cornell Universität, Ithaca, New York, USA durchgeführt und von dem *Cornell University Animal Care and Use Committee* (IACUC) genehmigt.

3.1.3 Primer

Die in Tabelle 3.1 zusammengefassten Primersequenzen sind in der entsprechend gekennzeichneten Literatur beschrieben bzw. mit Hilfe der OLIGO Primer Analysis Software v.5.0 entworfen worden. Die dargestellten Positionen ergeben sich aus den Nukleotidpositionen des 5` - Endes der jeweiligen Primer, wobei der Genstart mit +1 definiert ist. Alle Primer wurden durch Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland hergestellt.

Tab. 3.1 Primersequenzen.

Primer	Sequenz	Position
Rv0288 - F[1]	5`- GAG AGG GGG AGG CGA CGG CTA CC -3`	- 411
Rv0288 - R[1]	5`- TCC CCG CCC CAA TGG TTT CAG C -3`	+ 356
Rv0388c - F	5`- CCC AGC CAC GCA GCG CTG AG -3`	- 49
Rv0388c - R	5`- CTC GAT GGG GTT CGG AAT G -3`	+ 646
Rv0407 - F[1]	5`- CGT GGC CGC GAG CGA GGT GAA -3`	- 189
Rv0407 - R[1]	5`- CGC CCG AAC CGT CAA CAA CAC TGG -3`	+ 1394
Rv0407 - S1[1]	5`- CGG AGT TCA AGG AGC GGT TCG -3`	+ 368
Rv0410c - F[1]	5`- CTG GCC GGG CTG GTA GAG GAA GAC -3`	- 227
Rv0410c - R[1]	5`- CCG ATC GCC GTG CTG GTG GTT -3`	+ 2373
Rv0410c - S1[1]	5`- TGA GGC CCT GAT GAC CAA CCC -3`	+ 270
Rv0410c - S2[1]	5`- GGC GCT GAG CTA CCT GCA TTC -3`	+ 786
Rv0410c - S3[1]	5`- GCG CAC ACC GAC GTG TAT CTG -3`	+ 1285
Rv0557 - F	5`- CTG GAC AAG CGG TTG GAA C -3`	- 112
Rv0557 - R	5`- GTC ATA CTT GCG GGC GAC G -3`	+ 1210
Rv0667 - F	5`- TCG CCG CGA TCA AGG AGT -3`	+ 1253
Rv0667 - R	5`- GTG CAC GTC GCG GAC CTC CA -3`	+ 1391
Rv1009 - F[1]	5`- GGC CCA TTT TGC TTT TTG TT -3`	- 105
Rv1009 - R[1]	5`- GGC CCG ACC TCC AAA ACC AG -3`	+ 1236
Rv1483 - F	5`- CCT CGC TGC CCA GAA AGG GA -3`	- 168
Rv1483 - R	5`- ATC CCC CGG TTT CCT CCG GT -3`	+ 61
Rv1617 - F[2]	5`- CGT TGC CCG GAA TGA ACG TG -3`	+ 473
Rv1617 - R[2]	5`- GGA TGG CTC GCT TCT GTA CC -3`	+ 768
Rv1811 - F	5`- CGC CTA GGC TCA AAC TGC TG -3`	- 78
Rv1811 - R	5`- CAA TAC CCG GCG GAT CTA CC -3`	+ 783
Rv1884c - F[1]	5`- CAA CGG GCC CTG ACG ACA -3`	- 68
Rv1884c - R[1]	5`- GCG CTG CCA TGT GAA CTG TG -3`	+ 602

Fortsetzung Tab. 3.1.

Primer	Sequenz	Position
Rv1908 - F	5`- GAA ACA GCG GCG CTG ATC GT -3`	+ 781
Rv1908 - R	5`- GTT GTC CCA TTT CGT CGG GG -3`	+ 971
Rv1980c - F[1]	5`- CAG CGC GAT GCC CTA TGT -3`	- 102
Rv1980c - R[1]	5`- TGG GCG CAC CGA ACA CTC -3`	+ 739
Rv2032 - F[1]	5`- TGG CGC TGA ACG GGA AGG GTG GT -3`	- 225
Rv2032 - R[1]	5`- CTC AGC CGG CCG GGG ACG AAT AGC -3`	+ 1111
Rv2032 - S1[1]	5`- GCC GGA TTG GGA CTT GGT -3`	+ 390
Rv2389c - F[1]	5`- TGG CGG CGT CGG TCA AAT CAG C -3`	- 169
Rv2389c - R[1]	5`- CCA GCT GGG CCG GGG TGT AGG TA -3`	+ 645
Rv2428 - F	5`- ACC ACT GCT TTG CCG CCA CC -3`	- 178
Rv2428 - R	5`- CCG ATG AGA GCG GTG AGC TG -3`	+ 40
Rv2430c - F	5`- CGG CGG CGG TGG TTC TTG AG -3`	- 144
Rv2430c - R	5`- TGA AAG CCG CAG CAA TCG TT -3`	+ 633
Rv2431c - F	5`- ATC GTC GGG TGG CGT TGT GT -3`	- 197
Rv2431c - R	5`- CAT CCA ACG ACC TCC ACG CC -3`	+ 433
Rv2450c - F[1]	5`- CGG GCA GCA AGA AAT CTC AAC AAT -3`	- 240
Rv2450c - R[1]	5`- GCC CGG GCC AGG TAT TC -3`	+ 681
Rv2609c - F	5`- TGG CCG ATG GAC TGA TTG C -3`	- 169
Rv2609c - R	5`- TCA ACG ACG CCC TGT CCG GA -3`	+ 1126
Rv2609c - S1	5`- GGC CCG CCG CTT CCA CAA C -3`	+ 366
Rv2610c - F	5`- CAG AAC ATT GCC GCC CAT C -3`	- 109
Rv2610c - R	5`- GCC GAA CGC AAC CAG CAC A -3`	+ 1175
Rv2610c - S1	5`- CCG ATT GTG GCG ACA TTT CA -3`	+ 334
Rv2611c - F	5`- GGC GTT GTC GGT GGG GAT GT -3`	- 126
Rv2611c - R	5`- TGC GCA TCA CCT CGG CAA GC -3`	+ 1030
Rv2611c - S1	5`- CCG GCT GCC GAC GAT AAA C -3`	+ 291
Rv2612c - F	5`- ACC ATC ATC GGG GGC TCC A -3`	- 83
Rv2612c - R	5`- CAT ACG CCC AGT CGG TCG C -3`	+ 714
Rv2613c - F	5`- TCA TGG TGT TGG CGG GTG AT -3`	- 174
Rv2613c - R	5`- CAG CAG TCC CCT GGC GAT C -3`	+ 638
Rv2628 - F[1]	5`- GGC GCG ACC GGG CAC ATC -3`	- 83
Rv2628 - R[1]	5`- GCG GGA AGG CAT AGG GAC CAA AGT -3`	+ 415
Rv2629 - F	5`- CCG CTG GAC CGC ACA ACG AT -3`	- 275
Rv2629 - R	5`- GAT TCG CAA GTC CGC CGT AT -3`	+ 1281

Fortsetzung Tab. 3.1.

Primer	Sequenz	Position
Rv2946c - F	5`- GCC CCC GCA GAG GCG CCG GTT -3`	- 68
Rv2946c - R	5`- CTG GGT TGG CCT GCA CGT GGG CCA TAA -3`	+ 50
Rv3547- F[1]	5`- CGA GCG CAC CGA CCA GAG C -3`	- 196
Rv3547- R[1]	5`- GCA TGG CCC GCA GGT GGA CAA -3`	+ 630
Rv3696c - F	5`- CGG CAA GCT GCA GTG GAT CCT GGA A -3`	+ 447
Rv3696c - R	5`- GGC AGC ATG GCC CGA GGT ATC GAA A -3`	+ 662

[1]Hershberg *et al.* (70)

[2]Keating *et al.* (83)

3.1.4 Nährmedien und Zusätze

BBL™ BHI Broth (1000 ml)

Zur Herstellung von einem Liter wurden 38 g BBL™ BHI Broth in Aqua dest. gelöst und autoklaviert.

LB Medium (1000 ml)

20 g LB Medium Basis wurden in einem Liter Aqua dest. gelöst und autoklaviert. Die LB Medium Basis bestand aus 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt und 5 g/l NaCl.

Löwenstein - Jensen Medium (1600 ml)

Zunächst wurden 38,5 g Löwenstein - Jensen Basis in 600 ml Aqua dest. gelöst und 12 ml 87 % Glyzerin hinzugefügt. Die Lösung wurde autoklaviert. Anschließend wurden 1000 ml Volleier dazu gegeben und die Lösung zu je 5 ml in Glasröhrchen abgefüllt. Die Koagulation erfolgte bei 86°C in Schräglage für 45 min.

Makrophagen - Medium (500 ml)

Für die Kultivierung muriner Makrophagen wurden 100 ml L - Zell - Medium, 50 ml fötales Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS), 5 ml L - Glutamin, 5 ml Natriumpyruvat sowie wahlweise 5 ml Penicillin/Streptomycin Lösung auf 500 ml Gesamtlösung mit 1x DMEM Medium aufgefüllt und sterilfiltriert. Für die Infektionssversuche wurden die Makrophagen in antibiotikafreiem Medium kultiviert.

Middlebrook 7H9 Medium (1000 ml)

Es wurden 4,7 g Middlebrook 7H9 Medium in 900 ml Aqua dest. gelöst und mit 2 ml Glyzerin sowie 500 µl Tween 80 vermischt. Nach dem Autoklavieren wurde vor Gebrauch OADC *(oleic acid, bovine albumin, dextrose, catalase)* in einer Endkonzentration von 10 % frisch hinzugefügt.

Middlebrook 7H10 Agar (1000 ml)

Zunächst wurden 19 g Middlebrook 7H10 Agar in 900 ml Aqua dest. gelöst, mit 5 ml Glyzerin versetzt und autoklaviert. Nachdem der Agar auf ca. 45°C abgekühlt war, wurden 100 ml OADC oder 100 ml Rinderserum hinzugegeben und durch Schwenken vermischt. Anschließend wurden je 20 ml Agar in Petrischalen gegossen.

OADC - Lösung

Der essentielle Zusatz für die Kultivierung von Mykobakterien in 7H9 und 7H10 Medium wurde gebrauchsfertig bei der Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland bestellt. Die einzelnen Bestandteile sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tab. 3.2 Bestandteile des OADC.

Substanz	Menge in g/l	Funktion
Ölsäure	0,10	Stoffwechselsubstrat
Rinderalbumin	50,00	Bindung freier Fettsäuren, die für Mykobakterien toxisch wirken können
Dextrose	20,00	Energiequelle
Katalase	0,03	Zerstörung von im Medium potentiell vorkommender toxischer Peroxide

THP1 - Zellkultur Medium (500 ml)

Das Medium für die Kultivierung von THP1 - Zellen setzte sich aus 440 ml VLE - RPMI 1640 Medium, 50 ml FCS, 5 ml L - Glutamin und 5 ml Penicillin/Streptomycin Lösung zusammen. Bei der Kultivierung aufgetauter Zellen erhöhte sich die Konzentration des FCS auf 20 %. Für die Infektionsversuche wurden die Zellen in antibiotikafreiem Medium kultiviert.

3.1.5 Puffer und Lösungen für die Infektion von murinen Makrophagen

Aufnahmepuffer zur Infektion von murinen Makrophagen

Der Aufnahmepuffer zur Infektion von murinen Makrophagen bestand aus dem so genannten basalen Aufnahmepuffer der mit Bindungsmedium in einem Verhältnis 1:5 verdünnt und sterilfiltriert wurde.

Für die Herstellung des basalen Aufnahmepuffers wurden folgende Bestandteile in 500 ml PBS - Puffer gelöst und sterilfiltriert:

- 2,25 g Glukose
- 0,50 g Gelantine
- 50 mg $CaCl_2$
- 50 mg $MgCl_2$

Das so genannte Bindungsmedium, das ebenfalls sterilfiltriert wurde, bestand aus 470 ml 1x DMEM Medium, 25 ml FCS sowie 5 ml eines 1 M HEPES - Puffers.

Lysis - Puffer (1000 ml)

999 ml Aqua dest. wurden mit 1 ml Tween 80 versetzt und sterilfiltriert.

3.1.6 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

3.1.6.1 Puffer und Lösungen für DNA - Arbeiten

CTAB - Lösung für die Isolierung genomischer DNA aus Mykobakterien (100 ml)

4,1 g NaCl wurden in 90 ml Aqua dest. gelöst. Unter Rühren wurden 10 g Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) hinzugefügt. Durch Erwärmung auf 65°C wurde der Lösungsprozess beschleunigt. Die Lösung wurde anschließend auf ein Gesamtvolumen von 100 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

0,5 M EDTA - Lösung (1000 ml)

186,12 g EDTA - Na_2 - Dihydrat wurden in Aqua dest. gelöst und auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde auf einen pH von 8 mit NaOH eingestellt.

Schwerepuffer zum Beschweren der DNA für die Agarose - Gelelektrophorese

Der Schwerepuffer setzte sich aus 50 % (v/v) Glyzerin, 0,05 % (w/v) Bromophenolblau, 1 mM EDTA - Lösung sowie 50 % (v/v) 1x TAE Puffer zusammen.

50x TAE - Puffer (1000 ml)

242 g Tris - Base und 40 ml 0,5 M EDTA - Lösung wurden in 750 ml Aqua dest. gelöst. Der pH von 7,5 wurde mit ca. 57 ml Essigsäure eingestellt. Anschließend wurde die Lösung auf ein Gesamtvolumen von einem Liter mit Aqua dest. aufgefüllt. Für die Agarosegelelektrophorese wurde der Puffer mit Aqua dest. 1:50 verdünnt eingesetzt.

3.1.6.2 Puffer und Lösungen für RNA - Arbeiten

4 M GTC - Puffer (1000 ml)

Für die Herstellung von 4 M Guanidin - Isothiocyanat (GTC) - Puffer wurden folgende Bestandteile in 1000 ml Aqua dest. bei Raumtemperatur gelöst:

- 500 g GTC
- 5 g Na - Lauryl - Saccrose
- 20 ml einer 1,25 M Na - Citrat Lösung (pH 7,0)
- 7 ml 2 - β - Mercaptoethanol

Hybridisierungspuffer für Microarrays (50 µl)

50 µl Hybridisierungspuffer bestanden aus 20 µl H_2O (Ambion), 2,5 µl *Salmon Sperm* DNA, 13 µl einer UltraPure™ 20x SSC - Lösung, 5 µl einer 1 % SDS - Lösung und 13 µl Formamid (MP Biomedicals).

Prehybridisierungspuffer für Microarrays (500 ml)

Zur Herstellung des Prehybridisierungspuffers wurden 125 ml Formamid (MP Biomedicals), 125 ml UltraPure™ 20x SSC - Lösung, 5 ml 10 % SDS - Lösung und 1 % (w/v) BSA auf 500 ml mit H_2O (NERL Diagnostic) aufgefüllt und sterilfiltriert.

Waschpuffer für Microarrays (je 500 ml)

Die Microarrays wurden sukzessiv mit vier unterschiedlichen Puffern gewaschen.

- Waschpuffer 1: 50 ml UltraPure™ 20x SSC - Lösung, 5 ml 10 % SDS - Lösung, 445 ml H_2O (NERL Diagnostic)
- Waschpuffer 2: 5 ml UltraPure™ 20x SSC - Lösung, 5 ml 10 % SDS - Lösung, 490 ml H_2O (NERL Diagnostic)
- Waschpuffer 3: 5 ml UltraPure™ 20x SSC - Lösung, 495 ml H_2O (NERL Diagnostic)
- Waschpuffer 4: 1,25 ml UltraPure™ 20x SSC - Lösung, 498,75 ml H_2O (NERL Diagnostic)

Alle Puffer wurden sterilfiltriert.

3.1.6.3 Puffer und Lösungen für den humanen TNFα - ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)

Absättigungspuffer (1000 ml)

24,28 g Tris Base und 10 g BSA wurden in einem Gesamtvolumen von 1000 ml Aqua dest. gelöst und auf einem pH von 7,5 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Sensibilisierungspuffer (1000 ml)

Insgesamt wurden 10 g NaH_2PO_4 x 2 H_2O und 5,8 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O in einem Liter Aqua dest. gelöst und ein pH von 6,0 eingestellt. Der Puffer wurde anschließend sterilfiltriert und konnte bei 4°C gelagert werden.

Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) (50 ml)

240 mg TMB wurden in 5 ml Aceton gelöst und mit 45 ml absoluten Ethanol sowie 300 µl Wasserstoffperoxid (35 %) vermengt. Die Lösung sollte in einer mit Alufolie ummantelten braunen Flasche gelagert werden.

Substratpuffer (1000 ml)

Für die Herstellung des Substratpuffers wurden 24,41 g Natriumcitrat x 2 H_2O mit 6,3 g Zitronensäure in 1000 ml Aqua dest. gelöst und auf einen pH von 4,1 mit einer 1 M KOH - Lösung eingestellt.

Verdünnungspuffer (1000 ml)

24,22 g Tris Base, 1 g Phenol sowie 50 ml hitzeinaktiviertes FCS wurden in einem Gesamtvolumen von 1000 ml Aqua dest. gelöst und auf einen pH von 7,5 eingestellt. Der Puffer konnte nach Sterilfiltration bei 4°C gelagert werden.

3.2 Methoden

Teile dieser Arbeit wurden im Labor von Prof. Dr. David Russell an der Cornell Universität Ithaca, New York, USA durchgeführt. Daher werden in einigen Abschnitten bestimmte Methoden hinsichtlich ihrer Durchführung in Borstel und in Ithaca unterschieden.

3.2.1 Mikrobiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung von *M. tuberculosis* Komplex Stämmen in Flüssigkultur

Durchführung in Borstel:

Zunächst wurden die einzelnen klinischen Isolate auf Löwenstein - Jensen Festkultur beimpft und für ca. 14 - 21 Tage bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit einer 10 µl Einmalimpföse eine homogene Bakteriensuspension in 10 ml 7H9 Medium (10 % OADC) hergestellt (Vorkultur), die in Nährmedienflaschen (Nalgene) überführt und bei 37°C stehend inkubiert wurden. Für die Überführung ins Rollflaschensystem wurden Kulturen mit einer optischen Dichte zwischen OD 0,2 - 0,4 benötigt (600nm, Messung der OD siehe 3.2.1.2). Die Inkubationszeit variierte je nach klinischem Isolat zwischen 5 und 10 Tagen. Alle Vorkulturen wurden vor Umsetzung ins Rollflaschensystem (Hauptkulturen) Sterilitätskontrollen unterzogen. Dazu wurden je 100 µl Vorkultur in 5 ml LB - Medium sowie in 5 ml BHI - Medium überführt und bei 37°C für mindestens 3 Tage inkubiert. Außerdem wurden je 200 µl auf Blutagarplatten und auf BHI - Agarplatten beimpft und ebenfalls bei 37°C inkubiert. Eine mikroskopische Kontrolle erfolgte durch die Anfertigung eines Ziehl - Neelsen Präparats (siehe 3.2.1.3). Zusätzlich wurden alle klinischen Isolate erneut genotypisiert (siehe 3.2.3.1). Anschließend wurde die gesamte Vorkultur in 20 ml über Nacht bei 37°C in Rollflaschen vorinkubiertem 7H9/OADC Medium überführt. Bei einer OD von 0,2 - 0,4 wurde sukzessiv Medium (je 20 ml) bis zu einem Gesamtvolumen von 100 ml aufgefüllt und die Hauptkulturen bei 37°C rollend inkubiert (5 rpm, Rolleinheit Wheaton). Erneut wurden alle oben aufgeführten Sterilitätskontrollen durchgeführt. Bei einer OD von 0,2 - 0,4 wurden 1 ml Aliquots in Schraubdeckelreaktionsgefäße hergestellt und bei -80°C für weitere Analysen gelagert. Die Gesamtinkubationszeit im Rollflaschensystem mit einem Volumen von 100 ml betrug ungefähr 7 - 10 Tage. Eine erneute Genotypisierung folgte (siehe 3.2.3.1).

Durchführung in Ithaca:

Drei klinische Isolate von fünf verschiedenen Genotypen des MTBKs sowie der H37Rv Referenzstamm wurden als Gefrierkulturen verschickt und im Labor von Prof. Dr. David Russell erneut kultiviert. Dazu wurden 200 µl der Gefrierkultur in 20 ml 7H9/OADC Medium in TPP - Zellkulturflaschen (25 cm^2) überführt und stehend für ca. 10 Tage inkubiert. Die wesentlichen Unterschiede zwischen der Anzucht in Borstel und der Anzucht in Ithaca bestanden also darin, dass es sich um Standkulturen mit kontinuierlicher Sauerstoffzufuhr durch Verwendung von Zellkulturflaschen mit Filter handelte.

3.2.1.2 Bestimmung der optischen Dichte (OD)

Durchführung in Borstel:

Für die Bestimmung der OD wurden 100 µl der entsprechenden Kultur in Flachboden - Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen, Nunc) gegeben und im ELISA Reader Sunrise bei einer Wellenlänge von 600 nm (Referenzwelllenlänge ist 0) gemessen. Als Leerwert wurde 7H9/OADC Medium eingesetzt. Die Messung erfolgte in Duplikaten.

Durchführung in Ithaca:

Für die Bestimmung der OD wurden 750 µl der entsprechenden Kultur in verschließbare Einmalküvetten überführt und bei einer Absorption von 600 nm im BIO - RAD SmartSpec™ 3000 gemessen. Zur Bestimmung des Leerwerts wurde 7H9/OADC Medium eingesetzt.

3.2.1.3 Ziehl - Neelsen Färbung

Für den Nachweis von Mykobakterien und als Kontaminationskontrolle wurden Ziehl - Neelsen Präparate von allen Vor - und Hauptkulturen angefertigt. Dazu wurden 10 µl der Kultur auf einem Objektträger ausgestrichen und ca. 15 min unter der Werkbank getrocknet. Die eingetrocknete Kultur wurde hitzefixiert, indem sie mehrmals durch die Bunsenbrennerflamme gezogen wurde. Die Färbung erfolgte außerhalb des S3 - Bereiches. Hierzu wurden die Präparate mit filtrierter Karbolfuchsinlösung bedeckt und erhitzt. Dabei war es wichtig, die Färbelösung nur so zu erwärmen, dass es zu keiner Blasenbildung kommen konnte. Nach jeweils kurzen Abkühlungsphasen wurde die Hitzefixierung insgesamt dreimal wiederholt.

Nach einer abschließenden 10 - minütige Abkühlungsphase wurde die Färbelösung von den Präparaten entfernt und die Objektträger kurz in Aqua dest. gewaschen. Durch mehrmaliges Eintauchen der Präparate in 0,5 % HCl - 70 % Ethanol - Lösung wurden diese entfärbt. Ein kurzer Waschschritt in Aqua dest. folgte. Die Gegenfärbung wurde mit einer 1:10 verdünnten Methylenblau - Lösung für ca. 1 min durchgeführt. Nach einem erneuten Waschschritt in Aqua dest. wurden die Präparate bei Raumtemperatur getrocknet.

3.2.1.4 Bestimmung der Lebendkeimzahl von *M. tuberculosis* Komplex Stämmen

Durchführung in Borstel:

Die Bestimmung der Lebendkeimzahl der bei -80°C gelagerten MTBK Aliquots erfolgte ca. eine Woche nach Einlagerung. Dazu wurden von jeweils zwei Aliquots pro Stamm Verdünnungsreihen angelegt und ausplattiert. Zunächst wurden die Bakterienzellen durch mehrmaliges Auf - und Abziehen (ca. 10x) mit einer 1 ml Spritze durch eine 26G - Kanüle vereinzelt. Anschließend wurden 1:10 Verdünnungen (bis einschließlich 10^{-7}) in mit 0,05 % Tween 80 versetztem Braunwasser in einem Gesamtvolumen von 5 ml hergestellt. Sowohl von der unverdünnten als auch von den einzelnen Verdünnungsstufen wurden je 100 µl auf 7H10 Platten mit einem Zusatz von 10 % Rinderserum ausgestrichen. Es sei darauf hingewiesen, dass jede 7H10 Platte halbiert und damit je zwei unterschiedliche Verdünnungsstufen pro Platte beimpft wurden. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Platten in Plastikfolie eingepackt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C bakterienstamm - abhängig für 3 - 5 Wochen. Die Lebendkeimzahl CFU = Zellen/ml (Kolonie bildene Einheiten, *colony forming units*) ergab sich aus:

CFU = Zellen/ml = Anzahl der Kolonien x Verdünnungsfaktor x 10

Durchführung in Ithaca:

Für die Bestimmung der Lebendkeimzahl der in murine Makrophagen wachsenden Keime wurden die Makrophagen lysiert (siehe 3.2.2.2) und das Zelllysat durch mehrmaliges Auf - und Abziehen (ca. 10x) mit einer 1 ml Spritze durch eine 26G - Kanüle homogenisiert. Anschließend wurden 1:10 Verdünnungen (bis einschließlich 10^{-3}) in Flachboden - Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen, Nunc) mit einem Gesamtvolumen von 250 µl hergestellt. Die Verdünnungsschritte erfolgten in mit 0,05 % Tween 80 versetztem PBS - Puffer. Sowohl von den unverdünnten als auch von den einzelnen Verdünnungsstufen wurden jeweils 50 µl auf 7H10 Platten (10 % OADC) ausgestrichen. Die 7H10 Platten waren in vier Quadranten unterteilt. Die Lebendkeimzahl (CFU = Zellen/ml) ergab sich aus:

CFU = Zellen/ml = Anzahl der Kolonien x Verdünnungsfaktor x 20

3.2.1.5 Bestimmung des Wachstumsprofils von *M. tuberculosis* Komplex Stämmen in Flüssigkultur

Die Bakterienstämme wurden wie unter 3.2.1.1 (Ithaca) beschrieben in einem Gesamtvolumen von 20 ml 7H9/OADC Medium kultiviert. Die initiale Bakteriensuspension wurde dabei auf einer OD von 0,1 - 0,15 eingestellt. Das Wachstumsprofil konnte über die Zunahme der optischen Dichte in einem Zeitrahmen von 20 Tagen gemessen werden (siehe 3.2.1.2 (Ithaca)).

3.2.2 Zellbiologische Arbeiten

3.2.2.1 Arbeiten mit der THP1 - Zelllinie

Kultivierung und Differenzierung von THP1 - Zellen

Zunächst wurden THP1 Gefrierstocklösungen mit einer Zellzahl von 2 x 10^6 Zellen in 25 cm^2 Zellkulturflaschen (TPP) in einem Gesamtvolumen von 10 ml (RPMI 1640, 20 % FCS, 1 % L - Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin) überführt und bei 37°C/5 % CO_2 inkubiert. Nach zwei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. Dazu wurden die Zellen für 10 min bei 160 rcf (*relative centrifugal forces*) und 4°C zentrifugiert (Hettich Rotanta 460R). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml frischem Medium (RPMI1640, 10 % FCS, 1 % L - Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin) resuspendiert. Bei einer Verdopplungszeit von 35 - 50 Stunden erreichten die Zellen nach sieben Tagen eine Zelldichte von ca. 1 x 10^7 und konnten in 75 cm^2 Zellkulturflaschen (TPP) überführt werden. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben zentrifugiert und in 10 ml Medium resuspendiert. Die Zugabe von 10 ml frischem Medium erfolgte nach 3 - 4 Tagen. Die Zellen erreichten nach weiteren drei Tagen eine Zelldichte von ca. 2,5 x 10^7 und konnten somit in zwei 75 cm^2 Zellkulturflaschen gesplittet werden. Dazu wurden sie erneut wie oben beschrieben zentrifugiert und in 20 ml Medium resuspendiert. Je 10 ml Zellsuspension wurden anschließend in die Zellkulturflaschen überführt. Insgesamt konnten die Zellen so ca. 10 mal passagiert werden.
Für die Infektionsversuche zur Bestimmung des immunmodulatorischen Potentials verschiedener MTBK Stämme in THP1 - Zellen wurden 3,5 x 10^5 Zellen in Flachboden - Zellkulturplatten (48 Vertiefungen, Nunc) in einem Volumen von 500 µl ausgesät. Zunächst wurden die Zellen aus den Zellkulturflaschen in einem 50 ml Falcon - Röhrchen überführt und für 10 min bei 160 rcf bei 4°C zentrifugiert. Das alte Medium wurde anschließend verworfen und die Zellen in 5 ml neuem Medium resuspendiert.

Zur Bestimmung der genauen Zellzahl wurde eine 1:10 Verdünnung der Zellsuspension in einem Gesamtvolumen von 100 µl mit Trypanblau hergestellt. 10 µl wurden anschließend in eine Neubauer Zählkammer überführt und vier Großquadrate mikroskopisch ausgezählt. Die Zellzahl ergab sich wie folgt:

Zellen/ml = Zellzahl x Verdünnungsfaktor x Kammerfaktor / Anzahl der Großquadrate

(10) (10000) (4)

Für eine Zellkulturplatte (48 Vertiefungen) wurden insgesamt 1,75 x 10^7 Zellen in 25 ml Medium benötigt. Die Zugabe von in PBS vorverdünntem Phorbol - 12 - myristat - 13 - Acetat (PMA, Endkonzentration 100 ng/ml) ermöglichte die Differenzierung der Zellen. Anschließend wurde die Zellsuspension in die Zellkulturplatte überführt (500 µl/Vertiefung). Nach einer Inkubationszeit von vier Tagen bei 37°C/5 % CO_2 konnten die Infektionsversuche durchgeführt werden.

Infektion von THP1 - Zellen mit *M. tuberculosis* Komplex Stämmen

Vor der Infektion wurde bei den mit PMA differenzierten THP1 - Zellen ein Mediumwechsel vorgenommen. Die Infektion mit unterschiedlichen Bakterienstämmen erfolgte mit einer MOI von 3:1 (*multiplicity of infection*). Dazu wurden die entsprechenden 1 ml Aliquots der Bakterienstämme aufgetaut, bei 2200 rcf (Hettich Rotanta 460R) für 10 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die einzelnen Bakterienstämme wurden auf einer Zellzahl von 1,05 x 10^6 Zellen/5 µl mit PBS - Puffer eingestellt. Anschließend wurden jeweils 5 µl Bakteriensuspension zu den THP1 - Zellen gegeben und für 4 h bei 37°C/5 % CO_2 inkubiert. Für den TNFα - ELISA wurden die Überstände (je 60 µl) in Flachboden - Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen, Nunc) überführt und bei -20°C gelagert.

3.2.2.2 Arbeiten mit murinen Makrophagen

Isolierung und Kultivierung

Die Makrophagen wurden aus den Oberschenkelknochen, den Schienbeinknochen sowie den Hüftknochen von C57BL/6 Mäusen gewonnen. Nach Präparation der einzelne Knochen wurden diese mit einer mit DMEM Medium gefüllten Spritze durchspült. Die somit gewonnenen Zellen wurden für 10 min bei 160 rcf (Beckmann Coulter Allegra 6KR) pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml Makrophagen - Medium resuspendiert und anschließend auf ein Gesamtvolumen von 8,5 ml Medium aufgefüllt.
In acht mit 9 ml Makrophagen - Medium gefüllten Petrischalen wurden nun jeweils 1 ml Zellsuspension gegeben und bei 37°C/5 % CO_2 inkubiert. Am Tag 3 nach Isolierung wurden 5 ml frisches Medium hinzugefügt.

Zwischen Tag 7 und Tag 8 zeigten die Kulturen ein konfluentes Wachstum mit einer Zellzahl von 1 x 10^7 Zellen/Petrischale, die nun in einem Verhältnis 1:4 gesplittet werden konnten. Für das Passagieren der Zellen wurde zunächst das alte Medium abgenommen und die Makrophagen mit 10 ml auf 4°C vorgekühlten PBS - Puffer versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 4°C wurden die Zellen mit einem Zellschaber von den Petrischalen gelöst und die Zellsuspension in 50 ml Falcon - Röhrchen überführt. Nach dem Zentrifugieren für 10 min bei 160 rcf wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in einem Gesamtvolumen von 32 ml gepoolt. In insgesamt 32 mit 9 ml Makrophagen - Medium gefüllten Petrischalen wurden nun jeweils 1ml Zellsuspension gegeben und bei 37°C/5 % CO_2 inkubiert. Nach ca. vier Tagen zeigten die Kulturen erneut ein konfluentes Wachstum und konnten für intrazelluläre Wachstumsstudien bzw. für die Transkriptomanalysen verwendet werden. Für die intrazellulären Wachstumsanalysen von MTBK Stämmen wurden die murinen Makrophagen in Zellkulturplatten (24 Vertiefungen, Nunc) mit einer Zellzahl von ca. 6 x 10^5 Zellen/Vertiefung über Nacht ausgesät. Dazu wurden 1½ konfluent bewachsende Petrischalen pro Zellkulturplatte benötigt. Die Zellen wurden wie beschrieben mit PBS gewaschen, zentrifugiert und in 25 ml frischem, antibiotikafreiem Makrophagen - Medium aufgenommen. Anschließend wurde 1 ml Zellsuspension pro Vertiefung in die Zellkulturplatte überführt und über Nacht bei 37°C/5 % CO_2 inkubiert. Die Infektion muriner Makrophagen mit MTBK Stämmen für die Transkriptomanalysen erfolgte in TPP - Zellkulturflaschen (75 cm^2). Dazu wurden 1½ konfluent bewachsende Petrischalen pro Zellkulturflasche benötigt. Die Zellen wurden wie beschrieben mit PBS gewaschen, zentrifugiert und in 1 ml frischem, antibiotikafreiem Makrophagen - Medium aufgenommen. In den Zellkulturflaschen wurden 11 ml Medium vorgelegt bevor die Zellsuspension überführt wurde. Nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 37°C/5 % CO_2 war ein konfluenter Makrophagenmonolayer zu erkennen.
Insgesamt wurden bei allen Infektionsversuchen nur Makrophagen verwendet, die nicht mehr als zwei Passagen durchlaufen sind

Aktivierung von murinen Makrophagen

Die Aktivierung von murinen Makrophagen erfolgte durch die Stimulierung mit IFNγ (100.000 U/ml) und LPS (10 µg/ml). Zunächst wurde mit IFNγ für 24 Stunden stimuliert (Endkonzentration 100 U/ml). In den Zellkulturplatten (24 Vertiefungen) wurden dazu pro Vertiefung 10 µl einer 1:10 mit Medium verdünnten Lösung gegeben, in den Zellkulturflaschen (75 cm^2) hingegen 12 µl der unverdünnten Lösung. Nach 24 h erfolgte der zweite Stimulationsschritt mit LPS (Endkonzentration 10 ng/ml). Die Zellen inkubierten über Nacht bei 37°C/5 % CO_2.

Infektion von murinen Makrophagen mit *M. tuberculosis* Komplex Stämmen

Die Bakterienstämme wurden für die Infektionsversuche wie unter 3.2.1.1 (Ithaca) beschrieben als Standkulturen bis zu einer OD von 0,6 (~1 x 10^8 Zellen/ml) kultiviert.
Für die intrazellulären Wachstumsanalysen wurden 1 ml Bakteriensuspension (OD 0,6) mit 5 ml Aufnahmepuffer vermengt und 10 min bei 2200 rcf zentrifugiert (Beckmann Coulter Allegra 6KR). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Bakterienpellet in 1 ml Aufnahmepuffer resuspendiert. Durch mehrfaches Auf - und Abziehen einer 1 ml Spritze mit einer 26G - Kanüle (10x) wurden die Bakterien vereinzelt.
Die Infektion erfolgte mit einer Zellzahl von 2 x 10^6 Zellen/ml. Demnach wurde die Bakteriensuspension 1:50 mit auf 37°C vorgewärmten Aufnahmepuffer verdünnt. Von den in Zellkulturplatten (24 Vertiefungen, Nunc) ausgesäten Makrophagen wurde das Medium abgenommen und 500 µl Bakteriensuspension je Vertiefung hinzugefügt. Nach 4 h erfolgte ein Mediumwechsel (antibiotikafreies Makrophagen - Medium).
Für die Infektionsversuche zur RNA Isolierung intrazellulär wachsender Bakterien wurden 3,25 ml der Bakteriensuspension (OD 0,6) für 10 min bei 2200 rcf zentrifugiert und das Bakterienpellet anschließend in 1 ml PBS/0,05 % Tween 80 resuspendiert. Die Bakterien wurden durch mehrmaliges Auf - und Abziehen durch eine 1 ml Spritze vereinzelt. Anschließend wurden 1 ml PBS/0,05 % Tween 80 sowie 22 ml auf 37°C vorgewärmter Aufnahmepuffer hinzugefügt. Das Makrophagen - Medium wurde aus den Zellkulturflaschen abgenommen und die Zellen mit 12 ml Bakterienkultur infiziert (MOI ~ 5:1). Die verbleibenden 12 ml wurden in eine leere Zellkulturflasche als extrazelluläre Kontrollen überführt. Nach 4 h Infektion erfolgte auch hier ein Mediumwechsel (antibiotikafreies Makrophagen - Medium).

Bestimmung des intrazellulären Wachstumsprofils von *M. tuberculosis* Komplex Stämmen

Die in Zellkulturplatten (24 Vertiefungen, Nunc) ausgesäten murinen Makrophagen wurden mit MTBK Stämmen infiziert (siehe Infektion von murinen Makrophagen mit MTBK Stämmen) und für 11 Tage in Kultur gehalten. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Die Lebendkeimzahlen der intrazellulär wachsenden Bakterien wurden 4 Stunden sowie am Tag 2, 4, 7 und 11 nach Infektion erfasst. Dazu wurde das Makrophagen - Medium abgenommen, die Zellen mit 500 µl Lysispuffer versetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Lyse der Makrophagen wurde durch zusätzliches Abschaben der Zellen mit einer 1000 µl Pipettenspitze unterstützt. Das Lysat wurde in einer Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen, Nunc) überführt und die Lebendkeimzahl, wie unter 3.2.1.4 (Ithaca) beschrieben, bestimmt.

3.2.3 Molekularbiologische Arbeiten

3.2.3.1 DNA - Arbeiten

Isolierung genomischer DNA aus *M. tuberculosis* Komplex Stämmen

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte aus Zellen, die durch Zentrifugieren einer 5 ml Flüssigkultur oder alternativ durch Überführen mit einer Impföse von einer Löwenstein - Jensen - Festkultur gewonnen wurden. Zunächst wurden die Zellen in 400 µl TE - Puffer (Carl Roth) resuspendiert und für 20 min bei 80°C hitzeinaktiviert. Zum Abbau der Zellwand wurde die Zellsuspension anschließend mit 50 µl Lysozym (10 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zum Lysat wurde ein Mix aus 10 % SDS und 5 µl Proteinase K - Lösung (19,2 mg/ml) hinzugefügt und nach kurzem Vortexen für 10 min bei 65°C inkubiert. Im Anschluss wurden 100 µl 5 M NaCl und 100 µl CTAB - Lösung (vorgewärmt auf 65°C) zugefügt und für weitere 10 min bei 65°C inkubiert. In diesem Schritt wurden die im Lysat befindlichen Polysaccharide durch das CTAB komplexiert. Durch Zugabe von 750 µl Chloroform - Isoamylalkohol (24:1) und kurzem Vortexen wurde die DNA extrahiert. Die Phasentrennung erfolgte mittels Zentrifugation für 5 min bei 15000 rcf (Eppendorf 5430). In der oberen wässrigen Phase befand sich die DNA, die in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Nach Zugabe von 0,6 Volumen (~ 450 µl) Isopropanol und vorsichtigem Schwenken wurde die DNA für 30 min bei -20°C gefällt. Ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 15000 rcf für 15 min folgte. Der Überstand wurde verworfen und die DNA mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA erneut für 5 min bei 15000 rcf zentrifugiert und der Überstand sehr vorsichtig abgenommen. Das DNA Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 80 µl TE - Puffer gelöst.

Polymerase - Kettenreaktion (*polymerase chain reaction,* PCR)

Für die Analyse der genomischen Diversität von MTBK Stämmen wurden 29 Gene für die spätere Sequenzanalyse amplifiziert. Der PCR - Ansatz erfolgte unter einer DNA - freien Werkbank, die Zugabe der DNA hingegen außerhalb. Die PCR mit einem Gesamtvolumen von 25 µl setzte sich zusammen aus:

10x PCR - Puffer (Qiagen)	2,50 µl
25 mM $MgCl_2$ (Qiagen)	0,75 µl
20 µM F - Primer	1,25 µl
20 µM R - Primer	1,25 µl
10 mM dNTP - Mix (Roche)	0,50 µl
DMSO	1,25 µl
HotStarTaq®DNA - Polymerase (Qiagen)	0,13 µl
H_2O (Carl Roth)	15,37 µl
DNA	2,00 µl

Von den eingesetzten DNAs verschiedener Stämme (Referenzkollektion Anhang A) wurden 1:50 Verdünnungen mit Aqua dest. für die PCR hergestellt. Eine Übersicht zu den analysierten Genen hinsichtlich Funktion, Gengröße, PCR - Fragmentlänge sowie der Annealing - Temperatur (T_a) befinden sich im Anhang B. Die einzelnen Primersequenzen und deren Positionen sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Die PCR Reaktion erfolgte in einem MJ Research PTC - 200™ Thermocycler.
Auf einem intialen Inkubationschritt von 15 min bei 95°C zur Aktivierung der HotStarTaq® DNA - Polymerase folgten 35 Zyklen nach folgendem Profil, wobei die Annealing - Temperatur und die Elongationszeit je nach Fragmentlänge variierte (siehe Anhang B):

Aktivierung	95°C	15 min	
Denaturierung	94°C	30 s	35 Zyklen
Annealing	T_a°C	30 s	
Elongation	72°C	500 bp/min	
Elongation	72°C	10 min	
Kühlung	4°C	∞	

Agarosegelelektrophorese

Alle PCR Produkte wurden mittels Gelektrophorese überprüft. Für ein 1 % Agarosegel wurden 1 g UltraPure™ Agarose in 100 ml 1x TAE - Puffer durch Aufkochen gelöst. Unter einem Abzug wurden 10 µl einer 1 % Ethidiumbromid - Lösung unter Rühren zur gelösten Agarose hinzugefügt und in eine Gelvorrichtung luftblasenfrei gegossen.

Nach ca. 20 Minuten Abkühlung wurde das feste Agarosegel in eine Elektrophoresekammer überführt und die mit Schwerepuffer gemischten PCR - Proben aufgetragen. Dazu wurden jeweils 3 µl Schwerepuffer mit 2 µl PCR - Produkt gemischt. Als Laufpuffer in der Elektrophoresekammer wurde 1x TAE - Puffer verwendet. Ein Größenstandard (100 bp DNA Leiter, Carl Roth) ist immer mitgeführt worden. Die Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von ~120 Volt für 30 - 45 min durchgeführt. Danach konnten die PCR Banden aufgrund der interkalierenden Wirkung des Ethidiumbromids unter UV - Licht sichtbar gemacht werden.

Aufreinigung von PCR - Produkten mittels ExoSAP - Methode für die Sequenzanalyse

Die Aufreinigung der PCR Produkte (Abbau von überschüssigen Desoxynukleotiden und Primern) erfolgte mit Hilfe der Exonuklease I aus *E. Coli* und der Alkalischen Phosphatase aus Schrimps. Dabei greift die Exonuklease I am 3´ - Ende einzelsträngiger DNA an und baut diese ab (93). Die alkalische Phosphatase entfernt Phosphatgruppen am 5` - Ende (137).
Zunächst wurde von der Exonuklease I (20 U/µl) eine 1:20 Verdünnung hergestellt. Dazu wurden 5 µl Exonuklease I mit 85 µl TE - Puffer (pH 7,5) und 10 µl Glyzerin (87 %) vermischt. Der Aufreinigungsansatz setzte sich zusammen aus:

PCR - Produkt	5 µl
Exonuklease I (1 U/µl)	1 µl
Alkalische Phosphatase (1 U/µl)	1 µl

Der Aufreinigungsansatz wurde in einem Thermocycler 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend zur Inaktivierung der Enzyme für 15 min auf 80°C erhitzt. Das PCR Produkt konnte nun für die folgende Sequenzreaktion verwendet werden.

Sequenzreaktion

Für die Sequenzreaktion wurde das BigDye® Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) mit dem entsprechenden Sequenzierungspuffer verwendet. Ein 20 µl Standardansatz erhielt folgende Komponenten:

Aqua dest. (Carl Roth)	14,0 µl
Sequenzierungspuffer (ABI)	3,5 µl
Primer (10 µM)	0,5 µl
BigDye ® (ABI)	1,0 µl
Aufgereinigtes PCR Produkt	1,0 µl

Alle in dieser Arbeit analysierten Gene wurden mit den in Tabelle 3.1 gelisteten F - und R - Primern sequenziert. Bei großen Genen wurden zusätzliche Sequenzierprimer (S - Primer, Tab. 3.1) benötigt. Die Sequenzreaktion erfolgte in einem MJ Research PTC - 200™ Thermocycler:

Denaturierung	96°C	15 s	25 Zyklen
	0,5°C/s zu 60°C		
Annealing/Elongation	60°C	90 s	
	0,8°C/s zu 96°C		

Aufreinigung der Sequenzansätze und Sequenzierung

Die Aufreinigung der Sequenzansätze erfolgte mittels MultiScreen® - HV Filtrationsplatten, die mit Matrizes aus illustra™ Sephadex G50 beladen wurden. Dazu wurde die benötigte Menge an Sephadex mit einer Dosierungsplatte abgemessen und in die Filtrationsplatte überführt. Anschließend wurden 300 µl Aqua dest. (Carl Roth) zu jeder mit Sephadex befüllten Filtrationseinheit hinzugegeben. Zum Aufquellen des Sephadex wurde die Platte für ca. 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Filtrationsplatte mit Hilfe eines Fixierrahmens auf eine Auffangplatte gelegt und für 5 min bei 920 rcf (Hettich Universal 32R) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Platte auf eine neue Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen) überführt. Anschließend wurden 10 µl des Sequenzansatzes mittig auf die Sephadexmatrix gegeben. Ein erneuter Zentrifugationsschritt für 5 min bei 920 rcf folgte. Für die automatische Kapillargelektrophorese wurden 4 µl des aufgereinigten Sequenzansatzes in 15 µl Formamid (ABI) in einer *MicroAmp® Optical 96well Reaction Plate* überführt.
Die Analyse erfolgte entsprechend den Instruktionen des Herstellers am ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer.

Sequenzanalyse

Zur Analyse der Sequenzdaten wurde die SeqScape Software v.2.6 verwendet. Die BioNumerics Software v.5.1 ermöglichte die phylogenetische Auswertung.

Genotypisierung von *M. tuberculosis* Komplex Stämmen

Alle in dieser Arbeit verwendeten klinischen Isolate sind durch IS*6110* RFLP DNA Fingerprint Technik, Spoligo - sowie MIRU - VNTR Typisierung charakterisiert worden. Eine detaillierte Beschreibung aller Genotypisierungsmethoden sowie ausführliche Protokolle stehen unter der MIRU - VNTRplus Webseite zur Verfügung (http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/miruinfo.faces).

3.2.3.2 RNA - Arbeiten

Isolierung von RNA aus *M. tuberculosis* Komplex Stämmen

Zur Bestimmung des Transkriptomprofils unterschiedlicher MTBK Stämme wurden Genexpressionsanalysen von in Flüssigmedium kultivierten sowie von in Makrophagen intrazellulär wachsenden Keimen durchgeführt. Dazu wurde mykobakterielle RNA aus beiden Systemen für spätere Microarrayanalysen isoliert.

Für die Isolierung von RNA aus Flüssigkulturen wurden 5 ml Bakterienkultur mit einer OD von 0,6 in 20 ml 4 M GTC - Puffer aufgenommen und für 30 min bei 2200 rcf (Beckman Coulter Allegra 6KR) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet in 1 ml 4 M GTC - Puffer resuspendiert und in einem 2 ml Schraubdeckelreaktionsgefäß überführt. Die Lagerung bei -80°C über Nacht erhöhte die spätere RNA - Ausbeute.

Die Isolierung mykobakterieller RNA aus murinen Makrophagen erfolgte 24 h nach Infektion. Dazu wurde zur Eliminierung extrazellulärer Bakterien das Makrophagen - Medium abgenommen und 25 ml 4 M GTC - Puffer hinzugefügt. Durch Zugabe des Puffers erfolgte die Lyse des Makrophagenmonolayers. Die Viskosität der Lösung wurde durch mehrfaches Auf - und Abziehen mit einer 25 ml Einwegpipette verringert. Nach dem Überführen der Lösung in einem 50 ml Falconröhrchen wurde die Makrophagen - DNA durch mehrmaliges Auf - und Abziehen durch eine 25 ml Spritze mit einer 21G - Kanüle zerstört. Die Bakterien blieben dabei unbeschadet. Zu den Kontrollflaschen wurden direkt 38 ml 4 M GTC - Puffer gegeben und die Lösung in 50 ml Falconröhrchen überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 60 min bei 2200 rcf wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, das Pellet in 1 ml 4 M GTC - Puffer resuspendiert und in einem 2 ml Schraubdeckelreaktionsgefäß überführt. Auch hier erfolgte eine Lagerung bei -80°C über Nacht.

Die weitere Prozessierung der RNA war im Folgenden identisch. Die bei -80°C über Nacht gelagerten Aliquots wurden zunächst für 5 min bei 15000 rcf (Eppendorf 5430) zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Pellet wurde mit 1 ml PBS/0,05 % Tween 80 gewaschen und für 5 min bei 15000 rcf zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand abgenommen. Durch Zugabe von 250 µl Lysozym (5 mg/ml) und einer Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur wurden die Zellwandbestandteile der Bakterien abgebaut. Anschließend wurden 750 µl auf 65°C erwärmtes TRIzol® Reagent hinzugegeben und die Lösung in mit 0,5 ml *Ziconia/Silica beads* gefüllten 2 ml Schraubdeckelreaktionsgefäße überführt. Das Aufbrechen der Bakterienzellen erfolgte im FastPrep FP 120 für 2 min bei 6000 rcf. Nach einer Abkühlungsphase von 5 min bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt und die Phasen durch mehrfaches Invertieren der Reaktionsgefäße miteinander gemischt.

Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 15000 rcf für 15 min bei Raumtemperatur. Die obere wässrige Phase wurde anschließend in ein RNase freies Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl 100 % Ethanol vermischt. Die Aufreinigung der RNA wurde anschließend mit Hilfe des RNeasy Kit (Qiagen) durchgeführt. Dazu wurden 700 µl der Lösung auf die Qiagen RNeasy Miniprep Säulen gegeben und für 1 min bei 10000 rcf zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulen mit der verbleibenden Lösung erneut beladen. Ein weiterer Zentrifugationsschritt für 1 min bei 10000 rcf folgte. Nach Verwerfen des Durchfluss wurden die Säulen mit 700 µl Qiagen RW1 beladen und erneut zentrifugiert (1 min, 10000 rcf). Die Säule wurde dann in ein frisches Auffanggefäß überführt und 2x mit 500 µl Qiagen RPE Puffer gewaschen (1 min, 10000 rcf). Anschließend wurden die Säulen in einem weiteren Zentrifugationsschritt für 2 min bei 15000 rcf getrocknet und in RNase freie 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Eluierung der RNA erfolgte durch Zugabe von 32 µl RNase freies Wasser (Qiagen) (10000 rcf, 1 min). Die RNA - Ausbeute wurde erhöht durch das erneute Überführen des Durchfluss in die Säule und einem weiteren sich anschließenden Zentrifugationsschritt.
Für den Verdau von in der Probe befindlicher DNA stand das TURBO DNA™ free Kit der Firma Ambion zur Verfügung. Zur RNA wurde dazu 5 µl des im Kit befindlichen Puffers und 1 µl DNase hinzugefügt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 5 µl Inaktivator wurde die Enzymreaktion abgebrochen. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 15000 rcf konnte die sich im Überstand befindliche RNA in ein neues RNase freies Reaktionsgefäß überführt werden. Die Konzentration sowie die Reinheit der RNA wurden mittels NanoDrop 1000 bestimmt. Aus den Flüssigkulturen konnten durchschnittlich 100 - 200 ng/µl RNA, aus den Makrophagenkulturen 20 - 80 ng/µl RNA isoliert werden.

Amplifizierung der RNA

Die Amplifizierung der RNA erfolgte mit Hilfe des *MessageAmp™ II Bacteria Prokaryotic RNA Amplification Kit*. Die mRNA wurde in mehreren Schritten zu doppelsträngiger cDNA umgeschrieben, die im Anschluss in RNA transkribiert wurde (amplifizierte RNA, aRNA).
Es wurden 250 ng mRNA in einem Gesamtvolumen von 2,5 µl in ein RNase freies 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Die Mengen wurden durch Zugabe von RNase freiem Wasser bzw. durch Aufkonzentrierung (Savant Speedvac) eingestellt. Nach der Inkubation bei 70°C wurden die Proben sofort auf Eis gelagert.

Zunächst erfolgte die Polyadenylierung des 3` - Endes der mRNA durch Zugabe von 2,5 µl Polyadenylierungs - Mix. Dieser setzte sich wie folgt zusammen:

Nuklease freies H_2O	0,75 µl
10x Poly(A) - Tailing Puffer	0,50 µl
RNase Inhibitor	0,50 µl
Poly(A) Tailing ATP	0,25 µl
PAP	0,50 µl

Die Reaktion erfolgte für 15 min bei 37°C. Durch die Poly - (A) - Markierung am 3` - Ende konnte anschließend die T7 - Polymerase den komplementären DNA Strang (cDNA) in 5` - 3` Richtung synthetisieren. Durch Zugabe von 5 µl des so genannten Reverse Transkription Mixes und einer Inkubation bei 42°C für 2 h lag nun einzelsträngige cDNA vor. Der Reverse Transkription Mix bestand aus:

Nuklease freies H_2O	1,5 µl
T7 Oligo (dT) VN	0,5 µl
10x First Strand Puffer	0,5 µl
dNTP Mix	2,0 µl
Array Script	0,5 µl

Die Synthese des zweiten cDNA Stranges erfolgte durch Zugabe von 40 µl *Second Strand* Mix:

Nuklease freies H_2O	31,5 µl
10x Seccond Strand Puffer	5,0 µl
dNTP Mix	2,0 µl
DNA Polymerase	1,0 µl
RNase H	0,5 µl

Nach 2 h bei 16°C konnte die doppelsträngige cDNA aufgereinigt werden. Dazu wurde das im Kit bereitgestellte Säulensystem verwendet und entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zur Eluierung wurden 12 µl auf 50°C vorgewärmtes, nukleasefreies Wasser verwendet. Bei der sich anschließenden *in vitro* Transkription wurde für die spätere Fluoreszenzmarkierung der aRNA Amino - Allyl - UTP (aaUTP) eingebaut.

Der Transkriptionsansatz bestand aus:

T7 ATP	2,0 µl
T7 CTP	2,0 µl
T7 GTP	2,0 µl
T7 UTP	1,0 µl
aaUTP	1,5 µl
T7 10x Reaktionspuffer	2,0 µl
T7 Enzym Mix	2,0 µl

Zu der aufgereinigten cDNA wurden 12,5 µl Mix hinzugefügt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die dabei synthetisierte aRNA wurde am nächsten Tag mit Hilfe des MEGAclear™ Kit entsprechend dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

Fluoreszenzmarkierung und Hybridisierung

Durch den Einbau von aaUTP in der aRNA konnten die Fluoreszenzfarbstoffe Alexa Fluor® 555 (555 nm) und Alexa Fluor® 647 (647 nm) an die aRNA über eine Esterbindung kovalent gebunden werden. Zunächst wurden 10 µg aRNA im Vakuumsystem (Savant Speed Vac) eingetrocknet und anschließend in 10 µl 0,1 M Natriumhydrogencarbonatlösung aufgenommen. Der Alexa Fluor® 647 Farbstoff definierte die unbekannte Probe. Der Alexa Fluor® 555 Farbstoff markierte die Referenzprobe.
In dieser Arbeit wurde zum einen die Genexpression unterschiedlicher MTBK Stämme (647 nm) in Flüssigstandkulturen im Verhältnis zum ebenfalls in Flüssigkultur gewachsenen CDC1551 Referenzstamm (555 nm) untersucht.
Zum anderen wurde das Transkriptionsprofil intrazellulär wachsender Keime (aus Makrophagen isolierte mykobakterielle RNA, 647 nm) im Verhältnis zu ihrer extrazellulären Genexpressionsantwort (Makrophagen - freie extrazelluläre Kontrollen, 555 nm) analysiert. Die Farbstoffe wurden in 10 µl DMSO gelöst und mit den entsprechenden Proben vermischt. Die Bindung erfolgte für 1,5 h bei Raumtemperatur in einer lichtundurchlässigen Box. Zum Abfangen ungebundener Farbstoffe wurden 15 µl zu den einzelnen Proben hinzugefügt und für weitere 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben mittels MEGAclear™ Kit gemäß dem Herstellerprotokoll aufgereinigt, in 50 µl eluiert und bis zu einem Gesamtvolumen von ca. 2,5 µl aufkonzentriert. Danach wurden 50 µl Hybridisierungpuffer zu den Referenzproben (555 nm) gegeben und gut gemischt. Die gesamte Lösung wurde dann in die korrespondierende, unbekannte Probe (647 nm) überführt. Ein Denaturierungsschritt für 5 min bei 95°C folgte. Die Proben wurden bis zum Hybridisieren bei 50°C im Dunkeln gelagert.

Die Microarrays wurden für 1 h im Prehybridisierungspuffer inkubiert und anschließend mit H_2O (NERL Diagnostic) gefolgt von Isopropanol gewaschen. Ein Trocken - Zentrifugationsschritt bei 700 rcf (Beckman Coulter Allegra 6KR) für 10 min folgte. Für die Hybridisierung der Proben wurden die Microarrays in Hybridisierungskammern überführt und mit einem *Glas - LifterSlip* bedeckt. Die Proben wurden seitlich unter dem *Glas - LifterSlip* pipettiert und die Hybridisierungskammern wasserdicht verschlossen. Die Hybridisierung erfolgte für 16 - 18 h in einem 45°C warmen Wasserbad. Anschließend wurden die Microarrays in Waschpuffer 1 bis 4 für jeweils 10 min gewaschen. Zuletzt wurden die Microarrays in deionisiertes, ultrafiltriertes H_2O (NERL Diagnostic) getaucht und anschließend bei 700 rcf für 10 min zentrifugiert. Das Auslesen der Fluoreszenzintensitäten erfolgte im GenePix 4000B.

Analyse der Transkriptomdaten

Für die primäre Bildverarbeitung, d.h. für die Bestimmung der Spot - Intensität und Qualität sowie für Hintergrundsmessungen und die Markierung nicht auswertbarer Spots, wurde die ImaGene Software v.6 verwendet. Dabei wurden alle Spots mit einer Intensität geringer als drei Standardabweichungen der Hintergrundmessungen aus der nachfolgenden Analyse ausgeschlossen. Alle weiteren statistischen Auswertungen und Visualisierungen wurden mit der GeneSpring GX 7.3 Software durchgeführt.

3.2.3.3 Immunologische Arbeiten

Die THP1 - Zellen wurden wie unter 3.2.2.1 ausgesät und mit MTBK Stämmen infiziert. Nach 4 h wurde der Überstand der infizierten Zellen abgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Der Nachweis von TNFα im Überstand erfolgte mit Hilfe eines ELISA. Dazu wurde zunächst eine 1:1000 Verdünnung des TNFα Antikörper (5 mg/ml) im Sensibilisierungspuffer hergestellt. In einer Flachboden - Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen, Nunc) wurden 50 µl/Vertiefung überführt und für 16 - 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde die Platte mit Folie und Parafilm abgedichtet. Anschließend wurde die Platte ausgeschlagen und mit H_2O (Carl Roth) zweimal gewaschen. Nach einem erneuten Ausklopfen wurden 200 µl/Vertiefung Absättigungspuffer hinzugefügt und erneut für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde ausgeschlagen, die Proben (1:10) sowie der TNFα (1 mg/ml) Standard (1:2 im Bereich 500 pg - 7,8 pg) im Verdünnungspuffer vorbereitet und je 50 µl/Vertiefung überführt. Vom Detektionsantikörper wurden 25 µl/Vertiefung hinzugegeben (Endkonzentration 7,5 ng/ml) und die Platte für 24 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte ca. 6x mit H_2O (Carl Roth) gewaschen und danach gut ausgeklopft. Eine 1:20 Verdünnung des TMB - Substrats wurde mit Substratpuffer hergestellt und 50 µl/Vertiefung überführt. Die Platte wurde 10 - 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert bis ein deutlicher Farbumschlag zu erkennen war. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl H_2SO_4 abgestoppt und photometrisch bei 450 nm im BioTek Synergy 2 gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Genetische Diversität von *M. tuberculosis* Komplex Stämmen

Zur Analyse der genetischen Diversität von MTBK Stämmen wurde eine umfangreiche Sequenzanalyse von 29 Genen in 58 klinischen Isolaten sowie von den ATCC Referenzstämmen H37Rv, *M. bovis* und *M. africanum* durchgeführt. Die Auswahl der Stämme basierte auf einer phylogenetischen Klassifizierung, so dass die Referenzkollektion repräsentative Vertreter der weltweit am häufigsten vorkommenden Spezies und Genotypen der Gruppe 1 und 2 bzw. der durch Gagneux *et al.* definierten sechs Hauptlinien umfasste (Abb. 4.1, (55)).

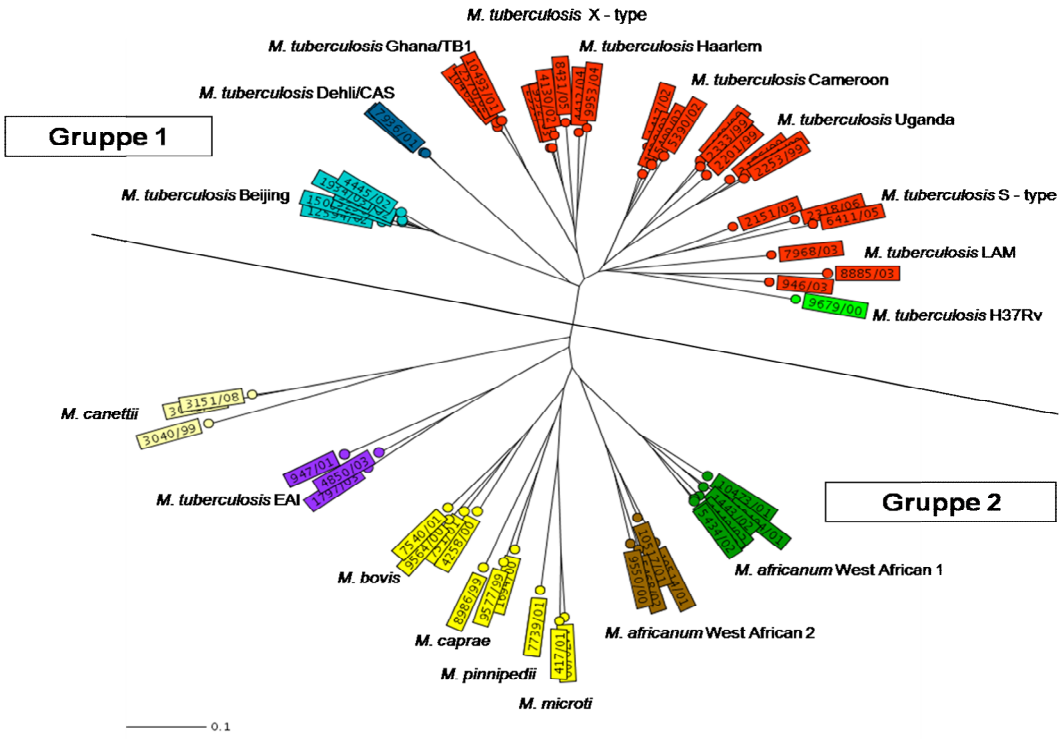


Abb. 4.1. Phylogenetischer Baum basierend auf MIRU - VNTR (24 Loci) und Spoligotypisierungsdaten (43 Spacer) (http://www.miru-vntrplus.org). Repräsentative Vertreter von 18 unterschiedlichen Genotypen wurden in die Sequenzanalyse mit eingeschlossen. Die Strukturierung in zwei Hauptgruppen (Gruppe 1 und 2) ist deutlich zu erkennen. Hellblau: *M. tuberculosis* Linie 2; Dunkelblau: *M. tuberculosis* Linie 3; Rot: *Euro - American* Linie; Hellgrün: Referenzstamm H37Rv; Dunkelgrün: *M. aficanum* West African 1a und 1b Stämme; Braun: *M. africanum* West African 2 Stämme; Gelb: tierpathogene Spezies; Lila: *M. tuberculosis* Linie 1; Beige: *M. canettii* Stämme. CAS: *Central Asian* Genotyp; EAI: *East African Indian* Genotyp; LAM: *Latin - American - Mediterranean* Genotyp (Neighbour - Joining tree; DC: Cavalli - Storza und Edwards, 1967).

Ein Teil der Ergebnisse der Sequenzanalysen sind im Rahmen eines Kooperationsprojekts mit S. Gagneux (*Medical Research Center London*) erarbeitet worden und in einer gemeinsamen Veröffentlichung beschrieben (70).

Von fast allen Stämmen (Ausnahme 8885/03 Rv2431c Gen) konnten alle 29 Gene amplifiziert und sequenziert werden. Insgesamt wurden Sequenzdaten mit einer Gesamtgröße von 18598 bp/Stamm generiert, was ca. 0,42 % des mykobakteriellen Gesamtgenoms (~ 4,4 Mbp) entspricht. Alle DNA - Sequenzen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit der H37Rv Referenzsequenz verglichen, um Sequenzvariationen (SNPs oder LSPs) zu bestimmen Ein beispielhaftes Sequenzalignment ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

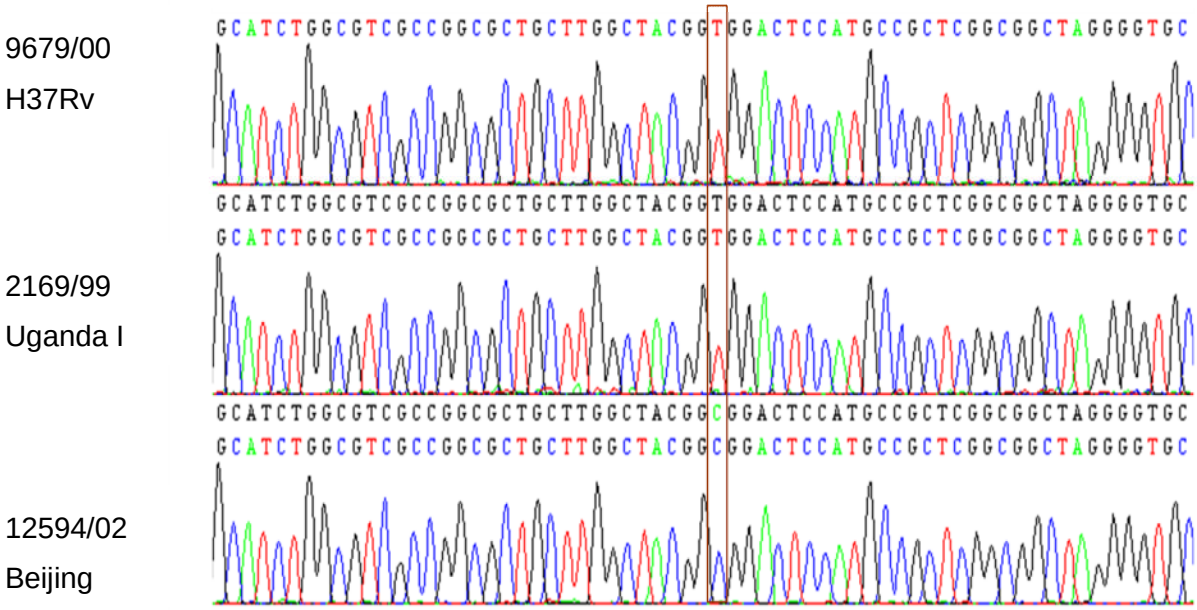


Abb. 4.2 Beispielhaftes Sequenzalignment (Rv0557). Dargestellt sind die Elektropherogramme zweier klinischer Isolate im Vergleich zur H37Rv Referenzsequenz. An Position 321 nach Genstart (Codon 107) weist der Beijing Stamm 12594/02 einen Austausch von T zu C auf, während der Uganda I Stamm 2169/99 der Referenzsequenz entspricht. Der Einzelbasenaustausch führt zu keiner Veränderung in der Aminosäuresequenz.

Insgesamt ergab die Analyse 148 Sequenzvariationen, wobei resistenz - assoziierte Mutationen nicht gewertet wurden. Daraus resultiert eine Mutationsrate von 7,96 x 10^{-3}/bp. Von den 148 Mutationen traten 44 bei den hoch diversen *M. canettii* Isolaten auf, woraus sich für *M. canettii* Stämme eine Mutationsrate/bp von 5,6 x 10^{-3} ergibt. Die in dieser Arbeit analysierten *M. canettii* Stämme weisen also untereinander im Durchschnitt 15 Sequenzveränderungen auf, während für die restlichen MTBK Stämme eine durchschnittliche Variabilität von zwei Sequenzvariationen gezeigt werden konnte.

Um einen ersten Eindruck über den Nutzen der gefundenen Sequenzvariationen für eine phylogenetische Stammklassifizierung zu bekommen, wurde basierend auf den Sequenzdaten ein phylogenetischer Baum berechnet (Abb. 4.3). In dem sequenzbasierten Stammbaum spiegelt sich die gruppen - und linienspezifische Einteilung sowie die klare Abgrenzung einzelner Genotypen entsprechend der auf klassischen Stammtypisierungsdaten basierenden Gruppierungen wider (Vergeich Abb. 4.1 und 4.3). Allerdings deutet sich an, dass EAI Stämme eine eigene Gruppe (Gruppe 3) bilden und sich von der phylogenetischen Gruppe 2 abgrenzen.

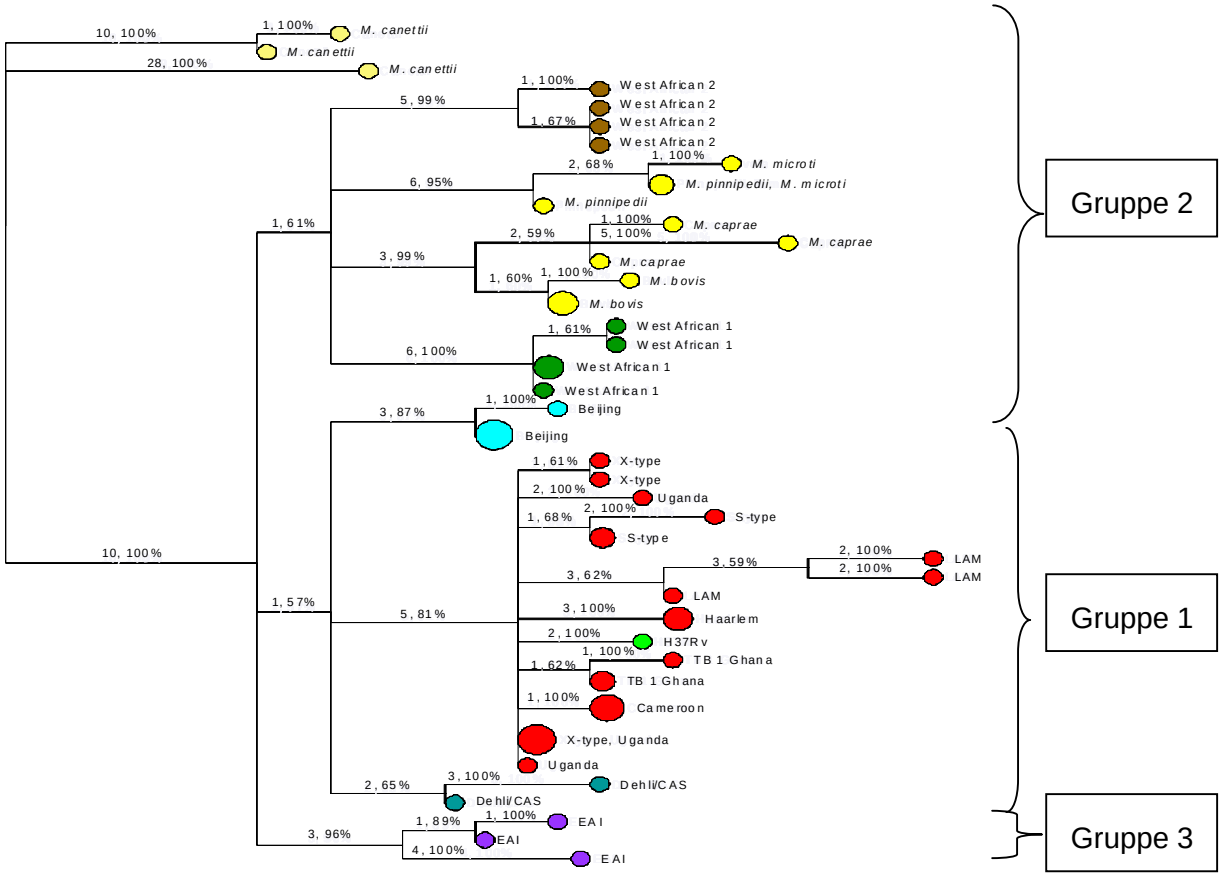


Abb. 4.3 Phylogenetischer Stammbaum basierend auf Multi - Locus - Sequenz - Typisierungsdaten (MLST). Die Berechnung des *Maximum Parsimomy Trees* beruhte auf 148 Mutationen, die in 29 Genen nachgewiesen werden konnten. Eine gruppen -, linien - und genotypspezifische Einteilung von MTBK Stämmen konnte bestätigt werden. Beige: *M. canettii* Stämme; Braun: *M. africanum* West African 2 Stämme; Gelb: tierpathogene Spezies; Dunkelgrün: *M. africanum* West African 1a und 1b Stämme; Hellblau: *M. tuberculosis* Linie 2; Rot: Stämme der *Euro - American* Linie; Hellgrün: Referenzstamm H37Rv; Dunkelblau: *M. tuberculosis* Linie 3; Lila: *M. tuberculosis* Linie 1. CAS: *Central Asian* Genotyp; EAI: *East African Indian* Genotyp; LAM: *Latin - American - Mediterranean* Genotyp (Bootstrap 200).

Von den 148 nachgewiesenen Mutationen waren 45 genotypspezifisch und 12 genotypübergreifend. Diese Sequenzveränderungen können somit zur Identifizierung größerer phylogenetischer Gruppen verwendet werden (Abb. 4.4). 91 der beschriebenden Mutationen traten nur in einem oder zwei der untersuchten Stämmen des jeweiligen Genotyps auf. Insgesamt konnte für fast alle Genotypen mit Ausnahme von *M. pinnipedii* und *M. microti* sowie *M. tuberculosis* Uganda und X - type Stämmen mindestens eine definierende Sequenzvariation identifiziert werden.

Am häufigsten zeigten *M. canettii* Stämme genotypspezifische Veränderungen (14/45), gefolgt von *M. africanum* West African 1 (9/45) und West African 2 (5/45) Isolaten (Abb. 4.4). Die Analyse der *M. africanum* Stämme ergab außerdem eine Vielzahl von Mutationen, die ebenfalls in einigen tierpathogenen Spezies identifiziert werden konnten. Unter den tierpathogenen Erregern zeigten *M. bovis* und *M. caprae* Isolate insgesamt drei gemeinsame SNPs. Für *M. pinnipedii* und *M. microti* Stämme konnten ebenfalls drei gemeinsame Mutationen detektiert werden. (Abb. 4.4). Insgesamt wurden für *M. bovis* und *M. caprae* nur eine bzw. zwei genotypspezifische Veränderungen nachgewiesen, während für *M. pinnipedii* und *M. microti* keine genotypspezifischen Mutationen in den in dieser Arbeit analysierten Genen gefunden wurden.

Von den insgesamt 57 phylogenetisch informativen Mutationen waren 37 nicht - synonym und haben somit eine potentielle funktionelle Bedeutung. Daraus ergibt sich eine Rate von nicht - synonymen zu synonymen Mutationen von 1,85. Unter Ausschluss von *M. canettii* Stämmen wurden 40 genotyp - assoziierte Sequenzvariationen, von denen 30 zu einer Veränderung in der Aminosäuresequenz führten, nachgewiesen. Das Verhältnis von nicht - synonymen zu synonymen Mutationen erhöhte sich dadurch auf einen Wert von 3.

Betrachtet man alle gefundenen Sequenzveränderungen konnten insgesamt 87 Mutationen mit funktioneller Bedeutung und 61 synonyme Variationen detektiert werden. Daraus ergibt sich eine Rate von nicht - synonymen zu synonymen Mutationen von 1,43. *M. canettii* Stämme zeigten 44 Mutationen, während alle restlichen MTBK Isolate 104 Sequenzveränderungen aufwiesen. Von den 104 detektierten Mutationen führten 68 zu einer Veränderung in der Aminosäuresequenz, 36 Mutationen hatten keine funktionelle Bedeutung. Daraus ergab sich ein Verhältnis von nicht - synonymen zu synonymen Variationen von 1,89. Im Gegensatz dazu wurden für *M. canettii* Stämme 19 funktionelle Mutationen und 25 synonyme Veränderungen in den untersuchten Genen nachgewiesen. Daraus ergibt sich eine für *M. canettii* spezifische Rate von nicht - synonymen zu synonymen Mutationen von 0,76.

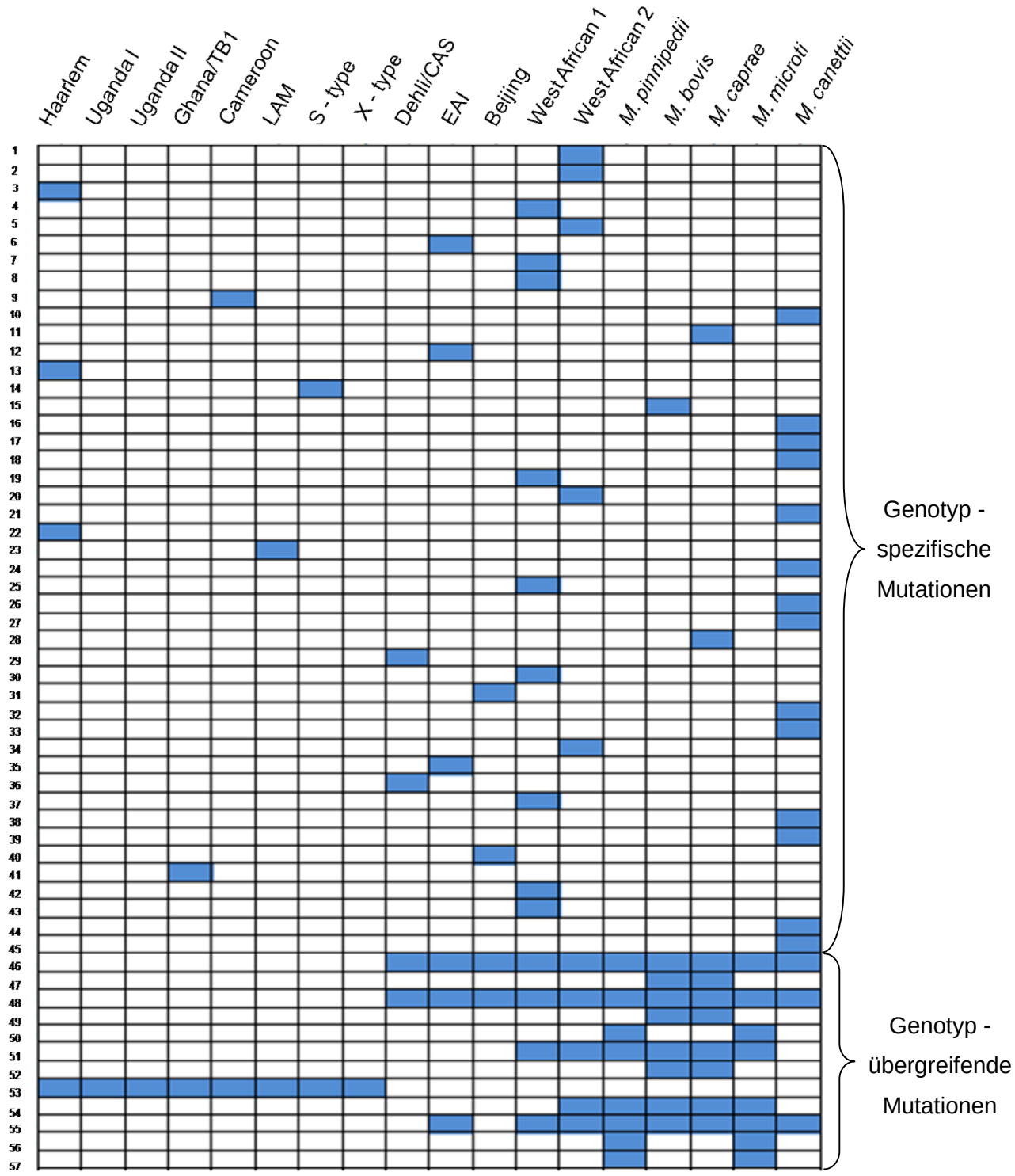


Abb. 4.4 Phylogenetisch informative Sequenzvariationen. Es konnten 45 genotypspezifische Mutationen und 12 genotypübergreifende Mutationen identifiziert werden (blaue Markierungen). Die höchste Variabilität zeigten *M. canettii* Stämme, gefolgt von West African 1 Stämme. Eine detaillierte Liste der Sequenzvariationen befindet sich im Anhang C. CAS: *Central Asian* Genotyp; EAI: *East African Indian* Genotyp; LAM: *Latin - American - Mediterranean* Genotyp.

Basierend auf den durchgeführten Sequenzanalysen konnte ein neuer Algorithmus zur Differenzierung der wichtigsten phylogenetischen Gruppen des MTBKs durch Analyse von nur fünf Genen (Rv0557, Rv1811, Rv2628, Rv2629, Rv2946c) erarbeitet werden. Durch das Vorhandensein bestimmter Sequenzvariationen können fast alle in dieser Arbeit untersuchten Genotypen eindeutig klassifiziert werden. Eine detaillierte Zusammenfassung ist schematisch in Abbildung 4.5 dargestellt.

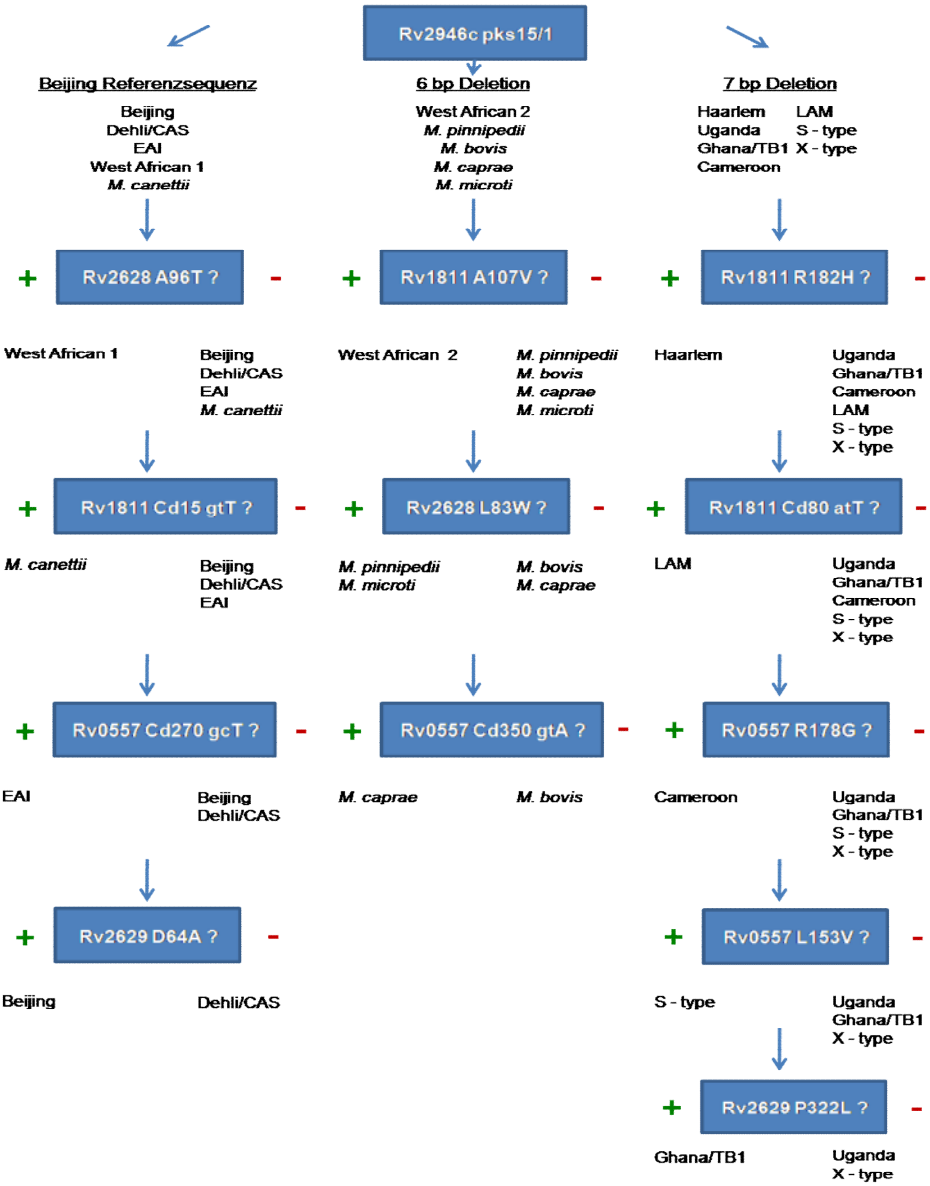


Abb. 4.5 Algorithmus zur Differenzierung von Stämmen des MTBKs basierend auf Sequenzvariationen. Die Klassifizierung erfolgt nach dem Ausschlussprinzip bestimmter Mutationen in den entsprechenden Genen. Cd: Codon; +: Mutation vorhanden; -: Mutation nicht vorhanden; CAS: *Central Asian* Genotyp; EAI: *East African Indian* Genotyp; LAM: *Latin - American - Mediterranean* Genotyp; Einbuchstabencode der Aminosäuren siehe Anhang E.

Im Folgenden werden die Sequenzierergebnisse detailliert beschrieben. Hierbei werden Mutationen als Aminosäureaustausch im Einbuchstabencode mit entsprechenden, mittig zentrierten Codon angegeben. Bei synonymen Mutationen wird nur der Basenaustausch im Triplettcode dargestellt. Alle Analysen wurden, sofern nicht anders angegeben, im Vergleich zur H37Rv Referenzsequenz durchgeführt.

4.1.1 Mutationen in Zellwand - assoziierten Genen

Die Bedeutung von Genvariationen für den Aufbau der mykobakteriellen Zellwand und mögliche spezies - oder genotypspezifische Mutationen sind in der Literatur unzureichend diskutiert worden. In einem ersten Schritt dieser Arbeit wurde daher die Referenzkollektion (Anhang A) auf Mutationen in Zellwand - assoziierten Genen im Vergleich zu der H37Rv Referenzsequenz analysiert. An der Synthese von Lipoarabinomanan (LAM), einen ubiquitären Bestandteil der mykobakteriellen Zellwand, und dessen Vorläufermoleküle Lipomanan (LM) und Phosphatidylinositolmanosid (PIM) sind u.a. Gene des *pimA* - Operons (Rv2609c - Rv2613c) beteiligt (Abb. 4.6). Für alle Stämme der Referenzkollektion konnten Sequenzdaten generiert werden, die in Tabelle 4.1 zusammengefasst sind.

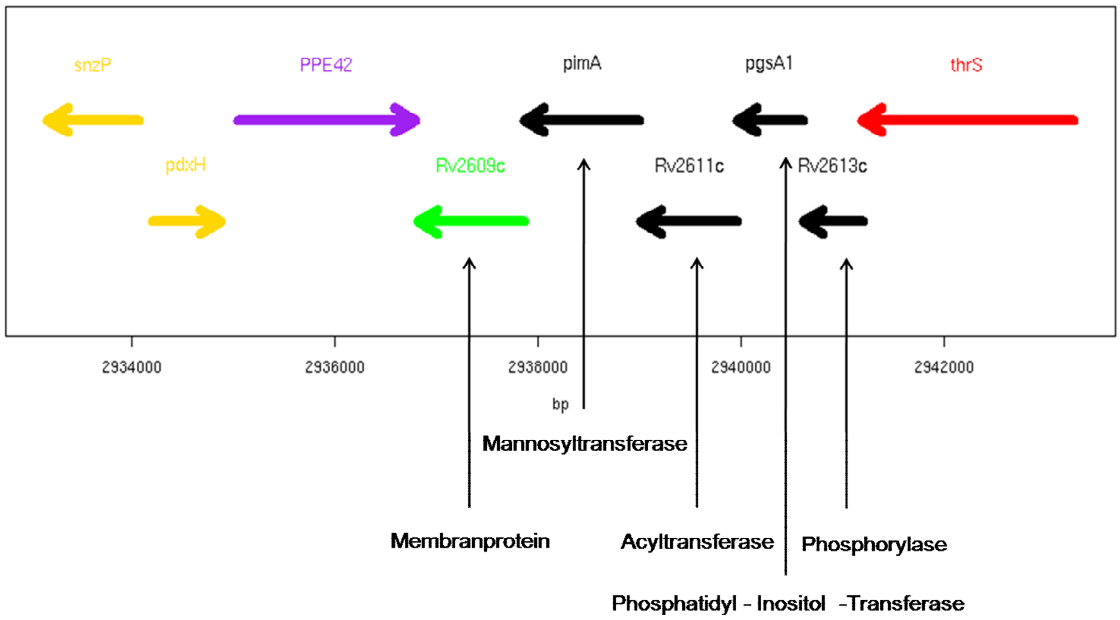


Abb. 4.6 Schematische Darstellung des *pimA* - Operons (Rv2609c - Rv2613c). Gene des *pimA* Operons sind maßgeblich an der Synthese von Lipoarabinomanan, ein ubiquitärer Bestandteil der mykobakteriellen Zellwand, beteiligt. Die angegebenen Positionen in bp entsprechen der Lage der Gene im H37Rv Genom (http://tuberculist.epfl.ch). Die einzelnen Funktionen der Gene bzw. die Genprodukte sind im unteren Teil der Abbildung gekennzeichnet. Farbkodierung: siehe http://tuberculist.epfl.ch.

In den fünf untersuchten Genen konnten insgesamt neun Sequenzveränderungen nachgewiesen werden, von denen fünf phylogenetisch informativ waren. Vier weitere Mutationen traten in einem bzw. zwei der analysierten Stämme des jeweiligen Genotyps auf (Tab. 4.1). Unter den neun beschriebenden Sequenzvariationen führten sechs zu einer veränderten Aminosäuresequenz.

Alle analysierten *M. africanum* Stämme des West African 2 Genotyps zeigten eine synonyme Veränderung in Codon 262 des Rv2611c Gens (taT>taC). Zusätzlich konnte hier eine H37Rv spezifische Variante nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur H37Rv Wildtypsequenz wiesen alle klinischen Isolate und die *M. bovis* bzw. *M. africanum* ATCC Referenzstämme Mutationen in Codon 102 (I102M, atA>atG) sowie in Codon 197 (S197C, tCt>tGt) auf, welche nicht explizit in der Tabelle 4.1 erwähnt werden. Ein *M. tuberculosis* Beijing Stamm zeigte einen tCT>tGC Austausch in Codon 197 (S197C).

In allen *M. tuberculosis* EAI Stämmen konnte eine funktionelle Mutation im Rv2612c Gen detektiert werden (S2N, aGc>aAc). Ein weiterer synonymer SNP wurde für alle *M. tuberculosis* Dehli/CAS Stämme im Rv2613c Gen identifiziert (Codon 6, cgC>cgT). Neben den genotypspezifischen Varianten wiesen einige Stämme zusätzlich stammspezifische Mutationen auf, die in Tabelle 4.1 zusammengefasst sind.

Tab. 4.1 Mutationen im *pimA* - Operon.

Genotyp	**N**	**Rv2609c (%)**	**Rv2610c (%)**	**Rv2611c (%)**	**Rv2612c (%)**	**Rv2613c (%)**
H37Rv ATCC	1	-	-	-	-	-
Bovis ATCC	1	-	-	-	-	-
Africanum ATCC	1	-	-	-	-	-
Haarlem	3	-	-	-	-	-
Uganda I	3	-	-	-	-	-
Uganda II	3	-	-	-	-	-
Ghana/TB1	3	-	-	-	-	-
Cameroon	4	-	-	-	-	-
LAM	3	-	-	-	-	-
S - type	3	-	-	-	-	-
X - type	3	-	-	-	-	-
Dehli/CAS	2	-	-	-	-	Codon 6, cgC>cgT (100%)

N: Anzahl der untersuchten Stämme; CAS: *Central Asian* Genotyp; LAM: *Latin - American - Mediterranean* Genotyp.
Die H37Rv spezifischen Varianten in Rv2611c sind nicht explizit dargestellt.

Fortsetzung Tab. 4.1.

Genotyp	N	Rv2609c (%)	Rv2610c (%)	Rv2611c (%)	Rv2612c (%)	Rv2613c (%)
EAI	3	M99T (33,3%)	-	Codon 210, gcC>gcG (33,3%)	S2N (100%)	-
Beijing	6	-	-	-	-	-
West African 1a	3	-	-	-	-	-
West African 1b	3	-	-	-	-	-
West African 2	3	-	-	Codon 262, taT>taC (100%)	-	-
M. pinnipedii	2	-	-	-	-	-
M. bovis	3	-	-	-	-	-
M. caprae	3	-	-	-	-	F117V (66,6%); M35L (66,6%)
M. microti	2	-	-	-	-	-
M. canettii	3	-	-		-	-

N: Anzahl der untersuchten Stämme; EAI: *East African Indian* Genotyp.

Die H37Rv spezifischen Varianten in Rv2611c sind nicht explizit dargestellt.

Die Sequenzanalyse einer weiteren Mannosyltransferase *pimB* (Rv0557) ergab insgesamt acht genotypspezifische Mutationen, wovon sechs einen Aminosäureaustausch bedingten (Tab. 4.2). So zeigten alle *M. tuberculosis* Haarlem Stämme eine Mutation in Codon 152 (R152P; cGc>cCc), während alle Cameroon Isolate eine Veränderung in Codon 178 trugen (R178G; Cgg>Ggg). *M. tuberculosis* S - type Stämme wiesen einen Leucin zu Valin Austausch in Codon 153 auf (L153V; Ctg>Gtg). Für alle *M. africanum* West African 1 Stämme konnten gleich zwei genotypspezifische Mutationen identifiziert werden (T74M, aCg>aTg; G304D, gGc>gAc). *M. canettii* Isolate zeigten eine genotypspezifische Variation in Codon 356 (P356S, Ccg>Tcg).

In *M. tuberculosis* EAI Stämmen wurde eine nicht - funktionelle Veränderung in Codon 270 (gcC>gcT) nachgewiesen. Eine weitere synonyme, genotypspezifische Variation zeigten alle *M. caprae* Isolate (Codon 350, gtG>gtA).

Zusätzlich wurde in Rv0557 auch eine genotypübergreifende Mutation nachgewiesen. Die in Codon 107 beschriebene Veränderung (Tab. 4.2) trat in allen tierpathogenen Stämmen sowie in allen *M. africanum* und *M. canettii* Isolaten auf. Weiterhin wiesen diese Mutation auch alle *M. tuberculosis* Beijing, EAI und Dehli/CAS Stämme auf, so dass über diesen phylogenetischen Marker die *Euro - American* Linie definiert werden kann. Eine Vielzahl von weiteren nur in einzelnen Stämmen gefundenen Mutationen sind ebenfalls in Tabelle 4.2. zusammengefasst.

Tab. 4.2 Mutationen in *pimB* (Rv0557).

Genotyp	**N**	***pimB* - Rv0557 (%)**
H37Rv ATCC	1	-
Bovis ATCC	1	Codon 107, ggT>ggC (100%)
Africanum ATCC	1	Codon 107, ggT>ggC (100%); R148P (100%); H149P (100%)
Haarlem	3	R152P (100%)
Uganda I	3	Codon 315, acC>acT (33,3%)
Uganda II	3	-
Ghana/TB1	3	-
Cameroon	4	R178G (100%)
LAM	3	-
S - type	3	L153V (100%)
X - type	3	-
Dehli/CAS	2	Codon 107, ggT>ggC (100%)
EAI	3	Codon 107, ggT>ggC (100%); Codon 270, gcC>gcT (100%)
Beijing	6	Codon 107, ggT>ggC (100%)
West African 1a	3	T74M (100%); Codon 107, ggT>ggC (100%); G304D (100%)
West African 1b	3	T74M (100%); Codon 107, ggT>ggC (100%); G304D (100%)
West African 2	3	Codon 107, ggT>ggC (100%)
M. pinnipedii	2	Codon 107, ggT>ggC (100%)
M. bovis	3	Codon 107, ggT>ggC (100%)
M. caprae	3	Codon 107, ggT>ggC (100%);Codon 350, gtG>gtA (100%)
M. microti	2	Codon 107, ggT>ggC (100%)
M. canettii	3	A87T (66,6%); Codon 107, ggT>ggC (100%); P356S (100%), Codon 5, cgC>cgT (33,3%)

N: Anzahl der untersuchten Stämme; CAS: *Central Asian* Genotyp; EAI: *East African Indian* Genotyp; LAM: Latin - *American* - *Mediterranean* Genotyp.

4.1.2 Mutationen in Reaktivierungsgenen *(resusciation factors)*

Ein besonderes Merkmal des Tuberkuloseerregers ist der Übergang in einen metabolisch inaktiven Zustand (Dormanz). An der Reaktivierung sind Reaktivierungsfaktoren beteiligt, die durch fünf so genannte *rpf* Gene (*rpfA - rpfE, resusciation promoting factor*) kodiert werden. In dieser Arbeit wurden Sequenzdaten für *rpfB* (Rv1009), *rpfC* (Rv1884c), *rpfD* (Rv2389c) sowie *rpfE* (Rv2450c) erhoben und hinsichtlich genotypspezifischer Variationen analysiert. Alle im Folgenden beschriebenen Sequenzdaten sind in Tabelle 4.3 zusammenfassend dargestellt.

Insgesamt konnten 24 Mutationen, von denen 11 phylogenetisch informativ waren, identifiziert werden. Dreizehn weitere Mutationen wurden nur in einzelnen Isolaten gefunden. Von den 24 Mutationen führten 17 zu einer veränderten Aminosäuresequenz.

Im *rpfB* Gen (Rv1009) konnten vorrangig Mutationen in den tierpathogenen Isolaten nachgewiesen werden. Alle *M. bovis* und *M. caprae* Stämme zeigten einen Glycin zu Glutaminsäure Austausch in Codon 282 (gGa>gAa). Genotypübergreifende Mutationen konnten auch für *M. microti* und *M. pinnipedii* detektiert werden (Codon 245, ggC>ggT). Weiterhin zeigten *M. bovis* Stämme eine genotypspezifische Veränderung in Codon 357 (A357V, gCa>gTa). In *M. canettii* Isolaten konnten drei Veränderungen in Rv1009 nachgewiesen werden (E275D, gaG>gaC; L345Q; cTg>cAg; Codon 346, cgT>cgC).

Die Analyse des *rpfC* Gens (Rv1884c) ergab weitaus weniger Variationen. Alle *M. canettii* Stämme zeigten eine genotypspezifische, funktionelle Mutation in Codon 2 (H2Y, Cat>Tat). Weitere, nur in einzelnen Stämmen vorkommende Mutationen sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Im *rpfD* Gen (Rv2389c) wurden nur zwei stammspezifische Mutationen detektiert. Ein *M. canettii* Stamm zeigte eine Deletion von Codon 1 - 48. Ein weiterer *M. tuberculosis* Haarlem Stamm wies eine stille Mutation in Codon 114 auf (ggC>ggA).

Die Analyse des *rpfE* (Rv2450c) Gens ergab für alle klinischen Isolate sowie für alle Referenzstämme eine Mutation in Codon 126 (R126Q, cGg>cAg), was auf eine fehlerhafte Sequenzannotation im H37Rv Genom schlussfolgern lässt und daher nicht explizit in Tabelle 4.3 erwähnt wird. Zusätzlich konnten genotyp - und stammspezifische Mutationen detektiert werden. So zeigten alle *M. africanum* West African 1 Stämme einen synonymen SNP in Codon 17 (Ttg>Ctg). Weitere stille Mutationen konnten für alle *M. canettii* Isolate in Codon 105 (gcG>gcA) und in Codon 139 (ggG>ggA) beschrieben werden. Einen genotypspezifischen, funktionellen SNP (T20R, aCg>aGg) zeigten alle Beijing Isolate.

Tab. 4.3 Mutationen in *rpf* Genen.

Genotyp	N	Rv1009 (%)	Rv1884c (%)	Rv2389c (%)	Rv2450c (%)
H37Rv ATCC	1	-	-	-	-
Bovis ATCC	1	G282E (100%); A357V (100%)	-	-	-
Africanum ATCC	1	-	-		-
Haarlem	3	-	-	Codon 114 ggC>ggA (33,3%)	-
Uganda I	3	-	-	-	L8P (33,3%)
Uganda II	3	-	-	-	-
Ghana/TB1	3	T39A (33,3%)	-		-
Cameroon	4	-		-	-
LAM	3	-	H16R (66,6%)	-	A90V (33,3%)
S - type	3	-	I158S (33,3%)	-	-
X - type	3	-	-	-	I115V (66,6%); G169V (33,3%); R170C (33,3%)
Dehli/CAS	2	-	-	-	-
EAI	3	-	-	-	-
Beijing	6	-	-	-	T20R (100%)
West African 1a	3	-	-	-	Codon 17 Ttg>Ctg (100%)
West African 1b	3	-	-	-	Codon 17 Ttg>Ctg (100%)
West African 2	3	-	Codon 30 acT>acG (33,33%)	-	-
M. pinnipedii	2	Codon 245 ggC>ggT (100%)	-	-	-
M. bovis	3	G282E (100%); A357V (100%)	-	-	-
M. caprae	3	I46V (33,3%); G282E (100%); Codon 211 CGTC Insertion (33,3%)	-	-	-
M. microti	2	Codon 245 ggC>ggT (100%)	-	-	-
M. canettii	3	E275D (100%); L345Q (100%); Codon 346 cgT>cgC (100%)	H2Y (100%)	Deletion Codon 1 - 48 (33,3%)	Codon 105 gcG>gcA (100%); Codon 139 ggG>ggA (100%)

N: Anzahl der untersuchten Stämme; EAI: *East African Indian* Genotyp; LAM: *Latin - American - Mediterranean* Genotyp

4.1.3 Mutationen in Stoffwechselgenen

Keating *et al.* zeigten 2005 in einer umfangreichen Studie, dass die genetische Ursache für ein Pyruvat - abhängiges Wachstum bestimmter MTBK Stämme auf Mutationen im *glpK* (Rv3696c) und im *pykA* (Rv1617) Gen zurückzuführen sind (83). Zur Detektion weiterer, genotypspezifischer Variationen innerhalb des MTBKs wurden Sequenzanalysen von den publizierten Regionen in *glpK* und *pykA* durchgeführt.

Bei der Analyse des *glpK* Gens ergab sich, dass der Nachweis der G - Insertion in Codon 191 in klinischen Isolaten nicht *M. bovis, M. microti* und *M. africanum* spezifisch ist. Zum Beispiel zeigten nur zwei von drei klinischen *M. bovis* Isolaten eine G - Insertion. Ein ähnliches Bild ergab sich für *M. pinnipedii* und *M. microti* Stämme. Jeweils ein klinisches Isolat zeigte eine G - Insertion in Codon 191, ein anderes entsprach jedoch der H37Rv Wildtypsequenz. G - Insertionen konnten auch für einige *M. africanum* West African 1 und West African 2 Stämme, für *M. africanum* ATCC sowie für einen *M. caprae* Stamm detektiert werden. Die Analyse ergab außerdem für zwei Stämme eine G - Deletion in Codon 190 (*M. africanum* West African 1b und West African 2). Zusätzlich zeigten fast alle *M. africanum* West African 1 Stämme sowie ein *M. caprae* Isolat eine synonyme Mutation in Codon 208 (taG>taA). Alle Ergebnisse sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Sequenzdaten des 315 bp Bereichs im *pykA* Gen konnten für alle Stämme der Referenzkollektion erhoben werden. Dabei entsprachen alle *M. tuberculosis* und *M. canettii* Stämme der H37Rv Referenzsequenz. *M. africanum* Isolate und alle tierpathogenen Stämme hingegen zeigten die von Keating *et al.* beschriebene, funktionelle Mutation in Codon 220 (E220D, gaG>gaT), die demnach für alle Stämme mit einer RD9 Deletion spezifisch ist. Einzige Ausnahme stellte dabei der *M. bovis* ATCC Stamm dar. Codon 220 zeigte hier einen gaG>gaA Austausch und hatte damit keine funktionelle Bedeutung (Tab. 4.5)

Im Zusammenhang mit dem Resistenzerwerb gegenüber dem neuen, derzeit in klinischen Studien getesteten Antituberkulotikum PA - 824 steht ein weiteres, mykobakterielles Enzym (*fgd1*, Rv0407). Rv0407 kodiert für eine Glukose - 6 - phosphat - Dehydrogenase, die für den Abbau von Glukose über den Pentosephosphatweg verantwortlich ist. Die Sequenzanalyse (Tab. 4.5) ergab eine synonyme Veränderung in Codon 320 (ttT>ttC) in allen tierpathogenen, *M. africanum* und *M. canettii* Stämmen. Da diese Mutation auch zusätzlich in allen *M. tuberculosis* Beijing, EAI und Dehli/CAS Stämmen nachgewiesen wurde, definiert dieser phylogenetische Marker die nach Gagneux *et al.* beschriebene *Euro - American* Linie (55). Genotypspezifische Variationen konnten für *M. tuberculosis* Haarlem und *M. africanum* West African 2 detektiert werden. Klinische Isolate des Haarlem Genotyps zeigten eine aAg>aTg Mutation in Codon 270, die in einem Aminosäureaustausch resultiert (K270M).

Alle *M. africanum* West African 2 Stämme trugen einen funktionellen SNP in Codon 296 (K296E, Aag>Gag). Auch in Rv407 konnten weitere, in einzelnen Stämmen vorkommende Variationen nachgewiesen werden, die in Tabelle 4.5 zusammengefasst sind.

Tab. 4.4 Mutationen in *glpK* (Rv3696).

Stammnummer	**N**	***glpK* - Rv3696 (%)**
H37Rv ATCC	1	-
Bovis ATCC	1	Codon 191 G - Insertion (100%)
Africanum ATCC	1	Codon 191 G - Insertion (100%)
Haarlem	3	Codon 191 G - Insertion (33,3%)
Uganda I	3	-
Uganda II	3	-
Ghana/TB1	3	-
Cameroon	4	-
LAM	3	-
S - type	3	-
X - type	3	-
Dehli/CAS	2	-
EAI	3	-
Beijing	6	-
West African 1a	3	Codon 191 G - Insertion (33,3%); Codon 208 taG>taA (100%)
West African 1b	3	Codon 190 G - Deletion (33,3%); Codon 191 G - Insertion (33,3%); Codon 208 taG>taA (66,6%)
West African 2	3	Codon 190 G - Deletion (33,3%); Codon 191 G - Insertion (33,3%)
M. pinnipedii	2	Codon 191 G - Insertion (50%)
M. bovis	3	Codon 191 G - Insertion (66,6%)
M. caprae	3	Codon 191 G - Insertion (33,3%); Codon 208 taG>taA (33,3%)
M. microti	2	Codon 191 G - Insertion (50%)
M. canettii	3	-

N: Anzahl der untersuchten Stämme; CAS: *Central Asian* Genotyp; EAI: *East African Indian* Genotyp; LAM: *Latin - American - Mediterranean* Genotyp

Tab. 4.5 Mutationen in *pykA* (Rv1617) und in *fgd1* (Rv0407).

Genotyp	N	*pykA* - Rv1617 (%)	*fgd1* - Rv0407 (%)
H37Rv ATCC	1	-	-
Bovis ATCC	1	Codon 220 gaG>gaT (100%)	Codon 320 ttT>ttC (100%)
Africanum ATCC	1	E220D (100%)	Codon 320 ttT>ttC (100%); K296E (100%)
Haarlem	3	-	K270M (100%)
Uganda I	3	-	-
Uganda II	3	-	-
Ghana/TB1	3	-	-
Cameroon	4	-	-
LAM	3	-	-
S - type	3	-	-
X - type	3	-	-
Dehli/CAS	2	-	Codon 320 ttT>ttC (100%); Codon 234 tcC>tcT (50%)
EAI	3	-	Codon 320 ttT>ttC (100%)
Beijing	6	-	Codon 320 ttT>ttC (100%)
West African 1a	3	E220D (100%)	Codon 320 ttT>ttC (100%); Codon 271 gcC>gcT (66,6%)
West African 1b	3	E220D (100%)	Codon 320 ttT>ttC (100%)
West African 2	3	E220D (100%)	Codon 320 ttT>ttC (100%); K296E (100%); G145A (33,3%)
M. pinnipedii	2	E220D (100%)	Codon 320 ttT>ttC (100%)
M. bovis	3	E220D (100%)	Codon 320 ttT>ttC (100%)
M. caprae	3	E220D (100%)	Codon 320 ttT>ttC (100%)
M. microti	2	E220D (100%)	Codon 320 ttT>ttC (100%)
M. canettii	3	-	Codon 320 ttT>ttC (100%); M208I (33,3%)

N: Anzahl der untersuchten Stämme; CAS: *Central Asian* Genotyp; EAI: *East African Indian Genotyp*; LAM: *Latin - American - Mediterranean* Genotyp

4.1.4 Mutationen in Antigenen

Zur Analyse der genetischen Diversität des MTBKs in Antigenen wurden beispielhaft Sequenzdaten für das 10kDa Antigen *esxH* (Rv0288) sowie Antigen *mpt64* (Rv1980c) erhoben. Beide Gene zeigten wenige Variationen.
Im Rv0288 Gen konnte eine genotypspezifische, funktionelle Mutation in Codon 71 (A71S, Gcg>Tcg) für alle *M. africanum* West African 2 Stämme sowie im *M. africanum* ATCC Stamm detektiert werden. Ein *M. tuberculosis* EAI Stamm zeigte einen nicht - synonymen SNP in Codon 9 (P9S, Ccc>Tcc). Alle anderen klinischen Isolate entsprachen der H37Rv Referenzsequenz.
Im Rv1980c Gen konnte eine *M. africanum* West African 1 genotypspezifische Mutation (I43N, aTt>aAt) nachgewiesen werden. Weiterhin konnte für alle *M. canettii* Stämme ein Aminosäureaustausch in Codon 45 detektiert werden (M45T, aTg>aCg). Die Sequenzanalyse aller anderen Stämme ergab die H37Rv Referenzsequenz.

4.1.5 Mutationen in *pe* und *ppe* Genen

Abdallah *et al*. zeigten 2006, dass PPE41/PE25 (Rv2430c - 2431c) sekretiert wird und immunmodulatorisch wirkt (2). Die Sequenzanalyse von Rv2430c (*ppe41)* und Rv2431c *(pe25)* ergab keine genotypspezifischen Sequenzvariationen innerhalb des MTBKs. In Rv2430c zeigten zwei der *M. tuberculosis* EAI Stämme eine synonyme Mutation in Codon 59 (ccA>ccT). Eine 112 bp Deletion (Codon 2 - Codon 39) konnte in einem *M. tuberculosis* LAM Stamm beschrieben werden. Für einen *M. microti* Stamm wurde eine funktionelle Variante in Codon 48 (T48P, Acg>Ccg) identifiziert.
Die Analyse des Rv2431c Gens ergab eine Mutation in Codon 40 (R40P, cGg>cCg) in einem *M. bovis* Isolat. Für den *M. tuberculosis* LAM Stamm mit der 112 bp Deletion in Rv2430c konnten keine Sequenzdaten generiert werden. Alle anderen klinischen Isolate entsprachen der H37Rv Referenzsequenz.
Ein weiteres, in die Sequenzanalyse mit einbezogenes *ppe* Gen (Rv0388c, *ppe9*) wies ebenfalls wenige Variationen auf. *M. bovis* Stämme sowie zwei der *M. caprae* Isolate zeigten eine Mutation in Codon 142 (E142A, gAa>gCa). In Codon 146 konnte eine T - Deletion und damit eine Leserasterverschiebung für alle *M. microti* Stämme und einem *M. pinnipedii* Isolat nachgewiesen werden. Alle klinischen Isolate sowie alle in dieser Analyse untersuchten Referenzstämme wiesen folgende Mutationen auf, welche auf Fehler in der H37Rv Sequenzannotation schließen lässt: Q122K, Cag>Aag; Codon 127 ggA>ggC; T138A, Acg>Gcg; H139Q caC>caG; H146Q, caT>caG; L149V, Ttg>Gtg; D152E, gaC>gaG; G159A, gGg>gCg; Codon 162, tcC>tcG; Codon 165 C - Insertion, Codon 169 C - Insertion.

4.1.6 Mutationen in Resistenzgenen

Zur Überprüfung der Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung gegenüber den Erstrangmedikamenten (Anhang A) wurden Sequenzanalysen in für Isoniazid und Rifampicin beschriebenen Resistenzgenen (INH: *katG, fabG1 - inhA, ahpC*; RMP: *rpoB*) durchgeführt. Dabei konnten zwei phylogenetische Marker identifiziert werden. Im *fabG1 - inhA* (Rv1483) Gen zeigten alle *M. africanum* West African 1 Stämme einen G zu A Austausch an Position -102 vor Startcodon. In *ahpC* (Rv2428) konnte ein G zu A Austausch an Position -88 vor Startcodon für alle Dehli/CAS Stämmen identifiziert werden. Die Ergebnisse für alle in Anhang A als INH und RMP resistent beschriebenen Stämme sowie alle weiteren Stämme mit Mutationen in den entsprechenden Genen sind in Tabelle 4.6 zusammengefasst. Alle nicht dargestellten Stämme entsprachen der H37Rv Referenzsequenz.

Tab. 4.6 Mutationen in Resistenzgenen.

Nr.	Spezie	Genotyp	*katG*	*fabG1 - inhA*	*ahpC*	*rpoB*
2169/99	*M. tuberculosis*	Uganda I	-	-	-	Codon 432 TTC Insertion
2201/99	*M. tuberculosis*	Uganda I	-	C>T -15	-	D435Y
10493/01	*M. tuberculosis*	Ghana/TB1	S325I	-	-	-
10469/01	*M. tuberculosis*	Ghana/TB1	-	-	-	D435Y
9953/04	*M. tuberculosis*	X - type	-	-	Codon 6 atT>atC	-
7936/01	*M. tuberculosis*	Dehli/CAS	-	-	G>A -88	-
2637/01	*M. tuberculosis*	Dehli/CAS	-	-	G>A -88	-
3256/02	*M. tuberculosis*	Beijing	S315T	-	-	H445D
3329/02	*M. tuberculosis*	Beijing	S315T	-	-	S450L
4445/02	*M. tuberculosis*	Beijing	S315T	-	-	S450L
5434/02	*M. africanum*	West African 1a	-	G>A -102	-	-
1449/02	*M. africanum*	West African 1a	-	G>A -102	-	-
1473/02	*M. africanum*	West African 1a	-	G>A -102	-	-
1443/02	*M. africanum*	West African 1b	-	G>A -102	-	-
10473/01	*M. africanum*	West African 1b	-	G>A -102	-	-
10494/01	*M. africanum*	West African 1b	-	G>A -102	-	-
10514/01	*M. africanum*	West African 2	-	C>T -15	-	-

CAS: *Central Asian* Genotyp

4.1.7 Virulenz - assoziierte Gene

In der Literatur wurde eine Vielzahl von Genen beschrieben, die im Zusammenhang mit der Virulenz von MTBK Stämmen stehen. Sequenzvariationen in diesen Genen stellen somit einen interessanten Mechanismus für die Modulation der Virulenz oder der Wirt - Pathogen Interaktion dar. Aus diesem Grund wurden sieben Virulenz - assoziierte Gene in die Sequenzanalyse mit eingeschlossen.

Zum Beispiel kodiert Rv0410c für eine Proteinkinase G (*pknG*), die in die Phagosomen von Makrophagen sekretiert, die Phagosomen - Lysomen - Fusion inhibiert und somit ein intrazelluläres Wachstum des Pathogens ermöglicht. Die Sequenzanalyse (Tab. 4.7) identifizierte genotypübergreifende und genotypspezifische Mutationen sowie Sequenzvariationen in einzelnen Stämmen des MTBKs.

So zeigten alle *M. bovis* und *M. caprae* Stämme eine synonyme Veränderung in Codon 69 (ccG>ccA; Abb. 4.7). *M. africanum* West African 1 Stämme trugen eine Variation in Codon 665 (A665T, Gcc>Acc), während für alle West African 2 Stämme eine Mutation in Codon 736 (T736K, aCg>aAg) identifiziert werden konnte. Für alle *M. tuberculosis* EAI Stämme konnte eine Mutation in Codon 614 (tcG>tcA) detektiert werden. Eine Vielzahl von Mutationen präsentierte ein *M. canettii* Isolat, die in Tabelle 4.7 nicht explizit erwähnt werden: Codon 3 aaA>aaG; Codon 36 ttC>ttG; Codon 269 ctC>ctT; Codon 501 tcA>tcG, Codon 506 ctA>ctG; Codon 510 cgC>cgT; Codon 532 gtT>gtC; K557R, aAA>aGG; Codon 564 gaT>gaC; Codon 575 gcC>gcG; Codon 579 acC>acG; A580V, gCc>gTc; Codon 707 ccG>ccA; Codon 716 ggT>ggC.

Abb. 4.7 Sequenzalignment für eine genotypübergreifende Mutation in Rv0410c. Alle *M. bovis* und *M. caprae* Stämme zeigten eine synonyme Sequenzvariation in Codon 69 (ccG>ccA) im Vergleich zur H37Rv Referenzsequenz.

MgtC (Rv1811), ein weiteres Beispiel für einen wichtigen Virulenzfaktor, kodiert für eine Magnesium - Transport - P - Typ - ATPase, die bei Magnesiummangel unter ATP Verbrauch Mg^{2+} ins Cytosol befördert. Neben dem von Alix *et al*. 2006 beschriebenen Haarlem genotypspezifischen Polymorphismus in Codon 182 (R182H, cGc>cAc) ergab die Analyse der Referenzkollektion weitere genotypspezifische Variationen (Abb. 4.8 (6)).

Zum Beispiel zeigten alle *M. tuberculosis* LAM Stämme eine synonyme Mutation in Codon 80 (atC>atT). *M. africanum* West African 1b Stämme trugen eine funktionelle Mutation in Codon 95 (T95M, aCg>aTg), während alle West African 1a Stämme der H37Rv Referenzsequenz entsprachen. West African 2 Stämme zeigten eine funktionelle Mutation in Codon 107 (A107V, gCc>gTc). Für *M. canettii* Stämme konnte eine synonyme Veränderung in Codon 15 (gtC>gtT) identifiziert werden. Weiterhin ergab die Sequenzanalyse eine stammspezifische Mutation in einem *M. microti* Stamm, der eine A - Insertion in Codon 7 zeigte.

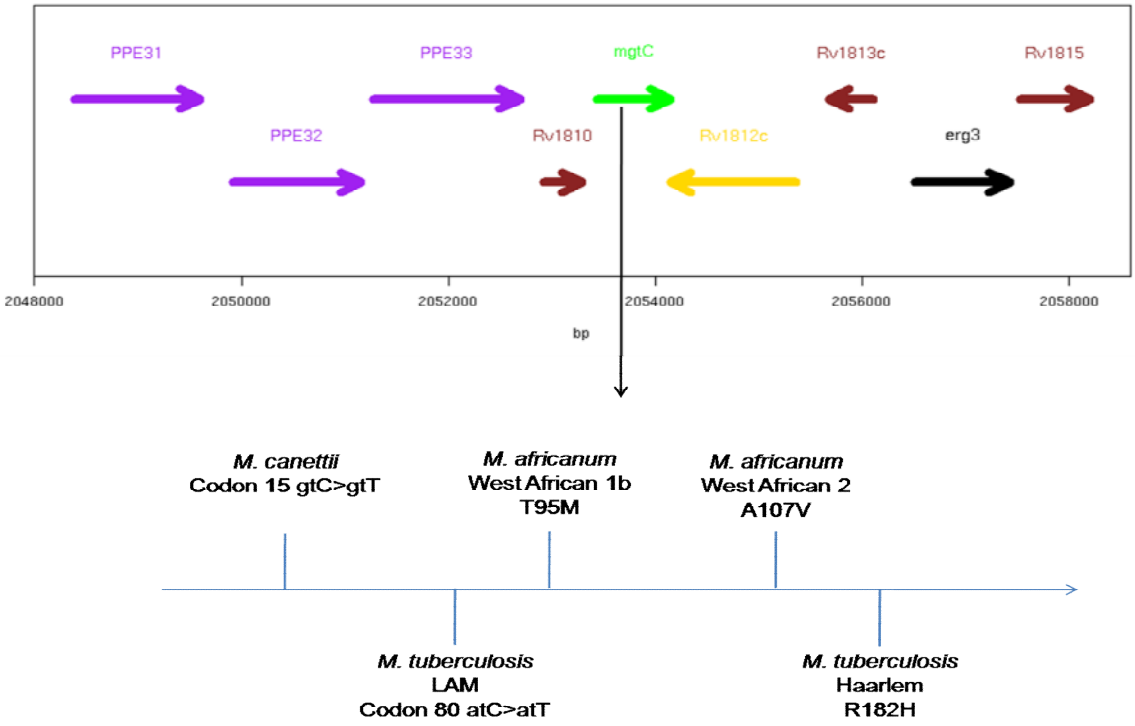


Abb. 4.8 Genotypspezifische Mutationen in Rv1811 (*mgtC*). Dargestellt ist die Position des *mgtC* Gens im mykobakteriellen Genom (http://tuberculist.epfl.ch; Farbkodierung entsprechend). Es konnten fünf phylogenetisch informative SNPs nachgewiesen werden, von denen drei zu einer veränderten Aminosäuresequenz führten. Die einzelnen Genotypen mit den entprechenden Sequenzveränderungen sind im unteren Teil der Abbildung dargestellt. EAI: *East African Indian* Genotyp; LAM: *Latin - American - Mediterranean* Genotyp; (Einbuchstabencode der Aminosäuren siehe Anhang E).

In dieser Arbeit wurden außerdem Sequenzanalysen von einigen der von Hershberg *et al.* publizierten Genen (Rv2032, Rv2628, Rv3547) mit eingeschlossen (70). In Rv2032 konnten genotypübergreifende, genotypspezifische sowie Variationen in einzelnen Stämmen detektiert werden. Alle *M. bovis* und *M. caprae* Stämme zeigten eine Mutation in Codon 318 (P318L, cCa>cTa). Zusätzlich trugen alle *M. caprae* Isolate eine Veränderung in Codon 34 (A34S, Gcc>Tcc), wobei einer der Stämme eine weitere Mutation in Codon 108 (E108V, gAg>gTg) aufwies. Für alle *M. canettii* Stämme konnte eine synonyme Veränderung in Codon 62 (ggG>ggC) detektiert werden. Stammspezifische Mutationen wurden für *M. africanum* ATCC, *M. tuberculosis* Ghana/TB1 und einen der *M. canettii* Stämme nachgewiesen, die in Tabelle 4.7 zusammengefasst sind. Die größte Variabilität zeigte erneut einer der *M. canettii* Stämme: S13R agC>agG; Codon 59 gcG>gcA; Codon 62 ggG>ggC; Codon 84 gaA>gaG; R141C, Cgc>Tgc; I151L, Atc>Ctc; Codon 279 caC>caT; Codon 297 gcC>gcG; Codon 305 ccG>ccT; M307V, Atg>Gtg.

Im Rv2628 Gen konnten ebenfalls genotypübergreifende und genotypspezifische Mutation sowie Variationen in einzelnen Isolaten detektiert werden (Tab. 4.8). Alle *M. africanum*, *M. canettii* und tierpathogenen Isolate sowie *M. tuberculosis* EAI Stämme zeigten einen tCg>tTg Austausch in Codon 59 (S59L). Zusätzlich konnte für alle *M. microti* und *M. pinnipedii* Stämme eine Mutation in Codon 83 (L83W, tTg>tGg) nachgewiesen werden. *M. africanum* West African 1 Stämme zeigten eine funktionelle Mutation in Codon 96 (A96T, Gcg>Acg). Für *M. canettii* Stämme konnten zwei genotypspezifische SNPs identifiziert werden (Codon 26 atA>atC; S49A, Tcc>Gcc). Einzelne Varianten trugen *M. africanum* West African 1b, West African 2 sowie *M. canettii* Stämme. Ein *M. africanum* West African 1b Isolat zeigte eine funktionelle Mutation in Codon 6 (P6L, cCg>cTg), der West African 2 Stamm eine Variation in Codon 27 (G27S, Ggc>Agc). Für die *M. canettii* Stämme ergab sich folgendes Bild: 3040/99: Codon 78 ggT>ggC; T85R, Acc>Gcc; 3041/99: Codon 31 G - Insertion; T85R, Acc>Gcc; Codon 91 gaT>gaC; 3151/08: Codon 31 G - Insertion, Codon 91 gaT>gaC.

Die Analyse des Rv3547 Gens identifizierte vier genotypspezifische SNPs sowie eine genotypübergreifende Variation (Tab. 4.8). Alle *M. africanum* West African 1 Stämme zeigten eine Veränderung in Codon 48 (ctG>ctT) sowie in Codon 113 (D113N, Gac>Aac). *M. canettii* Stämme wiesen Variationen in Codon 69 (gaC>gaT) sowie in Codon 148 (gtT>gtC) auf. Als gemeinsame Mutation zeigten alle *M. microti* und *M. pinnipedii* Stämme einen Ctc>Gtc Austausch in Codon 90 (L90V). In Rv3547 konnten auch Variationen in einzelnen Isolaten identifiziert werden, die in Tabelle 4.8 zusammengefasst sind.

Tab. 4.7 Mutationen in Rv0410c, Rv1811 und Rv2032.

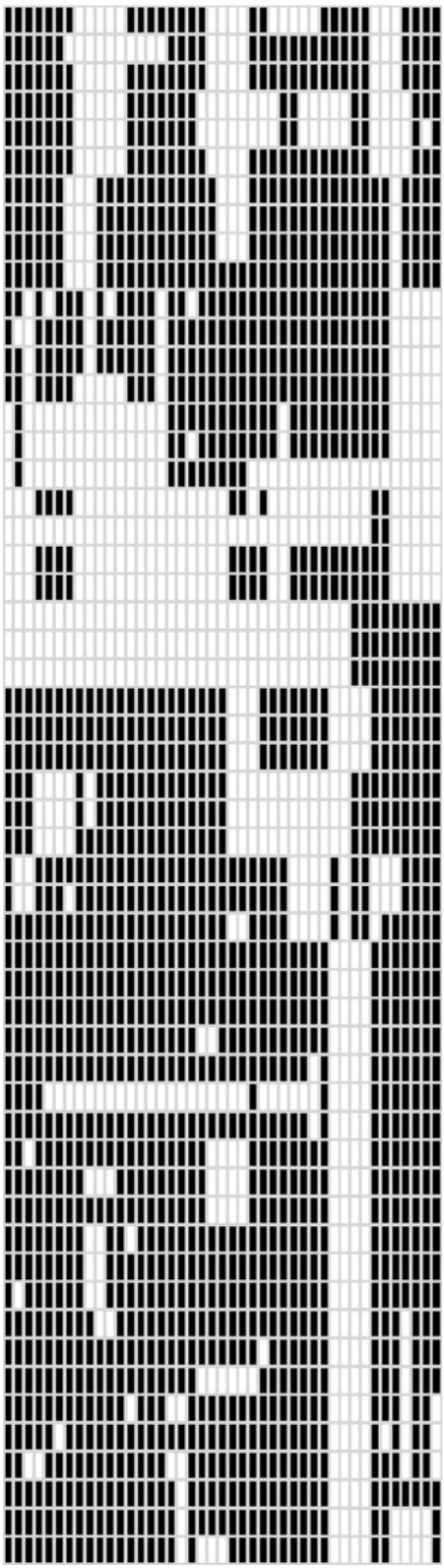
Genotyp	N	Rv0410c (%)	Rv1811 (%)	Rv2032 (%)
H37Rv ATCC	1	-	-	-
Bovis ATCC	1	Codon 69 ccG>ccA (100%)	-	P318L (100%)
Africanum ATCC	1	-	-	Y179C (100%)
Haarlem	3	-	R182H (100%)	-
Uganda I	3	-	-	-
Uganda II	3	-	-	-
Ghana/TB1	3	-	-	Codon 186 ggG>ggC (33,3%)
Cameroon	4	-	-	-
LAM	3	-	Codon 80 atC>atT (100%)	-
S - type	3	-	-	-
X - type	3	-	-	-
Dehli/CAS	2	-	-	-
EAI	3	Codon 614 tcG>tcA (100%); D145H (66,6%); H159Y (33,3%)	-	-
Beijing	6	-	-	-
West African 1a	3	Codon 132 ggC>ggA (33,3%; A665T (100%)	-	-
West African 1b	3	A665T (100%)	T95M (100%)	-
West African 2	3	T736K (100%)	A107V (100%)	-
M. pinnipedii	2	-	-	-
M. bovis	3	Codon 69 ccG>ccA (100%)	-	P318L (100%)
M. caprae	3	Codon 69 ccG>ccA (100%); Q58H (33,3%)	-	P318L (100%); A34S (100%); E108V (33,3%)
M. microti	2	E259Q (50%)	Codon 7 A - Insertion (50%)	-
M. canettii	3	Codon 272 Ttg>Ctg (100%); Codon 458 gtC>gtG (66,6%), Codon 730 acT>acC (66,6%); siehe Text (33,3%)	Codon 15 gtC>gtT (100%)	Codon 62 ggG>ggC (100%); Codon 271 acG>acC (66,6%); siehe Text (33,3%)

N: Anzahl der untersuchten Stämme; CAS: *Central Asian* Genotyp; EAI: *East African Indian* Genotyp; LAM*: Latin - American - Mediterranean* Genotyp

Reed *et al.* beschrieben 2004, dass die Hypervirulenz bestimmter Stämme auf eine funktionelle Polyketidsynthase (*pks15/1*, Rv2946c*)* zurückzuführen ist, die für die Synthese des phenolischen Glykolipids verantwortlich ist (129). Stämme wie der H37Rv Referenzstamm haben im Vergleich zu den Beijing Stämmen eine 7 bp Deletion, die zu einer Leserasterverschiebung führt und damit die Synthese einer aktiven Polyketidsynthase ausschliesst. Die Sequenzanalyse der Referenzkollektion (Tab. 4.8) bestätigte die beschriebene Deletion im Vergleich zur Beijing Referenzsequenz. Alle klinischen *M. tuberculosis* EAI, Beijing, Dehli/CAS sowie alle *M. africanum* West African 1 und *M. canettii* Isolate entsprachen der Beijing Referenzsequenz und besitzen damit eine funktionelle Polyketidsynthase. *M. africanum* West African 2, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* und *M. microti* Stämme wiesen eine 6 bp Deletion auf, was zum Verlust zweier Aminosäuren führt, aber nicht zur Inaktivierung der Polyketidsynthase (Abb. 4.9)

Abb. 4.9 Genotypspezifische Variationen in *pks15/1*. *M. tuberculosis* EAI, Dehli/CAS sowie alle *M. africanum* West African 1 und *M. canettii* Isolate entsprachen der Beijing Referenzsequenz. *M. africanum* West African 2, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* und *M. microti* Stämme zeigten eine 6 bp Deletion. Für alle anderen *M. tuberculosis* Isolate wie z.B *M. tuberculosis* Cameroon konnte eine 7 bp Deletion nachgewiesen werden.

Ein weiteres Beispiel für Gene, in denen Sequenzveränderungen in einen veränderten Phänotyp resultieren, bietet die von Wang *et al*. 2007 veröffentlichte Studie, die eine Mutation in Codon 64 des Rv2629 Gens mit RMP Resistenz assoziert. Der Studienaufbau lies jedoch vermuten, dass der Zusammenhang zwischen Mutation und RMP Resistenz auf dem Genotyp der ausgewählten klinischen Isolate beruhte. Die Sequenzanalyse der Referenzkollektion (Tab. 4.8) sowie weiterer in dieser Arbeit nicht erwähnter klinischer Isolate (Homolka *et al.* 2009 (73)) konnte dies bestätigen (Abb. 4.10). Eine Veränderung in Codon 64 (D64A, gAt>gCt) im Rv2629 Gen ist spezifisch für Isolate des Beijing Genotyps. Bei der Analyse konnte außerdem ein weiterer phylogenetischer Marker identifiziert werden. Alle *M. tuberculosis* Ghana/TB1 Stämme wiesen eine Mutation in Codon 322 (P322L, cCg>cTG) auf. Stammspezifische Variationen sind in Tabelle 4.8 zusammengefasst.



Spoligotype	Species	Genotype	Rv2629 polymorphisms
	M. africanum	West African 1	wt
	M. africanum	West African 1	wt
	M. africanum	West African 1	wt
	M. africanum	West African 1	wt
	M. africanum	West African 1	wt
	M. africanum	West African 1	wt
	M. africanum	West African 2	wt
	M. africanum	West African 2	wt
	M. africanum	West African 2	wt
	M. africanum	West African 2 (ATCC)	wt
	M. bovis	Bovis (ATCC)	wt
	M. bovis	Bovis	wt
	M. bovis	Bovis	wt
	M. bovis	Bovis	wt
	M. caprae	Caprae	wt
	M. caprae	Caprae	wt
	M. caprae	Caprae	wt
	M. microti	llama	wt
	M. microti	vole	wt
	M. pinnepedii	Seal	wt
	M. pinnepedii	Seal	wt
	M. tuberculosis	Beijing	gAt>gCt D64A
	M. tuberculosis	Beijing	gAt>gCt D64A
	M. tuberculosis	Beijing	gAt>gCt D64A
	M. tuberculosis	Cameroon	wt
	M. tuberculosis	Cameroon	wt
	M. tuberculosis	Cameroon	wt
	M. tuberculosis	Dehli/CAS	wt
	M. tuberculosis	Dehli/CAS	wt
	M. tuberculosis	Dehli/CAS	wt
	M. tuberculosis	EAI	wt
	M. tuberculosis	EAI	wt
	M. tuberculosis	EAI	wt
	M. tuberculosis	Ghana	cCg>cTg P322L
	M. tuberculosis	Ghana	cCg>cTg P322L
	M. tuberculosis	Ghana	cCg>cTg P322L
	M. tuberculosis	H37Rv (ATCC)	wt
	M. tuberculosis	Haarlem	wt
	M. tuberculosis	Haarlem	wt
	M. tuberculosis	Haarlem	wt
	M. tuberculosis	LAM	wt
	M. tuberculosis	LAM	wt
	M. tuberculosis	LAM	wt
	M. tuberculosis	S-type	wt
	M. tuberculosis	S-type	wt
	M. tuberculosis	S-type	wt
	M. tuberculosis	Uganda	wt
	M. tuberculosis	Uganda	wt
	M. tuberculosis	Uganda	wt
	M. tuberculosis	Uganda	caC>caT Codon 126 silent
	M. tuberculosis	Uganda	wt
	M. tuberculosis	Uganda	wt
	M. tuberculosis	X-type	wt
	M. tuberculosis	X-type	wt
	M. tuberculosis	X-type	wt

Abb. 4.10 Ergebnisse zur Studie von Mutationen in Rv2629 und RMP Resistenz. Dargestellt sind Spoligomuster und die Sequenzdaten des Rv2629 Gens (aus Homolka *et al.* 2009 (73)).

Tab. 4.8 Mutationen in Rv2628, Rv2629, Rv2946c (*pks15/1*) und Rv3547.

Genotyp	N	Rv2628 (%)	Rv2629 (%)	*Rv2946c (%)	Rv3547 (%)
H37Rv ATCC	1	-	-	7 bp Del (100%)	-
Bovis ATCC	1	S59L (100%)	-	6 bp Del (100%)	-
Africanum ATCC	1	-	-	6 bp Del (100%)	-
Haarlem	3	-	-	7 bp Del (100%)	-
Uganda I	3	-	-	7 bp Del (100%)	-
Uganda II	3	-	Codon 126 caC>caT (33,3%)	7 bp Del (100%)	-
Ghana/TB1	3	-	P322L (100%)	7 bp Del (100%)	-
Cameroon	4	-	-	7 bp Del (100%)	-
LAM	3	-	-	7 bp Del (100%)	R23W (33,3%)
S - type	3	-	-	7 bp Del (100%)	-
X - type	3	-	-	7 bp Del (100%)	-
Dehli/CAS	2	-	-	-	A111T (50%)
EAI	3	S59L (100%)	-	-	-
Beijing	6	-	D64A (100%)	-	-
West African 1a	3	S59L (100%); A96T (100%)	-	-	Codon 48 ctG>ctT (100%); D113N (100%)
West African 1b	3	S59L (100%); A96T (100%); P6L (33,3%)	-	-	Codon 48 ctG>ctT (100%); D113N (100%)
West African 2	3	S59L (100%); G27S (33,3%)	T211I (33,3%)	6 bp Del (100%)	-
M. pinnipedii	2	S59L (100%); L83W (100%)	-	6 bp Del (100%)	L90V (100%)
M. bovis	3	S59L (100%)	-	6 bp Del (100%)	-
M. caprae	3	S59L (100%)	-	6 bp Del (100%)	-
M. microti	2	S59L (100%); L83W (100%)	-	6 bp Del (100%)	L90V (100%)
M. canettii	3	S59L (100%); Codon 26 atA>atC (100%); S49A (100%); siehe Text (33,3%)	G80R (33,3%); Codon 271 gcG>gcA (33,3%) T118S (66,6%); Codon 178 cgC>cgT (66,6%)	-	Codon 69 gaC>gaT (100%); Codon 148 gtT>gtC (100%); Codon 23 Cgg>Agg (66,6%)

N: Anzahl der untersuchten Stämme; CAS: *Central Asian* Genotyp; EAI: *East African Indian* Genotyp; LAM: *Latin - American - Mediterranean* Genotyp; Del: Deletion; *Sequenzvergleich bezieht sich auf *M. tuberculosis* Beijing Stämme (Beijing entspricht der Wildtypsequenz)

4.2 Biologische Diversität von *M. tuberculosis* Komplex Stämmen

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte eine Vielzahl von funktionellen (nicht - synonymen) Mutationen bei klinischen MTBK Isolaten beschrieben werden. Ob diese genetische Diversität jedoch tatsächlich Auswirkungen auf die (Patho) - Biologie der Stämme hat, lässt sich anhand der reinen Sequenzdaten nicht belegen. Daher sollte in den folgenden Teilen die biologische Diversität von klinischen Isolaten in verschiedenen Modellsystemen analysiert werden.

Um einen ersten Eindruck von der biologischen Variabilität von MTBK Stämmen zu bekommen, wurden Wachstumsanalysen in Flüssigkulturmedium und in murinen Makrophagen sowie entsprechende Genexpressionsanalysen mittels Microarray - Technologie durchgeführt. Insgesamt wurden 15 klinische Isolate sowie die Referenzstämme H37Rv und CDC1551 in die Analyse mit einbezogen. Die klinischen Isolate repräsentieren eine Auswahl von fünf Genotypen (*M. tuberculosis* Haarlem, Uganda, Beijing, EAI; *M. africanum* West African 2), die zu unterschiedlichen nach Gagneux *et al.* definierten Linien bzw. nach Wirth *et al*. publizierten phylogenetischen Gruppen gehören (55,177). Eine Darstellung der phylogenetischen Gruppierung der Stämme ist in Abbildung 4.11 gezeigt.

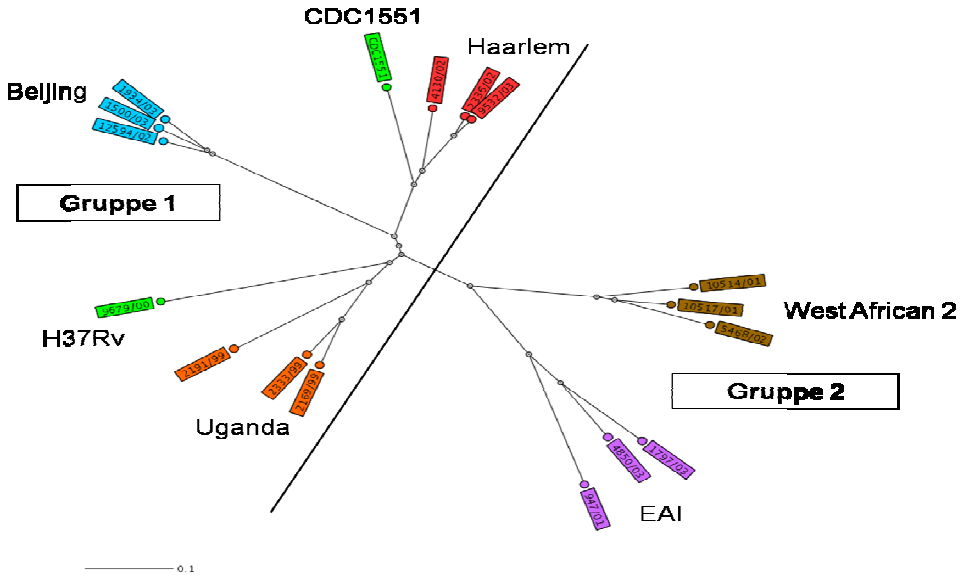


Abb. 4.11 Phylogenetischer Baum basierend auf MIRU - VNTR Typisierung und Spoligotypisierungsdaten von 17 Stämmen, die für die entsprechenden Analysen verwendet wurden. (http://www.miru-vntrplus.org). *M. tuberculosis* Haarlem, Uganda und Beijing Isolate sowie die Referenzstämme H37Rv und CDC1551 gehören zu der nach Wirth *et al*. definierten phylogenetischen Gruppe 1. *M. tuberculosis* EAI und *M. africanum* West African 2 Stämme gruppieren sich zu einer zweiten Einheit (177). EAI: *East African Indian* Genotyp; (Neighbour - Joining Tree, DC: Cavalli - Storza und Edwards, 1967).

4.2.1 Wachstums - und Transkriptionsanalysen in Flüssigkulturmedium - *in vitro*

In einem ersten Schritt wurden Wachstums - und Transkriptionsprofile von 15 klinischen Isolaten sowie den Referenzstämmen H37Rv und CDC1551 in 7H9/OADC Flüssigkulturmedium erstellt.

Die Analyse ergab keine signifikanten Wachstumsunterschiede klinischer Isolate (Abb. 4.12) im Vergleich zu den H37Rv und CDC1551 Referenzstämmen. Lediglich ein *M. tuberculosis* Uganda Stamm (2169/99) zeigte ein verzögertes Wachstum. Der Anstieg der Wuchskurve entsprach jedoch dem der Referenzstämme (Abb. 4.12).

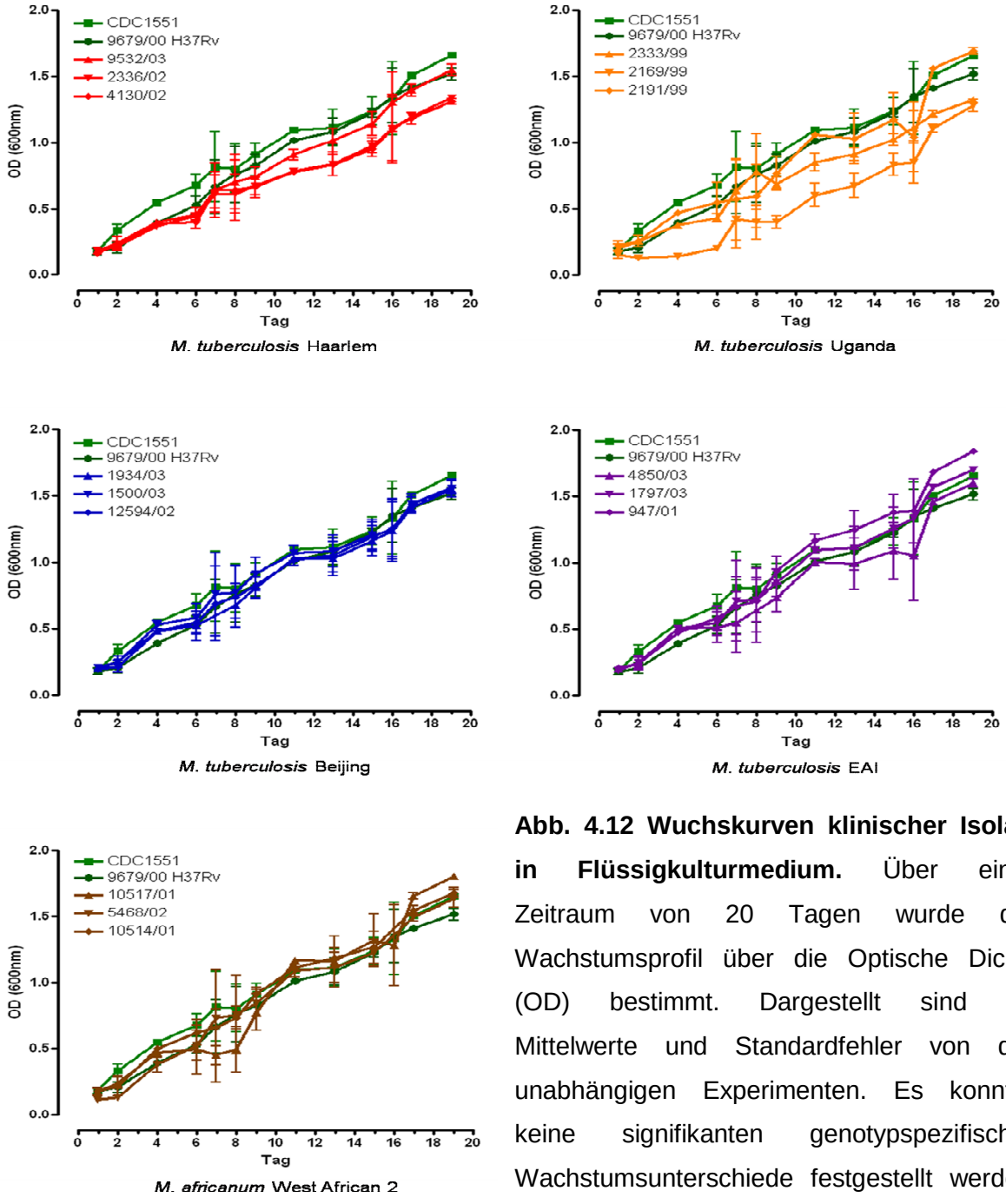


Abb. 4.12 Wuchskurven klinischer Isolate in Flüssigkulturmedium. Über einen Zeitraum von 20 Tagen wurde das Wachstumsprofil über die Optische Dichte (OD) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. Es konnten keine signifikanten genotypspezifischen Wachstumsunterschiede festgestellt werden. EAI: *East African Indian* Genotyp.

Nachfolgend wurden für alle klinischen Isolate und dem H37Rv Referenzstamm Genexpressionsprofile mittels Microarrayanalysen erstellt. Die Normalisierung erfolgte auf den CDC1551 Referenzstamm. Die folgenden Ergebnisse resultieren aus der Analyse von drei unabhängigen Experimenten pro Stamm. Da jedes Gen pro Microarray zweifach gespottet ist, ergibt sich für jedes Gen eine 6 fache Auflösung. Die Identifizierung statistisch signifikanter, gruppen - oder genotypspezifischer Genexpressionsunterschiede sowie Genexpressionsvarianten einzelner Stämme erfolgte mittels Varianzanalysen (ANOVA, *analysis of variance*).

Die Transkriptomanalyse zeigte im Gegensatz zu den Wachstumsprofilen eine deutlich größere Variabilität. Um zu prüfen, ob sich für bestimmte phylogenetische Gruppen spezifische Genexpressionssignaturen definieren lassen, wurde in einem ersten Schritt ein Ähnlichkeitsstammbaum (*condition tree*) berechnet. In die Analyse wurden alle Gene (1069), die 1,5 fach im Verhältnis zum CDC1551 Referenzstamm in mindestens einem von 16 Isolaten reguliert und in 42 von 48 Stämmen (16 Stämme, drei unabhängige Experimente) vorhanden waren, eingeschlossen (Abb. 4.13). Das daraus resultierende Dendogramm entspricht dem durch molekulare Typisierungsmethoden definierten Ähnlichkeitsstammbaum (Vergleich Abb. 4.11 und 4.13). Eine Klassifizierung in Gruppe 1 und 2 sowie die phylogenetische Einteilung der untersuchten klinischen Isolate in Genotypen wurde bestätigt.

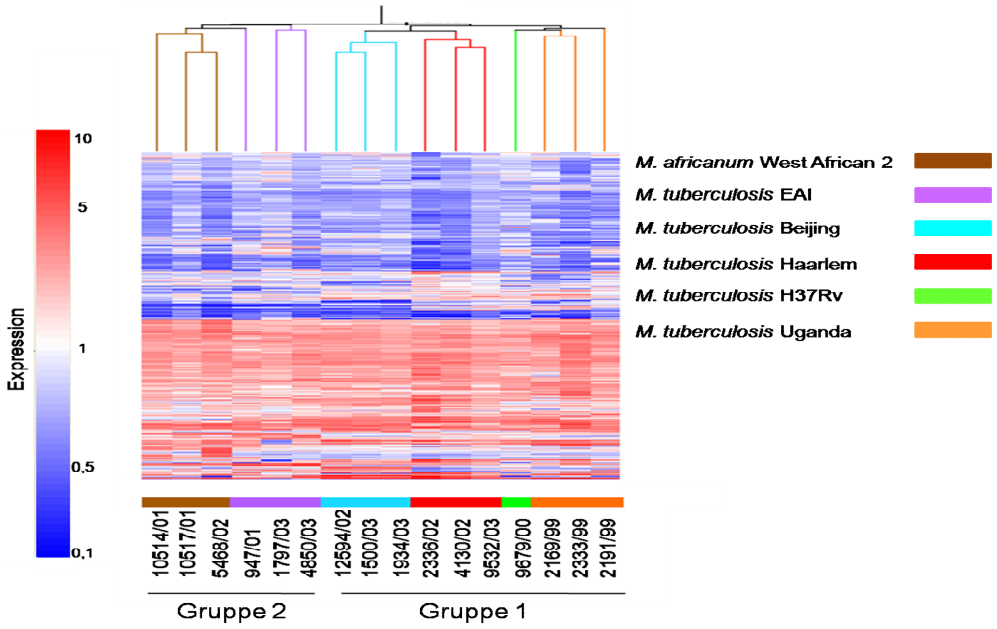


Abb. 4.13 Ähnlichkeitsstammbaum basierend auf Genexpressionsdaten aus drei unabhängigen Experimenten in Flüssigkulturmedium. Dargestellt sind alle Gene (1069), die mindestens 1,5 fach im Verhältnis zum CDC1551 Referenzstamm in einem von 16 reguliert und in 42 von 48 untersuchten Stämmen vorhanden waren. Die Einteilung in zwei Hauptgruppen und in die verschiedenen Genotypen ist deutlich zu erkennen. EAI: *East African Indian* Genotyp.

Mittels Varianzanalyse konnten 156 gruppenspezifische Gene identifiziert werden (Abb. 4.14). Bei dieser Analyse wurden alle Gene betrachtet, die signifikant (p<0,01) höher oder niedriger in klinischen Isolaten der Gruppe 1 im Vergleich zu Isolaten der Gruppe 2 exprimiert wurden.

Zum Beispiel zeigten alle Stämme der phylogenetischen Gruppe 1 eine höhere Expression des *narGHIJ* Operons (Rv1164 - 1166). Dieses Operon kodiert Gene für die Nitratreduktion, die dem Pathogen ermöglicht unter anaeroben Bedingungen Nitrat zur Energiegewinnung zu nutzen. Ein Beispiel für gruppenspezifische Genexpressionsmuster von Stämmen der phylogenetischen Gruppe 2 stellt der *mce4* Locus (Rv3494c - 3499c) dar. Gruppe 2 Stämme zeigten eine höhere Expression als Vertreter der Gruppe 1. Der *mce4* Locus kodiert für einen wichtigen Steroid - Transporter, der dem Bakterium ermöglicht, Cholesterin ins Innere zu transportieren.

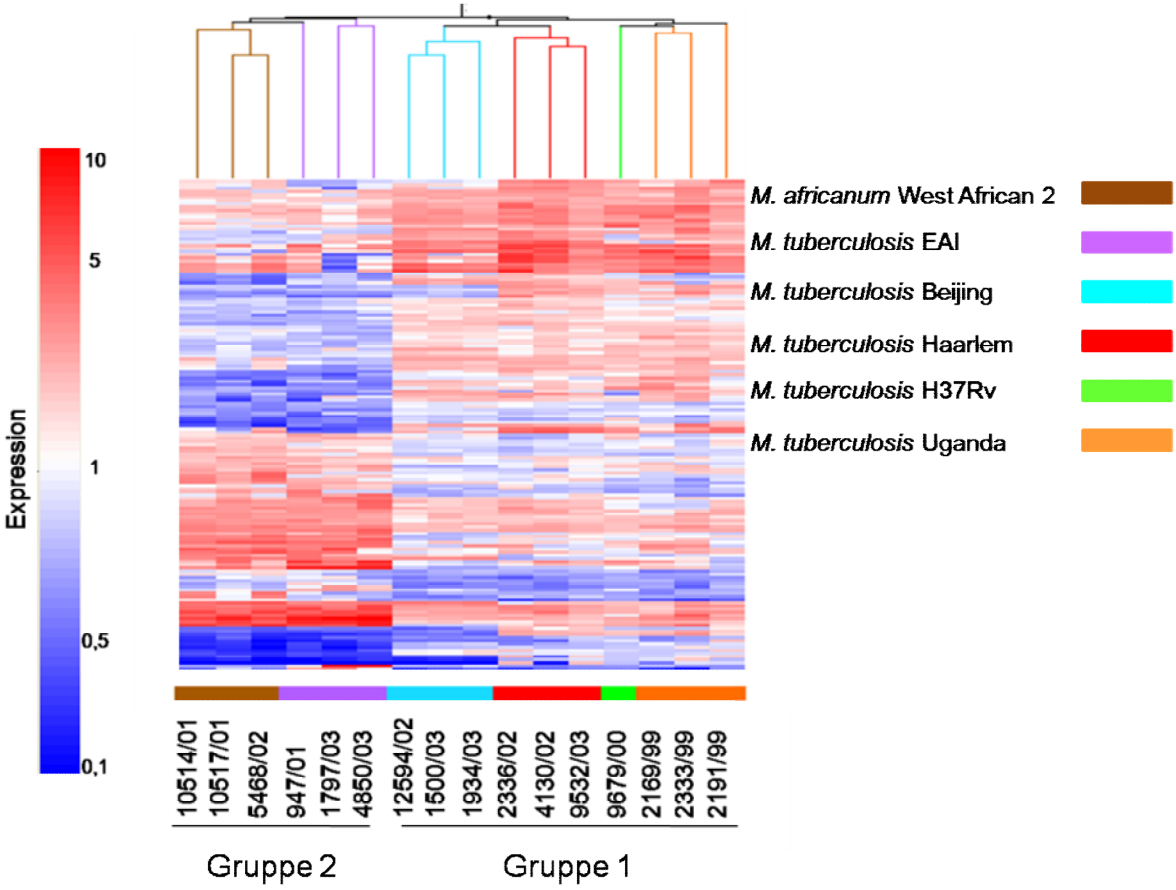


Abb. 4.14 Ähnlichkeitsstammbaum basierend auf 156, mittels ANOVA (*Benjamini and Hochberg false discovery rate*, p<0,01) identifizierten Genen, für die statistisch signifikante Genexpressionsunterschiede zwischen den phylogenetischen Gruppen 1 und 2 in Flüssigkulturmedium nachgewiesen werden konnten. Die Einteilung klinischer MTBK Isolate in zwei Hauptgruppen (Gruppe 1 und 2) wurde durch die Genexpressionsanalyse bestätigt. EAI: *East African Indian* Genotyp.

Außerdem ergab die Varianzanalyse basierend auf allen Genen, die in 42 von 48 Datenpunkten (16 Stämme, drei unabhängige Experimente) vorhanden waren, 364 Gene mit signifikanten ($p<0,01$), genotypspezifischen Expressionsunterschieden (Abb. 4.15). Beispielhaft konnte in *M. tuberculosis* EAI Stämmen eine erhöhte Expression im *virs - mymA* Operon (Rv3082c - Rv3089) nachgewiesen werden. Die erhöhte Expression des 2 - Komponenten Regulators *dosRS* (Rv3132c - Rv3133c) in allen Beijing Stämmen ist ein weiteres Beispiel genotypspezifischer Genexpression. Alle *M. tuberculosis* Haarlem Stämme zeigten ein signifikantes Genexpressionsmuster im Rv2619c - Rv2622 Operon. Die Funktion dieses Operons ist unbekannt.

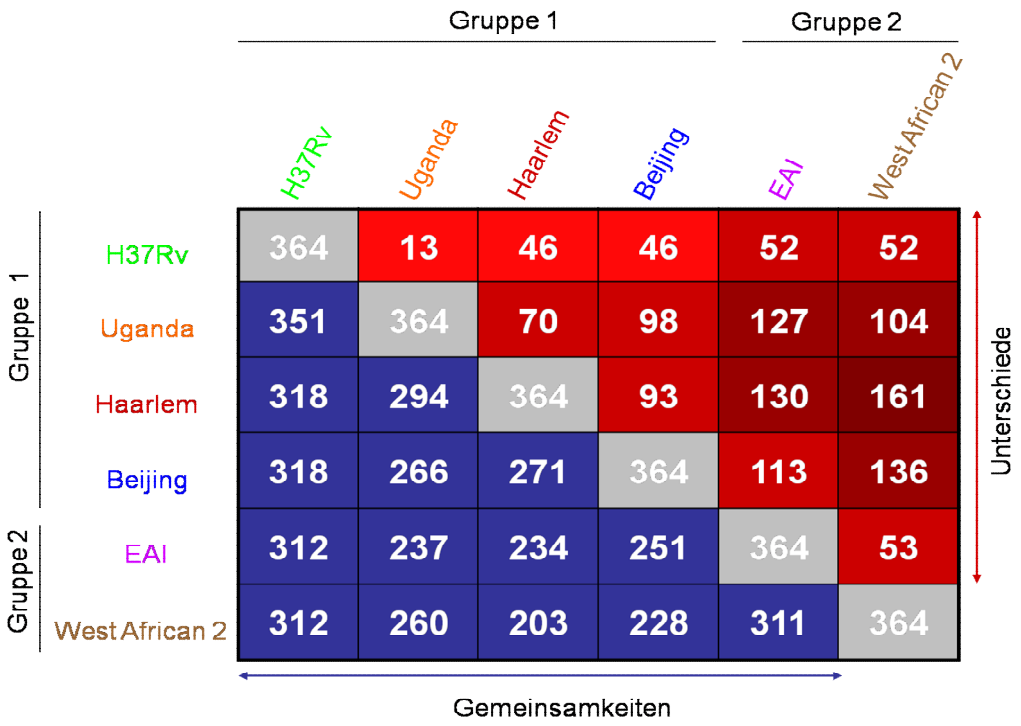


Abb. 4.15 Paarweiser Vergleich von Genen mit signifikanten genotypspezifischen Genexpressionsunterschieden. Die Genexpressionsdaten aller Stämme eines Genotyps aus drei unabhängigen Experimenten wurden zunächst zusammengefasst. In die Analyse wurden alle Gene eingeschlossen, die in 42 von 48 Datenpunkten (16 Stämme; drei unabhängige Experimente) nachgewiesen werden konnten. Die Varianzanalyse (*Benjamini and Hochberg false discovery rate*, $p<0,01$) ergab 364 Gene mit signifikanten Genexpressionsunterschieden. Die anschließende *Tukey post hoc test* Analyse der ANOVA Ergebnisse definierte eine Matrix (Tukey - Matrix), die den direkten Vergleich von Genexpressionsunterschieden zwischen zwei Genotypen erlaubte. Rot unterlegt ist die Anzahl der Gene, die zwischen den einzelnen Genotypen unterschiedlich exprimiert werden. Blau hinterlegte Werte definieren die Anzahl der Gene mit gleicher Genexpression zwischen zwei Genotypen. EAI: *East African Indian* Genotyp.

Neben genotypspezifischen Genexpressionsunterschieden konnten auch gemeinsame Genexpressionsmuster zum Beispiel bei Stämmen zweier Genotypen identifiziert werden. Alle *M. tuberculosis* Haarlem und Beijing Stämme zeigten beispielhaft eine erhöhte Expression des *moa* Operons (Rv3322c - 3324c). Außerdem konnte ein gemeinsames Genexpressionsmuster in Haarlem und Uganda Stämmen sowie im H37Rv Referenzstamm nachgewiesen werden. So zeigten diese klinischen Isolate im Vergleich zu *M. tuberculosis* Beijing, EAI oder *M. africanum* Stämmen eine erhöhte Expression des Rv3612c - 3616c Operons (Abb. 4.16 (A)).

Eine weitere Varianzanalyse identifizierte 195 Gene, die statistisch signifikante Genexpressionsunterschiede (p<0,01) in einzelnen Stämmen aufwiesen. Zum Beispiel zeigte ein *M. africanum* West African 2 Stamm (10514/01) eine erhöhte Expression des *fabG1 - inhA - hemZ* Operons (Abb. 4.16 (B)). Vergleicht man diese Daten mit den Sequenzierungsergebnissen des *fabG1 - inhA* Gens (Rv1483, siehe 4.1.6) konnte für diesen Stamm ein C zu T Austausch an der Position -15 im Promotorbereich des *fabG1 - inhA* Gens detektiert werden. Weitere Beispiele für Genexpressionsvarianten in einzelnen Stämmen sind die Rv3612c - 3616c (Abb. 4.16 (A)) und IS*6110* regulierten Gene (Abb. 4.16 (C)), die eine geringere Expression in einem der *M. tuberculosis* EAI (1797/03) Stämme zeigten.

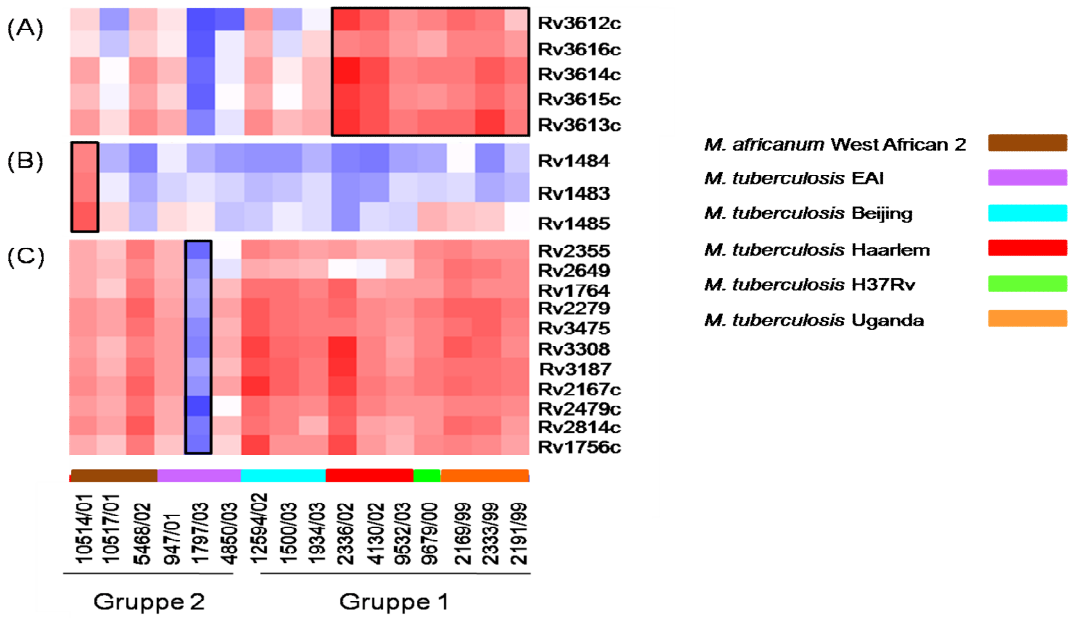


Abb. 4.16 Genotyp - und stammspezifische Genexpressionsmuster. (A) *M. tuberculosis* Haarlem und Uganda Stämme sowie der H37Rv Referenzstamm weisen eine ähnlich hohe Genexpression im Rv3612c - 3616c Operon auf. (B) Überexpression des *fabG1 - inhA - hemZ* Operon in einem *M. africanum* West African 2 Stamm (10514/01). (C) erniedrigte Expression von Genen in einem *M. tuberculosis* EAI Stamm (1797/03). Rot: erhöhte Genexpression; Blau: erniedrigte Genexpression; EAI: *East African Indian* Genotyp.

4.2.2 Wachstums - und Transkriptionsanalysen in murinen Makrophagen - *in vivo*

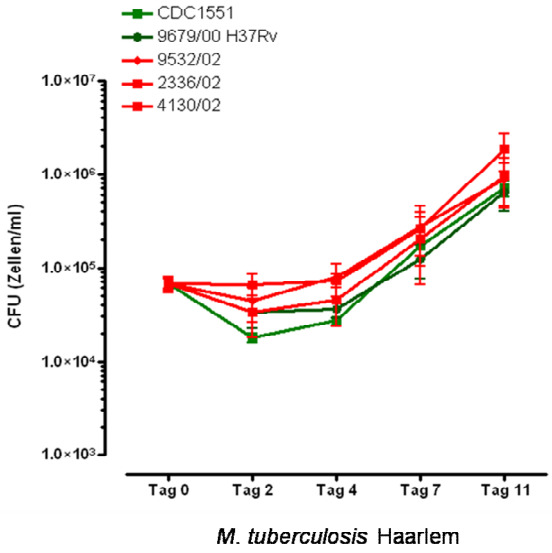
Die unter 4.2.1 beschriebene Transkriptionsanalyse unterschiedlicher, in Flüssigmedium kultivierter, klinischer Isolate zeigte gruppen - und genotypspezifische Genexpressionsmuster aber auch Genexpressionsunterschiede bei einzelnen Stämmen. Bei den Experimenten in Flüssigkulturmedium handelt es sich allerdings um ein sehr artifizielles System, das die eigentliche Infektionssituation nicht widerspiegelt. Um sich dieser zu nähern, wurden intrazelluläre Wachstums - und Transkriptionsanalysen von den ausgewählten Stämmen der Referenzkollektion in ruhenden und in aktivierten, murinen Makrophagen im Vergleich zu den Referenzstämmen H37Rv und CDC1551 durchgeführt.

Im Gegensatz zu den Wuchskurven im Flüssigkulturmedium wiesen die Stämme deutliche Unterschiede in ihrer Fähigkeit auf, in Makrophagen zu wachsen. Erstaunlicherweise traten diese Unterschiede im Besonderen in Abhängigkeit des Aktivierungzustandes der Makrophagen auf (Abb. 4.17 und Abb. 4.18).

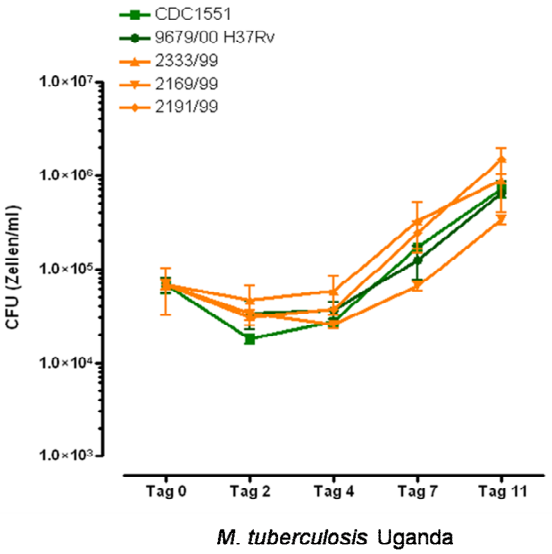
In nicht aktivierten Makrophagen zeigten alle zur Gruppe 1 gehörenden Stämme ein ähnliches Wachstumsprofil wie die Referenzstämme H37Rv und CDC1551. Im Gegensatz dazu war bei *M. africanum* West African 2 und in zwei der *M. tuberculosis* EAI Stämme ein deutlich schlechteres Wachstum zu erkennen (Abb. 4.17). Am Tag 11 wiesen *M. africanum* West African 2 und *M. tuberculosis* EAI Stämme geringere koloniebildende Einheiten auf als *M. tuberculosis* Stämme der phylogenetischen Gruppe 1.

Die gruppen - und genotypspezifischen Wachstumsunterschiede wurden in aktivierten Makrophagen noch deutlicher (Abb. 4.18). Vergleicht man die beiden Referenzstämme H37Rv und CDC1551 untereinander, zeigte der CDC1551 Stamm ein deutlich verringertes Wachstum. *M. tuberculosis* Haarlem Stämme wiesen ein ähnliches Wachstumsprofil wie der H37Rv Referenzstamm auf, wuchs also deutlich besser als CDC1551. Die Wuchskurven für *M. tuberculosis* Beijing sowie zwei der Uganda Stämme zeigten ein besseres Wachstum als CDC1551, jedoch ein geringeres Wachstum als H37Rv.

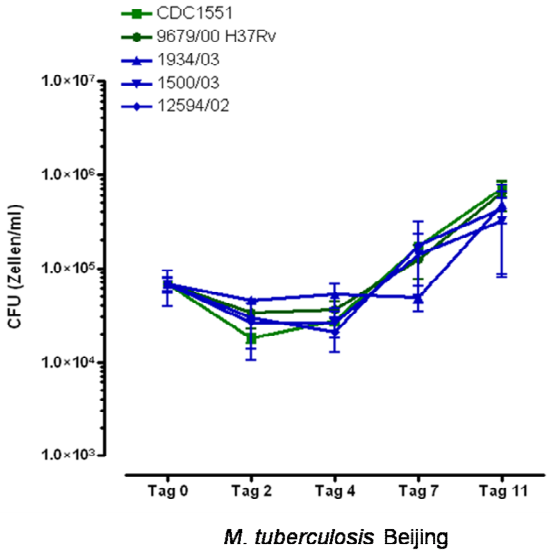
Für alle Stämme der phylogenetischen Gruppe 2 waren deutliche Wachstumdefizite im Vergleich zu Gruppe 1 Stämmen in aktivierten Makrophagen nachweisbar. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in ruhenden Makrophagen war ab Tag 7 ein deutlicher Wachstumsanstieg zu erkennen. Die CFU Werte am Tag 11 entsprachen denen des CDC1551 Referenzstamms. Ein besonderes Wachstumsprofil zeigte ein *M. tuberculosis* Uganda Stamm (2169/99). Hier konnte ein starker Abfall der Lebendkeimzahl bis zum Tag 7 verzeichnet werden.



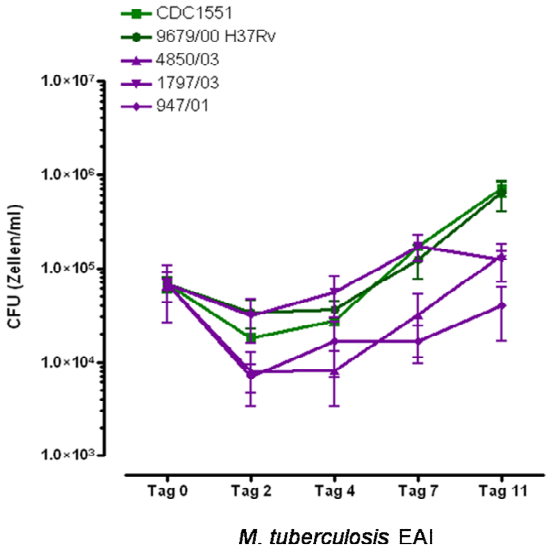
M. tuberculosis Haarlem



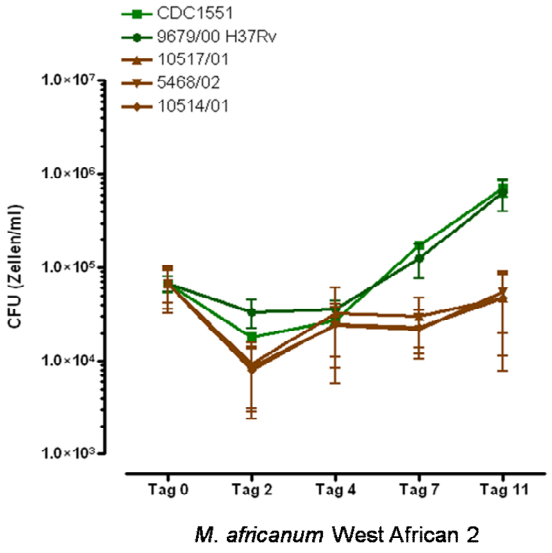
M. tuberculosis Uganda



M. tuberculosis Beijing

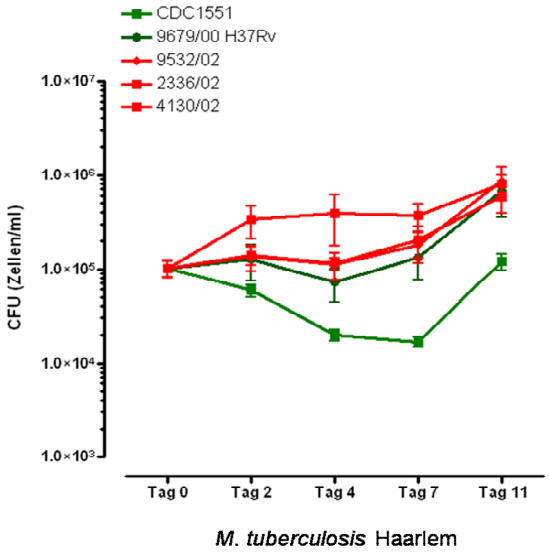


M. tuberculosis EAI

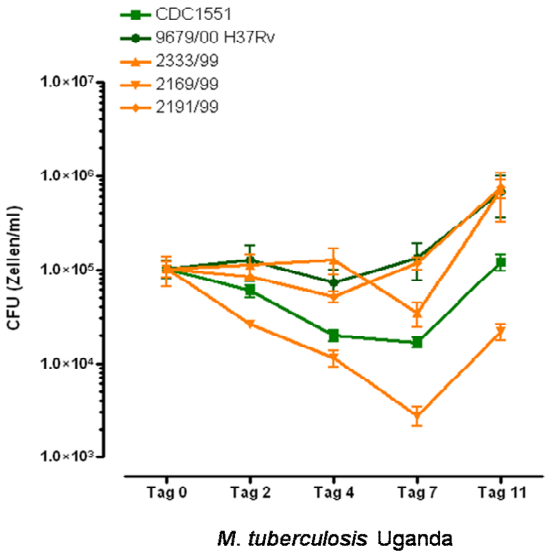


M. africanum West African 2

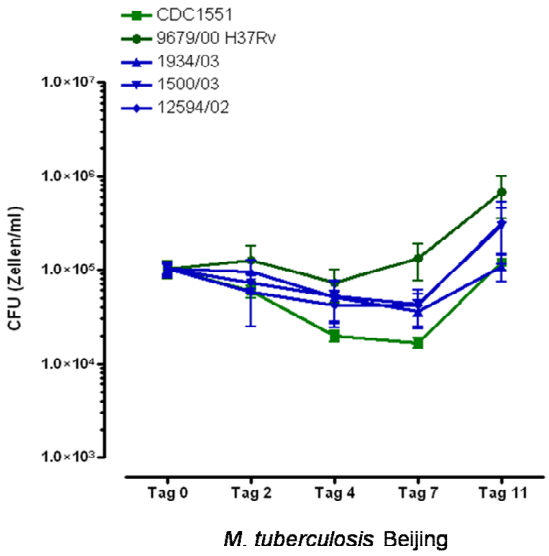
Abb. 4.17 Wuchskurven klinischer Isolate in nicht aktivierten, murinen Makrophagen. Über einen Zeitraum von 11 Tagen wurde das Wachstumsprofil über die Koloniebildenen Einheiten (CFU) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler von zwei unabhängigen Experimenten.
M. tuberculosis EAI und *M. africanum* West African 2 Stämme zeigten ein schlechteres Wachstum als die grün dargestellten Referenzstämme H37Rv und CDC1551. EAI: *East African Indian* Genotyp.



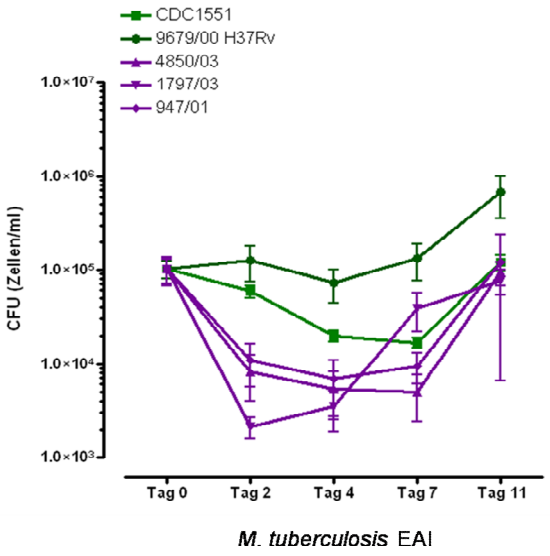
M. tuberculosis Haarlem



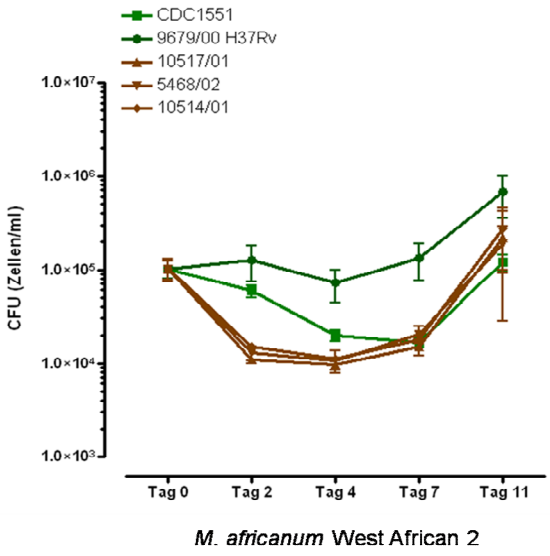
M. tuberculosis Uganda



M. tuberculosis Beijing



M. tuberculosis EAI



M. africanum West African 2

Abb. 4.18 Wuchskurven klinischer Isolate in aktivierten, murinen Makrophagen. Über einen Zeitraum von 11 Tagen wurde das Wachstumsprofil über die Koloniebildenen Einheiten (CFU) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler von zwei unabhängigen Experimenten. Für alle Stämme der phylogenetischen Gruppe 2 (*M. tuberculosis* EAI und *M. africanum* West African 2) waren deutliche Wachstumsdefizite im Vergleich zu Gruppe 1 Stämmen nachzuweisen. EAI: *East African Indian* Genotyp.

Wie die Wachstumsanalysen zeigten, weisen klinische Isolate bei der Adaption an die intraphagosomale Umgebung zu späteren Zeitpunkten eine große Variabilität auf. Daher wurden die nachfolgenden Genexpressionsstudien 24 h nach Infektion von ruhenden und aktivierten Makrophagen durchgeführt. Bei der Analyse wurde im Gegensatz zu den Transkriptionsanalysen in Flüssigkulturmedium die intrazelluläre Genexpressionsantwort eines Stammes auf sein extrazelluläres Genexpressionsprofil und nicht auf CDC1551 normalisiert. Die nachfolgenden Ergebnisse resultieren aus der Analyse von jeweils zwei unabhängigen Experimenten pro Stamm.

In einem ersten Schritt sollte die zentrale Frage nach einem so genannten universellen oder auch *Core* Transkriptom beantwortet werden. Dabei handelt es sich um Gene, die unabhängig vom Aktivierungsstatus der Makrophagen in allen Stämmen reguliert sind. Die Analyse aller Gene, die mindestens 1,5 fach in 8 von 17 und mindestens 1,2 fach in 15 von 17 Stämmen unabhängig vom Aktivierungstatus der Makrophagen reguliert waren, ergab 280 Gene mit signifikanten Genexpressionsunterschieden. Von den 280 Genen zeigten beim intrazellulären versus extrazellulären Vergleich 168 Gene eine erhöhte und 112 Gene eine erniedrigte Expression (Abb. 4.19). Darüber hinaus wurden 99 Gene nachgewiesen, die nur in ruhenden Makrophagen (57 ↑, 42 ↓) reguliert waren (Abb. 4.19). Zusätzlich traten in aktivierten Makrophagen 271 Gene (119 ↑, 152 ↓) mit statistisch signifikanten Genexpressionsunterschieden auf (Abb. 4.19).

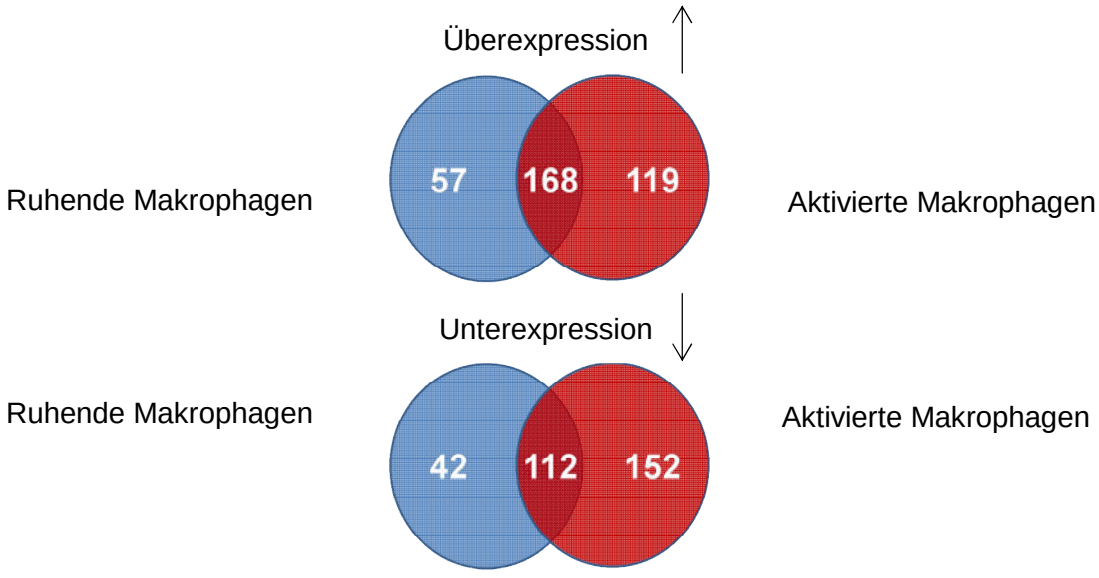


Abb. 4.19 Venn Diagramm basierend auf allen Genen (650), die 1,5 fach in 8 von 17 und mindestens 1,2 fach in 15 von 17 Stämmen in ruhenden und/oder in aktivierten Makrophagen reguliert sind. Die gemeinsamen Schnittmengen geben die Anzahl der vom Aktivierungsstatus unabhängigen Gene an. Die insgesamt 280 Gene definieren das so genannte universelle oder *Core* Transkriptom.

Viele der im Phagosom universell regulierten Gene mit erhöhter Expression spielen u.a. eine wichtige Rolle bei Hypoxie, bei der oxidativen Stressantwort sowie beim Zellwandumbau und im Fettsäuremetabolismus, was auf eine stressinduzierende, intraphagosomale Umgebung schließen lässt (Abb. 4.20 (A)). Es konnten zum Beispiel neun *fad* Gene nachgewiesen werden (Rv0244c, Rv1185c, Rv2590, Rv2930, Rv3061c, Rv3139, Rv3504, Rv3544c, Rv3546), die alle verschiedene Funktionen im Fettsäurestoffwechsel ausüben. Unter den 112 Genen mit erniedrigter Genexpression befanden sich Gene, die an der Modulation der Zellwand (Rv2244 - 2246) oder am Cholesterintransport (Rv0169) beteiligt sind (Abb. 4.20 (B)). Für ca. 40 % der universell regulierten Genen (114 von 280) sind die Funktionen noch unbekannt.

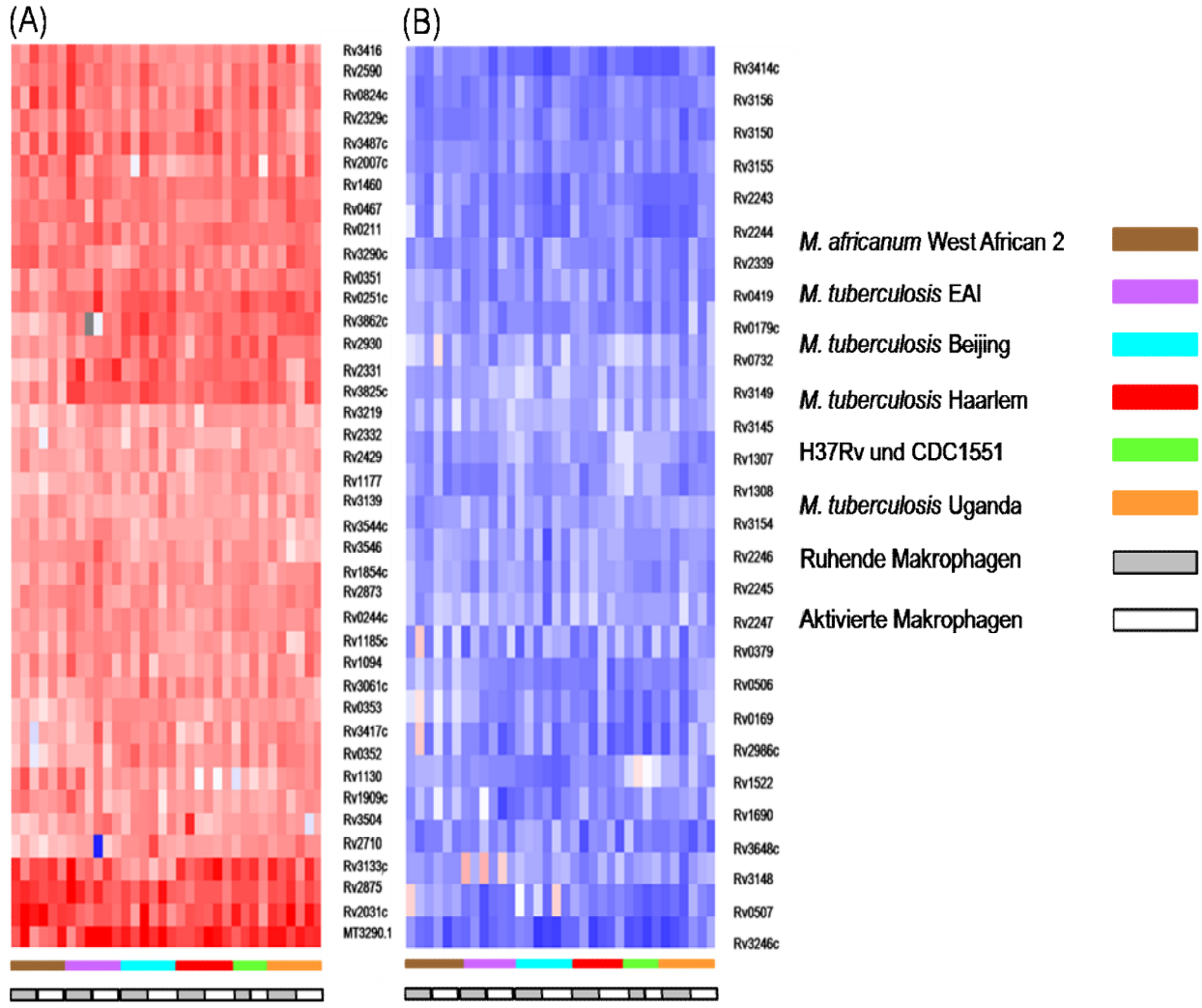


Abb. 4.20 Beispiele von universellen, vom Aktivierungsstatus der Makrophagen unabhängigen, 1,5 fach in 8 von 15 und mindestens 1,2 fach in 15 von 17 Stämmen regulierten Genen. (A) Gene mit Überexpression. (B) Gene mit erniedrigter Expression.

Im nächsten Schritt wurde die intrazelluläre Genexpressionsantwort klinischer Isolate in Abhängigkeit des Aktivierungsstatus der Makrophagen genauer untersucht. Unter Anwendung einfaktorieller ANOVA (*Benjamini and Hochberg false discovery rate,* p<0,01) konnten 719 Gene (18 % aller Gene) mit signifikanten Genexpressionsunterschieden in Abhängigkeit des Aktivierungsstatus identifiziert werden (Abb. 4.21).

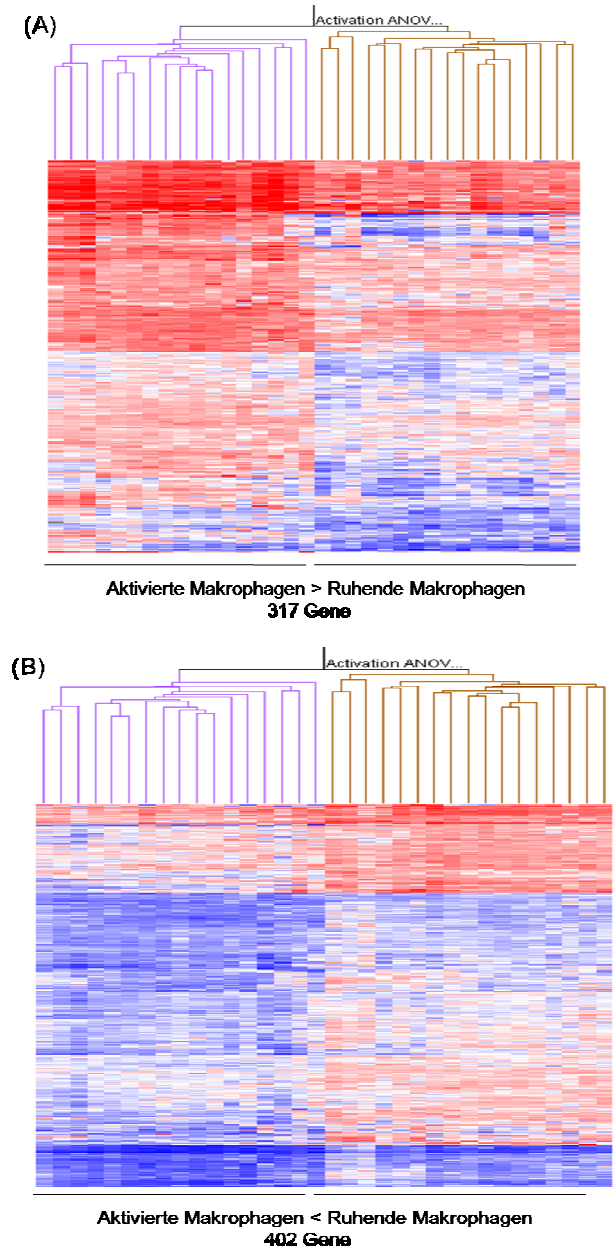


Abb. 4.21 Ähnlichkeitsstammbäume basierend auf allen Genen, die in Abhängigkeit des Aktivierungsstatus der Makrophagen universell exprimiert werden. ANOVA (*Benjamini and Hochberg false discovery rate*, p<0,01) identifizierte 719 Gene mit signifikanten Genexpressionsunterschieden. (A) 317 Gene zeigten eine erhöhte Expression in aktivierten Makrophagen. (B) 402 Gene waren in ruhenden Makrophagen höher exprimiert. Rot: erhöhte Genexpression; Blau: erniedrigte Genexpression.

Insgesamt waren 317 Gene in aktivierten Makrophagen höher induziert als in nicht aktivierten (Abb. 4.22). Als bekannte Beispiele sind das *dosRS* (Rv3132c - 3133c) Regulon oder das Mycobactin Operon (Rv2377c - 2386c) zu nennen. Weitere Beispiele für eine erhöhte Expression in aktivierten Makrophagen schließen Transkriptionsregulatoren (z.B Rv3416) und Antigene (Rv0287 - 0288) ein. Von 109 der 317 (34 %) in aktivierten Makrophagen induzierten Genen ist die Funktion unbekannt.

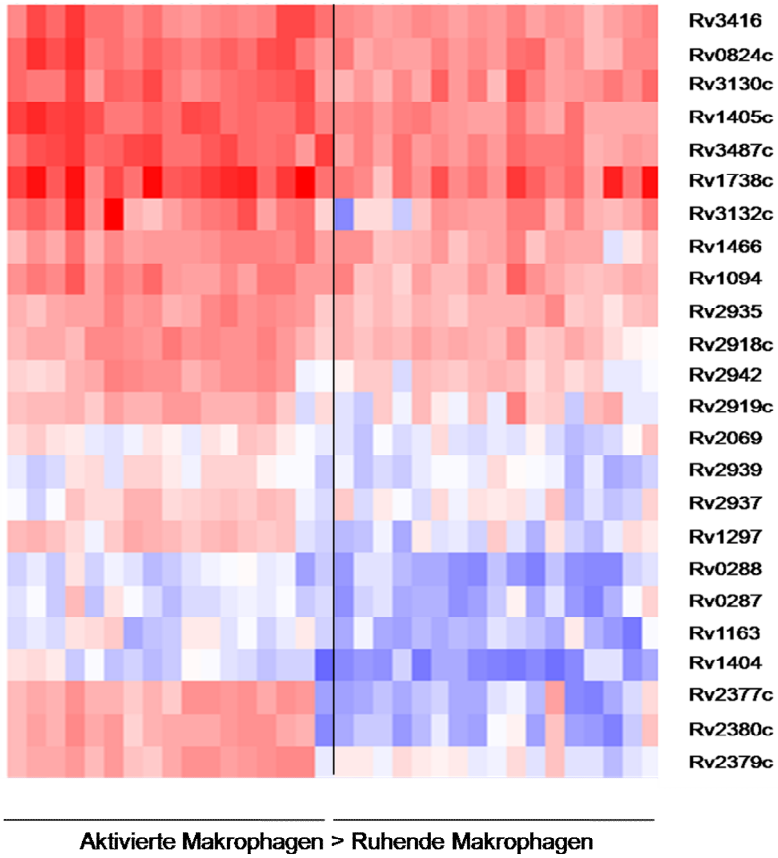


Abb. 4.22 Auswahl von Genen, die in aktivierten Makrophagen höher exprimiert waren als in ruhenden Makrophagen. Rot: erhöhte Genexpression; Blau: erniedrigte Genexpression.

In ruhenden Makrophagen konnten 402 Gene mit erhöhter Expression im Vergleich zu nicht aktivierten Makrophagen identifiziert werden (Abb. 4.23). Zum Beispiel impliziert eine höhere Induktion von *rpl* (Rv0056, Rv0652, Rv0716, Rv0720) und *rps* Genen (Rv0055, Rv0683, Rv0700), die für ribosomale Proteine kodieren, eine erhöhte Proteinbiosynthese und damit besseres Wachstum in ruhenden Makrophagen. Ein weiteres Beispiel ist die erhöhte Expression von Eisenspeicherungsgenen (Rv1876, Rv3841). Auch Gene wie *grpE, groEL1, groEL2,* und *groES* (Rv0351, Rv0440, Rv3417c, Rv3418c) werden in ruhenden Makrophagen höher exprimiert als in aktivierten Makrophagen. Zusätzliche Beispiele befinden sich in Abbildung 4.23.

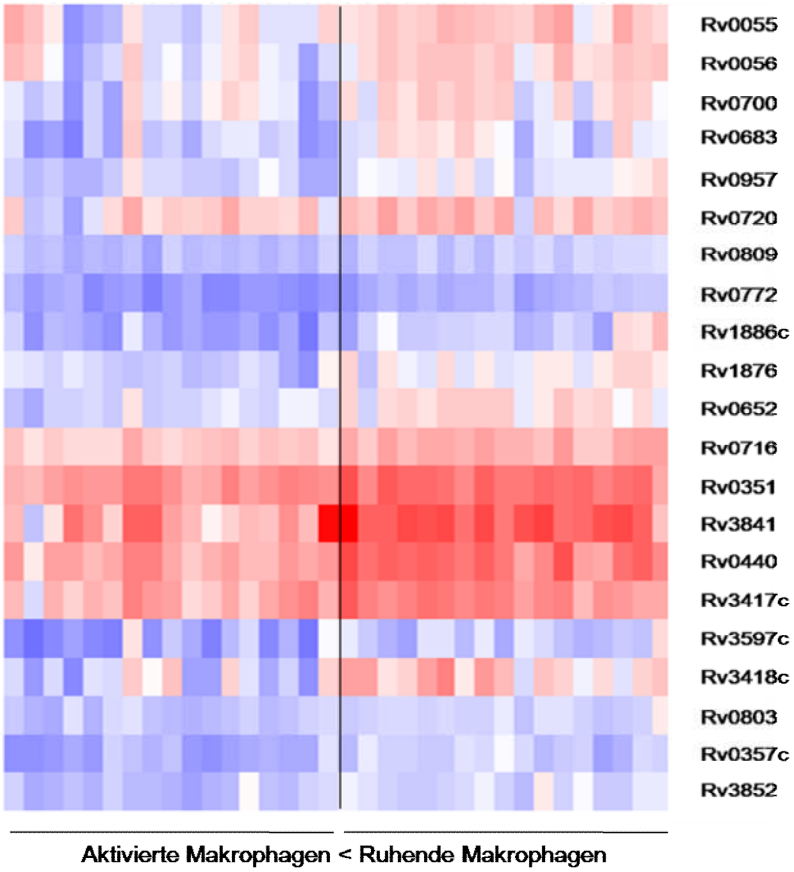


Abb. 4.23 Auswahl von Genen, die in ruhenden Makrophagen höher exprimiert waren als in aktivierten Makrophagen. Rot: erhöhte Genexpression; Blau: erniedrigte Genexpression.

Neben der hier beschriebenen, universellen und aktivierungsabhängigen Genexpressionsantwort unterschiedlicher klinischer Isolate zeigten sich bei den Infektionsexperimenten Genexpressionsprofile, die die phylogenetische Verwandschaft der Stämme widerspiegelt. So konnten gruppen - und genotypspezifische Genexpressionssignaturen nachgewiesen werden. Zum Beispiel zeigten alle *M. tuberculosis* EAI und *M. africanum* West African 2 Stämme eine erniedrigte Expression von ribosomalen Genen. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen der intrazellulären Wachstumsanalyse, bei der Isolate der phylogenetischen Gruppe 2 innerhalb der ersten 48 Stunden eine starke Reduzierung in der Lebendkeimzahl demonstrierten. Außerdem wiesen Stämme desselben Genotyps eine höhere Ähnlichkeit im Genexpressionsmuster auf als Stämme unterschiedlicher Genotypen (Abb. 4.24).

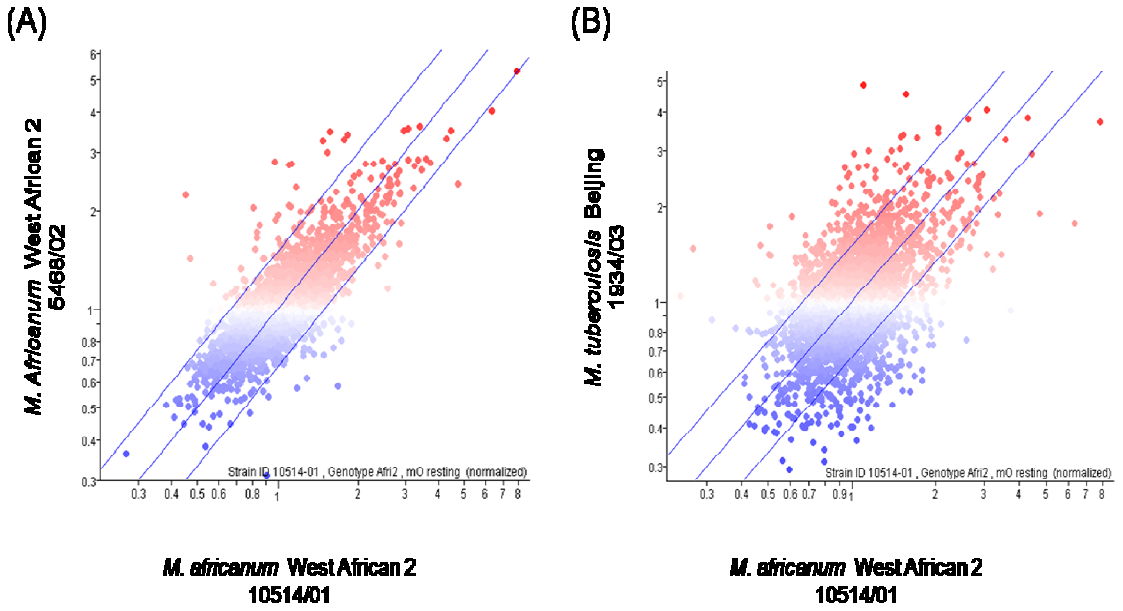


Abb. 4.24 Vergleichende Darstellung (*Scatter Plot*) von Genexpressionsprofilen zweier Stämme. (A) desselben Genotyps und (B) unterschiedlicher Genotypen. Die Streuung der Datenpunkte in Abbildung B ist größer als in Abbildung A. Stämme desselben Genotyps sind einander ähnlicher als Stämme unterschiedlicher Genotypen.

Die Varianzanalyse (*Benjamini and Hochberg false discovery rate,* p<0,01) ergab beim paarweisen Vergleich von Genotypen 625 Gene mit signifikanten, genotypspezifischen Genexpressionsunterschieden in ruhenden und in aktivierten Makrophagen (Abb. 4.25). Zum Beispiel zeigten alle *M. africanum* West African 2 Stämme eine erniedrigte Expression des Phthiolcerol - Dimycocerat Locus (PDIM), der an der Synthese von PDIM, einem komplexen mykobakteriellen Zellwandlipid und Virulenzfaktor, beteiligt ist.

Zusätzlich konnten mittels Varianzanalyse 293 Gene in einzelnen Stämmen mit signifikanten Genexpressionssignaturen (*Benjamini and Hochberg false discovery rate,* p<0,01) in aktivierten und ruhenden Makrophagen nachgewiesen werden. Zum Beispiel zeigte ein *M. africanum* West African 2 Stamm (10517/01) eine Dysregulation von Hitzeschockproteinen (Rv0350 - 0353, Rv0384c, Rv2710, Rv3223c).

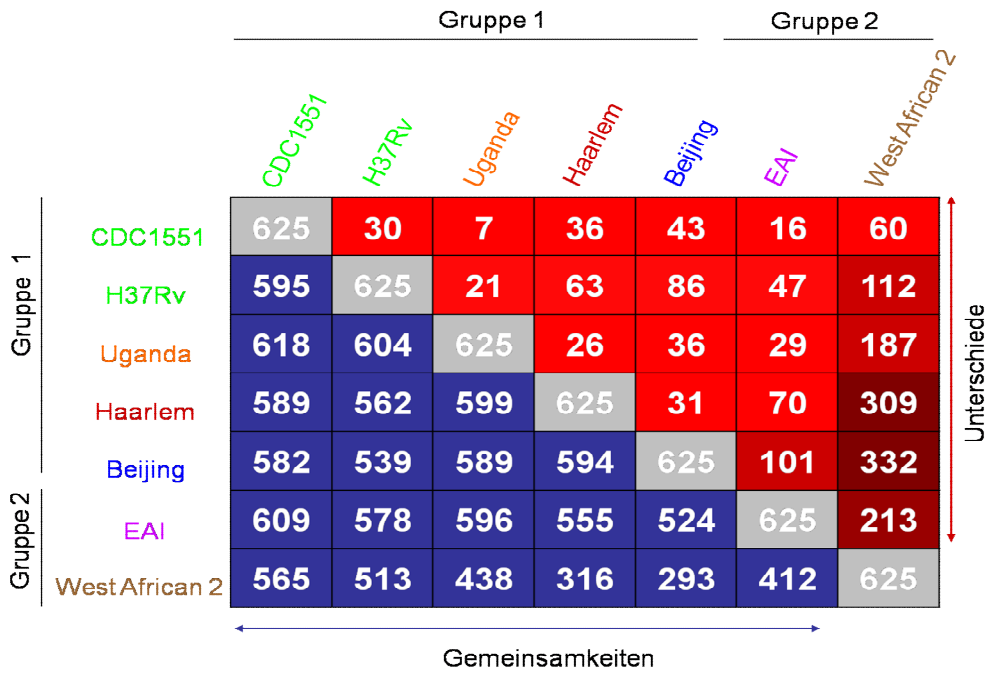


Abb. 4.25 Paarweiser Vergleich von Genen mit signifikanten, genotypspezifischen Genexpressionsunterschieden. Die Genexpressionsdaten aller Stämme eines Genotyps aus vier unabhängigen Experimenten (2x ruhende, 2x aktivierte Makrophagen) wurden zunächst zusammengefasst. In die Analyse wurden alle Gene eingeschlossen, die in 50 von 68 Datenpunkten (17 Stämme; vier unabhängige Experimente) nachgewiesen werden konnten. Die Varianzanalyse (*Benjamini and Hochberg false discovery rate*, $p<0,01$) ergab 625 Gene mit signifikanten Genexpressionsunterschieden. Die anschließende *Tukey post hoc test* Analyse der ANOVA Ergebnisse definierte eine Matrix (Tukey - Matrix), die den direkten Vergleich von Genexpressionsunterschieden zwischen zwei Genotypen erlaubte. Rot unterlegt ist die Anzahl der Gene, die zwischen den einzelnen Genotypen unterschiedlich exprimiert werden. Blau hinterlegte Werte definieren die Anzahl der Gene mit gleicher Genexpression zwischen zwei Genotypen. EAI: *East African Indian* Genotyp.

Insgesamt zeigten die Analysen zur biologischen Diversität klinischer Isolate im murinen Makrophagenmodellsystem eine Vielzahl von gruppen - und genotypspezifischen Unterschieden, die die auf genetische Variationen basierende, phylogenetische Einteilung von Stämmen des MTBKs bestätigt. Es konnte nicht nur ein unterschiedliches Wachstumsverhalten klinischer Isolate nachgewiesen werden, sondern auch spezifische Genexpressionsprofile. Die in dieser Arbeit untersuchten phänotypischen Eigenschaften, Wuchsverhalten und Genexpression, stehen in Abhängigkeit zum Aktivierungsstatus der Wirtszelle. Umso bedeutender ist die gleichzeitige Identifizierung einer universellen Transkriptionsantwort klinischer Isolate in der intrazellulären Umgebung. Umfangreiche Analysen sind zurzeit noch in Bearbeitung.

4.3 Analyse des immunmodulatorischen Potentials von *M. tuberculosis* Komplex Stämmen

In einem weiteren Schritt dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die gefundene Diversität der Stämme auf Genom und Transkriptomebene auch Bedeutung für das immunmodulatorische Potential nach Infektion der Wirtszelle hat. Um diese Frage zu analysieren, sollte zunächst das TNFα induzierende Potential von 48 klinischen Isolaten sowie von den ATCC Referenzstämmen H37Rv, *M. africanum* und *M. bovis* in THP1 - Zellen mittels ELISA 4 h nach Infektion gemessen werden.

Für die standardisierte Durchführung dieser Versuche musste ein Anzuchtsverfahren zur Herstellung von Gefrierstocklösungen mit definierten Zellzahlen etabliert werden. Besonders schwierig erwies sich hierbei die Anzucht der klinischen Isolate in dem benötigten Volumen von 100 ml (siehe 3.2.1.1). Nach ausgiebigen Vorversuchen erfolgte die Kultivierung über zwei Schritte. Zunächst wurden Vorkulturen angelegt, die stehend inkubiert wurden. Aus Sicherheitsgründen wurden keine Zellkulturflaschen mit Filter verwendet, was eine kontinuierliche Sauerstoffzufuhr auschloss. Daher war es von großer Bedeutung, das Medium - Sauerstoff Volumenverhältnis von 1 zu 3 nicht zu überschreiten. Ein weiterer wichtiger Punkt war die Herstellung einer komplett homogenen Zellsuspension. Kleinste, sichtbare Verklumpungen in der initialen Vorkultur führten zur verstärkten Ausprägung von Verklumpungen in der Hauptkultur und damit zum Wachstumsstillstand.

Die Hauptkulturen wurden in Rollflaschen angelegt, die ebenfalls aus Sicherheitsgründen keinen Verschluss mit Filter besaßen. Daher war es auch hier von großer Bedeutung, das Medium - Sauerstoff Volumenverhältnis von 1 zu 3 nicht zu überschreiten. Außerdem mussten die Vorkulturen in mindestens 20 ml Ausgangsmedium überführt werden, da sonst die Oberfläche der Rollflaschen im rollenden Zustand nicht vollständig bedeckt war und somit sich einzelne Kolonien an der Rollflascheninnenseite bildeten. Ein weiterer entscheidener Punkt war die kontinuierliche Mediumzufuhr. Mediumüberschuss führte zum Wachstumsstillstand. Bei Zugabe von zu wenig Medium bestand ein erhöhtes Risiko von Verklumpungen.

Von den Bakterienkulturen, die eine OD von 0,2 - 0,4 aufwiesen, wurden 1 ml Gefrierstocklösungen hergestellt. Das Ernten der Bakterienzellen bei einer geringen OD ergab sich aus den Ergebnissen initialer Wachstumskurven (Daten nicht gezeigt), die zeigten, dass im Rollflaschensystem die stationären Wachstumsphasen für klinische Isolate bereits bei einer OD von 0,6 - 0,8 (ELISA Reader Sunrise) erreicht wurden. Für die Infektionsversuche wurden Stämme in der logarithmischen Wachstumsphase verwendet.

Zusätzlich zu dem beschriebenen Kultivierungsverfahren wurde eine Vielzahl von Maßnahmen zur Qualitätskontrolle, die im Zuge der Methodenetablierung erarbeitet und unter 3.2.1.1 ausführlich erklärt sind, durchgeführt.
Von großer Bedeutung war dabei der Sterilitätsnachweis über die Ziehl - Neelsen Färbung. Abbildung 4.26 zeigt einen Kontaminationssnachweis im Vergleich zu einem mikroskopisch sauberen Präparat. Die Kontamination zeigte sich in keiner der anderen Sterilitätskontrollen Zum Beispiel konnten keine Bakterienkolonien auf Blutagarplatten nachgewiesen werden. Auch eine Trübung des LB - Mediums war nach Beimpfung mit der kontaminierten Bakterienkultur nicht zu erkennen. Dieses Beispiel zeigte, dass bei der Kultivierung von klinischen MTBK Stämmen die Durchführung einer Vielzahl von Sterilitätskontrollen (siehe 3.2.1.1) zwingend erforderlich ist.

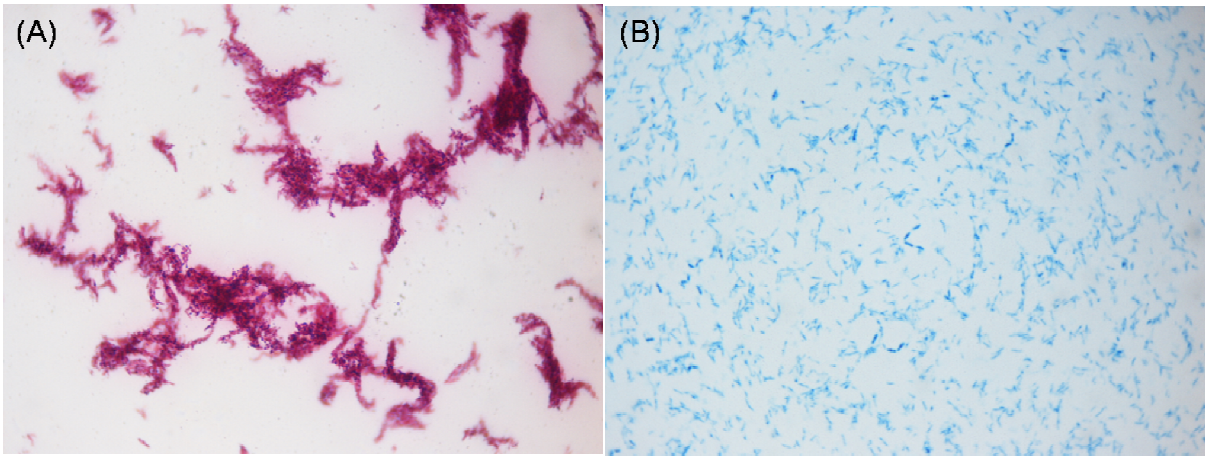


Abb. 4.26 Ziehl - Neelsen Präparate. (A) Die mikroskopische Aufnahme zeigt Mykobakterien als rote, säurefeste Stäbchen. (B) In der Mikroskopie waren keine säurefesten Stäbchen nachweisbar. Nicht mykobakterielle Keime wurden durch Methylenblau blau gefärbt.

Trotz erheblicher initialer Probleme mit der Anzucht wie der unterschiedlichen Ausprägung von Verklumpungen bei klinischen Isolaten in Flüssigkulturmedium, ist es gelungen fast alle Stämme der Referenzkollektion (Anhang A) mit Ausnahme von *M. microti* Stämmen standardisiert im großen Volumen zu kultivieren.
Die Infektion von THP1 - Zellen und die anschließende Bestimmung der TNFα - Konzentrationen wurde insgesamt in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Eine erste Analyse der TNFα - Konzentrationen ergab gruppenspezifische Unterschiede in der Induktion von TNFα. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.27 zusammengefasst. Stämme der phylogenetischen Gruppe 1 führten durchschnittlich zu höheren TNFα - Konzentrationen als Stämme der Gruppe 2. *M. canettii* Stämme wurden aus der Analyse ausgeschlossen, da diese im THP1 - Zellkulturmedium replizierten.

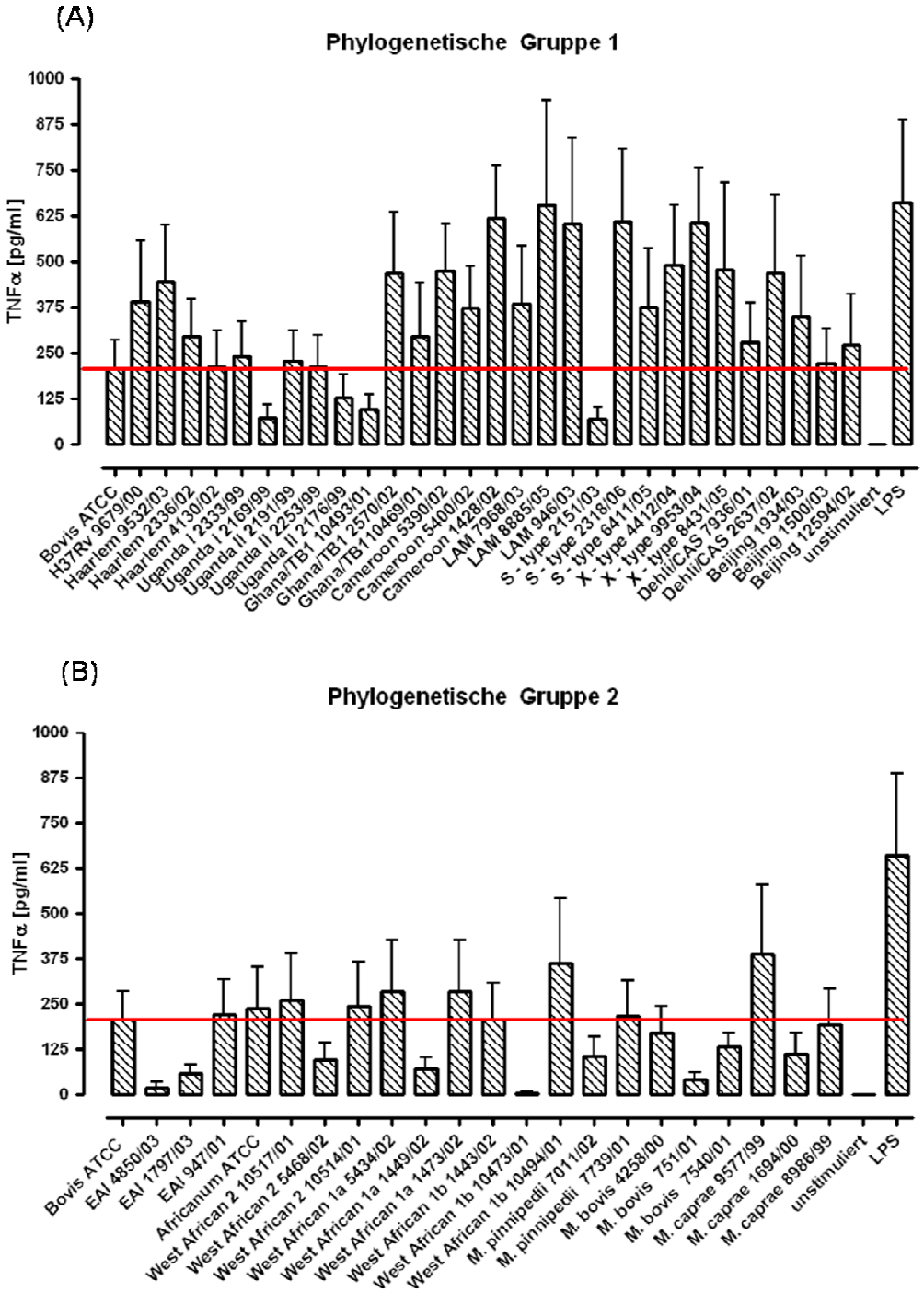


Abb. 4.27 MTBK Stämme induzieren eine unterschiedliche TNFα Antwort in THP1 - Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. Die TNFα - Konzentrationen vom Referenzstamm *M. bovis* ATCC sowie die Werte der unstimulierten und LPS Kontrolle sind in beiden Abbildungen aufgetragen. (A) Stämme der phylogenetischen Gruppe 1. (B) Stämme der phylogenetischen Gruppe 2. CAS: *Central Asian* Genotyp; EAI: *East African Indian* Genotyp; LAM: *Latin - American - Mediterranean* Genotyp; LPS: Lipopolysaccharid.

Die gruppen - aber auch genotypspezifischen Unterschiede wurden noch deutlicher durch die Normalisierung der TNFα - Konzentrationen auf die des *M. bovis* ATCC Stamms (9564/00) (Abb. 4.28). Alle tierpathogenen Erreger sowie *M. africanum* und *M. tuberculosis* EAI Isolate induzierten weniger TNFα in THP1 - Zellen als Stämme der phylogenetischen Gruppe 1. Aber auch innerhalb der phylogenetischen Gruppe 1 konnten deutliche Unterschiede detektiert werden. Zum Beispiel zeigten *M. tuberculosis* Cameroon, LAM, S - type und X - type Stämme eine höhere Induktion von TNFα im Vergleich zu *M. bovis* ATCC als *M. tuberculosis* Haarlem, Uganda oder Ghana/TB1 Isolate. Stämme der *Euro - American* Linie besitzen also im THP1 - Zellsystem ein unterschiedliches, immunmodulatorisches Potential.

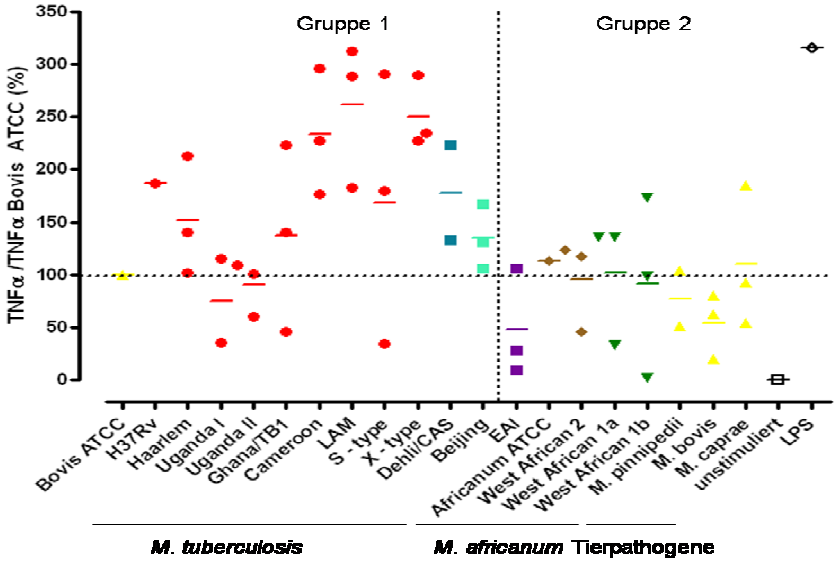


Abb. 4.28 TNFα Induktion von klinischen MTBK Isolaten in THP1 - Zellen. Die TNFα - Konzentrationen aus drei unabhängigen Experimenten sind prozentual im Vergleich zum *M. bovis* ATCC (100 %) Stamm als Scatter Plot dargestellt. Eine Klassifizierung in Gruppe 1 und Gruppe 2 ist deutlich zu erkennen. Stämme der phylogenetischen Gruppe 1 bewirken eine stärkere Induktion von TNFα als Stämme der Gruppe 2. Innerhalb der *Euro - American* Linie (rot) konnten genotypspezifische Unterschiede identifiziert werden. Rot: *Euro - American* Linie; Dunkelblau: *M. tuberculosis* Linie 3; Hellblau: *M. tuberculosis* Linie 2; Lila: *M. tuberculosis* Linie 1; Braun: *M. africanum* West African 2; Grün: *M. africanum* West African 1; Gelb: Tierpathogene; CAS: *Central Asian* Genotyp; EAI: *East African Indian* Genotyp; LAM*: Latin - American - Mediterrarean* Genotyp.

Die hier beschriebenen Ergebnisse geben einen ersten Hinweis auf immunmodulatorische Unterschiede innerhalb des MTBKs. Es konnte bestätigt werden, dass der genetische Hintergrund des Pathogens in phänotypischen Unterschieden resultiert. Weitere Analysen hinsichtlich der Induktion von Zytokinen sind derzeit in Bearbeitung.

5 Diskussion

Jahrzehnte war die Aufklärung der Pathogenese der Tuberkulose und die Entwicklung neuer antituberkulöser Medikamente und Testsysteme auf die Analyse klinischer Laborstämme wie CDC1551 und H37Rv fokussiert. Diese Referenzstämme repräsentieren jedoch nur einen kleinen Teil der genetischen und biologischen Diversität klinischer Isolate (52). In den letzten Jahren sind daher Untersuchungen zur natürlichen Variabilität von MTBK Stämmen in den Fokus intensiver Forschung gerückt (20,111,119). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die genetische und biologische Diversität klinischer Isolate der weltweit am häufigsten vorkommenden Genotypen des MTBKs analysiert. Dabei konnten erste Erkenntnisse hinsichtlich der Bedeutung des genetischen Hintergrunds eines Stammes für die Regulation der Genexpression im Flüssigkultur - und Makrophagen - Modell gewonnen werden. Darüber hinaus zeigte sich, dass die genetische Variabilität nicht nur die transkriptionelle Regulation maßgebend beeinflusst, sondern auch ein unterschiedliches, immunmodulatorisches Potential bedingt.

5.1 Genetische Diversität

Sequenzvariationen des Genoms und die daraus resultierende genetische Diversität innerhalb eines Genus sind Ergebnisse von Mutations - und Rekombinationsereignissen. Im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien weisen Stämme des MTBKs eine geringere Sequenzvariabilität auf und werden daher als genetisch monomorph bezeichnet (3). Aufgrund der strikten Klonalität und den vergleichsweise geringen Sequenzunterschieden wurde die genetische Diversität von Stämmen des MTBKs und ihre phänotypischen Konsequenzen viele Jahre als vernachlässigbar betrachtet (108,151). Neue Studien deuten jedoch an, dass klinische Isolate eine größere genetische Diversität aufweisen als ursprünglich angenommen und diese funktionelle Konsequenzen hat (70,177).

Um diese Frage weiter zu analysieren, wurden in dieser Arbeit vergleichende Sequenzanalysen von 29 Genen in 58 klinischen Isolaten sowie in den Referenzstämmen *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* ATCC und *M. africanum* ATCC durchgeführt. Einige Ergebnisse dieser Analysen sind in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von S. Gagneux entstanden und in einer gemeinsamen Publikation beschrieben (vier der hier analysierten Stämme, 11 der hier beschriebenen Gene (70)).

Die in dieser Arbeit untersuchten Gene repräsentieren eine Auswahl unterschiedlicher Genklassen, die zum Beispiel Gene verschiedener Stoffwechselwege, Gene mit funktioneller Bedeutung bei der Reaktivierung latenter *M. tuberculosis* Erreger oder Gene der PE und PPE Gruppe (Prolin - Glutaminsäure, Prolin - Prolin - Glutaminsäure) einschließen.

Insgesamt konnten Sequenzdaten mit einer Größe von 18598 bp/Stamm generiert werden. Dabei wurden 148 Mutationen identifiziert, von denen 87 zu einer veränderten Aminosäuresequenz führten. Daraus ergab sich eine Mutationsrate von 7,96 x 10^{-3}/bp. Diese Daten korrelieren mit der von Hershberg *et al.* publizierten Studie, in der 488 Mutationen bei einem Sequenzdatensatz von 65829 bp/Stamm nachgewiesen werden konnten (7,41 x 10^{-3}/bp, (70)). Die hier gefundene Mutationsrate für MTBK Stämme erscheint im Vergleich zu Mutationsraten anderer, genetisch monomorpher Bakterien deutlich erhöht. Roumagnac *et al.* beschrieben zum Beispiel für *Salmonella enterica* Typhi basierend auf der Analyse von 200 Genen, die konstitutiv exprimierte Gene, Strukturgene, Virulenz - assoziierte Gene, Pseudogene und Regulatoren einschlossen, eine Mutationsrate von 0,924 x 10^{-3}/bp (132). Im Vergleich zu vielen anderen, nicht genetisch monomorphen Bakterien wie *Heliobacter pylori* (466 x 10^{-3}/bp) ist die in dieser Arbeit definierte Mutationsrate für MTBK Stämme jedoch sehr gering (3,95).

Die Sequenzanalyse unter Ausschluss der hoch diversen *M. canettii* Stämmen ergab eine geringere Mutationsrate von 5,44 x 10^{-3}/bp. Auch dieser Wert entsprach den von Hershberg *et al.* veröffentlichen Daten (5,60 x 10^{-3}/bp), liegt jedoch um Faktor 6 höher als die beschriebenen Werte in *Salmonella enterica* Typhi (70,132). Ob sich die in dieser Arbeit gefundenen Mutationsraten für das gesamte mykobakterielle Genom bestätigen, müssen allerdings zukünftige Genomsequenzierungen zeigen.

Von den 148 identifizierten Mutationen besaßen 87 (58,78 %) eine funktionelle Bedeutung, während 61 (41,22 %) zu keiner Veränderung in der Aminosäuresequenz führten. Daraus ergibt sich ein Verhältnis von nicht - synonymen zu synonymen Veränderungen von 1,43. Dieser Wert korreliert mit den in der Literatur beschriebenen Sequenzdaten für *M. bovis* (1,52) und CDC1551 (1,69) im Vergleich zum H37Rv Referenzstamm (48,58). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen somit die Hypothese einer reduzierten *purifying selection* in klinischen MTBK Isolaten aufgrund der geringen effektiven Populationsgröße und der durch den Übertragungsmodus vielfältigen *bottleneck* Ereignissen, die letztendlich in einer hohen Rate an funktioneller Diversität resultiert.

M. canettii Stämme zeigten in den untersuchten Genen die größte genetische Variabilität. Insgesamt konnten 19 funktionelle und 25 synonyme Mutationen nachgewiesen werden, von denen 17 phylogenetisch informativ waren (Abb. 4.4). Das Verhältnis von nicht - synonymen zu synonymen Mutationen für die in dieser Arbeit untersuchten *M. canettii* Isolate beträgt 0,76 und ist damit im Vergleich zu anderen Stämmen des MTBKs um den Faktor 2 geringer. Die hohe Sequenzvariabiltät und die geringere Rate von nicht - synonymen Mutationen belegen ein deutlich höheres, evolutionäres Alter von *M. canettii* Stämmen im Vergleich zu anderen Stämmen des MTBKs.

Diese Daten korrelieren mit der von Gutierrez *et al*. 2005 veröffentlichten Studie von sechs konstitutiv exprimierten Genen, in der gezeigt werden konnte, dass *M. canettii* Stämme zusammen mit anderen *smooth tubercle bacilli* zur so genannen *pre - bottleneck* Linie (*M. prototuberculosis*) gehören, aus der die heutigen MTBK Stämme wie z.B. *M. tuberculosis*, *M. africanum* und *M. bovis* hervorgingen (68). Dieses evolutionäre Szenario konnte in weiteren Studien basierend auf der Diversität von MIRU - VNTR Markern (177) oder MLSA Daten (70) validiert werden.

Darüber hinaus bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit zum ersten Mal basierend auf Sequenzdaten die in der Literatur beschriebene Populationsstruktur von MTBK Stämmen, d.h. die Einteilung von klinischen Isolaten in zwei phylogenetischen Gruppen, sechs Hauptlinien und einer Vielzahl von Genotypen (siehe Abb. 4.3; (55,70,177)). Genotypspezifische und genotypübergreifende Sequenzvariationen traten z.B. in *M. africanum* Stämmen oder in den tierpathogenen Erregern auf (Abb. 4.4) und belegen deren nahe Verwandschaft. Diese Ergebnisse korrelieren mit der von Wirth *et al.* veröffentlichten, auf MIRU - VNTR Analysen basierende Studie von 355 Isolaten, in der ebenfalls zwei phylogenetische Gruppen identifiziert werden konnten (*clade 1, clade 2*). *M. africanum* und alle tierpathogenen Erreger sind der Gruppe 2 zuzuordnen (177). Alle *M. tuberculosis* Isolate mit Ausnahme von *M. tuberculosis* EAI Stämmen gehören zur phylogenetischen Gruppe 1. Gemeinsame Mutationen in allen *M. africanum*, *M. canettii* und tierpathogenen Erregern sowie in allen *M. tuberculosis* EAI, Beijing und Dehli/CAS Stämmen definieren die von Gagneux *et al.* beschriebene *Euro - American* Linie (55).

Insgesamt konnten in dieser Arbeit 57 phylogenetisch informative Mutationen nachgewiesen werden, von denen 45 als genotypspezifische und 12 als genotypübergreifende Sequenzvariationen beschrieben wurden (Abb. 4.4). Basierend auf diesen Daten ist es erstmalig gelungen, einen Algorithmus zu erarbeiten, der über die Sequenzierung von nur fünf Genen eine eindeutige Differenzierung fast aller in dieser Arbeit untersuchten Genotypen ermöglicht (Abb. 4.5).

Als so genannte *gold standards* kommen heutzutage vorrangig Spoligo - und MIRU - VNTR Typisierungmethoden zur Differenzierung von MTBK Stämmen zum Einsatz, da eine sequenzbasierte Genotypisierung klinischer Isolate durch z.B MLSA bislang eine zu geringe Auflösung besaß. Wie jedoch die von Comas *et al.* kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, weisen im Gegensatz zu den klassischen Typisierungsmethoden sequenzbasierte Methoden wie SNP Assays einen geringeren Homoplasieindex auf und eignen sich daher deutlich besser für phylogenetische Untersuchungen (29), da sie einen bestimmten Genotyp sicher definieren. Der beschriebene, sequenzbasierte Assay könnte somit als schnelle und kostengünstige Methode für die valide Identifizierung von MTBK Genotypen in zukünftigen epidemiologischen Studien Anwendung finden.

Darüber hinaus bieten die in dieser Arbeit gefundenen Sequenzvariationen die Basis für die Etablierung von Hochdurchsatz - Assays z.B. basierend auf dem SNPPlex™ System von ABI, welches die simultane Analyse von bis zu 50 SNPs aus einer Probe ermöglicht.
Im Folgenden werden die Ergebnisse für einzelne Genklassen ausführlich diskutiert.

5.1.1 Diversität in Strukturgenen

An der Synthese von Lipoarabinomanan (LAM) und dessen Vorläufermoleküle sind unter anderem Gene des *pimA* Operons (Rv2609c - Rv2613c) beteiligt. Die Sequenzanalyse ergab wenige Sequenzvariationen. Insgesamt konnten drei genotypspezifische Mutationen nachgewiesen werden, von denen nur eine in einer veränderten Aminosäuresequenz resultierte. Auch die Anzahl von Sequenzvariationen in einzelnen Stämmen war vergleichsweise gering. Demnach ist die Lipoarabinomannansynthese über den *pimA* Syntheseweg hoch konserviert. Diese Beobachtung korreliert mit den von Sreevatsan *et al.* 1997 und von James Musser 2001 publizierten Daten, die ergaben, dass Strukturgene wenige Sequenzvariationen zeigen (108,151). Dem gegenüber stehen jedoch die in dieser Arbeit identifizierten Mutationen in *pimB*, welches als Mannosyltransferase ebenfalls an der Synthese bzw. Modifizierung von LAM beteiligt ist. Es wurden acht genotypspezifische Mutationen nachgewiesen, von denen sechs zu einer veränderten Aminosäuresequenz führten. Welche Bedeutung der Austausch von Aminosäuren für die Funktion der Mannosyltransferase hat und welche Folgen sich für die LAM - Synthese daraus ergeben, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden. Dass Veränderungen von Zellwandbestandteilen jedoch erhebliche klinische Konsequenzen haben können, zeigen die Mutationsstudien zur Ethambutol Resistenz, bei der Sequenzveränderungen im *embB* Gen zu einer veränderten transmembranen Arabinosyltransferase führen und damit Resistenz vermitteln (125,126). Die Analyse der funktionellen Bedeutung von genotypspezifischen Polymorphismen in *pimB* für die LAM Synthese ist Gegenstand zukünftiger Arbeiten.

5.1.2 Diversität in Reaktivierungsgenen

Die Analyse der *rpf* Gene ergab nicht nur eine Vielzahl von phylogenetisch informativen Sequenzvariationen, sondern identifizierte auch zahlreiche Mutationen in einzelnen Stämmen. Insgesamt führten 18 der 24 beschriebenen Mutationen zu einem Aminosäureaustausch. Der hohe Anteil von Sequenzvariationen mit funktioneller Bedeutung korreliert mit Studien, die *rpf* Gene als funktionell redundant beschreiben (39,79), d.h. Sequenzveränderungen, die zu Struktur - oder Funktionsveränderungen führen, können toleriert werden, da diese Gene und ihre Produkte nicht essentiell sind (139).

Rpfs kodieren für Pepdidoglykan - hydrolisierende Enzyme (79,84,157). Durch die Spaltung von β - 1,4 - glykosidischen Bindungen im Peptidoglykan - Rückgrat wird die Zellwandstruktur gelockert und auf diese Weise das Wachstum erleichtert (80). Koltunov *et al.* zeigten für *Micrococcus luteus*, dass Rpfs eine lysozym - ähnliche Domäne besitzen, die über eine Linkersequenz mit einem so genannten LysM Motiv verbunden sind. Sequenzvariationen traten vorrangig in der Linkersequenz auf. Die lysozym - ähnliche Domäne und das LysM Motiv zeigten hingegen nur wenige Veränderungen (88). Weiterhin postulierten Koltunov *et al*., dass diese Linkerbereiche eine bedeutende Rolle bei der Adaption an bestimmten Umweltbedingungen spielen (88). Die *rpf* Gene von Isolaten des MTBKs weisen eine ähnliche Struktur wie in *Micrococcus luteus* auf (84,133). Ob die in dieser Arbeit beschriebenen Mutationen ebenfalls vorangig in so genannten Linkerbereichen auftreten und welche Bedeutung sie für die Adaption an Umweltbedingungen oder der Wirt - Pathogen Interaktion haben, wird zurzeit in Zusammenarbeit mit dem EMBL Hamburg (*The European Molecular Biology Laboratory*) untersucht.

5.1.3 Diversität in Stoffwechselgenen

Keating *et al.* beschrieben 2005, dass Mutationen in Rv3696c und in Rv1617 zu einem Pyruvat - abhängigen Wachstum bestimmter Spezies des MTBKs in Flüssigkulturmedium führen (83). Rv3696c kodiert für eine Glycerolkinase (*glpK*), die die Phosphorylierung von Glycerol zu Glycerol - 3 - Phosphat katalysiert und somit die Synthese von Pyruvat aus Glycerol initiert. Eine G - Insertion in Codon 191 verursacht eine Leserasterverschiebung, woraus eine inaktive Gylcerolkinase resultiert. Stämme, die diese Mutation tragen, benötigen daher für ein effizientes Wachstum zusätzlich Pyruvat im Kulturmedium. G - Insertionen wurden u.a. für *M. bovis, M. microti* und *M. africanum* Stämme nachgewiesen (83).
Die in dieser Arbeit erhobenen Sequenzdaten für Rv3696c zeigten eine Vielzahl von Sequenzvariationen in tierpathogenen und in *M. africanum* Stämmen. Neben der beschriebenen G - Insertion in Codon 191 konnten zusätzlich G - Deletionen in Codon 190 nachgewiesen werden, die ebenfalls zu einer Leserasterverschiebung und damit zur Inaktivierung der Glycerolkinase führten. Einige der untersuchten *M. africanum* und *M. bovis* Stämme entsprachen jedoch der H37Rv Wildtypsequenz. Daher sind die beschriebenen Mutationen nicht genotypspezifisch, sondern treten stammspezifisch nur bei bestimmten klinischen Isolaten auf. Diese Beobachtung korreliert mit der von Keating *et al.* publizierten Studie, in der für ein klinisches *M. bovis* Isolat ebenfalls keine Insertion nachgewiesen werden konnte (83).

Rv1617 kodiert für eine Pyruvatkinase *(pykA),* die die Herstellung von Pyruvat aus Phosphoenolpyruvat katalysiert. Mutationen in Codon 220 (E220D) in *M. bovis, M. microti* und *M. africanum* führen zu einem Aminosäureaustausch im aktiven Zentrum und somit zur Inaktivierung des Enzyms (83). In dieser Arbeit wurde eine Sequenzveränderung in Codon 220 für alle tierpathogenen und *M. africanum* Stämme bestätigt. Neben den von Keating *et al.* untersuchten *M. microti* und *M. bovis* Stämmen zeigten auch alle *M. caprae* und *M. pinnipedii* Isolate die Sequenzvariation (83). Einzige Ausnahme stellte der *M. bovis* ATCC Referenzstamm dar, für den eine synonyme Veränderung in Codon 220 nachgewiesen werden konnte. Diese Beobachtung korreliert mit der in der Literatur beschriebenen Adaption von Referenzstämmen an Kultivierungsbedingungen (52). Es ist denkbar, dass der *M. bovis* ATCC Referenzstamm aufgrund der häufigen Kultivierung eine weitere Mutation erwarb, die die Funktionsweise der Pyruvatkinase wiederherstellte.
Insgesamt lässt sich aus dem Nachweis von Mutationen in allen tierpathogenen und *M. africanum* Stämmen schlussfolgern, dass die Sequenzveränderung in Codon 220 des *pykA* Gens die genetische Ursache für ein Pyruvat - abhängiges Wachstum klinischer Isolate in Flüssigkulturmedium ist und nicht die Mutationen in Rv3696c, die zu Leserasterverschiebungen führen.

5.1.4 Diversität in Genen mit immunmodulatorischer Bedeutung

Genetische Variationen von Antigenen ermöglichen Pathogenen, die immunmodulatorische Antwort des Wirts zu beeinflussen. Sequenzveränderungen treten daher in diesen Genen häufiger auf als in anderen Genklassen (34). Die Sequenzanalyse von Rv0288 und Rv1980c ergab drei genotypspezifische Mutationen und eine stammspezifische Variation. Insgesamt wiesen also die in dieser Arbeit untersuchten Gene im Gegensatz zu Antigenen anderer Pathogene eine geringe genetische Diversität auf. Diese ersten Ergebnisse lassen vermuten, dass Antigene in MTBK Stämmen wie Strukturgene hoch konserviert sind.
Ähnliche Beobachtungen konnten von Holt *et al.* 2008 für *Salmonella enterica* Typhi publiziert werden (72). Auch bei diesem Organismus traten wenige Sequenzvariationen in Antigenen auf. Weitere Analysen in MTBK Stämmen zur genetischen Variabilität von Antigenen und ihre immunmodulatorische Bedeutung könnten daher eine zentrale Fragestellung für zukünftige Arbeiten sein.
Die PE und PPE Genfamilie umfasst 10 % der kodierenden Regionen des mykobakteriellen Genoms (26). Die Funktionen vieler dieser Gene sind derzeit nicht bekannt, werden aber immer häufiger mit pathogenen Eigenschaften von Stämmen des MTBKs in Verbindung gebracht. Zum Beispiel induziert der in der Literatur beschriebene Proteinkomplex PE25/PPE41 eine verstärkte humorale und zellvermittelte Immunantwort (2,24,163).

Die Sequenzanalyse von Rv2430c (*ppe41*) und Rv2431c (*pe25*) ergab wenige Variationen. Die Gene sind demnach hoch konserviert. Diese Daten entsprechen den Beobachtungen für Antigene, die ebenfalls eine geringe genetische Variabilität aufwiesen. Es ist zu vermuten, dass Mutationen, die zu immunmodulatorischen Veränderungen führen, nicht toleriert werden und einem selektiven evolutionären Druck unterliegen. Diese Beobachtung ist für die Entwicklung von neuen diagnostischen Tests von großer Bedeutung. Ein universelles Antigenrepertoire von Stämmen des MTBKs führt zu einem universellen Antikörperepertoire im Wirt, die den Nachweis von MTBK Stämmen über bestimmte Antikörper erleichtert.

5.1.5 Diversität in Virulenz - assoziierten Genen

Gegenwärtig wird die Assoziation verschiedener Genotypen mit einem virulenten Phänotyp in der Literatur intensiv diskutiert (32,111,119,165). Die Bedeutung der genetischen Diversität hinsichtlich pathogener Eigenschaften bestimmter klinischer Isolate wurde hingegen kaum untersucht. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob klinische Isolate in beschriebenen Virulenzgenen variabel sind.

Eines der wenigen bekannten Beispiele ist das Virulenz - assoziierte phenolische Glykolipid (PGL), das durch die Polyketidsynthase *pks15/1* (Rv2946c) synthetisiert wird (129). Deletionen in *pks15/1* führen zur Inaktivierung des Enzyms und inhibieren somit die PGL Synthese. Es wurde gezeigt, dass Stämme der *Euro - American* Linie eine 7 bp Deletion aufweisen und dadurch PGL nicht synthetisieren können (129). Stämme des Beijing oder EAI Genotyps besitzen hingegen eine funktionelle Polyketidsynthase. Die in dieser Arbeit durchgeführte Sequenzanalyse bestätigte die in der Literatur beschriebene 7 bp Deletion in Stämmen der *Euro - American* Linie sowie eine 6 bp Deletion in allen RD9$^-$ Stämmen (Ausnahme *M. africanum* West African 1).

Sinsimer *et al.* zeigten 2008, dass PGL die Zytokinantwort in humanen Monozyten modulieren kann (146). Im Gegensatz zu früheren Arbeiten, die eine geringere TNFα - und IL12 - Induktion durch PGL - synthetisierenden Stämmen postulierten (100), konnte ein immunmodulatorischer Effekt nicht für alle PGL synthetisierende Stämme nachgewiesen werden (146). Zusätzlich konnte ein Zusammenhang zwischen der Modulation der Zytokinantwort über PGL und dem genetischen Hintergrund eines Stammes gezeigt werden (146). Die Synthese von PGL führt also nicht zwangsläufig zu einem hypervirulenten Phänotyp. Die von Sinsimer *et al.* veröffentlichten Daten beruhen auf der Analyse weniger klinischer Isolate (146). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das TNFα induzierende Potential von 48 *pks15/1*$^+$ und *pks15/1*$^-$, klinischen Isolaten, die 17 unterschiedliche Genotypen repräsentieren, untersucht und ein Zusammenhang zwischen dem genetischen Hintergrund eines Stammes und seinem immunmodulatorischen Potential bestätigt.

Es konnten gruppen - und genotypspezifische Unterschiede in der TNFα Induktion nachgewiesen werden (siehe 4.3 und 5.4).

Ein weiteres Beispiel für Virulenz - assoziierte Gene ist das *mgtC* Gen, das eine Magnesium - Transport - P - Typ - ATPase kodiert und in vielen Organismen als wichtiger Virulenzfaktor beschrieben wurde. Zahlreiche Studien zu intrazellulären Pathogene wie *Yersinia pestis*, *Brucella melitensis, Salmonella enterica* oder *M. tuberculosis* zeigten, dass MgtC für das intrazelluläre Überleben im Makrophagen von entscheidener Bedeutung ist (5,13,127,131).

Phagosomen weisen eine geringe Magnesiumkonzentration auf (18), die intrazelluläre Pathogene durch einen erhöhten Magnesiumtransport über MgtC zum Erhalt wichtiger Zellfunktionen ausgleichen versuchen. Wie z.B. für Salmonellen beschrieben, führt eine Inaktivierung von MgtC zur Inhibierung der intraphagosomalen Replikation und ist daher von großer klinischer Bedeutung (13,131).

Alix *et al*. beschrieben 2006 eine *M. tuberculosis* Haarlem genotypspezifische Sequenzvariation in *mgtC* (Rv1811) (6). Die in dieser Arbeit durchgeführte Sequenzanalyse konnte darüber hinaus auch genotypspezifische Mutationen für *M. tuberculosis* LAM, *M. africanum* West African 1a und West African 2 sowie für *M. canettii* Stämme identifizieren.

Eine Vielzahl von phylogenetisch informativen Mutationen sowie Sequenzvariationen in einzelnen Stämmen konnte auch im *pknG* Gen (Rv0410c) nachgewiesen werden, das die Proteinkinase G kodiert. Walburger *et al.* zeigten 2004, dass PknG sekretiert, die Phagosomen - Lysosomen Fusion über Phosphorylierung von Wirtsproteinen inhibiert und somit ein intrazelluläres Überleben des Pathogens ermöglicht wird (170). Stämme mit einer inaktiven Proteinkinase G können die Phagosom - Lysosom Fusion nicht inhibieren und werden abgebaut (170). Acht der 26 in dieser Arbeit identifizierten genotyp - oder stammspezifischen Mutationen führten zu einem Aminosäureaustausch.

Wie diese Beispiele zeigen, weisen Virulenz - assoziierte Gene eine Vielzahl von Mutationen auf, die oftmals zu einer veränderten Aminosäuresequenz führen. Ob diese Sequenzvariationen jedoch in veränderten, biologischen Merkmalen oder virulenten Eigenschaften von Stämmen resultieren, soll in zukünftigen Arbeiten thematisiert werden.

Einen ersten Anhaltspunkt bieten jedoch die im Folgenden diskutierten Wachstumsanalysen klinischer Isolate (5.2). Zum Beispiel zeigten Haarlem Stämme, die eine funktionelle Mutation in *mgtC* aufweisen, ein deutlich besseres Wachstum in aktivierten, murinen Makrophagen als die Referenzstämme H37Rv und CDC1551.

Im Gegensatz dazu ergaben die Wachstumsanalyse von *M. tuberculosis* EAI und *M. africanum* West African 2 Stämmen, die funktionelle, genotypspezifische Mutationen in *pknG* aufweisen, ein eingeschränktes Wachstum im murinen Makrophagen - Modellsystem. Ob die beschriebenen Mutationen im direkten, ursächlichen Zusammenhang mit einem veränderten Wachstumsverhalten stehen und damit für das intraphagosomale Überleben von MTBK Stämmen von Bedeutung sind, müssen zukünftige Arbeiten zeigen.

5.2 Wachstumsanalysen klinischer *M. tuberculosis* Komplex Stämme

Die wenigen, in der Literatur beschriebenen Wachstumstudien klinischer MTBK Isolate zeigten einen ersten Zusammenhang zwischen bestimmten Genotypen und Wachstumsprofilen in verschiedenen Modellsystemen (23,122,160,178). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Wachstumsanalysen von Stämmen fünf verschiedener Genotypen in Flüssigkulturmedium sowie in murinen, ruhenden und aktivierten Makrophagen durchgeführt. Unter Flüssigkulturbedingungen konnten keine signifikanten Wachstumsunterschiede in klinischen Isolaten nachgewiesen werden.

Dem gegenüber stehen die Ergebnisse der Wachstumsanalysen in murinen Makrophagen. Dabei zeigten *M. africanum* und *M. tuberculosis* Stämme der phylogenetischen Gruppe 2 deutliche Wachstumsdefizite im Vergleich zu *M. tuberculosis* Isolaten der phylogenetischen Gruppe 1. Die beschriebenen Wachstumsunterschiede wurden durch die Aktivierung der Makrophagen noch deutlicher. Die verstärkte, stressinduzierende Umgebung in aktivierten Makrophagen akzentuiert die Virulenzunterschiede klinischer Isolate. So zeigten *M. tuberculosis* Haarlem Stämme in aktivierten Makrophagen ein besseres Wachstum als *M. tuberculosis* Beijing Isolate und sind, in dem hier genutzten Zellsystem, die Stämme mit der höchsten Virulenz. Diese Beobachtung steht im Widerspruch mit vorherigen Studien (94,180), in denen ein verstärktes Wachstum und eine damit verbundene Hypervirulenz von Beijing Stämmen beschrieben wurden.

Diese diskrepanten Ergebnisse könnten zum einen auf unterschiedliche Modellsysteme beruhen, zum anderen auf die von Theus *et al.* 2007 beschriebenen, subgruppenspezifischen Wachstumsunterschiede innerhalb eines Genotyps in THP1 - Zellen (159).

In jedem Fall bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Bedeutung des genetischen Hintergrunds eines Stammes für sein intrazelluläres Wachstum und Überleben. Generelle Schlussfolgerungen zur Virulenz klinischer Isolate basierend auf Analysen in Modellsystemen erscheinen im Hinblick auf die diskrepanten Ergebnisse derzeit verfrüht. Eine vertiefende Analyse genotypspezifischer Wachstumsunterschiede in verschiedenen Modellsystemen wie z.B. humanen und murinen Makrophagen soll daher in zukünftigen Studien thematisiert werden.

5.3 Transkriptionsanalysen

Die in der Literatur beschriebenen Genexpressionsstudien basieren fast ausschließlich auf der Analyse von *M. tuberculosis* und *M. bovis* Referenzstämmen unter verschiedenen Laborbedingungen (50,60,86,143,169). Vergleichende Analysen von Patientenisolaten, die die transkriptionelle Diversität von MTBK Stämmen beschreiben, sind hingegen kaum vorhanden.

Gao *et al.* veröffentlichten 2005 eine erste Genexpressionsstudie zu klinischen Isolaten und den Referenzstämmen H37Rv, H37Ra und CDC1551, die in Flüssigkulturmedium kultiviert wurden (57). Eine genotypspezifische Charakterisierung der untersuchten Stämme fehlte jedoch. Genexpressionsdaten hinsichtlich bestimmter Genotypen wurden zum Beispiel von Reed *et al.* 2007 beschrieben, die basierend auf Real Time PCR Daten die Überexpression des DosR Regulons in W - Beijing Stämmen zeigen konnten (130). Beide Studien ließen einen Zusammenhang zwischen der genetischen Diversität klinischer MTBK Isolate und ihrer transkriptionellen Regulation vermuten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Transkriptionsanalysen von Stämmen fünf verschiedener Genotypen in Flüssigkulturmedium und in murinen Makrophagen durchgeführt.

5.3.1 Transkriptionsanalysen in Flüssigkulturmedium

In einem ersten Schritt wurden Genexpressionsprofile von 15, in Flüssigkultur gewachsenen, klinischen Isolaten fünf verschiedener Genotypen sowie des Referenzstammes H37Rv erstellt. Die Analyse erlaubt die Beschreibung von gruppen -, genotyp - und stammspezifischen, transkriptionellen Unterschieden und gewährte damit einen ersten Einblick in die transkriptionelle Diversität klinischer MTBK Isolate.

Die Transkriptionsmuster reflektieren die beschriebene Phylogenie von MTBK Stämmen. Insgesamt identifizierten die Varianzanalysen 156 gruppen -, 364 genotyp - und 195 stammspezifische Gene mit signifikanten Genexpressionsunterschieden.

Unter den gruppenspezifischen, überexprimierten Genen konnte das *narGHIJ* Operon in Stämmen der phylogenetischen Gruppe 1 nachgewiesen werden. Stämme der phylogenetischen Gruppe 2 zeigten keine erhöhte Expression. Das *narGHIJ* Operon kodiert Proteine für die Nitratreduktion, die dem Pathogen ermöglicht, unter anaeroben Bedingungen Nitrat zur Energiegewinnung zu nutzen (150). Unter aeroben Bedingungen sind nur einige Mykobakterien in der Lage, Nitrat zu verstoffwechseln (168), worauf der auch heute noch in der Diagnostik verwendete Nitratreduktaseaktivitättest beruht. *M. africanum* West African 2 und alle tierpathogenen Erreger sind Nitratreduktase negativ, während in *M. tuberculosis* und *M. africanum* West African 1 Stämme eine Nitratreduktaseaktivität nachzuweisen ist.

Als molekulare Ursache wurde ein Einzelbasenaustausch im Promotorbereich des *narGHIJ* Operons beschrieben (59,152,153). Für die Referenzstämme H37Rv und Erdmann sowie für klinische *M. tuberculosis* Isolate konnten im Vergleich zu *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG sowie *M. microti* Stämmen Mutationen in der Promotorregion (C zu T -215) nachgewiesen werden (152,153). Eine genotypspezifische Klassifizierung der *M. tuberculosis* und *M. africanum* Isolate erfolgte hierbei nicht. Goh *et al.* detektierten in ihrer 2005 veröffentlichten Studie auch keine Sequenzveränderung an Position -215 in *M. pinnipedii*, *M. canettii* und *M. tuberculosis* EAI Stämmen (59). Die beschriebene Mutation stellt also einen phylogenetischen Marker von Stämmen der Gruppe 1 dar.

Erste vergleichende Genexpressionsanalysen von *M. tuberculosis* H37Rv und *M. bovis* sowie *M. bovis* BCG Pasteur zeigten eine erhöhte Expression der *narGHIJ* Operons in *M. tuberculosis* (149). Demnach resultiert die identifizierte Mutation in einer erhöhten Genexpression und damit in einer erhöhten Nitratreduktaseaktivität in *M. tuberculosis* H37Rv. Die in dieser Arbeit untersuchten *M. africanum* West African 2 und *M. tuberculosis* EAI Isolate gehören wie *M. bovis* Stämme zur phylogenetischen Gruppe 2 (177). Am Beispiel des *narGHIJ* Operons konnte folglich ein direkter Zusammenhang zwischen genetischer und biologischer Diversität hergestellt werden. Warum *M. tuberculosis* EAI Stämme trotz fehlendem Polymorphismus und geringerer Genexpression Nitratreduktaseaktivität aufweisen, ist derzeit nicht bekannt. Kompensatorische Mechanismen, die die Nitratreduktaseaktivität wiederherstellen, aber in Tierpathogenen und *M. africanum* West African 2 Stämmen fehlen, sind denkbar.

In Stämmen der phylogenetischen Gruppe 2 konnte eine erhöhte Expression des *mce4* Locus nachgewiesen werden. *Mce4* kodiert Untereinheiten eines Cholesterintransportsystems, welches für das Überleben in aktivierten Makrophagen von entscheidener Bedeutung ist (77,120). Cholesterin kann zum einen als Kohlenstoffquelle zur Energiegewinnung dienen. Zum anderen kann die C - 26 Seitenkette als Bestandteil von Zellwandlipiden wie PDIM genutzt werden (105,120). Die erhöhte Expression des *mce4* Locus in Flüssigkulturmedium könnte einen ersten Hinweis auf eine veränderte Synthese von Zellwandbestandteilen in Stämmen der phylogenetischen Gruppe 2 geben, da der Abbau von Cholesterin zur Energiegewinnung aufgrund anderer Kohlenstoffquellen in Flüssigkulturmedium nicht essentiell ist.

Zu den Genen mit genotypspezifischen Genexpressionsmuster zählt das *virs - mymA* Operon, welches eine erhöhte Expression in allen *M. tuberculosis* EAI Stämmen aufwies. *VirS* (Rv3082c) kodiert einen Transkriptionsfaktor, der das mykobakterielle Monooxygenase A (*mymA*) Operon reguliert (144), wobei VirS über Phosphorylierung durch die Proteinkinase K (*pknK*, Rv3080c) reguliert wird (92).

Das *mymA* Operon ist für den Erhalt der Mykolsäurestruktur und der Permeabilität der Zellwand bei Ansäuerung im Phagosom verantwortlich (144). Bei Inaktivierung von *mymA* kommt es zum Abbau der Pathogene in aktivierten Makrophagen (145). Die erhöhte Genexpression des *virS - mymA* Operons könnte zu einer veränderten Zellwandstruktur in *M. tuberculosis* EAI führen.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Varianzanalyse ergab außerdem einen höheren Anteil genotypspezifischer Genexpressionsmuster in *M. africanum* und *M. tuberculosis* EAI Isolaten im Vergleich zu Stämmen der phylogenetischen Gruppe 1. Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen der unter 5.1 beschriebenen Sequenzanalyse. Stämme der phylogenetischen Gruppe 2 weisen im Vergleich zu Stämmen der phylogenetischen Gruppe 1 eine größere genetische Distanz zu den Referenzstämmen auf, die sich auf Transkriptionsebene widerspiegelt.

Als Beispiel stammspezifischer Genexpressionsregulation ist das *fabG1 - inhA - hemZ* Operon zu nennen. In einem *M. africanum* West African 2 Stamm konnte eine erhöhte Expression nachgewiesen werden. Die Sequenzanalyse der Promotorregion des *fabG1 - inhA* Gens identifizierte einen C zu T Austausch an Position -15, die die erhöhte Genexpression erklärt. *InhA* kodiert für eine NADH - abhängige Enoyl - ACP - Reduktase, die an der Biosynthese von Mykolsäure beteiligt und Zielstruktur des Erstrangmedikaments INH ist (107). Eine erhöhte Expression führt zur Resistenz gegenüber INH. Die Empfindlichkeitstestung dieses Stammes bestätigte einen resistenten Phänotyp. Die durchgeführten molekularbiologischen Analysen korrelieren folglich mit der phänotypischen Charakterisierung.

Weitere Sequenzanalysen von Promotorbereichen differentiell exprimierter Gene sind in zukünftigen Arbeiten geplant, um weitere Zusammenhänge zwischen Sequenzveränderungen, Genexpressionsvariationen und phänotyischen Eigenschaften von Stämmen zu erklären.

5.3.2 Transkriptionsanalysen in murinen Makrophagen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalysen in Flüssigkulturmedium geben einen ersten Einblick über die transkriptionelle Diversität klinischer MTBK Isolate. Jedoch reflektieren diese Experimente nicht die eigentliche Infektionssituation im Menschen. Um sich dieser Situation anzunähern, wurden in einem weiteren Schritt Transkriptionsanalysen im murinen Makrophagen - Modellsystem durchgeführt.

Makrophagen sind die Wirtszellen mykobakterieller Erreger. Bei primärer Infektion des Menschens mit pathogenen Mykobakterien werden diese zunächst von in den Alveolen persistierenden Makrophagen phagozytiert. Nach Aktivierung der adaptiven Immunantwort erfahren die intrazellulären Pathogene aufgrund verstärkter antimikrobieller Aktivitäten eine erhöhte stressinduzierende, intraphagosomale Umgebung. Die Pathogene treffen somit im Verlauf der Infektion auf unterschiedliche Wirtszellen, an die sie sich entsprechend anpassen müssen. Zur Analyse der Genexpression in den verschiedenen Stadien, wurden in dieser Arbeit Transkriptomstudien in ruhenden und in aktivierten Makrophagen durchgeführt.

Durch diese Analysen ist es erstmalig gelungen, ein so genanntes *Core* Transkriptom zu beschreiben, das 280 Gene umfasst, die unabhängig vom Aktivierungsstatus der Makrophagen in fast allen untersuchten Stämmen reguliert werden. Viele dieser Gene (~ 25 %) sind am Lipidstoffwechsel und an der Zellwandmodifizierung beteiligt. Für über 40 % diese Gene sind derzeit die Funktionen noch nicht bekannt. Die durch das *Core* Transkriptom definierten Gene scheinen jedoch eine entscheidene Rolle für das intrazelluläre Überleben zu spielen. Als Virulenzfaktoren stellen sie potentielle Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Medikamente oder Impfstoffe dar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zusätzlich, dass klinische Isolate ein individuelles intrazelluläres Genexpressionsprofil aufweisen. Mehr als 15 % aller Gene wurden genotypspezifisch reguliert. Sie repräsentieren den variablen Teil des intrazellulären Transkriptoms und haben eine deutlich geringere Bedeutung als potientielle *Drug Targets*.

Zielstrukturen, die nicht in allen klinischen Isolaten vorkommen oder gleichermaßen reguliert werden, könnten in einer fehlerhaften Diagnostik oder sogar in einer ineffektiven Therapie resultieren. Zum Beispiel beschrieben Aagaard *et al*. 2004 zwei neue Antigene (Rv2653, Rv2654), die für die Entwicklung neuer diagnostischer Testsyteme genutzt werden könnten (1). Diese Gene gehören jedoch zu der RD11 Region und sind daher in bestimmten klinischen Isolaten nicht nachweisbar (55,162). Ein auf diesen Genen basierendes Testsystem würde eine Vielzahl von Erregern nicht identifizieren. Auch das von Cohen *et al.* 2008 veröffentlichte, mathematische Modell zur Stammdiversität beschreibt eindrucksvoll die möglichen, diagnostischen Folgen, wenn die natürliche Variabilität von Stämmen des MTBKs bei der Entwicklung neuer Testsysteme und Impfstoffe nicht berücksichtigt wird (25).

Neben dem im Rahmen dieser Arbeit definierten *Core* Transkriptom und den variablen Genexpressionsprofil verschiedener Genotypen konnten auch vom Aktivierungszustand der Makrophagen abhängige Genexpressionsunterschiede in klinischen Isolaten nachgewiesen werden. Diese Gene scheinen bei der Adaption der Stämme an unterschiedlichen intrazellulären Bedingungen eine entscheidene Rolle zu spielen.

Unter den in ruhenden Makrophagen höher exprimierten Genen konnten *rpl* und *rps* Gene nachgewiesen werden, die eine verstärkte Proteinbiosynthese und ein damit verbundenes gesteigertes Wachstum in nicht aktivierten Makrophagen signalisieren. Diese Beobachtung korreliert mit den unter 5.2 diskutierten Wachstumsanalysen. In ruhenden Makrophagen waren Wachstumsdefizite weniger stark ausgeprägt als in aktivierten Makrophagen.

Ein weiteres Beispiel für eine erhöhte Genexpression in ruhenden Makrophagen sind Eisenspeicherungsgene. Im Gegensatz zu ruhenden Makrophagen nutzen aktivierte Makrophagen zur Wachstumskontrolle von Erregern die Reduktion der intraphagosomalen Eisenversorgung (141,142,171). Eine erhöhte Speicherung von Eisen in nicht aktivierten Makrophagen scheint ein mykobakterielles Pathogenitätsmerkmal darzustellen, das einen Eisenmangel vorbeugt und somit ein intraphagosomales Wachstum auch in aktivierten Makrophagen gewährleistet.

Zu den Genen, die eine erhöhte Induktion in aktivierten Makrophagen zeigten, zählen Gene des Mycobactin Operon (*mbt)*. *Mbt* Gene kodieren Siderophore, die dem Pathogen ermöglichen, in einer eisenmangelhaften Umgebung wie z.B dem Phagosom zu überleben (33,141). Eine erhöhte Expression dieser Gene zeigt ebenfalls die bereits beschriebene schlechtere Eisenversorgung in aktivierten Makrophagen.

Insgesamt bestätigen die Transkriptomdaten im murinen Makrophagen - Modellsystem auch die in vorherigen Studien postulierte Adaption der verschiedenen, phylogenetischen MTBK Gruppen an bestimmte humane Populationen (55,75). Die genetische Diversität klinischer Isolate spiegelt sich in der transkriptionellen Regulation wider. MTBK Stämme passen sich in Abhängigkeit vom Aktivierungsstatus der Makrophagen genotypspezifisch an die intrazelluläre Umgebung an.

Diese Beobachtung korreliert mit den erhöhten Übertragungsraten klinischer Stämme in sympathischen Wirtspopulationen (z.B. Stämme der *Euro - American* Linie in Amerikanern, (55)). Auch eine kürzlich veröffentlichte Studie, in der gezeigt werden konnte, dass verschiedene Linien des MTBKs an bestimmte ethnische Gruppen angepasst sind und Genvariationen im Wirt vor Infektion mit bestimmten mykobakteriellen Erregern schützen, bestätigen einen Zusammenhang zwischen charakteristischen Eigenschaften der Wirtszelle und pathobiologischen Merkmalen des Keims (75). Basierend auf diesen Daten soll in zukünftigen Arbeiten die Wirt - Pathogen Interaktion weiter analysiert werden.

5.4 Immunmodulatorisches Potential von *M. tuberculosis* Komplex Stämmen

TNFα, eines der wichtigsten Zytokine der inflammatorischen Immunantwort, ist an einer Vielzahl immunmodulatorischer Zellprozesse wie der Aktivierung, Rekrutierung und Differenzierung von Zellen des Immunssytems sowie an der Apoptose beteiligt (42). TNFα wird primär von Makrophagen als immunologische Antwort auf pathogene Stimuli ausgeschüttet. Aber auch aktivierte T - und B - Zellen sowie natürliche Killerzellen sind in der Lage, TNFα zu produzieren (117). Als trimeres Molekül kann TNFα als lösliche Form oder als transmembraner Faktor auftreten (4).

Bei der Tuberkuloseinfektion spielt TNFα eine herausragende Rolle (49). Zum einen ist es maßgeblich an der Granulombildung durch Induzierung einer schützenden T - Helfer - Zellantwort (Th1) beteiligt. Zum anderen kann es bei sehr hohen TNFα - Mengen zu starken Gewebeschädigungen kommen (89,106). Die schwerwiegenden Folgen einer veränderten TNFα Antwort zeigten Studien zu chronischen Erkrankungen. Es konnte nachgewiesen werden, dass Patienten, die mit einer anti - TNFα Therapie behandelt wurden, ein erhöhtes Risiko der Reaktivierung einer latenten Tuberkulose aufweisen (81,116). Es besteht demnach ein direkter Zusammenhang zwischen der Induktion von TNFα und dem Verlauf der Tuberkuloseinfektion, woraus sich die Frage ergibt, ob die Modulation der TNFα Antwort als potentieller Virulenzmechanismus klinischer MTBK Isolate betrachtet werden kann.

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit das TNFα induzierende Potential von 48 klinischen Isolaten in der THP1 - Zelllinien untersucht. Interessanterweise zeigten sich Unterschiede in der TNFα Induktion in Abhängigkeit des Genotyps eines Stammes. So wurden in Stämmen der phylogenetischen Gruppe 2 eine geringere TNFα Induktion als in Stämmen der Gruppe 1 nachgewiesen. Auch innerhalb der phylogenetischen Gruppe 1 konnten deutliche Unterschiede detektiert werden.

Zum Beispiel wiesen einige Stämme der *Euro - American* Linie ein höheres TNFα induzierendes Potential auf als *M. tuberculosis* Beijing oder Dehli/CAS Isolate. Diese Beobachtung korreliert mit der von Tanveer *et al.* kürzlich veröffentlichten Studie, in der sie eine reduzierte TNFα Antwort in THP1 - Zellen nach Infektion mit klinischen Isolaten des Beijing und CAS1 Genotyps zeigten (156). Auch die von Sinsimer *et al.* beschriebene Modulation der TNFα Induktion über PGL (siehe 5.1.5) korreliert mit den in dieser Arbeit gezeigten Daten (146). Die Sequenzanalyse der untersuchten Beijing und Dehli/CAS Stämme ergab keine Deletion in *pks15/1,* so dass diese Isolate vermutlich PGL synthetisieren und somit eine geringere TNFα Antwort induzieren.

Die Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu der von Chacón - Salinas *et al.* 2005 veröffentlichten Studie, in der eine höhere TNFα Induktion durch Beijing Stämme im Vergleich zu Nicht - Beijing Stämmen in murinen Makrophagen nachgewiesen wurde (21). Diese Unterschiede könnten zum einen mit der Verwendung verschiedener Zellsysteme, zum anderen durch die unterschiedlichen Messzeitpunkte der Studien erklärt werden.

Insgesamt zeigte die durchgeführte Analyse, dass Stämme unterschiedlicher Genotypen des MTBKs eine unterschiedliche TNFα Antwort induzieren können. Welche Rolle diese Unterschiede für die Modulation der Erkrankung und der Adaption an verschiedene Wirte spielen, ist bislang nicht bekannt.

Erste Studien zeigten, dass eine frühe TNFα Induktion ein besseres intrazelluläres Wachstum der Pathogene ermöglicht (45). Vergleicht man die in dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsanalysen in murinen Makrophagen mit den TNFα Daten in THP1 - Zellen, konnte bei Stämmen mit geringerer TNFα Induktion ein verschlechtertes Wachstum in den ersten Tagen nach Infektion bestätigt werden. Dem gegenüber stehen die von Theus *et al.* 2005 veröffentlichten Daten, die eine erhöhte TNFα Induktion mit einem verlangsamten Wachstum korrelierten (160). Der Zusammenhang zwischen TNFα Induktion und intrazellulärem Wachstum bleibt somit kontrovers diskutiert.

Wie Marquina - Castillo *et al.* 2008 anhand klinischer Isolate zeigten, ist eine frühe Induktion von TNFα nicht zwangsläufig an einem virulenten Phänotyp gebunden (103). Vielmehr ergibt sich die Virulenz, Immunpathologie und die Übertragungsfähigkeit klinischer Isolate aus dem Zusammenspiel von pro - und anti - inflammatorischen Faktoren, die diese Pathogene individuell induzieren (103). Eine umfangreiche Analyse weiterer Zytokine ist daher derzeit in Bearbeitung.

5.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die genetische Diversität von Stämmen des MTBKs von großer biologischer Bedeutung ist. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse gaben einen ersten Einlick über die Vielzahl funktioneller Mutationen, die die unterschiedlichen phänotypischen Merkmale klinischer Isolate erklären könnten. Zukünftige Genomsequenzierungen von MTBK Stämmen unterschiedlicher Genotypen sind jedoch dringend erforderlich, um die molekularen Ursachen phänotypischer Merkmale von klinischen Isolaten noch genauer zu analysieren. Insbesondere sollte eine umfangreiche, genetische Analyse von so genannten hypervirulenten Stämmen im Vergleich zu weniger virulenten Erregern durchgeführt werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalysen zeigen, dass sich die genetische Variabiltät in der transkriptionellen Diversität von MTBK Stämmen widerspiegelt. Von besonderer Bedeutung ist der Nachweis eines intrazellulären *Core* Transkriptoms klinischer Isolate. Dabei handelt es sich um Gene, die in allen untersuchten Stämmen unabhängig vom Aktivierungsstatus der Makrophagen reguliert werden. Von ca. 40 % dieser Gene ist die Funktion zurzeit unbekannt. Daher müssen Analysen zur Bedeutung dieser Gene in zukünftigen Arbeiten thematisiert werden, um potentielle Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Medikamente, Diagnostika oder Impfstoffe zu identifizieren.

Wie in dieser Arbeit außerdem gezeigt werden konnte, weisen klinische Isolate ein unterschiedliches TNFα induzierendes Potential auf. Die Bedeutung dieser Unterschiede hinsichtlich virulenter Eigenschaften von Stämmen ist nicht bekannt. Weiterführende Analysen zu Unterschieden klinischer Isolate hinsichtlich ihrer Zytokininduktion und ihres Apoptose - induzierenden Potentials sind daher derzeit in Bearbeitung.

Literaturverzeichnis

1. **Aagaard, C., I. Brock, A. Olsen, T. H. Ottenhoff, K. Weldingh, and P. Andersen.** 2004. Mapping immune reactivity toward Rv2653 and Rv2654: two novel low - molecular - mass antigens found specifically in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. J.Infect.Dis. 189:812-819.

2. **Abdallah, A. M., T. Verboom, F. Hannes, M. Safi, M. Strong, D. Eisenberg, R. J. Musters, C. M. Vandenbroucke - Grauls, B. J. Appelmelk, J. Luirink, and W. Bitter.** 2006. A specific secretion system mediates PPE41 transport in pathogenic mycobacteria. Mol.Microbiol. 62:667-679.

3. **Achtman, M.** 2008. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. Annu.Rev.Microbiol. 62:53-70.

4. **Aggarwal, B. B.** 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double - edged sword. Nat.Rev.Immunol. 3:745-756.

5. **Alix, E., and A. B. Blanc - Potard.** 2007. MgtC: a key player in intramacrophage survival. Trends Microbiol. 15:252-256.

6. **Alix, E., S. Godreuil, and A. B. Blanc - Potard.** 2006. Identification of a Haarlem genotype - specific single nucleotide polymorphism in the *mgtC* virulence gene of *Mycobacterium tuberculosis*. J.Clin.Microbiol. 44:2093-2098.

7. **Aranaz, A., E. Liebana, E. Gomez - Mampaso, J. C. Galan, D. Cousins, A. Ortega, J. Blazquez, F. Baquero, A. Mateos, G. Suarez, and L. Dominguez.** 1999. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. caprae subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. Int.J.Syst.Bacteriol. 49 Pt 3:1263-1273.

8. **Aranaz, A., E. Liebana, A. Mateos, L. Dominguez, D. Vidal, M. Domingo, O. Gonzolez, E. F. Rodriguez - Ferri, A. E. Bunschoten, J. D. van Embden, and D. Cousins.** 1996. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. J.Clin.Microbiol. 34:2734-2740.

9. **Baker, L., T. Brown, M. C. Maiden, and F. Drobniewski.** 2004. Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. Emerg.Infect.Dis. 10:1568-1577.

10. **Balasubramanian, V., W. Guo - Zhi, E. Wiegeshaus, and D. Smith.** 1992. Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* for guinea pigs: a quantitative modification of the assay developed by Mitchison. Tuber.Lung Dis. 73:268-272.

11. **Barczak, A. K., P. Domenech, H. I. Boshoff, M. B. Reed, C. Manca, G. Kaplan, and C. E. Barry, III.** 2005. In vivo phenotypic dominance in mouse mixed infections with *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. J.Infect.Dis. 192:600-606.

12. **Bifani, P. J., B. Mathema, N. E. Kurepina, and B. N. Kreiswirth.** 2002. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W - Beijing family strains. Trends Microbiol. 10:45-52.

13. **Blanc - Potard, A. B., and B. Lafay.** 2003. MgtC as a horizontally - acquired virulence factor of intracellular bacterial pathogens: evidence from molecular phylogeny and comparative genomics. J.Mol.Evol. 57:479-486.

14. **Brodhun, B., D. Altmann, and W. Haas.** 2009. RKI - Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2007. Robert Koch Institut, Berlin.

15. **Brosch, R., S. V. Gordon, M. Marmiesse, P. Brodin, C. Buchrieser, K. Eiglmeier, T. Garnier, C. Gutierrez, G. Hewinson, K. Kremer, L. M. Parsons, A. S. Pym, S. Samper, D. van Soolingen, and S. T. Cole.** 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 99:3684-3689.

16. **Brudey, K., J. R. Driscoll, L. Rigouts, W. M. Prodinger, A. Gori, S. A. Al - Hajoj, C. Allix, L. Aristimuno, J. Arora, V. Baumanis, L. Binder, P. Cafrune, A. Cataldi, S. Cheong, R. Diel, C. Ellermeier, J. T. Evans, M. Fauville-Dufaux, S. Ferdinand, D. Garcia de Viedma, C. Garzelli, L. Gazzola, H. M. Gomes, M. C. Guttierez, P. M. Hawkey, P. D. van Helden, G. V. Kadival, B. N. Kreiswirth, K. Kremer, M. Kubin, S. P. Kulkarni, B. Liens, T. Lillebaek, M. L. Ho, C. Martin, C. Martin, I. Mokrousov, O. Narvskaia, Y. F. Ngeow, L. Naumann, S. Niemann, I. Parwati, Z. Rahim, V. Rasolofo - Razanamparany, T. Rasolonavalona, M. L. Rossetti, S. Ruesch - Gerdes, A. Sajduda, S. Samper, I. G. Shemyakin, U. B. Singh, A. Somoskovi, R. A. Skuce, D. van Soolingen, E. M. Streicher, P. N. Suffys, E. Tortoli, T. Tracevska, V. Vincent, T. C. Victor, R. M. Warren, S. F. Yap, K. Zaman, F. Portaels, N. Rastogi, and C. Sola.** 2006. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC.Microbiol. 6:23.

17. **Brudney, K., and J. Dobkin.** 1991. Resurgent tuberculosis in New York City. Human immunodeficiency virus, homelessness, and the decline of tuberculosis control programs. Am.Rev.Respir.Dis. 144:745-749.

18. **Buchmeier, N., A. Blanc - Potard, S. Ehrt, D. Piddington, L. Riley, and E. A. Groisman.** 2000. A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *Mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica*. Mol.Microbiol. 35:1375-1382.

19. **Buu, T. N., M. N. Huyen, N. T. Lan, H. T. Quy, N. V. Hen, M. Zignol, M. W. Borgdorff, F. G. Cobelens, and D. van Soolingen.** 2009. The Beijing genotype is associated with young age and multidrug - resistant tuberculosis in rural Vietnam. Int.J.Tuberc.Lung Dis. 13:900-906.

20. **Caws, M., G. Thwaites, K. Stepniewska, T. N. Nguyen, T. H. Nguyen, T. P. Nguyen, N. T. Mai, M. D. Phan, H. L. Tran, T. H. Tran, D. van Soolingen, K. Kremer, V. V. Nguyen, T. C. Nguyen, and J. Farrar.** 2006. Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is significantly associated with human immunodeficiency virus infection and multidrug resistance in cases of tuberculous meningitis. J.Clin.Microbiol. 44:3934-3939.

21. **Chacon - Salinas, R., J. Serafin - Lopez, R. Ramos - Payan, P. Mendez - Aragon, R. Hernandez - Pando, D. van Soolingen, L. Flores - Romo, S. Estrada - Parra, and I. Estrada - Garcia.** 2005. Differential pattern of cytokine expression by macrophages infected in vitro with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. Clin.Exp.Immunol. 140:443-449.

22. **Check, E.** 2007. After decades of drought, new drug possibilities flood TB pipeline. Nat.Med. 13:266.

23. **Chernousova, L. N., S. N. Andreevskaia, T. G. Smirnova, Z. S. Zemskova, and E. E. Larionova.** 2008. Biological properties of *M. tuberculosis* W cluster strains. Probl.Tuberk.Bolezn.Legk. 45-50.

24. **Choudhary, R. K., S. Mukhopadhyay, P. Chakhaiyar, N. Sharma, K. J. Murthy, V. M. Katoch, and S. E. Hasnain.** 2003. PPE antigen Rv2430c of *Mycobacterium tuberculosis* induces a strong B - cell response. Infect.Immun. 71:6338-6343.

25. **Cohen, T., C. Colijn, and M. Murray.** 2008. Modeling the effects of strain diversity and mechanisms of strain competition on the potential performance of new tuberculosis vaccines. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 105:16302-16307.

26. **Cole, S. T.** 1998. Comparative mycobacterial genomics. Curr.Opin.Microbiol. 1:567-571.

27. **Cole, S. T., and B. G. Barrell.** 1998. Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Novartis.Found.Symp. 217:160-172.

28. **Collins, F. M., and M. M. Smith.** 1969. A comparative study of the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* measured in mice and guinea pigs. Am.Rev.Respir.Dis. 100:631-639.

29. **Comas, I., and S. Gagneux.** 2009. The past and future of tuberculosis research. PLoS.Pathog. 5:e1000600.

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

31. **Cvetnic, Z., S. Spicic, M. Benic, V. Katalinic - Jankovic, M. Pate, B. Krt, and M. Ocepek.** 2007. Mycobacterial infection of pigs in Croatia. Acta Vet.Hung. 55:1-9.

32. **de Jong, B. C., P. C. Hill, A. Aiken, T. Awine, M. Antonio, I. M. Adetifa, D. J. Jackson - Sillah, A. Fox, K. DeRiemer, S. Gagneux, M. W. Borgdorff, K. P. McAdam, T. Corrah, P. M. Small, and R. A. Adegbola.** 2008. Progression to active tuberculosis, but not transmission, varies by *Mycobacterium tuberculosis* lineage in The Gambia. J.Infect.Dis. 198:1037-1043.

33. **De Voss, J. J., K. Rutter, B. G. Schroeder, H. Su, Y. Zhu, and C. E. Barry, III.** 2000. The salicylate - derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 97:1252-1257.

34. **Deitsch, K. W.** 2009. A mark of silence in malaria parasites. Cell Host.Microbe 5:112-113.

35. **Deutsches Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose.** 2009. DZK 32. Informationsbericht. Berlin.

36. **Dolin J. P., M. C. Raviglione, and A. Kochi.** 1993. A review of current epidemiological data and estimation of future tuberculosis incidence and mortality. WHO.

37. **Dormann, K. L., and R. Bruckner.** 2007. Variable synthesis of the optically active thiotetronic acid antibiotics thiolactomycin, thiotetromycin, and 834 - B1. Angew.Chem.Int.Ed Engl. 46:1160-1163.

38. **Dormans, J., M. Burger, D. Aguilar, R. Hernandez - Pando, K. Kremer, P. Roholl, S. M. Arend, and D. van Soolingen.** 2004. Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model. Clin.Exp.Immunol. 137:460-468.

39. **Downing, K. J., V. V. Mischenko, M. O. Shleeva, D. I. Young, M. Young, A. S. Kaprelyants, A. S. Apt, and V. Mizrahi.** 2005. Mutants of *Mycobacterium tuberculosis* lacking three of the five rpf - like genes are defective for growth in vivo and for resuscitation in vitro. Infect.Immun. 73:3038-3043.

40. **Doz, E., S. Rose, N. Court, S. Front, V. Vasseur, S. Charron, M. Gilleron, G. Puzo, I. Fremaux, Y. Delneste, F. Erard, B. Ryffel, O. R. Martin, and V. F. Quesniaux.** 2009. Mycobacterial phosphatidylinositol mannosides negatively regulate host Toll - like receptor 4, MyD88 - dependent proinflammatory cytokines, and TRIF - dependent co - stimulatory molecule expression. J.Biol.Chem. 284:23187-23196.

41. **Driessen, N. N., R. Ummels, J. J. Maaskant, S. S. Gurcha, G. S. Besra, G. D. Ainge, D. S. Larsen, G. F. Painter, C. M. Vandenbroucke - Grauls, J. Geurtsen, and B. J. Appelmelk.** 2009. Role of phosphatidylinositol mannosides in the interaction between mycobacteria and DC-SIGN. Infect.Immun. 77:4538-4547.

42. **Ehlers, S.** 2003. Role of tumour necrosis factor (TNF) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF. Ann.Rheum.Dis. 62 Suppl 2:ii37-ii42.

43. **Ehlers, S.** 2009. DC - SIGN and mannosylated surface structures of *Mycobacterium tuberculosis:* a deceptive liaison. Eur.J.Cell Biol. [Epub ahead of print].

44. **Eker, B., J. Ortmann, G. B. Migliori, G. Sotgiu, R. Muetterlein, R. Centis, H. Hoffmann, D. Kirsten, T. Schaberg, S. Ruesch - Gerdes, and C. Lange.** 2008. Multidrug - and extensively drug - resistant tuberculosis, Germany. Emerg.Infect.Dis. 14:1700-1706.

45. **Engele, M., E. Stossel, K. Castiglione, N. Schwerdtner, M. Wagner, P. Bolcskei, M. Rollinghoff, and S. Stenger.** 2002. Induction of TNF in human alveolar macrophages as a potential evasion mechanism of virulent *Mycobacterium tuberculosis.* J.Immunol. 168:1328-1337.

46. **Espie, I. W., T. M. Hlokwe, N. C. Gey van Pittius, E. Lane, A. S. Tordiffe, A. L. Michel, A. Muller, A. Kotze, and P. D. van Helden.** 2009. Pulmonary infection due to *Mycobacterium bovis* in a black rhinoceros (Diceros bicornis minor) in South Africa. J.Wildl.Dis. 45:1187-1193.

47. **Filliol, I., A. S. Motiwala, M. Cavatore, W. Qi, M. H. Hazbon, M. Bobadilla del Valle, J. Fyfe, L. Garcia - Garcia, N. Rastogi, C. Sola, T. Zozio, M. I. Guerrero, C. I. Leon, J. Crabtree, S. Angiuoli, K. D. Eisenach, R. Durmaz, M. L. Joloba, A. Rendon, J. Sifuentes - Osornio, A. Ponce de León, M. D. Cave, R. Fleischmann, T. S. Whittam, and D. Alland.** 2006. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. J.Bacteriol. 188:759-772.

48. **Fleischmann, R. D., D. Alland, J. A. Eisen, L. Carpenter, O. White, J. Peterson, R. DeBoy, R. Dodson, M. Gwinn, D. Haft, E. Hickey, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, L. A. Umayam, M. Ermolaeva, S. L. Salzberg, A. Delcher, T. Utterback, J. Weidman, H. Khouri, J. Gill, A. Mikula, W. Bishai, J. W. Jacobs, Jr., J. C. Venter, and C. M. Fraser.** 2002. Whole - genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. J.Bacteriol. 184:5479-5490.

49. **Flynn, J. L., M. M. Goldstein, J. Chan, K. J. Triebold, K. Pfeffer, C. J. Lowenstein, R. Schreiber, T. W. Mak, and B. R. Bloom.** 1995. Tumor necrosis factor - alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Immunity. 2:561-572.

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

51. **Frank, W., E. C. Reisinger, W. Brandt - Hamerla, I. Schwede, and W. Handrick.** 2009. *Mycobacterium microti* - pulmonary tuberculosis in an immunocompetent patient. Wien.Klin.Wochenschr. 121:282-286.

52. **Fux, C. A., M. Shirtliff, P. Stoodley, and J. W. Costerton.** 2005. Can laboratory reference strains mirror "real-world" pathogenesis? Trends Microbiol. 13:58-63.

53. **Gagneux, S.** 2009. Strain Variation and Evolution. In: Parish T., and A. Brown, (Hrsg): Mycobacterium Genomics and Molecular Biology. Caister Academic Press, Norfolk, UK, 1-18.

54. **Gagneux, S., M. V. Burgos, K. DeRiemer, A. Encisco, S. Munoz, P. C. Hopewell, P. M. Small, and A. S. Pym.** 2006. Impact of bacterial genetics on the transmission of isoniazid - resistant *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS.Pathog. 2:e61.

55. **Gagneux, S., K. DeRiemer, T. Van, M. Kato - Maeda, B. C. de Jong, S. Narayanan, M. Nicol, S. Niemann, K. Kremer, M. C. Gutierrez, M. Hilty, P. C. Hopewell, and P. M. Small.** 2006. Variable host - pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 103:2869-2873.

56. **Gandhi, N. R., A. Moll, A. W. Sturm, R. Pawinski, T. Govender, U. Lalloo, K. Zeller, J. Andrews, and G. Friedland.** 2006. Extensively drug - resistant tuberculosis as a cause of death in patients co - infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. Lancet 368:1575-1580.

57. **Gao, Q., K. E. Kripke, A. J. Saldanha, W. Yan, S. Holmes, and P. M. Small.** 2005. Gene expression diversity among *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Microbiology 151:5-14.

58. **Garnier, T., K. Eiglmeier, J. C. Camus, N. Medina, H. Mansoor, M. Pryor, S. Duthoy, S. Grondin, C. Lacroix, C. Monsempe, S. Simon, B. Harris, R. Atkin, J. Doggett, R. Mayes, L. Keating, P. R. Wheeler, J. Parkhill, B. G. Barrell, S. T. Cole, S. V. Gordon, and R. G. Hewinson.** 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 100:7877-7882.

59. **Goh, K. S., N. Rastogi, M. Berchel, R. C. Huard, and C. Sola.** 2005. Molecular evolutionary history of tubercle bacilli assessed by study of the polymorphic nucleotide within the nitrate reductase (narGHJI) operon promoter. J.Clin.Microbiol. 43:4010-4014.

60. **Golby, P., K. A. Hatch, J. Bacon, R. Cooney, P. Riley, J. Allnutt, J. Hinds, J. Nunez, P. D. Marsh, R. G. Hewinson, and S. V. Gordon.** 2007. Comparative transcriptomics reveals key gene expression differences between the human and bovine pathogens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiology 153:3323-3336.

61. **Gordon, S., S. Keshav, and M. Stein.** 1994. BCG - induced granuloma formation in murine tissues. Immunobiology 191:369-377.

62. **Gordon, S. V., R. Brosch, A. Billault, T. Garnier, K. Eiglmeier, and S. T. Cole.** 1999. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. Mol.Microbiol. 32:643-655.

63. **Goren, M. B., O. Brokl, and W. B. Schaefer.** 1974. Lipids of putative relevance to virulence in *Mycobacterium tuberculosis:* correlation of virulence with elaboration of sulfatides and strongly acidic lipids. Infect.Immun. 9:142-149.

64. **Goren, M. B., O. Brokl, and W. B. Schaefer.** 1974. Lipids of putative relevance to virulence in *Mycobacterium tuberculosis:* phthiocerol dimycocerosate and the attenuation indicator lipid. Infect.Immun. 9:150-158.

65. **Guenin - Mace, L., R. Simeone, and C. Demangel.** 2009. Lipids of pathogenic Mycobacteria: contributions to virulence and host immune suppression. Transbound.Emerg.Dis. 56:255-268.

66. **Gutacker, M. M., B. Mathema, H. Soini, E. Shashkina, B. N. Kreiswirth, E. A. Graviss, and J. M. Musser.** 2006. Single - nucleotide polymorphism - based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites. J.Infect.Dis. 193:121-128.

67. **Gutacker, M. M., J. C. Smoot, C. A. Migliaccio, S. M. Ricklefs, S. Hua, D. V. Cousins, E. A. Graviss, E. Shashkina, B. N. Kreiswirth, and J. M. Musser.** 2002. Genome - wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. Genetics 162:1533-1543.

68. **Gutierrez, M. C., S. Brisse, R. Brosch, M. Fabre, B. Omais, M. Marmiesse, P. Supply, and V. Vincent.** 2005. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis.* PLoS.Pathog. 1:e5.

69. **Hauer, B., and R. Loddenkemper.** 1999. Epidemiologie der Tuberkulose (Teil 1). In: Konietzko, N., and R. Loddenkemper, (Hrsg): Tuberkulose. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 24-44.

70. **Hershberg, R., M. Lipatov, P. M. Small, H. Sheffer, S. Niemann, S. Homolka, J. C. Roach, K. Kremer, D. A. Petrov, M. W. Feldman, and S. Gagneux.** 2008. High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. PLoS.Biol. 6:e311.

71. **Hirsh, A. E., A. G. Tsolaki, K. DeRiemer, M. W. Feldman, and P. M. Small.** 2004. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 101:4871-4876.

72. **Holt, K. E., J. Parkhill, C. J. Mazzoni, P. Roumagnac, F. X. Weill, I. Goodhead, R. Rance, S. Baker, D. J. Maskell, J. Wain, C. Dolecek, M. Achtman, and G. Dougan.** 2008. High - throughput sequencing provides insights into genome variation and evolution in *Salmonella Typhi*. Nat.Genet. 40:987-993.

73. **Homolka, S., C. Köser, J. Archer, S. Ruesch - Gerdes, and S. Niemann.** 2009. Single - nucleotide polymorphisms in Rv2629 are specific for *Mycobacterium tuberculosis* genotypes Beijing and Ghana but not associated with rifampin resistance. J Clin Microbiol. 47, 223-226.

74. **Homolka, S., E. Post, B. Oberhauser, A. G. George, L. Westman, F. Dafae, S. Ruesch - Gerdes, and S. Niemann.** 2008. High genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from Sierra Leone. BMC.Microbiol. 8:103.

75. **Intemann, C. D., T. Thye, S. Niemann, E. N. Browne, C. M. Amanua, A. Enimil, J. Gyapong, I. Osei, E. Owusu - Dabo, S. Helm, S. Ruesch - Gerdes, R. D. Horstmann, and C. G. Meyer.** 2009. Autophagy gene variant IRGM -261T contributes to protection from tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* but not by *M. africanum* strains. PLoS.Pathog. 5:e1000577.

76. **Jarlier, V., L. Gutmann, and H. Nikaido.** 1991. Interplay of cell wall barrier and beta - lactamase activity determines high resistance to beta - lactam antibiotics in *Mycobacterium chelonae.* Antimicrob.Agents Chemother. 35:1937-1939.

77. **Joshi, S. M., A. K. Pandey, N. Capite, S. M. Fortune, E. J. Rubin, and C. M. Sassetti.** 2006. Characterization of mycobacterial virulence genes through genetic interaction mapping. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 103:11760-11765.

78. **Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and J. van Embden.** 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J.Clin.Microbiol. 35:907-914.

79. **Kana, B. D., B. G. Gordhan, K. J. Downing, N. Sung, G. Vostroktunova, E. E. Machowski, L. Tsenova, M. Young, A. Kaprelyants, G. Kaplan, and V. Mizrahi.** 2008. The resuscitation - promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro. Mol.Microbiol. 67:672-684.

80. **Kana, B. D., and V. Mizrahi.** 2009. Resuscitation - promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling. FEMS Immunol.Med.Microbiol. [Epub ahead of print]

81. **Keane, J., S. Gershon, R. P. Wise, E. Mirabile - Levens, J. Kasznica, W. D. Schwieterman, J. N. Siegel, and M. M. Braun.** 2001. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha - neutralizing agent. N.Engl.J.Med. 345:1098-1104.

82. **Keane, J., H. G. Remold, and H. Kornfeld.** 2000. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. J.Immunol. 164:2016-2020.

83. **Keating, L. A., P. R. Wheeler, H. Mansoor, J. K. Inwald, J. Dale, R. G. Hewinson, and S. V. Gordon.** 2005. The pyruvate requirement of some members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is due to an inactive pyruvate kinase: implications for in vivo growth. Mol.Microbiol. 56:163-174.

84. **Keep, N. H., J. M. Ward, M. Cohen - Gonsaud, and B. Henderson.** 2006. Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non - growth states. Trends Microbiol. 14:271-276.

85. **Kell, D. B., A. S. Kaprelyants, D. H. Weichart, C. R. Harwood, and M. R. Barer.** 1998. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. Antonie Van Leeuwenhoek 73:169-187.

86. **Kendall, S. L., S. C. Rison, F. Movahedzadeh, R. Frita, and N. G. Stoker.** 2004. What do microarrays really tell us about *M. tuberculosis*? Trends Microbiol. 12:537-544.

87. **Kiers, A., A. Klarenbeek, B. Mendelts, D. van Soolingen, and G. Koeter.** 2008. Transmission of *Mycobacterium pinnipedii* to humans in a zoo with marine mammals. Int.J.Tuberc.Lung Dis. 12:1469-1473.

88. **Koltunov, V., C. L. Greenblatt, A. V. Goncharenko, G. R. Demina, B. Y. Klein, M. Young, and A. S. Kaprelyants.** 2009. Structural Changes and Cellular Localization of Resuscitation - Promoting Factor in Environmental Isolates of *Micrococcus luteus*. Microb.Ecol. [Epub ahead of print].

89. **Korbel, D. S., B. E. Schneider, and U. E. Schaible.** 2008. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. Microbes.Infect. 10:995-1004.

90. **Kubica, T., S. Ruesch - Gerdes, and S. Niemann.** 2003. *Mycobacterium bovis* subsp. caprae caused one - third of human *M. bovis* - associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. J.Clin.Microbiol. 41:3070-3077.

91. **Kumar, A., J. C. Toledo, R. P. Patel, J. R. Lancaster, Jr., and A. J. Steyn.** 2007. *Mycobacterium tuberculosis* DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 104:11568-11573.

92. **Kumar, P., D. Kumar, A. Parikh, D. Rananaware, M. Gupta, Y. Singh, and V. K. Nandicoori.** 2009. The *Mycobacterium tuberculosis* protein kinase K modulates activation of transcription from the promoter of mycobacterial monooxygenase operon through phosphorylation of the transcriptional regulator VirS. J.Biol.Chem. 284:11090-11099.

93. **Lehmann, I. R., and A. L. Nussbaum.** 1964. The desoxyribonucleases of *Escheria coli.* J.Biol.Chem. 239, 2628-2636.

94. **Li, Q., C. C. Whalen, J. M. Albert, R. Larkin, L. Zukowski, M. D. Cave, and R. F. Silver.** 2002. Differences in rate and variability of intracellular growth of a panel of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates within a human monocyte model. Infect.Immun. 70:6489-6493.

95. **Linz B., F. Balloux, Y. Moodley, A. Manica, H. Liu, P. Roumagnac, D. Falush, C. Stamer, F. Prugnolle, S. W. van der Merwe, Y. Yamaoka, D. Y. Graham, E. Perez-Trallero, T. Wadstrom, S. Suerbaum, and M. Achtman.** 2007. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. Nature. 445(7130):915-918.

96. **Lopez, B., D. Aguilar, H. Orozco, M. Burger, C. Espitia, V. Ritacco, L. Barrera, K. Kremer, R. Hernandez-Pando, K. Huygen, and D. van Soolingen.** 2003. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. Clin.Exp.Immunol. 133:30-37.

97. **MacMicking, J. D., R. J. North, R. LaCourse, J. S. Mudgett, S. K. Shah, and C. F. Nathan.** 1997. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 94:5243-5248.

98. **Malik, A. N., and P. Godfrey - Faussett.** 2005. Effects of genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* strains on the presentation of disease. Lancet Infect.Dis. 5:174-183.

99. **Manabe, Y. C., A. M. Dannenberg, Jr., S. K. Tyagi, C. L. Hatem, M. Yoder, S. C. Woolwine, B. C. Zook, M. L. Pitt, and W. R. Bishai.** 2003. Different strains of *Mycobacterium tuberculosis* cause various spectrums of disease in the rabbit model of tuberculosis. Infect.Immun. 71:6004-6011.

100. **Manca, C., M. B. Reed, S. Freeman, B. Mathema, B. Kreiswirth, C. E. Barry, III, and G. Kaplan.** 2004. Differential monocyte activation underlies strain - specific *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. Infect.Immun. 72:5511-5514.

101. **Manca, C., L. Tsenova, A. Bergtold, S. Freeman, M. Tovey, J. M. Musser, C. E. Barry, III, V. H. Freedman, and G. Kaplan.** 2001. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN - alpha/beta. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98:5752-5757.

102. **Manca, C., L. Tsenova, S. Freeman, A. K. Barczak, M. Tovey, P. J. Murray, C. Barry, and G. Kaplan.** 2005. Hypervirulent *M. tuberculosis* W/Beijing strains upregulate type I IFNs and increase expression of negative regulators of the Jak - Stat pathway. J.Interferon Cytokine Res. 25:694-701.

103. **Marquina - Castillo, B., L. Garcia - Garcia, A. Ponce - de - Leon, M. E. Jimenez - Corona, V. M. Bobadilla - Del, B. Cano - Arellano, S. Canizales - Quintero, A. Martinez - Gamboa, M. Kato - Maeda, B. Robertson, D. Young, P. Small, G. Schoolnik, J. Sifuentes - Osornio, and R. Hernandez - Pando.** 2009. Virulence, immunopathology and transmissibility of selected strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. Immunology 128:123-133.

104. **McNeil, M., M. Daffe, and P. J. Brennan.** 1991. Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria. J.Biol.Chem. 266:13217-13223.

105. **Miner, M. D., J. C. Chang, A. K. Pandey, C. M. Sassetti, and D. R. Sherman.** 2009. Role of cholesterol in *Mycobacterium tuberculosis* infection. Indian J.Exp.Biol. 47:407-411.

106. **Mootoo, A., E. Stylianou, M. A. Arias, and R. Reljic.** 2009. TNF - alpha in tuberculosis: a cytokine with a split personality. Inflamm.Allergy Drug Targets. 8:53-62.

107. **Musser, J. M.** 1995. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. Clin.Microbiol.Rev. 8:496-514.

108. **Musser, J. M., A. Amin, and S. Ramaswamy.** 2000. Negligible genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* host immune system protein targets: evidence of limited selective pressure. Genetics 155:7-16.

109. **Naganathan, N., B. Mahadev, V. K. Challu, R. Rajalakshmi, and B. Jones.** 1986. Virulence of tubercle bacilli isolated from patients with tuberculosis in Bangalore, India. Tubercle. 67:261-267.

110. **Nerlich, A. G., C. J. Haas, A. Zink, U. Szeimies, and H. G. Hagedorn.** 1997. Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy. Lancet 350:1404.

111. **Nicol, M. P., and R. J. Wilkinson.** 2008. The clinical consequences of strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg. 102:955-965.

112. **Niemann, S., T. Kubica, F. C. Bange, O. Adjei, E. N. Browne, M. A. Chinbuah, R. Diel, J. Gyapong, R. D. Horstmann, M. L. Joloba, C. G. Meyer, R. D. Mugerwa, A. Okwera, I. Osei, E. Owusu - Darbo, S. K. Schwander, and S. Ruesch - Gerdes.** 2004. The species *Mycobacterium africanum* in the light of new molecular markers. J.Clin.Microbiol. 42:3958-3962.

113. **Niemann, S., E. Richter, and S. Ruesch - Gerdes.** 2000. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide - susceptible subtypes of *M. bovis*. J.Clin.Microbiol. 38:152-157.

114. **Niemann, S., E. Richter, H. Daluegge - Tamm, H. Schlesinger, D. Graupner, B. Konigstein, G. Gurath, U. Greinert, and S. Ruesch-Gerdes.** 2000. Two cases of *Mycobacterium microti* derived tuberculosis in HIV - negative immunocompetent patients. Emerg.Infect.Dis. 6:539-542.

115. **Nikaido, H., and V. Jarlier.** 1991. Permeability of the mycobacterial cell wall. Res.Microbiol. 142:437-443.

116. **Nunez Martinez. O., C. Ripoll Noiseux, J. A. Carneros Martin, V. Gonzalez Lara, and H. G. Gregorio Maranon.** 2001. Reactivation tuberculosis in a patient with anti - TNF - alpha treatment. Am.J.Gastroenterol. 96:1665-1666.

117. **Old, L. J.** 1988. Tumor necrosis factor. Sci.Am. 258:59-75.

118. **Pagel, G.** 1927. Die Krankheitslehre der Phthise in Phasen ihrer geschichtlichen Entwicklung. Brauers Beitr. 66, 66-78.

119. **Palanisamy, G. S., N. DuTeau, K. D. Eisenach, D. M. Cave, S. A. Theus, B. N. Kreiswirth, R. J. Basaraba, and I. M. Orme.** 2009. Clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* display a wide range of virulence in guinea pigs. Tuberculosis.(Edinb.) 89:203-209.

120. **Pandey, A. K., and C. M. Sassetti.** 2008. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 105:4376-4380.

121. **Pate, M., T. Svara, M. Gombac, T. Paller, M. Zolnir-Dovc, I. Emersic, W. M. Prodinger, M. Bartos, I. Zdovc, B. Krt, I. Pavlik, Z. Cvetnic, M. Pogacnik, and M. Ocepek.** 2006. Outbreak of tuberculosis caused by *Mycobacterium caprae* in a zoological garden. J.Vet.Med.B Infect.Dis.Vet.Public Health 53:387-392.

122. **Petrelli, D., S. M. Kaushal, J. Wolfe, A. Al - Azem, E. Hershfield, and A. Kabani.** 2004. Strain - related virulence of the dominant *Mycobacterium tuberculosis* strain in the Canadian province of Manitoba. Tuberculosis.(Edinb.) 84:317-326.

123. **Pfyffer, G. E., R. Auckenthaler, J. D. van Embden, and D. van Soolingen.** 1998. *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. Emerg.Infect.Dis. 4:631-634.

124. **Pieters, J.** 2008. *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance. Cell Host.Microbe 3:399-407.

125. **Plinke, C., S. Ruesch - Gerdes, and S. Niemann.** 2006. Significance of mutations in embB codon 306 for prediction of ethambutol resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Antimicrob.Agents Chemother. 50:1900-1902.

126. **Ramaswamy, S. V., A. G. Amin, S. Goksel, C. E. Stager, S. J. Dou, S. H. El, S. L Moghazeh, B. N. Kreiswirth, and J. M. Musser.** 2000. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis.* Antimicrob.Agents Chemother. 44:326-336.

127. **Rang, C., E. Alix, C. Felix, A. Heitz, L. Tasse, and A. B. Blanc - Potard.** 2007. Dual role of the MgtC virulence factor in host and non - host environments. Mol.Microbiol. 63:605-622.

128. **Raviglione, M. C., H. L. Rieder, K. Styblo, A. G. Khomenko, K. Esteves, and A. Kochi.** 1994. Tuberculosis trends in eastern Europe and the former USSR. Tuber.Lung Dis. 75:400-416.

129. **Reed, M. B., P. Domenech, C. Manca, H. Su, A. K. Barczak, B. N. Kreiswirth, G. Kaplan, and C. E. Barry, III.** 2004. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. Nature 431:84-87.

130. **Reed, M. B., S. Gagneux, K. DeRiemer, P. M. Small, and C. E. Barry, III.** 2007. The W - Beijing lineage of *Mycobacterium tuberculosis* overproduces triglycerides and has the DosR dormancy regulon constitutively upregulated. J.Bacteriol. 189:2583-2589.

131. **Retamal, P., M. Castillo - Ruiz, and G. C. Mora.** 2009. Characterization of MgtC, a virulence factor of *Salmonella enterica* Serovar Typhi. PLoS.One. 4:e5551.

132. **Roumagnac, P., F. X. Weill, C. Dolecek, S. Baker, S. Brisse, N. T. Chinh, T. A. Le, C. J. Acosta, J. Farrar, G. Dougan, and M. Achtman.** 2006. Evolutionary history of *Salmonella typhi.* Science 314:1301-1304.

133. **Ruggiero, A., B. Tizzano, E. Pedone, C. Pedone, M. Wilmanns, and R. Berisio.** 2009. Crystal structure of the resuscitation - promoting factor (DeltaDUF)RpfB from *M. tuberculosis.* J.Mol.Biol. 385:153-162.

134. **Runyon, E. H.** 1974. Ten mycobacterial pathogens. Tubercle. 55:235-240.

135. **Russell, D. G.** 2001. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. Nat.Rev.Mol.Cell Biol. 2:569-577.

136. **Salo, W. L., A. C. Aufderheide, J. Buikstra, and T. A. Holcomb.** 1994. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre - Columbian Peruvian mummy. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 91:2091-2094.

137. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. Auflage 5.72.

138. **Santos, N., M. Correia - Neves, S. Ghebremichael, G. Kallenius, S. B. Svenson, and V. Almeida.** 2009. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in wild boar (Sus scrofa) from Portugal. J.Wildl.Dis. 45:1048-1061.

139. **Sassetti, C. M., D. H. Boyd, and E. J. Rubin.** 2003. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. Mol.Microbiol. 48:77-84.

140. **Savy nach Foes.** 1955. Hippokrates: Gesamelte Werke. Ed.du Fleuve, Lyon.

141. **Schaible, U. E., and S. H. Kaufmann.** 2004. Iron and microbial infection. Nat Rev Microbiol. 2(12), 946-953.

142. **Schaible, U. E., and S. H. Kaufmann.** 2005. A nutritive view on the host - pathogen interplay. Trends Microbiol. 13:373-380.

143. **Schnappinger, D., S. Ehrt, M. I. Voskuil, Y. Liu, J. A. Mangan, I. M. Monahan, G. Dolganov, B. Efron, P. D. Butcher, C. Nathan, and G. K. Schoolnik.** 2003. Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. J.Exp.Med. 198:693-704.

144. **Singh, A., R. Gupta, R. A. Vishwakarma, P. R. Narayanan, C. N. Paramasivan, V. D. Ramanathan, and A. K. Tyagi.** 2005. Requirement of the *mymA* operon for appropriate cell wall ultrastructure and persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in the spleens of guinea pigs. J.Bacteriol. 187:4173-4186.

145. **Singh, A., S. Jain, S. Gupta, T. Das, and A. K. Tyagi.** 2003. *mymA* operon of *Mycobacterium tuberculosis*: its regulation and importance in the cell envelope. FEMS Microbiol.Lett. 227:53-63.

146. **Sinsimer, D., G. Huet, C. Manca, L. Tsenova, M. S. Koo, N. Kurepina, B. Kana, B. Mathema, S. A. Marras, B. N. Kreiswirth, C. Guilhot, and G. Kaplan.** 2008. The phenolic glycolipid of *Mycobacterium tuberculosis* differentially modulates the early host cytokine response but does not in itself confer hypervirulence. Infect.Immun. 76:3027-3036.

147. **Smith, N. H., T. Crawshaw, J. Parry, and R. J. Birtles.** 2009. *Mycobacterium microti:* More diverse than previously thought. J.Clin.Microbiol. 47:2551-2559.

148. **Smith, N. H., R. G. Hewinson, K. Kremer, R. Brosch, and S. V. Gordon.** 2009. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis.* Nat.Rev.Microbiol. 7:537-544.

149. **Sohaskey, C. D., and L. Modesti.** 2009. Differences in nitrate reduction between *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* are due to differential expression of both narGHJI and narK2. FEMS Microbiol Lett. 290(2), 129-134.

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

151. **Sreevatsan, S., X. Pan, K. E. Stockbauer, N. D. Connell, B. N. Kreiswirth, T. S. Whittam, and J. M. Musser.** 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 94:9869-9874.

152. **Stermann, M., A. Bohrssen, C. Diephaus, S. Maass, and F. C. Bange.** 2003. Polymorphic nucleotide within the promoter of nitrate reductase (NarGHJI) is specific for *Mycobacterium tuberculosis.* J.Clin.Microbiol. 41:3252-3259.

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

154. **Supply, P., C. Allix, S. Lesjean, M. Cardoso - Oelemann, S. Ruesch - Gerdes, E. Willery, E. Savine, P. de Haas, H. van Deutekom, S. Roring, P. Bifani, N. Kurepina, B. Kreiswirth, C. Sola, N. Rastogi, V. Vatin, M. C. Gutierrez, M. Fauville, S. Niemann, R. Skuce, K. Kremer, C. Locht, and D. van Soolingen.** 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit - variable - number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis.* J.Clin.Microbiol. 44:4498-4510.

155. **Supply, P., R. M. Warren, A. L. Banuls, S. Lesjean, G. D. van der Spuy, L. A. Lewis, M. Tibayrenc, P. D. van Helden, and C. Locht.** 2003. Linkage disequilibrium between minisatellite loci supports clonal evolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis incidence area. Mol.Microbiol. 47:529-538.

156. **Tanveer, M., Z. Hasan, A. Kanji, R. Hussain, and R. Hasan.** 2009. Reduced TNF - alpha and IFN-gamma responses to Central Asian strain 1 and Beijing isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in comparison with H37Rv strain. Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg. 103:581-587.

157. **Telkov, M. V., G. R. Demina, S. A. Voloshin, E. G. Salina, T. V. Dudik, T. N. Stekhanova, G. V. Mukamolova, K. A. Kazaryan, A. V. Goncharenko, M. Young, and A. S. Kaprelyants.** 2006. Proteins of the Rpf (resuscitation promoting factor) family are peptidoglycan hydrolases. Biochemistry (Mosc.) 71:414-422.

158. **Teschner, M.** 1999. Geschichte der Tuberkulose. In: Konietzko, N., and R. Loddenkemper, (Hrsg): Tuberkulose. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1-23.

159. **Theus, S., K. Eisenach, N. Fomukong, R. F. Silver, and M. D. Cave.** 2007. Beijing family *Mycobacterium tuberculosis* strains differ in their intracellular growth in THP - 1 macrophages. Int.J.Tuberc.Lung Dis. 11:1087-1093.

160. **Theus, S. A., M. D. Cave, and K. D. Eisenach.** 2005. Intracellular macrophage growth rates and cytokine profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains with different transmission dynamics. J.Infect.Dis. 191:453-460.

161. **Thwaites, G., M. Caws, T. T. Chau, A. D'Sa, N. T. Lan, M. N. Huyen, S. Gagneux, P. T. Anh, D. Q. Tho, E. Torok, N. T. Nhu, N. T. Duyen, P. M. Duy, J. Richenberg, C. Simmons, T. T. Hien, and J. Farrar.** 2008. Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* genotype and the clinical phenotype of pulmonary and meningeal tuberculosis. J.Clin.Microbiol. 46:1363-1368.

162. **Tsolaki, A. G., A. E. Hirsh, K. DeRiemer, J. A. Enciso, M. Z. Wong, M. Hannan, Goguet de la Salmoniere YO, K. Aman, M. Kato - Maeda, and P. M. Small.** 2004. Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis:* insights from genomic deletions in 100 strains. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 101:4865-4870.

163. **Tundup, S., N. Pathak, M. Ramanadham, S. Mukhopadhyay, K. J. Murthy, N. Z. Ehtesham, and S. E. Hasnain.** 2008. The co - operonic PE25/PPE41 protein complex of *Mycobacterium tuberculosis* elicits increased humoral and cell mediated immune response. PLoS.One. 3:e3586.

164. **Ulrichs, T., and S. H. .E. Kaufmann.** 2003. Immunologie der Tuberkulose - Konsequenzen für die Impfstoffentwicklung. Internist 44, 1374-1384.

165. **van Der Spuy, G. D., K. Kremer, S. L. Ndabambi, N. Beyers, R. Dunbar, B. J. Marais, P. D. van Helden, and R. M. Warren.** 2009. Changing *Mycobacterium tuberculosis* population highlights clade - specific pathogenic characteristics. Tuberculosis.(Edinb.) 89:120-125.

166. **van Embden, J. D., M. D. Cave, J. T. Crawford, J. W. Dale, K. D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, T. M. Shinnick, and *et al*.** 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J.Clin.Microbiol. 31:406-409.

167. **van Soolingen, D., T. Hoogenboezem, P. E. de Haas, P. W. Hermans, M. A. Koedam, K. S. Teppema, P. J. Brennan, G. S. Besra, F. Portaels, J. Top, L. M. Schouls, and J. D. van Embden.** 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canettii: characterization of an exceptional isolate from Africa. Int.J.Syst.Bacteriol. 47:1236-1245.

168. **Virtanen, S.** 1960. A study of nitrate reduction by mycobacteria. The use of the nitrate reduction test in the identification of mycobacteria. Acta Tuberc.Scand.Suppl 48:1-119.

169. **Voskuil, M. I., K. C. Visconti, and G. K. Schoolnik.** 2004. *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during adaptation to stationary phase and low - oxygen dormancy. Tuberculosis.(Edinb.) 84:218-227.

170. **Walburger, A., A. Koul, G. Ferrari, L. Nguyen, C. Prescianotto-Baschong, K. Huygen, B. Klebl, C. Thompson, G. Bacher, and J. Pieters.** 2004. Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. Science 304:1800-1804.

171. **Weinberg, E. D.** 1974. Iron and susceptibility to infectious disease. Science 184:952-956.

172. **WHO.** 2009. Global tuberculosis control - epidemiology, strategy, financing. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/

173. **WHO.** 1999. What is DOTS? A guide to understanding the WHO - recommended TB control strategy known as DOTS.

174. **WHO.** 2003. Treatment of tuberculosis: Guidelines for national programmes.

175. **WHO.** 2006. THE STOP TB STRATEGY Building on and enhancing DOTS to meet the TB - related Millennium Development Goals.

176. **WHO.** 2008. ANTI - TUBERCULOSIS DRUG RESISTANCE IN THE WORLD Fourth Global Report.

177. **Wirth, T., F. Hildebrand, C. Allix - Beguec, F. Wolbeling, T. Kubica, K. Kremer, D. van Soolingen, S. Ruesch - Gerdes, C. Locht, S. Brisse, A. Meyer, P. Supply, and S. Niemann.** 2008. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. PLoS.Pathog. 4:e1000160.

178. **Wong, K. C., W. M. Leong, H. K. Law, K. F. Ip, J. T. Lam, K. Y. Yuen, P. L. Ho, W. S. Tse, X. H. Weng, W. H. Zhang, S. Chen, and W. C. Yam.** 2007. Molecular characterization of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and their association with phenotypic virulence in human macrophages. Clin.Vaccine Immunol. 14:1279-1284.

179. **Young, D., T. Hussell, and G. Dougan.** 2002. Chronic bacterial infections: living with unwanted guests. Nat.Immunol. 3:1026-1032.

180. **Zhang, M., J. Gong, Z. Yang, B. Samten, M. D. Cave, and P. F. Barnes.** 1999. Enhanced capacity of a widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in human macrophages. J.Infect.Dis. 179:1213-1217.

181. **Zhang, Y.** 2004. Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis. Front Biosci. 9:1136-1156.

182. **Zhang, Y., and A. Telenti.** 2000. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: Hatfull G. F. and W. R. Jacobs, (Hrsg): Molecular genetics of mycobacteria. ASM Press, Washington, D.C. 235-254.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1 Ziehl - Neelsen Färbung eines Präparats aus der Reinkultur von *M. tuberculosis*. Die rot angefärbten Stäbchen bilden zopfartige Strukturen. (Quelle: eigenes Präparat). 3

Abb. 2.2 Weltweit geschätzte Tuberkulose - Inzidenz (Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner) für das Jahr 2007. (Quelle: WHO 2009 (172)). 4

Abb. 2.3 Aufbau der mykobakteriellen Zellwand. PIM: Phosphatidylinositol - Mannosid (Quelle: modifiziert nach http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit1; Dr. Gary Kaiser). 9

Abb. 2.4 Ähnlichkeitsstammbaum basierend auf MIRU - VNTR (24 Loci) und Spoligotypisierungsdaten (43 Spacer) von 36 Stämmen verschiedener Genotypen. (*UPGMA tree*; http://www.miru-vntrplus.org) Grün: *M. africanum*; Gelb: tierpathogene Erreger; Rot: *M. tuberculosis*; Blau: *M. canettii.* CAS: *Central Asian* Genotyp*;* EAI: *East African Indian* Genotyp; LAM: *Latin - American - Mediterranean* Genotyp. 11

Abb. 2.5 Globale Populationsstruktur und geographische Verteilung von MTBK Stämmen. (A) LSPs definieren sechs phylogenetische Hauptlinien. (B) Geographische Verteilung der sechs Hauptlinien. (Quelle: Comas *et al.* 2009 (29)). 13

Abb. 4.1. Phylogenetischer Baum basierend auf MIRU - VNTR (24 Loci) und Spoligotypisierungsdaten (43 Spacer) (http://www.miru-vntrplus.org). Repräsentative Vertreter von 18 unterschiedlichen Genotypen wurden in die Sequenzanalyse mit eingeschlossen. Die Strukturierung in zwei Hauptgruppen (Gruppe 1 und 2) ist deutlich zu erkennen. Hellblau: *M. tuberculosis* Linie 2; Dunkelblau: *M. tuberculosis* Linie 3; Rot: *Euro - American* Linie; Hellgrün: Referenzstamm H37Rv; Dunkelgrün: *M. aficanum* West African 1a und 1b Stämme; Braun: *M. africanum* West African 2 Stämme; Gelb: tierpathogene Spezies; Lila: *M. tuberculosis* Linie 1; Beige: *M. canettii* Stämme. CAS: *Central Asian* Genotyp; EAI: *East African Indian* Genotyp; LAM: *Latin - American - Mediterranean* Genotyp (Neighbour - Joining tree; DC: Cavalli - Storza und Edwards, 1967). 43

Abb. 4.2 Beispielhaftes Sequenzalignment (Rv0557). Dargestellt sind die Elektropherogramme zweier klinischer Isolate im Vergleich zur H37Rv Referenzsequenz. An Position 321 nach Genstart (Codon 107) weist der Beijing Stamm 12594/02 einen Austausch von T zu C auf, während der Uganda I Stamm 2169/99 der Referenzsequenz entspricht. Der Einzelbasenaustausch führt zu keiner Veränderung in der Aminosäuresequenz. 44

Abb. 4.3 Phylogenetischer Stammbaum basierend auf Multi - Locus - Sequenz - Typisierungsdaten (MLST). Die Berechnung des *Maximum Parsimomy Trees* beruhte auf 148 Mutationen, die in 29 Genen nachgewiesen werden konnten. Eine gruppen -, linien - und genotypspezifische Einteilung von MTBK Stämmen konnte bestätigt werden. Beige: *M. canettii* Stämme; Braun: *M. africanum* West African 2 Stämme; Gelb: tierpathogene Spezies; Dunkelgrün: *M. africanum* West African 1a und 1b Stämme; Hellblau: *M. tuberculosis* Linie 2; Rot: Stämme der *Euro - American* Linie; Hellgrün: Referenzstamm H37Rv; Dunkelblau: *M. tuberculosis* Linie 3; Lila: *M. tuberculosis* Linie 1. CAS: *Central Asian* Genotyp; EAI: *East African Indian* Genotyp; LAM: *Latin - American - Mediterranean* Genotyp (Bootstrap 200).....45

Abb. 4.4 Phylogenetisch informative Sequenzvariationen. Es konnten 45 genotypspezifische Mutationen und 12 genotypübergreifende Mutationen identifiziert werden (blaue Markierungen). Die höchste Variabilität zeigten *M. canettii* Stämme, gefolgt von West African 1 Stämme. Eine detaillierte Liste der Sequenzvariationen befindet sich im Anhang C. CAS: *Central Asian* Genotyp; EAI: *East African Indian* Genotyp; LAM: *Latin - American - Mediterranean* Genotyp. 47

Abb. 4.5 Algorithmus zur Differenzierung von Stämmen des MTBKs basierend auf Sequenzvariationen. Die Klassifizierung erfolgt nach dem Ausschlussprinzip bestimmter Mutationen in den entsprechenden Genen. Cd: Codon; +: Mutation vorhanden; -: Mutation nicht vorhanden; CAS: *Central Asian* Genotyp; EAI: *East African Indian* Genotyp; LAM: *Latin - American - Mediterranean* Genotyp; Einbuchstabencode der Aminosäuren siehe Anhang E. 48

Abb. 4.6 Schematische Darstellung des *pimA* - Operons (Rv2609c - Rv2613c). Gene des *pimA* Operons sind maßgeblich an der Synthese von Lipoarabinomanan, ein ubiquitärer Bestandteil der mykobakteriellen Zellwand, beteiligt. Die angegebenen Positionen in bp entsprechen der Lage der Gene im H37Rv Genom (http://tuberculist.epfl.ch). Die einzelnen Funktionen der Gene bzw. die Genprodukte sind im unteren Teil der Abbildung gekennzeichnet. Farbkodierung: siehe http://tuberculist.epfl.ch. 49

Abb. 4.7 Sequenzalignment für eine genotypübergreifende Mutation in Rv0410c. Alle *M. bovis* und *M. caprae* Stämme zeigten eine synonyme Sequenzvariation in Codon 69 (ccG>ccA) im Vergleich zur H37Rv Referenzsequenz.....60

Abb. 4.8 Genotypspezifische Mutationen in Rv1811 (*mgtC*). Dargestellt ist die Position des *mgtC* Gens im mykobakteriellen Genom (http://tuberculist.epfl.ch; Farbkodierung entsprechend). Es konnten fünf phylogenetisch informative SNPs nachgewiesen werden, von denen drei zu einer veränderten Aminosäuresequenz führten. Die einzelnen Genotypen mit den entprechenden Sequenzveränderungen sind im unteren Teil der Abbildung dargestellt. EAI: *East African Indian* Genotyp; LAM: *Latin - American - Mediterranean* Genotyp; (Einbuchstabencode der Aminosäuren siehe Anhang E).....61

Abb. 4.9 Genotypspezifische Variationen in *pks15/1*. *M. tuberculosis* EAI, Dehli/CAS sowie alle *M. africanum* West African 1 und *M. canettii* Isolate entsprachen der Beijing Referenzsequenz. *M. africanum* West African 2, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* und *M. microti* Stämme zeigten eine 6 bp Deletion. Für alle anderen *M. tuberculosis* Isolate wie z.B *M. tuberculosis* Cameroon konnte eine 7 bp Deletion nachgewiesen werden.....64

Abb. 4.10 Ergebnisse zur Studie von Mutationen in Rv2629 und RMP Resistenz. Dargestellt sind Spoligomuster und die Sequenzdaten des Rv2629 Gens (aus Homolka *et al.* 2009 (73)).....65

Abb. 4.11 Phylogenetischer Baum basierend auf MIRU - VNTR Typisierung und Spoligotypisierungsdaten von 17 Stämmen, die für die entsprechenden Analysen verwendet wurden. (http://www.miru-vntrplus.org). *M. tuberculosis* Haarlem, Uganda und Beijing Isolate sowie die Referenzstämme H37Rv und CDC1551 gehören zu der nach Wirth *et al*. definierten phylogenetischen Gruppe 1. *M. tuberculosis* EAI und *M. africanum* West African 2 Stämme gruppieren sich zu einer zweiten Einheit (177). EAI: *East African Indian* Genotyp; (Neighbour - Joining Tree, DC: Cavalli - Storza und Edwards, 1967). 67

Abb. 4.12 Wuchskurven klinischer Isolate in Flüssigkulturmedium. Über einen Zeitraum von 20 Tagen wurde das Wachstumsprofil über die Optische Dichte (OD) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. Es konnten keine signifikanten genotypspezifischen Wachstumsunterschiede festgestellt werden. EAI: *East African Indian* Genotyp.....68

Abb. 4.13 Ähnlichkeitsstammbaum basierend auf Genexpressionsdaten aus drei unabhängigen Experimenten in Flüssigkulturmedium. Dargestellt sind alle Gene (1069), die mindestens 1,5 fach im Verhältnis zum CDC1551 Referenzstamm in einem von 16 reguliert und in 42 von 48 untersuchten Stämmen vorhanden waren. Die Einteilung in zwei Hauptgruppen und in die verschiedenen Genotypen ist deutlich zu erkennen. EAI: *East African Indian* Genotyp. 69

Abb. 4.14 Ähnlichkeitsstammbaum basierend auf 156, mittels ANOVA (*Benjamini and Hochberg false discovery rate*, p<0,01) identifizierten Genen, für die statistisch signifikante Genexpressionsunterschiede zwischen den phylogenetischen Gruppen 1 und 2 in Flüssigkulturmedium nachgewiesen werden konnten. Die Einteilung klinischer MTBK Isolate in zwei Hauptgruppen (Gruppe 1 und 2) wurde durch die Genexpressionsanalyse bestätigt. EAI: *East African Indian* Genotyp. 70

Abb. 4.15 Paarweiser Vergleich von Genen mit signifikanten genotypspezifischen Genexpressionsunterschieden. Die Genexpressionsdaten aller Stämme eines Genotyps aus drei unabhängigen Experimenten wurden zunächst zusammengefasst. In die Analyse wurden alle Gene eingeschlossen, die in 42 von 48 Datenpunkten (16 Stämme; drei unabhängige Experimente) nachgewiesen werden konnten. Die Varianzanalyse (*Benjamini and Hochberg false discovery rate*, p<0,01) ergab 364 Gene mit signifikanten Genexpressionsunterschieden. Die anschließende *Tukey post hoc test* Analyse der ANOVA Ergebnisse definierte eine Matrix (Tukey - Matrix), die den direkten Vergleich von Genexpressionsunterschieden zwischen zwei Genotypen erlaubte. Rot unterlegt ist die Anzahl der Gene, die zwischen den einzelnen Genotypen unterschiedlich exprimiert werden. Blau hinterlegte Werte definieren die Anzahl der Gene mit gleicher Genexpression zwischen zwei Genotypen. EAI: *East African Indian* Genotyp. 71

Abb. 4.16 Genotyp - und stammspezifische Genexpressionsmuster. (A) *M. tuberculosis* Haarlem und Uganda Stämme sowie der H37Rv Referenzstamm weisen eine ähnlich hohe Genexpression im Rv3612c - 3616c Operon auf. (B) Überexpression des *fabG1 - inhA - hemZ* Operon in einem *M. africanum* West African 2 Stamm (10514/01). (C) erniedrigte Expression von Genen in einem *M. tuberculosis* EAI Stamm (1797/03). Rot: erhöhte Genexpression; Blau: erniedrigte Genexpression; EAI: *East African Indian* Genotyp. 72

Abb. 4.17 Wuchskurven klinischer Isolate in nicht aktivierten, murinen Makrophagen. Über einen Zeitraum von 11 Tagen wurde das Wachstumsprofil über die Koloniebildenen Einheiten (CFU) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler von zwei unabhängigen Experimenten. *M. tuberculosis* EAI und *M. africanum* West African 2 Stämme zeigten ein schlechteres Wachstum als die grün dargestellten Referenzstämme H37Rv und CDC1551. EAI: *East African Indian* Genotyp. 74

Abb. 4.18 Wuchskurven klinischer Isolate in aktivierten, murinen Makrophagen. Über einen Zeitraum von 11 Tagen wurde das Wachstumsprofil über die Koloniebildenen Einheiten (CFU) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler von zwei unabhängigen Experimenten. Für alle Stämme der phylogenetischen Gruppe 2 (*M. tuberculosis* EAI und *M. africanum* West African 2) waren deutliche Wachstumsdefizite im Vergleich zu Gruppe 1 Stämmen nachzuweisen. EAI: *East African Indian* Genotyp. 75

Abb. 4.19 Venn Diagramm basierend auf allen Genen (650), die 1,5 fach in 8 von 17 und mindestens 1,2 fach in 15 von 17 Stämmen in ruhenden und/oder in aktivierten Makrophagen reguliert sind. Die gemeinsamen Schnittmengen geben die Anzahl der vom Aktivierungsstatus unabhängigen Gene an. Die insgesamt 280 Gene definieren das so genannte universelle oder *Core* Transkriptom. 76

Abb. 4.20 Beispiele von universellen, vom Aktivierungsstatus der Makrophagen unabhängigen, 1,5 fach in 8 von 15 und mindestens 1,2 fach in 15 von 17 Stämmen regulierten Genen. (A) Gene mit Überexpression. (B) Gene mit erniedrigter Expression. ...77

Abb. 4.21 Ähnlichkeitsstammbäume basierend auf allen Genen, die in Abhängigkeit des Aktivierungsstatus der Makrophagen universell exprimiert werden. ANOVA (*Benjamini and Hochberg false discovery rate*, p<0,01) identifizierte 719 Gene mit signifikanten Genexpressionsunterschieden. (A) 317 Gene zeigten eine erhöhte Expression in aktivierten Makrophagen. (B) 402 Gene waren in ruhenden Makrophagen höher exprimiert. Rot: erhöhte Genexpression; Blau: erniedrigte Genexpression. 78

Abb. 4.22 Auswahl von Genen, die in aktivierten Makrophagen höher exprimiert waren als in ruhenden Makrophagen. Rot: erhöhte Genexpression; Blau: erniedrigte Genexpression. 79

Abb. 4.23 Auswahl von Genen, die in ruhenden Makrophagen höher exprimiert waren als in aktivierten Makrophagen. Rot: erhöhte Genexpression; Blau: erniedrigte Genexpression. 80

Abb. 4.24 Vergleichende Darstellung (*Scatter Plot*) von Genexpressionsprofilen zweier Stämme. (A) desselben Genotyps und (B) unterschiedlicher Genotypen. Die Streuung der Datenpunkte in Abbildung B ist größer als in Abbildung A. Stämme desselben Genotyps sind einander ähnlicher als Stämme unterschiedlicher Genotypen. 81

Abb. 4.25 Paarweiser Vergleich von Genen mit signifikanten, genotypspezifischen Genexpressionsunterschieden. Die Genexpressionsdaten aller Stämme eines Genotyps aus vier unabhängigen Experimenten (2x ruhende, 2x aktivierte Makrophagen) wurden zunächst zusammengefasst. In die Analyse wurden alle Gene eingeschlossen, die in 50 von 68 Datenpunkten (17 Stämme; vier unabhängige Experimente) nachgewiesen werden konnten. Die Varianzanalyse (*Benjamini and Hochberg false discovery rate*, $p<0,01$) ergab 625 Gene mit signifikanten Genexpressionsunterschieden. Die anschließende *Tukey post hoc test* Analyse der ANOVA Ergebnisse definierte eine Matrix (Tukey - Matrix), die den direkten Vergleich von Genexpressionsunterschieden zwischen zwei Genotypen erlaubte. Rot unterlegt ist die Anzahl der Gene, die zwischen den einzelnen Genotypen unterschiedlich exprimiert werden. Blau hinterlegte Werte definieren die Anzahl der Gene mit gleicher Genexpression zwischen zwei Genotypen. EAI: *East African Indian* Genotyp.....82

Abb. 4.26 Ziehl - Neelsen Präparate. (A) Die mikroskopische Aufnahme zeigt Mykobakterien als rote, säurefeste Stäbchen. (B) In der Mikroskopie waren keine säurefesten Stäbchen nachweisbar. Nicht mykobakterielle Keime wurden durch Methylenblau blau gefärbt. 84

Abb. 4.27 MTBK Stämme induzieren eine unterschiedliche TNFα Antwort in THP1 - Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. Die TNFα - Konzentrationen vom Referenzstamm *M. bovis* ATCC sowie die Werte der unstimulierten und LPS Kontrolle sind in beiden Abbildungen aufgetragen. (A) Stämme der phylogenetischen Gruppe 1. (B) Stämme der phylogenetischen Gruppe 2. CAS: *Central Asian* Genotyp; EAI: *East African Indian* Genotyp; LAM: *Latin - American - Mediterranean* Genotyp; LPS: Lipopolysaccharid. 85

Abb. 4.28 TNFα Induktion von klinischen MTBK Isolaten in THP1 - Zellen. Die TNFα - Konzentrationen aus drei unabhängigen Experimenten sind prozentual im Vergleich zum *M. bovis* ATCC (100 %) Stamm als Scatter Plot dargestellt. Eine Klassifizierung in Gruppe 1 und Gruppe 2 ist deutlich zu erkennen. Stämme der phylogenetischen Gruppe 1 bewirken eine stärkere Induktion von TNFα als Stämme der Gruppe 2. Innerhalb der *Euro - American* Linie (rot) konnten genotypspezifische Unterschiede identifiziert werden. Rot: *Euro - American* Linie; Dunkelblau: *M. tuberculosis* Linie 3; Hellblau: *M. tuberculosis* Linie 2; Lila: *M. tuberculosis* Linie 1; Braun: *M. africanum* West African 2; Grün: *M. africanum* West African 1; Gelb: Tierpathogene; CAS: *Central Asian* Genotyp; EAI: *East African Indian* Genotyp; LAM*: Latin - American - Mediterrarean* Genotyp. 86

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1 Wirkmechanismen von Erstrangmedikamenten. 7

Tab. 3.1 Primersequenzen. 19

Tab. 3.2 Bestandteile des OADC. 22

Tab. 4.1 Mutationen im *pimA* - Operon. 50

Tab. 4.2 Mutationen in *pimB* (Rv0557). 52

Tab. 4.3 Mutationen in *rpf* Genen. 54

Tab. 4.4 Mutationen in *glpK* (Rv3696). 56

Tab. 4.5 Mutationen in *pykA* (Rv1617) und in *fgd1* (Rv0407) 57

Tab. 4.6 Mutationen in Resistenzgenen. 59

Tab. 4.7 Mutationen in Rv0410c, Rv1811 und Rv2032. 63

Tab. 4.8 Mutationen in Rv2628, Rv2629, Rv2946c (*pks15/1*) und Rv3547. 66

Tab. D - 1: Medium und Zusätze. 141

Tab. D - 2: Reagenzien für die PCR. 142

Tab. D - 3: Reagenzien und Materialien für die Sequenzierung. 142

Tab. D - 4: Reagenzien für die RNA Aufarbeitung und Microarray Prozessierung. 142

Tab. D - 5: Farbstoffe und Färbelösungen. 143

Tab. D - 6: Enzyme, Antikörper, Stimulatoren. 143

Tab. D - 7: Chemikalien. 144

Tab. D - 8: Verbrauchsmaterialien. 146

Tab. D - 9: Geräte. 147

Tab. D - 10: Software. 148

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin oder Alanin
aaUTP	Amino - Allyl - Uridintriphosphat
Aqua dest.	destilliertes Wasser (lat: *aqua destillata*)
aRNA	amplifizierte RNA
BCG	Bacille Calmette Guerin
BHI	*brain heart infusion*
bp	Basenpaare *(base pair)*
BSA	Rinderserumalbumin *(bovine serum albumin)*
C	Cytosin oder Cystein
$CaCl_2$	Kalziumchlorid
CAS	*Central Asian* (Genotyp von *Mycobacterium tuberculosis*)
cDNA	komplementäre DNA *(complementary DNA)*
CFU	Kolonie bildende Einheiten *(colony forming units)*
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DMEM	*Dulbecco´s Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure *(deoxyribonucleic acid)*
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EAI	*East African Indian* (Genotyp von *Mycobacterium tuberculosis*)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	*Enzyme - linked - Immunosorbent Assay*
EMB	Ethambutol
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum *(fetal calf serum)*
G	Guanin (bei DNA) oder Glycin (bei Aminosäuren)
GTC	Guanidinisothiocyanat
HEPES	2 - (4 - (2 - Hydroxyethyl) - 1-piperazinyl) - ethansulfonsäure
HCl	Chlorwasserstoff, Salzsäure
H_2O	Wasser
H_2SO_4	Schwefelsäure
IACUC	*Cornell University Animal Care and Use Committee*
IFNγ	Interferon γ
INH	Isoniazid
LAM	*Latin - American - Mediterranean* (Genotyp von *Mycobacterium tuberculosis*) oder Lipoarabinomanan

LB	Luria Bertani
LJ	Löwenstein - Jensen
LM	Lipomanan
LPS	Lipopolysaccharid
M. africanum	*Mycobacterium africanum*
M. bovis	*Mycobacterium bovis*
M. canettii	*Mycobacterium canettii*
M. caprae	*Mycobacterium caprae*
M. microti	*Mycobacterium microti*
M. pinnipedii	*Mycobacterium pinnipedii*
M. tuberculosis	*Mycobacterium tuberculosis*
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MLSA	Multi - Locus - Sequenzanalyse (*multi locus sequencing analysis*)
MLST	Multi - Locus - Sequenztypisierung (*multi locus sequencing typing*)
MOI	Infektionsverhältnis *(multiplicity of infection)*
MTBK	*Mycobacterium tuberculosis* Komplex
MΦ	Makrophagen
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Di - Natriumhydrogenphosphat
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
nm	SI - Einheit für Nanometer
Nr.	Nummer
OADC	Ölsäure *(oleic acid),* Rinderserumalbumin *(bovine albumin),* Dextrose *(dextrose),* Katalase *(catalase)*
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung *(phosphate buffered saline)*
PCR	Polymerasekettenreaktion *(polymerase chain reaction)*
PDIM	Phthiolcerol - Dimycocerat
PE	Gene mit Prolin - Glutaminsäure Motiv
PGL	Phenolisches Glykolipid
PI	Phosphatidylinositol
PIM	Phosphatidylinositolmanosid
PMA	Phorbol - 12 - myristat - 13 - Acetat
PPE	Gene mit Prolin - Prolin - Glutaminsäure Motiv

PZA	Pyrazinamid
rcf	relative Zentrifugalkraft *(relative centrifugal forces)*
RMP	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure *(ribonucleic acid)*
RPMI	Zellkulturmedium, das Mitte der 1960er Jahre am *Roswell Park Memorial Institute* entwickelt wurde
SDS	Natriumlaurylsulfat *(sodium dodecyl sulfate)*
SI	internationales Einheitensystem
SM	Streptomycin
SNP	Einzelbasenaustausch *(single nucleotide polymorphism)*
SSC	Natriumchlorid - Natriumcitrat *(sodium chloride sodium citrate)*
T	Thymin oder Threonin
T_a	Annealing - Temperatur
TAE	Tris - Acetat - EDTA
TB	Tuberkulose
TE	Tris - EDTA
THP1	*human acute monocytic leukemia cell line*
TMB	Tetramethylbenzidin
TNFα	Tumor Nekrose Faktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl) - aminomethan
V	SI - Einheit für Volt
v/v	*volume/volume*
Wt	Wildtyp
w/v	*weight/volume*
z.B.	zum Beispiel

Anhang

A Referenzkollektion

Stammnummer	Spezie	Genotyp	SM	INH	RMP	EMB	PZA
9679/00	*M. tuberculosis*	H37Rv ATCC	S	S	S	S	S
CDC1551	*M. tuberculosis*	CDC1551	S	S	S	S	S
9564/00	*M. bovis*	Bovis ATCC	S	S	S	S	R
9550/00	*M. africanum*	Africanum ATCC	S	S	S	S	S
9532/03	*M. tuberculosis*	Haarlem	S	S	S	S	S
2336/02	*M. tuberculosis*	Haarlem	S	S	S	S	S
4130/02	*M. tuberculosis*	Haarlem	S	S	S	S	S
4850/03	*M. tuberculosis*	EAI	S	S	S	S	S
1797/03	*M. tuberculosis*	EAI	S	S	S	S	S
947/01	*M. tuberculosis*	EAI	S	S	S	S	S
2333/99	*M. tuberculosis*	Uganda I	S	S	S	S	S
2169/99	*M. tuberculosis*	Uganda I	S	S	R	S	S
2201/99	*M. tuberculosis*	Uganda I	R	R	R	S	S
2191/99	*M. tuberculosis*	Uganda II	S	S	S	S	S
2253/99	*M. tuberculosis*	Uganda II	S	S	S	S	S
2176/99	*M. tuberculosis*	Uganda II	S	S	S	S	S
10493/01	*M. tuberculosis*	Ghana/TB1	R	R	S	S	S
2570/02	*M. tuberculosis*	Ghana/TB1	S	S	S	S	S
10469/01	*M. tuberculosis*	Ghana/TB1	R	R	S	R	S
5390/02	*M. tuberculosis*	Cameroon	S	S	S	S	S
5400/02	*M. tuberculosis*	Cameroon	S	S	S	S	S
1428/02	*M. tuberculosis*	Cameroon	S	S	S	S	S
1417/02	*M. tuberculosis*	Cameroon	S	S	S	S	S
7968/03	*M. tuberculosis*	LAM	S	S	S	S	S
8885/03	*M. tuberculosis*	LAM	S	S	S	S	S
946/03	*M. tuberculosis*	LAM	S	S	S	S	S
2151/03	*M. tuberculosis*	S – type	S	S	S	S	S
2318/06	*M. tuberculosis*	S – type	S	S	S	S	S
6411/05	*M. tuberculosis*	S – type	S	S	S	S	S

EAI: *East African Indian* Genotyp; LAM: *Latin - American - Mediterranean* Genotyp; SM: Streptomycin; INH: Isoniazid; RMP: Rifampizin; EMB: Ethambutol; PZA: Pyrazinamid; S: sensibel; R: resistent

Fortsetzung Referenzkollektion

Stammnummer	Spezie	Genotyp	SM	INH	RMP	EMB	PZA
4412/04	*M. tuberculosis*	X - type	S	S	S	S	S
9953/04	*M. tuberculosis*	X - type	S	S	S	S	S
8431/05	*M. tuberculosis*	X - type	S	S	S	S	S
7936/01	*M. tuberculosis*	Dehli/CAS	S	S	S	S	S
2637/02	*M. tuberculosis*	Dehli/CAS	S	S	S	S	S
1934/03	*M. tuberculosis*	Beijing	S	S	S	S	S
1500/03	*M. tuberculosis*	Bejing	S	S	S	S	S
12594/02	*M. tuberculosis*	Beijing	S	S	S	S	S
3256/02	*M. tuberculosis*	Beijing	R	R	R	R	S
3329/02	*M. tuberculosis*	Beijing	R	R	R	R	S
4445/02	*M. tuberculosis*	Beijing	R	R	R	R	S
10517/01	*M. africanum*	West African 2	S	S	S	S	S
5468/02	*M. africanum*	West African 2	S	S	S	S	S
10514/01	*M. africanum*	West African 2	S	R	S	S	S
5434/02	*M. africanum*	West African 1a	R	S	S	S	S
1449/02	*M. africanum*	West African 1a	S	S	S	S	S
1473/02	*M. africanum*	West African 1a	S	S	S	S	S
1443/02	*M. africanum*	West African 1b	S	S	S	S	S
10473/01	*M. africanum*	West African 1b	S	S	S	S	S
10494/01	*M. africanum*	West African 1b	R	S	S	S	S
7011/02	*M. pinnipedii*	Seal	S	S	S	S	S
7739/01	*M. pinnipedii*	Seal	S	S	S	S	S
4258/00	*M. bovis*	Bovis	S	S	S	S	R
751/01	*M. bovis*	Bovis	S	S	S	S	R
7540/01	*M. bovis*	Bovis	S	S	S	S	R
9577/99	*M. caprae*	Caprae	S	S	S	S	S
1694/00	*M. caprae*	Caprae	S	S	S	S	S
8986/99	*M. caprae*	Caprae	S	S	S	S	S
417/01	*M. microti*	Llama	S	S	S	S	S
1479/00	*M. microti*	Vole	S	S	S	S	S
3040/99	*M. canettii*	Canettii	S	S	S	S	S
3041/99	*M. canettii*	Canettii	S	S	S	S	S
3151/08	*M. canettii*	Canettii	S	S	S	S	S

CAS*: Central Asian* Genotyp; SM: Streptomycin; INH: Isoniazid; RMP: Rifampizin; EMB: Ethambutol; PZA: Pyrazinamid; S: sensibel; R: resistent

B Übersicht der für die Sequenzanalyse verwendeten Gene

Rv Nummer	Genname	Funktion/Produkt	Gesamtes Gen	Gen (bp)	PCR (bp)	T_a (°C)
Rv0288	*esxH*	10kDa Antigen	X	291	788	62
Rv0388c	*ppe9*	Unbekannt	X	543	713	64
Rv0407	*fgd1*	Glukose - 6 - phosphate - Dehydrogenase	X	1011	1606	62
Rv0410c	*pknG*	Proteinkinase G	X	2253	2620	68
Rv0557	*mtfB*	Mannosyltransferase	X	1137	1340	68
Rv0667	*rpoB*	RNA Polymerase (β - Untereinheit)	-	3519	158	62
Rv1009	*rpfB*	*Resusciation* Faktor B	X	1089	1360	62
Rv1483	*fabG1*	3 - Oxoacyl – Reduktase	-	744	248	64
Rv1617	*pykA*	Pyruvatkinase	-	1419	315	64
Rv1811	*mgtC*	Mg^{2+} Transport P - type ATPase	X	705	880	62
Rv1884c	*rpfC*	*Resusciation* Faktor C	X	531	689	64
Rv1908	*katG*	Katalase – Peroxidase	-	2223	210	67
Rv1980c	*mpt64*	Antigen MPT64	X	687	858	60
Rv2032	*acg*	Nitroreduktase	X	996	1359	64
Rv2389c	*rpfD*	*Resusciation* Faktor D	X	465	836	62
Rv2428	*ahpC*	Alkyl - Hydroperoxid - Reduktase	-	588	237	66
Rv2430c	*ppe41*	Antigen	X	585	796	64
Rv2431c	*pe25*	Antigen	X	300	649	64
Rv2450c	*rpfE*	*Resusciation* Faktor E	X	519	938	62
Rv2609c	-	Membranprotein	X	1056	1314	66
Rv2610c	*pimA*	Mannosyltransferase	X	1137	1302	66
Rv2611c	-	Acyltransferase	X	951	1175	66
Rv2612c	*pgsA1*	Phosphatidyl - Inositol - Synthase	X	654	815	66
Rv2613c	-	Phosphorylase	X	588	830	66
Rv2628	-	Antigen	X	363	521	62
Rv2629	-	hypothetisches Protein	X	1125	1575	64
Rv2946c	*pks1/15*	Polyketidsynthase	-	1616	144	64
Rv3547	-	F420 - abhängige Nitroreduktase	X	456	846	64
Rv3696c	*glpK*	Glycerolkinase	-	517	240	64

C Übersicht der genotypspezifischen Mutationen aus Abbildung 4.1

Nr.	Rv - Nummer	Codon	Basenaustausch
1	Rv0288	A71S	Gcg>Tcg
2	Rv0407	K296E	Aag>Gag
3	Rv0407	K270M	aAg>aTg
4	Rv0410c	A665T	Gcc>Acc
5	Rv0410c	T736K	aCg>aAg
6	Rv0410c	Codon 614	tcG>tcA
7	Rv0557	T74M	aCg>aTg
8	Rv0557	G304D	gGc>gAc
9	Rv0557	R178G	Cgg>Ggg
10	Rv0557	P356S	Ccg>Tcg
11	Rv0557	Codon 350	gtG>gtA
12	Rv0557	Codon 270	ggC>ggT
13	Rv0557	R152P	cGc>cCc
14	Rv0557	L153V	Ctg>Gtg
15	Rv1009	A357V	gCA>gTA
16	Rv1009	E275D	gaG>gaC
17	Rv1009	L345Q	cTg>cAg
18	Rv1009	Codon 346	cgT>cgC
19	Rv1483	-	G>A -102
20	Rv1811	A107V	gCc>gTc
21	Rv1811	Codon 15	gtC>gtT
22	Rv1811	R182H	cGc>cAc
23	Rv1811	Codon 80	atC>atT
24	Rv1884c	H2Y	Cat>Tat
25	Rv1980c	I43N	aTt>aAt
26	Rv1980c	M45T	aTg>aCg
27	Rv2032	Codon 62	ggG>ggC
28	Rv2032	A34S	Gcc>Tcc
29	Rv2428	-	G>A -88
30	Rv2450c	Codon 17	Ttg>Ctg
31	Rv2450c	T20R	aCg>aGg
32	Rv2450c	Codon 105	gcG>gcA
33	Rv2450c	Codon 139	ggG>ggA
34	Rv2611c	Codon 262	taT>taC

Fortsetzung Anhang C

Nr.	Rv - Nummer	Codon	Basenaustausch
35	Rv2612c	S2N	aGc>aAc
36	Rv2613c	Codon 6	cgC>cgT
37	Rv2628	A96T	Gcg>Acg
38	Rv2628	Codon 26	atA>atC
39	Rv2628	S49A	Tcc>Gcc
40	Rv2629	D64A	gAt>gCt
41	Rv2629	P322L	cCg>cTg
42	Rv3547	Codon 48	ctG>ctT
43	Rv3547	D113N	Gac>AaC
44	Rv3547	Codon 69	gaC>gaT
45	Rv3547	Codon 148	gtT>gtC
46	Rv0407	Codon 320	ttT>ttC
47	Rv0410c	Codon 69	ccG>ccA
48	Rv0557	Codon 107	ggT>ggC
49	Rv1009	G282E	gGa>gAa
50	Rv1009	Codon 245	ggC>ggT
51	Rv1617	E220D	gaG>gaT
52	Rv2032	P318L	cCA>cTA
53	Rv2946c	-	7 bp Deletion
54	Rv2946c	-	6 bp Deletion
55	Rv2628	S59L	tCg>tTg
56	Rv2628	L83W	tTg>tGg
57	Rv3547	L90V	Ctc>Gtc

D Materialien

Tab. D - 1: Medium und Zusätze.

Medium/Zusätze	Best. - Nr.	Hersteller	Standort
BD BBL™ Brain Heart Infusion Broth	299070	geliefert durch Otto Nordwald	Hamburg
BD BBL™ Brain Heart Infusion Agar	221610	geliefert durch Otto Nordwald	Hamburg
BD BBL™ Tripticase™ Soy Agar with 5 % Sheep Blood	254087	geliefert durch Otto Nordwald	Hamburg
BD Middlebrook 7H9 Broth	2713310	geliefert durch Otto Nordwald	Hamburg
BD Middlebrook 7H10 Agar	262710	geliefert durch Otto Nordwald	Hamburg
BD Middlebrook OADC	212351	Becton Dickison GmbH	Heidelberg
DMEM	10 - 017 - CV	Mediatech, Inc.	Manassas, Virginia, USA
Fötales Kälberserum (THP1)	S0113/50115	Biochrom	Berlin
Fötales Kälberserum (MΦ)	SH30070.03	HyClone über Thermo Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
LB Medium (Lenox)	X964.2	Carl Roth	Karlsruhe
L - Glutamin (THP1)	K0283	Biochrom	Berlin
L - Glutamin (MΦ)	25 - 005 - CV	Mediatech, Inc.	Manassas, Virginia, USA
L - Zell - Medium		eigene Herstellung in Ithaca durchs technische Personal	Ithaca, New York, USA
Natriumpyruvat	25 - 000 - CI	Mediatech, Inc.	Manassas, Virginia, USA
Penicillin/Streptomycin (THP1)	A2213	Biochrom	Berlin
Penicillin/Streptomycin (MΦ)	30 - 002 - CI	Mediatech, Inc.	Manassas, Virginia, USA
PMA	524400	Calbiochem	Schwalbach
Rinderserum	S0250	Biowest	Nuaille, Frankreich
TB Medium nach Löwenstein - Jensen Basis	1.05400.0500	Merck	Darmstadt
VLE - RPMI - 1640 Medium	F 1415	Biochrom	Berlin

Tab. D - 2: Reagenzien für die PCR.

Produkt	Best. - Nr.	Hersteller	Standort
HotStarTaq DNA Polymerase Kit	203205	Qiagen	Hilden
Dimethylsulfoxid	1.02952.1000	Merck	Darmstadt
100 mM dNTP Set	1196906400	Roche	Mannheim

Tab. D - 3: Reagenzien und Materialien für die Sequenzierung.

Produkt	Best. - Nr.	Hersteller	Standort
BigDye® Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit	4337451	Applied Biosystems	Darmstadt
BigDye® Terminator v.1.1/v3.1 Sequencing Buffer (5x)	4336701	Applied Biosystems	Darmstadt
Hi - Di™ Formamide	4311320	Applied Biosystems	Darmstadt
LiChrosolv® Wasser für die Chromatographie	1.5333.2500	Merck	Darmstadt
MicroAmp® Optical 96 - Well Reaction Plate	N8010560	Applied Biosystems	Darmstadt
Plate Septa 96 - Well	4315933	Applied Biosystems	Darmstadt
10x Analysis Buffer with EDTA	402824	Applied Biosystems	Darmstadt
3130 Pop - 7™ Performance Optimized Polymer	4352759	Applied Biosystems	Darmstadt

Tab. D - 4: Reagenzien für die RNA Aufarbeitung und Microarray Prozessierung.

Produkt	Best.- Nr.	Hersteller	Standort
Casco - Nerl Wasser	9800 - 5	NERL Diagnostic	Fremont, Kalifornien, USA
MEGAclear™ Kit	AM1908	Ambion	Darmstadt
MessageAmp™ II - Bacteria Prokaryotic RNA Amplification Kit	AM1790	Ambion	Darmstadt
Tuberculosis Genome Oligo Set	4295	Qiagen	Hilden
RNeasy Mini Kit	74104	Qiagen	Hilden
Salmon Sperm DNA	AM9680	Invitrogen	Karlsruhe
TRIzol®Reagent	15596 - 018	Invitrogen	Karlsruhe
TURBO DNA - free™	AM1907	Ambion	Darmstadt

Tab. D - 5: Farbstoffe und Färbelösungen.

Produkt	Best. - Nr.	Hersteller	Standort
Alexa Fluor ®555	A32756	Invitrogen	Karlsruhe
Alexa Fluor ®647	A32757	Invitrogen	Karlsruhe
Karbolfuchsin - Lösung	1.09215.2500	Merck	Darmstadt
Löfflers Methylenblau	1.01287.2500	Merck	Darmstadt
Trypanblau	L6323	Biochrom	Berlin
TMB	87748	Sigma - Aldrich® (Fluka)	Steinheim

Tab. D - 6: Enzyme, Antikörper, Stimulatoren.

Produkt	Best. - Nr.	Hersteller	Standort
Detektionsantikörper	Polyclonal (Harald Galatti)	INTEX Pharmazeutica AG	Muttenz, Schweiz
Exonuklease I	M0293S	New England Biolabs	Frankfurt
Interferon γ	315 - 05	PreptoTech GmbH	Hamburg
Lipopolysaccharid	L9641	Sigma - Aldrich®	Steinheim
Lysozym	10837059001	Roche	Mannheim
Proteinase - K	03115801001	Roche	Mannheim
Shrimp Alkaline Phosphatase	E70092X	USB Amersham	Otelfingen
TNFα	300 - 01A	PreptoTech GmbH	Hamburg
TNFα Antikörper	Klon 6B (Harald Gallati)	INTEX Pharmazeutica AG	Muttenz, Schweiz

Tab. D - 7: Chemikalien.

Produkt	Best.- Nr.	Hersteller	Standort
Aceton	14.25000	Merck	Darmstadt
Bovines Serum Albumin	85041C	Sigma - Aldrich®	Steinheim
Braunwasser Ecotainer® Aqua B.	75/1260405.20503	B. Braun Melsungen AG	Melsungen
Bromophenolblau	108122	Merck	Darmstadt
Cetyltrimethylammoniumbromid	A0805.0100	AppliChem	Darmstadt
Chloroform	1.02445.1000	Merck	Darmstadt
Dimethylsulfoxid	1.02952.1000	Merck	Darmstadt
Di - Natriumhydrogenphosphat - Dihydrat	6580.1000	Merck	Darmstadt
Essigsäure, ≥ 99%	100063.1011	Merck	Darmstadt
Ethanol	1.00983.1000	Merck	Darmstadt
Ethidiumbromid	1.11608.0030	Merck	Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat - Na_2 - Dihydrat	152522	MP Biomedicals	Eschwege
Formamid	04800686	MP Biomedicals	Eschwege
Gelantine	G93991	Sigma - Aldrich®	Steinheim
Glukose	170080010	Fisher Scientific	Schwerte
Glyzerin wasserfrei	1.04093.1000	Merck	Darmstadt
Glyzerin 87%, zur Analyse	1.04094.2500	Merck	Darmstadt
Guanidinisothiocyanat	0017.2	Carl Roth	Karlsruhe
HEPES Puffer	H3375	Sigma - Aldrich®	Steinheim
Hydroxlamin	H2391	Sigma - Aldrich®	Steinheim
illustra™ Sephadex G50 Fine DNA grade	170573-02	GE Healthcare	München
Isopropanol	6752.3	Carl Roth	Karlsruhe
Kaliumhydroxid Plätzchen	1.05021.0250	Merck	Darmstadt
Kalziumchlorid	1020830250	Merck	Darmstadt
Magnesiumchlorid	8.14733.0500	Merck	Darmstadt
Natriumchlorid	1.06400.500	Merck	Darmstadt
Natriumcitrat	71402	Sigma - Aldrich® (Fluka)	Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat - Dihydrat	1.06345.1000	Merck	Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	1.06329.0500	Merck	Darmstadt
Natriumhydroxidlösung	9137.1000	Merck	Darmstadt

Fortsetzung Tab. D - 7:

Produkt	Best.- Nr.	Hersteller	Standort
N - Lauroylsarcosin - Natrium Salz	L9150	Sigma - Aldrich®	Steinheim
PBS - Puffer	10010031	Invitrogen	Karlsruhe
Phenol	1.00206.0250	Merck	Darmstadt
Roti® - Stock 100x TE - Puffer	1052.1	Carl Roth	Karlsruhe
Salzsäure, rauchend 37 %	1.00317.2500	Merck	Darmstadt
Saponin	16109	Riedel - de Haen	Seelze
Tris - Base	819623	MP Biomedicals	Eschwege
Tween® 80 zur Synthese	8.22187.0500	Merck	Darmstadt
UltraPure™ Agarose	15510 - 027	Invitrogen	Karlsruhe
UltraPure™ 20x SSC	15557 - 036	Invitrogen	Karlsruhe
Wasser für die Molekularbiologie DEPC - behandelt	T143.1	Carl Roth	Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	1.07209.1000	Merck	Darmstadt
Zitronensäure	8.18707.1000	Merck	Darmstadt
10 % SDS - Lösung	AM 9822	Ambion	Darmstadt
100 bp DNA Leiter Extended	T840.1	Carl Roth	Karlsruhe
2 - β - Mercaptoethanol	M3148	Sigma - Aldrich®	Steinheim

Tab. D - 8: Verbrauchsmaterialien.

Produkt	Best.- Nr.	Hersteller	Standort
Corning® Rollerflaschen 490 cm^2	5380149	Omnilab	Hamburg
Einmalimpföse (10 µl)	I612 - 9498	VWR	Darmstadt
Glas - LifterSlip Microarray Coverslip	EN - MA - 22X44I24774	Erie Scientific	Wilmington, Delaware USA
Hybridisierungskammer Corning	732 - 5503	VWR	Darmstadt
Millipore Multiscreen® - HV - Platten	MAHVN4550	Millipore	Schwalbach
Microarray	-	Center for Gene Expression Profiling (CGEP), Boyce Thompson Institute for Plant Research	Ithaca, New York, USA
Neubauer Zählkammer	-	Optik Labor	Friedrichsdorf
Nunclon™ Surface 24 well	142475	Nunc	Langenselbold
Nunclon™ Surface 48 well	150687	Nunc	Langenselbold
Nunclon™ Surface 96 well	167008	Nunc	Langenselbold
O - Ring für Hybridisierungskammer	732 - 5552	VWR	Darmstadt
Steritop™	SCGPT02RE	Millipore	Schwalbach
SuperFrost Plus Objekträger	03 - 00602R	Langenbrinck	Emmendingen
TPP - Zellkulturflasche (25 cm^2)	90026	TPP	Trasadingen, Schweiz
TPP - Zellkulturflasche (75 cm^2)	90076	TPP	Trasadingen, Schweiz
Zirconia/Silica beads 0,1mm	11079101z	Biospec über Carl Roth	Karlsruhe
30 ml Nalgene® Nährmedienflasche	2156700H	VWR	Darmstadt

Tab. D - 9: Geräte.

Produkt	Hersteller	Standort
ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems	Darmstadt
Aufbereitungssystem Elga PURELAB ultra	Elga labwater	Celle
Beckman Coulter Allegra 6KR Zentrifuge	Beckman Coulter	Krefeld
BIO-RAD Smart™ Spec 3000	Bio - Rad Laboratories GmbH	München
BioTek Synergy 2	BioTek	Bad Friedrichshall
Dosierungsplatte MACL09645	Millipore	Schwalbach
Eppendorf Zentrifuge 5430	Eppendorf	Hamburg
FastPrep® Instrument FP 120	Qbiogene	Heidelberg
GenePix 4000B Instrument	Molecular Devices	Sunnyvale, Kalifornien, USA
Geldokumentationssystem	Bio - Rad Laboratories GmbH	München
Gelkammer mini sub cell ®GT	Bio - Rad Laboratories GmbH	München
Gelkammer sub cell ®GT	Bio - Rad Laboratories GmbH	München
Gelkammer wide mini sub cell ®GT	Bio - Rad Laboratories GmbH	München
Hettich Zentrifuge Universal 32R	über Armin Baack Laborbedarf	Schwerin
Hettich Rotanta 460R	über Armin Baack Laborbedarf	Schwerin
MJ Research PTC - 200 Thermocycler	über Biozym	Hess. Oldendorf
ELISA Reader Sunrise™	Tecan	Crailsheim
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Peqlab	Erlangen
Rolleinheit Wheaton Roller Aparatus	Wheaton Science	Millville, New Jersey, USA
Spannungsgerät PowerPac™ 300	Bio - Rad Laboratories GmbH	München
Savant Speedvac	Global Medical Instrumentation	Ramsey Minnesota, USA

Tab. D - 10: Software.

Produkt	Hersteller	Standort
BioNumerics v.5.1	Applied Math	Sint Martens Latem, Belgien
GeneSpring GX7.3	Agilent Technologies	Waldbronn
GraphPadPrism v.4.0	Statcon	Witzenhausen
ImaGene v.6.0	BioDiscovery	El Segundo, Kalifornien USA
OLIGO Primer Analysis Software v.5.0	National Bioscience	Plymouth, Minnesota, USA
SeqScape v.2.6	Applied Biosystems	Darmstadt

E Abkürzungen Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Trytophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Stefan Niemann für die Vergabe des interessanten Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können, bedanken. Als „Doktorvater“ hat er durch seine vielen hilfreichen Ratschläge, Anregungen und Ideen aber auch durch seiner steten Bereitschaft für wissenschaftliche Diskussionen zum Fortgang der Projekte und zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen. Ganz besonders möchte ich mich bei ihm dafür bedanken, dass er mir immer wieder die Freude an der Arbeit mit Mykobakterien zurück gegeben hat.
Herrn Prof. Dr. Ulrich Schaible danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens. Bei meinen Zweitbetreuer, Herrn PD Dr. Norbert Reiling, möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, eine Vielzahl von zellbiologischen Experimenten in seiner Arbeitsgruppe durchgeführt haben zu dürfen. Mit seiner konstruktiven Kritik aber auch mit seiner Motivation stand er mir hilfreich zur Seite.
Frau Dr. Sabine Rüsch - Gerdes und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Mykobakteriologie am Nationalen Referenzzentrum möchte ich mich für die freundliche Aufnahme und ihrer vielfältigen Unterstützung bedanken. Ein ganz großer Dank gilt insbesondere Tanja Ubben, Lisa Dost, Ilse Radzio und Petra Vock für ihre Hilfe bei allen wissenschaftlich experimentellen, aber auch bei allen „nicht wissenschaftlichen“ Fragen. Dr. Claudia Plinke und Dr. Silke Feuerriegel, die für mich nicht nur tolle Kolleginnen sondern auch gute Freunde sind, möchte ich für ihre Unterstützung, Motivation aber vor allem für den Spaß bei der Zusammenarbeit danken.
Weiterhin danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Molekularen Infektiologie. Ganz besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Stefan Ehlers für die finanzielle Unterstützung, die mir den Forschungsaufenthalt in Ithaca ermöglichte, bedanken. Stefanie Pfau und Kerstin Kopp danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei der Planung und Durchführung von Experimenten.
Prof. Dr. David Russell und Dr. Kyle Rohde von der *Cornell University, Ithaca, NY* danke ich für die tolle Zusammenarbeit bei der Durchführung der Transkriptionsanalysen. Besonders Kyle Rohde möchte ich für sein Engagement und seinem steten Optimismus danken.

Zuletzt möchte ich meiner gesamten Familie, vor allem aber meinen Mann und meinen Eltern danken, die mir nicht nur diesen Weg ermöglicht, sondern ihn auch mit viel Liebe begleitet haben. Danke, dass ihr immer für mich da seid und an mich glaubt.

Publikationen

Die Ergebnisse, die im Rahmen der vorliegenden Dissertation erarbeitet wurden, sind zum Teil publiziert oder zur Veröffentlichung eingereicht worden.

- **Homolka, S., E. Post, B. Oberhauser, A. G. George, L. Westman, F. Dafae, S. Ruesch - Gerdes, and S. Niemann.** 2008. High genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from Sierra Leone. BMC.Microbiol. 25; 8:103.
- **Hershberg, R., M. Lipatov, P. M. Small, H. Sheffer, S. Niemann, S. Homolka, J. C. Roach, K. Kremer, D. A. Petrov, M. W. Feldman, and S. Gagneux**. 2008. High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. PLoS.Biol. 16; 6(12):e311.
- **Homolka, S., C. Köser, J. Archer, S. Ruesch - Gerdes, and S. Niemann.** 2009. Single nucleotide polymorphisms in Rv2629 are specific for *Mycobacterium tuberculosis* genotypes Beijing and Ghana but not associated with rifampin resistance. J.Clin.Microbiol. 47(1); 223 - 6.
- **Niemann, S., C. U. Köser, S. Gagneux, C. Plinke, S. Homolka, H. Bignell, R. J. Carter, R. K. Cheetham, A. Cox, N. A. Gormley, P. Kokko - Gonzales, L. J. Murray, R. Rigatti, V. P. Smith, F. P. Arends, H. S. Cox, G. Smith, and J. A. Archer.** 2009. Genomic diversity among drug sensitive and multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with identical DNA fingerprints. PLoS.One. 10; 4(10):e7407.
- **Comas, I., S. Homolka, S. Niemann, and S. Gagneux.** 2009. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. PLoS.One. 11;4(11):e7815.
- **Homolka S., S. Niemann, D. G. Russell, and K. H. Rohde.** 2009. Functional Genetic Diversity among *M. tuberculosis* clinical isolates: Delineation of conserved core and lineage - specific transcriptomes during intracellular survival. (Manuskript eingereicht)

Zusätzlich wurden Inhalte dieser Arbeit auf folgenden Tagungen vorgestellt:

- **ESM 2007, 28. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Mykobakteriologie**, **Athen.** Population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from Sierra Leone. (Poster)
- **DGHM 2008, 60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Dresden.** Population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from Sierra Leone. (Vortrag)

- **Dechema 2008. Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V., Frankfurt.** Genetic and biological diversity of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. (Poster)
- **PathoGenoMikPlus 2008. Beiratssitzung des PathoGenoMikPlus Netzwerks, Würzburg.** Genetic and biological diversity of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. (Vortrag)
- **ESM 2009, 30. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Mykobakteriologie**, **Porto.** Growth profile of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex in murine macrophages. (Vortrag)
- **PathoGenoMikPlus 2009. Beiratssitzung des PathoGenoMikPlus Netzwerks, Göttingen.** Transcriptomic variability delineates the phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex. (Poster)

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, dass alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Quellen übernommen wurden, als solche kenntlich gemacht wurden und dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Hamburg, 06.01.2010

Vorname, Nachname