

## 6. Zusammenfassung

Infektionen mit *M. bovis* und *M. tuberculosis* sind histopathologisch durch Granulome und Abszesse gekennzeichnet. Welche StoffwechsellLeistungen es den Mykobakterien ermöglichen in dieser nährstoffarmen, anaeroben Umgebung zu überleben, ist noch nicht endgültig bekannt. Die Reduktion von Nitrat zu Nitrit wird von anderen pathogenen Bakterien für das Wachstum unter anaeroben Bedingungen genutzt. Bei der Sequenzierung des Genoms von *M. tuberculosis* konnten die Gene für die dissimilatorische (anaerobe) Nitratreduktase *narGHJ* identifiziert werden.

Vor diesem Hintergrund gliedert sich die vorliegende Arbeit in einen molekularbiologischen (*in vitro*-) und einen tierexperimentellen (*in vivo*-) Teil.

Im *in vitro*-Teil wurden zunächst die Gene *narGHJ* der dissimilatorischen Nitratreduktase von *M. tuberculosis* näher charakterisiert. Hierzu wurde ein die Gene *narGHJ* tragendes Cosmid und in einem weiteren Experiment die in mykobakterielle Shuttlevektoren integrierten Gene *narGHJ* in den Nitratreduktase-negativen apathogenen *Mycobacterium smegmatis* Stamm mc<sup>2</sup>155 transformiert. Es konnte gezeigt werden, dass *narGHJ* von *M. tuberculosis* eine anaerobe Nitratreduktaseaktivität auf den Nitratreduktase-negativen *M. smegmatis* Stamm mc<sup>2</sup>155 überträgt.

Weiter wurde eine *AnarG*-Mutante von BCG im Hinblick auf ihre Nitratreduktaseaktivität mit dem BCG-Wildtyp verglichen. Als Ergebnisse aus diesen Experimenten lässt sich festhalten, dass BCG eine anaerobe Nitratreduktase hat und eine *AnarG*-Mutante von BCG keine anaerobe Nitratreduktase exprimiert.

In einem abschließenden Experiment wurde die *AnarG*-Mutante von BCG mit den *narGHJ* von *M. tuberculosis* komplementiert, wobei gezeigt werden konnte, dass dieser komplementierte Klon eine anaerobe Nitratreduktaseaktivität aufweist, die um ein Vielfaches höher liegt als die des BCG-Wildtyps.

Im *in vivo*-Teil der vorliegenden Arbeit wurde die *AnarG*-Deletionsmutante von BCG mit dem BCG-Wildtyp im Tiermodell, und zwar in immundefizienten SCID-Mäusen und in immunkompetenten BALB/c-Mäusen, verglichen. Dabei wurde neben dem Überleben der Tiere auch die Keimdichte in Leber, Lunge, Niere, Milz und Gehirn untersucht. Darüberhinaus wurden histopathologische Befunde an Leber, Lunge, Niere und Gehirn erhoben. Aus den durchgeführten Tierexperimenten resultierte, dass die *AnarG*-Mutante von BCG attenuiert ist, und dass immundefiziente SCID-Mäuse, mit der *AnarG*-Mutante von BCG infiziert, zu einem späteren Zeitpunkt sterben als mit dem BCG-Wildtyp infizierte SCID-Mäuse. Auch konnten

wir zeigen, dass die *AnaerG*-Mutante von BCG in SCID-Mäusen kein Wachstum zeigt, wohl aber in den Organen persistiert. Die pathohistologischen Veränderungen bei den mit der *AnaerG*-Mutante von BCG infizierten SCID-Mäusen sind gering- bis mittelgradig. Während die mit dem BCG-Wildtyp infizierten Organe besonders in der Lunge hochgradige Veränderungen aufweisen, bei denen das eigentliche Organparenchym weitgehend zurückgedrängt wurde. Aus den BALB/c-Mäusen wird die *AnaerG*-Mutante von BCG innerhalb von 10 Monaten eliminiert, während der BCG-Wildtyp in diesen Tieren eine subklinische, chronische Infektion hervorruft.

Die anaerobe Nitratreduktase scheint aber keinen Einfluss auf das Wachstum bzw die Persistenz einer Infektion in der Milz zu haben, denn hier konnten bei beiden Tiermodellen keine Unterschiede zwischen der *AnaerG*-Mutante von BCG und dem BCG-Wildtyp festgestellt werden.

## 6. Summary

Christian Fritz

**Contribution of the anaerobic nitrate reductase to the pathogenesis of the infection with *Mycobacterium bovis* BCG in immunodeficient (SCID) mice.**

Infections caused by *M. bovis*, and *M. tuberculosis* are histopathologically characterized by granulomas and abscesses. At present it is not finally settled which metabolic pathway allows mycobacteria to survive in this anaerobic environment that is poor in nutritive materials. Other pathogenic bacteria use the reduction of nitrate to nitrite for their growth under anaerobic conditions. In mycobacteria, a gene cluster homologues to *narGHJI* (encoding the anaerobic nitrate reductase) of *Bacillus subtilis* was first identified in the course of the *M. tuberculosis* project. The anaerobic nitrate reductase is also known as dissimilatory nitrate reductase.

Based on this background the present study is divided in two parts. The first part deals with the molecularbiology of mycobacterias (*in vitro*-part), while the second one consists of results from animal experiments (*in vivo*-part).

In the *in vitro*-part we made a closer characterization of the *narGHJI* of *M. tuberculosis*, using the nitrate reductase-negative strain mc<sup>2</sup>155 of the apathogen *Mycobacterium smegmatis*. We transformed *narGHJI* of *M. tuberculosis* into mc<sup>2</sup>155 of *M. smegmatis*. We showed that *narGHJI* from *M. tuberculosis* transferred the ability of nitrate reduction under anaerobic conditions.

Furthermore we compared the activity of nitrate reduction of a  $\Delta narG$ -mutant with the BCG wild type. As result of this experiment we find out that the BCG-wild type has a anaerobic nitrate reductase and that the  $\Delta narG$ -mutant does not express an anaerobic nitrate reductase.

In a final experiment we complemented the  $\Delta narG$ -mutant with *narGHJI* of *M. tuberculosis* with the result that this clone had an activity of anaerobic nitrate reduction which was much higher than in the BCG-wild type.

In the *in vivo*-part the  $\Delta narG$ -mutant of BCG was compared with the BCG-wild type in the mouse-model. We used immunodeficient SCID-mice as well as immunocompetent BALB/c-mice. In this study we examined not only the survival of the mice but also the bacterial load in the liver, lung, kidney, spleen and brain. Beyond that we collected histopathological findings in these organs. The result of this animal-model was that the  $\Delta narG$ -mutant from BCG is

attenuated and that immunodeficient SCID-mice infected with the mutant die later than when infected with the BCG-wild type. Furthermore we showed that the mutant persisted in the organs but did not show any growth.

The histopathological findings in the SCID-mice showed that the BCG-wild type caused severe changes in the tissue, especially in the lung, where there was almost no parenchyma left. In opposite to that the histopathological findings in the SCID-mice infected with the mutant were only at a low or medium degree. In the immunocompetent BALB/c-mice the BCG-wild type causes a chronic subclinical infections while the infection with the *AnaG*-mutant was cleared from the examined organs within 10 months.

Contrary to the findings in the lungs we could not detect a difference in the spleen between the mutant and the wild type. It seems that the anaerobic nitrate reductase is without any significance on the growth or persistence of the bacteria in the spleen.

The animal experiments lead us to the conclusion that the anaerobic nitrate reductase is essential for the pathogenesis of an infection with the BCG-wild type in immunodeficient SCID-mice but also in immunocompetent BALB/c-mice.