

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen  
Hochschule Hannover und dem Institut für Medizinische Mikrobiologie  
und Krankenhaushygiene der Medizinischen Hochschule Hannover

---

**Untersuchungen zur Regulation**  
**der anaeroben Nitratreduktasen von**  
*Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium bovis* BCG

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

(Dr. med. vet.)

durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

**Vorgelegt von**

**Axel Puncken**

**aus Quakenbrück**

**Hannover 2002**

Wissenschaftliche Betreuung: Priv.-Doz. Dr. med. F.-C. Bange

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. G. F. Gerlach
2. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Jacobs

Tag der mündlichen Prüfung: 22. November 2002

---

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	3
2.1	Mykobakterien	3
2.1.1	Vorkommen und Bedeutung	3
2.1.2	Taxonomie	4
2.1.3	Eigenschaften	4
2.2	Tuberkulose	6
2.2.1	Tuberkulose beim Menschen	6
2.2.1.1	Epidemiologie und Bedeutung	6
2.2.1.2	Klinik	8
2.2.1.3	Ätiologie und Pathogenese	10
2.2.1.4	Diagnose	12
2.2.1.5	Therapie	15
2.2.1.6	Impfung	17
2.2.2	Tuberkulose bei Tieren	20
2.2.2.1	Epidemiologie und Bedeutung	20
2.2.2.2	Klinik	21
2.2.2.3	Ätiologie und Pathogenese	22
2.2.2.4	Diagnose	25
2.2.2.5	Bekämpfung	26
2.3	Nitratstoffwechsel in Mykobakterien	27
2.3.1	Anaerober Stoffwechsel in Mykobakterien	28
2.3.2	Die anaerobe Nitratreduktase	29
3	Material und Methoden	33
3.1	Material	33
3.1.1	Plasmide, Cosmide und Cosmid-Bibliotheken	33
3.1.2	Cosmid-Bibliotheken	35
3.1.3	Bakterienstämme	36
3.1.4	Nährmedien	37
3.1.5	Lösungen und Puffer	39
3.1.6	Puffer und Lösungen für den Zellaufschluß	40
3.2	Methoden	42
3.2.1	Präparation von Plasmid-DNA	42
3.2.2	Präparation genomischer DNA	42
3.2.3	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	43

---

3.2.4	Agarosegelelektrophorese	43
3.2.5	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Banden aus Agarosegelen	44
3.2.6	Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA	45
3.2.7	Ligation	45
3.2.8	Glycogenfällung	46
3.2.9	Herstellung elektrokompenter Zellen von <i>E. coli</i>	46
3.2.10	Transformation in <i>E. coli</i>	46
3.2.11	Transformation in schnellwachsende Mykobakterien	47
3.2.12	Transformation in langsamwachsende Mykobakterien	48
3.2.13	Kultivierung von <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	48
3.2.13.1	Kultivierung unter aeroben Bedingungen	48
3.2.13.2	Kultivierung unter anaeroben Bedingungen	48
3.2.14	Kultivierung langsamwachsender Mykobakterien	49
3.2.14.1	Kultivierung unter aeroben Bedingungen	49
3.2.14.2	Kultivierung unter anaeroben Bedingungen	49
3.2.15	Nitratreduktasetest	49
3.2.16	Die Polymerasekettenreaktion	51
3.2.17	Erstellung einer Einpunktmutation mittels Site-directed mutagenesis	52
3.2.18	Erstellung, Markierung und Quantifizierung einer Hybridisierungssonde	54
3.2.19	Koloniehybridisierung	55
3.2.20	Southernblotanalyse	56
3.2.21	Erstellung einer Cosmid-Bibliothek	57
3.2.22	Überprüfung einer Cosmid-Bibliothek mit Hilfe von auxotrophen Mutanten	59
3.2.23	Sequenzierung	60
4	Ergebnisse	62
4.1	Nitritbildung der komplementierten Deletionsmutante CF1	62
4.2	Isolierung eines Cosmids mit der anaeroben Nitratreduktase aus <i>Mycobacterium bovis</i> BCG	64
4.3	Nitritbildung des Cosmids pAP7 in <i>Mycobacterium smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	70
4.4	Erstellung des Plasmids pAP8 mit der anaeroben Nitratreduktase aus <i>M. bovis</i> BCG	72
4.5	Nitratreduktaseaktivität von pAP8 in <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	76
4.6	Subklonierung der anaeroben Nitratreduktase aus <i>M. bovis</i> BCG in einen replikativen Vektor	77
4.7	Nitritbildung der anaeroben Nitratreduktase aus <i>M. bovis</i> BCG in einem replikativen Plasmid	81

---

4.8	Subklonierung der anaeroben Nitratreduktase aus <i>M. tuberculosis</i> in ein replikatives Plasmid	82
4.9	Nitritbildung der anaeroben Nitratreduktase aus <i>M. tuberculosis</i> in einem replikativen Plasmid	85
4.10	Komplementation der Nitratreduktaseaktivität in einer Nitratreduktasemutante von BCG	88
4.11	Sequenzierungsanalysen in den anaeroben Nitratreduktaseoperons von <i>M. tuberculosis</i> und <i>M. bovis</i> BCG	91
4.12	Untersuchung der Expressionsregulation von <i>narGHJI</i> aus <i>M. tuberculosis</i> und <i>M. bovis</i> BCG mit Hilfe der Site-directed mutagenesis	94
4.13	Nitratreduktaseaktivität von pAP28	99
4.14	Erstellung einer Cosmid-Bibliothek von <i>M. bovis</i> R99	101
4.15	Überprüfung der Cosmid-Bibliothek von <i>M. bovis</i> R99 mit Hilfe von auxotrophen Mutanten	104
4.16	Isolierung eines das <i>narGHJI</i> -Operon tragenden Cosmids aus <i>M. bovis</i> R99	106
4.17	Nitritbildung des Cosmids pAP19 in schnellwachsenden Mykobakterien	108
4.18	Sequenzierungsanalysen im anaeroben Nitratreduktaseoperon von <i>M. bovis</i>	110
5	Diskussion	111
6	Zusammenfassung	117
7	Summary	119
8	Literaturverzeichnis	121
9	Anhang	140
9.1	Geräte	140
9.2	Chemikalien	141
9.3	Enzyme	142
9.4	Gebrauchsmaterialien	143
9.5	Rohdaten	144

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADS	Albumin Dextrose Salt
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
BCG	Bacille Calmette-Guérin
bp/bps	Basenpaar/Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CFU	Colony forming units
d	Tage
dest. H <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	double stranded DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamide Tetraacetic Acid Disodium Dihydrate
evtl.	Eventuell
Fa.	Firma
h	Stunde

HDZ	Hautdickenzunahme
HIV	Human Immunodeficiency Virus
H <sub>2</sub> O	Wasser
i.d.R.	in der Regel
I.E.	Internationale Einheiten
INH	Isoniazid
IW1	? <i>narG</i> -Mutante von BCG
kb	Kilobasenpaare
KBE	Kolonie bildende Einheiten
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LT	Lymphozytentransformationstest
M	Molar
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
mA	Milliampère
MAC	<i>M. avium</i> -Komplex
MB-Medium	Mykobakterien-Basalsalz-Medium
mg	Milligramm
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
Min./min.	Minute(n)
ml	Milliliter

mM	Millimolar
mmol	Millimol
MOTT	Mycobacteria Other Than Tubercle Bacilli
$\mu\text{F}$	Mikrofaraday
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
<i>napABC</i>	Gene für die periplasmatische Nitratreduktase
NapABC	Periplasmatische Nitratreduktase
<i>nar</i>	nitrate anaerobic reductase
<i>narGHJI</i>	Gene für die anaerobe Nitratreduktase
NarGHJI	Anaerobe Nitratreduktase
<i>nasAC</i>	Gene für die assimilatorische Nnitratreduktase
NasAC	Assimilatorische Nitratreduktase
NEB	New England Biolabs
<i>nirBD</i>	Gene für die dissimilatorische Nitritreduktase
nm	Nanometer
NTM	Non Tuberculous Mycobacteria
$\text{OD}_{xxx}$	optische Dichte, der Wert steht für den Wellenlängenbereich in nm
OPA	One Phor All (Buffer)
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure

rpm	rounds per minute
s	Sekunde
sec.	Sekunde
SCID	severe combined immunodeficiency
SD	Standardabweichung
s.a.	siehe auch
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt
ssDNA	single stranded DNA
t	Time
T	Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tb/Tbc	Tuberkulose
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TNF	Tumornekrosefaktor
U/u	unit
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
v.a.	vor allem
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel



## 1 Einleitung

Durch die Entwicklung von Antibiotika in der Mitte des letzten Jahrhunderts kam die Hoffnung auf, sämtliche bakterielle Infektionskrankheiten besiegen zu können. Heute weiß man, daß dieser Gedanke immer noch ein Wunschdenken ist. Bakterien schaffen es immer wieder, innerhalb relativ kurzer Zeit durch Mutationen Varianten ihrer Art zu entwickeln, die gegen die neuesten Antibiotika resistent sind. Ein sehr gutes Beispiel hierfür ist die Tuberkulose. Selbst in den industrialisierten Ländern steigt die Inzidenz an Tuberkulosefällen, weltweit ist die Tuberkulose sogar die häufigste tödlich verlaufende bakterielle Infektionskrankheit. Mindestens 1/3 der Weltbevölkerung ist mit *Mycobacterium tuberculosis* infiziert. Jährlich sterben ca. 3 Millionen Menschen an den Folgen der Tuberkulose, womit diese Krankheit nach AIDS und Malaria die dritthäufigste Erkrankung mit Todesfolge ist. Innerhalb des letzten Jahrzehnts sind über die Erde verteilt mehrere sogenannte „Hotspots“ entstanden. In diesen besonders prägnanten Regionen, zu denen das Baltikum, Afrika und auch Mittel- und Südamerika zählen, haben sich multiresistente Stämme von *Mycobacterium tuberculosis* entwickelt, die bei immunkompetenten Patienten zu 50 % und bei immunsupprimierten Patienten in über 90 % eine letale Infektion nach sich ziehen. Der zur Zeit am häufigsten eingesetzte Impfstoff enthält einen durch Attenuierung entstandenen *Mycobacterium bovis*-Stamm namens BCG (Bacille Calmette Guérin). Dieser Stamm vermittelt jedoch je nach Studie nur einen Impfschutz von 0 bis 80 %. Zudem führt er bei immunsupprimierten Patienten (z.B. HIV, angeborene Immundefekte) zu einer disseminierten BCGitis. Es ist also dringend erforderlich, einen neuen Impfstoff zu entwickeln.

Ein sehr interessanter Ansatz ist die Entdeckung eines alternativen Stoffwechselweges von *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium bovis* BCG. Die Frage, wie es diese obligaten Aerobier schaffen, in sauerstofffreien oder -armen Milieus (Granulome, Abszesse) zu überleben, steuerte unsere Aufmerksamkeit durch die Entschlüsselung des kompletten Genoms von *Mycobacterium tuberculosis* auf einen Enzymkomplex. In anderen Bakterien, z.B. *Bacillus subtilis* oder *Pseudomonas aeruginosa*, stellt dieser Enzymkomplex, codiert durch die Gene *narGHJI*, Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor bereit. Dadurch ist es diesen obligaten Aerobiern möglich, unter anaeroben Bedingungen zu existieren. *Mycobacterium tuberculosis* besitzt die Fähigkeit, durch diesen Enzymkomplex Nitrat zu Nitrit zu reduzieren (WEBER 1999). Aufgrund dieser Fähigkeit heißt der Enzymkomplex anaerobe Nitratreduktase. FRITZ hat gezeigt, daß auch

*Mycobacterium bovis* BCG diese Nitrat reduzierenden Eigenschaften besitzt (2001). Es hat sich herausgestellt, daß *Mycobacterium tuberculosis* mehr Nitrat zu Nitrit reduzieren kann als *Mycobacterium bovis* BCG.

Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation der anaeroben Nitratreduktasen von *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium bovis* BCG zu untersuchen. Genauere Kenntnisse diesbezüglich könnten Rückschlüsse über die Virulenz dieser Bakterien zulassen.

## 2 Schrifttum

### 2.1 Mykobakterien

#### 2.1.1 Vorkommen und Bedeutung

Mykobakterien sind weltweit verbreitet, wobei die meisten saprophytäre Umweltkeime sind. Sie konnten z.B. in Ackerböden, Staub (v.a. *M. fortuitum*), Abwasser, Klärschlamm, Waldböden, Aquarien, natürlichen und künstlichen Gewässern, Schwimmbädern (v.a. *M. marinum*, führt zum sog. Schwimmbadgranulom) und in Wasserleitungen (z.B. *M. gordonae*, *M. kansasii*) (SZEWZYK et al. 2000) nachgewiesen werden (DEDIÉ et al. 1993). Die im Staub vorkommenden Mykobakterien können sich nicht in ihm vermehren, bleiben aber über einen langen Zeitraum infektiös und werden daher mit diesem verbreitet (SCHULZE-RÖBBECKE 1993).

Eine Ausnahme innerhalb der Gattung *Mycobacterium* stellen die obligat pathogenen Keime dar, zu denen beispielsweise *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* (stellen zusammen den *M. tuberculosis*-Komplex dar), *M. avium* (Erreger der Geflügeltuberkulose) und *M. leprae* gerechnet werden (SCHULZE-RÖBBECKE 1993). Sie können sich in der unbelebten Umwelt nicht vermehren und sind somit auf einen Wirt angewiesen, in dem sie parasitär leben. Die Spezies *M. tuberculosis* und *M. bovis* können Menschen und andere Primaten infizieren und eine Erkrankung auslösen, wohingegen Säugetiere im allgemeinen nur durch *M. bovis* erkranken (ROSENBERGER 1970, WILESMITH u. CLIFTON-HADLEY 1994, SELBITZ 2002). *M. avium* wurde in Vögeln nachgewiesen, eine Übertragung von Rindern, Schafen, Ziegen, Schweinen, Hunden und Katzen auf den Menschen konnte gezeigt werden (HAWTHORNE u. LAUDER 1962, WILESMITH u. CLIFTON-HADLEY 1994). *M. leprae* konnte bisher nur aus Menschen isoliert werden (HAHN 1994), *M. fortuitum* aus Süßwasserfischen in Südafrika (BRAGG et al. 1990). Für *M. marinum*-Infektionen konnte der Nachweis erbracht werden, daß eine Infektion mit Bakterien aus Schwimmbadwasser sowie aus Aquariumwasser mit infizierten Fischen erfolgt war (SCHULZE-RÖBBECKE 1993).

### 2.1.2 Taxonomie

Die Mykobakterien gehören dem Stamm Firmicutes an, dessen Merkmal eine Zellwand vom grampositiven Typ ist. Die phylogenetische Klassifikation ordnet sie aufgrund eines G+C-Gehaltes von mehr als 50 mol% den Actinobacteria zu. Innerhalb der Gruppe der Actinomyceten („Strahlenpilze“) gibt es die Familien Actinomycetaceae, Mycobacteriaceae (wird in der neuesten Ausgabe des Bergey's Manual of Determinative Bacteriology nicht mehr erwähnt), Corynebacteriaceae, Nocardiaceae und Dermatophilaceae. Die einzige Gattung der Familie Mycobacteriaceae ist *Mycobacterium* mit über 50 Arten.

Aufgrund ihrer Pathogenität werden die Mykobakterien in Hauptgruppen unterteilt. Die obligat pathogene Gruppe besteht aus dem *M. tuberculosis*-Komplex, zu dem die Erreger *M. tuberculosis*, *M. bovis* (einschließlich der Impfstämme *M. bovis* BCG), *M. africanum* und wegen der hohen Homologie auch *M. microti* gehören. Die fakultativ pathogenen Keime werden als NTM („non-tuberculous-bacilli“) oder MOTT („mycobacteria other than tubercle bacilli“) bezeichnet (SALFINGER u. KAFADER 1992). Eine weitere „Gruppe“ ist der Erreger der humanen Lepra, das *M. leprae*. Innerhalb der Gruppe der NTM gibt es verschiedene Untergruppen. Als MAI-Komplex oder MAC werden die Erreger *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. marinum* und *M. xenopi* zusammengefasst, da eine große strukturelle Übereinstimmung besteht (DEDIÉ et al. 1993). Mykobakteriosen können unter bestimmten Bedingungen auch durch weitere Mykobakterien der NTM, beispielsweise durch *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai* und *M. simiae*, ausgelöst werden (DEDIÉ et al. 1993).

### 2.1.3 Eigenschaften

Mykobakterien sind grampositive, leicht gebogene, ca. 0,2 - 0,7 x 1,0 - 10,0 µm große, sporenlose, unbewegliche Stäbchen. Ihr G+C-Gehalt liegt bei 61 - 71 mol%. In der Zellwand befinden sich Mykolsäuren mit 60 - 90 C-Atomen, die den Bakterien eine hohe Alkohol- und Säurefestigkeit bescheren, eine Eigenschaft, die man sich beim Anfärben der Bakterien zunutze macht (DEDIÉ et al. 1993). Karbolfuchsin bildet mit freien Mykolsäuren in der Zellwand einen Komplex, der einer Entfärbung mit HCl-Alkohol standhält (SALFINGER u. KAFADER 1992). Weit verzweigte

Filamente sind nicht typisch, können aber auftreten (SELBITZ 2002). Mykobakterien wachsen bei 37 °C unter aeroben bis mikroaerophilen Bedingungen (5 –10 % CO<sub>2</sub>) auf komplexen Nährböden in z. T. variabler Kolonieforn. Während die NTM mit einer Wachstumsgeschwindigkeit von drei bis sieben Tagen zu den schneller wachsenden Mykobakterien gerechnet werden, zählen die zu dem *M. tuberculosis*-Komplex gehörenden Mykobakterien zu den langsamwachsenden Mykobakterien, ihr Wachstum erstreckt sich auf drei bis vier Wochen. Die dem *M. tuberculosis*-Komplex zugehörigen Mykobakterien wachsen immer mit einer rauen Oberfläche, während *M. avium* dies nur in Ausnahmefällen tut (DEDIÉ et al. 1993).

1959 unterteilte RUNYON die NTM nach ihrer Wachstumsgeschwindigkeit und ihrem Pigmentationsverhalten in vier Gruppen. Inzwischen ist bekannt, daß dieses System veraltet ist, es sei jedoch wegen der daraus hervorgehenden Eigenschaften mit aufgeführt.

- Runyon-Gruppe I: langsamwachsend, photochromogen; *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*
- Runyon-Gruppe II: langsamwachsend, skotochromogen; *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*
- Runyon-Gruppe III: langsamwachsend, keine Pigmentbildung; *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. terrae*
- Runyon-Gruppe IV: schnellwachsend, *M. smegmatis*, *M. chelonae*, *M. phlei*, *M. vaccae*

Wie sich im Laufe der Zeit herausstellte, ist dieses Schema zu einfach und genügt nicht den Ansprüchen einer Klassifizierung, da innerhalb einer Spezies Unterschiede im Pigmentbildungsverhalten auftreten können.

Der Lipidgehalt der Tuberkuloserreger ist mit 13,4 – 23,8 % höher als bei den Saprophyten mit ca. 8,4 % (WILSON u. MILES 1964). Aus der Gruppe der Lipide ist eines von besonderer Bedeutung für die Virulenz. Das Trehalose-6,6-Dimykolat, der sog. „Cord-Faktor“ bewirkt das strangartige, wie Zöpfe aussehende Wachstumsmuster junger *M. tuberculosis*-Kulturen (DEDIÉ et al. 1993). Zudem zeichnet dieses Lipid für die Phagozytosehemmung, die Gewebeschädigung und die Virulenzsteigerung verantwortlich (COLLINS 1989). Die lipopolysaccharid- und wachsartigen

Substanzen der Mykobakterien haben aber auch eine die unspezifische Immunität steigernde Wirkung, die therapeutisch ausgenutzt werden kann, z.B. das BCG-Vakzin bei der Behandlung des Blasenkarzinoms oder des equinen Sarkoids sowie das Freund-Adjuvans (KREBS et al. 1977). Die Mykobakterien besitzen Phosphatide, die im Körper des Wirtes als Reizstoffe fungieren und so die Granulombildung fördern (DEDIÉ et al. 1993). Insgesamt besitzen Mykobakterien aber über 50 Antigenfaktoren, die zur Identifizierung herangezogen werden und pro Art 1 – 17 Serovare (DEDIÉ et al. 1993).

Aufgrund ihres Zellwandaufbaues haben Mykobakterien eine Tenazität, die höher ist als die anderer sporenloser Bakterien. In der Außenwelt können sie unter günstigen Bedingungen mehrere Monate infektiös bleiben. Die Einlagerung in Bronchialschleim, Milch oder ähnlichen Medien verstärkt diese Eigenschaft zudem. Temperaturen über 100 °C führen innerhalb kürzester Zeit zum Absterben, für die Milch haben sich die Kurzzeitpasteurisierung bei 71 – 74 °C und die Hoherhitzung bei 80 – 85 °C bewährt (SELBITZ 2002). Säuren und Alkalien haben nur eine begrenzte Wirkung auf Mykobakterien, sehr resistent sind sie auch gegen Eintrocknen und Gefrieren, so überleben sie sogar die Hitzefixierung und die chemische Behandlung bei der Ziehl-Neelsen-Färbung (DEDIÉ et al. 1993). Zur Desinfektion sind deshalb nur bestimmte hinsichtlich ihrer Tuberkulozidie überprüfte (den Desinfektions-mittellisten der DVG zu entnehmende) Mittel zugelassen, bspw. Formaldehyd, Phenol, chlorabspaltende Mittel, Alkohole, Aldehyde und quarternäre Ammoniumverbindungen (SELBITZ 2002). Mykobakterienkulturen sind bis zu zwölf Jahre überlebensfähig, in Fäkalien, Gülle und Abwässern bis zu sechs Monate. Jedoch sind sie empfindlich gegen direktes Sonnen- oder UV-Licht und oxidierende Verbindungen (DEDIÉ et al. 1993).

## **2.2 Tuberkulose**

### **2.2.1 Tuberkulose beim Menschen**

#### *2.2.1.1 Epidemiologie und Bedeutung*

Seit Jahrhunderten ist die Tuberkulose diejenige bakterielle Infektionskrankheit, an der weltweit die meisten Menschen sterben. Daran hat sich bis heute nichts geändert. Innerhalb der letzten 15 Jahre

sind die Inzidenz und die Prävalenz dieser Erkrankung stark gestiegen (STOKSTAD 2000). Heute sind 1/3 der Menschheit latent mit *M. tuberculosis* infiziert, von denen nach Expertenschätzungen 10 % im Laufe ihres Lebens erkranken werden. Zunehmender internationaler Reiseverkehr, ansteigende Migration und das gehäufte Auftreten von HIV-Patienten, insbesondere in den Entwicklungsländern, werden für die steigenden Fallzahlen verantwortlich gemacht (RAVIGLIONE et al. 1995). In diesen Ländern sterben jährlich zwei bis drei Millionen Menschen an Tuberkulose (RKI 2001). Epidemiologische Beobachtungen in New York, USA, legten dar, daß 1992 dreimal mehr Tuberkulosefälle aufgetreten sind als noch 1978 (FRIEDEN et al. 1995). Die Hälfte aller Tuberkulosepatienten war gleichzeitig mit dem HI-Virus infiziert (HAMBURG 1995). Eine Studie, die im Jahr 2000 in Japan durchgeführt wurde, belegt, daß seit 1997 ein Aufwärtstrend der Tuberkuloseinzidenzen zu verzeichnen ist (NAKATANI et al. 2002). Nach mehr als 40jähriger Anwendung von Therapeutika gegen die Tuberkulose ist das Auftreten von multiresistenten Stämmen von *M. tuberculosis* heute zu einem weltweiten Problem geworden (NOLAN 1997; SALOMON u. PERLMAN 1999). Die WHO informierte im März 2000, daß die Anzahl an resistenten Stämmen in Deutschland und Dänemark seit 1996 um 50 % auf 10,3 % bzw. 13,1 % angestiegen ist (STOKSTAD 2000). In Russland sind 7 %, in Teilen von Indien 14 % und in Estland sogar 22 % aller Stämme von *M. tuberculosis* resistent gegen Rifampicin und Isoniazid.

Neben der Resistenz ist aber auch die Persistenz der Mykobakterien für ihre lange Erfolgsgeschichte verantwortlich. *M. tuberculosis* kann innerhalb eines infizierten Individuums über einen langen Zeitraum überleben, ohne klinische Krankheitserscheinungen auszulösen (HÖNER ZU BENTRUP u. RUSSELL 2001). Wie Studien belegen, ist es selbst nach einer scheinbar erfolgreich durchgeführten Chemotherapie zu Rezidiven gekommen. Für den Fall, daß Rifampicin nicht in der Therapie verwendet wird, liegt die Rezidivrate bei über 10 % (East African-British Medical Research Councils 1974). Die für das erneute Ausbrechen der Erkrankung verantwortlichen Stämme sind weiterhin empfindlich gegen die verwendeten Medikamente. Demnach sind keine Mutationen aufgetreten, sondern die Mykobakterien blieben von der Chemotherapie unbeeinflusst. Diese Persistenz ist auch für den Verlauf einer Infektion mit *M. tuberculosis* bei nicht behandelten Patienten typisch und erklärt die hohe Anzahl von 2 Milliarden infizierten Menschen (RAVIGLIONE et al. 1995).

In dem Epidemiologischen Bulletin des Robert-Koch-Institutes (RKI), Nr. 46 vom 16. November 2001, ist die derzeitige Tuberkulosesituation für Deutschland offengelegt. Obwohl die Situation

bisher als nicht bedrohlich angesehen wird, gehört Deutschland nicht zu den „low incidence countries“. Die Zahl der gemeldeten Neuerkrankungen an aktiver Tuberkulose im Jahr 2000 betrug 9064. Das entspricht einer Inzidenz von 11,0 Erkrankungen auf 100.000 Einwohner. Im Vergleich mit den Zahlen aus den Vorjahren ist ein Rückgang an jährlichen Neuerkrankungen festzustellen. Der Anteil an erkrankten Ausländern beträgt derzeit 33,6 %. Der Anteil an erkrankten Kindern unter 15 Jahren ist mit 4,9 % um 17 Fälle gestiegen. Dies wird als bedeutsam angesehen, weil durch die häufige und zeitnahe Erkrankung nach einer Infektion das aktuelle Tuberkulosegeschehen an dieser Gruppe abgelesen werden könne. Die Inzidenzraten lagen im Jahr 2000 bundesweit zwischen 17,2 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner in Hamburg und 7,6 in Sachsen. Niedersachsen gehört zu den Bundesländern mit relativ niedrigen Inzidenzraten. Im Jahr 1998 betrug sie 9,9 , 1999 5,6 und im Jahr 2000 9,1 pro 100.000 Einwohner. Nur Niedersachsen und das Saarland haben steigende Inzidenzen zu verzeichnen, in allen anderen Bundesländern blieben sie auf gleichem Niveau.

#### 2.2.1.2 Klinik

Eine Infektion mit *M. tuberculosis* führt nicht automatisch sofort zu einer Tuberkulose. Während Kinder meistens innerhalb eines kurzen Zeitraumes erkranken, kann die Inkubationszeit bei Erwachsenen mehrere Jahre betragen. Tritt der Erkrankungsfall sofort nach einer Infektion ein, spricht man von einer Primärtuberkulose. Demgegenüber spricht man von einer postprimären Tuberkulose, wenn die Krankheit mehr als zwei Jahre nach einer Infektion auftritt. Anhand des Ausdehnungsgrades wird zwischen einer Miliartuberkulose, einer mäßig fortgeschrittenen und einer weit fortgeschrittenen Tuberkulose unterschieden (MATHIESSEN et al. 1992)

In der ersten Krankheitsphase verläuft eine Tuberkulose häufig symptomlos. Im fortgeschrittenen Stadium treten Allgemeinerscheinungen wie gestörtes Allgemeinbefinden, Appetitlosigkeit, Nachtschweiß, Fieber, Schüttelfrost, Gewichtsverlust und vermindertes Leistungsvermögen auf. Je nach Lokalisation erscheinen auch Heiserkeit, Husten, Halsschmerzen und Thoraxschmerzen (MAGNUSSEN u. KANZOW 2001). Regelanomalien wurden ebenfalls beobachtet (DEDIÉ et al. 1993).

Nach MATTHIESSEN et al. (1992) wird die Erkrankung der Lunge wie folgt eingeteilt:

- Intrathorakale Lungentuberkulose mit intrathorakaler Lymphknotentuberkulose, stenosierender Bronchustuberkulose, Lungentuberkulose durch Lymphknoteneinbruch in das

Bronchialsystem, hämatogener Lungentuberkulose und Pleuritis exsudativa tuberculosa

- Postprimäre Lungentuberkulose in Form von einer Oberlappenspitzentuberkulose, einer lobulären Lungentuberkulose oder einer infiltrativen Lungentuberkulose

Bei einem Befall der Hiluslymphknoten kann es zu einer Kompression der Bronchien und zu Segment- oder Lappenatelektasen kommen. Im Rahmen einer kavernösen Lungentuberkulose können eingeschmolzene, käsige Nekrosen zu Hohlrumbildungen und Verbindungen zum Bronchialbaum führen (MATTHYS 2000).

In weiter fortgeschrittenen Stadien treten an weiteren Symptomen persistierender Husten mit schleimig-eitrigem, manchmal auch blutigem Auswurf und Heiserkeit hinzu (DEDIÉ et al. 1993).

Die einzelnen pulmonalen Tuberkuloseformen können röntgenologisch voneinander abgegrenzt werden, z.B. miliare Herde bei der Miliartuberkulose, ebenso die exsudative, käsige und die fibrotische Form der postprimären Lungentuberkulose (MATTHYS 2000).

Gelangen Mykobakterien in den großen Körperkreislauf, manifestieren sie sich in anderen Organen, so dass extrathorakale Organtuberkulosen auftreten. Neben den unspezifischen Symptomen kann es zu abdominellen Schmerzen und Gelenkschmerzen kommen, speziell bei Knochen- und Gelenktuberkulose. Raumfördernde tuberkulöse Prozesse im Abdomen (z.B. tuberkulöser Psoasabszeß) können zu Flankenschwellung und bei Verlegung der Ureteren zu einer Hydronephrose führen (BUCHHOLZ et al. 2000).

Eine urogenitale Tuberkulose zeigt sich anhand der Leitsymptome rezidivierende Pyelonephritis und eventuell auch Hämaturie. Im weiteren Verlauf treten Entzündungen der Becken- und Geschlechtsorgane auf (DEDIÉ et al. 1993).

Andere Organmanifestationen im Abdomen sind die Darmtuberkulose, die häufig im Ileocaecalbereich auftritt und dann zu Ileus, Durchfall, Blut im Stuhl und Malabsorptionsstörungen führen kann (DIERICH et al. 2000) und die Peritonealtuberkulose mit Peritonitis und Aszites (DEDIÉ et al. 1993).

Neben unspezifischen Symptomen treten auch abdominelle Schmerzen oder Gelenkschmerzen, insbesondere bei Knochen- bzw. Gelenktuberkulose, auf. Diese Form der Tuberkulose ist häufig an

den Wirbelkörpern lokalisiert (Spondylitis tuberculosa). Eine Zerstörung der Wirbelkörper führt zu einer Kompression des Rückenmarks mit den daraus resultierenden Symptomen bis hin zu einer Querschnittslähmung (DIERICH et al. 2000). An der Wirbelsäule bedingten ausgedehnte Senkungsabszesse Schmerzen und Funktionsstörungen (DEDIÉ et al. 1993). Andere Lokalisationen wie Hüft- oder Kniegelenk sind bekannt.

Eine meningeale Form der Tuberkulose, die vor allem bei Kleinkindern in Erscheinung tritt, äußert sich nach einem schleichenden Beginn durch Kopfschmerzen, Wesensänderungen, Leistungsschwäche Krämpfe, Erbrechen und Appetitlosigkeit (DEDIÉ et al. 1993). In einem späteren Stadium der Krankheit kann es zu Läsionen der Hirnnerven II, III, IV, VI, VII und VIII kommen, die selbst nach einer erfolgreichen Therapie neurologische Schäden bis hin zur Bewußtlosigkeit nach sich ziehen können (MALTEZOU et al. 2000).

Die tuberkulöse Pericarditis gehört zu den selteneren Organmanifestationen und resultiert in einer erheblichen Absenkung des Herzminutenvolumens. In einem solchen Fall ist die Letalität sehr hoch (DEDIÉ et al. 1993).

Die sehr selten auftretenden Hautformen der Tuberkulose sind der Lupus vulgaris mit papulöser Entzündung und die Tuberculosis verrucosa cutis mit granulomatösen, warzenähnlichen Läsionen (DIERICH et al. 2000).

Tuberkulosen nach extrapulmonaler Primärinfektion sind nur noch sehr selten anzutreffen. Sie können durch Infektionen in der Mundhöhle eine Tonsillen- oder Halslymphknoten-tuberkulose bewirken. Eine enterale Infektion kann zu einer Ileozäkaltuberkulose mit eventueller Beteiligung der Mesenteriallymphknoten führen. Neben uncharakteristischen Bauchschmerzen kommen Ileus, Durchfall und Blut im Stuhl vor (DIERICH et al. 2000). Eine tuberkulöse Peritonitis kann folgen. Auch bei diesen Primärinfektionen kann es zu einer hämatogenen Aussaat kommen, die alle postprimären Verlaufsformen einschließlich der Miliartuberkulose nach sich ziehen kann.

Eine generalisierte Miliartuberkulose kann einen milden, unspezifischen Verlauf, oft aber auch ein infektiös-toxisches Krankheitsbild mit hoher Letalität annehmen (DEDIÉ et al. 1993).

### 2.2.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Die Tuberkulose wird beim Menschen durch *M. tuberculosis*, *M. africanum* oder *M. bovis*

hervorgerufen. In Mitteleuropa überwiegt die Infektion mit *M. tuberculosis* mit einem Anteil von 99 %, *M. africanum*-Infektionen kommen praktisch nur in Westafrika vor, Infektionen mit *M. bovis* sind seit der Bekämpfung der Rindertuberkulose selten geworden (MATTHIESSEN et al. 1992). Infektionsquelle sind erkrankte und infizierte Menschen (VALVAY et al. 1998). Nahrungsmittelinfektionen durch z.B. kontaminierte Milch oder erregerhaltiges Fleisch sowie eine Übertragung der Tuberkulose von infizierten Tieren auf den Menschen sind heute sehr selten geworden (DOHOO et al. 1998, CORRY u. HINTON 1997). Von untergeordneter Bedeutung sind Infektionen durch Staub (Aufwirbeln von eingetrockneten bakterienhaltigen Ausscheidungen beim Bettenmachen oder bei der Fußbodenpflege) und Laborinfektionen. Eintrittspforten sind die Mundschleimhaut, die Tonsillen oder die Ileozäkalregion des Darms (MATTHIESSEN et al. 1992).

Der häufigste Übertragungsweg für Mykobakterien ist die Aerosolinfection. Das Sputum erkrankter und unbehandelter Personen mit einer „offenen“ Tuberkulose enthält in jedem Tropfen eine große Anzahl von Mykobakterien, die über die Luft in die Atemwege anderer Menschen gelangen (MATTHIESSEN et al. 1992).

Voraussetzung für eine Erkrankung ist die Infektion mit großen Bakterienmengen und darauffolgender Erregervermehrung und –ausbreitung. Die nach MATTHIESSEN et al. (1992) charakteristischen Ausbreitungswege sind:

- 1.) lymphogene Streuung
- 2.) hämatogene Aussaat nach Einbruch in das Gefäßsystem oder nach lymphogener Ausbreitung über den Angulus venosus
- 3.) örtliche Ausbreitung (Organtuberkulose)
- 4.) kanalikuläre Aussaat bei verkästen und eingeschmolzenen Prozessen; bekannt sind die bronchiogene Ausbreitung und die Aussaat über den Harn bei bestehender Nierentuberkulose mit Ausbreitung auf die Ureteren, die Harnblase und die männlichen Genitalien.

An der Eintrittspforte entwickelt sich ein entzündlicher Primärherd. Durch die Ausbreitung der

Entzündung über die Lymphgefäße zu den regionären Lymphknoten entsteht der sog. Primärkomplex (DEDIÉ et al. 1993). In 96 – 98 % der Fälle kommt es in der Folge zum Stillstand der Entzündung und vorübergehenden oder dauerhaften Ausheilung. Die entzündlichen Prozesse resorbieren und vernarben (MATTHIESSEN et al. 1992).

Im Verlauf einer Tuberkulose treten die typischen Erscheinungen einer chronisch-spezifischen Entzündung auf. Die zelluläre Immunantwort bewirkt einen Tropismus von Epitheloidzellen, Langhans-Riesenzellen, Lymphozyten und Makrophagen, die einen Abwehrwall für die zentral gelegenen Mykobakterien darstellen (FRIEDLAND 1999). Eine exsudative Entzündung geht mit einer Infiltration polymorphkerniger Leukozyten, Makrophagen und Lymphozyten einher. Bei der produktiven oder granulomatösen Entzündung bilden sich die charakteristischen Tuberkel oder Granulome aus, in deren Innem Epitheloidzellen und Riesenzellen vom Langhanstyp zu finden sind. Ihr Zentrum kann verkäsen und sekundär verkalken (BARON et al. 1994). Die Mykobakterien persistieren in solchen Herden über Jahrzehnte und bleiben virulent. Dadurch geht von ihnen ständig die Bedrohung einer postprimären Erkrankung aus. Eine lymphogene und / oder hämatogene Ausbreitung der Bakterien vor Eintreten einer relativen zellulären Immunantwort führt zu einer Frühgeneralisation. Diese verläuft als akute Miliartuberkulose oder in Form einer protrahierten Generalisation (MATTHIESSEN et al. 1992). Kommt es mehr als zwei Jahre nach einer Infektion mit Mykobakterien zu einer Reaktivierung der alten Herde, entwickelt sich eine postprimäre Lungentuberkulose (MATTHYS 2000). Solche Verlaufsformen zeigen sich in einer chronischen Organtuberkulose, die durch kanalikuläre oder direkte Ausbreitung auf einen großen Teil oder auf das gesamte Organ entstanden ist (MATTHIESSEN et al. 1992). Durch Einschmelzungsprozesse kommt es zu Kavernenbildungen und / oder zu Einbrüchen in bestehende Hohlraumsysteme, z.B. in den Bronchialbaum, wodurch eine sog. „offene Tuberkulose“ entsteht (MATTHYS 2000). Bei schlechter Resistenzlage des Wirtes können persistierende Mykobakterien eine Exazerbation bewirken. Man spricht in diesem Fall von einer Spätgeneralisation (MATTHIESSEN et al. 1992).

#### 2.2.1.4 Diagnose

Bereits eine sorgfältige Anamnese, zu der eine genaue Hinterfragung der Familien- und Arbeitsverhältnisse zählen, kann eine Verdachtsdiagnose ergeben. Neben der vielfältigen Symptomatik geben eine Leukozytose mit Linksverschiebung, eine stark erhöhte

Blutsenkungsgeschwindigkeit und ein erhöhter  $\alpha_2$ -Globulinwert einen Hinweis auf ein akutes Geschehen. Im chronischen Stadium sind eine relative Leukozytose, eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit und ein Anstieg der  $\gamma$ -Globulinfraction zu verzeichnen. Eine röntgenologische Thoraxübersicht, auf der eventuell vorhandene Verdichtungen auf dem Röntgenbild zu erkennen sind, ist immer angeraten (MATTHIESSEN et al. 1987). Weitere radiologische Diagnostika wären die Sonographie und die Computertomographie (FRIEDLAND 1999).

Nach wie vor ist die Tuberkulinhauttestung ein approbates Mittel, Tuberkulinreagenten ausfindig zu machen. Die am häufigsten eingesetzten Tests sind der Tine-Test und der Mendel-Mantoux-Test. Beide Verfahren beruhen auf einer zellvermittelten Über-empfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (Typ IV) auf das zuvor injizierte Tuberkulin. Der Nachteil dieses diagnostischen Verfahrens ist, daß es lediglich gegen das Tuberkulin gerichtete T-Zellen nachweist. Diese können auch aus einer früheren Infektion oder Impfung resultieren, so daß ein positiver Tuberkulintest keine Aussage über eine akute Tuberkuloseinfektion zulässt (MATTHYS 2000).

Eine sichere Diagnose ist nur durch den Erregernachweis zu stellen. Für eine bakteriologische Untersuchung eignen sich viele Se- und Exkrete der Patienten (Sputum, Nüchtermagensaft, Pleuraexsudat, Menstrualblut, Prostatasekret oder Ejakulat, Synovia und Liquor), aus denen die Mykobakterien kulturell angezüchtet werden (FRIEDLAND 1999). Zur Kultivierung eignen sich Nährmedien, die auf einer Ei- oder Kartoffelbasis aufgebaut sind. Beispiele sind Middlebrook 7H10/11, das Löwenstein-Jensen-Medium, Gottsacker-Medium, Coletsos-Medium und das Petragani-Medium (SALFINGER u. KAFADER 1992, FRIEDLAND 1999). Die Nährmedien sollten über eine Zeit von acht Wochen inkubiert werden, da die Bakterien des *M. tuberculosis*-Komplexes zu den langsamwachsenden Spezies gehören. Innerhalb von drei bis vier Wochen wachsen raue und weißliche Kolonien heran. Mit Hilfe der herangezüchteten Kolonien erfolgen Typenbestimmungen sowie Sensibilitätstestungen (FRIEDLAND 1999).

Aus den oben genannten Patientenmaterialien werden Direktpräparate angefertigt, die nach Ziehl-Neelsen oder Kinyoun gefärbt werden. Beide Färbetechniken nutzen die Säurefestigkeit der Mykobakterien aus, durch die die Bakterien nicht mit saurem Alkohol entfärbt werden können und dadurch im mikroskopischen Aufsichtpräparat rot erscheinen (MATTHIESSEN et al. 1987, FRIEDLAND 1999, HAAS 2000). Dieses diagnostische Mittel lässt jedoch nur die Aussage zu, daß im Patientenmaterial säurefeste Stäbchen nachgewiesen wurden.

Aus Biopaten, die durch eine Probeexzision oder operativ gewonnen wurden, werden histologische und zytologische Untersuchungen durchgeführt. Während die eine Hälfte des Biopats den oben beschriebenen bakteriologischen Untersuchungen zugeführt wird, muß die andere Hälfte für die pathologisch-anatomischen Untersuchungen in Formalin eingelegt werden. Das Vorhandensein einer epitheloidzelligen Granulomatose unterstützt die Diagnose einer Tuberkuloseinfektion (MATTHIESSEN et al. 1987).

Für eine Speziesdiagnose müssen biochemische und molekularbiologische Verfahren angewendet werden. Ein besonderes Augenmerk fällt auf das Nitratreduktionsvermögen von *M. tuberculosis* unter aeroben Bedingungen. Diese Spezies ist innerhalb des *M. tuberculosis*-Komplexes die einzige mit dieser Eigenschaft, wodurch eine Abgrenzung zu *M. bovis*, BCG, *M. africanum* und *M. microti* möglich ist (VIRTANEN 1960, MATTHIESSEN et al. 1987, FRIEDLAND 1999). Andere Tests nutzen die Fähigkeit zur Niacinproduktion oder die Eigenschaft, eine hitzesensitive Katalase zu bilden, aus (FRIEDLAND 1999).

Ein relativ schnelles diagnostisches Verfahren ist das BACTEC-System, das auf einem 7H12-Medium mit einer an ein  $^{14}\text{C}$ -Atom gebundenen Palmitinsäure als einziger Kohlenstoffquelle basiert. Stoffwechselaktive Mykobakterien bewirken eine Freisetzung von radioaktivem  $^{14}\text{CO}_2$ , das durch dieses System erkannt wird (FRIEDLAND 1999).

*M. tuberculosis* kann auch durch ein Fettsäureprofil identifiziert werden. Mit Hilfe einer HPLC (High Performance Liquid Chromatography), einer Gasflüssigkeitschromatographie oder einer Dünnschichtchromatographie werden solche Profile erstellt und mit Daten bekannter Stämme verglichen (FRIEDLAND 1999).

Ein neueres Verfahren stützt sich auf eine kalorimetrische Methode. Es beruht auf einem Middlebrook 7H9-Medium mit einem sauerstoffsensitiven, fluoreszierenden Wachstums-indikator, der ein Bakterienwachstum anzeigt (FRIEDLAND 1999).

Ebenfalls zu den neueren Methoden werden gentechnische Verfahren gerechnet. Mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR) können Mykobakterien auf bestimmte DNA-Sequenzen, meistens das IS6110 (Insertionssequenz 6110) oder das 16S-rRNA-Gen, untersucht werden (MATTHIESSEN et al. 1987, FRIEDLAND 1999). Eine weitere Methode verwendet einen Reporter-Phagen, der mit einem Luciferasegen des Glühwürmchens *Photinus pyralis* ausgestattet ist. Wird ein solcher Phage (z. B. TM4) in der Gegenwart von Luciferin und ATP in Mykobakterien

eingebraucht, erfolgt durch die Bakterien eine Oxidation zu Luciferyl-AMP. Dieses Zwischenprodukt zerfällt zu oxy-Luciferin, das pro Molekül Substrat 0,85 Photonen abgibt. Diese Lichtemission kann in einem Luminometer gemessen werden (FRIEDLAND 1999).

In der Serodiagnostik kommen verschiedene ELISA zur Anwendung, die mykobakterielle Proteine nachweisen. Zu nennen sind hier das 16 kDa hsp, das 30 kDa-Antigen, die 38 kDa-Antigene und das LAM. Ein entscheidender Nachteil dieser Methoden ist die geringe Sensitivität (FRIEDLAND 1999).

### 2.2.1.5 Therapie

Es gibt eine Reihe von Tuberkulostatika, die in Kombination bei einer Chemotherapie eingesetzt werden. Bewährt haben sich Rifampicin, Isoniazid, Pyrazinamid, Ethambutol und Streptomycin. Laut MATTHIESSEN et al. (1987) gelten für eine erfolgreiche antituberkulöse Therapie folgende Grundsätze:

- 1.) Am Anfang muß eine Intensivbehandlungsphase stehen, die zum Ziel haben soll, mit einer Drei- oder Vierfachkombination der oben aufgeführten Medikamente die Keimzahl möglichst schnell zu reduzieren, eine kulturelle (Sputum-) Konversion zu erzielen und die Entwicklung sekundärer Resistenzen zu verhindern.
- 2.) Eine anschließende längere Stabilisierungsphase soll die persistierenden Erreger abtöten, um Rezidive zu vermeiden.
- 3.) Die Auswahl der Medikamente richtet sich nach
  - der Chemotherapiesanamnese; eventuelle sekundäre Resistenzen durch insuffiziente Vorbehandlungen
  - der möglichen Infektionsquelle; aquirierte Primärresistenz durch Ansteckung
  - den Organfunktionsstörungen; Krankheiten der Leber, Niere, Augen, Ohren (N. vestibularis)
- 4.) Eine sehr wichtige Rolle spielt die Zuverlässigkeit der Patienten. Die Einnahme der Medikamente muß stets gesichert sein. Anderenfalls drohen Rezidive mit sekundär resistenten Keimen. Besonders sozioökonomisch bedrohte Menschengruppen sind häufiger

unkooperativ und uneinsichtig. Bei diesen Patienten muß eine strikte Überwachung der Medikamenteneinnahme erfolgen, entweder durch eine Einbestellung in die Praxis, durch Hausbesuche oder durch eine stationäre Aufnahme. Empfehlenswert ist die andauernde Anwendung einer Dreifachtherapie, die die Gefahr von Resistenzen mindert.

- 5.) Die Therapiedauer hängt von der Ausdehnung der Tuberkulose und der verwendeten Medikamentenkombination ab. Rifampicin und Isoniazid scheinen unverzichtbar für eine erfolgreiche Therapie zu sein.

Die oben genannten Medikamente gehören zu den Mitteln der ersten Wahl im Kampf gegen die Tuberkulose (GRANGE u. ZUMLA 1999). Dennoch sind sie nicht ungefährlich, wie die zahlreichen Nebenwirkungen dokumentieren.

Isoniazid (INH oder Isonicotinsäurehydrazid) wirkt bei bestehender Lebererkrankung und möglicherweise auch bei Schwangerschaft hepatotoxisch. Weiterhin bedingt es eine Neuritis im peripheren Nervensystem und seltener auch in den Sehnerven. Weniger häufig auftretende Nebenwirkungen sind Übelkeit, Erbrechen, Gelenkschmerzen sowie sehr selten hypersensitive Reaktionen, Lupus-ähnliche Reaktionen, zerebellare Ataxien, Konvulsionen, Psychosen, Hyperglykämie, Agranulozytose und bei schlecht ernährten Patienten auch Pellagra (GRANGE u. ZUMLA 1999).

Rifampin oder Rifampicin besitzt eine sehr gute antituberkulöse Aktivität, aber auch eine Vielzahl von Wechselwirkungen mit körpereigenen und –fremden Substraten. Eine Eigenschaft des Rifampins ist es, sämtliche Körpersekrete orange einzufärben. Zum einen sollten Patienten darauf vorbereitet werden, zum anderen ist Rifampin dadurch aber ein hervorragender Indikator zur Überwachung der Patientendisziplin bei der Einnahme der Medikamente. An weiteren Nebenwirkungen treten hepatische Erkrankungen bei Vorliegen einer Leberverschädigung auf. Selten führen gastrointestinale Nebenwirkungen wie Gewichtsabnahme, Übelkeit, Erbrechen, abdominale Schmerzen und Diarrhoe zu einem Abbruch der Therapie. Immunitätsvermittelte Reaktionen wie Hautausschläge, Urtikaria, Konjunktivitis und selten auch Hämolyse oder thrombozytopeniebedingte Purpura werden beschrieben (GRANGE u. ZUMLA 1999).

Ebenfalls hepatotoxisch ist das Pyrazinamid. Häufiger allerdings treten milde gastrointestinale

Beschwerden und Gelenkschmerzen auf. Die Patienten zeigen einen herabgesetzten Appetit (GRANGE u. ZUMLA 1999).

Die häufigste Komplikation in der Ethambutoltherapie ist eine retrobulbäre Neuritis, die sich durch eingeschränkte visuelle Wahrnehmung, Farbenblindheit und verkleinerte Sehfelder äußert. Sehr selten tritt eine periphere Neuritis auf. Der Einsatz von Ethambutol bei Kindern sollte generell vermieden werden (GRANGE u. ZUMLA 1999).

Das erste tuberkulostatisch eingesetzte Medikament war das Streptomycin. Es besitzt schon bei niedriger Dosierung eine lange Halbwertszeit, was das Auftreten von Nebenwirkungen begünstigt. Durch die Bindung an die 30S-Untereinheit der rRNA vermindert es die Proteinsynthese und verursacht Fehler beim Lesen der mRNA. Die häufigsten Nebenwirkungen sind eine Oto- und eine Nephrotoxizität, seltenere sind neuromuskuläre Blockaden und Hypersensitivitätsreaktionen mit makulopapulären Hautausschlägen, Fieber und Eosinophilie (GRANGE u. ZUMLA 1999).

Die Medikamente der zweiten Wahl sollten auf den Einsatz bei multiresistenter Lage beschränkt bleiben. Der therapeutische Erfolg dieser Medikamente wurde bis jetzt in keiner klinischen Studie bestätigt. Genannt werden sollen Ethionamid, Imipenem, Clofazamin und Thiazetazon (GRANGE u. ZUMLA 1999).

Die Behandlungsstrategie stützt sich auf die Kombination von drei oder vier der genannten Medikamente innerhalb der ersten zwei Monate. Rifampin und Isoniazid sollten in dieser Kombinationstherapie nicht fehlen. Sofern keine Resistenzen zu befürchten sind, kann die Menge an Medikamenten auf zwei reduziert werden. Auch dann sollten wieder Rifampin und Isoniazid über eine Dauer von vier bis sechs Monaten weitergegeben werden (GRANGE u. ZUMLA 1999).

#### 2.2.1.6 Impfung

Der einzige zur Zeit zugelassene Impfstoff gegen die Tuberkulose ist das BCG-Vakzin. Es handelt sich um einen abgeschwächten *M. bovis*-Stamm, der im frühen 20. Jahrhundert durch 230 Kulturpassagen von Albert Calmette und Camille Guérin hergestellt worden ist. Im Jahr 1921 zum ersten Mal eingesetzt, wurden inzwischen drei Milliarden Menschen mit diesem Impfstoff geimpft, womit er zum meist eingesetzten Lebendimpfstoff überhaupt wurde (MC KINNEY et al. 1998).

BCG wurde lange Zeit als ein idealer Impfstoff angesehen. Eine Impfung schien zu keinen ernsthaften

Nebenwirkungen zu führen, die Impfung selbst ist sehr kostengünstig, sie kann zu jedem Zeitpunkt während und nach der Geburt verabreicht werden, eine einmalige Applikation führt zu einer lang anhaltenden Immunität, BCG ist temperaturresistent, so daß auch in Ländern ohne geschlossene Kühlkette eine Impfung durchgeführt werden kann und zudem hat es sich erwiesen, daß eine Impfung im frühen Kindesalter eine starke Immunität vermittelt, die eine Erkrankung an den schlimmsten Formen der Kindertuberkulose wie der meningitischen und der disseminierten miliaren Form verhindert (MC KINNEY et al. 1998).

Die Effektivität einer BCG-Impfung wurde in den letzten 50 Jahren in diversen Studien untersucht. Der Tabelle 2.1 ist zu entnehmen, daß je nach durchgeführter Studie die Effektivität der Impfung bei 80 bis 0 % liegt. In einigen Studien konnte demnach kein BCG-vermittelter Schutzeffekt nachgewiesen werden (BLOOM u. FINE 1994). Diese Ergebnisse führten zu stark kontrovers diskutierten Meinungen. Auf der einen Seite steht das alarmierende Ergebnis gerade aus den großen Studien in Indien. Auf der anderen Seite zeigen Untersuchungen (dargestellt in Tabelle 2.1), daß dort, wo der Unterschied der Tuberkuloseinzidenz zwischen Kontrollgruppe und Impfgruppe am geringsten war, die Exposition mit nichttuberkulösen Mykobakterien am weitesten verbreitet war. Die nichttuberkulösen Mykobakterien scheinen einen ähnlichen Schutz gegen die Tuberkulose zu vermitteln wie BCG, was eine Erklärung für die erschreckenden Zahlen besonders der Indienstudien sein könnte (WILSON et al. 1995). Versuche an Tiermodellen zeigten, daß *M. kansasii* und *M. avium* 85 % des Impfschutzes von BCG erreichten (PALMER u. LONG 1966).

Studie	Anzahl der Studienteilnehmer		Anzahl der Tuberkuloseinzidenzen		Impfschutz in %	Exposition mit atypischen Mykobakterien
	Kontrolle	Geimpfte	Kontrolle	Geimpfte		
Haiti (1973)	629	2545	15	25	80	unbekannt
Kanada (1949)	303	306	29	6	80	gering
Britisch MRC (1977)	12867	13598	248	62	77	gering
Nordamerikan. Indianer (1958)	1451	1541	372	108	75	gering
Chicago (1961)	1665	1716	65	17	75	gering
Südafrika (1968)	17135	20623	74	48	37	unbekannt
Puerto Rico (1974)	27338	50634	141	186	31	hoch
Indien, Madanapalle (1973)	5808	5069	46	28	31	hoch
Georgia u. Alabama (1976)	17854	16913	32	26	14	hoch
Georgia (1969)	2341	2398	3	5	0	hoch
Indien, Chingleput (1969)	79398	272455	93	192	0	hoch

Tab. 2.1: Impfschutz durch BCG-Impfungen (BLOOM u. FINE 1994)

In den letzten Jahren hat sich ein zusätzliches Problem herausgestellt. Immunsupprimierte Menschen,

hier seien insbesondere die HIV-Patienten genannt, entwickeln nach einer Impfung mit BCG eine generalisierte Infektion (disseminierte BCGitis) mit oft tödlichem Ausgang (VON REYN et al. 1987, WELTMAN u. ROSE 1993, JOUANGUY et al. 1996, NEWPORT et al. 1996). Dennoch empfiehlt die WHO in Ländern mit einer hohen Tuberkuloseprävalenz und –inzidenz eine Schutzimpfung mit BCG. Lediglich HIV-positive Kinder sollten von den Impfmaßnahmen ausgenommen sein. Weltweit werden heute 85 % aller Neugeborenen gegen die Tuberkulose geimpft. In Deutschland und einigen anderen Industrienationen wird eine BCG-Impfung gegenwärtig nicht empfohlen.

## 2.2.2 Tuberkulose bei Tieren

### 2.2.2.1 Epidemiologie und Bedeutung

Die Tuberkulose ist eine meist chronisch verlaufende Infektionskrankheit, die sehr viele Tierarten befallen kann. Die häufigste Tuberkulose ist die Rindertuberkulose, die entsprechend am besten beschrieben ist. In der Bundesrepublik zählt sie heute zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen.

Wie zahlreiche historische Aufzeichnungen belegen, ist die Tuberkulose eine der am längsten bekannten Seuchen. Aber erst Robert Koch gelang es, den verantwortlichen Erreger zu charakterisieren. 1882 entdeckte er die Tuberkulosebakterien und postulierte daraufhin, daß die Tuberkulose bei Tieren und bei Menschen durch den gleichen Erreger hervorgerufen werde. Erst 1901 gelang ihm der Nachweis, daß es sich um zwei unterschiedliche Erreger handeln müsse (SELBITZ 2002).

In den weitaus häufigsten Fällen wird die Tuberkulose bei Säugetieren durch *M. bovis* verursacht, sehr viel seltener sind *M. tuberculosis*-Infektionen. In den letzten Jahrzehnten wurde die Tuberkulose in vielen Industrienationen erfolgreich bekämpft, so daß sie in vielen dieser Länder - u.a. auch in Deutschland und vielen Bundesstaaten der USA sowie Kanada - getilgt werden konnte (HUNTER 1996, SELBITZ 2002). Dennoch treten heute wieder vermehrt Tuberkulosefälle, z. B. in Großbritannien und den USA, auf (MONIES u. HEAD 1999). Obwohl Deutschland den Status tuberkulosefrei besitzt, werden auch bei uns hin und wieder vereinzelte Fälle gemeldet (s.

Tierseuchenberichte des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten im DEUTSCHES TIERÄRZTEBLATT, diverse Ausgaben der Jahre 2001 und 2002).

Der Erreger *M. bovis* zeichnet sich durch ein großes Wirtsspektrum aus (O'REILLY u. DABORN 1995). Der bekannteste Wirt der Tuberkulose ist das Rind, aber auch kleine Wiederkäuer wie Schaf und Ziege werden, wenn auch selten, befallen (MORRIS et al. 1994, O'REILLY u. DABORN 1995). Die Tuberkulose macht auch nicht vor Speziesgrenzen halt. Neben Hausschweinen (O'REILLY u. DABORN 1995, ARANAZ et al. 1996) und Pferden werden auch Hunde und Katzen mit *M. bovis* infiziert (COSIVI et al. 1995, JONES und JENKINS 1995, O'REILLY u. DABORN 1995). Von Zoo- und Wildtieren wie Büffeln, Bisons, Warzenschweinen (MORRIS et al. 1994, COSIVI et al. 1995, O'REILLY u. DABORN 1995) und in freier Wildbahn sowie auch in Gefangenschaft lebenden Cerviden (CLIFTON-HADLEY u. WILESMITH 1991, HUNTER 1996) sind ebenfalls Fälle von Tuberkuloseerkrankungen bekannt. Ein besonderes Problem in Großbritannien stellt die Dachspopulation dar. Durch ihre große Verbreitung auf der Insel ist dieses Erregerreservoir nur schwer zu erfassen und führt wie die Beutelrattenpopulation (Opossum) in Neuseeland zu einer erschwerten Tilgung der Tuberkulose (CLIFTON-HADLEY u. WILESMITH 1991). Eine Infektion mit *M. bovis* bei im Zoo lebenden Pavianen, Leoparden und Seelöwen ist ebenfalls beschrieben (THOREL et al. 1998). Weil alle wild lebenden, mit *M. bovis* infizierten, Tiere ein großes Erregerreservoir bilden, stellen sie eine ständige Bedrohung für die Haustiere dar (DE LISLE et al. 2002).

Da die Rindertuberkulose in Deutschland getilgt ist, gehen heute die meisten Infektionen von anderen Tierarten und von Menschen mit offenen *M. bovis*-Tuberkulosen aus (SELBITZ 2002). Tierseuchenrechtlich gilt nur die *M. bovis*-Infektion als Rindertuberkulose, obwohl Rinder auch für Infektionen mit *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. avium* und einigen anderen atypischen Mykobakterien empfänglich sind (SELBITZ 2002).

Im Reich der Vögel wird die Tuberkulose durch *M. avium* verursacht. Sie kommt bei Haus- und Wildgeflügel, Ziervögeln (HOOP, BÖTTGER u. PFYFFER 1996) und in Nordamerika bei Emus vor (SHANE et al. 1993).

#### 2.2.2.2 Klinik

Im Stadium des Primärkomplexes treten im allgemeinen noch keine klinischen Symptome auf. Erst im

Stadium der Frühgeneralisation, der ausgeprägten Organtuberkulose oder der Spätgeneralisation (Niederbruchphase) kommt es zu klinischen Erscheinungen (ROSENBERGER 1970). An vorderster Stelle ist hier die Lungentuberkulose zu nennen, die durch anhaltendes, fortschreitendes Husten und zunehmend schlechteren Allgemeinzustand auffällt (SELBITZ 2002). Kräftige Fieberschübe, Abmagerung, Kräfteverfall, Anorexie, Somnolenz und eventuell Anämie sind begleitende Symptome. Auskultatorisch ist teils ein verschärftes, teils ein geschwächtes vesikuläres Atmen zu vernehmen, daß aber auch ganz fehlen kann, so daß nur bronchiale Atemgeräusche zu hören sind. Bei großflächigen Veränderungen oder bei Beteiligung der Bronchien sind Rasselgeräusche wahrnehmbar. Je nach Lage der tuberkulösen Veränderungen im Thorax treten mehr oder weniger starke funktionelle Störungen auf, die die Atmung, den Verdauungstrakt (Kompression des *N. vagus*) oder das kardiovaskuläre System betreffen können. Das Erscheinungsbild von Organtuberkulosen richtet sich nach der Art des betroffenen Organs. So wurden beispielsweise Verdauungsstörungen, Fertilitätsstörungen, Nierenfunktionsstörungen und zentralnervöse Erscheinungen beschrieben. Bei Rückenmark- und Wirbelkörpertuberkulose treten Lähmungserscheinungen, bei der Tuberkulose der Haut und Unterhaut bis zu faustgroße Umfangsvermehrungen in den Vordergrund (ROSENBERGER 1970).

Bei Schafen und Ziegen ist die Lungentuberkulose die häufigste Form, bei der Ziege ist die Eutertuberkulose noch erwähnenswert. Schweine hingegen weisen durch die häufige alimentäre Ansteckung in den meisten Fällen tuberkulöse Herde im Darm- und Rachenbereich auf. Bei Pferden werden vorwiegend Darm-, Lungen-, Tonsillen-, Kehlgangs- und Retropharyngeallymphknotentuberkulose beobachtet. Hunde und Katzen erkranken weitaus weniger häufig an Tuberkulose als beispielsweise der Mensch. Die befallenen Organsysteme sind meist der Atmungs- sowie der Verdauungstrakt (SELBITZ 2002).

Die Geflügeltuberkulose äußert sich durch den alimentären Ansteckungsweg in erster Linie in der Ausbildung eines Primärkomplexes in der Darmregion. Es kommt zu einer Generalisation mit Auftreten erster Krankheitssymptome wie uncharakteristische Allgemeinerscheinungen, Abmagerung, Durchfall, Lahmheiten und Hängenlassen der Flügel (SELBITZ 2002).

### 2.2.2.3 Ätiologie und Pathogenese

Der Erreger der Rindertuberkulose ist *M. bovis*. Er befällt aber auch andere Tierarten, wie in der

Epidemiologie bereits aufgezeigt wurde. *M. tuberculosis*-Infektionen sind bei Rindern zwar ebenfalls beschrieben, doch führt dieser Erreger meist nur zu einer Ausbildung eines Primärkomplexes (s. unten) mit anschließender spontaner Abheilung (ROSENBERGER 1970, SELBITZ 2002).

Die Übertragung des Erregers erfolgt meist auf aerogenem Wege durch Tröpfcheninfektion, seltener durch orale Aufnahme erregerhaltigen Faeces, Urin, Ejakulat, Gebärmutterausfluß und Milch (COSIVI et al. 1995). Die Ansteckung landwirtschaftlicher Nutztiere bei infektiösen Menschen wurde ebenfalls beschrieben (GRANGE u. YATES 1994). Seltener sind Infektionen durch die Aufnahme kontaminierten Weidefutters (MORRIS et al. 1994) und kontaminierter Kadaver oder Beutetiere, sie sind aber aufgrund der ausgeprägten Tenazität des Erregers nicht auszuschließen (WHIPPLE et al. 1997).

Abhängig von der Tierart, der Art des Erregers und der Reaktionslage des Wirtes entstehen entweder vermehrt exsudative oder eher proliferative (produktive) granulomatöse Entzündungen (BUCHAN u. GRIFFIN 1990, WEISS u. RUDOLPH 1999). Bei Pferden und Fleischfressern herrschen die exsudativen Prozesse vor, während bei Rind, Schaf und Ziege die Entzündung eher einen proliferativen Verlauf annimmt (SCHULZ u. TRAUTWEIN 1990).

Die exsudative Entzündung ist durch eine ausgeprägte Ansammlung von eiweißreichem Exsudat gekennzeichnet, daß anschließend primär verkäst (Koagulationsnekrose). Bei der proliferativen Entzündung bilden sich die typischen Granulome (Tuberkel, Tuberkulome) aus, deren Zentren später verkäsen und verkalken können (SELBITZ 2002).

Die erste Manifestation der Bakterien in der sog. Erstinfektionsperiode mit Ausbildung einer Entzündungsreaktion in Form von Epitheloidzelltuberkeln wird als Primärherd bezeichnet. Breiten sich die Bakterien gemäß dem Cornetschen Lokalisationsgesetz auf die regionären Lymphknoten aus, spricht man von einem Primärkomplex. Ist der Primärherd bereits wieder abgeheilt, handelt es sich um einen unvollständigen Primärkomplex (SCHULZ u. TRAUTWEIN 1990). Der Primärherd ist beim Rind zu 90 %, bei Hund und Katze zu 50 % und bei Pferd und Schwein nur selten in der Lunge zu finden, manifestiert sich dann überwiegend in den am besten beatmeten Gebieten subpleural am dorsalen Hauptlappen. Im Verdauungsweg ist der Primärherd zu 100 % bei Vögeln, bei Hund und Katze zu 50 %, beim Kalb zu 80 % und außerdem häufig bei Pferd und Schwein zu finden. Übrige weniger bedeutende Primärherdlokalisationen sind die Haut und das Auge (vor allen Dingen bei Katzen) sowie beim Kalb der Nabel (SCHULZ u. TRAUTWEIN 1990). Eine vollständige

Ausheilung der Tuberkulose ist bei Tieren selten, vielmehr wird der Primärkomplex bindegewebig abgekapselt, so daß über viele Jahre ein infektionsfähiger Herd im Körper verbleibt (SCHULZ u. TRAUTWEIN 1990). Bei schlechter Resistenzlage des Wirtes kann es bereits in der Phase der Erstinfektion zu einer Bakteriämie kommen. Diese Frühgeneralisation bedingt das Ausschwemmen der Bakterien, was sich in der Entstehung von miliaren Tuberkeln in den betroffenen Organen äußert. Solch eine akute Miliartuberkulose ist in den meisten Fällen tödlich. Es gibt aber auch einen chronisch-protrahierten Verlauf der Frühgeneralisation mit älteren und jüngeren Herden nebeneinander, insbesondere bei Pferd, Schwein, Fleischfresser und Huhn. Das Cornetsche Lokalisations-gesetz gilt in diesen Fällen uneingeschränkt (SCHULZ u. TRAUTWEIN 1990).

Im Falle einer Exazerbation oder bei einer Superinfektion entsteht bei geschwächter Resistenzlage des Wirtes eine chronische Organtuberkulose. In dieser postprimären Phase breiten sich die Mykobakterien ausschließlich intrakanalikulär aus, so daß die regionären Lymphknoten nicht betroffen sind und die Tuberkulose auf ein Organ beschränkt bleibt. Es kommt weder zur Ausbildung einer Verkalkung noch zu einer bindegewebigen Abkapselung, so daß die Bakterien über die natürlichen Kanäle (Bronchien, Nierenkanäle, Ureteren etc.) eine Verbindung zur Außenwelt haben. Weil auf diese Weise die Tuberkelbakterien mit den Ausscheidungen des Körpers in die Außenwelt gelangen, spricht man von einer offenen Tuberkulose (SCHULZ u. TRAUTWEIN 1990). Besonders beim Rind ist die Lunge prädisponiert, in ihr werden drei Charakteristika der Ausbreitung unterschieden (SCHULZ u. TRAUTWEIN 1990):

- die azinös-nodösen Herde,
- bronchiektatische und Einschmelzungskavernen,
- tuberkulöse Veränderungen in den oberen Atemwegen.

Eine Schwächung der Immunität kann zu einer Spätgeneralisation oder Niederbruchphase führen. Entzündliche Herde verkäsen primär, so daß kaum eine produktive Entzündungs-reaktion entsteht. Weil sich die Bakterien lymphohämatogen ausbreiten, sind die Lymphknoten immer beteiligt (Cornetsches Lokalisationsgesetz) und häufig auch die Blutgefäße. Dies erklärt das gehäufte Auftreten von Blutungen, die bei einer Ausbreitung auf größere Areale (in der Regel nur bei

Primaten) in einen sog. Blutsturz resultieren können (SCHULZ u. TRAUTWEIN 1990).

#### 2.2.2.4 Diagnose

Die Notwendigkeit einer Tuberkulosediagnostik ergibt sich seit der Tilgung dieser Krankheit in Deutschland meist aus Schlachtbefunden. Neben den pathologisch-anatomischen Befunden werden Proben der veränderten Bereiche entnommen und mikroskopisch mit Hilfe der Ziehl-Neelsen-Färbung auf säurefeste Stäbchen untersucht. Doch erst ein kultureller Nachweis von Mykobakterien des *M. tuberculosis*-Komplexes erlaubt die Diagnose Tuberkulose (SELBITZ 2002). Eine anschließende Anzuchtung und Speziesdifferenzierung dauert zwei bis drei Monate. Die Abbildung 2.1 gibt einen Überblick über das diagnostische Verfahren.

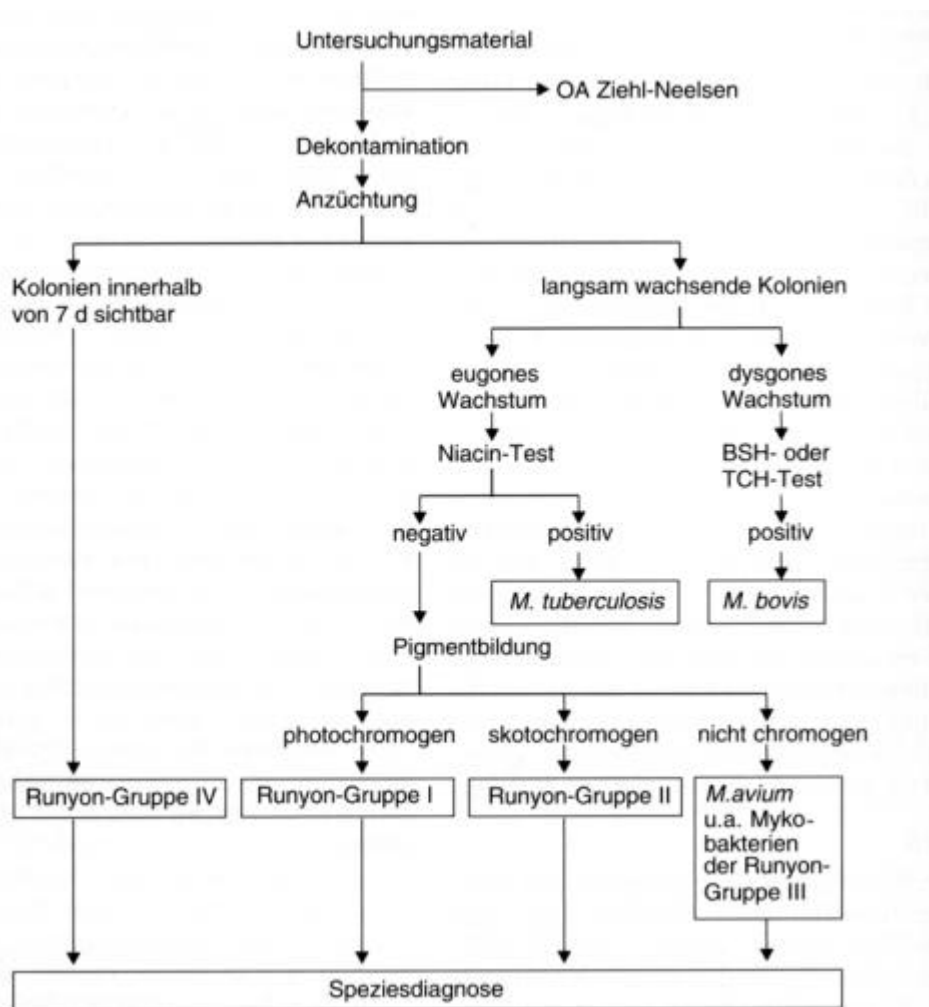


Abb. 2.1: Schema zur Diagnostik von Mykobakterieninfektionen (SELBITZ 2002).

BSH = Brenzschleimsäurehydrazid; TCH = Thiophen-2-carbonsäurehydrazid

Im Rahmen der Tuberkulosebekämpfung wurde in Deutschland früher der Tuberkulintest eingesetzt. Es handelt sich um einen Schnelltest, der innerhalb von drei Tagen Tuberkulose verdächtige Rinder identifizieren kann. Auch heute ist dieser Test der weit verbreitetste in der Tuberkulosedagnostik am lebenden Tier. Nach einem in der Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose der Rinder (Neufassung vom 13.3.1997) festgelegten Verfahren wird den verdächtigen Tieren Tuberkulin (5000 I.E.) subkutan injiziert (SELBITZ 2002). Dieses Tuberkulin hat antigene Eigenschaften und löst im immunkompetenten Wirt eine Allergie vom verzögerten Typ aus (SCHULZ u. TRAUTWEIN 1990). An der Injektionsstelle kommt es im positiven Fall zu einer Hautdickenzunahme, zu Schmerzreaktionen und zu vermehrter Wärmebildung (SELBITZ 2002). Durch einen Vergleich der Hautdicke zum Zeitpunkt der Injektion und 72 Stunden danach können verdächtige Tiere von nicht verdächtigen unterschieden werden. Beträgt die Hautdickenzunahme weniger als 2 mm und sind keine sonstigen Entzündungsreaktionen vorhanden, fällt der Test negativ aus. Eine Zunahme von 2-4 mm ohne klinische Anzeichen gilt als zweifelhaft und eine Hautdickenzunahme von mehr als 4 mm oder das Auftreten von Entzündungsreaktionen wird als positiv bewertet (TUBERKULOSE-VERORDNUNG 1997). Dieses Verfahren birgt jedoch Schwachstellen. Nach Infektionen mit anderen Mykobakterien (*M. tuberculosis*, *M. avium*) treten Kreuzreaktionen auf, die ein falsch-positives Ergebnis im Sinne der Tuberkulose-Verordnung erzeugen, da nur Infektionen mit *M. bovis* von dieser Verordnung geregelt werden. Falsch-negative Ergebnisse können entstehen, wenn sich ein erkranktes Tier im Frühstadium einer Neuinfektion oder im Stadium der Niederbruchsphase befindet.

Eine in den USA verwendete Methode, die Kombination des Tuberkulintests mit ELISA-Verfahren zur Erhöhung der diagnostischen Sicherheit, fand in Deutschland kaum Anwendung (SELBITZ 2002). Weitere diagnostische Verfahren sind der  $\gamma$ -Interferontest, ebenfalls als Ergänzung zur Tuberkulinprobe (SELBITZ 2002), ein Lymphozyten-transformationstest zum Nachweis sensibilisierter T-Lymphozyten (GRIFFIN u. BUCHAN 1994) und eine PCR, die die Insertionssequenz IS6110 nachweisen kann (SELBITZ 2002). Als Vergleich hierzu siehe Abschnitt 2.2.1.4.

#### 2.2.2.5 Bekämpfung

Laut Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose der Rinder vom 13.3.1997 sind eine Therapie

sowie Schutzimpfungen verboten. Nachdem die Tuberkulosefreiheit in Deutschland erreicht wurde, zielt die Überwachung der Tuberkulose auf Schlachtbefunde. Tuberkulöse Veränderungen müssen sorgfältig abgeklärt und sofort dem zuständigen Veterinäramt gemeldet werden. Andere Tierarten als Rinder (z. B. Wildtierpopulationen) werden in Bekämpfungsmaßnahmen miteinbezogen (SELBITZ 2002).

### 2.3 Nitratstoffwechsel in Mykobakterien

Nitrat ist eine wichtige Stickstoffquelle für Pflanzen und Mikroorganismen (POOLE 1998). Die Fähigkeit, Nitrat zu veratmen, ist unter den Bakterien weit verbreitet. Dabei produziert Nitrit wird entweder in gasförmige Komponenten (Denitrifizierung:  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ) umgewandelt oder zu Ammonium reduziert (PHILIPPOT u. HØJBERG 1999). Bei dem letztgenannten auch als Assimilation bezeichneten Vorgang dient NAD(P)H als Elektronenquelle, das gebildete Ammonium wird für den Einbau in Zellmaterial verwendet. Das für diese Leistung verantwortliche Enzym wurde bei anderen Bakterien als zytoplasmatische Nitratreduktase klassifiziert (*NasAC* bei *Klebsiella oxytoca*, *NasAB* bei *Bacillus subtilis*). Es handelt sich um ein *in vitro* labiles Enzym mit einem Molybdän-Cofaktor und je vier Eisen- und Schwefelatomen (LIN u. STEWART 1998). Nach RATLEDGE (1982) verwerten sowohl saprophytäre als auch pathogene Mykobakterien Ammoniumionen als Stickstoffquelle. Die einzelnen Mykobakterienspezies unterscheiden sich allerdings stark in ihrer Fähigkeit, Nitrat, Nitrit oder Ammoniumionen zu assimilieren. Stämme, die ausschließlich eine dieser drei Komponenten für ihr Zellwachstum verwenden können, wachsen erheblich langsamer als bei Zusatz von organischen Stickstoffquellen. *M. tuberculosis* bspw. wächst am besten mit Zusatz von Alanin oder Glutamat, während nahezu alle anderen Mykobakterien Asparagin bevorzugen. Nitrat und Nitrit werden von *M. tuberculosis*, *M. bovis* (BCG), *M. smegmatis* und *M. butyricum*, Ammonium von *M. tuberculosis* assimiliert. Obwohl viele Mykobakterien in der Lage sind, mit Nitrat als alleiniger Stickstoffquelle zu wachsen (DE TURK u. BERNHEIM 1958, RATLEDGE 1982), ist nicht bekannt, ob diese Fähigkeit auf der Expression einer assimilatorischen Nitratreduktase beruht. Bei der Sequenzierung des Genoms von *M. tuberculosis* wurden keine Gene mit Homologie zu den assimilatorischen Nitratreduktasen

anderer Bakterien gefunden (COLE et al. 1998).

Ein unter den Bakterien ebenfalls weit verbreiteter Stoffwechselfvorgang ist die Respiration, bei der Nitrat als Elektronenakzeptor in der anaeroben Atmung die Bildung von ATP ermöglicht (LIN u STEWART 1998). Das nächste Kapitel beschäftigt sich mit der anaeroben Nitratreduktion.

### 2.3.1 Anaerober Stoffwechsel in Mykobakterien

Die Begriffe respiratorische Atmung und dissimilatorische Atmung werden in der Literatur oftmals synonym verwendet. Sie beschreiben den Aufbau eines elektrochemischen Gradienten über eine Membrantransferkette mit Hilfe eines Reduktaseenzym. Da dasselbe Enzym je nach den Stoffwechselfordernissen aber unterschiedliche Aufgaben erfüllt, muß zwischen diesen beiden Begriffen unterschieden werden. Wird der Elektronenfluß an einen Protonen transportierenden Komplex zur Erzeugung von ATP gekoppelt, so wird dieser Vorgang als Respiration bezeichnet. Die Beseitigung reduzierender Äquivalente an einer Membran ohne Koppelung an eine Protonentransportkette wird Dissimilation genannt (MORENO-VIVIAN u. FERGUSON 1998). Die periplasmatische Nitratreduktase von *E. coli*, kodiert durch die Gene *napABC*, dient überwiegend der Aufrechterhaltung der Redoxbalance im anaeroben Stoffwechsel (LIN u. STEWART 1998). Unter bestimmten Voraussetzungen bewirkt die Aktivität dieses Enzyms aber auch eine Protonen bewegende Kraft, so daß sie dann respiratorische Aufgaben erfüllt. In Photosynthese betreibenden Bakterien wie *Rhodobacter sphaeroides* zeigt die periplasmatische Nitratreduktase hingegen dissimilatorische Eigenschaften, da sie bestehende reduzierende Äquivalente abbaut und weder zu einer Nitratassimilation noch zu einer Nitratrespiration fähig ist (MORENO-VIVIAN u. FERGUSON 1998). Nach PHILIPPOT u. HØJBERG (1999) könnte dieses Enzym den Übergang von aerober zu anaerober Atmung katalysieren.

Von einigen obligat aeroben Bakterien ist bekannt, daß sie unter anaeroben Bedingungen von Sauerstoff- auf Nitratatmung umschalten. So verfügen z.B. *E. coli*, *B. subtilis* und *Pseudomonas aeruginosa* über eine membranständige Nitratreduktase, die unter Verwendung von Nitrat als Elektronenakzeptor einen Protonengradienten an der Zellmembran aufbaut, der die Bildung von ATP fördert (HOFFMANN 1995, NAKANO 1997, POOLE 1998, NAKANO u. ZUBER 1998,

POTTER 1999, PHILIPPOT u. HØJBERG 1999). VIRTANEN entdeckte 1960, daß *M. tuberculosis* sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen eine Nitratreduktaseaktivität besitzt. Da Mykobakterien jedoch strikte Aerobier sind, hielt er diese Entdeckung für den Stoffwechsel nicht für bedeutungsvoll. In der neueren Literatur wird vermutet, daß der anaerobe Stoffwechsel in der Pathogenese der Mykobakterien eine Rolle spielt, da sich die Bakterien in Granulomen und Abszessen, in denen vermutlich anaerobe Bedingungen herrschen, vermehren (BARCLAY u. WHEELER 1989). WAYNE und LIN fanden 1982 heraus, daß *M. tuberculosis* unter anaeroben Bedingungen das Enzym Isozitrattyase exprimiert, das die Oxidation von NAD zu NADH katalysiert. Im Mausmodell konnte inzwischen der Nachweis erbracht werden, daß *M. tuberculosis* für sein Überleben *in vivo* die Isozitrattyase benötigt (MC KINNEY et al. 2000). Doch erst 1998 wurden bei der Sequenzierung des kompletten Genoms von *M. tuberculosis* Gene mit hoher Homologie zu den anaeroben Nitratreduktasen anderer Bakterien gefunden. Die Homologie der anaeroben Nitratreduktase und der anaeroben Nitritreduktase (reduziert anfallendes Nitrit zu Ammoniumionen) zu den vergleichbaren Enzymen von *E. coli* und *B. subtilis* beträgt durchschnittlich 55 % (COLE et al. 1998). Das Gencluster der anaeroben Nitratreduktase von *M. tuberculosis*, kodiert als *narGHJI*, überträgt eine anaerobe Nitratreduktaseaktivität auf den nicht Nitrit bildenden Stamm *M. smegmatis* (FRITZ 2001). Das Genom von *M. tuberculosis* und *M. bovis* BCG stimmen zu mehr als 98 % überein. WEBER (1999) konnte den Nachweis erbringen, daß auch BCG über eine anaerobe Nitratreduktase verfügt. Es wird vermutet, daß die Anpassung an anaerobe Bedingungen die Voraussetzung für die mykobakterielle Latenz ist (MANABE u. BISHAI 2000). Beobachtungen über verabreichte Impfstämme, die noch nach Jahren bei immunsupprimierten Patienten eine Infektion verursachen können, stützen diese Theorie (TALBOT et al. 1997).

### 2.3.2 Die anaerobe Nitratreduktase

Die membrangebundene Nitratreduktase *narGHJI* ist unter enterischen Bakterien weit verbreitet (PHILIPPOT u. HØJBERG 1999). Beispielhaft besitzen folgende Bakterien eine anaerobe Nitratreduktase: *Escherichia coli* (BLASCO et al. 1989), *Pseudomonas fluorescens* (PHILIPPOT et al. 1997), *Bacillus subtilis* (HOFFMANN et al. 1995), *Staphylococcus carnosus*

(PANTEL et al. 1998), *Thermus thermophilus* (RAMIREZ-ARCOS et al. 1997) LI (1987) konnte zeigen, daß die Nitratreduktase, damals noch unvollständig *nar*-Operon genannt, unter anaeroben Bedingungen bei Anwesenheit von Nitrat induziert wird. Zwei Jahre später wurde die Nucleotidsequenz von *narGHJI* komplettiert. In diesem Zusammenhang konnten die Molekulargewichte der einzelnen Gene bestimmt werden. Mit einer Größe von 138,7 kDa ist *narG* das größte Gen, in absteigender Reihe folgen *narH* (57,7 kDa), *narJ* (26,5 kDa) und *narI* (25,5 kDa). Das Genprodukt NarGHJI besteht aus einem Eisen-Schwefel-Zentrum, das eine Elektronentransportkette darstellt (BLASCO et al. 1989). Eine detailliertere Beschreibung der anaeroben Nitratreduktase gelang 1999 PHILIPPOT und HØJBERG. Ihre Untersuchungen führten sie mit der anaeroben Nitratreduktase von *E. coli* durch. Demnach besteht diese aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) und einigen Cofaktoren. Die Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  bilden zusammen den zytoplasmatischen Anteil des Enzyms, die  $\gamma$ -Untereinheit macht den membrangebundenen Anteil aus, mit dem das Enzym in die innere Membran gekoppelt wird. Das *narG*-Gen kodiert für die  $\alpha$ -Untereinheit, die ein Eisen-Schwefel-Zentrum und einen Molybdän-Cofaktor enthält. Diese beiden Einheiten stellen reversible Redoxsysteme dar, mit deren Hilfe Elektronen übertragen werden. Somit ist das *narG* das katalytische Zentrum der anaeroben Nitratreduktase. Die  $\beta$ -Untereinheit wird durch *narH* kodiert. Es handelt sich um ein globuläres Protein, das je nach Spezies ein bis drei Eisen-Schwefel-Zentren enthält, die über Cystein verankert sind. Seine Aufgabe ist die Weiterleitung der Elektronen von der  $\gamma$ -Untereinheit an die  $\alpha$ -Untereinheit. Das für die  $\gamma$ -Untereinheit kodierende Gen *narI* ist ein hydrophobes Protein mit fünf transmembranösen  $\alpha$ -Helices, einem periplasmatischen N-Terminus und einem zytoplasmatischen C-Terminus. Die Helices umsäumen zwei über Histidin verankerte Häm-Moleküle, die für Transport der Elektronen von den Chinonen zu der  $\beta$ -Untereinheit verantwortlich sind. Die Chinone erhalten die Elektronen von den verschiedenen Cofaktoren, die neben den Elektronen auch Protonen auf die Bakterienmembran übertragen. Eine Sonderstellung innerhalb des Nitratreduktasekomplexes nimmt das *narJ*-Gen ein. Es hat keine funktionelle Aufgabe, sondern dient der Reifung des  $\alpha\beta$ -Komplexes und der Bereitstellung des gesamten  $\alpha\beta\gamma$ -Komplexes. In der Abbildung 2.2 wird durch ein Schema der Aufbau der anaeroben Nitratreduktase verdeutlicht.

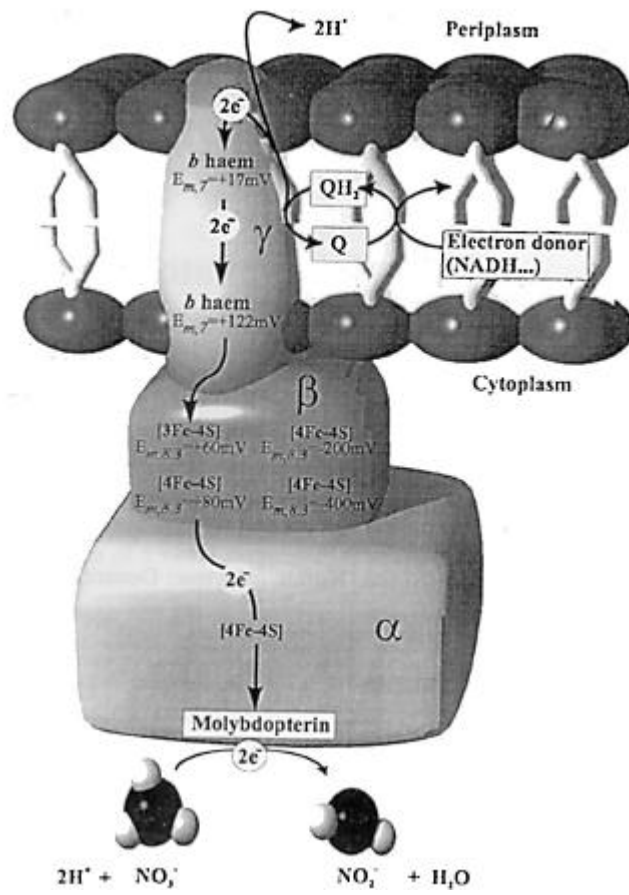


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Aufbaus der anaeroben Nitratreduktase von *E. coli*

(PHILIPPOT u. HØJBERG 1999).

Anhand dieser Abbildung lässt sich der Elektronenfluss verfolgen. Im oberen Abschnitt des Bildes ist die Oxidation der Chinone, illustriert durch Q, dargestellt. Die Pfeile beschreiben den Weg der Elektronen entlang des Häm-Moleküls, über die Eisen-Schwefel-Zentren bis hin zur Reduktion des Nitrats zu Nitrit. Bei dieser Reduktion werden Protonen aus dem Zytoplasma verbraucht. Zusammen mit der Oxidation der Chinone innerhalb der Membran, bei der Protonen an das Periplasma abgegeben werden, wird entlang dieser Membran ein Protonengradient gebildet, der zur Synthese von ATP genutzt wird, das wiederum dem bakteriellen Stoffwechsel unter anaeroben Bedingungen zugute kommt (PHILIPPOT u. HØJBERG 1999).

Die anaerobe Nitratreduktase wird durch zwei Gene induziert: unter anaeroben Bedingungen durch *Fnr* (fumarate and nitrate reductase regulation) und bei Anwesenheit von Nitrat durch NarL (LI et al. 1987). Die Regulation durch NarL scheint auf Transkriptionsniveau zu erfolgen (POTTER et al. 1999). Nach PHILIPPOT und HØJBERG (1999) ist NarL der einzige regulatorische Transmitter für die Expression von *narGHJI*. Die Aktivierung der Transkription von *narGHJI* durch NarL und FNR ist abhängig von IHF (integration host factor) (PHILIPPOT u. HØJBERG 1999). Das *fnr*-Gen ist als Hauptaktivator für die Transkription von Genen des anaeroben Stoffwechsels etabliert (SPIRO u. GUEST 1990, UNDEN u. BONGAERTS 1997 und 1998). Dieses Gen wird durch molekularen Sauerstoff sehr effektiv inaktiviert (BECKER et al. 1996, JORDAN et al. 1997). Die Bedeutung von Nitrat im Stoffwechsel der Bakterien (hier *Klebsiella*) wird durch die Synthetisierung der anaeroben Nitratreduktase bei Stickstofflimitierung deutlich (POOLE 1998). In diesen Bakterien ist auch eine Induktion der Transkription durch Nitrat und Nitrit beschrieben (POOLE 1998). Bei niedrigen Nitratkonzentrationen ist das *narGHJI*-Gencluster in *E. coli* nur schwach, bei hohen Nitratkonzentrationen dagegen maximal exprimiert (WANG, TSENG u. GUNSALUS 1999).

Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden, was die Gründe für die stärkere Nitratreduktaseaktivität von *M. tuberculosis* gegenüber *M. bovis* BCG sind. Gibt es wie bei anderen Strukturgenen einen sog. Promotor, der die Expression der anaeroben Nitratreduktase reguliert? Ist der schwächer ausgeprägte Phänotyp von BCG in einem abweichenden DNA-Abschnitt begründet? Weiterhin sollte nach Hinweisen gesucht werden, ob die anaerobe Nitratreduktase für die Virulenz der pathogenen Mykobakterienstämme verantwortlich ist. In diesem Zusammenhang sollte abgeklärt werden, ob auch *M. bovis* über ein Operon der anaeroben Nitratreduktase verfügt.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Plasmide, Cosmide und Cosmid-Bibliotheken

Plasmid / Cosmid	repliziert in E. coli	repliziert in Mykobakterien	integriert in Mykobakterien	Selektionsmarker	Herkunft
pYUB.412.2	+	-	+	Ampicillin Hygromycin	Labor W.R. Jacobs, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York
pMV.306	+	-	+	Kanamycin	Labor W.R. Jacobs, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York
pMV.206	+	+	-	Hygromycin	Labor W.R. Jacobs, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York
pCF3	+	-	+	Kanamycin	AG Bange, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Medizinischen Hochschule Hannover
pAP7	+	-	+	Kanamycin	Diese Arbeit
pAP8	+	-	+	Kanamycin	
pAP10	+	-	+	Kanamycin	

pAP11	+	+	-	Hygromycin	Diese Arbeit
pAP12	+	+	-	Hygromycin	
pAP17	+	+	-	Hygromycin	
pAP18	+	+	-	Hygromycin	
pAP19	+	-	+	Kanamycin	
pAP20	+	-	+	Kanamycin	
pAP25	+	-	+	Kanamycin	
pAP27	+	-	+	Kanamycin	

---

pAP28	+	-	+	Kanamycin	Diese Arbeit
-------	---	---	---	-----------	--------------

Tabelle 3.1: verwendete Plasmide und Cosmide; pAP7 bis pAP28 wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt.

### 3.1.2 Cosmid-Bibliotheken

Cosmid-Bibliothek von *M. bovis* BCG (Vektor: pYUB.412),  
erstellt von F.-C. Bange (unveröffentlichte Ergebnisse)

Cosmid-Bibliothek von *M. bovis* (Vektor: pYUB.412),  
im Rahmen dieser Arbeit erstellt.

## 3.1.3 Bakterienstämme

Gattung	Spezies	Stamm	Herkunft
<i>Mycobacterium</i>	<i>tuberculosis</i>	H37RV	ATCC 25618
		RV/2001-422-4	Nationaler Ringversuch
		RV/2001-422-5	Nationaler Ringversuch
		Erdmann	Labor W.R. Jacobs, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York
	<i>bovis</i> BCG	Pasteur	Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark
		Copenhagen	Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark
		Moreau	Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark
		<i>narG</i> BCG (IW1)	Molecular Microbiology (2000) <b>35</b> (5), 1017 - 1025
		<i>narG</i> BCG (SR106)	AG Bange, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Medizinische Hochschule Hannover, unveröffentlichte Ergebnisse
	<i>bovis</i>	R99	Nationaler Ringversuch
			Labor W.R. Jacobs, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York
<i>smegmatis</i>	mc <sup>2</sup> 155	Labor W.R. Jacobs, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York	
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	HB101	Firma Promega GmbH, Mannheim
		Stabl-2	Firma Stratagene
		Ec <sup>2</sup> 191	Firma Stratagene

Tabelle 3.2: verwendete Bakterienstämme

### 3.1.4 Nährmedien

#### Middlebrook 7H9 Medium

4,7 g Middlebrook 7H9 (Difco, Best.-Nr. 0713-01-7) werden in 900 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst und nach Zugabe von 100 ml ADS, 2,5 ml 20 % Tween 80 und 10 ml 50 % Glycerin sterilfiltriert.

#### Middlebrook 7H10 Agar

19 g Middlebrook 7H10 Agar (Difco, Best.-Nr. 0627-17-4) werden in 900 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert. Nach Zugabe von 10 ml Glycerin und 100 ml ADS wird der auf 50 °C abgekühlte Nährboden in Petrischalen gegossen.

Wahlweise wird der Agar in 960 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst und statt ADS wird 40 ml OADC hinzugefügt.

#### ADS (Albumin Dextrose Salt = Natriumchlorid)

8,1 g NaCl

50 g Rinderalbumin (Boehringer-Mannheim, Best.-Nr. 100021)

20 g Dextrose

950 ml dest. H<sub>2</sub>O

Die Zutaten werden nacheinander gelöst und sterilfiltriert (1 Liter-Sterilfiltrationseinheit)

#### MB Medium für Mykobakterien (1000 ml)

100 ml 10x Basissalzlösung (s.u.)

2 ml Spurenelemente (s.u.)

500 µl 1 M CaCl<sub>2</sub> [ 0,5 mM ]

500 µl 1 M MgCl<sub>2</sub> [ 0,5 mM ]

50 ml 20 % Glucoselösung [ 1 % ]

4 ml 50 % Glycerinlösung [ 0,2 % ]

2,5 ml 20 % Tween 80 [ 0,05 % ]

840,5 ml dest. H<sub>2</sub>O

Die Zutaten werden gemischt und sterilfiltriert (1 Liter Sterilfiltrationseinheit).

#### 10x Basissalzlösung ohne Stickstoffquelle für Mykobakterien-Basalsalzmedium (MB)

Die Grundlage des Minimalmediums stellt eine Nährsalzlösung dar. Es enthält alle wachstumsfördernden Komponenten mit Ausnahme der Kohlenstoff- und Stickstoffquelle.

10 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> , 25 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 20 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> werden nacheinander in 950 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst und sterilfiltriert (1 Liter Sterilfiltrationseinheit).

#### 500x Spurenelemente

40 mg ZnCl<sub>2</sub>, 200 mg FeCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10 mg CuCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 10 mg MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 10 mg Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 10 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O werden in 1000 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst und sterilfiltriert.

#### 20 % Glucoselösung

200 g Glucose werden in 1000 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst und sterilfiltriert.

#### 5x Ammoniumchloridlösung

50 g NH<sub>4</sub>Cl werden in 1000 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst und sterilfiltriert.

#### LB-Agar

35 g LB-Agar, Lennox (Difco, Best.-Nr. 0401-17-0) werden in 1000 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert.

#### LB-Bouillon

20 g LB-Broth-Base (Lennox, Best.-Nr. 12780-052) werden in 1000 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert.

### 3.1.5 Lösungen und Puffer

#### *Allgemeine Lösungen und Puffer*

##### 50x TAE-Puffer

242 g Trispuffer

57 ml Eisessig

100 ml 0,5M EDTA (pH8)

mit dest. H<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen und autoklavieren.

##### 10 % Glycerinlösung

100 ml Glycerin in 900 ml dest. H<sub>2</sub>O lösen und autoklavieren.

##### 50 % Glycerinlösung

500 ml Glycerin in 500 ml dest. H<sub>2</sub>O lösen und sterilfiltrieren.

### 1M KNO<sub>3</sub>-Lösung

101,11 g KNO<sub>3</sub> in 1000 ml dest. H<sub>2</sub>O lösen und sterilfiltrieren.

### Cetrimid-Salzlösung

4,1 g NaCl werden in 90 ml Aqua dest. gelöst, unter Rühren wird 10 g Cetrimid hinzugegeben und auf 65 °C erwärmt. Es wird nicht autoklaviert oder sterilfiltriert.

### 3.1.6 Puffer und Lösungen für den Zellaufschluß

#### SM-Puffer

5,8 g NaCl

2,0 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

50 ml 1M TRIS-HCl (pH 7,5)

5 ml 2 % (w/v) Gelatine

in deionisiertem Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 1 Liter lösen und autoklavieren.

#### Resuspensionspuffer (P1), Fa. Qiagen

50mM Tris HCl

10mM EDTA

10µg/ml RNase

#### Lysepuffer (P2), Fa. Qiagen

200mM NaOH

1 % SDS

Neutralisationspuffer (P3), Fa. Qiagen

3M Kaliumacetat (pH 5,5)

Bakterienlysepuffer

10 ml 1M TRIS-HCl pH 9,5

8 ml 0,5M EDTA

3,6 g D-Glucose (3,96 g D-Glucose x 1 H<sub>2</sub>O)

382 ml Aqua dest.

Sterilfiltrieren.

Alle Medien und Lösungen werden durch Autoklavieren (T= 121°C, t= 60 Min., p= 2,1 bar) sterilisiert oder sterilfiltriert (Filtrationseinheiten der Fa. Corning Costar).

***Sonstige Materialien***

Alle weiteren Geräte, Chemikalien, Enzyme und Gebrauchsmaterialien sind im Anhang aufgeführt.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Plasmid-Minipräparation wurde mit Hilfe des Plasmid-Präparations-Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Die Lösungen sind vorgefertigt. Die Methode basiert auf der alkalischen Denaturierung (pH-Wert 12) von hochmolekularer (chromosomaler) DNA in Einzelstränge, während niedermolekulare (Plasmid-) DNA nicht denaturiert wird. Auf diese Weise wird Plasmid-DNA aus Zellen gewonnen und von chromosomaler DNA bereinigt.

Es werden 1,5 ml einer Übernachtskultur in einem Eppendorfgefäß bei 10.000 x g (13000 U/min.) zentrifugiert. Das Pellet wird in 100 µl Resuspensionspuffer (P 1) gelöst. Anschließend wird 100 µl Lysepuffer (P 2) hinzupipettiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Neutralisationspuffer wird das Eppendorfgefäß für 15 min. auf Eis inkubiert. Die entstandenen Zelltrümmer werden bei 10.000 x g abzentrifugiert und der Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach einer anschließenden Phenolisierung mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) wird das Gemisch abermals bei 10.000 x g zentrifugiert. Während die untere Phenolphase im Eppendorfgefäß verbleibt, wird die obere wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Durch Zugabe von absolutem Ethanol (96 %) wird die DNA anschließend für 15 min auf Eis gefällt. Es folgt eine Zentrifugation bei 10.000 x g, wodurch sich ein Pellet bildet, das anschließend mit verdünntem Ethanol (70 %) gewaschen wird. Dann wird das DNA-Pellet bei 37 °C getrocknet und schließlich in sterilem Aqua dest. aufgenommen.

### 3.2.2 Präparation genomischer DNA

Diese Methode basiert auf einem enzymatischen Zellaufschluß durch Lysozym und Proteinase K.

Eine Ausgangskultur von 10 ml (100 ml, wenn eine größere Menge präpariert werden soll) wird durch Zentrifugation (20 min bei 13.000 x g) pelletiert. Das Pellet wird in 1 ml Bakterienlysepuffer resuspendiert und in zwei 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Nach einer Zentrifugation bei 10.000 x g für 10 Minuten wird erneut 225 µl Bakterienlysepuffer sowie 25 µl Lysozym (10 mg / ml) hinzugegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird nach Zugabe von 50 µl 10

% SDS vorsichtig gemischt. Anschließend wird 25 µl Proteinase K (10 mg / ml) hinzupipettiert und im 55 °C warmen Wasserbad für 20 bis 40 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl 5 M NaCl und 80 µl einer Cetrimid-Salzlösung wird für 10 min auf 65 °C erhitzt. Anschließend wird die gleiche Menge (0,5 ml) Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Durch Zentrifugieren bei 10.000 x g für 5 min wird die Lösung pelletiert und der Überstand (enthält die DNA) in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dieser Vorgang wird bis zu zweimal wiederholt. Durch Zugabe von 0,7 vol% Isopropanol (280 µl) wird die chromosomale DNA auf Eis für ½ bis 2 Stunden präzipitiert. Das Waschen des Pellets erfolgte mit 70 % Ethanol bei 10.000 x g. Anschließend wurde das Pellet luftgetrocknet und in 50 µl sterilem Aqua dest. bei 4 °C über Nacht gelöst.

### 3.2.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsenzyme oder –endonucleasen sind in der Lage, doppelsträngige DNA zu spalten. Sie benötigen dazu eine Nucleotidsequenz von 4 – 10 aufeinanderfolgenden Basen als Erkennungsmerkmal. Die Enzyme schneiden in dem Bereich der Nucleotidsequenz entweder mit (sticky ends) oder ohne (blunt ends) überstehende Enden. Für ihre Aktivität benötigen Restriktionsendonucleasen ein Milieu mit einem speziellen Salzgehalt. Dieses wird durch Zugabe von Puffern erreicht. Einige Enzyme brauchen zusätzlich noch bovines Serumalbumin (BSA) zur Aktivitätssteigerung.

Es wurden Enzyme der Firmen New England Biolab (NEB) und Amersham Pharmacia verwendet. Per Definition schneidet eine Einheit Enzym 1 µg DNA in einer Stunde. Das standardisierte Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 10 µl. Inkubiert wurde 1 – 2 Stunden bei 37 °C.

### 3.2.4 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese ist es möglich, durch Restriktionsenzyme gespaltene DNA-Stücke von ca. 200 bis 20.000 bp Größe aufzutrennen. Jede DNA enthält negativ geladene Phosphatreste, die einem elektrischen Gradienten folgen. Je nach Größe der DNA-Stücke wandern diese unterschiedlich schnell in einem entsprechenden Transportmilieu. Dieses Transportmilieu ist ein

Agarosegel, das in Konzentrationen von 0,7 – 1,5 % aus einem Agarosepulver mit 50 x TAE und Wasser angesetzt wird. Durch Aufkochen löst sich das Pulver, so dass eine klare Flüssigkeit entsteht. Diese wird in einen Gelschlitten gegossen, in dem die Flüssigkeit aushärtet und in eine Gelphase übergeht. Das Gel wird in eine mit Ladepuffer versehene Elektrophoresekammer eingesetzt. Die (gespaltene) DNA wird in Taschen, die beim Gießen des Geles ausgespart werden, einpipettiert. Je nach Größe der zu erwartenden Banden wird eine Spannung auf die Elektrophoresekammer gelegt, so dass ein gewisser Stromgradient zwischen Anode und Kathode entsteht. Die Zeit ist variabel einzustellen.

Um die DNA sichtbar zu machen, wird das Gel anschließend für 10 – 60 min. in ein Ethidiumbromidbad (0,8 mg / l) gelegt. Unter UV-Licht sind daraufhin die DNA-Banden zu erkennen und können fotografiert werden.

### 3.2.5 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Banden aus Agarosegelen

Unter Verwendung des GFX™ DNA and Gel Purification Kits der Firma Pharmacia ist es möglich, DNA von Salzen, Proteinen, Primern u.a. zu reinigen. Das Prinzip beruht auf einer Glasfibrermatrix, an der die DNA zunächst bindet und so isoliert wird. Durch Lösungen mit niedriger Salzkonzentration (bspw. Aqua dest.) wird die DNA anschließend eluiert.

Die gewünschten DNA-Banden werden möglichst genau aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Dem Gewicht der Banden entsprechend wird eine definierte Menge Capture-Puffer hinzugegeben (10 µl / 10 mg). Hierbei handelt es sich um eine chaotrophe Lösung, die Proteine denaturiert und die Agarose löst. Nachdem die DNA in gelöster Form vorliegt, wird sie auf die GFX™-Säule gegeben und 500 µl Wash-Puffer werden hinzupipettiert. Es folgt eine erneute Zentrifugation bei 10.000 x g für 30 Sekunden. Auf die Säule wird der Elutionspuffer gegeben (z.B. Aqua dest.), 1 min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wird durch eine letzte Zentrifugation bei 10.000 x g für 1min. die DNA eluiert.

### 3.2.6 Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA

Die Dephosphorylierung der Vektor-DNA ist ein wichtiger Schritt vor einer Ligation. Um den unerwünschten Effekt der Religation einer zuvor gespaltenen Vektor-DNA zu vermeiden, ist es notwendig, die Phosphorgruppe am 5'-Ende der DNA abzuspalten.

Die Dephosphorylierung erfolgt mittels einer Alkalischen Phosphatase in einem Reaktionsvolumen von 50  $\mu\text{l}$ .

X  $\mu\text{l}$  DNA

1,5 – 3  $\mu\text{l}$  alkal. Phosphatase (1 U/ $\mu\text{l}$ )

5  $\mu\text{l}$  AP-Puffer (10x)

X  $\mu\text{l}$  steriles  $\text{dH}_2\text{O}$

Die Reaktion wird für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.7 Ligation

Die Ligation von DNA-Molekülen erlaubt es, Fremd-DNA in ein Plasmid einzubauen, welches als Transportvehikel genutzt wird, um diese Fremd-DNA in Zellen einzuschleusen.

Das die Reaktion katalysierende Enzym ist die T4-DNA-Ligase, die in einem Reaktionsvolumen von 20  $\mu\text{l}$  verwendet wird.

X  $\mu\text{l}$  Insert-DNA

X  $\mu\text{l}$  Vektor-DNA

2  $\mu\text{l}$  T4-Ligase

4  $\mu\text{l}$  Ligasepuffer (10x)

Die Menge an Insert-DNA sollte möglichst maximal (12-13  $\mu\text{l}$ ) gewählt werden, um die Wahrscheinlichkeit einer gewünschten Verbindung von Insert und Vektor zu erhöhen. Die Menge an Vektor entspricht demnach 1-2  $\mu\text{l}$ . Nach Angaben des Herstellers der T4-DNA-Ligase sollen für einen 20  $\mu\text{l}$ -Ansatz 4  $\mu\text{l}$  10x Ligasepuffer verwendet werden. Die Reaktion wird über Nacht bei 16

°C inkubiert.

### 3.2.8 Glycogenfällung

Um die Effizienz einer Transformation von ligierter DNA in Zellen zu erhöhen, ist es von Vorteil, die DNA zu fällen. So kann eine größere Menge DNA eingesetzt werden. Ein weiterer Effekt ist, daß bei der Aufbereitung die Salze des Ligasepuffers entfernt werden, so daß diese eine Transformation durch Interaktion mit geladenen Teilchen an der Membran der Zellen nicht mehr behindern. Zu dem Ligationsansatz von 20 µl wurden 80 µl dest. H<sub>2</sub>O und 100 µl Phenolchloroformisoamylalkohol hinzupipettiert und anschließend für 5 Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zu der Phenolphase wurden noch einmal 50 µl dest. H<sub>2</sub>O gegeben und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem ersten Überstand vereint. Nun wurden 15 µl 5 M NaCl, 13 µl dest. H<sub>2</sub>O und 2 µl Glycogen hinzupipettiert und mit 540 µl 96 % Ethanol aufgefüllt. Das Gemisch wurde dann bei 10.000 x g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Nach einem Waschschriff mit 70 % Ethanol wurde abermals zentrifugiert, dann der Überstand verworfen und das Pellet in 4 – 6 µl dest. H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 3.2.9 Herstellung elektrokompetenter Zellen von *E. coli*

Als *E. coli*-Stämme wurden HB101, Stabl-2 und Ec<sup>2</sup>191 verwendet. Zunächst wurde eine 5 ml-Übernachtskultur in LB-Medium angesetzt, die am nächsten Tag in 345 ml LB-Medium inokuliert wurde. Bei 37 °C und 300 rpm wurde solange inkubiert bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht war. Anschließend wurde die Kultur bei 4.000 rpm, entsprechend 1200 x g, und 4 °C für 15 Minuten im JA14-Rotor einer Beckman® Zentrifuge pellettiert. Das Pellet wurde dreimal mit 10 % Glycerin gewaschen und in 5 ml 10 % Glycerin suspendiert und in Aliquots zu je 300 µl in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei –70 °C gelagert.

### 3.2.10 Transformation in *E. coli*

Zur Anwendung kamen die Stämme HB101, Stabl-2 und Ec<sup>2</sup>191.

50 µl der auf Eis aufgetauten Bakterien wurden mit 1 µl DNA (0,1 – 1 µg), nach einer

Glycogenfällung 2 – 3 µl DNA vermischt und in Transformationsküvetten überführt. Die Elektroporation (Genepulser der Fa. Biorad) erfolgte bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Widerstand von 400 Ω und einer Kapazität von 25 µF bei ca. 4 °C. Nach der Transformation wurden die Bakterien in 1 ml Nährmedium (LBB) überführt und für eine Stunde bei 37 °C im Schüttelinkubator vermehrt, um die Antibiotikaresistenz zu exprimieren.. Um positive (transformierte) Bakterien von negativen zu unterscheiden, werden die Bakterien auf Selektivnährböden ausgestrichen. Dabei handelt es sich um LB-Agar-Platten mit einem entsprechenden Antibiotikum. Die Wahl des Antibiotikums richtet sich nach der Antibiotikumresistenz des Vektors. Nach einer Inkubation bei 37 °C kann am nächsten Tag das Ergebnis auf der Platte abgelesen werden. Zur Überprüfung des Transformationserfolges werden eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle ebenfalls transformiert. Die Transformationseffizienz wird nach folgender Formel berechnet :

$$\frac{\text{X ml Nährmedium} + \text{X ml Bakterien}}{\text{X ml ausplattiertes Volumen}} \times \text{Anzahl Bakterien}$$

### 3.2.11 Transformation in schnellwachsende Mykobakterien

Bei den schnellwachsenden Mykobakterien handelt es sich um die Spezies *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155. Aus einer Vorkultur wird ein 50 ml-Ansatz bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 - 0,7 kultiviert und zunächst bei 1.200 x g (2500 U/min. in einer Heraeus-Zentrifuge) für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wird in eiskaltem, 10 %igem Glycerol resuspendiert. Der Vorgang wird noch zweimal wiederholt bis das Pellet am Ende in 4 – 5 ml Glycerol gelöst wird. 400 µl der Bakterien werden mit 1 µl DNA (0,1 – 1 µg) in der Elektroporationsküvette auf Eis vermischt. Das Elektroporationsgerät wird mit einem Widerstand von 1 kΩ betrieben. Die Bakterien werden auf 7H10/ADS/Glycerol-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und für 3-4 Tage bei 37 °C bebrütet.

### 3.2.12 Transformation in langsamwachsende Mykobakterien

Eine Besonderheit der langsamwachsenden Mykobakterien ist ihre Eigenschaft, ein besseres Transformationsergebnis bei erheblich höheren Temperaturen zu erreichen. Nachdem die Zellen analog dem Protokoll zur Herstellung elektrokompenter Zellen aus schnellwachsenden Mykobakterien kompetent gemacht wurden, erfolgte die Resuspendierung des Pellets daher mit raumtemperiertem Glycerol. Vor der Überführung der Bakterien in die Transformationsküvetten wurden diese im Wasserbad auf 50 °C erwärmt. Dasselbe wurde unmittelbar vor der Transformation mitsamt Inhalt wiederholt. Der Genepulser der Fa. Biorad wurde genauso eingestellt wie für die schnellwachsenden Mykobakterien. Die Bakterien wurden auf 7H10/OADC/Glycerol-Platten ausgestrichen und für ca. 3 Wochen bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.13 Kultivierung von *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155

#### 3.2.13.1 Kultivierung unter aeroben Bedingungen

*Mycobacterium smegmatis* gehört zu den schnellwachsenden Mykobakterien. Eine 50 ml-Kultur wurde über Nacht durch die Inokulation von 75 µl Bakterien in 50 ml 7H9/ADS/Glycerol/Tween80 angezüchtet. Die Kultur wurde in einen 300 ml Erlenmeyerkolben mit Stopfen gegeben und bei 37 °C inkubiert.

#### 3.2.13.2 Kultivierung unter anaeroben Bedingungen

Das Vorgehen bei der Kultivierung unter anaeroben Bedingungen entspricht bis zum Waschschrift der Vorkulturen der Kultivierung unter aeroben Bedingungen. Anschließend wurden die Bakterien in Kunststoffröhrchen (Greiner PP) mit 10 ml MB-Medium, 20 % Glycerol und 0,01 M Kaliumnitrat inokuliert. Die Greiner-Röhrchen wurden zusammen mit dem AnaeroGen™ - System der Fa. Oxoid (stellt anaerobes Milieu her) und einem Indikator zur visuellen Überprüfung der kulturellen

Bedingungen in einen Anaerobiertopf der Fa. Merck überführt. Es wurde bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.14 Kultivierung langsamwachsender Mykobakterien

#### *3.2.14.1 Kultivierung unter aeroben Bedingungen*

Alle anderen verwendeten Mykobakterien sind langsamwachsende Stämme. Volumina bis ca. 15 ml wurden in Ink square bottles (Fa. Nalgene), Volumina ab ca. 50 ml wurden in Rollflaschen (Fa. Corning Costar) angezüchtet. Auf diese Weise wird eine größere Oberfläche erzielt, so daß die Bakterien bei gleichem Volumen mehr Sauerstoffkontakt haben als in Erlenmeyerkolben. Für ihr Wachstum benötigen langsamwachsende Mykobakterien bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C ca. 7 – 10 Tage.

#### *3.2.14.2 Kultivierung unter anaeroben Bedingungen*

Die Kultivierung unter anaeroben Bedingungen erfolgte bis zum Waschschrift der Vorkulturen analog dem Protokoll zur Kultivierung unter aeroben Bedingungen. Nach dem Waschen werden die Bakterien in Kunststoffröhrchen (Greiner PP) mit 10 ml MB, ADS und 0,01 M KNO<sub>3</sub> inokuliert. Die Bebrütung erfolgt in einem Anaerobiertopf der Fa. Merck mit dem AnaeroGen<sup>TM</sup>-System der Fa. Oxoid bei 37 °C. Zur Überprüfung der anaeroben Verhältnisse wurde ein Anaerobierindikator der Fa. Oxoid verwendet.

### 3.2.15 Nitratreduktasetest

Das Vermögen einiger Bakterien, durch eine Nitratreduktase Nitrat zu Nitrit zu reduzieren, wird mittels einer Diazotierungsreaktion nachgewiesen. Durch salpetrige Säure, die aus Nitrit und Essig entsteht, werden primäre Amine in Diazoniumsalze umgewandelt. Bei der Diazotierungsreaktion von Sulphanilamid (NIT 1) und N-N-dimethyl-1-naphthylamin (NIT 2) entsteht unter Anwesenheit von Nitrit bzw. salpetriger Säure ein Diazoniumsalz von roter Farbe. Diese Farbstoffentwicklung gilt als

Nachweis des Nitratreduktionsvermögens bei Mikroorganismen.

Es wurden in ein Eppendorfgefäß zu 1 ml Bakteriensuspension jeweils 50 µl NIT 1 und NIT 2 (Fa. Api Biomerieux) gegeben und bei Raumtemperatur für 7 Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert. Die Absorption des Überstandes wurde bei schnellwachsenden Mykobakterien bei 530 nm und bei langsamwachsenden Mykobakterien bei 440 nm gemessen. Die verschiedenen Absorptionsbereiche sind notwendig, um die Auswirkungen von ADS auf das Lichtabsorptionsspektrum zu kompensieren. Zur Errechnung des produzierten Nitrits (in µmol/l) wurden für beide Absorptionsbereiche Eichkurven erstellt, aus denen Faktoren ermittelt wurden, die zur Multiplikation mit den Lichtabsorptionswerten verwendet wurden.

Für den Absorptionsbereich von 530 nm wurde folgende Eichkurve erstellt:

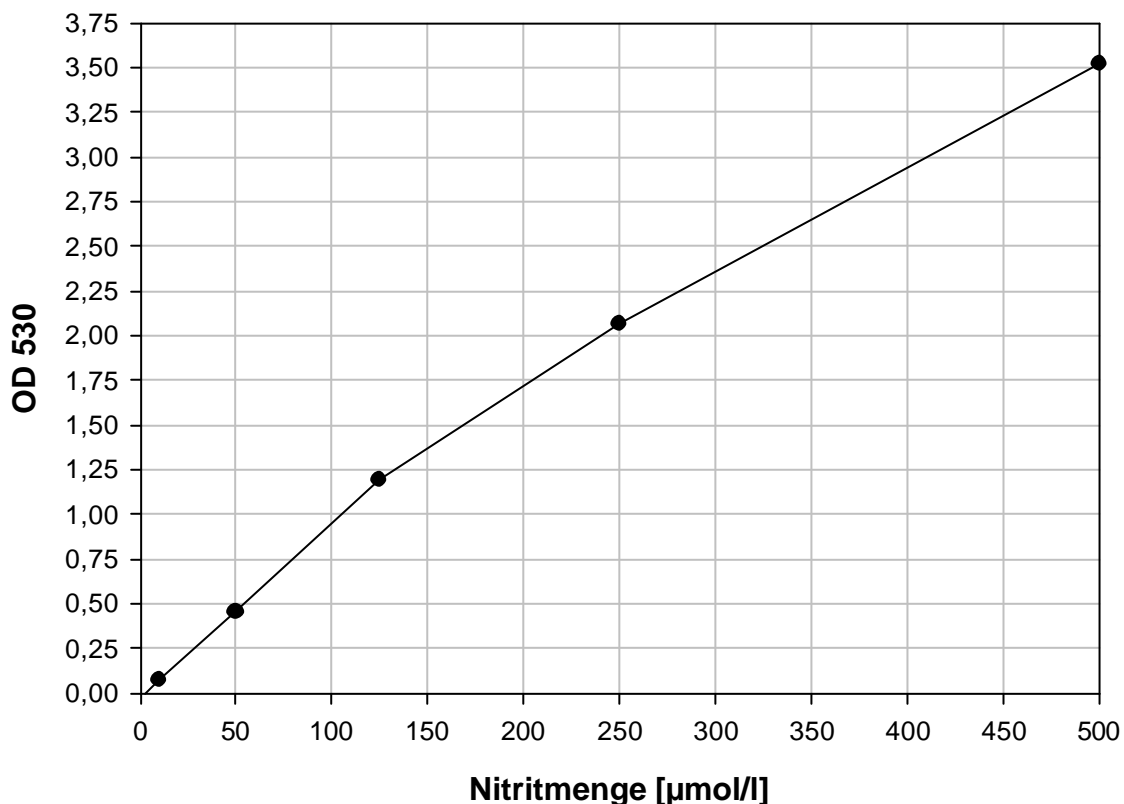


Abb. 3.1: Eichkurve zur Bestimmung photometrisch ermittelter Nitritmengen im Absorptionsbereich von 530 nm.

Es ergab sich der Faktor 105.

Für den Absorptionsbereich von 440 nm sah die Eichkurve folgendermaßen aus:

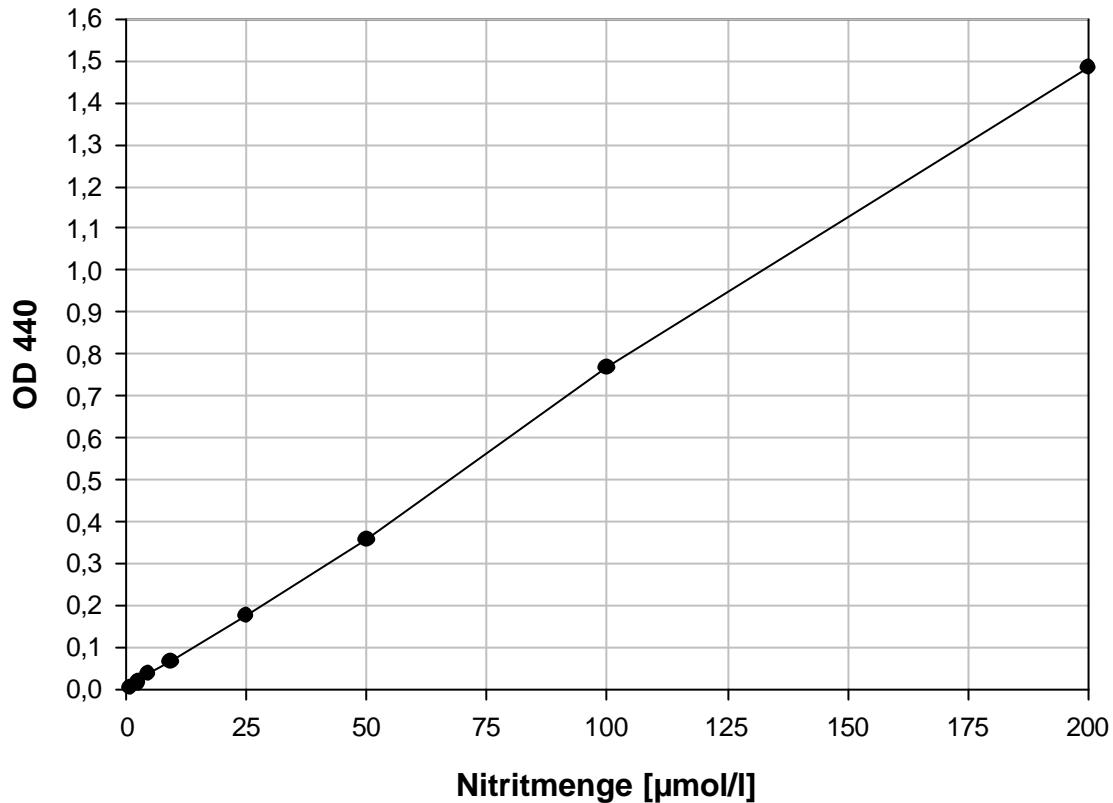


Abb. 3.2: Eichkurve zur Bestimmung photometrisch ermittelter Nitritmengen im Absorptionsbereich von 440 nm.

Hier betrug der Faktor 134.

### 3.2.16 Die Polymerasekettenreaktion

Eine PCR (Polymerase Chain Reaction) wird dazu verwendet, einen bestimmten DNA-Abschnitt zu vervielfältigen (amplifizieren). Hierzu werden Oligonukleotide (Primer) benötigt, die den gewünschten DNA-Abschnitt begrenzen und komplementär zu der zu amplifizierenden DNA sind. Eine temperaturbeständige DNA-Polymerase nutzt die Primer, um sich an die DNA (sog. Template-DNA) anzulagern. Sie liest an der Template-DNA die Basenfolge ab und synthetisiert in einem

weiteren Schritt einen neuen DNA-Strang, indem sie die einzelnen Nukleotide (Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin) in der richtigen Reihenfolge zusammensetzt. Die Polymerase kann sich nur an einsträngige DNA anlagern. Daher muß die zweisträngig vorliegende Template-DNA vorher aufgespalten (denaturiert) werden. Dies geschieht durch kurzzeitige Temperaturerhöhung auf 92 – 95 °C. An diesen Prozess schließt sich die Primerbindung an (Annealing). Hierfür werden niedrigere Temperaturen benötigt. Der genaue Wert richtet sich nach der Schmelztemperatur der Primer, also nach derjenigen Temperatur, bei der die Hälfte aller vorhandenen Primer von der DNA gelöst ist. Die Schmelztemperatur errechnet sich aus der Länge der Primer sowie aus der Art und der Anzahl der vorhandenen Nukleotide, aus denen der Primer zusammengesetzt ist. Nachdem die Primer an die DNA gebunden haben, kann nach einer Temperaturerhöhung die Polymerase die gewünschte DNA verlängern (Extension). Jede Polymerase besitzt ein eigenes Temperaturoptimum, in dem sie am effektivsten arbeitet. Die in dieser Arbeit verwendeten Polymerasen haben ihr Temperaturoptimum bei 68 °C. Durch mehrmaliges Wiederholen dieses Zyklus – Denaturierung, Annealing und Extension – wird so in mehreren Schritten eine größere Menge DNA erstellt. Dadurch, daß nach jedem Zyklus immer mehr Matrizen zur Verfügung stehen, wächst die Menge an gebildeter DNA exponentiell.

### 3.2.17 Erstellung einer Einpunktmutation mittels Site-directed mutagenesis

Das Verfahren beruht auf einem von der Firma Stratagene entwickelten Prinzip (Quik Change™ Site-Directed Mutagenesis Kit). Es werden zwei Primer gewählt, die komplementär zueinander an einem zirkularisierten, doppelsträngigen Plasmid binden können. So entsteht ein Block von einem Primerpaar, der in seiner Mitte die gewünschte Mutation enthält. Beide Primer werden durch eine *Pfu* DNA Polymerase verlängert, so daß wieder ein zirkularisiertes Plasmid entsteht. Der fehlende Schluß des Ringes wird erst während einer anschließenden Transformation durch die Zellen erzielt.

Die Firma Stratagene empfiehlt folgendes Primerdesign:

- beide Primer müssen die gewünschte Mutation enthalten und komplementär zueinander an die Template-DNA binden können
- die Primer sollten zwischen 25 und 45 Basenpaare lang sein und eine Schmelztemperatur haben, die ca. 10 °C oberhalb der Verlängerungstemperatur der Polymerase liegt (68 °C), damit der Verlängerungszyklus nicht zweimal abläuft; die Schmelztemperatur  $T_m$  soll nach

folgender Formel berechnet werden:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\% \text{ GC}) - 675 / N - \% \text{ mismatch}$$

N = Primerlänge in bp

mismatch = Menge der Punktmutationen in Prozent

- die gewünschte Mutation sollte in der Mitte der Primer liegen und zu beiden Enden hin noch 10 bis 15 Basen Überstand besitzen
- die Primer sollten mindestens zu 40 % aus Guanin und Cytosin bestehen und sollten mit einem oder mehreren Guanin- oder Cytosinbasen enden
- die Primer brauchen am 5' – Ende nicht phosphoryliert zu sein, müssen aber durch eine Hochgeschwindigkeitsflüssigchromatographie (FPLC) oder durch eine Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) aufgereinigt werden
- wichtig ist die genaue Einhaltung der empfohlenen Primerkonzentration

Der Reaktionsansatz für die PCR wurde wie folgt angemischt:

5 µl 10x Reaktionspuffer

X µl dsDNA als Template

X µl (125 ng) Forwardprimer

X µl (125 ng) Reverseprimer

1 µl 50 mM dNTP-Mix

ddest H<sub>2</sub>O ad 50 µl

anschließend 1 µl *Pfu* DNA Polymerase (2,5 U/µl)

Es wurden drei verschiedenen Mengen an Template-DNA verwendet. In jeweils 5 µl waren 5, 25 und 50 ng DNA enthalten.

Der Thermocycler wurde auf 15 Zyklen programmiert. Nach der initialen Denaturierung von 95 °C für 30 Sekunden folgte eine erneute Denaturierung bei 95 °C für 30 Sekunden. Das Annealing wurde 1 min bei 55 °C durchlaufen, dem sich eine Extension bei 68 °C für 2 Minuten / kb Plasmidlänge anschließt.

Nach Beendigung der PCR liegen in dem Reaktionsgemisch sowohl die neu synthetisierte DNA als auch die Ursprungs-DNA vor. Letztere wurde durch eine Restriktionsspaltung mit der Endonuclease *DpnI* in viele kleine Stücke gespalten. Die synthetisierte DNA wird nicht gespalten, weil *DpnI* ausschließlich methylierte DNA spalten kann und nur von Bakterien erzeugte DNA methyliert ist. 1 µl *DpnI* (10 U/µl) wurde zu dem Reaktionsansatz pipettiert und anschließend wurde für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert.

Abweichend vom Standardprotokoll der Firma Stratagene wurde die synthetisierte DNA in CaCl<sub>2</sub>-kompetente Zellen des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$  transformiert. Dazu wurden 2-3 µl der DNA mit 100 µl der kompetenten Zellen vermischt und für 20 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde exakt 90 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Nach einer erneuten Eisphase von 2 min wurden die Zellen in 1ml LBB überführt und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen 5 min bei 7.500 x g abzentrifugiert und in 150 – 200 µl LBB resuspendiert. Diese Menge wurde auf einen Nährboden mit LB-Agar und entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Aus den gewachsenen Kolonien wurden eine Flüssigkultur angelegt und die Plasmide präpariert.

### 3.2.18 Erstellung, Markierung und Quantifizierung einer Hybridisierungssonde

Die Herstellung einer Hybridisierungssonde erfolgte mit Hilfe einer PCR. Die gewünschten Primer wurden von der Firma MWG synthetisiert.

Damit die Sonde im Rahmen einer Hybridisierung wirksam ist, muß sie markiert werden. Das Verfahren hierfür war das „DIG randomprimed DNA Labeling“ der Firma Boehringer Mannheim. Es handelt sich um ein nicht radioaktives Verfahren, bei dem das an dUTP angelagerte Steroidhaptene Digoxigenin (DIG) durch Klenow-Enzym mit der Sonden-DNA verbunden wird.

Es wurden 15 µl DNA für 10 min im kochenden Wasserbad denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Zur Markierung wurden 2 µl DIG-11-dUTP und 1 µl Klenow-Enzym verwendet. Als Primer wurden 2 µl Hexanukleotid-Mix zugegeben, die an die Template-DNA binden. Markiert wurde über Nacht bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA-Lösung abgestoppt und der Reaktionsansatz mit ddest H<sub>2</sub>O auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend wurde die Sonde für eine halbe Stunde mit 96 % Ethanol gefällt. Nach einem Waschschrift mit 70 % Ethanol wurde die Sonde überprüft.

Die Überprüfung einer Hybridisierungssonde dient dazu, die Menge an einzusetzender DNA zu bestimmen. Die Sonden-DNA wurde in vier Stufen (1:10, 1:100, 1:1.000 und 1:10.000) verdünnt und von jeder Verdünnungsstufe wurde 1 µl auf eine Nylonmembran aufgetragen. Eine im DIG DNA Labeling and Detection Kit enthaltene Kontroll-DNA wurde in fünf Schritten verdünnt und von diesen Verdünnungsstufen (c = 100 pg/µl, 10 pg/µl, 1 pg/µl, 0,1 pg/µl und 0,01 pg/µl) wurde ebenfalls je 1 µl auf die Nylonmembran aufgetragen. Analog dem Protokoll zur Entwicklung einer hybridisierten Nylonmembran (s. Kapitel 3.2.19) wurde die Membran entwickelt. Anhand der Signalstärke der Kontroll-DNA konnte abgelesen werden, welche DNA-Menge als Hybridisierungssonde eingesetzt werden mußte. Bei gleicher Signalstärke von Sonden- und Kontroll-DNA wurden pro 10 ml Hybridisierungslösung 10 µl Sonden-DNA verwendet.

### 3.2.19 Koloniehybridisierung

Aus einer genomischen Cosmid-Bibliothek kann mit Hilfe einer Koloniehybridisierung und einer geeigneten Sonde ein gewünschter Genom-Abschnitt isoliert werden. Die die Bibliothek enthaltenden Bakterien wurden getitert, um diejenige Verdünnungsstufe zu erhalten, bei der pro Nährboden ca. 200 Kolonie bildende Einheiten wachsen. Die Anzahl an Kolonien pro Nährboden ist entscheidend für das Gelingen einer Koloniehybridisierung, da einerseits möglichst viele Kolonien untersucht werden sollen, andererseits aber zu viele Kolonien eine Abgrenzung untereinander unmöglich machen. Von den gewachsenen Kolonien wurden Abklatschpräparate durch Auflegen einer Nylonmembran hergestellt. Die Membranen wurden dann mit der Kolonieseite nach oben 15 min in Denaturierungslösung, 5 min in Neutralisierungslösung und anschließend für 20 min in 2 x SSC bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membranen lagen dabei auf einem zweilagigen Stapel Whatman™-

Papier. Zur Fixierung der DNA wurden die Membranen 30 min bei 120 °C gebacken. Die Entfernung der Bakterienzellreste wurde durch zweimaliges Waschen je 30 min mit 2 x SSC / 0,1% SDS bei 65 °C im Hybridisierungssofen erzielt. Während dieser Zeit wurden die Rundfilter vorsichtig mit der Waschlösung und einem sauberen Geschirrhandtuch abgerieben.

Die Membranen wurden zunächst 1 Stunde in Hybridisierungslösung bei 65 °C prähybridisiert. Dieser Schritt ist notwendig, um den Hintergrund zu eliminieren, der durch unspezifische Bindung der DIG-DNA-Sonde an die Nylonmembran entsteht.

Die Hybridisierung wurde über Nacht mit der zuvor denaturierten und dann auf Eis abgekühlten DIG-markierten Sonde bei einer Hybridisierungstemperatur von 65 °C durchgeführt. Es wurden pro 100 cm<sup>2</sup> Filterfläche 2,5 ml Hybridisierungslösung verwendet. Die Menge an Sonden-DNA richtete sich nach dem Ergebnis der Quantifizierung.

Am nächsten Morgen wurden die Membranen für 2 x 30 Minuten in Waschlösung I und 2 x 30 min in Waschlösung II bei 65 °C gewaschen. Diese spezifischen Waschschrte sind notwendig, um Basenpaarungen mit weniger als 95 % Homologie zwischen Sonde und DNA auf dem Filter zu beseitigen.

Es folgt der Schritt der Chemilumineszenzdetektion (s.o.). Dazu wurden die Filter 5 min in Waschpuffer gewaschen und anschließend für 30 min in Puffer 2 und dann für weitere 30 min in 1:10.000 verdünntem DIG-AP-Konjugat in Puffer 2 inkubiert. Danach wurden die Filter 3 x 10 min in Waschpuffer gewaschen und anschließend für 5 min in 20 ml Puffer 3 äquilibriert. Die Membranen wurden daraufhin mit der Kolonieseite nach unten in eine Schale mit CSPD<sup>®</sup>-Substratlösung gelegt (CSPD<sup>®</sup> 1:100 in Puffer 3 verdünnt). Überschüssiges Substrat wurde abgestreift und die Membranen mit der Kolonieseite nach unten für 5 min im Dunkeln inkubiert. Die Membranen wurden dann in Plastikbeuteln eingeschweißt und 15 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Das Ergebnis der Hybridisierung wurde durch Exposition eines Röntgenfilmes für 15 min bis 3 Stunden und anschließender Entwicklung dokumentiert.

### 3.2.20 Southernblotanalyse

Genomische DNA oder Cosmid-DNA wird bei der Methode nach Southern (1975) nach einer Spaltung mit Restriktionsendonucleasen in einem Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt und auf

eine Nylonmembran übertragen (Blotting).

Das in Ethidiumbromid gefärbte Agarosegel wurde mit einem Längenmaßstab fotografiert. Zur Denaturierung der DNA wurde das Agarosegel 2 x 30 min in einer Schale mit Denaturierungslösung unter leichtem Schwenken behandelt. Anschließend wurde für 2 x 30 min in Neutralisierungslösung inkubiert. Der Transfer fand über Nacht statt. Dazu wurde eine Lage Whatman™-Papier mit 20 x SSC-Puffer angefeuchtet. Dieser Puffer stellt eine Transferlösung dar, die in einer Schale unterhalb des Agarosegels schwimmt. Das Papier ist saugfähig und kann somit den Transferpuffer aus der Schale ziehen. Das Agarosegel wurde mit 20 x SSC äquilibriert und mit der glatten Seite nach oben luftblasenfrei auf das Saugpapier gelegt. Eine zurechtgeschnittene und äquilibrierte Nylonmembran wurde ebenfalls ohne Luftblasen auf das Gel gelegt. Auf die Nylonmembran wurden zwei Lagen Whatman™-Papier gelegt. Als Saugpapier wurden Papierhandtücher verwendet, die noch oberhalb des Whatman™-Papiers positioniert wurden. Der Blot wurde mit etwa 600 g beschwert. Zur Fixierung der DNA wurde die Nylonmembran mit UV-Licht behandelt. Die Membran wurde anschließend für 2 x 30 min mit 2 x SSC / 0,1 % SDS im Hybridisierungssofen gewaschen.

Die folgenden Schritte sind identisch mit dem Protokoll der Koloniehybridisierung (s. Kapitel 3.2.19).

### 3.2.21 Erstellung einer Cosmid-Bibliothek

Zur Erstellung einer genomischen Cosmid-Bibliothek wird die chromosomale DNA des gewünschten Bakteriums benötigt. Diese wurde aus dem *M. bovis*-Stamm R99 präpariert. Die Spaltung der DNA erfolgte mit der Restriktionsendonuclease *Sau3A*. Dieses Enzym spaltet an allen GATC-sites einer DNA. Da es davon sehr viele gibt, würde die gesamte chromosomale DNA in viele 150 – 300 bp kleine DNA-Fragmente unterteilt werden. Es werden jedoch ca. 40.000 bp große Fragmente benötigt (s.u.). Somit durfte die DNA nur partiell verdaut werden. Dies wurde erreicht, indem von der Restriktionsendonuclease eine Verdünnungsreihe über zehn Stufen angefertigt wurde. Zunächst wurde ein Reaktionsgemisch bestehend aus 150 µg DNA, 10 x Reaktionspuffer und ddest. H<sub>2</sub>O hergestellt. Die Gesamtmenge betrug 440 µl. 80 µl davon wurden in ein Eppendorfgefäß überführt, je 40 µl in weitere 9 Eppendorfgefäße. In das erste Gefäß wurden 2 µl einer 1:10-Verdünnung von *Sau3A* (entsprechend 0,8 U) gegeben. Nach dem Mischen des Reaktionsansatzes wurden 40 µl

entnommen und in das nächste Eppendorfgefäß überführt. Die Reihe wurde bis zum zehnten Eppendorfgefäß fortgeführt. Die Reaktionsansätze wurden für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach einem Denaturierungsschritt für 20 min bei 65 °C wurde je ein Zehntel des Reaktionsansatzes auf ein 0,4 %iges Agarosegel aufgetragen. Die DNA-Fragmente mit einer Größe von ca. 35.000 bis 40.000 bp wurden in einem Eppendorfgefäß zusammengefasst und mit einer Kälberphosphatase (1 µl einer 1:1.000-Verdünnung) für eine Stunde dephosphoryliert.

Die gepoolte DNA wurde nach einer Phenolisierung mit Isopropanol unter Natriumacetatzugabe gefällt. Anschließend wurde die DNA mit 70 % Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 ml ddest. H<sub>2</sub>O resuspendiert.

Parallel dazu wurden Vektorarme erstellt. Es handelt sich dabei um Anteile des Vektors pYUB.412.2 (Ampicillin, Hygromycin), die je eine cos-Site besitzen. Diese benötigt der Phage (s.u.), um die DNA zu verpacken. Der Vektor pYUB.412.2 wurde mit der Restriktionsendonuclease *Xba*I gespalten, nach einer anschließenden Denaturierung dephosphoryliert und phenolisiert und dann einer Ethanolpräzipitation unterzogen. Durch eine Spaltung des linearisierten Vektors mit dem Restriktionsenzym *Bcl*II entstanden zwei Vektorarme. Auf einem Arm ist die Antibiotikumresistenz lokalisiert, auf dem anderen das „origin of replication“ für *E. coli*. So wird bei der zu einem späteren Zeitpunkt stattfindenden Kultivierung der dann phagenhaltigen Bakterien (s.u.) sichergestellt, dass nur diejenigen Bakterien überleben, die beide Vektorarme enthalten. Nach einer Säulenaufreinigung wurden die Vektorarme auf einem Agarosegel kontrolliert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend mit den Vektorarmen ligiert.

part. Verdau	Vektorarme	Puffer	Ligase	Aqua dest.
3 µg	500 ng	4 µl	2 U	8 µl
10 µg	500 ng	4 µl	2 U	1 µl

Tab. 3.3: Ligationsansätze zur Erstellung einer Cosmid-Bibliothek

Die Ligation erfolgte bei 16 °C über Nacht. Werden die beiden Vektorarme mit A und B bezeichnet, ergeben sich folgende Kombinationsmöglichkeiten:

- A – DNA-Fragment – B

- A – DNA-Fragment – A
- B – DNA-Fragment –B

Bei der Infektion (*in vitro*-Verpackung der DNA in die Zielzellen) kann nur die erste Variante in die Zielzellen integrieren, da sowohl die Antibiotikumresistenz als auch das „origin of replication“ für *E. coli* benötigt wird.

Die Infektion erfolgte mit dem GigaPack III Gold™ – System der Firma Stratagene. Es enthält einen 8-Phagen, der über zwei cos-Sites DNA verpacken kann. Er ist allerdings nur in der Lage, 35.000 bis 40.000 bp große DNA-Fragmente zu integrieren. Zu den in der Hand aufgetauten Phagen wurden 5 µl des Ligationsansatzes hinzugegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel dazu wurden die Zielzellen (*E. coli* Stabl-2) vorbereitet. 750 µl Stabl-2 wurden in 30 ml LBB gegeben, 600 µl 20 % Maltose und 300 µl 1 M MgSO<sub>4</sub> hinzupipettiert und anschließend bei 37 °C im Schüttler inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,7 erreicht worden war. Danach wurden die Bakterien für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert und auf Eis in 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert, so daß eine OD<sub>600</sub> von 1,2 erzielt wurde.

Die DNA-haltigen Phagen wurden nach den zwei Stunden Inkubationszeit in 500 µl SM-Puffer aufgenommen. 50 µl davon wurden mit 200 µl der Bakterien zusammengeführt und für eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in 1 ml LBB überführt und erneut bei 37 °C für eine Stunde inkubiert, wobei alle 15 Minuten einmal geschwenkt wurde. Das gesamte Material wurde auf Nährböden mit LB-Agar und Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg / ml ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Die Nährböden wurden am nächsten Tag ausgewertet, um die auszuplattierende Gesamtmenge zu ermitteln, die benötigt wird, um mindestens 20.000 Klone zu erhalten. Da das gesamte Genom von *M. bovis* 4,4 Millionen Basenpaare umfasst, ist diese Größenordnung notwendig, damit das Genom ungefähr 1000 mal in der Bibliothek repräsentiert ist. Mit der restlichen in dem SM-Puffer befindlichen Bibliothek wurde wie oben beschrieben verfahren. Die gewachsenen Klone wurden mit LBB von den Nährböden geschwemmt und zusammen in Glycerol eingefroren.

### 3.2.22 Überprüfung einer Cosmid-Bibliothek mit Hilfe von auxotrophen Mutanten

Die verwendeten auxotrophen Mutanten von *M. smegmatis* – die Herstellung der Mutanten erfolgte

durch chemische Mutagenese (BANGE, COLLINS u. JACOBS 1999) - haben einen Aminosäuresynthesedefekt, so daß sie für ihr Wachstum auf die Supplementation von bestimmten Aminosäuren angewiesen sind. Im Genom von *M. bovis* R99 sind Gene zur Synthetisierung von Aminosäuren vorhanden. Wird die genomische Bibliothek in die auxotrophen Mutanten transformiert, sollte der Aminosäuresynthesedefekt komplementiert sein. Nach der Transformation wurde eine Hälfte auf Nährböden mit Antibiotikum sowie mit der zu supplementierenden Aminosäure ausplattiert, um das Vorhandensein der Antibiotikum-resistenz zu überprüfen. Die andere Hälfte wurde auf Nährböden ausgestrichen, die ausschließlich das Antibiotikum enthalten. Wuchsen auf diesen Nährböden Kolonien, so war das ein Beweis für die Komplementation des Aminosäuredefekts. Da das gesamte Genom der untersuchten Bakterienspezies *M. bovis* R99 eine Größe von 4,4 Millionen Basenpaaren und jedes Cosmid eine Größe von 40.000 Basenpaaren aufweist, wird theoretisch jeder hundertste Klon komplementiert. Empirisch liegt die Frequenz bei 1:200 bis 1:300. Werden auf einem Nährboden 1000 Klone ausgestrichen (erkennbar an der Anzahl auf den Platten mit der Aminosäure), so reicht eine Menge von 3-4 Klonen aus, um von einer gelungenen Komplementation sprechen zu können.

### 3.2.23 Sequenzierung

Für eine Sequenzierungs-PCR wird je nach Leselänge eine Menge von 200 bis 1000 ng der zu sequenzierenden DNA benötigt. Diese Menge wurde in einem Volumen von 5 µl ddest. H<sub>2</sub>O gelöst. Es wurde ein Sequenzierungsprimer ausgesucht, der komplementär zu der dsDNA ist. Die Konzentration des Primers wurde auf 5 pmol / µl eingestellt, für die Reaktion wurde 1 µl verwendet. Zu der DNA und dem Primer wurden 4 µl des Sequenzierungsgemisches, bestehend aus einer Taq-Polymerase, fluoreszenzmarkierten dNTPs und Puffer, hinzupipettiert. Bei dem Standardprogramm für die Sequenzierung wurden 25 Zyklen mit folgenden Parametern durchlaufen:

96 °C 10 Sekunden

56 °C 5 Sekunden

60 °C 4 Minuten

Die Dauer des Programms betrug ca. 2,5 Stunden. In dieser Zeit wurde ein Acrylamidgel hergestellt. 30 g Harnstoff wurden in 7,5 ml 40 % Acrylamid mit 23,5 ml ddest. H<sub>2</sub>O gegeben und bei 50 °C auf einem Magnetrührer gelöst. Die gelöste Flüssigkeit wurde nach Zugabe von 6 ml 10 x TBE filtriert. Anschließend wurde das Filtrat luftblasenfrei zu 350 µl APS gegeben. Nach Zugabe von 15 µl 5 % Temed<sup>®</sup> (Beginn der Polymerisation) wird die Flüssigkeit sofort zwischen zwei zuvor vorbereitete Glasscheiben gegossen. Es ist wichtig, hierbei keine Luftblasen zu produzieren. Nach einer Polymerisationszeit von 1 bis 1,5 Stunden wurde das fertige Gel in den Sequencer eingesetzt.

In der Zwischenzeit wurden die Proben aus der Sequenzierungs-PCR gefällt, um ungebundene dNTPs, Primer und die Taq-Polymerase auszuwaschen, da diese in der sich anschließenden Sequenzierung zu einem falschen Ergebnis führen können. 2 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) mit 50 µl 96 % Ethanol wurden in ein Eppendorfgefäß vorgelegt. Nachdem zu der Probe 10 µl ddest. H<sub>2</sub>O gegeben wurden, konnte das Gemisch zu der Essigsäure pipettiert werden. Anschließend wurde die Probe 10 Minuten auf Eis gefällt, 25 Minuten bei 10.000 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einem Waschschrift mit 70 % Ethanol wurde erneut bei 10.000 x g für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand abermals verworfen. Das Pellet wurde für 8 bis 10 Minuten in einer Heizzentrifuge (Speedvac<sup>®</sup>) getrocknet. Die folgenden Schritte wurden auf Eis ausgeführt. Das getrocknete Pellet wurde in 4 µl Ladelösung (Formamid, EDTA, Dextranblau) gelöst und anschließend für 2 Minuten bei 95 °C denaturiert. Dann wurde die Probe sofort auf Eis gestellt. Von jeder Probe wurden 4 µl auf das Acrylamidgel aufgetragen und der Sequencer gestartet. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden durch eine Software (DNAstar<sup>™</sup>) aufbereitet und in zwei Versionen ausgedruckt. Eine Version zeigt die Basenabfolge als Buchstabencode, die zweite Version ordnet jeder Base einen farbigen „Peak“ zu, so daß auffällige Merkmale schnell erkannt werden können.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Nitritbildung der komplementierten Deletionsmutante CF1

*Mycobacterium tuberculosis* reduziert unter anaeroben Bedingungen Nitrat zu Nitrit (VIRTANEN 1960). Auch von anderen Bakterien (z.B. *Bacillus subtilis*) ist eine Nitratreduktion bekannt. Bei diesen Bakterien exprimieren die Gene *narGHJI* eine anaerobe Nitratreduktase, durch die Nitrat zu Nitrit reduziert wird (HOFFMANN 1995, NAKANO 1997). Bei der Sequenzierung von *M. tuberculosis* wurden die Gene *narGHJI* lokalisiert und als dissimilatorische Nitratreduktase annotiert (COLE et al. 1998). Durch Untersuchungen an *Bacillus subtilis* ist bekannt, daß die auch als anaerobe Nitratreduktase bezeichneten Gene *narGHJI* als alternative Elektronentransportkette fungieren, die es diesen Bakterien ermöglicht, ATP unter anaeroben Bedingungen zu produzieren (STEWART 1988, BLASCO 1989, PHILIPPOT 1999). *Mycobacterium bovis* BCG besitzt ebenfalls die Fähigkeit, unter anaeroben Bedingungen Nitrat zu Nitrit zu reduzieren (WEBER 1999). Frühere Arbeiten in unserem Labor haben gezeigt, dass *M. bovis* BCG über das *narGHJI*-Gencluster verfügt (WEBER 1999). Durch homologe Rekombination wurde eine *DnarG*-Deletionsmutante (IW1) von *Mycobacterium bovis* BCG hergestellt (WEBER 1999). Diese Deletionsmutante exprimiert keine anaerobe Nitratreduktaseaktivität (WEBER 1999). Die Deletionsmutante IW1 wurde mit dem *narGHJI*-Operon aus *M. tuberculosis* komplementiert (FRITZ 2001). Die komplementierte Mutante wird im folgenden als CF1 bezeichnet. Durch Untersuchungen unter anaeroben Bedingungen wurde festgestellt, dass durch CF1 mehr Nitrat zu Nitrit reduziert wird als durch den BCG-Wildtyp. Die Menge des gebildeten Nitrits beträgt nach elf Tagen fünfmal mehr als die des Wildtyps. Die Abbildung 4.1 zeigt die gebildeten Nitritmengen der komplementierten Deletionsmutante CF1 im Vergleich mit dem Wildtyp BCG.

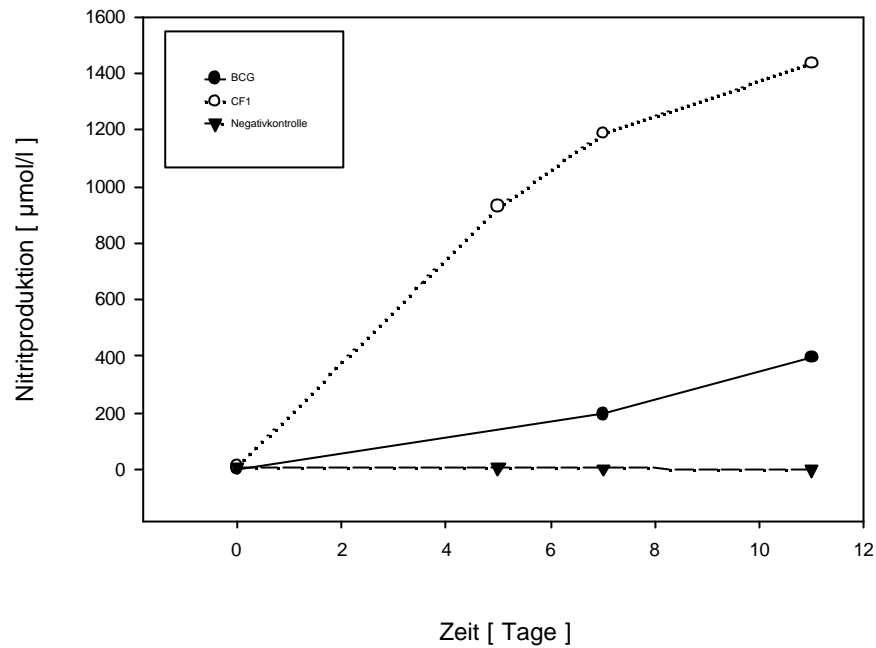


Abb. 4.1: Nitritproduktion des Wildtyps BCG und der komplementierten Deletionsmutante CF1 unter anaeroben Bedingungen. Die Bakterien wurden in Minimalmedium mit Nitrat inokuliert und bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen inkubiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass *M. tuberculosis* im Vergleich zu *M. bovis* BCG unter anaeroben Bedingungen eine stärkere Nitratreduktaseaktivität exprimiert. Woher dieser Unterschied kommt, ist nicht bekannt. Das Genom von *M. bovis* BCG unterscheidet sich nur in 1 – 2 % von dem Genom von *M. tuberculosis*. Möglicherweise ist ein Sequenzunterschied im *narGHJI*-Operon zwischen *M. tuberculosis* und BCG zu finden, der diesen Unterschied erklären könnte. Somit entschieden wir uns, das *narGHJI*-Operon von *M. bovis* BCG zu untersuchen.

## 4.2 Isolierung eines Cosmids mit der anaeroben Nitratreduktase aus *Mycobacterium bovis* BCG

Als erstes war eine Isolierung der Gene der anaeroben Nitratreduktase aus *M. bovis* BCG erforderlich. Das Genom von *Mycobacterium bovis* BCG lag als Cosmid-Bibliothek vor. Mittels einer Koloniehybridisierung sollte aus dieser Cosmid-Bibliothek das *narGHJI*-Operon isoliert werden.

Aus den Arbeiten zur Isolierung des *narGHJI*-Operons aus *Mycobacterium tuberculosis* existierte bereits eine DNA-Sonde („nar-Sonde“), mit der das Operon isoliert werden sollte. Diese Sonde bindet an einen 511 bp großen DNA-Bereich in der *narG*- und der *narH*-Untereinheit der anaeroben Nitratreduktase ( Abb. 4.2 ).

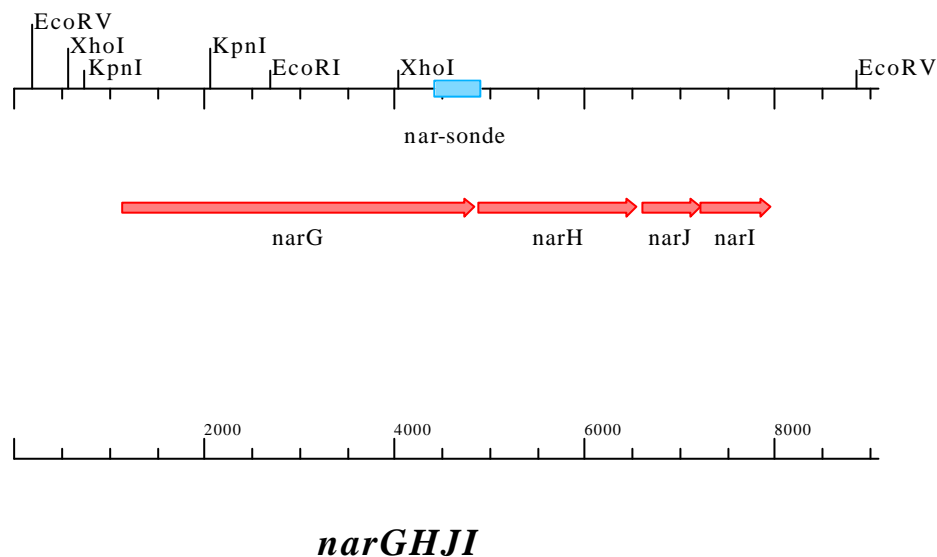


Abb. 4.2: Bindungsstelle der „nar-Sonde“ im *EcoRV*-Fragment der anaeroben Nitratreduktase aus dem Genom von *M. tuberculosis*

Mit Hilfe dieser Sonde gelang es nicht, durch eine Koloniehybridisierung Cosmide zu isolieren, die das Operon der anaeroben Nitratreduktase tragen. Es wurde zweimal eine Koloniehybridisierung durchgeführt. Von jeweils 4000 Kolonien auf den Nährböden zeigte keine Kolonie ein Signal auf

dem Röntgenfilm. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die „nar-Sonde“ keine komplementäre Bindungsstelle in den entsprechenden Untereinheiten der anaeroben Nitratreduktase von *M. bovis* BCG findet. Möglicherweise gibt es in diesem Sequenzbereich Unterschiede zwischen *M. tuberculosis* und *M. bovis* BCG. Wir entschieden uns daher, eine neue DNA-Sonde anzufertigen. Diese Sonde sollte 100 % homolog zu der Sequenz von *M. bovis* BCG sein. Deshalb wurde die Sonde aus der genomischen DNA von BCG hergestellt. Wir suchten uns eine Sonde im Promotorbereich des *narGHJI*-Operons aus, da diese Region zu einem späteren Zeitpunkt ohnehin analysiert werden sollte.

#### Erstellung einer Sonde für das *narGHJI*-Operon von *M. bovis* BCG

Die gewünschte Sonde wurde mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR) hergestellt. Als „Matrize“ wurde die genomische DNA von *Mycobacterium bovis* BCG verwendet.

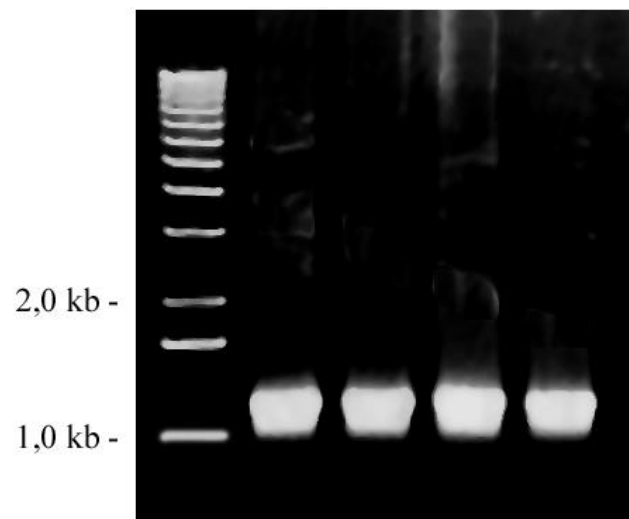


Abb. 4.3: Agarosegelfoto des PCR-Amplikons der „Promotor-Sonde“ aus *M. bovis* BCG

Für diese PCR wurden die Taq-Polymerase der Firma Sigma sowie die Primer SR1 und SR2 (Fa.

MWG Biotech AG) verwendet. Es wurde eine „Annealing“-Temperatur von 50 °C und eine „Extension“-Temperatur von 72 °C gewählt. Die Verlängerungszeit betrug bei 35 Zyklen zwei Minuten pro Zyklus. Die Primer umfassen einen 1165 Basenpaare großen DNA-Strang (s. Abbildung 4.3), der den gesamten Promotorbereich der anaeroben Nitratreduktase sowie noch 226 Basen der *narG*-Untereinheit abdeckt. Die Abbildung 4.4 zeigt schematisch die Bindungsstelle der „Promotor“-Sonde an dem *narGHJI*-Operon.

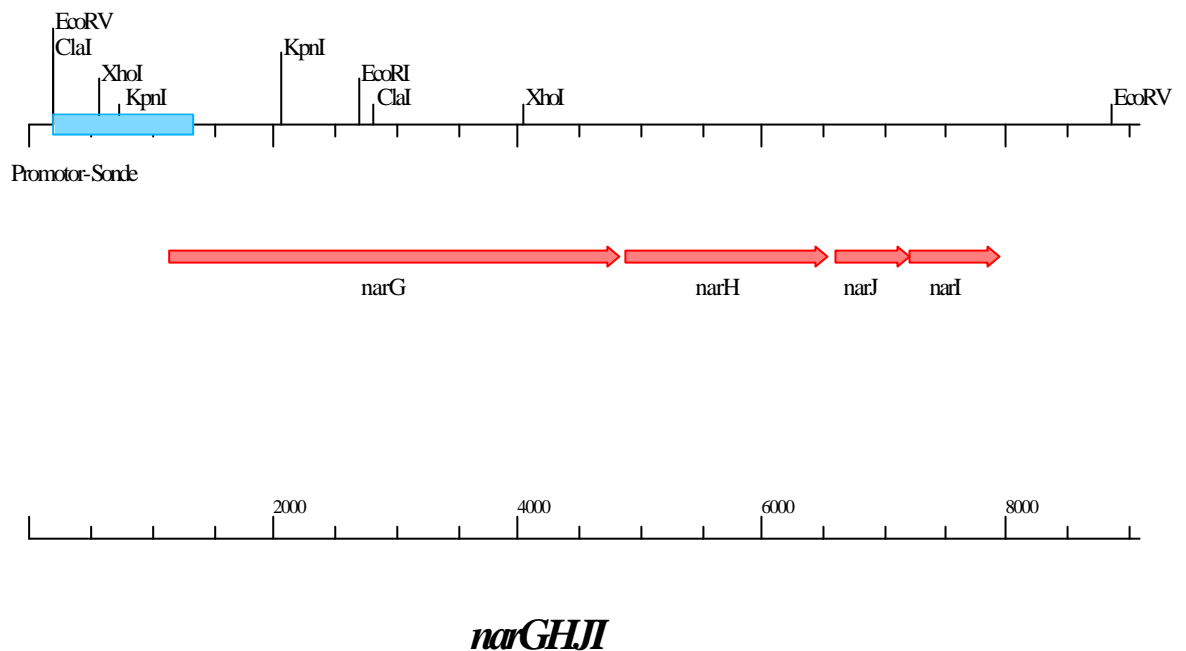


Abb. 4.4: Bindungsstelle der „Promotor-Sonde“ im *EcoRV*-Fragment der anaeroben Nitratreduktase aus *M. bovis* BCG

Die Sonde wurde zur weiteren Anwendung bei einem Hybridisierungsverfahren mit dem DIG DNA Labeling and Detection Kit der Fa. Boehringer Mannheim, einem nicht radioaktiven Verfahren, markiert. Durch den Entwicklungsschritt nach einer Hybridisierung wird emittiertes Licht dadurch auf einem Röntgenfilm als Schwärzung sichtbar (s. Kapitel 3.2.19).

Ein optimales Verhältnis von Hybridisierungslösung und „Promotor-Sonde“ und somit ein möglichst gutes Ergebnis einer Hybridisierung sollte durch eine Quantifizierung der „Promotor-Sonde“ erzielt

werden. Dazu wurden Verdünnungsreihen der Sonden-DNA und einer im Markierungskit der Fa. Boehringer Mannheim enthaltenen Kontroll-DNA hergestellt und auf eine Nylonmembran aufgetragen, die analog dem Entwicklungsprotokoll einer Koloniehybridisierung entwickelt wurde. Näheres zum Verfahren ist dem Kapitel 3.2.18 (Quantifizierung einer Hybridisierungssonde) zu entnehmen. Aufgrund der gleich starken Lichtsignale von Sonden-DNA und Kontroll-DNA wurden pro 10 ml Hybridisierungslösung 10 µl Sonden-DNA eingesetzt. Die Abbildung 4.5 zeigt den Röntgenfilm dieser Quantifizierung.

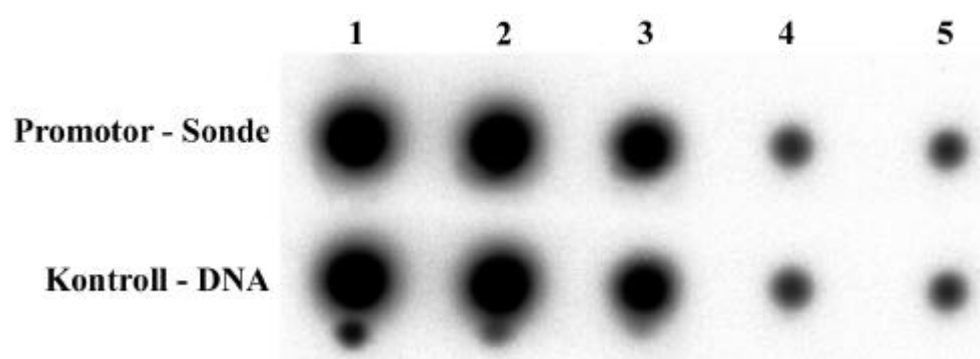


Abb. 4.5: Röntgenfilm über die Quantifizierung der „Promotor-Sonde“

#### Isolierung eines das *narGHJI*-Operon tragenden Cosmids aus *M. bovis* BCG

Zur Isolierung des *narGHJI*-Operons wurde eine Koloniehybridisierung durchgeführt. Da das gesamte Genom von *M. bovis* BCG eine Größe von  $4,4 \times 10^6$  bp hat und ein Cosmid der Cosmid-Bibliothek ca.  $4 \times 10^4$  bp aufweist, besteht jedes Cosmid aus ca. 1/115 des gesamten Genoms. Somit enthält theoretisch eine Kolonie aus 115 die gewünschten Gene *narGHJI*. Praktisch liegt dieser Anteil bei 1:100 bis 1:300. Bei der Koloniehybridisierung konnten aus 4000 Kolonien 38 Kolonien gefunden werden, die auf dem Röntgenfilm ein Signal ergaben. Das entspricht einer Frequenz von 1:105. Die Abbildung 4.6 zeigt exemplarisch drei Nylonmembranen mit ein Signal gebenden Kolonien.

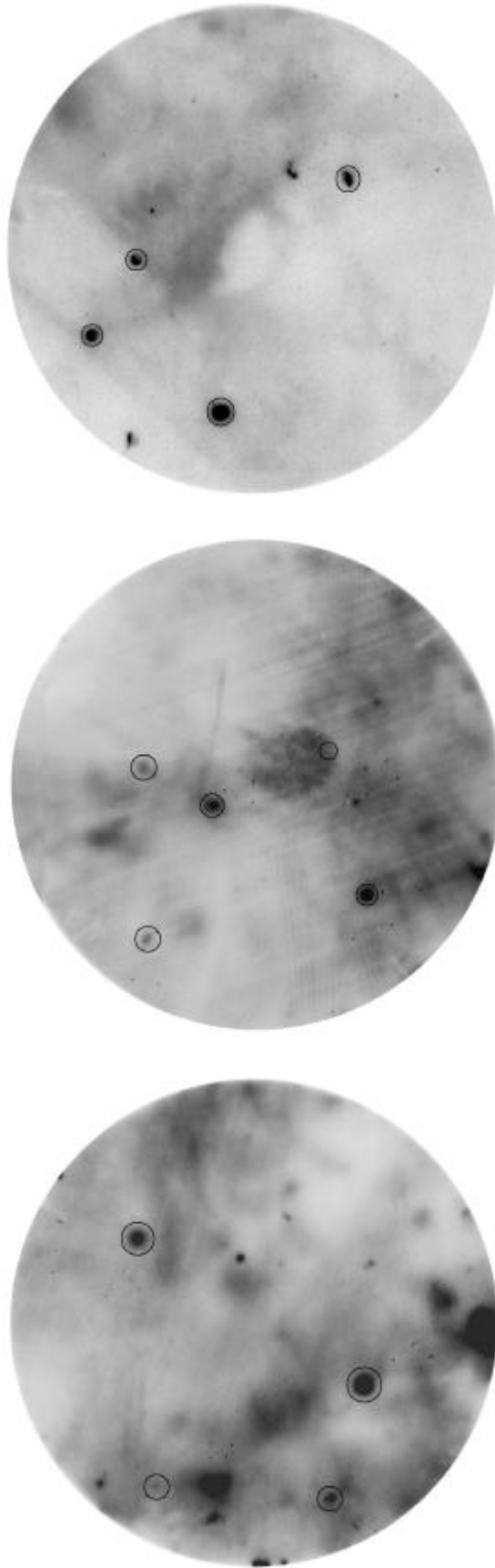


Abb. 4.6: Beispiele für ein Signal gebende Kolonien nach der Koloniehybridisierung

Die 38 positiven Klone wurden isoliert, die Cosmid-DNA präpariert und nach Restriktionsspaltung mit der Restriktionsendonuclease *EcoRV* durch eine Southernblot-Analyse unter Verwendung der an die Promotorregion bindenden BCG-Sonde untersucht. Sechs Cosmide zeigten ein Signal auf dem Röntgenfilm. Nach weiteren Restriktionsspaltungen dieser sechs Cosmide mit den Restriktionsendonucleasen *EcoRV*, *XhoI*, *KpnI*, *EcoRI* und *NotI* mit einer anschließenden Southernblot-Analyse sollte sich ein Bandenmuster ergeben, das dem der Positivkontrollen (*M. tuberculosis* und *M. bovis* BCG) entspricht :

<i>EcoRV</i>	<i>XhoI</i>	<i>KpnI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>NotI</i>
8652	3466 5680	1319 3366	6699	1764

Tabelle 4.1: Bandengrößen der Cosmid-Fragmente an die die „Promotor-Sonde“ bindet

Die Abbildungen 4.7 und 4.8 zeigen die Röntgenfilme der Southernblot-Analyse.

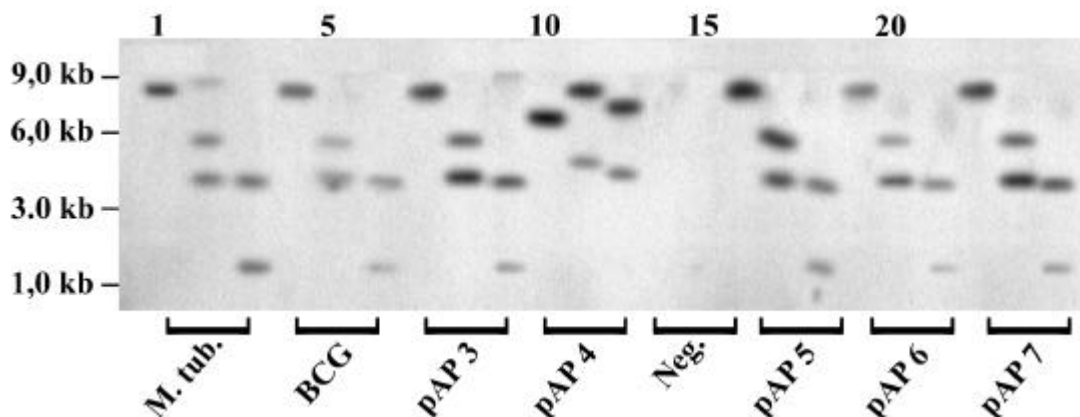


Abb. 4.7: Southernblotanalyse der Cosmide pAP3 bis pAP7; die Zahlen am oberen Rand der Abbildung nummerieren die Laufspuren des Agarosegels. Geschnitten wurde mit *EcoRV* (Spuren 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 und 22), *XhoI* (Spuren 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20 und 23) und *KpnI* (Spuren 3, 6, 9, 12, 15, 21 und 24).

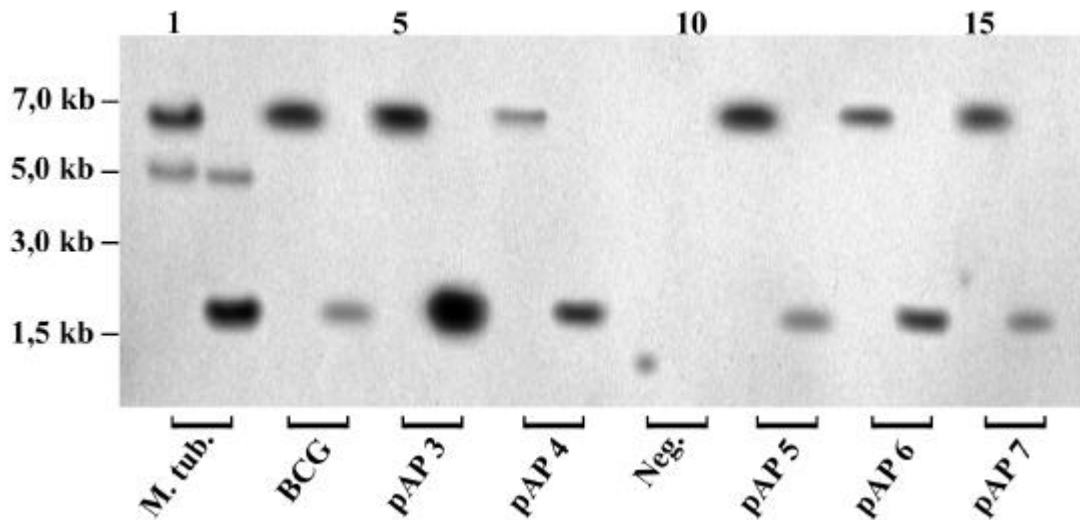


Abb. 4.8: Southernblotanalyse der Cosmide pAP3 bis pAP7;

Geschnitten wurde mit *EcoRI* (Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 und 15) und *NotI* (Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 16).

Vier der sechs Cosmide zeigten Signale auf den Röntgenfilmen, die denen der Kontrollen (*Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium bovis* BCG) entsprachen. Alle Cosmide, die Signale auf den Röntgenfilmen gaben, wurden im weiteren Verlauf als pAP3 bis pAP7 bezeichnet. Durch die Spaltung von *M. tuberculosis* mit den Restriktionsendonucleasen *XhoI*, *EcoRI* und *NotI* entstand auf den Röntgenfilmen jeweils eine Bande mehr als bei BCG. Ob es sich um Artefakte oder um tatsächliche Unterschiede handelt, ist nicht bekannt. Da die getesteten Klone aber mit BCG übereinstimmen, sind diese Unterschiede für die Isolierung der anaeroben Nitratreduktase aus BCG nicht relevant.

#### 4.3 Nitritbildung des Cosmids pAP7 in *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155

Wir entschieden uns, das Operon der anaeroben Nitratreduktase aus dem Cosmid pAP7 zu isolieren. Bevor dieses Cosmid subkloniert wurde, sollte geklärt werden, ob es tatsächlich eine

anaerobe Nitratreduktase exprimiert. Dazu wurden die Cosmide mit den *narGHJI*-Genclustern von *M. bovis* BCG bzw. von *M. tuberculosis* in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 transformiert (pAP7 bzw. pIW10, beide integrieren in Mykobakterien). Dieser apathogene Stamm eignet sich besonders zur Untersuchung der Nitratreduktaseaktivität, weil er selbst keine Nitratreduktase exprimiert (WEBER 1999). In Abbildung 4.9 ist die Aktivität der anaeroben Nitratreduktase von *M. bovis* BCG aufgeführt, die Abbildung 4.10 zeigt einen Vergleich mit der Nitratreduktaseaktivität von *M. tuberculosis*. Die rekombinanten Klone wurden unter anaeroben Bedingungen in MB-Medium mit Glucose als Kohlenstoffquelle und Nitrat bei 37 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 1, 3, 4, 6, 7, 10 und 12 Tage) wurde die Menge an gebildetem Nitrit bestimmt. Der Test wurde nach 10 bzw. 12 Tagen beendet. Die anaerobe Nitratreduktaseaktivität von *M. tuberculosis* liegt um ein Vielfaches höher als die von *M. bovis* BCG. Zu beachten ist, dass die Skalierungen der beiden Abbildungen um den Faktor 100 differieren.

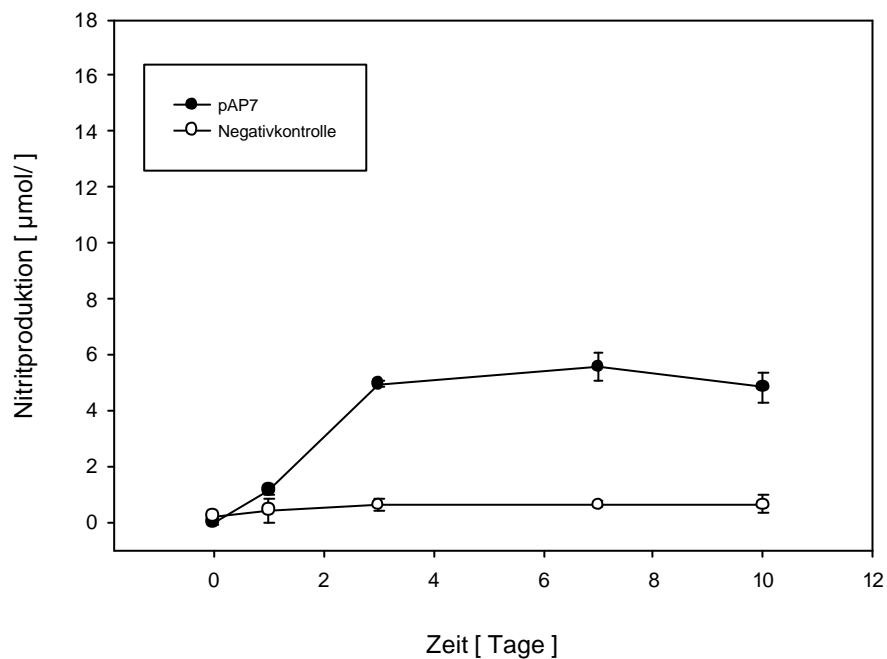


Abb. 4.9: Nitritproduktion des Cosmids pAP7 (*narGHJI*<sub>BCG</sub>) mit der anaeroben Nitratreduktase aus *M. bovis* BCG in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 unter anaeroben Bedingungen

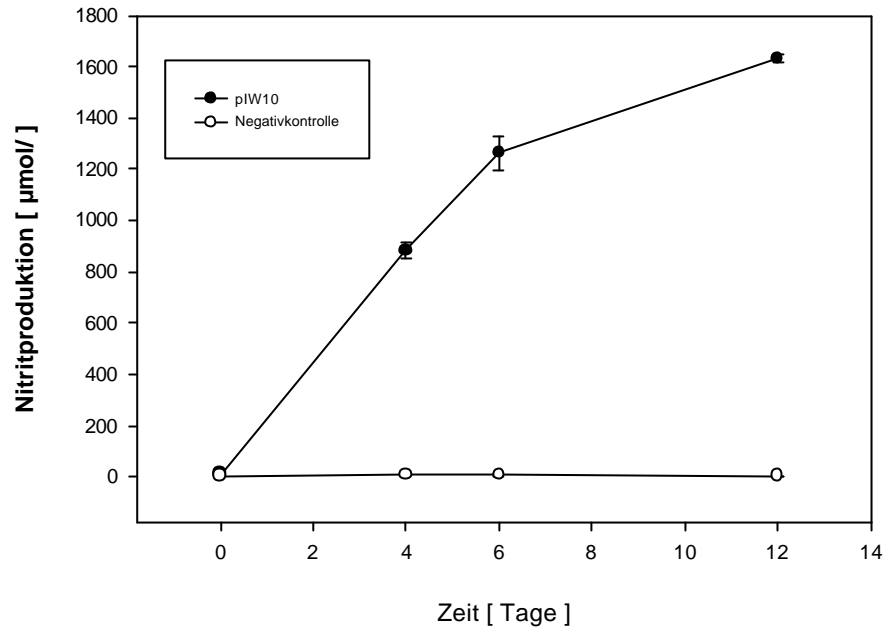


Abb. 4.10: Nitritproduktion des Cosmids pIW10 (*narGHJI*<sub>M.tb.</sub>) mit der anaeroben Nitratreduktase aus *M. tuberculosis* in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 unter anaeroben Bedingungen

Somit war gezeigt, daß das Cosmid pAP7 in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 eine anaerobe Nitratreduktase exprimiert.

#### 4.4 Erstellung des Plasmids pAP8 mit der anaeroben Nitratreduktase aus *M. bovis* BCG

Für einen direkten Vergleich mit *narGHJI* aus *M. tuberculosis* war es notwendig, das Operon der anaeroben Nitratreduktase aus BCG in einen Vektor zu klonieren, so daß keine weiteren DNA-Abschnitte vor oder hinter dem Operon den Phänotyp (die Nitritproduktion) beeinflussen können. Aus dem Cosmid pAP7 wurde die anaerobe Nitratreduktase durch eine Restriktionsspaltung mit der Restriktionsendonuclease *EcoRV* isoliert. Daraufhin wurde das Gencluster in ein in Mykobakterien

integrierendes Plasmid (pMV.306.Kanamycin) kloniert, dieses in den *E. coli*-Stamm HB101 transformiert und durch eine Plasmidpräparation mit anschließender Restriktionsspaltung mit den Enzymen *EcoRV*, *EcoRI* und *KpnI* überprüft. Als Kontrolle wurden ein Plasmid mit der anaeroben Nitratreduktase aus *M. tuberculosis* (pCF3) sowie die Cosmide pAP7 und pIW10 (enthält *narGHJI* aus *M. tuberculosis*) gespalten. Die Banden der neu entstandenen Plasmide sowie die der Kontrolle pCF3 sind in Tabelle 4.2 aufgelistet. Die Bandengrößen nach den Restriktionsspaltungen mit den Enzymen *EcoRI* und *KpnI* stimmen nicht mit den Banden des Plasmids pCF3 überein. Dies ist dadurch zu erklären, dass die anaerobe Nitratreduktase in pCF3 in entgegengesetzter Richtung kloniert wurde. Nachdem sichergestellt war, dass das Plasmid das *narGHJI*-Gencluster enthält, wurde es als pAP8 bezeichnet. Das Konstrukt pAP10 enthält die anaerobe Nitratreduktase aus BCG in der gleichen Ausrichtung wie pCF3.

Plasmid	<i>narGHJI</i> aus	Ursprungsvektor	<i>EcoRV</i>	<i>EcoRI</i>	<i>KpnI</i>
pCF3	<i>M. tuberculosis</i>	pMV.306.kan integrativ	8652 3995	8891 2527 1229	6804 4524 1319
pAP8	<i>M. bovis</i> BCG	pMV.306.kan integrativ	8652 3995	6478 4940 1229	10757 1319 571
pAP10	<i>M. bovis</i> BCG	pMV.306.kan integrativ	8652 3995	8891 2527 1229	6804 4524 1319

Tab 4.2: Erwartete Bandengrößen von pAP8, pAP10 und pCF3

In Abbildung 4.11 ist das zugehörige Agarosegelfoto gezeigt.

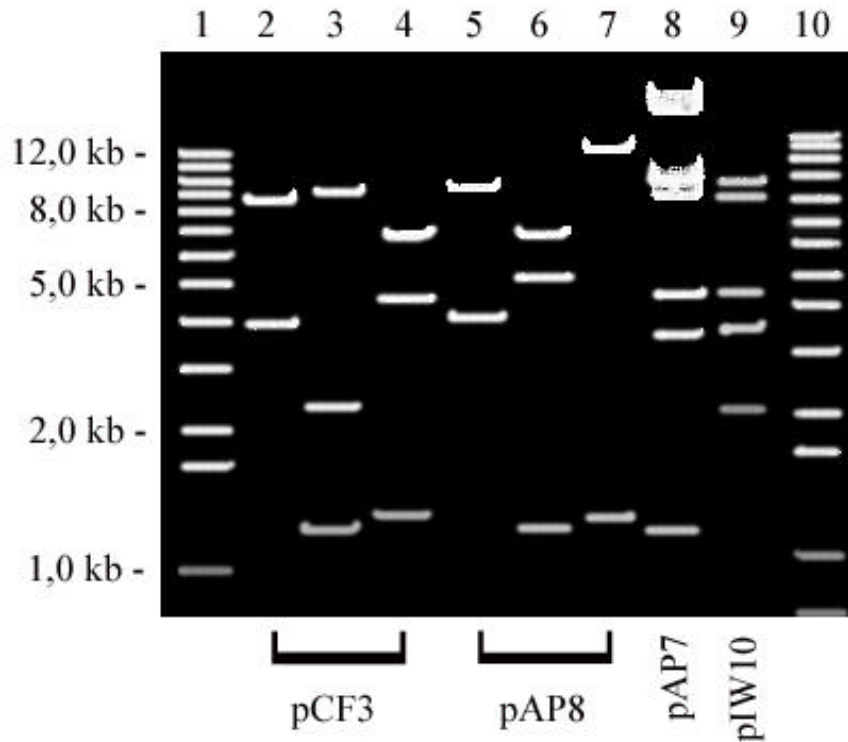


Abb. 4.11: Agarosegel zur Überprüfung des Plasmids pAP8; die Spuren 2 und 5 zeigen einen *EcoRV*-Verdau, die Spuren 3 und 6 einen *EcoRI*-Verdau und die Spuren 4 und 7 einen *KpnI*-Verdau; in Spur 7 fehlt die 571 bp große Bande, da dieses DNA-Fragment über den Rand des Agarosegels hinausgelaufen ist; in Spur 8 ist das Cosmid pAP7, in Spur 9 das Cosmid pIW10 mit *EcoRV* geschnitten.

Mit Abbildung 4.12 ist ein Schema des Plasmids pAP8 sowie das des Plasmids pAP10, welches die anaerobe Nitratreduktase aus BCG in entgegengesetzter Richtung beinhaltet, gezeigt. Die Schnittstellen der verschiedenen Restriktionsendonucleasen sind aufgeführt.

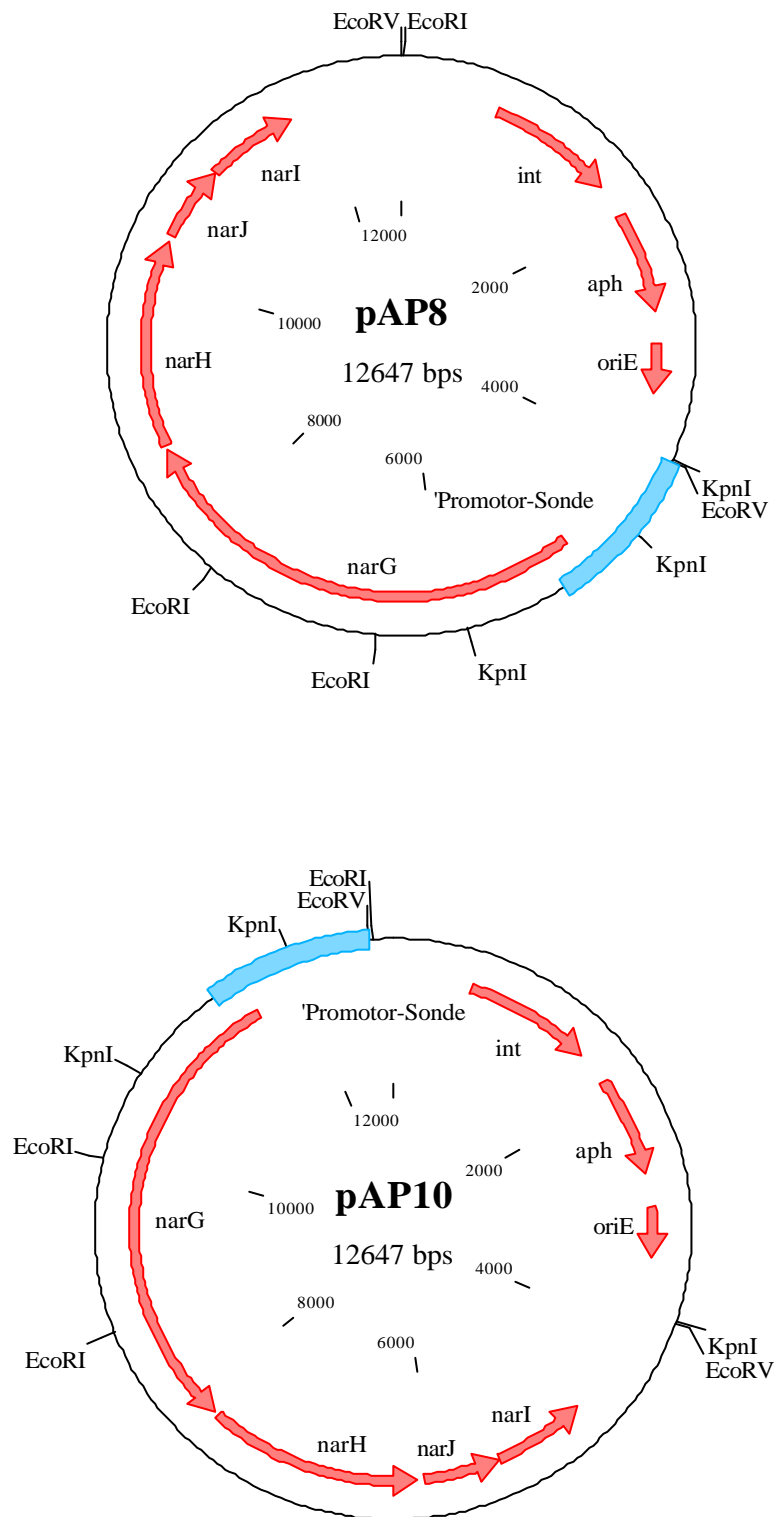


Abb. 4.12: Schemata der Plasmide pAP8 und pAP10; beide Plasmide enthalten die anaerobe Nitratreduktase aus *M. bovis* BCG.

#### 4.5 Nitratreduktaseaktivität von pAP8 in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155

Die Aktivität der isolierten anaeroben Nitratreduktase sollte analysiert werden. Dazu wurde das Plasmid pAP8 (enthält die anaerobe Nitratreduktase aus *M. bovis* BCG) in den apathogenen Stamm *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 transformiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation in Minimalmedium und Nitrat bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen. In regelmäßigen Abständen wurde die Nitritbildung untersucht. In den Abbildungen 4.13 und 4.14 ist die Aktivität des Plasmids im Vergleich mit einem Plasmid, das die anaerobe Nitratreduktase aus *M. tuberculosis* (pCF3) trägt, zu sehen. Beide Plasmide bestehen aus dem gleichen Vektor in den die jeweilige Nitratreduktase kloniert wurde. Im Vergleich mit pCF3 exprimiert pAP8 in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 eine deutlich geringere anaerobe Nitratreduktase. Um die Nitratreduktaseaktivität des Plasmids pAP8 zu verdeutlichen, wurde für die Abbildung 4.14 die Kontrolle pCF3 entfernt und die Skalierung angepasst. Es handelt sich um denselben Versuch. Im Vergleich mit der Negativkontrolle (Vektor ohne die anaerobe Nitratreduktase) ist nun deutlich zu erkennen, daß das *narGHJI*-Operon aus BCG eine Nitratreduktaseaktivität unter anaeroben Bedingungen vermittelt.

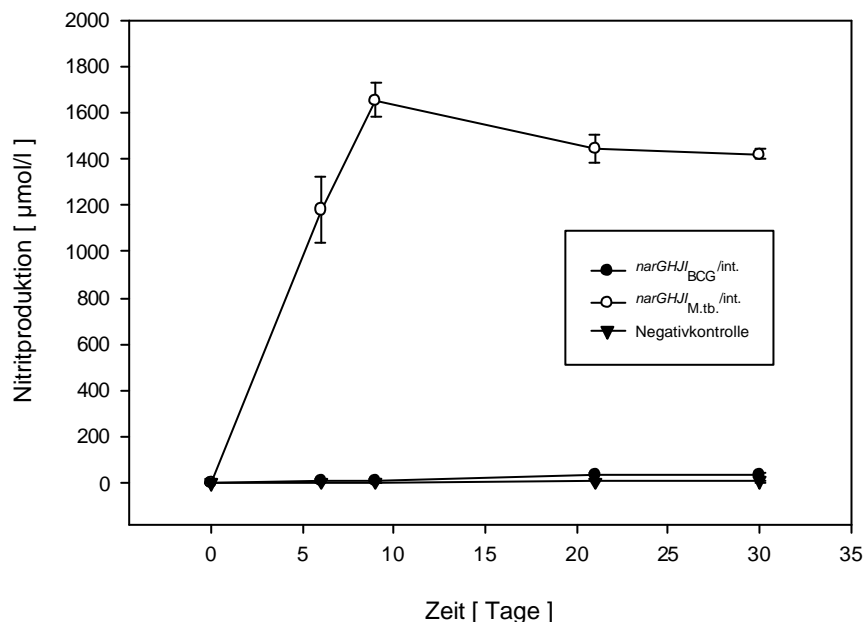


Abb. 4.13: Nitritproduktion von pAP8 (*narGHJI*<sub>BCG</sub>) und pCF3 (*narGHJI*<sub>M.tb.</sub>) in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 unter anaeroben Bedingungen. Die Bakterien wurden in MB- Medium mit Glucose und Nitrat bei 37 °C inkubiert.

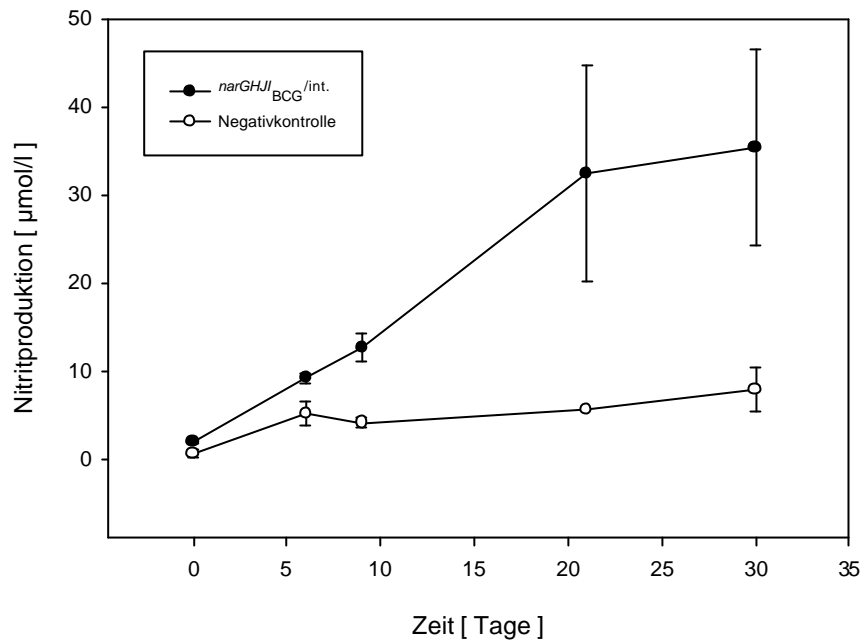


Abb. 4.14: Nitritproduktion von pAP8 (*narGHJI*<sub>BCG</sub>) in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 im Vergleich zu einer Negativkontrolle. Es gelten die selben Versuchsbedingungen wie in Abb. 4.13.

#### 4.6 Subklonierung der anaeroben Nitratreduktase aus *M. bovis* BCG in einen replikativen Vektor

Das Plasmid pAP8 exprimiert die anaerobe Nitratreduktase in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 deutlich schwächer als pCF3. Es wird durch pAP8 weniger Nitrat zu Nitrit reduziert. Durch die Klonierung des *narGHJI*-Operons aus BCG in einen replikativen Shuttle-Vektor sollte eine stärkere Expression erreicht werden. Die Vorteile eines replikativen Vektors liegen darin, dass er nicht in das Genom einer Bakterienzelle integriert, sondern frei im Zytoplasma vorliegt. Er teilt sich unabhängig vom Genom der Zelle, so dass mehrere Kopien pro Zelle vorliegen („multi-copy plasmid“). Die anaerobe Nitratreduktase aus *M. bovis* BCG wurde in das replikative Plasmid pMV.206 (Hygromycin) kloniert. Dazu wurde das *narGHJI*-Operon mit der Restriktionsendonuclease *EcoRV* aus pAP8 ausgeschnitten und mit dem linearisierten Vektor pMV.206 ligiert. Zur Überprüfung des Klonierungsergebnisses wurden drei Kolonien, die nach einer Restriktionsspaltung mit *EcoRV* die

gewünschten Banden hervorbrachten, mit den Restriktionsenzymen *FseI* und *KpnI* überprüft. Die Tabelle 4.3 zeigt die erwarteten Bandengrößen der Kolonien sowie deren anschließende Bezeichnung. In Kolonie 1 wurde das *narGHJI*-Gencluster im Uhrzeigersinn, in den Kolonien 2 und 3 gegen den Uhrzeigersinn kloniert.

Plasmid	<i>narGHJI</i> aus	Ursprungsvektor	<i>FseI</i>	<i>KpnI</i>	entspr. Banden zeigt
pAP11	<i>M. bovis</i> BCG	pMV.206.hyg replikativ	8306 4526	10942 1319 571	Kolonie 1
pAP12	<i>M. bovis</i> BCG	pMV.206.hyg replikativ	11468 1364	6804 4709 1319	Kolonie 2 Kolonie 3

Tab. 4.3: Bandengrößen der Kolonien 1-3

Die Abbildung 4.15 zeigt das Agarosegel. Die Kolonie 1 wird im Folgenden als pAP11, die Kolonie 3 als pAP12 bezeichnet.

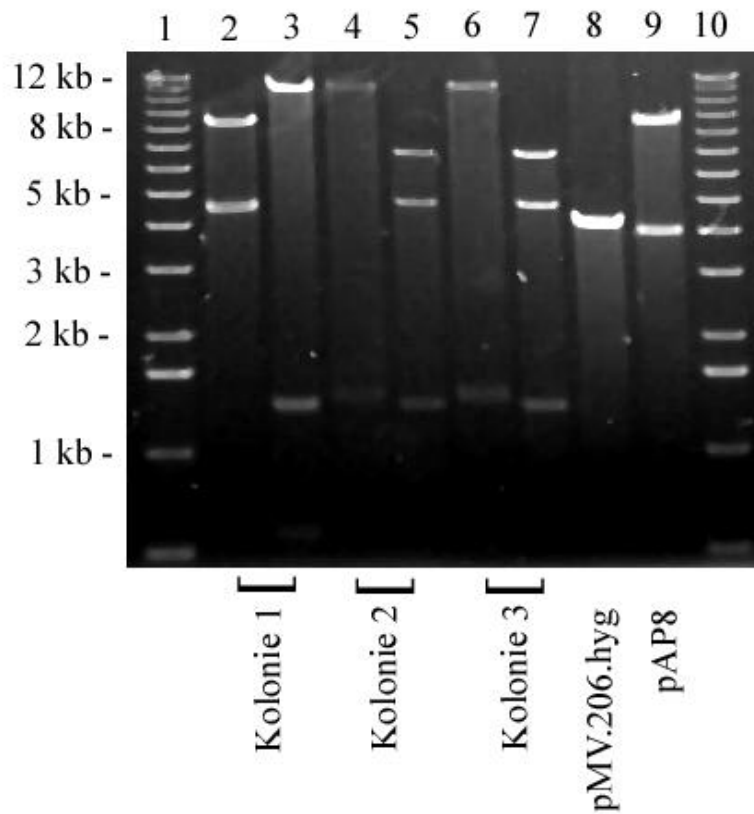


Abb. 4.15: Analytischer Restriktionsverdau der Kolonien 1, 2 und 3; die Spuren 2, 4 und 6 zeigen das *FseI*-Bandenmuster, die Spuren 3, 5 und 7 das *KpnI*-Bandenmuster; in Spur 8 ist der Shuttle-Vektor, in Spur 9 ist pAP8 mit *EcoRV* geschnitten.

Die Schemata der Plasmide, die die anaerobe Nitratreduktase aus *M. bovis* BCG beinhalten, sind in Abbildung 4.16 aufgeführt. Es sind beide Ausrichtungen des *narGHJI*-Operons in dem replikativen Plasmid pMV.206 vertreten (pAP11 bzw. pAP12).

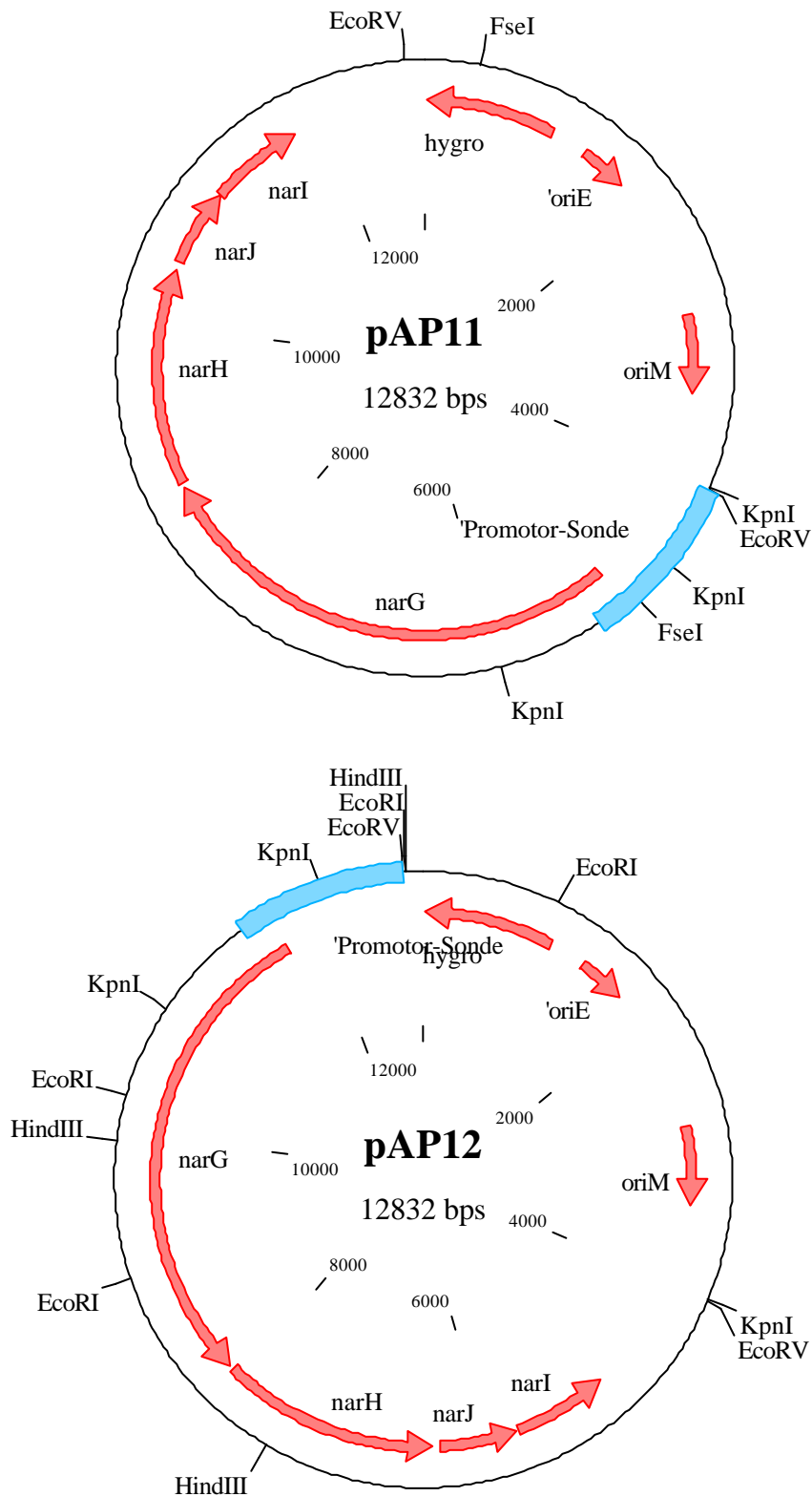


Abb. 4.16: Schemata der Konstrukte pAP11 und pAP12. Sie enthalten die anaerobe Nitratreduktase aus BCG im replikativen Vektor pMV.206.hyg

#### 4.7 Nitritbildung der anaeroben Nitratreduktase aus *M. bovis* BCG in einem replikativen Plasmid

Die Plasmide pAP11 und pAP12 wurden in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 transformiert. Bei ständiger Bebrütung der Bakterien unter anaeroben Bedingungen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die gebildete Menge Nitrit gemessen. Als Vergleich wurden das Plasmid pAP8 (Nitratreduktase aus BCG im integrativen Plasmid), das Plasmid pCF3 (Nitratreduktase aus *M. tuberculosis*) und eine Negativkontrolle (replikatives Plasmid ohne Nitratreduktase) mit gemessen. In Abbildung 4.13 wurde gezeigt, daß die anaerobe Nitratreduktase aus *M. bovis* BCG in dem integrativen Plasmid (pAP8) im Vergleich zu der Nitratreduktase aus *M. tuberculosis* im integrativen Plasmid (pCF3) nur eine geringe Nitritbildung erkennen lässt (s.a. Kapitel 4.5).

Das *narGHJI*-Gencluster aus BCG in dem replikativen Plasmid (sowohl pAP11 als auch pAP12) exprimiert hingegen eine ebenso starke Nitratreduktaseaktivität wie das Gencluster aus *M. tuberculosis* im integrativen Plasmid (s. Abb. 4.17).

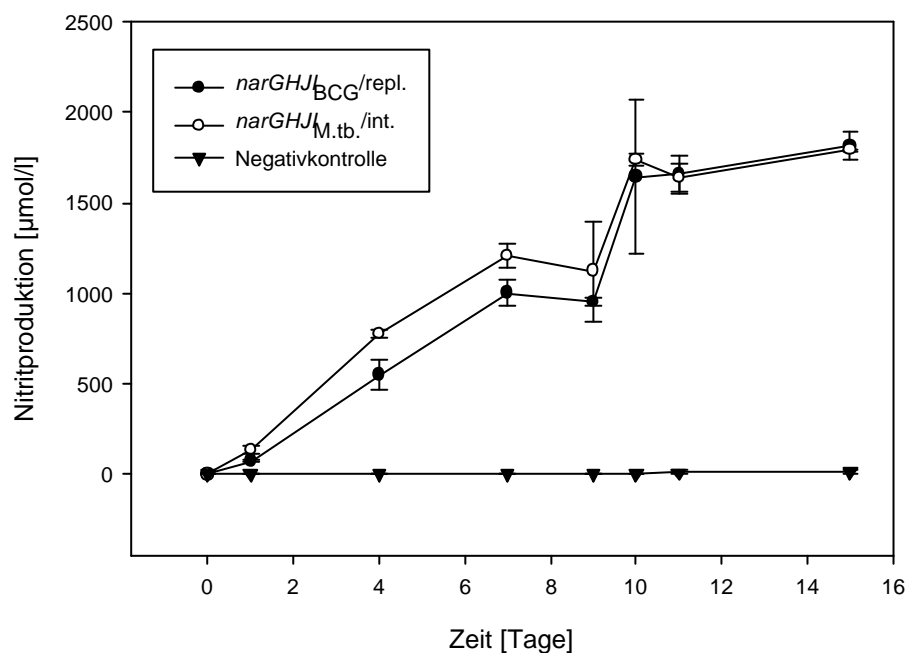


Abb. 4.17: Nitritproduktion von pAP12 (*narGHJI*<sub>BCG</sub> im replikativen Plasmid) im

Vergleich mit pCF3 (*narGHJI*<sub>M.tb.</sub>) im integrativen Plasmid

#### 4.8 Subklonierung der anaeroben Nitratreduktase aus *M. tuberculosis* in ein replikatives Plasmid

Die unterschiedlich starke Expressierung der anaeroben Nitratreduktase in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 zwischen dem integrativen und dem replikativen Plasmid mit dem *narGHJI*-Operon aus *M. bovis* BCG veranlasste uns zu der Überlegung, ob der gleiche Effekt auch bei *M. tuberculosis* auftreten würde. Deshalb sollte das *narGHJI*-Operon aus *M. tuberculosis* in ein replikatives Plasmid kloniert werden. Es wäre zu erwarten, dass ein solches Konstrukt die Expression der anaeroben Nitratreduktase ähnlich verstärkt wie dies bei dem *narGHJI*-Operon aus BCG der Fall ist.

Aus dem Plasmid pCF3 wurde mittels eines Restriktionsverdau mit dem Enzym *EcoRV* das *narGHJI*-Operon aus *M. tuberculosis* ausgeschnitten und in das gleiche replikative Plasmid (pMV.206.Hygromycin) wie das *narGHJI*-Operon aus *M. bovis* BCG kloniert. Es sind beide Ausrichtungen der anaeroben Nitratreduktase entstanden. Durch eine Restriktionsspaltung mit *EcoRV* und *HindIII* ergeben sich die in Tabelle 4.4 aufgeführten Bandengrößen.

Plasmid	<i>narGHJI</i> aus	Ursprungsvektor	<i>EcoRV</i>	<i>HindIII</i>
pAP17	<i>M. tuberculosis</i>	pMV.206.hyg replikativ	8652 4180	7614 2843 2375
pAP18	<i>M. tuberculosis</i>	pMV.206.hyg replikativ	8652 4180	6965 3492 2375

Tab. 4.4: Erwartete Bandengrößen der Plasmide pAP17 und pAP18

Die Abbildung 4.18 zeigt das Ergebnis der Restriktionsspaltung. Es ist je eine Kolonie mit und entgegen den Uhrzeigersinn gespalten worden. Als Kontrollen sind der Ursprungsvektor sowie das Plasmid pCF3 (*narGHJI* aus *M. tuberculosis* im integrativen Vektor) und das Plasmid pAP10 (*narGHJI* aus *M. bovis* BCG im integrativen Vektor) mit den gleichen Enzymen gespalten worden.

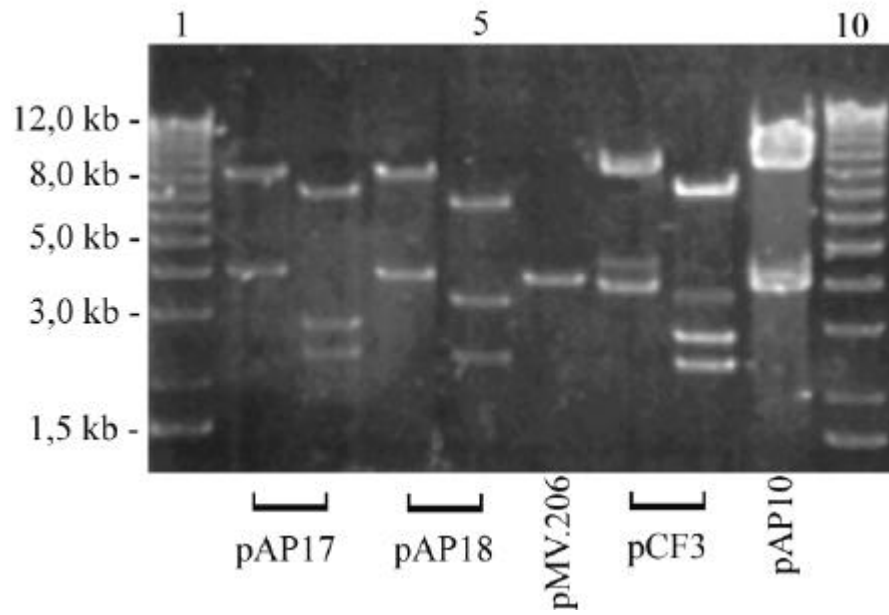


Abb. 4.18: Restriktionsspaltung der Plasmide pAP17 und pAP18. Die Spuren 2, 4, 6, 7 und 9 zeigen einen Verdau mit *EcoRV*, die Spuren 3, 5 und 8 einen Verdau mit *HindIII*. Zusätzliche Banden sind Folgen einer unvollständigen Enzymsspaltung.

Wiederum sind zwei Plasmide mit jeweils entgegengesetzter Ausrichtung der anaeroben Nitratreduktase entstanden (pAP17 bzw. pAP18). Folgende Schemata verdeutlichen die Schnittstellen der verwendeten Enzyme :

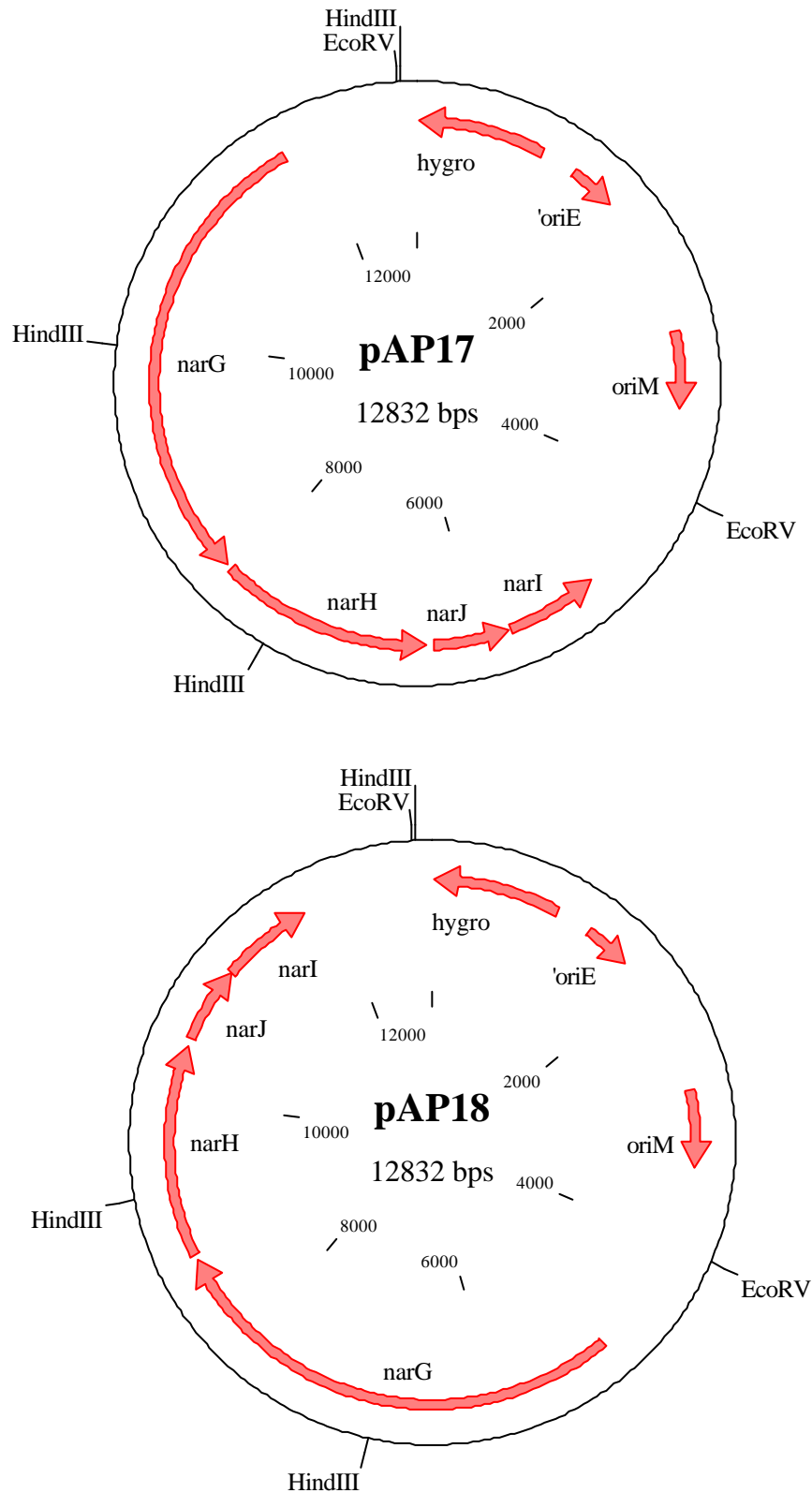


Abb. 4.19: Schemata der Plasmide pAP17 und pAP18. Die relevanten Schnittstellen sind eingezeichnet.

#### 4.9 Nitritbildung der anaeroben Nitratreduktase aus *M. tuberculosis* in einem replikativen Plasmid

Die Plasmide pAP17 und pAP18 wurden in den Stamm mc<sup>2</sup> 155 von *M. smegmatis* transformiert. Unter anaeroben Bedingungen wurde die Nitritbildung der Bakterien gemessen (Abb. 4.22) und ein Vergleich mit den anaeroben Nitratreduktasen aus *M. tuberculosis* im integrativen Plasmid (Abb. 4.21) und aus *M. bovis* BCG im replikativen Plasmid angeführt (Abb. 4.20). Es wird gezeigt, daß die anaerobe Nitratreduktase aus *M. tuberculosis* in dem replikativen Plasmid stärker exprimiert wird als in dem integrativen Plasmid. Dies wird durch den steileren Anstieg der Kurve deutlich. Innerhalb eines kürzeren Zeitraums wird die gleiche Menge Nitrit gebildet. Bereits zwei Tage nach der Inokulation erreicht *narGHJI* im replikativen Plasmid die Menge an Nitrit, die *narGHJI* im integrativen Plasmid erst nach 10 Tagen erzielt. Weiterhin wird deutlich, daß die anaerobe Nitratreduktase aus *M. tuberculosis* sowohl im integrativen als auch im replikativen Plasmid mehr Nitrit bildet als die anaerobe Nitratreduktase aus *M. bovis* BCG in den entsprechenden Plasmiden.

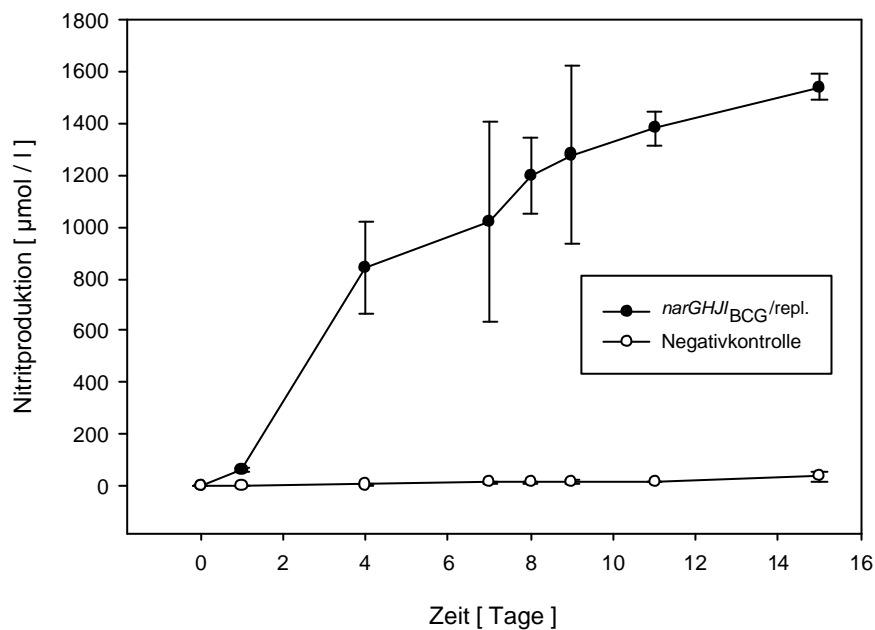


Abb. 4.20: Zur Erinnerung ist noch einmal die Nitritproduktion von pAP12 (*narGHJI*<sub>BCG</sub> im replikativen Plasmid) gezeigt. Als Vergleich ist eine Negativkontrolle aufgeführt.

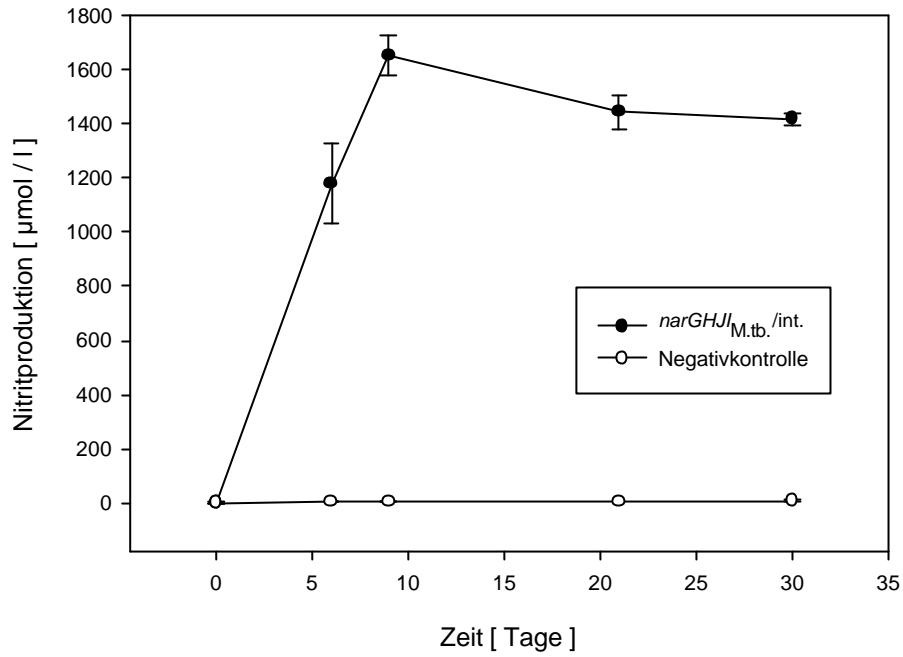


Abb. 4.21: Nitritproduktion von pCF3 ( $narGHJI_{M.tb.}$  im integrativen Plasmid). Als Vergleich ist eine Negativkontrolle aufgeführt.

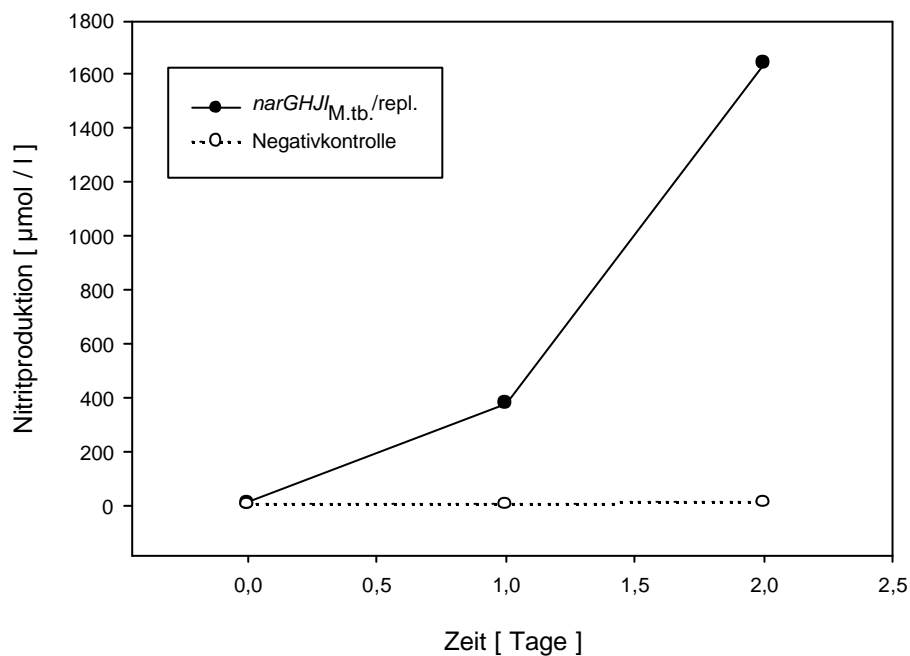


Abb. 4.22: Nitritbildung von pAPI8 ( $narGHJI_{M.tb.}$  im replikativen Plasmid). Als Vergleich ist eine Negativkontrolle aufgeführt.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass

- *narGHJI* aus BCG in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 eine Nitratreduktase exprimiert.
- in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 die Nitratreduktaseaktivität von *narGHJI* aus *M. tuberculosis* stärker ist als die Nitratreduktaseaktivität von *narGHJI* aus BCG.
- *narGHJI* sowohl aus BCG wie auch aus *M. tuberculosis* im replikativen Vektor stärker exprimiert wird als im integrativen Vektor.

Zur Veranschaulichung der bisherigen Ergebnisse sind die Nitritproduktionen der einzelnen Konstrukte in einem Graphen zusammengefasst (Abb. 4.23).

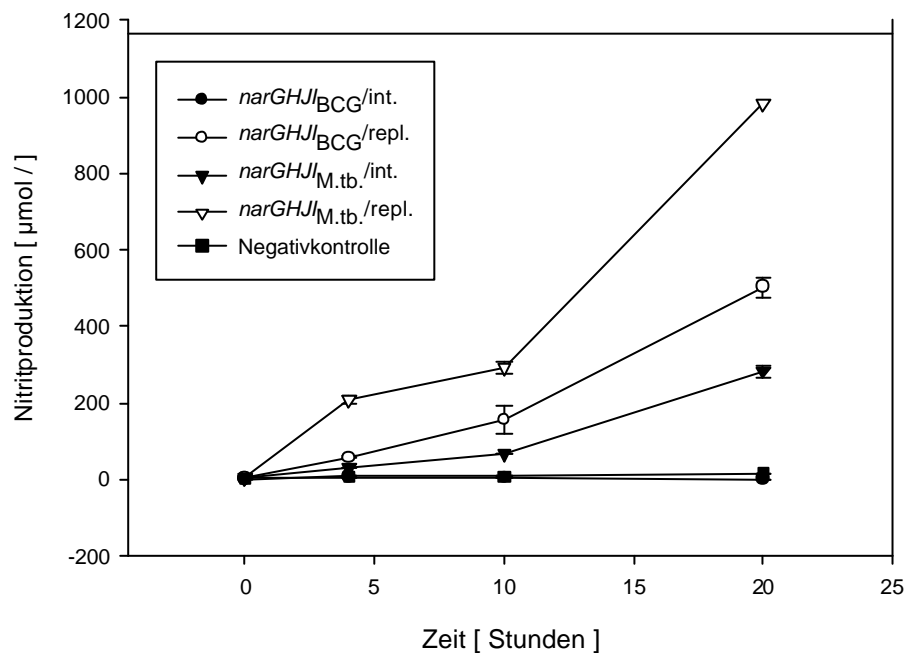


Abb. 4.23: Nitritproduktion der anaeroben Nitratreduktasen aus BCG und *M. tuberculosis* im integrativen und im replikativen Vektor. Es wurde bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen inkubiert.

#### 4.10 Komplementation der Nitratreduktaseaktivität in einer Nitratreduktasemutante von BCG

Bei den für Menschen und für Tiere pathogenen Mykobakterienspezies handelt es sich um langsamwachsende Mykobakterien. Die Beurteilung von Mutanten des Nitratstoffwechsels von *M. tuberculosis* und *M. bovis* BCG sollte daher in einer langsamwachsenden Stoffwechselmutante vorgenommen werden. Unser Labor verfügt über eine *narG*-Deletionsmutante von BCG (genannt IW1, WEBER 1999). Mit dieser Deletionsmutante sollte herausgefunden werden, wie die isolierten *narGHJI*-Gencluster in langsamwachsenden Mykobakterien exprimiert werden. IW1 besitzt ein Operon für eine Hygromycinresistenz (WEBER 1999). Da die replikativen Vektoren mit den Nitratreduktasen aus BCG und *M. tuberculosis* (pAP11 / pAP12 bzw. pAP17 / pAP18) ebenfalls eine Hygromycinresistenz aufweisen, ist die Deletionsmutante IW1 zur Untersuchung der Nitratreduktaseaktivität dieser Konstrukte nicht geeignet. Stattdessen wurde zur Nitritbestimmung dieser Konstrukte eine weitere in unserem Labor erstellte Deletionsmutante von BCG, namentlich SR106, verwendet (unveröffentlichte Ergebnisse). SR106 besitzt eine nicht markierte 700 bp große Deletion im *narG*-Gen. Da diese Mutante über keine Antibiotikumresistenz verfügt, eignet sie sich besonders für die Transformation von Plasmiden zu Komplementationsuntersuchungen. Somit wurden die *narGHJI*-Operons in den integrativen Plasmiden (Kanamycinresistenz) in die Mutante IW1 und die Operons in den replikativen Plasmiden (Hygromycinresistenz) in die Mutante SR106 transformiert.

Zunächst zeigt die Abbildung 4.24 die Ergebnisse der integrativen Konstrukte. Für diesen Versuch wurden die Plasmide pAP8 (*narGHJI* aus *M. bovis* BCG) und pCF3 (*narGHJI* aus *M. tuberculosis*) in die  $\Delta narG$ -Deletionsmutante IW1 des BCG-Wildtyps transformiert. Die rekombinanten Deletionsmutanten wurden anschließend unter anaeroben Bedingungen in MB-Medium mit ADS und Nitrat bei 37 °C inkubiert. Wie bei den Tests in schnellwachsenden Mykobakterien wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und das gebildete Nitrit photometrisch bestimmt. Im Vergleich zur Deletionsmutante IW1 (keine Nitritbildung) besitzt IW1::pAP8 (*narGHJI* aus BCG) eine Nitrat reduzierende Eigenschaft. Die Menge des gebildeten Nitrits liegt wie in dem schnellwachsenden Stamm *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 unterhalb der gebildeten Nitritmenge von IW1::pCF3 (*narGHJI* aus *M. tuberculosis*; entspricht CF1).

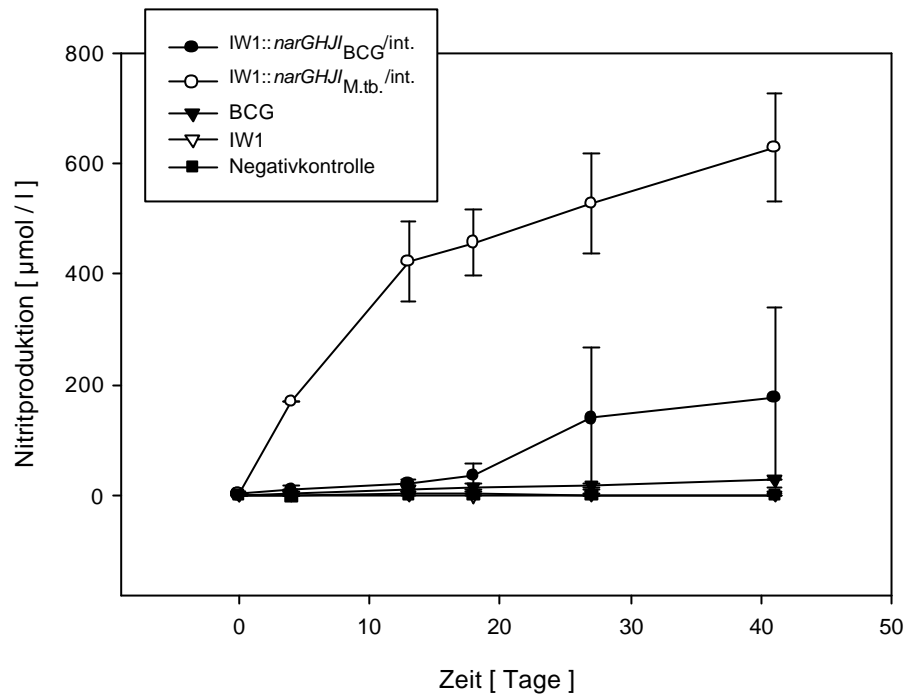


Abb. 4.24: Nitritproduktion der in IW1 integrierenden Konstrukte pAP8 (*narGHJI* aus BCG) und pCF3 (*narGHJI* aus *M. tuberculosis*). Als Kontrollen sind BCG, IW1 sowie eine Negativkontrolle aufgeführt.

Die replikativen Konstrukte (pAP12 enthält *narGHJI* aus BCG und pAP18 enthält *narGHJI* aus *M. tuberculosis*) wurden in die ?*narG*-Deletionsmutante SR106 transformiert. Zur Bestimmung der Nitritproduktion wurden die Bakterien daraufhin unter anaeroben Bedingungen in MB mit ADS und Nitrat bei 37 °C inkubiert. Die Abbildung 4.25 zeigt das Versuchsergebnis.

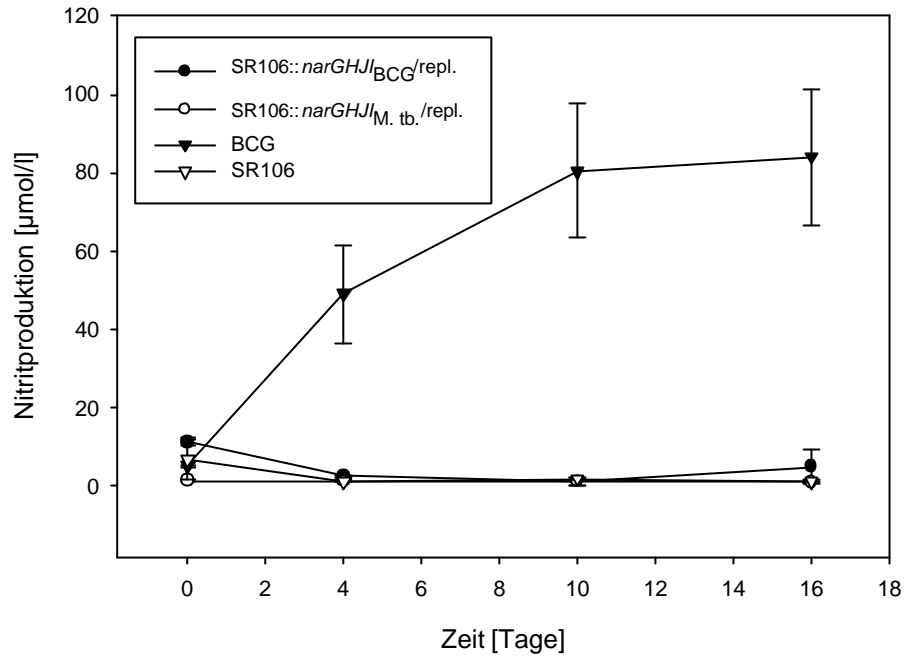


Abb. 4.25: Nitritproduktion der replikativen Konstrukte pAP12 (*narGHJI* aus BCG) und pAP18 (*narGHJI* aus *M. tuberculosis*) in der zu den langsamwachsenden Mykobakterien zählenden ?*narG*-Deletionsmutante SR106. Als Kontrollen sind der Wildtyp BCG und die Deletionsmutante SR106 aufgeführt.

Zum Vergleich wurden die *narGHJI*-Operons in den integrativen Vektoren (pAP8 und pCF3) in die Deletionsmutante SR106 transformiert. Der Nitratreduktasetest wurde zeitgleich mit dem in diesem Kapitel beschriebenen Experiment durchgeführt. Die Ergebnisse stimmen mit den durch die Rekombination von IW1 gewonnenen Ergebnissen überein (keine Abbildung). Es bleibt zu diesem Zeitpunkt ungeklärt, warum *narGHJI* auf replikativen Vektoren die Nitratreduktaseaktivität in ?*narG*-Mutanten nicht komplementiert.

Nach diesen Ergebnissen lässt sich festhalten, dass

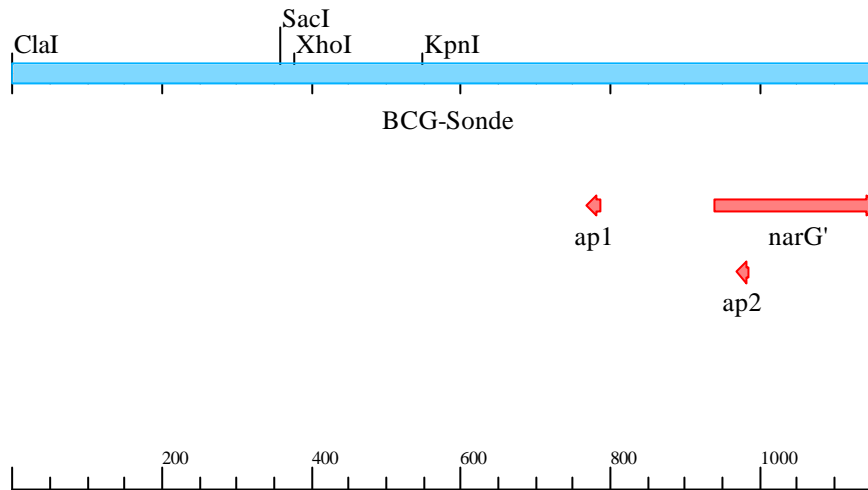
- *narGHJI* aus BCG in langsamwachsenden Mykobakterien eine anaerobe Nitratreduktase exprimiert.
- *narGHJI* aus BCG die anaerobe Nitratreduktase in langsamwachsenden Mykobakterien weniger stark exprimiert als es *narGHJI* aus *M. tuberculosis* vermag.
- *narGHJI* aus BCG bzw. aus *M. tuberculosis* im replikativen Vektor keine anaerobe Nitratreduktase auf die BCG-Deletionsmutante SR106 übertragen können.

#### **4.11 Sequenzierungsanalysen in den anaeroben Nitratreduktaseoperons von *M. tuberculosis* und *M. bovis* BCG**

Nachdem die *in vitro* - Analysen der anaeroben Nitratreduktasen von *M. tuberculosis* und *M. bovis* BCG die beschriebenen Ergebnisse erbrachten, stellte sich die Frage, ob die Unterschiede zwischen diesen beiden Stämmen in der genomischen Sequenz begründet liegen könnten. Denn es ist bekannt, dass *M. bovis* BCG und *M. tuberculosis* zu 1 – 2 % ein differierendes Genom aufweisen. Die höhere Nitratreduktaseaktivität von *M. tuberculosis* im Vergleich zu *M. bovis* BCG könnte ein Hinweis auf einen Sequenzunterschied im Operon der anaeroben Nitratreduktase sein.

Wir entschieden uns, eine ca. 500 Basenpaare lange Region unmittelbar vor dem Start von *narG* der anaeroben Nitratreduktase zu untersuchen. In diesem Bereich könnte sich der Promotor mit regulierenden Genen befinden. Falls dort ein Unterschied zwischen den Sequenzen von *M. tuberculosis* und BCG bestünde, wäre es möglich, einen Anhaltspunkt dafür gefunden zu haben.

Für die Sequenzierung dieser Regionen vor dem *narG*-Gen von *M. tuberculosis* und *M. bovis* BCG wurden Primer benötigt, die an die Sequenz binden können. Die Primer ap1 und ap2 erfüllen diese Voraussetzung. In Abbildung 4.26 sind die Bindungsstellen der beiden Primer veranschaulicht. Der vermutete Promotorbereich und der Start von *narG* sind gekennzeichnet.



### “Promotor”

Abb. 4.26: Bereich der anaeroben Nitratreduktase unmittelbar vor *narG* mit den Sequenzierungsprimern ap1 und ap2.

Es wurden vier verschiedene Stämme von *M. tuberculosis* und drei Verschiedene von *M. bovis* BCG untersucht. Die *M. tuberculosis*-Stämme wiesen ebenso wie die *M. bovis*-Stämme untereinander einheitliche Sequenzen auf. Alle drei *M. bovis* BCG-Stämme wiesen aber 215 Basenpaare vor Beginn des *narG*-Gens einen Sequenzunterschied von einer Base im Vergleich zu allen vier *M. tuberculosis*-Stämmen auf. Statt der Pyrimidinbase Thymin besitzt *M. bovis* BCG an dieser Stelle die Pyrimidinbase Cytosin. Das gleiche Ergebnis brachten noch drei weitere Sequenzierungen. Die Abbildung 4.27 stellt die Sequenzunterschiede in einem sogenannten Alignment gegenüber. Der Stamm *M. tuberculosis* Erdmann fehlt in der Auflistung.

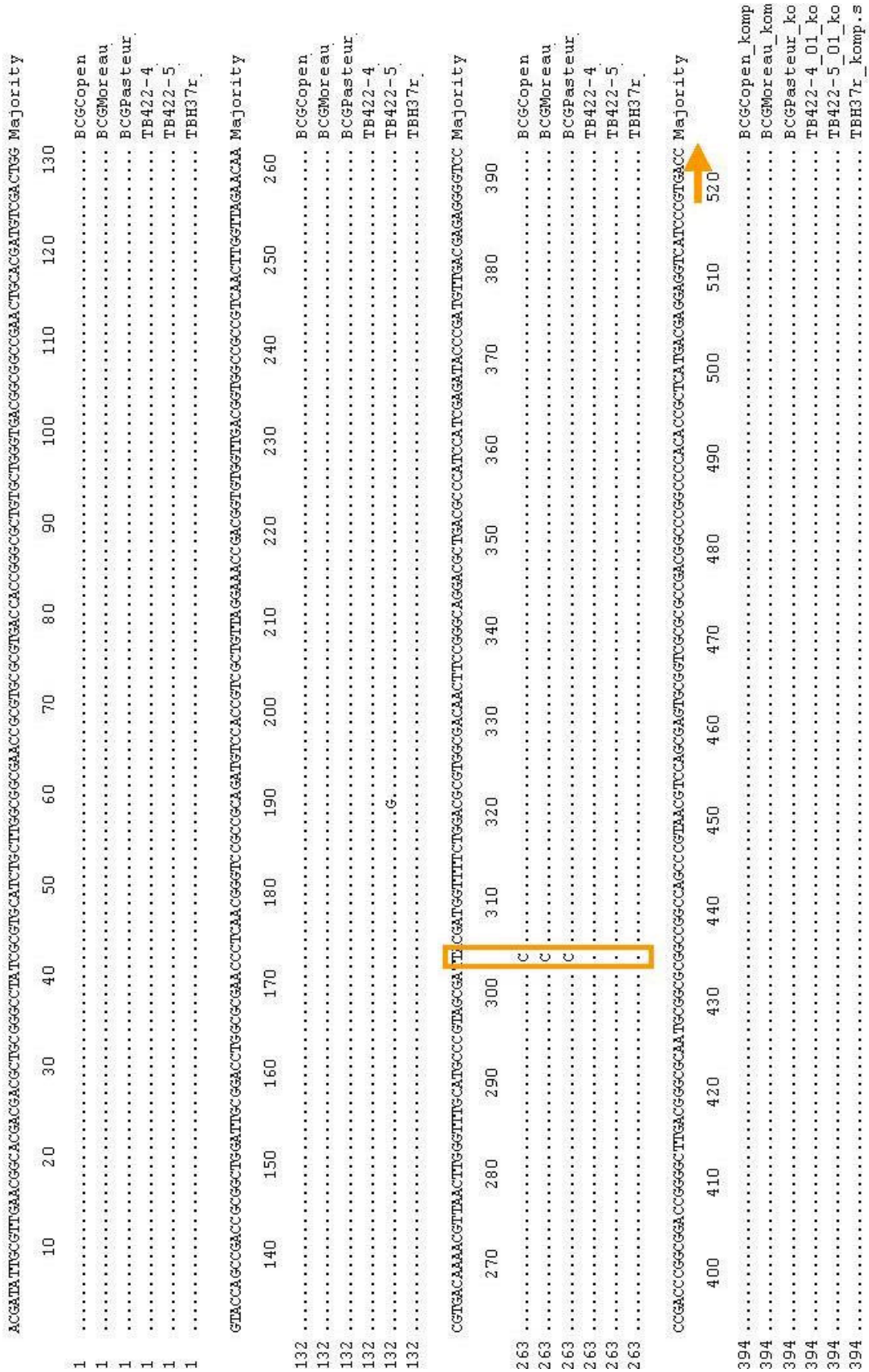


Abb. 4.27: Alignment der sequenzierten Stämme von *M. tuberculosis* und *M. bovis* BCG.

Übereinstimmende Basen sind durch Punkte gekennzeichnet.

Decoration 'decoration #1': Hide (as '.') residues that match the Consensus exactly.

Die Tabelle 4.5 gibt einen Überblick über die untersuchten Stämme, die verwendeten Primer und die aus der Sequenzierung resultierenden unterschiedlichen Basen.

Seq.-Nr.	Bakterium	Stamm	Primer	Base
1	<i>M. tuberculosis</i>	H37Rv	ap1	T
		RV 2001/422-4	ap1	T
		RV 2001/422-5	ap1	T
		Erdmann	ap1	T
	<i>M. bovis</i> BCG	Pasteur	ap1	C
		Copenhagen	ap1	C
		Moreau	ap1	C
2	<i>M. tuberculosis</i>	H37Rv	ap2	T
		RV 2001/422-4	ap2	T
		RV 2001/422-5	ap2	T
		Erdmann	ap2	T
	<i>M. bovis</i> BCG	Pasteur	ap2	C
		Copenhagen	ap2	C
		Moreau	ap2	C

Tab. 4.5 : Übersicht über die sequenzierten Stämme, die verwendeten Primer und die unterschiedlichen Basen

#### 4.12 Untersuchung der Expressionsregulation von *narGHJI* aus *M. tuberculosis* und *M. bovis* BCG mit Hilfe der Site-directed mutagenesis

Der gezeigte Sequenzunterschied von einer Base in den sequenzierten Bereichen von *M. tuberculosis* und BCG veranlasste uns zu der Überlegung, ob dieser Unterschied der Grund für die höhere Nitratreduktaseaktivität von *M. tuberculosis* sein könnte. Wie bereits erwähnt wäre es möglich, daß in diesem DNA-Abschnitt Regulatoren für die Expression des *narGHJI*-Operons liegen.

Mit einer Site-directed mutagenesis kann an jeder beliebigen Stelle eines DNA-Abschnitts eine Punktmutation erzeugt werden. Im Rahmen einer PCR wird unter Verwendung der *Pfu* Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) eine Base gegen eine andere ausgetauscht. Bei dem Verfahren werden Oligonukleotide verwendet, die an einen Bereich um die gewünschte Punktmutation binden können. Die Primer sind bis auf die Stelle der Punktmutation komplementär zu der zu untersuchenden DNA. Dort, wo die Punktmutation erzeugt werden soll, besitzen sie die gewünschte Base. Die Polymerase baut deshalb an dieser Stelle in die synthetisierte DNA die neue Base ein. Die genaue Verfahrensweise ist dem Kapitel 3.2.17 zu entnehmen.

Wir wollten 215 Basenpaare vor dem Start von *narG* (s. Kapitel 4.11) von *M. tuberculosis* die Base Thymin entfernen und an ihre Stelle die Base Cytosin setzen. Diese Base wurde bei der Sequenzierung von BCG an der gleichen Position gefunden. Das Konstrukt pCF3 enthält das gesamte *narGHJI*-Operon von *M. tuberculosis*. Laut Auskunft der Firma Stratagene funktioniert das Verfahren der Site-directed mutagenesis mit kleinen Plasmiden besser. Das Plasmid pCF3 ist mit einer Länge von 12647 Basenpaaren sehr groß. Deshalb wurde ein 2936 bp großes Fragment aus der DNA von pCF3 ausgeschnitten und in einen kleinen Vektor kloniert. Dieses DNA-Fragment enthält den sequenzierten Bereich (s. Kapitel 4.11) sowie einen weiteren Abschnitt außerhalb des *narGHJI*-Operons und endet 17 Basenpaare vor dem Start von *narG*. Mit dem neuen Konstrukt (pAP25) wurde die Site-directed mutagenesis durchgeführt. Die Abbildung 4.28 zeigt die Vektorkarte dieses Plasmids.

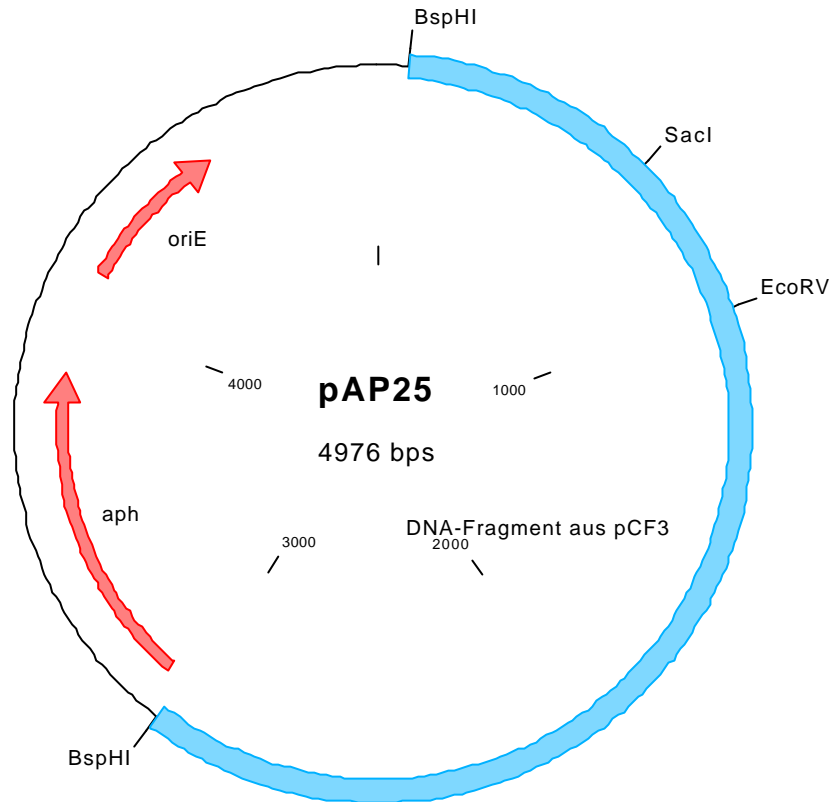


Abb. 4.28: Vektorkarte von pAP25; mit diesem Konstrukt wurde die Punktmutation durchgeführt. Das DNA-Fragment aus pCF3 ist gekennzeichnet.

Zunächst war es erforderlich, zwei Primer auszuwählen, die den Bereich der gewünschten Mutation abdecken und komplementär zueinander sowie zu der zu untersuchenden DNA sind. Sie mussten anstelle der Base Thymin die Base Cytosin bzw. statt Adenin die Base Guanin besitzen (Forward- bzw. Reverseprimer). Die Auswahl der Primer richtete sich nach den Empfehlungen der Firma Stratagene für ein Primerdesign im Rahmen der Beschreibung zur Quick Change Site-directed Mutagenesis™ (s. Kapitel 3.2.17).

Der Forward-Primer ap5 hat folgende Sequenz :

5'-CCA GAA AAC CAT CGT **GAT** CGC TAC GGG CAT GC-3'

Der Reverse-Primer ap6 hat folgende Sequenz :

5'-GCA TGC CCG TAG CGA TCA CGA TGG TTT TCT GG-3'

Die fettgedruckten Basen kennzeichnen die Stelle der Punktmutation.

Für die PCR wurde die Denaturierung initial für 2 Minuten bei 95 °C angesetzt, anschließend wurden 15 Zyklen des folgenden Programmmusters durchlaufen :

95 °C	60 Sekunden
55 °C	120 Sekunden
68 °C	900 Sekunden

Das Amplikon wurde auf dem Agarosegel und durch eine Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde das 2936 bp große DNA-Fragment mit dem punktmultierten Bereich wieder aus pAP25 ausgeschnitten und in den verbliebenen Rest des Ausgangskonstruktes pCF3 kloniert. Das neue Konstrukt pAP28 wurde durch eine Restriktionsanalyse mit den Enzymen *EcoRV* und *SacI* überprüft.

Konstrukt	<i>EcoRV</i>	<i>SacI</i>
pAP28	3995 8652	3796 8851
pCF3	3995 8652	3796 8851

Tabelle 4.6: Erwartete Bandengrößen von pAP28 und pCF3 bei einem Restriktionsverdau mit den aufgeführten Enzymen.

In der Abbildung 4.29 ist das Ergebnis der Restriktionsanalyse aufgeführt.

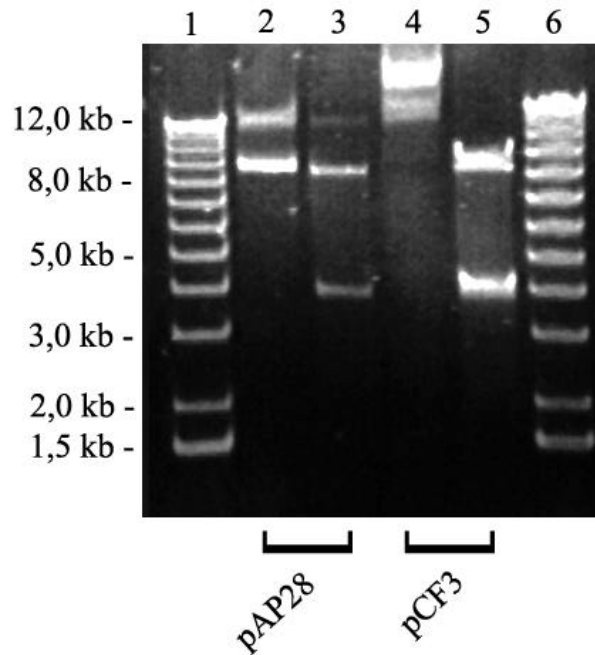


Abb. 4.29: Kontrollverdau des punktmutierten Konstrukts pAP28. Als Vergleich ist die Kontrolle pCF3 aufgeführt. Die Spuren 2 und 4 zeigen einen Restriktionsverdau mit *SacI*, die Spuren 3 und 5 einen Verdau mit *EcoRV*.

Die verwendeten Enzyme wurden ausgewählt, um die Ausrichtung des 2936 bp großen Fragments zu überprüfen. Die Restriktionsendonuclease *SacI* konnte die DNA beider Plasmide nicht (pCF3) oder nur unvollständig (pAP28) spalten. Durch die Restriktionsspaltung mit *EcoRV* wurde gezeigt, daß das 2936 bp große Fragment in der Ausrichtung kloniert wurde, in der es auch dem Plasmid pCF3 entnommen worden ist (s. Spuren 3 und 5).

Um sicher zu gehen, daß bei der Punktmutation keine unerwünschte Mutation stattgefunden hat, wurde der Bereich von 500 bp vor dem Translationsstart von *narG* erneut sequenziert. Es zeigte sich, daß keine weitere Mutation aufgetreten war.

Das endgültige, punktmutierte Konstrukt wird durch ein Schema in Abbildung 4.30 verdeutlicht.

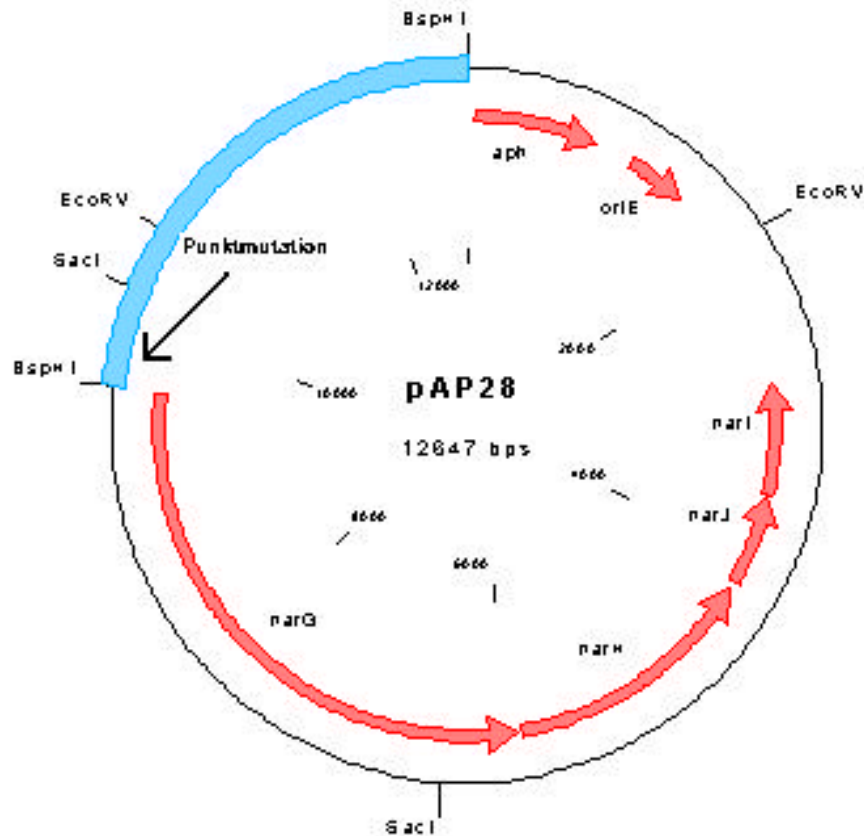


Abb. 4.30: Schema des punktmutierten Konstruktes pAP28. Die Punktmutation befindet sich 215 bp vor dem Start von *narG* (s. Pfeil)

#### 4.13 Nitratreduktaseaktivität von pAP28

Nachdem sichergestellt war, daß die Punktmutation erfolgreich durchgeführt wurde, sollte der Effekt dieser Mutation untersucht werden. Dazu mußte pAP28 in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 transformiert werden. In diesem Stamm sollte die Nitritbildung und somit die Expression einer anaeroben Nitratreduktase untersucht werden.

Die Ausgangslage war folgende: das *narGHJI*-Operon aus *M. tuberculosis* ist in der Lage, innerhalb eines vergleichbaren Zeitraumes mehr Nitrat zu Nitrit zu reduzieren als das *narGHJI*-Operon aus *M. bovis* BCG. Sequenzierungsanalysen beider Stämme in einem Bereich von 500 bp vor Beginn des Translationsstarts von *narG* zeigten, daß es bei BCG eine Sequenzabweichung zu *M.*

*tuberculosis* von einer Base gibt. Durch Austausch dieser Base sollte aus dem Phänotyp von *M. tuberculosis* der Phänotyp von BCG entstehen. Diese Mutation müsste eine erheblich schwächere Nitritbildung von pAP28 im Vergleich zu pCF3 (*narGHJI* aus *M. tuberculosis*) zur Folge haben.

Aus der Abbildung 4.31 lässt sich entnehmen, daß pCF3 wie schon bekannt viel Nitrit produziert. Das Plasmid pAP28 zeigt hingegen eine erheblich geringere Nitratreduktase-aktivität. Zum Vergleich ist die Nitritbildung von BCG und *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 aufgeführt.

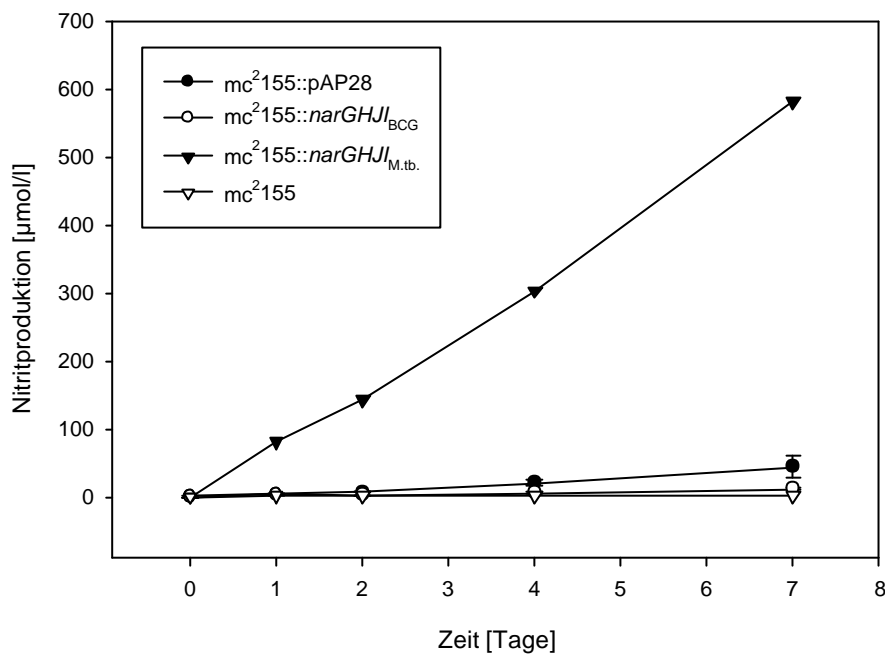


Abb. 4.31: Nitritproduktion des punktmutierten Plasmids pAP28 im Vergleich zu den *narGHJI*-Genclustern aus *M. tuberculosis* und BCG. Die Plasmide wurden bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen bebrütet.

Abschließend lässt sich festhalten, daß der gefundene Sequenzunterschied von einer Base in den untersuchten Bereichen von *M. tuberculosis* und BCG eine Rolle für die unterschiedlich starke Expression der anaeroben Nitratreduktasen dieser beiden Spezies zu spielen scheint.

#### 4.14 Erstellung einer Cosmid-Bibliothek von *M. bovis* R99

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, daß die anaerobe Nitratreduktase für die Virulenz von BCG eine Rolle spielt (WEBER 1999; FRITZ 2001). BCG wurde in den Jahren 1909 bis 1919 von Calmette und Guérin durch zahlreiche *in vitro*-Passagen aus einem virulentem Isolat von *M. bovis* hergestellt. Daher stellte sich die Frage, ob *M. bovis* ebenfalls eine anaerobe Nitratreduktase besitzt. Um dies zu untersuchen, sollte zunächst das *narGHJI*-Operon aus *M. bovis* isoliert werden. Die dazu nötige Cosmid-Bibliothek lag noch nicht in unserem Labor vor und sollte daher mit Hilfe eines Phagensystems der Firma Stratagene erstellt werden.

Zunächst wurde das Genom von *M. bovis* R99 präpariert. Anschließend wurde die DNA mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* geschnitten. Dieses Enzym hat in der verwendeten *M. bovis*-DNA unendlich viele Schnittstellen. Um DNA-Stücke von ca. 40 kb Größe (nur diese Größe kann der Lambda-Phage in die Zielzellen einschleusen) zu erhalten, darf die DNA nur partiell verdaut werden. Dies wird erreicht, indem das Enzym in mehreren Schritten verdünnt wird (nähere Informationen zum Verfahren sind im Kapitel 3.2.21 aufgeführt). Die Abbildung 4.32 zeigt ein Gelfoto nach dem partiellen Verdau der DNA. Von links nach rechts sind die Verdünnungsstufen des Enzyms in aufsteigender Reihenfolge aufgetragen. In der niedrigsten Verdünnungsstufe wird die DNA in viele kleine Abschnitte gespalten, erkennbar an der Bandengröße. In der darauffolgenden Verdünnungsstufe ist die DNA nicht mehr so häufig geschnitten worden. Somit werden die Banden im Gel größer dargestellt. Mit zunehmender Verdünnungsstufe werden die DNA-Fragmente immer größer bis das Enzym die DNA überhaupt nicht mehr schneidet.

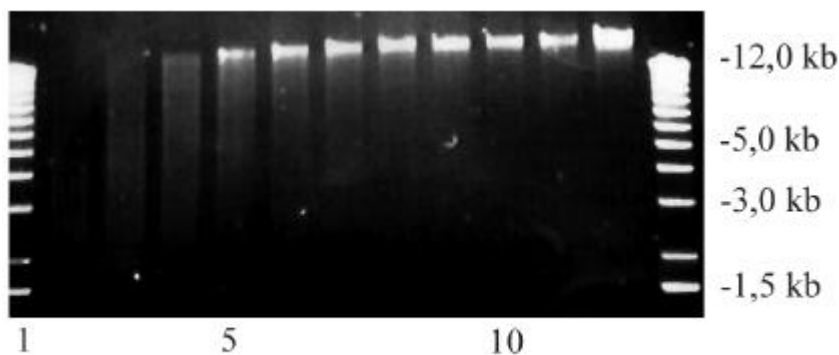


Abb. 4.32: Partieller *Sau3A*-Verdau der *M. bovis*-DNA.

Die Verdünnungsstufen der Spuren 4 bis 6 wurden vereint. So war sichergestellt, dass neben den kleineren und größeren Fragmenten die gewünschten 40 kb großen DNA-Fragmente in dem Pool enthalten sind. Diese Fragmente können nur in den Lambda-Phagen eingebaut werden, wenn sie zwischen zwei sog. Vektorarme eingebunden sind, die beidseitig eine cos-Stelle besitzen.

Das Plasmid pYUB.412.2 besitzt zwei cos-Stellen. Für die Präparation der Vektorarme wurde es mit der Restriktionsendonuclease *XbaI* linearisiert. Um zwei Vektorarme mit je einer cos-Stelle zu erhalten, wurde die linearisierte pYUB.412-DNA anschließend einmal mit der Restriktionsendonuclease *BclI* gespalten. Die Abbildung 4.33 zeigt die Gelkontrolle der präparierten Vektorarme (Spur 2) sowie die gepoolte *M. bovis*-DNA aus Abbildung 4.33 (Spur 3).

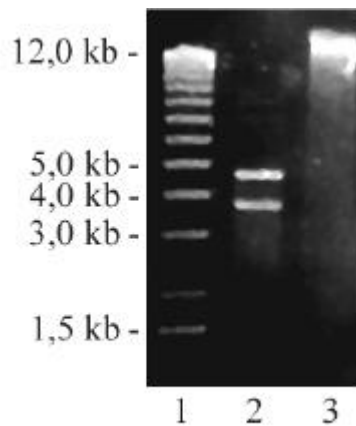


Abb. 4.33: Gelkontrolle der präparierten Vektorarme sowie des gepoolten partiellen Verdauungsergebnisses der genomischen DNA von *M. bovis* R99

Die Vektorarme wurden anschließend über Nacht mit der partiell gespaltenen *M. bovis*-DNA ligiert. Diese ligierte DNA konnte dann mit dem Gigapack<sup>®</sup> III Gold Packaging System der Firma Stratagene in den Lambda-Phagen integriert werden. Anschließend wurden die *E. coli*-Zellen mit den rekombinierten Phagen infiziert. Die Beschreibung der weiteren Durchführung ist in dem Kapitel 3.2.21 zu finden.

Die Cosmide tragenden Phagen wurden mittels Transduktion von Zellen des *E. coli*-Stammes Stabl-2 aufgenommen (s. Kapitel 3.2.21). Die Zellen konnten dann auf speziellen LB-Nährböden mit dem Antibiotikum Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml ausgestrichen werden. Es wurde über

Nacht bei 37 °C inkubiert. Von einer repräsentativen Bibliothek, d.h. von einer vollständigen Bibliothek, kann nur ausgegangen werden, wenn auf allen Platten zusammen ca. 40000 bis 50000 Kolonie bildende Einheiten gewachsen sind. Nur mit dieser Mindestzahl an Kolonien wird das gesamte Spektrum der genomischen DNA von *M. bovis* abgedeckt. Bei 20 ausgestrichenen Platten bedeutet dies, dass pro Platte ca. 2000 Kolonie bildende Einheiten benötigt werden. Es wurden pro Nährboden ca. 1200 Kolonie bildende Einheiten gezählt, so dass ca. 24000 Kolonie bildende Einheiten auf allen Nährböden vorhanden waren. Zur Überprüfung der Bibliothek wurden von allen Kolonien per Zufall Zehn ausgewählt und über Nacht in LB-Medium bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine Plasmidpräparation mit anschließender Kontrolle der Kolonien durch Spaltung der DNA mit der Restriktionsendonuclease *EcoRV*. Die Abbildung 4.34 zeigt das Gelfoto. Werden die einzelnen Banden nach ihrer Größe zusammengezählt, ergibt dies Cosmide von ca. 40000 bp Größe.

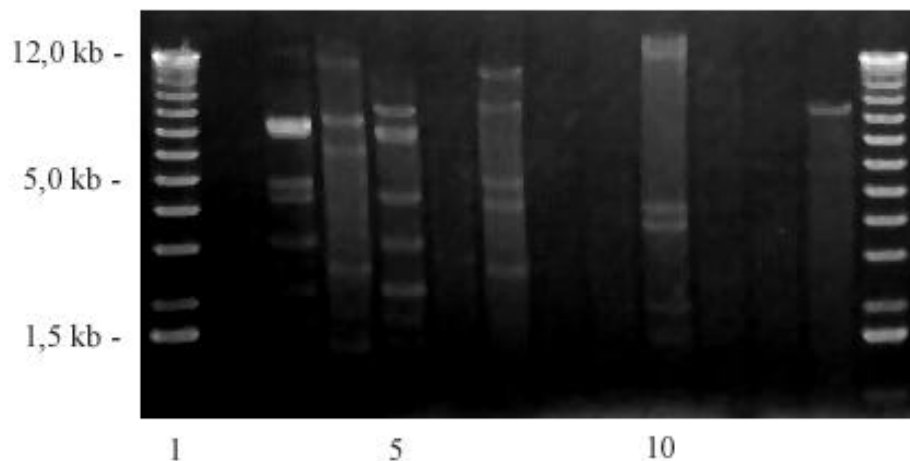


Abb. 4.34: Die Spaltung der Transduktionskolonien 1 bis 10 mit der Restriktionsendonuclease *EcoRV* dient der Größenkontrolle der Cosmide.

Dennoch ist weder die Anzahl an Kolonie bildenden Einheiten noch eine Größenkontrolle der Cosmide ein Beweis für eine repräsentative Cosmid-Bibliothek mit überlappenden Klonen. Daher beschreibt Kapitel 4.15 eine adäquate Überprüfung der Cosmid-Bibliothek.

#### 4.15 Überprüfung der Cosmid-Bibliothek von *M. bovis* R99 mit Hilfe von auxotrophen Mutanten

*M. bovis* besitzt die Fähigkeit, alle 20 Aminosäuren zu bilden. Diese Fähigkeit kann zur Überprüfung der Cosmid-Bibliothek herangezogen werden. Das geschieht mit Hilfe von auxotrophen Mutanten. Wir verwendeten Mutanten der Mykobakterienspezies *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, die für ihr Wachstum auf die Zugabe einer bestimmten Aminosäure angewiesen sind. Sind die Bakterien, die die Cosmid-Bibliothek von *M. bovis* enthalten sollen, in der Lage, auf Nährböden ohne Zusatz von Aminosäuren zu wachsen, so ist das ein Beweis dafür, dass sie die fehlende Aminosäure synthetisiert haben. Durch die Auswahl mehrerer verschiedener auxotropher Mutanten kann ein breites Spektrum der Bibliothek überprüft werden. Können alle Aminosäuredefekte komplementiert werden, ist dies ein Beweis für die Vollständigkeit der Cosmid-Bibliothek. Die Tabelle 4.7 gibt einen Überblick über die verwendeten Mutanten und ihre Aminosäuredefekte. Alle Mutanten stammen aus dem Labor von W. R. Jacobs, Albert Einstein College of Medicine, New York, wo sie innerhalb eines Projektes erstellt wurden (BANGE, COLLINS, JACOBS, 1999).

Nr. der Mutante	mc <sup>2</sup> - Nummer	Auxotropher Phänotyp
# 177	mc <sup>2</sup> 1488	Cystein / Methionin
# 450	mc <sup>2</sup> 1483	Isoleucin / Leucin / Valin
# 757	mc <sup>2</sup> 1489	Cystein / Methionin
# 1900	mc <sup>2</sup> 1481	Histidin
# 1988	mc <sup>2</sup> 1484	Leucin
# 2116	mc <sup>2</sup> 1490	Prolin
# 2235	mc <sup>2</sup> 1472	Arginin
# 2278	mc <sup>2</sup> 1485	Leucin
# 2520	mc <sup>2</sup> 1473	Arginin
# 3037	mc <sup>2</sup> 1486	Lysin
# 3910	mc <sup>2</sup> 1482	Histidin
# 4829	mc <sup>2</sup> 1491	Prolin

Tab. 4.7: Die verwendeten auxotrophen Mutanten und ihre Aminosäuredefekte

Zur Durchführung der Überprüfung wird die DNA der Cosmid-Bibliothek benötigt. Diese wurde aus den transduzierten Cosmiden hergestellt. Die Cosmide wurden von den Platten geschwemmt und anschließend in LB-Medium inkubiert. Aus den Zellen konnte dann die DNA präpariert werden. Die genaue Verfahrenstechnik geht aus Kapitel 3.2.21 hervor.

Die DNA der Cosmid-Bibliothek wurde in die verschiedenen *M. smegmatis*-Mutanten transformiert. Die Bakterienkulturen wurden auf Kulturplatten mit 7H10-Medium (ein spezielles Mykobakteriennährmedium mit Agar), ADS und dem Antibiotikum Hygromycin (alle Kolonien müssen durch den Vektor pYUB.412.2 eine Hygromycinresistenz besitzen) in einer Konzentration von 50 µg/ml ausgestrichen. Es wurden Nährböden verwendet, die die erforderliche Aminosäure enthalten, parallel dazu Nährböden ohne die entsprechende Aminosäure. Auf den Nährböden mit der Aminosäure wuchsen alle Bakterienkulturen. Dies war ein Beweis für das Vorhandensein einer Hygromycinresistenz. Auf den Nährböden ohne die entsprechende Aminosäure wuchsen erwartungsgemäß nur sehr wenige Kolonien. Dies ist dadurch zu erklären, daß bei der Größe des *M. bovis*-Genoms von ca. vier Millionen Basenpaaren und einer Cosmidgröße von ca. 40000 Basenpaaren nur jedes hundertste Cosmid die fehlende Aminosäure komplementieren kann. Die empirische Koloniezahl liegt noch etwas niedriger.

In der Tabelle 4.8 sind die verwendeten auxotrophen Mutanten, die benötigten Aminosäuren sowie das Ergebnis der Testung aufgeführt.

Cosmid-Bibliothek in Mutanten-Nr.	Benötigte Aminosäure der Mutante	Wachstum ohne Aminosäurezusatz
# 177	Cystein / Methionin	ja
# 450	Isoleucin / Leucin / Valin	ja
# 1900	Histidin	ja
# 1988	Leucin	ja
# 2116	Prolin	ja
# 2235	Arginin	ja
# 2278	Leucin	ja
# 2520	Arginin	ja
# 3037	Lysin	ja
# 3910	Histidin	ja
# 4829	Prolin	ja

Tab. 4.8: Ergebnis der Überprüfung der Cosmid-Bibliothek mit Hilfe von auxotrophen Mutanten

Da alle verwendeten auxotrophen Mutanten durch die Cosmid-Bibliothek komplementiert werden konnten, ist der Beweis für eine repräsentative Cosmid-Bibliothek erbracht.

#### 4.16 Isolierung eines das *narGHJI*-Operon tragenden Cosmids aus *M. bovis* R99

Aus der selbst erstellten Cosmid-Bibliothek von *M. bovis* R99 sollte nun dasjenige Cosmid isoliert werden, welches die anaerobe Nitratreduktase beinhalten soll. Das Verfahren hierfür war die Koloniehybridisierung. Die genomische Bibliothek lag in dem *E. coli*-Stamm Stabl-2 vor. Nach der Titerbestimmung der Bakterien konnten von der entsprechenden Verdünnungsstufe 20 Nährböden ausplattiert werden. Nach einem Inkubationsschritt über Nacht waren Kolonien auf den Nährböden gewachsen, die für die Koloniehybridisierung auf Nylonmembranen übertragen wurden. Nach der

Hybridisierung gaben insgesamt 35 Kolonien auf den Röntgenfilmen ein Signal (s. a. Kapitel 4.2). Das entspricht einer Frequenz von 1:114. Diese Kolonien wurden von den Nährböden entnommen und in LB-Medium mit Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die DNA jeder Kolonie isoliert und durch eine Restriktionsspaltung mit der Endonuclease *EcoRV* überprüft. Anschließend wurde ein Southernblot dieser Restriktionsspaltung durchgeführt. Als Sonde wurde die „Promotor-Sonde“ verwendet, die auch schon bei der Isolierung des *narGHJI*-Operons aus BCG benutzt wurde (s. Kapitel 4.2). Die Kolonien 4, 6, 8, 11, 17, 25, 26, 29 und 31 zeigten auf dem Röntgenfilm Signale, die mit denen der Positivkontrollen (*M. bovis* BCG und *M. bovis* R99; keine Abbildung) übereinstimmten. Zur Bestätigung wurde die DNA der Kolonien mit weiteren Restriktionsendonucleasen (*EcoRI* und *NotI*) geschnitten. Hierbei stimmten die Banden der Kolonien 4, 8, 11, 25, 26, 29 und 31 auf dem Röntgenfilm mit denen der Positivkontrollen (fehlen aufgrund unterschiedlicher Signalstärken in der Abbildung) überein. Die Abbildung 4.35 zeigt den zugehörigen Röntgenfilm.

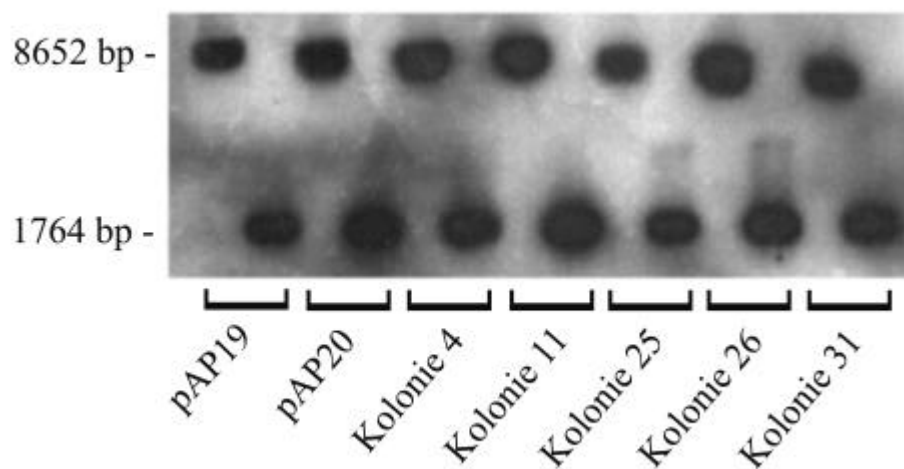


Abb. 4.35: Southernblot verschiedener Kolonien mit dem *narGHJI*-Operon aus *M. bovis* R99.

Geschnitten wurde mit den Restriktionsendonucleasen *EcoRI* (Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11 und 13) und *NotI* (Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 14). Die zu erwartenden Bandengrößen sind angegeben.

In der Gesamtheit aus Restriktionsspaltungen und Southernblotanalysen brachten die Kolonien 8 und 29 die stärksten Signale hervor. Diese Kolonien werden im Folgenden als pAP19 bzw. pAP20 bezeichnet.

#### 4.17 Nitritbildung des Cosmids pAP19 in schnellwachsenden Mykobakterien

Es sollte überprüft werden, ob das *narGHJI*-Operon aus *M. bovis* eine anaerobe Nitratreduktaseaktivität auf den nicht Nitrit bildenden Stamm *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 übertragen kann. Dazu wurde das Cosmid in diesen Mykobakterienstamm transformiert. Die Bakterien wurden anschließend unter anaeroben Bedingungen zusammen mit den Kontrollen (pAP7: Cosmid mit *narGHJI* aus *M. bovis* BCG und einem Plasmid ohne Nitratreduktase als Negativkontrolle) bei 37 °C inkubiert. Nach 1, 3, 7 und 10 Tagen wurde die Nitritbildung der Bakterien bestimmt. Die Nitritproduktion von *M. bovis* liegt auf dem Niveau von BCG.

In Abbildung 4.36 ist der zugehörige Graph aufgezeigt. Als Vergleich zu der Nitritbildung dieser beiden Cosmide ist in Abbildung 4.37 die Nitritbildung des Cosmids pIW10 gezeigt. Es handelt sich um ein Cosmid, das die anaerobe Nitratreduktase aus *M. tuberculosis* trägt. Die Nitritbildung von pIW10 ist um ein Vielfaches stärker als die der Cosmide pAP7 und pAP19. Das Cosmid pAP20 (ein zweites Cosmid mit *narGHJI* aus *M. bovis*) zeigt den gleichen Phänotyp wie pAP19.

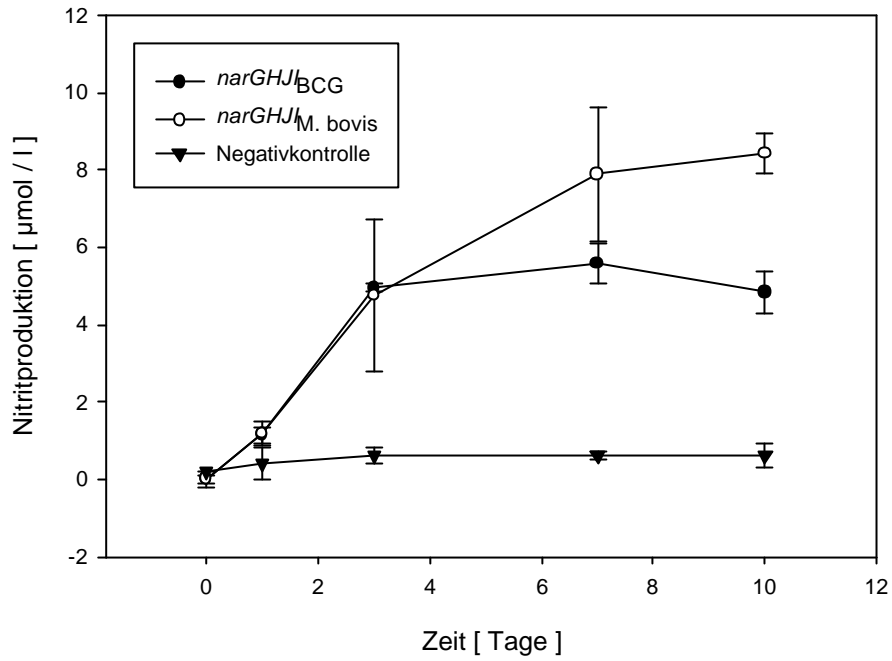


Abb. 4.36: Nitritproduktion der Cosmide pAP7 ( $narGHJI$  aus BCG) und pAP19 ( $narGHJI$  aus *M. bovis*)

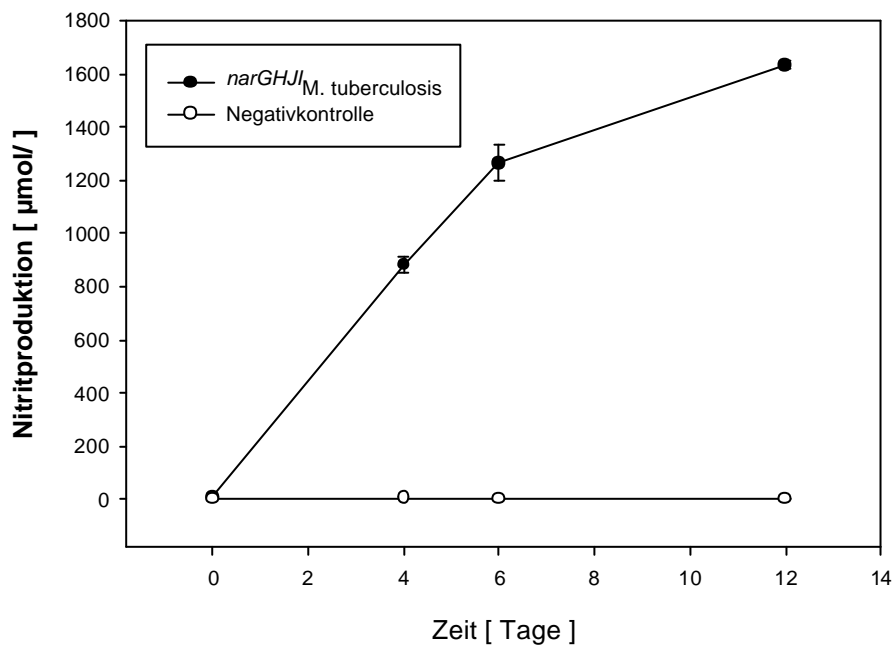


Abb. 4.37: Nitritproduktion des Cosmids pIW10 ( $narGHJI$  aus *M. tuberculosis*)

Das *narGHJI*-Operon von *M. bovis* überträgt eine anaerobe Nitratreduktaseaktivität auf den schnellwachsenden Stamm *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155. Es wird, vergleichbar mit dem *narGHJI*-Operon aus BCG, jedoch erheblich weniger Nitrit gebildet als durch das *narGHJI*-Operon von *M. tuberculosis*.

#### 4.18 Sequenzierungsanalysen im anaeroben Nitratreduktaseoperon von *M. bovis*

Aus Kapitel 4.17 geht hervor, daß *M. bovis* eine anaerobe Nitratreduktase besitzt. Die Sequenzierungsanalysen von *M. tuberculosis* und *M. bovis* BCG (siehe Kapitel 4.11) zeigten, daß diese beiden Mykobakterienspezies in dem untersuchten Bereich eine abweichende Sequenz von einer Base haben. An die Stelle von Thymin bei *M. tuberculosis* tritt bei *M. bovis* BCG die Base Cytosin. Es sollte nun untersucht werden, welcher dieser beiden Sequenzen 221 bp vor dem Translationsstart von *narG* *M. bovis* gleicht.

Wie bei *M. tuberculosis* und *M. bovis* BCG wurde im *narGHJI*-Operon von *M. bovis* ein 500 bp langer DNA-Abschnitt vor dem Translationsstart von *narG* mit zwei verschiedenen Primern sequenziert. Untersucht wurde der *M. bovis*-Stamm R99. Diese Sequenzierungen brachten das Ergebnis hervor, dass *M. bovis* an der beschriebenen Stelle die Base Cytosin aufweist. Damit liegt eine Übereinstimmung mit *M. bovis* BCG vor. Die Tabelle 4.9 zeigt die Sequenzierungsergebnisse.

Seq.-Nr.	Bakterium	Stamm	Primer	Base
1	<i>M. bovis</i>	R99	ap1	C
2	<i>M. bovis</i>	R99	ap2	C
	<i>M. tuberculosis</i>	alle	ap1, ap2	T
	<i>M. bovis</i> BCG	alle	ap1, ap2	C

Tab. 4.9: Sequenzierungsanalysen von *M. bovis* R99

## 5 Diskussion

Diese Arbeit ist Teil eines Gesamtprojektes, das zum Ziel hat, einen neuen Impfstoff gegen die Tuberkulose zu entwickeln. Das Projekt stützt sich auf die These, daß das Überleben der Mykobakterien unter anaeroben Bedingungen an die Expression einer anaeroben Nitratreduktase gebunden ist, durch die es den Erregern ermöglicht wird, ohne Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor Energie in Form von ATP zu bilden. Es ist daher ein großes Ziel, die Aktivität der anaeroben Nitratreduktase abzuschwächen oder sogar ganz auszuschalten. Nur wenn ausreichend Wissen über die Regulation der Genexpression vorhanden ist, kann dieses Ziel verwirklicht werden.

Über die Stoffwechselprozesse von Mykobakterien unter anaeroben Bedingungen ist noch nicht viel bekannt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Nitratstoffwechsel dieser obligat aeroben Bakterien. FRITZ (2001) hat in seiner Arbeit gezeigt, daß entgegen früheren Forschungen (VIRTANEN 1960) BCG unter anaeroben Bedingungen eine Nitratreduktase exprimiert. Eine *narG*-Deletionsmutante von BCG, die kein Nitrat zu Nitrit reduzieren kann, komplementierte er mit dem *narGHJI*-Operon aus *M. tuberculosis*. Der Phänotyp des Wildtyps BCG wurde wiederhergestellt. Die komplementierte Deletionsmutante reduzierte sogar erheblich mehr Nitrat als der Wildtyp. Dies veranlasste uns zu einer Untersuchung der anaeroben Nitratreduktasen aus *M. tuberculosis* und BCG. Aus der Arbeit können mehrere Schlüsse gezogen werden. Zum einen zeigt die membranständige, anaerobe Nitratreduktase von BCG *in vitro* ein deutlich geringeres Nitritbildungsvermögen als diejenige von *M. tuberculosis*. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass *M. tuberculosis* sowohl unter anaeroben als auch unter aeroben Bedingungen Nitrat zu Nitrit reduziert, während BCG dazu nur unter anaeroben Bedingungen in der Lage ist. Das deutet darauf hin, dass BCG nur eine Nitratreduktase enthält, im Gegensatz dazu *M. tuberculosis* aber mindestens eine Nitratreduktase mehr – verantwortlich für eine aerobe Nitritbildung (unveröffentlichte Ergebnisse). Zum anderen wurde nach Analysen eines 500 bp großen Bereiches vor dem Translationsstart von *narG* beider Nitratreduktasen ein Sequenzunterschied von einer Base gefunden. In einem Plasmid, das das *narGHJI*-Operon aus *M. tuberculosis* enthält, wurde mit Hilfe einer Einpunktmutation die *M. tuberculosis*-Base gegen die entsprechende BCG-Base ersetzt. Anschließend durchgeführte Nitratreduktasetests ergaben, dass die Aktivität daraufhin deutlich verringert war. Weiterhin wurde gezeigt, daß *M. bovis* ebenfalls über eine Nitratreduktase verfügt,

die *in vitro* unter anaeroben Bedingungen exprimiert wird. Das Nitritbildungsvermögen liegt auf dem Niveau von BCG. Eine Sequenzierungsanalyse des 500 bp großen Bereiches vor dem Start von *narG* zeigt, daß die *M. bovis*-DNA in diesem Bereich mit der BCG-DNA übereinstimmt.

Bevorzugter Manifestationsort von *Mycobacterium tuberculosis* ist die Lunge, aber auch andere Besiedlungsorte wie in Lymphknoten, ZNS, Darm, Herz, Leber, Urogenitaltrakt, Skelettmuskelsystem sowie in der Haut treten auf (HAAS 2000, FRIEDLAND 1999). Es ist eine Eigenschaft von *M. tuberculosis*, in den befallenen Geweben Granulome zu bilden, die in ihrem Kern zur Verkäsung neigen. Diese Granulome sind von einem Wall aus Lymphozyten, Makrophagen und anderen Entzündungszellen umgeben (FRIEDLAND 1999). In ihrem Inneren herrscht vermutlich ein anaerobes Milieu (BARCLAY u. WHEELER 1989). Die Mykobakterien müssen demnach in einem anaeroben oder zumindest mikroaerophilen Milieu überleben können. Wie der strikte Aerobier *M. tuberculosis* unter anaeroben Bedingungen existieren kann, ist bisher noch nicht geklärt. Seit der kompletten Sequenzierung von *M. tuberculosis* (COLE et al. 1998) ist bekannt, daß dieser Mykobakterienstamm über ein Operon mit hoher Homologie zu dem *narGHJI*-Operon anderer Bakterien (z. B. *Bacillus subtilis*) besitzt. Diese Bakterien benutzen die Nitratreduktase unter anaeroben Bedingungen als alternativen Stoffwechselweg, in dessen Rahmen Nitrat als Elektronenakzeptor fungiert (HOFFMANN 1995 und NAKANO 1997). Es wurde gezeigt, daß auch BCG unter anaeroben Bedingungen Nitrat zu Nitrit reduzieren kann (WEBER 1999). Aus dieser Arbeit geht hervor, daß das Nitritbildungsvermögen des *narGHJI*-Operons von BCG weit unter dem Niveau von *M. tuberculosis* liegt. Diese Erkenntnis beruht auf der Untersuchung der isolierten *narGHJI*-Operons von *M. tuberculosis* und BCG. Die beiden Operons wurden in die gleichen Plasmide kloniert. Die Untersuchungen wurden jeweils in zwei verschiedenen Plasmiden (ein integratives und ein replikatives Plasmid), in die die Operons in jeweils gleicher Ausrichtung kloniert wurden, durchgeführt. In Mykobakterien integrierende Plasmide werden in das Genom der Bakterien aufgenommen, so daß ihre Teilung von der Zellteilung abhängig ist. Somit gibt es pro Zelle nur eine Kopie des *narGHJI*-Operons. Replikative Plasmide werden nicht in das Genom integriert, so daß sie sich unabhängig von der Zellteilung innerhalb des Zytoplasmas vermehren können. Auf diese Weise können mehrere *narGHJI*-Operons in einer Zelle vorkommen (multi-copy plasmid). Je mehr dieser Operons in einer Zelle vorkommen, desto mehr Nitrit kann gebildet werden. So können durch die Verwendung replikativer Plasmide auch *narGHJI*-Operons untersucht werden, die eine weniger starke Nitratreduktaseaktivität besitzen. Der Nitratreduktasetest diente als Indikator für die

Expression einer anaeroben Nitratreduktase. Der Test wurde mit allen *narGHJI*-Operon tragenden Plasmiden unter gleichen Bedingungen mehrfach wiederholt.

Über die Regulation der anaeroben Nitratreduktaseaktivität von *M. tuberculosis* und BCG herrscht bisher noch Unklarheit. Die regulatorischen Mechanismen für die Genexpression der anaeroben Nitratreduktase wurden noch nicht gefunden. Durch Studien anderer Strukturproteine ist bekannt, daß die Expression von Proteinen auf Transkriptionsebene, bei der posttranskriptionellen mRNA-Synthese oder auch auf der Ebene der Translation reguliert wird (KARLSON, DOENECKE, KOOLMAN 1994). Untersuchungen zur Regulation des *narGHJI*-Operons von *E. coli* haben gezeigt, daß die primäre Kontrollebene für die Enzymsynthese der anaeroben Nitratreduktase auf Transkriptionsniveau zu liegen scheint (WANG, TSENG u. GUNSALUS 1999). Schon seit längerer Zeit ist FNR (Fumarate and nitrate regulation) als Hauptaktivator für die Transkription von Genen des anaeroben Stoffwechsels in *E. coli* etabliert (SPIRO u. GUEST 1990; UNDEN, BONGAERTS 1997 u. 1998). Dabei wird molekularer Sauerstoff als ein Repressor für die FNR-Aktivierung gehalten (BECKER et al. 1996; JORDAN et al. 1997). Die Regulation von FNR übernehmen zwei Proteingruppen, bestehend aus dem *narXL*-Operon und den Genen *narP* und *narQ*. Das *narGHJI*-Operon gehört zu der Gruppe von Strukturgenen, deren Transkription ausschließlich durch den Transmitter *narL* reguliert zu werden scheint (TYSON, COLE u. BUSBY 1994). Bisher wurde in *M. tuberculosis* keine FNR-Bindungsstelle gefunden (PANTEL et al. 1998).

In der Promotorregion von *Bacillus subtilis* ist eine FNR-Bindungsstelle lokalisiert, deren Inaktivierung einen dramatischen Rückgang der Genexpression von *narGHJI* zur Folge hat (NAKANO u. ZUBER 1998). Die Untersuchung eines 500 bp langen DNA-Abschnitts in *M. tuberculosis* und BCG unmittelbar vor dem Translationsstart von *narG* sollte den möglichen Promotorbereich der anaeroben Nitratreduktase lokalisieren. Durch die Verwendung zweier verschiedener Oligonukleotide wurde die Aussagefähigkeit der Sequenzierungsanalysen erhöht. Jeder untersuchte Stamm (*M. tuberculosis*: 4 verschiedene Stämme, BCG: 3 verschiedene Stämme) wurde mindestens zweimal sequenziert. In dem genannten Bereich wurde 215 bp vor dem Translationsstart von *narG* in der *narGHJI*-Sequenz von BCG statt Thymin (besitzt *M. tuberculosis* an dieser Position) die Base Cytosin gefunden. Dies war in dem untersuchten Bereich der einzige Unterschied zwischen *M. tuberculosis* und BCG. Durch einen Basenaustausch an dieser Stelle erhielten wir einen Hinweis auf regulatorische Mechanismen für die Genexpression. Die in dem

*narGHJI*-Operon von *M. tuberculosis* durchgeführte Punktmutation führte zu einer deutlichen Minderung der Nitratreduktase-aktivität. Das Nitritbildungsvermögen des punktmutierten Konstruktes fiel fast auf das Niveau von BCG ab. Diese Untersuchung wurde fünfmal wiederholt. Es ist also sehr wahrscheinlich, daß sich in diesem Bereich regulatorische Mechanismen für die Genexpression der anaeroben Nitratreduktase befinden. Um diese Aussage zu untermauern, könnte versucht werden, durch eine Punktmutation im *narGHJI*-Operon von BCG das Nitritbildungsvermögen zu steigern. Wie bereits gezeigt werden konnte, spielt die Nitratatmung eine wichtige Rolle in der Pathogenese von BCG in Mäusen (FRITZ 2001). Das oben erläuterte Ergebnis untermauert die Spekulation, daß die unterschiedlich starke Nitratreduktaseaktivität von *M. tuberculosis* und *M. bovis* BCG die unterschiedliche Virulenz dieser Stämme bedingen könnte. Es kann jedoch noch keine Aussage bezüglich der Art und Weise der Regulation gemacht werden. Nachfolgende Untersuchungen sollten daher zum Ziel haben, den genannten Bereich näher zu definieren. Durch Deletionen größerer DNA-Abschnitte könnte untersucht werden, ob sich ein Effekt für die Nitratreduktaseaktivität verzeichnen und so ein Bereich für die Expressionsregulation eingrenzen läßt. Bisher wurden nur die oben beschriebenen Sequenzvergleiche zwischen *M. tuberculosis* und BCG durchgeführt. Es herrscht daher noch Unklarheit über die Sequenz von BCG im Bereich der Strukturgene. Somit könnten auch die Gene *narGHJI* in diese Untersuchungen mit einbezogen werden. Schon seit Längerem ist eine Differenz von 1-2 % in den Genomen von *M. tuberculosis* und BCG bekannt. Möglicherweise findet sich ein weiterer Unterschied in der Sequenz der Strukturgene.

Der vielfältig eingesetzte Impfstamm BCG wurde aus *Mycobacterium bovis* erstellt. Für uns war es daher interessant zu wissen, ob *M. bovis* ebenfalls über eine anaerobe Nitratreduktase verfügt und, falls ja, ob es Unterschiede im Phänotyp der beiden *narGHJI*-Operons von BCG und *M. bovis* gibt. Die Isolierung des *narGHJI*-Operons aus *M. bovis* erfolgte durch eine Koloniehybridisierung. Dies ist zwar ein aufwendiges Verfahren, doch kann mit einer geeigneten Sonde das gesuchte Operon erkannt werden. Die Homologie der BCG-Sonde zu der *M. bovis*-DNA reichte offensichtlich aus, um das *narGHJI*-Operon auffinden zu können. Es wurde gezeigt, daß *M. bovis* eine anaerobe Nitratreduktase besitzt. Die Aktivität der Nitratreduktase befindet sich auf dem Niveau von BCG. Dieses Ergebnis bezieht sich auf einen Vergleich der jeweiligen Cosmide mit den *narGHJI*-Operons von *M. tuberculosis*, BCG und *M. bovis*. Interessanterweise zeigte ein *M. bovis*-Stamm, der *in vitro* unter anaeroben Bedingungen kultiviert wurde, eine deutlich stärkere

Nitratreduktaseaktivität als *M. bovis* BCG (unveröffentlichte Ergebnisse). Durch Sequenzierungsanalysen des gleichen 500 bp großen Bereiches vor dem Start von *narG* in *M. bovis* wurde hingegen festgestellt, daß die Sequenz in diesem Bereich mit derjenigen von BCG übereinstimmt. Dieser Widerspruch sollte in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

Die Entdeckung, daß *M. bovis* über eine anaerobe Nitratreduktase verfügt, könnte von veterinärmedizinischer Bedeutung sein. *M. bovis* ist der Erreger der Rindertuberkulose, der aber neben anderen Tierarten wie Schweinen, Pferden, Hunden, Katzen Schafen, Ziegen, Papageien und Affen auch den Menschen befallen kann (ROSENBERGER, 1970). Wie früher in Deutschland stellen infizierte Menschen und Tiere heute in den Entwicklungsländern ein ständiges Erregerreservoir dar. Die Entwicklung eines *M. bovis*-Impfstammes durch beispielsweise eine gezielte Deletion des *narG*-Gens könnte agrarwirtschaftliche und auch humanpathologische Schäden in den betroffenen Gebieten nachhaltig mindern. Für Tiere könnte die Entwicklung eines Impfstammes aus *M. bovis* notwendig sein, da *M. tuberculosis* zwar auch aus Tieren isoliert wurde, dieser Erreger jedoch keine klinisch manifesten Krankheitserscheinungen auslöst (ROSENBERGER 1970) und damit als Ausgangsstamm für einen Lebendimpfstoff nicht in Frage kommt.

Die Aktivität der anaeroben Nitratreduktase hat zur Folge, daß Nitrat zu Nitrit reduziert wird. Das anfallende Nitrit scheint auf Mykobakterien toxisch zu wirken (RATLEDGE 1982). Das könnte der Grund dafür sein, daß die Mykobakterien das Nitrit weiter verstoffwechseln. Die Nitritverstoffwechslung ist Gegenstand momentaner Untersuchungen. Bisher sind zwei Wege der Verstoffwechslung bekannt. Zum einen die Denitrifikation, die mit Hilfe von verschiedenen Enzymkomplexen über die Zwischenstufen Stickstoffoxid (NO) und Distickstoffoxid (N<sub>2</sub>O) das Endprodukt Stickstoff (N<sub>2</sub>) bildet. Zum anderen gibt es eine anaerobe Nitritreduktase, die Nitrit zu Ammonium (NH<sub>4</sub>) reduziert (MORTLOCK 1998). Bei der Sequenzierung des Genoms von *M. tuberculosis* wurden Gene mit hoher Homologie zu denen einer anaeroben Nitritreduktase, codiert durch *nirBD*, in *E. coli* gefunden. Gene für die Denitrifikation konnten dagegen nicht identifiziert werden (COLE et al. 1998). Daher scheint der letztgenannte Weg der von Mykobakterien genutzte zu sein.

Die Entschlüsselung des anaeroben Nitratstoffwechsels von Mykobakterien könnte auch für andere Bereiche als die Impfstoffentwicklung wichtig sein. Mykobakterien wurden im Respirationstrakt von Mukoviszidosepatienten gefunden (BANGE et al. 1999). Bei dieser autosomal vererbten auch

---

zystische Fibrose (CF) genannten Krankheit kommt es zu einer vermehrten Produktion von viskösem Schleim in Lunge und Bronchien. Mit großer Wahrscheinlichkeit herrschen in diesem Schleim anaerobe oder zumindest mikroaerophile Bedingungen. CF-Patienten sind besonders anfällig für chronische Pneumonien. Ein Erreger, der häufig aus dem Mukus dieser Patienten isoliert wird, ist *Pseudomonas aeruginosa*. Dieser obligate Aerobier, der sich in dem Schleim vermehren kann, verwendet unter anaeroben Bedingungen Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor (GALIMAND et al. 1991). Möglicherweise spielt die Nitratatmung auch für die Pathogenese der Mykobakterien bei CF-Patienten eine wesentliche Rolle. Insbesondere *M. abscessus* scheint über Monate zu persistieren und eine Verschlechterung der pulmonalen Situation bei diesen Patienten zu verursachen (BANGE et al. 2001).

## 6 Zusammenfassung

### Untersuchungen zur Regulation der anaeroben Nitratreduktasen von *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium bovis* BCG

#### Axel Puncken

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *narGHJI*-Gencluster aus der genomischen Bibliothek von BCG isoliert und mit dem isolierten Gencluster der anaeroben Nitratreduktase aus *M. tuberculosis* hinsichtlich seines Nitritbildungsvermögens sowohl in dem schnellwachsenden Mykobakterienstamm *M. smegmatis* als auch in langsamwachsenden Deletionsmutanten von *M. bovis* BCG verglichen. Das Gencluster aus *M. tuberculosis* ist in der Lage, erheblich mehr Nitrit zu bilden als dasjenige aus BCG. Mit Hilfe von Sequenzanalysen wurde daraufhin die DNA beider Mykobakterienspezies im Bereich von 500 bp vor dem Translationsstart von *narG* analysiert. Ein Unterschied in der Sequenz von nur einer Base (215 bp vor dem Translationsstart von *narG*) zwischen *M. tuberculosis* und BCG veranlasste uns dazu, eine gezielte Punktmutation an genau dieser Stelle durchzuführen. In dem *narGHJI*-Gencluster aus *M. tuberculosis* wurde die Base Thymin gegen die Base Cytosin, die sich an der entsprechenden Stelle im *narGHJI*-Gencluster von BCG befindet, ausgetauscht. Die ehemals hohe Nitratreduktaseaktivität des *narGHJI*-Genclusters aus *M. tuberculosis* nahm daraufhin erheblich ab. Es ist also zu vermuten, dass sich an dieser Stelle regulatorische Mechanismen für die Genexpression der anaeroben Nitratreduktase befinden, die auf einen Promotorbereich zurückzuführen sein könnten. Die Tatsache, dass *M. tuberculosis* im Gegensatz zu BCG auch unter aeroben Bedingungen eine Nitratreduktaseaktivität aufweist, deutet darauf hin, dass *M. tuberculosis* über mindestens eine weitere Nitratreduktase verfügen könnte.

Da der als Impfstamm verwendete Stamm BCG aus der Spezies *Mycobacterium bovis* entwickelt worden ist, wurde auch diese Spezies auf das Vorhandensein einer Nitratreduktase untersucht, die unter anaeroben Bedingungen vermittelt wird. Es war zunächst erforderlich, eine Genombibliothek von *M. bovis* zu erstellen, aus der das *narGHJI*-Gencluster isoliert werden konnte. Es zeigte sich, dass dieses isolierte Gencluster in der Lage ist, eine Nitratreduktaseaktivität auf den schnellwachsenden Stamm *M. smegmatis* zu übertragen. Die Höhe der Aktivität liegt auf dem

Niveau von BCG. Die DNA von *M. bovis* wurde ebenfalls in einem Bereich von 500 bp vor dem Translationsstart von *narG* sequenziert. Es wurde kein Unterschied zu der Sequenz von BCG gefunden.

Ob es einen Zusammenhang zwischen der stärkeren Virulenz von *M. tuberculosis* gegenüber BCG und auch *M. bovis* und der höheren Nitratreduktaseaktivität dieses Stammes gibt, ist bis heute nicht geklärt und kann daher nur vermutet werden.

## 7 Summary

### Examinations to the regulation of the anaerobic nitrate reductase of both *M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG

#### Axel Puncken

In this study, the *narGHJI* gene cluster was cloned from a genomic library of BCG and compared to the isolated gene cluster of *M. tuberculosis* with focus on the capability to produce nitrite in fast-growing *M. smegmatis* as well as in a slow-growing deletion mutant of *M. bovis* BCG. The gene cluster of *M. tuberculosis* shows much more reductase activity than BCG. DNA sequence analyses of a 500 bp fragment in both species was done. The fragment lies before of the translation start sequence of *narG*. Since there was just a single mismatch between both sequences (215 bp upstream of the translation start) a site directed mutagenesis was performed in the gene cluster of *M. tuberculosis* to exchange the base thymidine for cytosine, as it is present in BCG at the same location. Consequently, a considerable decrease of nitrite production of the altered *M. tuberculosis* gene cluster was observed.

Apparently, the regulating mechanism for gene expression of the anaerobe nitrate reductase must be located in this region. The fact that *M. tuberculosis* shows nitrate reductase activity while *M. bovis* BCG does not, leads to the assumption that there must be at least one further nitrate reductase in *M. tuberculosis*.

Since the vaccine strain BCG was developed from *M. bovis*, this species was also tested for the existence of a nitrate reductase activity under anaerobe growing conditions. To isolate the *narGHJI* gene cluster, it was necessary to construct a genomic library of *M. bovis* first. The isolated gene cluster was able to transfer the capability to reduce nitrate to slow-growing species of *M. smegmatis*. Its activity was on the level of BCG. Sequence analyses of the 500 bp fragment which is located before the translation start of *narG* was done in *M. bovis* as well. There was no difference found to the corresponding sequence of BCG.

Whether there is a connection between a higher virulence in *M. tuberculosis* than in BCG or *M.*

*bovis* and a higher nitrate reductase activity in *M. tuberculosis* has not been fully solved and remains an assumption.

## 8 Literaturverzeichnis

ARANZ, A., LIEBAN, E., MATEOS, A., DOMINGUEZ, L., VIDAL, D., DOMINGO, M., GONZOLEZ, O., RODRIGUEZ-FERRI, E.F., BUNSCHOTEN, A.E., VAN EMBDEN, J.D.A. u. COUSINS, D. (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

BANGE, F.-C., BROWN, B.A., SMACZNY, C., WALLACE JR., R.J. u. BÖTTGER, E.C. (2001)

Lack of transmission of *Mycobacterium abscessus* among patients with cystic fibrosis attending a single clinic

Clin. Infect. Dis. 32, 1684-1650

BANGE, F.-C., COLLINS, F.M. u. JACOBS JR., W.R. (1999)

Survival of mice infected with *Mycobacterium smegmatis* containing large DNA fragments from *Mycobacterium tuberculosis*

Tuber. Lung Dis. 79, 171-180

BANGE, F.-C., KIRSCHNER, P. u. BÖTTGER, E.C. (1999)

Recovery of *Mycobacteria* from patients with cystic fibrosis

J. Clin. Microbiol. 37, 3761-3763

BARCLAY, R. u. WHEELER, P.R. (1989)

Metabolism of mycobacteria in tissues

In: RATLEDGE, C., STANFORD, F. u. GRANGE, J.M. [Hrsg.]: The biology of Mycobacteria, Volume 8, London, San Diego, New York, Berkeley, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press 37-106

BARON, E.J., CHANG, R.S., HOWARD, D.H., MILLER, J.N. u. TURNER, J.A. (1994)

Medical Microbiology – A Short Course

John Wiley and sons inc., 407-424

BECKER, S., HOLIGHAUS, G., GABRIELCZYK, T. u. UNDEN, G. (1996)

O<sub>2</sub> as the regulatory signal for *fnr*-dependent gene regulation in *Escherichia coli*

J. Bacteriol. 178, 4515-4521

BLASCO, F., IOBB, C., GIORDANO, G., CHIPPEAUX, M. u. BONNEFOY, V. (1989)

Nitrate reductase of *Escherichia coli*: complementation of the nucleotide sequence of the *nar* operon and reassessment of the role of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in iron binding and electron transfer

Mol. Gen. Genet. 218, 249-256

BLOOM, B.R., FINE, P.E.M. (1998)

The BCG experience: Implications for future vaccines against tuberculosis

In: BLOOM, B.R. [Hrsg.]: Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington, DC: ASM Press. 531-557

BUCHAN, G.S. u. GRIFFIN, J.F.T. (1990)

Tuberculosis in domestical deer (*Cervus elaphus*): a large animal model for human tuberculosis

J. Comp. Path. 103, 11-22

BUCHHOLZ, S., MARTI, D., SCHULTHEISS, G u. WIDMER, U. (2000)

Tuberkulöser Psoasabszess

Dtsch. Med. Wschr. 125, 866-868

BRAGG, R.R., HUCHZERMEYER, H.F. u. HANISCH, M.A. (1990)

*Mycobacterium fortuitum* isolated from three species of fish in South Africa

Onderstepoort J. Vet. Res. 57, 101-102

CANTWELL, M.F., SNIDER, D.E., CAUTHEN, G.M. u. ONORATO, I.M (1994)

Epidemiology of Tuberculosis in the United States, 1985 Through 1992

J. Am. Med. Assoc. 272, 535-539

CLIFTON-HADLEY, R.S. u. WILESMITH, J.W. (1991)

Tuberculosis in deer: a review

Vet. Rec. 129, 5-12

COLE, S.T., BROSCHE, R., PARKHILL, J., GARNIER, T., CHURCHER, C., HARRIS, D., GORDON, S.V., EIGLMEIER, K., GAS, S., BARRY III, C.E., TEKAIA, F., BADKOCK, K., BASHAM, D., BROWN, D., CHILLINGWORTH, T., CONNOR, R., DAVIES, R., DEVLIN, K., FELTWELL, T., GENTLES, T., HAMLIN, N., HOLROYD, S., HORNSBY, T., JAGELS, K., KROGH, A., MC LEAN, J., MOULE, S., MURPHY, L., OLIVER, K., OSBORNE, J., QUAIL, M.A., RAJANDREAM, M.-A., ROGERS, J., RUTTER, S., SEEGER, K. SKELTON,

J. , SQUARES, R., SQUARES, S., SULSTOPN, J.E., TAYLOR, K., WHITEHEAD, S. u.  
BARREL, B.G. (1998)

Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence  
Nature 393, 537-544

COLLINS, F. (1989)

Mycobacterial Disease, Immunosuppression and AIDS

Clin. Microbiol. Rev. 2, 360-377

CORRY, J.E.L. u. HINTON, M.H. (1997)

Zoonoses in the meat industry: a review

Acta Vet. Hung. 45, 457-479

COSIVI, O., MESLIN, F.-X., DABORN, C.J. u. GRANGE, J.M. (1995)

Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans, with particular reference to  
Africa

Rev. Sci. Tech. 14, 733-746

DEDIÉ, K. (1993)

Tuberkulosen und Mykobakteriosen als Zoonosen

In: DEDIÉ, K.; BOCKEMÜHL, J.; KÜHN, H.; VOLKMER, K.-J.; WEINKE, T. [Hrsg.]:

Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 335-362

De LISLE, G.W., BENGIS, R.G., SCHMITT, S.M. O'BRIEN, D.J. (2002)

---

Tuberculosis in free-ranging wildlife: detection, diagnosis and management

Rev. Sci. Tech. 21, 317-334

DE TURK, W. u. BERNHEIM, F. (1958)

Effects of ammonia, methylamine and hydroxylamine on the adaptive assimilation of nitrite and nitrate by a mycobacterium

J. Bacteriol. 75, 691-696

DIERICH, M.P., PALL, H., SEMENITZ, E. (2000)

Infektionskrankheiten durch Bakterien und Pilze

In: GEROK, W., GRUBER, C., MEINERTZ, H., ZEIDLER, H. [Hrsg]: Die Innere Medizin, 10. Auflage, Schattauer, Stuttgart, New York, 1310-1371

DOHOO, I.R., MC DONNELL, W.N., RHODES, C.S. u. ELAZHARY, Y.L. (1998)

Veterinary research and human health

Can Vet. J. 39, 548-556

FRIEDEN, T.R.; FUJIWARA, P.I.; WASHKO, R.I.; HAMBURG, M.A. (1995)

Tuberculosis in New York City-turning the tide

N. Engl. J. Med. 333, 229-299

FRIEDLAND, J.S. (1999)

Tuberculosis

In: ARMSTRONG, D. u. COHEN, J. [Hrsg.]: Infectious Diseases, 2.30, 1-16

FRITZ, C. (2001)

Bedeutung der anaeroben Nitratreduktase für die Pathogenese der Infektion mit *Mycobacterium bovis* BCG in immundefizienten (SCID) Mäusen

Tierärztliche Hochschule Hannover, Inaugural-Dissertation

GALIMAND, M., GAMPER, M., ZIMMERMANN, A. u. HAAS, D. (1991)

Positive *Fnr*-like control of anaerobic arginine degradation and nitrate respiration in *Pseudomonas aeruginosa*

J. bacteriol. 173, 1598-1606

GRANGE, J.M. u. YATES, M.D. (1994)

Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection

Vet. Microbiol. 40, 137-151

GRANGE, J.M. u. ZUMLA, A. (1999)

Antituberculous agents

In: ARMSTRONG, D. u. COHEN, J. [Hrsg.]: Infectious Diseases, 7.13, 1-13

GRIFFIN, J.F.T. u. BUCHAN, G.S. (1994)

Aetiology, pathogenesis and diagnosis of *Mycobacterium bovis* in deer

Vet. Microbiol. 40, 193-205

HAAS, D.W. (2000)

*M. tuberculosis*

In: MANDELL, DOUGLAS, BENNETT [Hrsg.]: Principles and Practice of Infectious Diseases, 2576-2604

HAHN, H. (1994)

Mykobakterien

In: HAHN,H.; FALKE, D.; KLEIN,P. [Hrsg.]: Medizinische Mikrobiologie, 2. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest: Springer Verlag, 435-4550

HAMBURG, M. (1995)

Health of the city: Focus on Tuberculosis

New York City Department of Health, New York, NY

HAWTHORNE, V.M. u. LAUDER, I:M: (1962)

Tuberculosis in man, dog and cat

Am. Rev. Resp. Dis. 85, 858-869

HÖNER ZU BENTRUP, K., RUSSELL, W. (2001)

Trends in Microbiology

Vol. 9, No. 12, 12. Dec. 2001

HOFFMANN, T., TROUP, B., SZABO, A., HUNGERER, C. u. JAHN, D. (1995)

The anaerobic life of *Bacillus subtilis*; Cloning of the genes encoding the respiratory nitrate system

FEMS Microbiol. Letters 131, 219-225

HOOP, R.K., BÖTTGER, E.C. u. PFYFFER, G.E. (1996)

Etiological agents of mycobacterioses in pet birds between 1986 and 1995

J. Clin. Microbiol. 34, 991-992

HUNTER, D.L. (1996)

Tuberculosis in free-ranging, semi free-ranging and captive cervids

Rev. Sci. Tech. 15, 171-181

JONES, J.W. u. JENKINS, P.A. (1995)

Is tuberculosis in domestic cats hazardous to human beings ?

Lancet 346, 442-443

JORDAN, P.A., THOMSON, A.J., RALPH, E.T., GUEST, J.R. u. GREEN, J (1997)

*Fnr* is a direct oxygen sensor having a biphasic response curve

FEBS Lett. 416, 349-352

JOUANGUY, E.F., ALTARE, F., LAMHAMEDI, S., REVY, P., EMILE, J.-F., NEWPORT, M., LEVIN, M. BLANCHE, S., SEBOUN, E., FISCHER, A. u. CASANOVA, J.-L. (1996)

Deficiency in an infant with fatal Bacille Calmette-Guérin infection

N. Engl. J. Med. 335, 1956-1961

KARLSON, P., DOENECKE, D u. KOOLMAN, J. (1994)

Regulation der Genexpression

In: KARLSON, P., DOENECKE, D. u. KOOLMAN, J. [Hrsg.]: Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, 14. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 132-138

KREBS A.; KÄPPLER, W. ; KALICH, A. (1997)

Mykobakterien

In: MEISSNER, G.; SCHMIEDEL, A. [Hrsg.]: Mykobakterien und mykobakterielle Krankheiten, Teil III, VEB G. Fischer, Jena, 183-250

LI, S.F. u. DE MOSS, J.A. (1987)

Promotor region of the *nar* operon of *Escherichia coli*: nucleotide sequence and transcription initiation signals

J. Bacteriol. 169, 4614-4620

LIN, J. T. u. STEWART, V. (1998)

Nitrate Assimilation by bacteria

Adv. Micro. Physio. 39, 1-30

MAGNUSSEN, H. u. KANZOW, G. (2001)

Infektionskrankheiten der Lunge

In: GRETEN, H. [Hrsg.]: Innere Medizin, 10. Auflage, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 438-451

MALTEZOU, H.C., SPYRIDIS, P. u. KAFETZIS, D.A. (2000)

Extra-pulmonary tuberculosis in children

Arch. Dis. Child., 83, 342-346

MANABE, Y.C. u. BISHAI, W.R. (2000)

Latent *Mycobacterium tuberculosis* - persistence, patience and winning by waiting

Nature Med. 6, 1327-1329

MATTHIESSEN, W., RADENBACH, K.L. (1992)

Tuberkulose

In: SIEGENTHALER, W., KAUFMANN, W., HORNBOSTEL, H., WALLER, H.D. [Hrsg.]:

Lehrbuch der inneren Medizin, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, 829-845

MATTHYS, H. (2000)

Krankheiten der Atmungsorgane

In: GEROK, W., GRUBER, C., MEINERTZ, H., ZEIDLER, H. [Hrsg]: Die Innere Medizin, 10.

Auflage, Schattauer, Stuttgart, New York, 467-558

MC KINNEY, J.D., HÖNER ZU BENTRUP, K., MUNOZ-ELIAS, E.J., MICZAK, A., CHEN, B., CHAN, W.-T., SWENSON, D., SACCHETTINI, J.C., JACOBS JR., W.R. u. RUSSELL, D.G. (2000)

Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase

Nature 406, 735-738

MC KINNEY, J.D., JACOBS JR., W.R., BLOOM, B.R. (1998)

Persisting Problems in Tuberculosis

In: KRAUSE, R.M., GALLIN, J.I., FAUCI, A.S. [Hrsg.]: Emerging Infections, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press., 51-146

MONIES, R.J. u. HEAD, J.C.S. (1999)

Bovine Tuberculosis in housed calves

Vet. Rec. 145, 743

MORENO-VIVIAN, C. u. FERGUSON, S.J. (1998)

Definition and distinction between assimilatory, dissimilatory and respiratory pathways

Mol. Microbiol. 29, 664-666

MORRIS, R.S., PFEIFFER, D.U. u. JACKSON, R. (1994)

The Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections

Vet. Microbiol. 40, 153-177

MORTLOCK, R.P. (1998)

Bacterial growth and metabolism

In: Balows, A., Duerden, B.I. [Hrsg.]: Systematic bacteriology, Volume 2, 9<sup>th</sup> Edition, London: Arnold, 85-124

NAKANO, M.M., DAILLY, Y.P., ZUBER, P. u. CLARK, D.P. (1997)

Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth

J. Bacteriol. 179, 6749-6755

NAKANO, M.M. u. ZUBER, P. (1998)

Anaerobic growth of a „strict aerobe“ (*Bacillus subtilis*)

Annu. Rev. Microbiol. 52, 165-190

NAKATANI, H., FUJII, N., MORI, T. u. HOSHINOT, H. (2002)

Epidemiological transition of tuberculosis and future agenda of control in Japan: results of the Ad-Hoc National Survey of Tuberculosis 2000

Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 6, 198-207

NEWPORT, M.J., HUXLEY, C.M., HUSTON, S., HAWRYLOWICZ, C., OOSTRA, B.A., WILLIAMSON, R. u. LEVIN, M. (1996)

A mutation in the Interferon- $\gamma$ -receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection

N. Engl. J. Med. 335, 1941-1949

NOLAN, C.M. (1997)

Nosocomial multidrug-resistant tuberculosis – global spread of the third epidemic

J. Infect. Dis. 176, 748-751

O'REILLY, L.M. u. DABORN, C.J. (1995)

The epidemiology of *M. bovis* infections in animals and men: a review

Tuber. Lung Dis. 76 Suppl. 1: 1-46

PALMER, C.E. u. LONG, M.W. (1966)

Effects of infection with atypical mycobacteria on BCG vaccination and tuberculosis

Am. Rev. Respir. Dis. 94, 553-568

PANTEL, I., LINDGREN, P.-E., NEUBAUER, H u. GÖTZ, F. (1998)

Identification and characterization of the *Staphylococcus carnosus* nitrate reductase operon

Mol. Gen. Genet. 259, 105-114

PHILIPPOT, L., CLAYS-JOSSERAND, A., LENS, R., TRINSOUTREAU, I., NORMAND, P.  
u. POTIER, P. (1998)

Purification of the dissimilative nitrate reductase of *Pseudomonas fluorescens* and the cloning and sequence of its corresponding genes

Biochem. Biophys. Acta. 1350, 272-276

PHILIPPOT, L. u. HØJBERG, O. (1999)

Dissimilatory nitrate reductases in bacteria

Biochem. Biophys. Acta. 1446, 1-23

POTTER, L. (1999)

Competition between *Escherichia coli* strains expressing either a periplasmic or a membrane-bound nitrate reductase: does Nap confer a selective advantage during nitrate-limited growth ?

Biochemical Journal, School of Biochemistry, University of Birmingham, 77-84

RAMIREZ-ARCOS, S. BERENQUER, J. U. ERNANDEZ-HERRERO, L.A. (1997)

*Thermus thermophilus narG, narH, narJ and narI genes*

Direct submission to F.-C. Bange

RATLEDGE, C. (1982)

Nutrition, growth and metabolism

In: RATLEDGE, C. u. STANDFORD, J. [Hrsg.]: The Biology of the Mycobacteria, Volume 1, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press. 186-271

RAVIGLIONE, M.C.; SNIDER JR., D.E.; KOCHI, A. (1995)

Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic

J. Am. Med. Assoc. 273, 220-226

ROBERT-KOCH-INSTITUT (2001)

Tuberkulose in Deutschland

In: EPIDEMIOLOGISCHES BULLETIN

Nr. 46, 16. November 2001

ROSENBERGER, G. (1970)

Tuberkulose

In: ROSENBERGER, G. [Hrsg.]: Krankheiten des Rindes, 3. unveränderte Auflage, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin 1994, 856-871

SALFINGER, M. u. KAFADER, F.M. (1992)

*Mycobacteriaceae/ Prüfung biochemischer Merkmale von Mikroorganismen*

---

In: BURKHARDT, F. [Hrsg.]: Mikrobiologische Diagnostik, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart, New York

SALOMON, N.; PERLMAN, D.C. (1999)

Editorial response : Multidrug-resistant tuberculosis – globally with us for the long haul

Clin. Infect. Dis. 29, 93-95

SCHULZ, L.-C. u. TRAUTWEIN, G. (1990)

Besondere Entzündungsformen

In: SCHULZ, L.-C. [Hrsg.]: Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie, 10. Auflage, Stuttgart: Ferdinand-Enke-Verlag, 312-328

SCHULZE-RÖBBECKE, R. (1993)

Mykobakterien in der Umwelt.

Immun. Infekt. 21, 126-131

SELBITZ, H.-J. ( 2002)

Bakterielle Krankheiten der Tiere

In: ROLLE, M.; MAYR, A. [Hrsg.]: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, Enke Verlag, Stuttgart, 555-565

SHANE, S.M., CAMUS, A., STRAIN, M.G., THOEN, C.O. u. TULLY, T.N. (1993)

Tuberculosis in commercial emus (*Dromaius novaehollandiae*)

Avian Dis. 37, 1172-1176

SPIRO, S. u. GUEST, J.R. (1990)

*Fnr* and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*

FEMS Microbiol.Rev. 75, 399-428

STOKSTAD (2000)

Drug-resistant TB on the Rise

Science, 287, 2391

SZEWZYK, U., SZEWZYK, R., MANZ, W. u. SCHLEIFER, K.-H. (2000)

Mycobacterial safety of drinking water.

Annu. Rev. Microbiol. 54, 80-127

TALBOT, E.A., PERKINS, M.D., SILVA, S.F.M. u. FROTHINGHAM, R. (1997)

*Mycobacterium avium* infections in animals. Literature review.

Clin. Infect. Dis. 24, 1139-1146

THOREL, M.F., KARSNI, C., VARNEROT, A., FLEURY, C. u. VINCENT, V. (1998)

Isolation of *Mycobacterium bovis* from baboons, leopards and a sea-lion

Vet. Rec. 29, 207-212

TIERSEUCHENBERICHTE des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten  
(2001/2002)

In: Bundestierärztekammer, Gemeinschaft der deutschen Tierärztekammern und tierärztlichen

Vereinigungen e.V. [Hrsg.]: Deutsches Tierärzteblatt, Schlütersche GmbH & Co. KG, diverse Ausgaben

TYSON, K.L., COLE, J.A. u. BUSBY, S.J.W. (1994)

Nitrite and Nitrate regulation at the promoters of two *Escherichia coli* operons encoding nitrite reductase: identification of common target heptamers for both *NarP*- and *NarL*-dependent regulation

Mol. Microbiol. 13, 1045-1055

UNDEN, G. (1998)

Transcriptional regulation and energetics of alternative respiratory pathways in facultatively anaerobic bacteria

Biochem. Biophys. Acta 1365, 220-224

UNDEN, G. u. BONGAERTS, J. (1997)

Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors

Biochem. Biophys. Acta 1320, 217-234

VERORDNUNG zum Schutz gegen die Tuberkulose der Rinder

Neufassung vom 13.3.1997

VIRTANEN, S. (1960)

A study of nitrate reduction by mycobacteria

Acta. Tuberc. Scand. 47 (Suppl.), 1-116

VON REYN, C.F., CLEMENTS, C.J. u. MANN, J.M. (1987)

Human immunodeficiency virus infection and routine childhood immunisation

Lancet 343, 1137-1141

WANG, H., TSENG, C.P. u. GUNSALUS, R.P. (1999)

The *napF* and *narG* nitrate reductase operons in *Escherichia coli* are differentially expressed in response to submicromolar concentrations of nitrate but not nitrite

J. Bacteriol. 181, 5303-5308

WAYNE, L.G. u. LIN, K.-Y. (1982)

Glyoxylate metabolism and adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to survival under anaerobic conditions

Infect. Immun. 37, 1042-1049

WEBER, M.-I. (1999)

Untersuchungen zur assimilatorischen und dissimilatorischen Nitratreduktion bei Mykobakterien und Entwicklung einer Nitratreduktase-Mutante von *Mycobacterium bovis* BCG

Techn. Univ. Braunschweig, Diplomarbeit

WEISS, E. u. RUDOLPH, R. (1999)

Atmungsorgane

In: DAHME, E., WEISS, E. [Hrsg.]: Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere, 5. Auflage, Stuttgart: Ferdinand-Enke-Verlag, 70-113

WELTMAN, A.C. u. ROSE, D.N. (1993)

The safety of Bacille Calmette-Guérin vaccination in HIV infection and AIDS

AIDS 7, 149-157

WHIPPLE, D.L., CLARKE, P.R., JARNAGIN, J.L. u. PAYEUR, J.B. (1997)

Restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from captive and free-ranging animals

J. Vet. Diagn. Invest. 9, 381-386

WILESMITH, J.W. u. CLIFTON-HADLEY, R.S. (1994)

Tuberculosis in cats

Vet. Rec. 134, 359

WILSON, G. u. MILES, A. (1964)

Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity

VOL. I.5. ED. ARNOLD PUBL. LTD., London, 536-582

WILSON, M.E., FINEBERG, H.V. u. COLDITZ, G.A. (1995)

Geographic latitude and the efficacy of Bacillus Calmette-Guérin vaccine

Clin. Infect. Dis. 20, 982-991

## 9 Anhang

### 9.1 Geräte

Ausgießstation, Fa. Medite

Blockthermostat BT 100, Kleinfeld Labortechnik

DNA Agarosegelapparaturen (Subcell Model 96), Fa. Biorad

Spannungsgerät, Power Pac, Fa. Biorad

Elektroporationsgerät, Gene Pulser, Fa. Biorad

Photometer, Ultrospec III, Fa. Pharmacia LKB

Zentrifuge, Biofuge pico, Fa. Heraeus

Zentrifuge, Minifuge T, Fa. Heraeus

Zentrifuge, Varifuge S, Fa. Heraeus

Ultrazentrifuge, Fa. Beckman

Thermocycler Techne Genius, Fa. Techne

Thermocycler Techne Touchgene, Fa. Techne

Thermocycler, Fa. Landgraf

Sequencer, 373 DNA Sequencer, Fa. Applied Biosystems

Hybridisierungsöfen, Fa. Bachofer

Heizzentrifuge, Speedvac SVC 100, Fa. Savant

## 9.2 Chemikalien

Substanz	Firma	Best.-Nr.
Biozym DNA Agarose	Biozym	870055
D-Glucose-Monohydrat	Applichem	A 1349
1 kb DNA-Ladder	Gibco BRL	15615-016
Smart-DNA-Ladder	Eurogentec	MW-1700-10
Ethidiumbromid	Gibco BRL	15585-011
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Pharmacia	27-9602-01
Glycerin	Merck	40932500
LB-Broth-Base, Lennox	Difco	12780-052
LB-Agar, Lennox	Difco	0401-17-0
Natriumhydroxid Pellets	Applichem	A 1551
Middlebrook 7H9	Difco	0713-01-7
Middlebrook 7H10	Difco	0627-17-4
NIT 1	Api BioMerieux	70440
NIT 2	Api BioMerieux	70450
Phenolchloroform-isoamylalkohol	Roth	A 156.1
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen	
Buffer 1		19051
Buffer 2		19052
Buffer 3		19053
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen	12143
Rinderalbumin (BSA Fraktion V)	Boehringer Mannheim	100021
Tris	Biomol	50005
Tween80	Sigma	P8074
alle verwendeten Aminosäuren	Sigma	

Alle weiteren verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen Applichem, Fluka, Merck oder Sigma.

### 9.3 Enzyme

Enzymgattung	Name	Firma
Restriktionsendonucleasen	<i>EcoRV</i>	New England Biolab
	<i>EcoRI</i>	New England Biolab
	<i>EcoNI</i>	New England Biolab
	<i>HindIII</i>	New England Biolab
	<i>KpnI</i>	New England Biolab
	<i>XbaI</i>	Amersham Pharmacia Biotech
	<i>SacI</i>	Amersham Pharmacia Biotech
	<i>BclI</i>	New England Biolab
	<i>XhoI</i>	New England Biolab
	<i>ClaI</i>	New England Biolab
	<i>NotI</i>	New England Biolab
	<i>FseI</i>	New England Biolab
	<i>DpnI</i>	New England Biolab
	<i>Sau3A</i>	New England Biolab
Polymerasen	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Sigma
	<i>Pfu</i> Turbo Hotstart DNA Polymerase	Stratagene
zur Klonierung	T4-DNA-Ligase	Gibco BRL
verwendete Enzyme	Alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim

#### 9.4 Gebrauchsmaterialien

Artikel	Firma	Best.-Nr.
Anaerobier Topf	Merck	116.387
Anaero Gen Beutel	Oxoid	ANO 35 A
Anaerobier Indikator	Oxoid	BR 55
Photometerküvetten	Sarstedt	67.742
Elektroporationsküvetten	Biozym	748020
Falcon-Tubes 15 ml	Becton-Dickinson	352096
Röhrchen PP 50 ml	Greiner	227261
Röhrchen PP 14 ml	Greiner	318282
Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt	72.690
Reagiergefäße 0,5 ml		
Reagiergefäße 0,2 ml		
Filtrationseinheiten	Corning Costar	430517
Roller bottles	Corning Costar	430195
Sterile Square Media bottles	Nalgene	2019-0030
Impfschlingen	Sarstedt	861562050

## 9.5 Rohdaten

Tag	CF1	BCG	Negativkontrolle
0	0,068	0,025	0,65
5	6,975		0,063
7	8,928	1,468	0,037
11	10,784	2,968	-0,026

Tab. 8.1: Nitritproduktion von *M. bovis* BCG und CF1 (komplementierte Deletionsmutante) unter anaeroben Bedingungen. Die Werte entstanden durch Messung der optischen Dichte bei 440 nm und wurden zur Grapherstellung mit dem Faktor 134 in  $\mu\text{mol/l}$  umgerechnet. Es erfolgte keine Mittelwertberechnung, da aufgrund des bekannten Verhaltens von CF1 und BCG nur eine Versuchsdurchführung für die Grapherstellung herangezogen wurde.

Tag	pAP7 Mittelwert	pAP7 SD*	Negativkontrolle Mittelwert	Negativkontrolle SD*
0	-0,001	0,001	0,002	0
1	0,011	0,002	0,004	0,004
3	0,047	0,001	0,016	0,009
7	0,053	0,005	0,006	0,001
10	0,046	0,005	0,006	0,003

Tab.: 8.2: Nitritproduktion von  $mc^2155::pAP7$  unter anaeroben Bedingungen. Die Werte entstanden durch Messung der optischen Dichte bei 530 nm und wurden zur Grapherstellung mit dem Faktor 105 in  $\mu\text{mol/l}$  umgerechnet.

\* SD = Standardabweichung

Tag	pIW10 Mittelwert	pIW10 SD*	Negativkontrolle Mittelwert	Negativkontrolle SD*
0	0,106	0,008	0,029	0,001
4	8,4	0,419	0,031	0,003
6	12,032	0,916	0,022	0,003
12	15,54	0,187	0,019	0,008

Tab. 8.3: Nitritproduktion von  $mc^2155::pIW10$  unter anaeroben Bedingungen. Die Werte entstanden durch Messung der optischen Dichte bei 530 nm und wurden zur Grapherstellung mit dem Faktor

105 in  $\mu\text{mol/l}$  umgerechnet.

\* SD = Standardabweichung

Tag	pAP8 Mittelwert	pAP8 SD*	pCF3 Mittelwert	pCF3 SD*	Negativkontrolle Mittelwert	Negativkontrolle SD*
0	0,018	0,002	0,02	0,008	0,006	0,004
6	0,087	0,006	11,24	1,38	0,049	0,012
9	0,121	0,015	15,735	0,705	0,039	0,005
21	0,308	0,117	13,755	0,585	0,053	0
30	0,337	0,106	13,51	0,2	0,075	0,023

Tab. 8.4: Nitritproduktion von  $mc^2155::pAP8$  und  $mc^2155::pCF3$  unter anaeroben Bedingungen. Die Werte entstanden durch Messung der optischen Dichte bei 530 nm und wurden zur Grapherstellung mit dem Faktor 105 in  $\mu\text{mol/l}$  umgerechnet.

\* SD = Standardabweichung

Tag	pAP11 Mittelwert	pAP11 SD*	pCF3 Mittelwert	pCF3 SD*	Negativkontrolle Mittelwert	Negativkontrolle SD*
0	0,009	0,002	-0,002	0,002	0,019	0,006
1	0,558	0,074	1,293	0,243	0,012	0,01
4	7,795	1,645	7,41	0,2	0,054	0,029
7	9,46	3,59	11,525	0,625	0,135	0,043
8	11,085	1,355	11,7	2,03	0,129	0,061
11	12,79	0,6	15,62	0,75	0,145	0,026
15	14,25	0,47	17,075	0,04	0,359	0,184

Tab. 8.5: Nitritproduktion von  $mc^2155::pAP11$  und  $mc^2155::pCF3$  unter anaeroben Bedingungen. Die Werte entstanden durch Messung der optischen Dichte bei 530 nm und wurden zur Grapherstellung mit dem Faktor 105 in  $\mu\text{mol/l}$  umgerechnet.

\* SD = Standardabweichung

Tag	pAP18	Negativkontrolle
0	0,128	0,101
1	3,55	0,099
2	15,21	0,156

Tab. 8.6: Nitritproduktion von  $mc^2155::pAP18$  unter anaeroben Bedingungen. Die Werte entstanden durch Messung der optischen Dichte bei 530 nm und wurden zur Grapherstellung mit dem Faktor 105 in  $\mu\text{mol/l}$  umgerechnet. Zur Erstellung des Graphs wurde nur eine Versuchsreihe verwendet.

Tag	pAP8 Mittelwert	pAP8 SD*	pCF3 Mittelwert	pCF3 SD*	Negativko. Mittelwert	Negativko. SD*
0	0,018	0,002	0,02	0,008	0,006	0,004
6	0,087	0,006	11,24	1,38	0,049	0,012
9	0,121	0,015	15,735	0,705	0,039	0,005
21	0,308	0,117	13,755	0,585	0,053	0
30	0,337	0,106	13,51	0,2	0,075	0,023

Tab. 8.7: Nitritproduktion von  $mc^2155::pAP8$  und  $mc^2155::pCF3$  unter anaeroben Bedingungen. Die Werte entstanden durch Messung der optischen Dichte bei 530 nm und wurden zur Grapherstellung mit dem Faktor 105 in  $\mu\text{mol/l}$  umgerechnet.

\* SD = Standardabweichung

Tag	IW1::pAP8 Mittelwert	IW1::pAP8 SD*	IW1::pCF3 Mittelwert	IW1::pCF3 SD*	IW1 Mittelwert	IW1 SD*	BCG Mittelwert	BCG SD*	Negativko. Mittelwert	Negativko. SD*
0	0,015	0,001	0,018	0,001	0,011	0,001	0,01	0,003	0,009	0,003
4	0,082	0,043	1,268	0,003	0,008	0,002	0,035	0,008	0,002	0,002
13	0,151	0,071	3,16	0,55	0,011	0	0,085	0,043	0,015	0,004
18	0,201	0,173	3,41	0,45	0,005	0	0,101	0,057	0,012	0,002
27	1,038	0,954	3,94	0,68	0,008	0,002	0,137	0,033	0,01	0,006
41	1,324	1,227	4,7	0,72	0,01	0,003	0,219	0,007	0,006	0,005

Tab. 8.8: Nitritproduktion von IW1::pAP8, IW1::pCF3, IW1 und BCG unter anaeroben Bedingungen. Die Werte entstanden durch Messung der optischen Dichte bei 440 nm und wurden zur Grapherstellung mit dem Faktor 134 in  $\mu\text{mol/l}$  umgerechnet.

\* SD = Standardabweichung

Der Mittelwert der angegebenen Rohdaten errechnet sich aus der Basis von zwei Durchführungen je Versuch. Bei Abweichungen von diesem Standardverfahren ist dies ausdrücklich in der Tabellenlegende erwähnt.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation „**Untersuchungen zur Regulation der anaeroben Nitratreduktasen von *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium bovis* BCG**“ selbständig verfasst habe. Bei der Anfertigung wurden keine Hilfen Dritter in Anspruch genommen.

Ich habe keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotions-berater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir mittelbar oder unmittelbar entgeltliche Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich habe die Dissertation am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaus-hygiene der Medizinischen Hochschule Hannover angefertigt.

Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

Hannover, den 15.8.2002

Axel Puncken

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei PD Dr. med. Franz-Christoph Bange bedanken, der mir nicht nur dieses Thema überlassen hat, sondern durch seine vielen Anregungen und die stets gute Betreuung das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht hat.

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. med. vet. G. F. Gerlach für die Übernahme der Betreuung der Arbeit an der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

Prof. Dr. med. D. Bitter-Suermann danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Medizinischen Hochschule Hannover anfertigen zu dürfen.

Silvia Maaß sei an dieser Stelle - eigentlich viel zu spät - gedankt für ihre nicht enden wollende Geduld in allen Dingen des täglichen Laboralltags und für ihr Engagement, diese Arbeit voranzutreiben.

Ein ganz besonderes Dankeschön möchte ich an meine Arbeitsgruppe (Franz Bange, Silvia Maaß, Birgit Ackermann, Insa Joost, Jacqueline Lachnik, Catharina Diephaus-Borchers, Marion Stermann, Antje Bohrßen, Claudia Röhker und Torsten Jäger) richten, die in so vielerlei Hinsicht die Laborarbeit und besonders auch so manche Veranstaltungen außerhalb des Labors zu einem Vergnügen machte.

Vielen Dank sage ich meiner Familie, insbesondere Julia, für die großartige Unterstützung, auch für das tatkräftige Korrekturlesen, und für die gelegentlich nötige Aufmunterung. An dieser Stelle sind besonders meine Eltern und mein Onkel zu erwähnen, die mich das gesamte Studium hindurch unterstützt und zu diesem Schritt ermuntert haben.