

Aus dem Forschungszentrum Borstel
Leibniz Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
(Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. med. P. Zabel)
Abteilung Immunchemie und Biochemische Mikrobiologie
Laborgruppe Strukturbiochemie

**Untersuchungen zur Struktur und biologischen Aktivität
von Polysacchariden aus der Kapsel von *Mycobacterium avium***

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -
vorgelegt von

**Manon Wittkowski
aus Hamburg**

Lübeck 2005

Gutachter der Dissertation:

1. Prof. Dr. rer. nat. Otto Holst

2.

Vorsitzender:

Tag der mündlichen Prüfung:

zum Druck genehmigt, Lübeck, den

gez. Prof. Dr. rer. nat. Enno Hartmann

Dekan der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Die vorliegende Arbeit wurde in dem Zeitraum von August 2001 bis März 2005 in der Laborgruppe Strukturbiochemie des Forschungszentrums Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Otto Holst angefertigt.

A. INHALT

A. INHALT I

B. EIGENE PUBLIKATIONEN..... VI

C. ERKLÄRUNGVII

D. DANKSAGUNG VIII

E. ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... IX

F. TABELLENVERZEICHNISXII

G. ABKÜRZUNGEN..... XIII

1. EINLEITUNG..... 1

1.1 ALLGEMEINER TEIL 1

1.1.1 Die Gattung *Mycobacterium* 1

1.1.1.1 Bedeutung und Verbreitung..... 1

1.1.1.2 Taxonomie4

1.1.1.3 Charakteristika5

1.1.1.4 Virulenz7

1.1.2 Mykobakterielle Infektionen beim Menschen..... 7

1.1.2.1 Tuberkulose7

1.1.2.1.1 Pathogenese und Klinik8

1.1.2.1.2 Diagnostik und Vakzinierung..... 12

1.1.2.2 Atypische Mykobakteriosen..... 13

1.1.3 *Mycobacterium avium* 14

1.1.3.1 Epidemiologie..... 14

1.1.3.2 Klinik 17

1.1.3.3 Therapie 18

1.1.3.4 Mikrobiologie 18

1.1.3.4.1 Serovare 18

1.1.3.4.2 Koloniemorphologie..... 19

1.1.3.4.3 Wachstum20

1.2 SPEZIELLER TEIL21

1.2.1	Die Zellwand der Mykobakterien.....	21
1.2.1.1	Zytoplasmamembran	22
1.2.1.2	Mycoloyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplex	24
1.2.1.3	Lipoarabinomannan und Lipomannan.....	27
1.2.1.4	Nicht-kovalent gebundene Lipide und Glycolipide.....	29
1.2.1.5	Die Kapsel	31
1.2.2	Biosynthese mykobakterieller Zellwand-Polysaccharide.....	37
1.2.2.1	Biosynthese des Mycoloyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplexes.....	37
1.2.2.2	Biosynthese des Lipoarabinomannans	40
1.2.3	Funktion mykobakterieller Zellwand-Polysaccharide.....	41
1.2.3.1	Der Mycoloyl-Arabinogalactan-Komplex als hydrophobe Barriere...	42
1.2.3.2	Die Rolle des Lipoarabinomannans im Krankheitsverlauf.....	43
1.2.4	Funktion mykobakterieller Kapselpolysaccharide	44
2.	ZIEL DER ARBEIT	47
3.	MATERIAL UND METHODEN.....	48
3.1	MATERIAL	48
3.1.1	Chemikalien und Lösungsmittel.....	48
3.1.2	Bakterien.....	50
3.1.3	Wachstumsbedingungen.....	50
3.2	PRÄPARATIVE METHODEN.....	51
3.2.1	Ernten der Zellen	51
3.2.2	Phenol/Wasser-Extraktion	51
3.2.3	Triton-Extraktion.....	52
3.2.4	Proteinfällung mittels Ammoniumsulfat	52
3.2.5	Proteolytischer Verdau	53
3.2.6	Gelpermeations-Chromatographie (GPC).....	53
3.2.7	Trennungen mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).	54
3.2.7.1	Reverse Phase-Chromatographie.....	54
3.2.7.2	Anionenaustausch-Chromatographie	54
3.2.7.3	Affinitäts-Chromatographie mittels ConcanavalinA.....	55
3.2.8	Entsalzung durch Ultrafiltration	55

3.3	ANALYTISCHE METHODEN	56
3.3.1	Färbung nach Ziehl-Neelsen.....	56
3.3.2	Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel- Elektrophorese (Disk-SDS-PAGE)	56
3.3.2.1	SDS-PAGE im HOEFER-System	58
3.3.2.2	SDS-PAGE im BIORAD-System	58
3.3.2.3	Färbemethoden	58
3.3.2.3.1	Coomassie-Färbung.....	58
3.3.2.3.2	Silberfärbung	59
3.3.2.3.3	Perjodsäure-Schiff-Färbung (PAS-Färbung).....	60
3.3.2.4	Westernblot.....	61
3.3.3	BCA-Mikro-Assay zur Proteinbestimmung	62
3.3.4	Neutralzuckeranalyse.....	63
3.3.4.1	Gaschromatographie (GLC) der Alditolacetate und acetylierten Methylglycoside	63
3.3.4.2	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GLC-MS) der Alditolacetate und acetylierten Methylglycoside	64
3.3.5	Methanolyse	64
3.3.6	Methylierungsanalysen.....	65
3.3.6.1	Methylierungsanalysen nach Derivatisierung	65
3.3.7	Bestimmung der absoluten Konfiguration von Pentosen und Hexosen	66
3.3.8	Phosphatbestimmung.....	67
3.3.9	Fourier-Transform Infrarot- (FTIR-) Spektroskopie	68
3.3.10	Sulfatnachweis mittels analytischer Anionenaustausch-Chromatographie	68
3.3.11	Sulfatnachweis mittels Bariumchlorid	68
3.3.12	Massenspektrometrie	69
3.3.12.1	Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI TOF-MS)	69
3.3.12.2	Electrospray-Ionization Fourier-Transform-Ion-Cyclotron- Resonance-Mass Spectrometry (ESI FT-ICR MS)	70
3.3.13	Kernspin-Resonanz-Spektroskopie (NMR).....	70
3.3.14	Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA).....	71
3.3.14.1	TNF- α -ELISA	71
3.3.14.1.1	TNF- α -ELISA mit Überständen stimulierter Mauszellen	71

3.3.14.1.2	TNF- α -ELISA mit Überständen stimulierter Humanzellen	72
3.3.14.2	IFN- γ ELISA	72
3.3.14.3	IL-10-ELISA	73
3.3.14.3.1	IL-10-ELISA mit Überständen stimulierter Mauszellen	73
3.3.14.3.2	IL-10-ELISA mit Überständen stimulierter Humanzellen	73
3.3.14.4	IL-12-ELISA	73
3.3.15	Zytotoxizitäts-Tests	74
3.3.15.1	Zellkultur der Tumor-Zelllinie T-24.....	74
3.3.15.2	Isolierung und Stimulation humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut	74
3.3.15.3	Chromat-Assay	74
3.3.15.4	Apoptose-Assay	75
3.3.16	Limulus Amöbozyten Lysat (LAL)-Test.....	76
4.	ERGEBNISSE.....	77
4.1	BAKTERIENANZUCHT.....	77
4.2	EXTRAKTION VON KAPSELMATERIAL	78
4.2.1	Ergebnisse der Triton-Extraktion	79
4.2.2	Ergebnisse der Proteinpräzipitation.....	81
4.2.3	Auftrennung der proteinfreien Extrakte durch Gelpermeations- Chromatographie	84
4.3	ISOLIERUNG VON GALACTANSULFATEN	86
4.4	ISOLIERUNG UND UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTUR VON ARABINO- MANNANEN.....	90
4.4.1	Isolierung der Arabinomannane durch Affinitäts-Chromatographie.....	93
4.4.2	Strukturanalysen der Arabinomannane	96
4.4.2.1	Ergebnisse der Neutralzuckerbestimmung	96
4.4.2.2	Ergebnisse der Methylierungsanalysen	98
4.4.2.2.1	Methylierungsanalysen der Fraktion A-Polysaccharide.....	98
4.4.2.2.1.1	Methylierung mit Methyljodid	98
4.4.2.2.1.2	Methylierung mit deuteriertem Methyljodid	102
4.4.2.2.2	Methylierungsanalysen der Arabinomannane	107
4.4.2.3	Ergebnisse der Massenspektrometrie	111

4.4.2.3.1 MALDI-TOF Massenspektrometrie	112
4.4.2.3.2 ESI FT-ICR Massenspektrometrie	114
4.4.2.4 Ergebnisse der NMR-Spektroskopie	126
4.5 UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT DER ARABINOMANNANE	138
4.5.1 TNF- α -Freisetzung stimulierter muriner Makrophagen und humaner dendritischer Zellen	138
4.5.2 IL-10-Freisetzung stimulierter muriner Makrophagen und humaner dendritischer Zellen	141
4.5.3 INF- γ -Freisetzung stimulierter humaner mononukleärer Zellen.....	143
4.5.4 IL-12	145
4.5.5 Zytotoxizitäts-Tests	145
4.5.6 Apoptose-Tests	148
5. DISKUSSION	152
5.1 ANZUCHT DER MYKOBAKTERIEN	155
5.2 ISOLIERUNG DER POLYSACCHARIDE	157
5.3 STRUKTURANALYSEN	163
5.4 BIOLOGISCHE AKTIVITÄT	167
5.5 AUSBLICK.....	172
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	175
7. SUMMARY.....	176
8. LITERATURVERZEICHNIS	177
9. LEBENSLAUF.....	200

B. EIGENE PUBLIKATIONEN

C.1 Posterpräsentationen

1. Lepp U, Pauli G, Wittkowski M, Becker WM. Anaphylactic shock after ingestion of pork kidney: case reports and western blot studies. Abstract Book of 8th International Symposium on Immunological, Chemical and Clinical Problems of Food Allergy. Venezia. 2001:34.
2. Gruhl A, Wittkowski M, Holst O. Are Capsule Components of *Mycobacterium avium* Involved in Cellular Adhesion? Abstract Book of 2nd International Symposium on Conformational Control of Biomolecular Function. Lübeck. 2001:43.
3. Gruhl A, Wittkowski M, Engel R, Holst O. Isolation and Characterisation of Capsular Components of *Mycobacterium avium*. Symposium of the Resource Center, Glycostructures in Biosystems VII: Glycostructures in Biological Systems – Synthesis and Function. Hamburg. 2001.
4. Wittkowski M, Engel R, Holst O. Isolation and Investigation of Capsule Components of *Mycobacterium avium*. Abstract Book of The Carbohydrate Workshop. Borstel. 2002: Poster 04.
5. Wittkowski M, Holst O. Investigation on a Capsular Galactose-containing Polysaccharide of *Mycobacterium avium*. Abstract Book of The Carbohydrate Workshop. Güstrow. 2003: P 1.

C.2. Originalarbeiten

Taylor AM, Engel R, Torrelles J, Wittkowski M, Wang B, Helmholtz H, Brennan PJ, Thomas-Oates JE, Holst O. Protein constituents of the capsule of *Mycobacterium avium* are mannosylated. J Bacteriol. Eingereicht zur Publikation

Wittkowski M, Brandau S, Reiling N, Lindner B, Torrelles J, Brennan P, Holst O. Structural morphotype specific differences in capsular arabinomannans from *Mycobacterium avium* with reference to biological activity. In Vorbereitung

C.3 Vortrag

Wittkowski M. Studies on Capsular Polysaccharides of *Mycobacterium avium*. 2nd German-Polish-Russian Meeting on Bacterial Carbohydrates. Moskau. 2002.

C. ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit in Inhalt und Form selbständig verfasst und keine weiteren als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin

D. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die in irgendeiner Weise zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

an erster Stelle **Prof. Dr. Dr. Ernst Theodor Rietschel**, Leiter der Abteilung Immunchemie und Biochemische Mikrobiologie und Direktor des Forschungszentrums Borstel, für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in dieser Forschungseinrichtung anzufertigen,

sowie meinem Doktorvater **Prof. Dr. Otto Holst**, Leiter der Laborgruppe Strukturbiochemie, u. a. für die Überlassung eines überaus interessanten Themas, den ausgezeichneten Arbeitsbedingungen sowie für die Ermöglichung, meine Ergebnisse auf Kongressen zu präsentieren.

Ich danke allen Mitarbeitern der Laborgruppe Strukturbiochemie, die mich äußerst freundlich in ihre Mitte aufgenommen haben.

Mein aufrichtiger Dank gilt **Dipl.-Ing. Regina Engel** für ihre stetige Diskussionsbereitschaft, moralische und bedingungslose Unterstützung, zahlreiche gesellige Abende, und für die Korrektur dieser Arbeit. Danke für alles, Regina.

Ich bedanke mich bei **Dr. Zbigniew Kaczynski** für die Aufnahme von NMR-Spektren, und **Marc Schnäkel** für seine unentbehrliche Hilfe bei Software- und Hardware-Problemen,

Ich danke **Hermann Moll**, Laborgruppe Immunchemie, für die Durchführung von GC-MS-Untersuchungen,

PD Dr. habil. Buko Lindner, Laborgruppe Biophysik, für die außerordentlichen Bemühungen hinsichtlich massenspektrometrischer Analysen,

Prof. Dr. Stefan Ehlers, Leiter der Laborgruppe Molekulare Infektiologie, für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz im S2-Labor, **Dr. Norbert Reiling**, **Dipl.-Biochem. Dagmar Schneider** sowie **Svenja Kröger** für die Zytokin-Messungen und Apoptose-Tests sowie hilfreichen Diskussionen,

sowie **PD Dr. habil. Sven Brandau**, Leiter der Laborgruppe Immuntherapie, **Dipl.-Biochem. Jessica Mittelstädt** und **Gabriele Bentien** für die Ermöglichung der humanen *in vitro*-Assays, insbesondere der Zytotoxizitäts-Tests.

Ein ganz besonderes „Dankeschön“ geht an meinen Freund **Mike Kubik**, der stets an mich geglaubt, mich unterstützt und motiviert hat.

E. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Von der Weltgesundheitsorganisation geschätzte weltweite Tuberkulose-Verteilung für das Jahr 2001.	2
Abbildung 2: Übersicht über die frühen Makrophagenreaktionen als Folge der Phagozytose von Mykobakterien.	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung der mykobakteriellen Zellhülle.....	21
Abbildung 4: Grundstruktur der mykobakteriellen Phosphatidylinositolmannoside (PIM).	23
Abbildung 5: Wiederholungseinheit des mykobakteriellen Peptidoglycans.....	24
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Mycoloyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplexes als Hauptbestandteil der mykobakteriellen Zellwand.	25
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Struktur des mykobakteriellen Lipoarabinomannans.	27
Abbildung 8: Struktur des Glycopeptidolipids aus <i>M. avium</i> Serovar 2.....	30
Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Aufnahmen mykobakterieller Zellen (<i>M. avium</i> Stamm 104) vor (a) und nach (b) Extraktion mit Phenol.....	32
Abbildung 10: Strukturausschnitt des Glucans aus der Kapsel von <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	35
Abbildung 11: Vorgeschlagenes Strukturmodell des Arabinomannan aus der Kapsel von <i>M. tuberculosis</i>	36
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Biosynthese des mykobakteriellen Mycoloyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplexes.	38
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Biosyntheseweges der mykobakteriellen Lipoglycane Lipomannan und Lipoarabinomannan.....	40
Abbildung 14: Auf Nitrozellulosemembran gewachsene <i>M. avium</i> Kolonien (Stamm 2151, Serovar 2, Morphotyp SmT) nach fünf Wochen Kultivierungsdauer (a) mit Nachweis säurefester Stäbchen durch Ziehl-Neelsen-Färbung (b).	77
Abbildung 15. Extraktionsschema zur Gewinnung von Kapselpolysacchariden aus <i>M. avium</i> 2151 SmT und SmO.	78
Abbildung 16: SDS-Gel (a) und Lektin-Blot (b) der Sedimente und Überstände nach der Fällung der Triton-Phase aus <i>M. avium</i> Stamm 104.	80
Abbildung 17: SDS-Polyacrylamid-Gel nach Perjodsäure-Schiff- (PAS) und anschließender Coomassie-Färbung zum Kohlenhydrat- und Proteinnachweis in Fraktionen aus <i>M. avium</i> SmT und SmO.	82
Abbildung 18: Gelpermeations-Chromatogramm der proteinfreien Extrakte aus <i>M. avium</i> SmO (a) und SmT (b).	85
Abbildung 19: Sulfatnachweis mittels analytischer Anionenaustausch-Chromatographie der proteinfreien Fraktion nach Sephadex-G-50 aus SmT.	88

Abbildung 20: ^1H -NMR-Spektrum der Fraktion 2 nach Sephadex-G-50 aus SmT mit Ausschnittsvergrößerung der Anomeren-Region.	92
Abbildung 21: ^1H -NMR-Spektrum der Fraktion 2 nach Sephadex-G-50 aus SmO mit Ausschnittsvergrößerung der Anomeren-Region.	92
Abbildung 22: Übersicht über die Aufreinigung der Polysaccharide (siehe 2, Abbildung 18) aus SmO und SmT.	93
Abbildung 23: Übersicht über die Trennungen von Fraktion 2 nach Sephadex-G-50 aus SmO (I, III) sowie aus SmT (II, IV) mittels Affinitäts-Chromatographie.	94
Abbildung 24: Zuckerszusammensetzung der Fraktion A-Polysacchariden nach Affinitäts-Chromatographie im Vergleich zwischen SmO und SmT.	96
Abbildung 25: Zuckerszusammensetzung der Fraktion B-Polysacchariden nach Affinitäts-Chromatographie im Vergleich zwischen SmO und SmT.	97
Abbildung 26: Chromatogramm der partiell methylierten Alditolacetate nach Methylierung mit Deutero-Methyljodid des Fraktion A- Polysaccharids aus SmT.	103
Abbildung 27: EI-Massenspektrum des Gemisches aus 1-Deutero-1,4,5-tri- <i>O</i> -acetyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -deutero-methyl-hexitol und 1-Deutero-1,4,5-tri- <i>O</i> -acetyl-6- <i>O</i> -methyl-2,3-di- <i>O</i> -deutero-methyl-hexitol.	104
Abbildung 28: EI-Massenspektrum eines 1-Deutero-1,4,5-tri- <i>O</i> -acetyl-6- <i>O</i> -methyl-2,3-di- <i>O</i> -deutero-methyl-hexitols.	105
Abbildung 29: EI-Massenspektrum des Gemisches aus 1-Deutero-1,5-di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -deutero-methyl-hexitol und 1-Deutero-1,5-di- <i>O</i> -acetyl-3- <i>O</i> -methyl-2,4,6-tri- <i>O</i> -deutero-methyl-hexitol.	106
Abbildung 30: MALDI-TOF-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmO. .	113
Abbildung 31: ESI-Massenspektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmO.	117
Abbildung 32: ESI-Massenspektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmT.	122
Abbildung 33: ^1H -NMR-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmT.	127
Abbildung 34: ^1H -NMR-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmO.	127
Abbildung 35: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmT.	128
Abbildung 36: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmO.	128
Abbildung 37: ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmT.	130
Abbildung 38: ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmO.	130
Abbildung 39: Ausschnitt aus dem HMQC-NMR-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmT.	132
Abbildung 40: Ausschnitt aus dem HMQC-NMR-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmO.	132
Abbildung 41: Ausschnitt aus dem ROESY-NMR-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmT.	137

Abbildung 42: Ausschnitt aus dem ROESY-NMR-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmO.	137
Abbildung 43: TNF- α -Freisetzung muriner Knochenmarks-Makrophagen nach Stimulation mit Fraktionen A und B aus SmO und SmT.	139
Abbildung 44: TNF- α -Freisetzung humaner dendritischer Zellen nach Stimulation mit Fraktionen A und B aus SmT und SmO.	140
Abbildung 45: IL-10-Freisetzung muriner Knochenmarks-Makrophagen nach Stimulation mit Fraktionen A und B aus SmO und SmT.	142
Abbildung 46: IL-10-Freisetzung humaner dendritischer Zellen nach Stimulation mit Fraktionen A und B aus SmT und SmO.	143
Abbildung 47: INF- γ -Freisetzung humaner mononukleärer Zellen nach Stimulation mit Fraktionen A und B aus SmO und SmT.	144
Abbildung 48: IL-12-Freisetzung humaner dendritischer Zellen nach Stimulation mit Fraktionen A und B aus SmT und SmO.	145
Abbildung 49: Zytotoxizität humaner mononukleärer Zellen (MNC) nach Stimulation mit 10 μ g der Fraktionen A und B aus SmO und SmT gegen die humane Blasen-tumor-Zelllinie T24.	146
Abbildung 50: Zytotoxizität humaner mononukleärer Zellen (MNC) nach Stimulation mit 40 μ g der Fraktionen A und B aus SmO und SmT gegen die humane Blasen-tumor-Zelllinie T24.	147
Abbildung 51: Anteile viabler und apoptotischer humaner Tumor-Zellen nach Stimulation mit Fraktion A und B aus SmO und SmT.	149
Abbildung 52: Anteile viabler und apoptotischer humaner Monozyten nach Stimulation mit Fraktion A und B aus SmO und SmT.	150

F. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht über die Ausbeuten nach Zellernte, Kapselisolierung, Triton-Extraktion und Proteinpräzipitation im Vergleich zwischen SmT und SmO.....	81
Tabelle 2: Übersicht über die Zuckerzusammensetzung der Fraktionen 2 (siehe Abbildung 18) nach Sephadex-G-50 aus SmO und SmT.....	90
Tabelle 3: Übersicht über die gewonnenen Substanzmengen nach Affinitäts-Chromatographie und Gelpermeations-Chromatographie.....	96
Tabelle 4: Übersicht über die identifizierten partiell methylierten Alditolacetate nach Methylierungsanalyse der Fraktion A-Polysaccharide aus SmT und SmO.	99
Tabelle 5: Übersicht über die partiell methylierten Alditolacetate nach Methylierungsanalyse der ConA-positiven Arabinomannane aus SmT und SmO.	109
Tabelle 6: Übersicht über die monoisotopischen gemessenen und berechneten Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse der Fragmente des Fraktion B-Arabinomannans aus SmO nach ESI FT-MS.....	121
Tabelle 7: Übersicht über die monoisotopischen gemessenen und berechneten Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse der Fragmente des Fraktion B-Arabinomannans aus SmT nach ESI FT-MS.	124
Tabelle 8: ¹ H-NMR-Daten des Arabinomannans aus SmT.....	134
Tabelle 9: ¹ H-NMR-Daten des Arabinomannans aus SmO.	135
Tabelle 10: Übersicht der biologischen Aktivitäten der Fraktionen A und B (10 µg ml ⁻¹) aus SmO und SmT <i>in vitro</i>	151

G. ABKÜRZUNGEN

Ac	Acetyl
AEC	Anion Exchange-Chromatography
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AG	Arabinogalactan
AK	Antikörper
amu	Atomare Masseneinheit
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Ara	Arabinose
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion
BAK	BCG-aktivierte Killerzellen
BCA	Bicinchoninic acid
BCG	Bacille Calmette-Guérin
Bis	<i>N,N'</i> -Methylen-Bisacrylamid
CD	Cluster of Differentiation
CI	Chemische Ionisation
ConA	ConcanavalinA
COSY	Correlation Spectroscopy
CR	Complement Receptor
CSD	Capillary Skimmer Dissociation
DAP	Diaminopimelinsäure
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Deoxyribonucleic acid
EI	Electron Impact
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESI	Elektrospray-Ionisation
ETZ	Elektronentransparente Zone
<i>f</i>	Furanose
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fetal Calf Serum
Gal	Galactose
Glc	Glucose
GLC	Gas-Liquid-Chromatography
GM-CSF	Granulocyte/Monocyte Colony-Stimulating Factor
GPC	Gelpermeations-Chromatographie
GPL	Glycopeptidolipid
Hex	Hexose
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IL	Interleukin
INF	Interferon
IR	Infrarot
LAM	Lipoarabinomannan
LM	Lipomannan
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> -complex
mAGP	Mycoloyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplex
Man	Mannose

MAI-Komplex	<i>Mycobacterium-avium-intracellulare</i> -Komplex
MALDI	Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionisation
ManLAM	Mannosyliertes Lipoarabinomannan
MCSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MDR	Multi Drug-Resistant
Me	Methyl
MMR	Makrophagen-Mannose-Rezeptor
mmu	Atomare Milli-Masseneinheit
MNC	Mononuclear Cells
MOI	Multiplicity of Infection
MOTT	Mycobacteria Other Than Tubercle Bacilli
MS	Massenspektrometrie
MWCO	Molecular Weight Cut Off
<i>m/z</i>	Masse/Ladung
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NTM	Nicht-Tuberkulöse Mykobakterien
<i>p</i>	Pyranose
p.A.	Pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Periodic Acid Schiff Reagent
PEG	Polyethylenglykol
Pent	Pentose
PI	Phosphoinositol
PI-GAM	Phosphoinositol-glycero-arabinomannan
PIM	Phosphatidylinositolmannosid
POD	Peroxidase
ppm	Parts Per Million
psi	Pounds Per Squareinch
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rha	Rhamnose
RNA	Ribonucleic Acid
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
Rg	Rough
Rib	Ribose
ROESY	Rotating Frame Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
SDS	Sodiumdodecylsulphate
SmO	Smooth-opaque
SmT	Smooth-transparent
ssp.	Subspezies
sv.	Serovar
TB	Tuberkulose
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
term	Terminal
TGF-β	Transforming-Growth-Factor-β
T _H -Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TOF	Time of flight (Flugzeitanalysator)
WHO	World Health Organisation

1. EINLEITUNG

1.1 Allgemeiner Teil

1.1.1 Die Gattung *Mycobacterium*

1.1.1.1 Bedeutung und Verbreitung

Mykobakterielle Infektionen spielen derzeit wieder weltweit eine bedeutende Rolle. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist bereits ein Drittel der Weltbevölkerung mit dem Tuberkulose-Erreger infiziert. Jedes Jahr werden rund 1,8 Millionen Todesfälle infolge von Tuberkulose (TB) verzeichnet. Tuberkulose ist somit die häufigste bakteriell bedingte Todesursache. Die WHO erwartet bis zum Jahre 2020 weltweit eine Milliarde Neuinfektionen, 150 Millionen Neuerkrankungen und in der Folge bis zu 36 Millionen Todesfälle. Die Bedeutung dieser Pandemie ist mit dem vermehrten Auftreten der AIDS-Erkrankung, sowie von multiresistenten (MDR, multidrug resistant) Stämmen dramatisch gestiegen [1;2]. Vor Estland, Lettland, einigen Teilen Chinas, in denen MDR-Fälle mehr als 10% aller Tuberkulose-Erkrankungen überstiegen [3;4], lag 2004 die weltweit höchste Rate von multiresistenten *M. tuberculosis*-Stämmen bei 13,7% in der russischen Föderation. Dabei ist nach Angaben der WHO die Tendenz für diese Region steigend [5].

Mykobakterien sind generell weltweit verbreitet (siehe 1.1.3.1), ihr Vorkommen hängt jedoch stark von Klima und Lebensstandard ab. So tritt *Mycobacterium ulcerans* nur in tropischen bis subtropischen Klimazonen auf [6]. *Mycobacterium tuberculosis* hingegen ist klimaunabhängig verbreitet, ist dennoch hauptsächlich in den Entwicklungsländern ein medizinisches Problem ersten Ranges. Im Jahre 2000 lag die weltweit höchste Tuberkulose-Inzidenz in Afrika mit rund 300 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner (siehe Abbildung 1).

Ein großes Problem stellen die Koinfektionen von TB mit HIV (humanes Immundefizienz-Virus) dar. So gingen weltweit 9% aller Neuerkrankungen unter den Erwachsenen im Alter von 15-49 Jahren mit einer HIV-Infektion einher. Dieser Anteil

lag in Afrika bei 26% und in den USA als Industrienation sogar um 31%. Im Jahr 2000 waren weltweit 12% aller Todesfälle als Folge von TB mit einer HIV-Infektion assoziiert. Allein in Südafrika leben nach Schätzungen der WHO zwei Millionen koinfizierte Menschen [7].

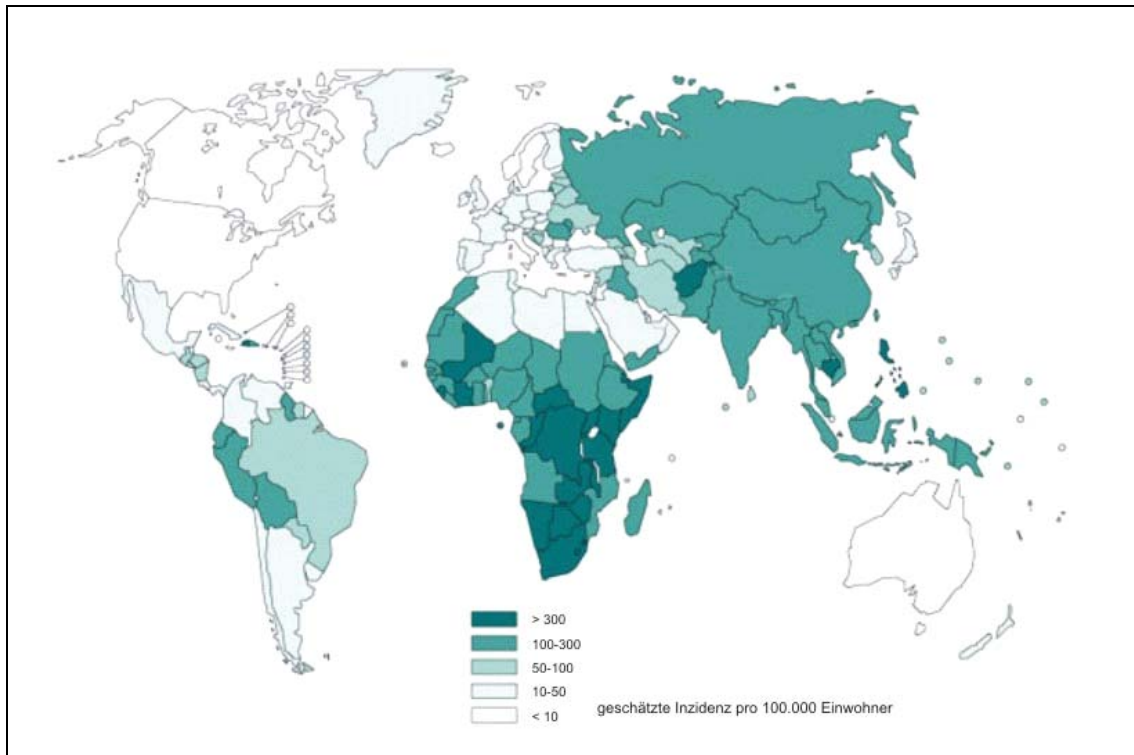


Abbildung 1: Von der Weltgesundheitsorganisation geschätzte weltweite Tuberkulose-Verteilung für das Jahr 2001.

Die weltweit höchste Tuberkulose-Inzidenz liegt in Afrika mit über 300 und in Asien mit rund 200 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner. Ähnlich wie in Westeuropa werden in Deutschland jährlich durchschnittlich 11.000 Neuerkrankungen statistisch erfasst, was einer Inzidenz von 13 auf 100.000 Einwohner entspricht. In den USA ist die Tuberkulose-Inzidenz um 50% geringer als in Deutschland [8].

Im Zuge der fortschreitenden HIV-Pandemie wurde somit durch die Weltgesundheitsorganisation eine Strategie zur weltweiten, kontrollierten Tuberkulose-Bekämpfung im so genannten DOTS-Programm (directly observed therapy, short course) entwickelt, in dem die Therapieadhärenz, wie u. a. die Medikamenten-Einnahme durch die Tuberkulose-Patienten, durch ärztliche Aufsicht überwacht wird [9].

Als weiterer Vertreter der Mykobakterien verursacht *M. leprae* die Lepra-Erkrankung. Eine Vielzahl von Manifestationen ist bekannt mit z. T. asymptomatischen, aber auch schweren Verlaufsformen mit starken Einschränkungen bis hin zu Lähmungen [10]. Die

weltweit höchste Inzidenz ist in Afrika und Südostasien zu verzeichnen. In Industrieländern ist die Lepra nicht verbreitet und tritt nur in Einzelfällen als Folge von Einreisenden aus Übersee auf [11]. Durch erfolgreiche WHO-Programme ist die Lepra-Prävalenz im Gegensatz zur Tuberkulose in den letzten 15 Jahren um rund 85% reduziert worden, obwohl die Population in den betroffenen Regionen stark angestiegen ist [12].

Ebenfalls von humanmedizinischer Bedeutung sind Infektionen mit *M. avium*. Dieser Erreger wird mit *M. intracellulare* zum *M. avium*-Komplex (MAC) zusammengefasst. MAC-Infektionen treten vermehrt in Patienten mit geschwächtem Immunsystem auf, wie onkologische Patienten, medikamentös immunsupprimierte und AIDS-Patienten, bei denen vorwiegend disseminierte Formen zu beobachten sind. Der am häufigsten isolierte Erreger aus AIDS-Patienten ist *M. avium*. Auch im gesunden Organismus können sich MAC-Infektionen manifestieren. Bei Kindern verursacht eine solche Infektion typischerweise zervikale Lymphknoten-Läsionen. Bei Erwachsenen mit vorgeschädigten Lungen können sich chronische Lungeninfektionen ausbilden (siehe 1.1.3.2). Jedoch kommt es bei immunkompetenten Individuen lediglich selten zu klinischen Erscheinungsbildern, so dass eine solche Infektion nur durch Hauttests diagnostiziert werden kann [13;14;15].

Mykobakterien infizieren Mensch und Tier. Eine Erkrankung durch *M. tuberculosis* tritt ausschließlich beim Menschen auf, wobei Rinder, Katzen und unter Umständen auch Hunde als Wirte dienen. Typischerweise tritt *M. bovis* im Rind auf (siehe 1.1.1.2), kann jedoch, wie *M. avium*, durch das Tier (Schaf, Ziege, Schwein, Katze, Hühnervogel) auf den Menschen übertragen werden [16;17].

Alle obligat parasitären Säugertuberkulose-Erreger, die sich in der unbelebten Natur nicht replizieren können, sind in der unmittelbaren Umgebung von Mensch und Tier verbreitet. Vertreter des MAC sind im Boden, in Grünfütter, Weiden und roher Kuhmilch zu finden. Saprophytäre Mykobakterien sind generell ubiquitär in der Umwelt verbreitet, z.B. in Ackerböden, Staub (v. a. *M. fortuitum*), Abwasser, Klärschlamm, natürlichen und künstlichen Gewässern, Schwimmbädern, Aquarien (v. a. *M. marinum*) und Wasserleitungen (u. a. *M. gordonae* und *M. kansasii*) [6;18].

1.1.1.2 Taxonomie

Die Familie *Mycobacteriaceae* aus der Ordnung der Aktinomyzeten besteht aus der einzigen Gattung *Mycobacterium* [19]. Diese wiederum umfasst mehr als 100 Spezies [20], die obligat oder fakultativ pathogen sowie ausschließlich saprophytär sind [21]. Eine Unterteilung dieser Gattung erfolgt nach verschiedenen Kriterien:

- Nach klinischen Gesichtspunkten unterscheidet man innerhalb des Genus *Mycobacterium* zwischen den klassischen Tuberkulose-Erregern (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*), dem Lepra-Erreger (*M. leprae*), den Erregern des MAC (*M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, *M. avium* ssp. *silvaticum*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*) und den so genannten atypischen Mykobakterien (siehe 1.1.2.2).

- Aufgrund ihrer Pathogenität werden die obligat pathogenen und direkten Zoonose-Erreger (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*) als „*M. tuberculosis*-Komplex“ von den fakultativ pathogenen Mykobakterien als „nicht-tuberkulöse Mykobakterien (non-tuberculous mycobacteria, NTM)“ oder „Mycobacteria other than Tubercle Bacilli (MOTT)“ abgegrenzt. Als Untergruppe der NTM werden *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. marinum* und *M. xenopi* als MAI-Komplex oder MAC (*Mycobacterium avium-intracellulare*-Komplex, siehe 1.1.1.1) aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeiten zusammengefasst. Der Erreger der Johne'schen Krankheit des Rindes [22], *M. paratuberculosis*, ist von großer veterinärmedizinischer Bedeutung [23] und wird aufgrund von ähnlichen biochemischen Eigenschaften als Subspezies von *M. avium* klassifiziert [24]. Weitere Vertreter aus der Gruppe der NTM von humanmedizinischer Bedeutung sind *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai* und *M. simiae*, da sie unter gewissen Bedingungen Mykobakteriosen des Menschen verursachen können [25].

- Nach wachstumsbiologischen Eigenschaften unterteilt man diese Gattung nach einem von RUNYON vorgeschlagenen Schema in vier Gruppen [26]. Dabei unterscheidet man zwischen Wachstumsgeschwindigkeit (schnell und langsam wachsende Spezies) und Pigmentationsverhalten (skotochromogen und photochromogen). Langsam wachsende Keime benötigen länger als sieben Tage, um - von einem verdünnten Inokulum ausgehend - auf festen Medien sichtbare Kolonien auszubilden. Skotochromogene Arten bilden Pigment unabhängig von den Lichtverhältnissen, photochromogene Mykobakterien hingegen benötigen Licht zur Pigmentbildung [27;19].

Die Differenzierung der Spezies erfolgt heutzutage weniger nach biochemischen Kriterien, sondern vorwiegend durch molekularbiologische Methoden [28;29]. Das ermöglicht nicht nur, Mykobakterien vergleichsweise schnell zu identifizieren, sondern auch Spezies-Verwandtschaften aufzuklären, sowie phylogenetische Untersuchungen an diesem Genus durchzuführen. Als Zielstrukturen zur Differenzierung dienen ribosomale RNA-Gene, in denen sich genus- und speziesspezifische Sequenzbereiche befinden, die zur Identifizierung verschiedener Spezies herangezogen werden können. Dazu wird ein Fragment aus dem 16S rRNA-Gen durch eine Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) amplifiziert und anschließend mit entsprechenden spezies-spezifischen DNA-Sonden zur Bestimmung der Art hybridisiert. Mittlerweile sind zahlreiche 16S rRNA-Gene verschiedener Mykobakterien sequenziert worden, so dass über eine vergleichende Analyse dieser Sequenzen die Phylogenie dieser Gattung beschrieben werden konnte [30;31;32;33].

1.1.1.3 Charakteristika

Mykobakterien sind unbewegliche, säurefeste Stäbchen (siehe unten). Sie erreichen eine Länge von 3-5 µm und eine Breite von 0,2-0,6 µm. Die somit relativ kurzen, schlanken Stäbchen sind leicht gekrümmt und bilden nur selten Filamente, jedoch im Gegensatz zu vielen anderen Aktinomyzeten weder ein Luftmyzel noch Sporen [34]. Sie sind aerob bis mikroaerophil (5-10% CO₂) und wachsen bei einer optimalen Temperatur von 37-38°C auf komplexen Nährböden vorwiegend langsam und zum Teil in variabler Koloniemorphologie (siehe 1.1.3.4.2) [35]. Hinsichtlich der Wachstumstemperaturen verhalten sich Mykobakterien wie alle in Warmblütlern lebende Pathogene mesophil. Eine typische Erscheinung von virulenten Stämmen ist die Bildung von so genannten Cords, d. h. zopfförmiges Wachstum, während attenuierte Stämme in unregelmäßiger Anordnung wachsen [36]. Die Struktur, die dieses Wachstum hervorruft, wurde Cord-Faktor (siehe 1.2.1.4) genannt und gilt als Virulenzfaktor [37].

Durch die Gram-Färbung lassen sich Mykobakterien zwar schwach anfärben [295], werden aber aufgrund von strukturellen Unterschieden dennoch nicht zur Gruppe der Gram-positiven Bakterien gezählt (siehe 1.2.1).

Durch den großen Anteil an Mykolsäuren in ihrer Zellwand (siehe 1.2.1) besitzen sie einen sehr hohen charakteristischen Lipidgehalt, der einerseits ein Verklumpen der

Zellen in wässrigen Lösungen hervorruft und andererseits für die Säurefestigkeit verantwortlich ist [34].

Mykobakterien sind gegen Säuren und Alkalien besonders resistent. Sie können eine Behandlung mit 6-8%iger Schwefelsäure ohne Schaden überleben [38]. Alle anderen vegetativen Bakterienformen sterben bei derart hohen Säurekonzentrationen ab. Das wird sich beim Anlegen von *M. tuberculosis*-Kulturen zunutze gemacht, um das Ausgangsmaterial von Begleitkeimen zu befreien [39]. Zur Dekontamination von Sputum-Proben aus Tuberkulose-Patienten wird routinemäßig 1 M Natronlauge eingesetzt. Unter diesen Bedingungen sterben die meisten Mikroorganismen ab, während viele der *M. tuberculosis*-Zellen überleben, um dann in sterilen Kulturen angezüchtet werden zu können [40]. Mykobakterien sind ebenso widerstandsfähig gegen Eintrocknen [41] und Gefrieren. Sie überleben die Hitze-fixierung und chemische Behandlungen der Ziehl-Neelsen-Färbung (siehe 3.3.1). Gängige Methoden zur Keimabtötung, wie Inkubation in 1% wässriger Phenol-Lösung, überleben sie ebenfalls. Durch Temperaturen oberhalb von 65°C bei einer Einwirkzeit länger als 30 min- wie beim Vorgang des Pasteurisierens- sterben die Zellen jedoch ab. In der Umwelt, wie Abwässern, Fäkalien oder Gülle, sind Mykobakterien bis zu 6 Monate überlebensfähig, in trockener Umgebung sogar länger. Als Kulturen sind sie bis 12 Jahre viabel. Sehr sensibel hingegen reagieren sie auf direkte UV-Strahlung und oxidierende Verbindungen. Resistenzen gegen Farbstoffe, Antibiotika und Antituberkulostatika sind jedoch speziesspezifisch [34].

Eine Besonderheit der Mykobakterien ist, dass sie von Abwehrzellen des Immunsystems, den Makrophagen, zwar phagozytiert aber nicht abgetötet werden und sich sogar intrazellulär replizieren [42]. Um von Makrophagen aktiv aufgenommen zu werden, interagieren sie mit zahlreichen Rezeptoren, wie Komplement-Rezeptoren [43], Fibronectin-Rezeptoren [44], Makrophagen-Mannose-Rezeptoren [45], Integrinen [46], CD14 [47], Mannose-Fucose-Rezeptoren [48] und Surfactant-Protein-Rezeptoren [49;50;51]. Nach neuen Erkenntnissen ist auch ein u. a. HIV (gp120)-bindender Rezeptor auf dendritischen Zellen als C-Typ-Lektin für die Bindung terminal mannosylierter Zellwand-Komponenten, wie Lipoarabinomannan (siehe 1.2.1.3) aus *M. tuberculosis*, verantwortlich: DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin) [52;53].

Folglich sind multiple Rezeptor-Ligand-Systeme in der Adhärenz von Mykobakterien an Makrophagen involviert. Auf bisher unbekanntem Wege sind sie in der Lage, nach

der Phagozytose durch Makrophagen die Fusion von Lysosom und Phagosom zu inhibieren [40] (siehe 1.2.4). Damit haben sie eine Strategie entwickelt, der Immunabwehr optimal zu entgehen [34]. Die meisten intrazellulären Bakterien verhindern die Reifung des Phagosoms und schaffen sich so einen optimalen Lebensraum innerhalb der Wirtszelle [54;55;56].

1.1.1.4 Virulenz

Von einigen Mykobakterien existieren Rauformen, die virulenter sind als Glattformen. *Mycobacterium tuberculosis*, *M. microti* und *M. bovis* wachsen ausschließlich in Rauformen, *M. avium* zeigt sowohl raue als auch glatte Kolonien (siehe 1.1.3.4.2). Die Virulenz ist ferner abhängig von einer erworbenen Resistenz gegen Isoniazid durch den Verlust des Cord-Faktors [57;58] (siehe 1.2.1.4). Beim MAI-Komplex hängt die Virulenz auch vom Serovar ab (siehe 1.1.3.4.1). Mykobakterien besitzen zahlreiche Serovare und Antigenfaktoren pro Spezies [6;59].

1.1.2 Mykobakterielle Infektionen beim Menschen

Es wird generell unterschieden zwischen Tuberkulosen, die bei Säugern durch den *M. tuberculosis*-Komplex (siehe 1.1.1.1), bei Vögeln durch *M. avium* und bei wechselwarmen Vertebraten durch *M. marinum* hervorgerufen werden [60], und Mykobakteriosen, die vorwiegend in vorgeschädigten Organismen durch fakultativ pathogene Erreger verursacht werden.

Klinisch und epidemiologisch bedeutsame mykobakterielle Infektionen im Menschen sind die Tuberkulose (siehe 1.1.2.1), die Lepra und Atypische Mykobakteriosen (siehe 1.1.2.2).

1.1.2.1 Tuberkulose

Erstmals wurde der Begriff „Phthisis“ (Schwindsucht) von HIPPOKRATES (ca. 460-375 v. Chr.) geprägt, um einen Zustand zu beschreiben, der von allgemeinem Verfall und Auszehrung gekennzeichnet war. 1689 benutzte der britische Arzt THOMAS G. MORTON den Begriff „Tuberkel“ (= Höcker, Knötchen) für die charakteristischen

Läsionen im Lungengewebe. Daraus leitete JOHANN LUCAS SCHÖNLEIN 1832 „Tuberkulose“ ab. Sie wurde jedoch durch ihr vielgestaltiges Leiden nicht als Krankheit aufgefasst, sondern als „Schicksal“ bezeichnet. Diese Erkrankung war im 19. Jahrhundert als „Weiße Pest“, „Volksseuche“ oder „Proletarierkrankheit“ die häufigste Todesursache in Europa, an der etwa 30% der erwachsenen Bevölkerung verstarben [61].

Im Jahre 1882 entdeckte der deutsche Arzt ROBERT KOCH *M. tuberculosis* als Erreger der Tuberkulose. Damit war der Krankheitsbegriff ätiologisch geprägt. Entscheidend für die Diagnose wurde der Nachweis von „Tuberkel-Bazillen“. Die verschiedenen Organmanifestationen der Infektion, z.B. in der Lunge, Haut, im Urogenitaltrakt, die bislang als verschiedene Krankheitseinheiten galten, wurden nun als Tuberkulose zusammengefasst. Die Erforschung und Bekämpfung der Tuberkulose als wichtigste Infektionskrankheit, weit vor Pest und Cholera, war nun wichtigstes Ziel von ROBERT KOCH und anderen Bakteriologen [61].

Mit der Entwicklung des Streptomycins (1944 [62]), der Paraminosalicylsäure (1949 [63]), des Isoniazids (1952 [64]), Pyrazinamids (1954 [65]), Ethambutols (1962 [66]) und des Rifampicins (1967) wurde es möglich, die Tuberkulose chemotherapeutisch zu behandeln, so dass sich die Therapie der TB vom Lungensanatorium zum Allgemeinkrankenhaus verlagerte [67;68].

1.1.2.1.1 Pathogenese und Klinik

Die Tuberkulose des Menschen wird durch *M. tuberculosis* verursacht und ist eine chronische, progressive Allgemeininfektion. Sie ist gekennzeichnet durch die Bildung von Granulomen (siehe unten) in infiziertem Gewebe und durch zellvermittelte Hypersensitivität. Die zellvermittelte Hypersensitivität ist charakteristisch für die Tuberkulose und spielt eine bedeutende Rolle in der Pathogenese [69].

Mykobakterien werden rezeptorvermittelt (siehe 1.1.1.3) durch Gewebsmakrophagen phagozytiert [42]. Weiterhin ist bekannt, dass Mykobakterien nicht nur durch Makrophagen, sondern auch durch Neutrophile phagozytiert werden [70]. Das frühe Phagosom, das durch einen schwach sauren pH-Wert (pH~ 6) charakterisiert ist, reift dann zu einem späten Phagosom mit niedrigerem pH-Wert (< pH 5,5). Mykobakterien hemmen die Verschmelzung von Phagosom und Lysosom, wie auch die meisten intrazellulären Bakterien die Reifung des Phagosoms verhindern. Durch die Erstinfektion

eines Alveolarmakrophagen mit Mykobakterien werden zahlreiche Effektormoleküle und lösliche Botenstoffe freigesetzt, die eine Immunantwort des Wirtsorganismus induzieren. Eine Übersicht über die frühen Makrophagenreaktionen als Folge der Phagozytose von Mykobakterien zeigt die Abbildung 2.

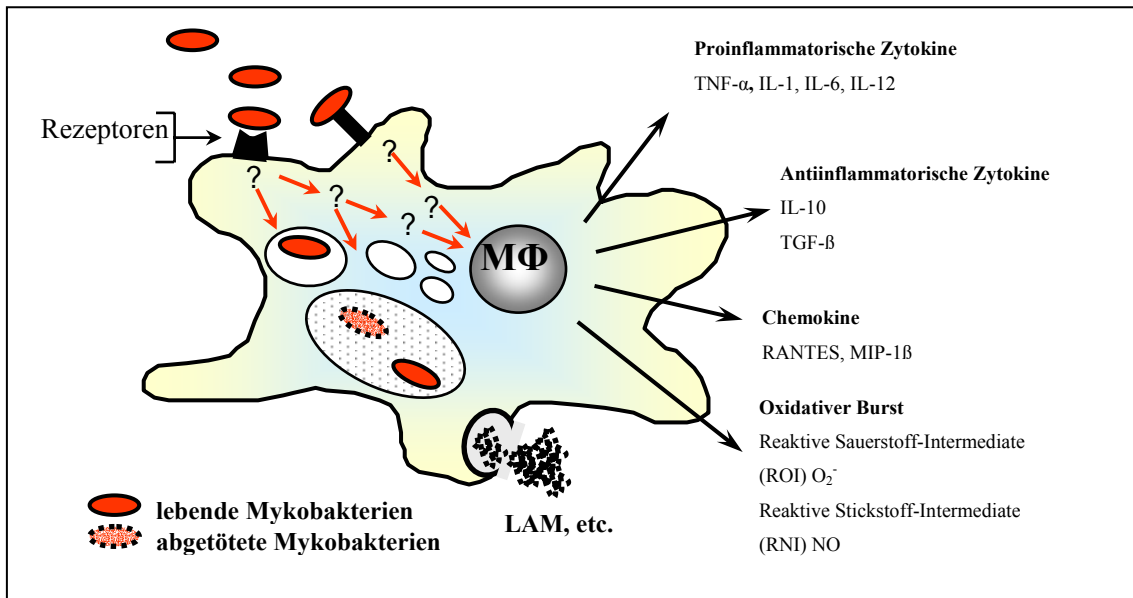


Abbildung 2: Übersicht über die frühen Makrophagenreaktionen als Folge der Phagozytose von Mykobakterien.

Nach rezeptorvermittelter Aufnahme von Mykobakterien (MΦ) durch Makrophagen werden apathogene Erreger erfolgreich abgetötet, verdaut und deren Abbauprodukte freigesetzt. Die Abbauprodukte stellen u. a. Zellwandbestandteile, wie Lipoarabinomannan (LAM) dar. Pathogene Mykobakterien hingegen inhibieren die Verschmelzung von Phagosom und Lysosom und überleben intrazellulär. Die Abtötung intrazellulärer Erreger wird hauptsächlich durch hoch reaktive Effektormoleküle, wie Superoxidanionen (O₂⁻) und Stickstoffmonoxid (NO), die oft synergistisch wirken, ausgelöst. Proinflammatorische Zytokine, wie TNF-α, IL-1 und IL-6, sowie Chemokine (RANTES und MIP-1β) werden von ruhenden Makrophagen sezerniert, um Leukozyten an den Infektionsherd zu rekrutieren und lokale Entzündungsreaktionen zu induzieren. Die Freisetzung von IL-12 führt zu einer protektiven Zellantwort. TGF-β und IL-10 dämpfen wahrscheinlich nach erfolgreicher Infektabwehr die Immunantwort [71]. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Norbert Reiling, Molekulare Infektiologie, Forschungszentrum Borstel.

Die Abtötung intrazellulärer Erreger geschieht in erster Linie direkt durch hoch reaktive Effektormoleküle, wie reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Intermediate [72;73]. Proteine des Erregers werden von Makrophagen prozessiert und durch Genprodukte des MHC-Komplexes auf der Oberfläche antigen-präsentierender Zellen (T-Lymphozyten) präsentiert [74], die ihrerseits unterschiedliche Effektormechanismen aktivieren. Von

T-Lymphozyten sezerniertes $\text{INF-}\gamma$ führt zur Aktivierung von Gewebsmakrophagen [75], die dann als Effektoren der körpereigenen Abwehr fungieren. Obwohl in aktivierten Makrophagen die intrazelluläre Vermehrung weitgehend unterdrückt wird, können einige Erreger persistieren und bei einer Immunschwäche reaktiviert werden. Proinflammatorische Zytokine, wie $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 und IL-6, sowie Chemokine werden von Makrophagen und anderen Wirtszellen sezerniert, um Leukozyten an den Infektionsherd zu rekrutieren und lokale Entzündungsreaktionen hervorzurufen [76;77;78;79]. Die Freisetzung von IL-12 führt zur Entwicklung einer protektiven Zellantwort [80]. Da hohe $\text{TNF-}\alpha$ -Konzentrationen im Plasma negative Effekte - wie die charakteristische Kachexie - bewirken, ist es nötig, die Immunantwort zu gegebener Zeit zu reduzieren [81]. Wahrscheinlich werden daher sowohl IL-10 als auch $\text{TGF-}\beta$ als immuninhibitorische Zytokine sezerniert [82;83].

Der initiale Eintritt der Erreger in die Lunge ruft bei Neuinfizierten eine unspezifische, akut inflammatorische, aber oft symptomlose Reaktion hervor. Die Tuberkelbakterien werden von Makrophagen phagozytiert und den regionalen Lymphknoten zugeführt. Von dort aus kann es zur hämatogenen Ausbreitung des Erregers im Organismus kommen und so zu einer Dissemination führen. In den meisten Fällen heilen primäre pulmonale Läsionen und solche einer disseminierten Tuberkulose ab, jedoch stellen sie mögliche Ausgangspunkte für spätere Reaktivierungen dar [84]. In den ersten zwei bis acht Wochen nach der primären Infektion entwickelt sich eine zellvermittelte Hypersensitivität. Während sich die Erreger intrazellulär replizieren, gelangen immunkompetente Lymphozyten in die infizierten Gebiete, in denen sie Interleukine und Lymphokine sezernieren, um Monozyten aus dem Blutstrom in die betreffende Region zu rekrutieren. Diese transformieren zu Makrophagen und differenzieren sich anschließend in spezialisierte histiozytäre Zellen, die in Granulomen [85] organisiert werden. Dadurch wird die weitere Vermehrung und Ausbreitung der Mykobakterien normalerweise verhindert, obwohl sie innerhalb der Makrophagen für viele Jahre persistieren können, ohne einen Ausbruch einer Tuberkulose hervorzurufen. Das Zentrum des Granuloms kann sich nach gewisser Zeit isolieren und durchläuft eine verkäsende Nekrose [86]. Darin persistierende Bakterien finden im käsigen Detritus des Granuloms eine lipid-reiche Nährstoff-Umgebung. Sie können in einer solchen Phase der Latenz ihr Überleben wahrscheinlich dadurch sichern, dass sie Lipide katabolisieren und zur Nitrat-Atmung wechseln [3;87].

Eine primäre Lungentuberkulose verläuft normalerweise asymptomatisch mit einer unspezifischen Pneumonie in den mittleren und unteren Lungenbezirken. Bei einer nicht ausreichenden zellulären Immunantwort kann sich eine Miliartuberkulose ausbilden. Dabei kommt es zur synchronen Durchsetzung aller Organe mit zahlreichen knötchenförmigen Herden [69].

Eine postprimäre Lungentuberkulose entsteht mehr als zwei Jahre nach der Infektion. Es kommt dabei zu einer Reaktivierung der endogenen Tuberkulose aus einem bestehenden Herd. Die meisten Patienten (über 95%) bilden diese Form der Tuberkulose erst Jahre nach der Infektion. Nach neuen Erkenntnissen spielen jedoch Reinfektionen (mit einem weiteren Stamm) eine bedeutende Rolle. Die Erkrankung beginnt oftmals im Lungenapex mit einer chronischen Entzündung, wo sich häufig Erreger bei der primären Streuherdbildung ablagern. Dabei kann es zur Verkäsung und Einschmelzung des Focus kommen und schließlich bis zur Arrosion des Bronchus führen. Daraufhin kommt es zur Kavernenbildung, und es können Erreger in weitere Bereiche des Lungengewebes aspiriert werden, die dann einen weiteren Infektionsprozess durchlaufen [88]. Generell kann jedes Organ von einer so genannten extrapulmonalen Tuberkulose befallen werden [89]. Bei einer extrem schlechten zellulären Abwehr (z.B. bei AIDS-Patienten) kann es zur areaktiven *Sepsis acutissima* kommen, die zumeist innerhalb weniger Tage zum Tode führt [69].

Wenn es bei der Lungentuberkulose zu Einschmelzungen kommt, die Anschluss an den Bronchialbaum haben, können sich beim Abhusten lungengängige Aerosole bilden, die hochinfektiös sind. Man spricht dann von einer „offenen TB“. Jeder Patient mit einer offenen TB ist kontagiös und infiziert - entgegen der verbreiteten Ansicht - eine große Anzahl weiterer Personen mit einer Infektionsrate von bis zu 45% unter sämtlichen Kontaktpersonen [90].

In 99% der Fälle handelt es sich um den aerogenen Übertragungsweg, vorwiegend durch Inhalation von Aerosolen. Als die Rindertuberkulose noch verbreitet war, spielte auch die orale Infektion mit *M. bovis* durch Kuhmilch eine große Rolle. Doch durch die 1931 verordnete Milchpasteurisierung konnte diese Erkrankung erfolgreich bekämpft werden.

Weniger als 10% der mit *M. tuberculosis* infizierten und immunkompetenten Menschen entwickeln eine aktive TB. Wird diese nicht therapiert, so verläuft die Erkrankung in der Hälfte aller Fälle tödlich [3]. Mit zunehmender Immunschwäche steigt die Inzidenz

jedoch dramatisch, und die Reaktivierung eines bereits vorhandenen Herdes wird begünstigt durch Alkoholismus, Fehlernährung, Immunsuppression und Diabetes [91].

1.1.2.1.2 Diagnostik und Vakzinierung

In Deutschland wurde die Meldepflicht der Tuberkulose durch das Infektionsschutzgesetz eingeführt. Danach muss sowohl die Erkrankung als auch der Tod an einer Tuberkulose gemeldet werden [92].

Der Verdacht einer Lungentuberkulose wird anhand der Kombination aus klinischer Symptomatik, Thorax-Röntgenbild und Tuberkulin-Hauttest erhärtet, die Diagnose aber wird bestätigt durch den direkten Nachweis säurefester Stäbchen im Sputum, den Kulturnachweis und gegebenenfalls molekularbiologischer Methoden [93].

Der Tuberkulin-Test gibt Aufschluss über den Infektionsstatus. Dabei wird standardisiertes PPD (Purified Protein Derivative), ein Extrakt aus *M. tuberculosis* [94], intrakutan injiziert. Ist der Organismus zuvor mit Tuberkulose-Erregern in Kontakt gekommen, so infiltrieren u. a. inflammatorische CD4⁺-T-Lymphozyten in ihrer Funktion als Memory-Zellen zum Ort des Geschehens und rufen eine lokale Entzündungsreaktion vom verzögerten Typ hervor [95]. Als positiv wird der Test gewertet, wenn sich nach 72 h eine Induration von 10 mm oder mehr zeigt und als negativ, wenn diese 5 mm oder weniger beträgt. Bei Werten dazwischen ist das Ergebnis nicht eindeutig zu bewerten. Bei repräsentativen Gruppen nichtvakzinierter Kinder ist der Test einfach und verlässlich. Ein positiver Tuberkulin-Test zeigt also den Abwehrstatus des Organismus nach einer vorangegangenen Infektion mit Tuberkulose-Erregern oder eine erfolgte Schutzimpfung an [96].

Bei der Schutzimpfung gegen TB setzt man den attenuierten *M. bovis* Stamm BCG ein. BCG ist die Abkürzung für Bacille Calmette-Guérin, benannt nach zwei französischen Bakteriologen, die einen virulenten Stamm von *M. bovis* auf Kartoffel-Glyzerin-Medium mit Rindergalle durch 230 Passagen über 13 Jahre für Impfzwecke dauerhaft attenuierten [97]. Die erhaltene Kultur wurde 1921 in Paris als erste Humanvakzine unter der Bezeichnung Bacille Calmette-Guérin appliziert und nach offizieller Akzeptanz weit verbreitet eingesetzt [98]. Seit 1974 ist die BCG-Impfung Teil des „Erweiterten Impfprogrammes“ (Expanded Programme on Immunization) der WHO [99] und von unbestrittenem Nutzen, was den Schutz gegen die Tuberkulose betrifft [100]. Sie schützt Neugeborene und Kleinkinder vor disseminierter Tuberkulose, wie

typischerweise Miliartuberkulose und tuberkulöser Meningitis, jedoch ist die BCG-Impfung unzureichend, was den Schutz von Erwachsenen gegen pulmonale Tuberkulose betrifft [101;102]. Ebenso kann auch eine natürliche Infektion mit *M. tuberculosis* nicht vor einer Reinfektion schützen.

Die Vakzinierung in Deutschland und anderen industrialisierten Ländern wird jedoch heute aufgrund von unerwünschten Nebenwirkungen und z. T. schwerwiegenden systemischen Komplikationen [103;104] nicht mehr standardmäßig durchgeführt [105;106] und lediglich Risikogruppen empfohlen [107]. Dennoch wurden bislang mehr als drei Milliarden Menschen geimpft. Damit handelt es sich hier um den am häufigsten verwendeten Lebendimpfstoff weltweit [108].

Erstaunlicherweise zeigt der *M. bovis* Stamm BCG nach intravesikaler Instillation einen positiven Effekt in der Behandlung des Urothelkarzinoms der Blase, der vierthäufigsten Tumorart unter Männern [109]. Die Behandlung dieser Tumoren mit BCG ist derzeit die erfolgreichste Immuntherapie, obwohl die Ursache der anti-neoplastischen Eigenschaft dieses Mykobakterien-Stammes bislang ungeklärt ist [110].

1.1.2.2 Atypische Mykobakterien

Mykobakterien sind durch die große Anzahl immunsupprimierter HIV-Infizierter vorwiegend in den Entwicklungsländern stark verbreitet [111].

Aus der Gruppe der nicht-tuberkulösen Mykobakterien (NTM) gehören 90% aller Isolate zu den Spezies *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chelonae*, *M. xenopi* und *M. kansasii* [112].

Atypische Mykobakterien werden u. a. durch folgende Spezies verursacht (Einteilung nach RUNYON, 1959 [26]):

1. *Mycobacterium kansasii* (Gruppe I, photochromogen, langsam wachsend): führt zu einer Lungenerkrankung ähnlich der TB, jedoch nicht so schwerwiegend und nur selten disseminierend [113].
2. *Mycobacterium scrofulaceum* (Gruppe II, skotochromogen, langsam wachsend): verursacht bei Kleinkindern zervikale Lymphadenitis von subakutem und chronischem Verlauf, nur selten disseminierend [114].

3. *Mycobacterium avium-intracellulare-Komplex* (Gruppe III, nicht chromogen, langsam wachsend): führt zu Lungenschädigungen, die radiologisch nicht von TB zu unterscheiden sind [115].

4. *Mycobacterium fortuitum* (Gruppe IV, nicht chromogen, schnell wachsend): verursacht Lungenschäden ähnlich der TB und Abszesse in OP-Wunden [116].

Die Verbreitung und Pathogenität von nicht-tuberkulösen Mykobakterien ist von Spezies zu Spezies unterschiedlich. Sie sind teilweise pathogen und z. T. Opportunisten. Vorwiegend verursachen sie Lungenschädigungen, lokalisierte Lymphadenitiden und Hautschäden. Bei AIDS-Patienten jedoch treten häufig disseminierte Formen durch den MAI-Komplex auf (siehe 1.1.3.2). Ebenfalls klinisch bedeutsam sind die Spezies *M. kansasii*, *M. simiae* und *M. szulgai* mit chronischen Lungeninfektionen als Folge, *M. marinum* als Auslöser des so genannten „Schwimmbadgranuloms“ nach Baden in kontaminiertem Wasser [117], sowie in tropischen Klimazonen *M. ulcerans* als Erreger von Hautinfektionen mit schwerwiegenden Geschwüren [118].

Im Gegensatz zu *M. tuberculosis* werden die Erreger aus der Gruppe der NTM nicht von Mensch zu Mensch übertragen [119].

Im Vergleich zu Tuberkulosen ist die Diagnose von Mykobakteriosen wesentlich komplizierter. Diese Erreger sind teilweise ubiquitär verbreitet, und die Infektionen verlaufen z. T. asymptomatisch, so dass nicht immer zwischen symptomloser Kolonisation und Erkrankung unterschieden werden kann. Für die Diagnose ist daher einerseits der kulturelle Erregernachweis und andererseits eine bestehende Organläsion Voraussetzung. Werden aber obligat humanpathogene Mykobakterien nachgewiesen, so wird eine Mykobakteriose ausgeschlossen. Molekularbiologische Methoden, wie die DNA-Microarray-Technik, bieten verbesserte Möglichkeiten zur Diagnostik von nicht-tuberkulösen Mykobakterien [120].

1.1.3 *Mycobacterium avium*

1.1.3.1 Epidemiologie

Im 19. Jahrhundert wurde erstmals ein Erreger des MAC aus Vögeln isoliert. Daher wurde der Organismus *Mycobacterium avium* genannt. Es war bekannt, dass der Erreger

sowohl in domestizierten als auch in wilden Vögeln Krankheiten verursacht. Doch bis 1950 wurde ihm keine Bedeutung als humanpathogener Keim zugesprochen [121;122].

Der MAC ist in der Umwelt ubiquitär verbreitet [123].

Seit 1970 ist bekannt, dass Meerwasser, Frischwasserquellen und Leitungswassersysteme ebenfalls Reservoirs für Vertreter des MAC sind. Auch konnten in den USA nicht-tuberkulöse Mykobakterien in Trinkwasser nachgewiesen werden [119]. Generell unterscheiden sich jedoch Isolate aus Meerwasser- und Frischwasserquellen von solchen aus Patienten in biochemischen Eigenschaften, so dass davon auszugehen ist, dass diese Quellen keine Habitats für humanpathogene Erreger sind. In Leitungswassersystemen, vorwiegend zirkulierenden Heißwassersystemen, wurden allerdings Isolate von demselben Serotyp gefunden wie in Patienten [122;124].

Mykobakterien des MAC sind in Gewässern aller geographischer Regionen präsent, dabei deutlich weniger in den Entwicklungsländern [122;125].

Auch wurden Organismen des MAC aus Säugern isoliert, wie Schweinen und Schafen, in denen sie sowohl subklinische Kolonisationen als auch Krankheiten verursachen können. Die Serotypen aus diesen Tieren ähneln sehr den humanen - vorwiegend 2, 6 und 8. Ferner gibt es u. a. Isolate aus Katzen, Hunden, Wild und Affen, was die ausgedehnte Verbreitung dieser Spezies widerspiegelt [121;122;126].

Alle Mykobakterien, so auch die des MAC, sind auch im Erdboden, wie Lehm, Ton und Schlamm zu finden. So wurden einige Serotypen gefunden, die Analogien zu Patientenisolaten aufwiesen [122;127].

Durch das Vorkommen von *M. avium* und anderen Vertretern aus dieser Gruppe in Schweinen, Schafen und Geflügel stellen diese Tiere und Tierprodukte auch als Lebensmittel bei unzureichender Hitzebehandlung für den Menschen eine potentielle Infektionsquelle dar. Außerdem wurden MAC-Isolate in Milch nachgewiesen, und zwar sowohl in unpasteurisierter als auch in pasteurisierter Milch [122;128].

Nicht zu unterschätzen ist die Kolonisation des Menschen mit Erregern vom MAC. Es gibt Studien, in denen Erreger des MAC von rund 1% asymptomatischer Personen aus Oral- und Bronchialsekreten isoliert wurden [129;130]. Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen gelten als besonders lange Keimträger. Bei Studien zur Rolle der Mykobakterien in der Ätiologie des Morbus Crohn wurden Stuhlproben gesunder Kontrollpersonen untersucht und festgestellt, dass diese ebenfalls im Colon eine Besiedlung durch *M. avium* aufweisen [131;132]. Das weist darauf hin, dass die

Ingestion und anschließende Passage durch den Gastrointestinaltrakt nicht selten auftritt und symptomlos verläuft [122].

Der mit *M. avium* kolonisierte und infizierte Mensch scheidet zwar Mykobakterien aus, jedoch ist die Übertragung von Mensch zu Mensch im Gegensatz zur Tuberkulose von geringer Bedeutung [133;134].

Die Erreger des MAC können im Menschen drei verschiedene Erkrankungen verursachen: zervikale Lymphadenitis, chronische Lungeninfektion und disseminierte Formen in AIDS-Patienten (siehe 1.1.3.2). Die Inzidenz aller drei Krankheitsbilder steigt, wobei die Zunahme der DMAC (disseminated M. avium complex diseases) mit der HIV-Pandemie einhergeht, die Tendenz der beiden anderen Erkrankungen hingegen noch ungeklärt ist.

Zervikale Lymphadenitiden werden vorwiegend durch den MAC, aber auch durch *M. kansasii* und *M. scrofulaceum* verursacht [135]. Es handelt sich dabei um eine relativ seltene Erscheinungsform [133]. In den achtziger Jahren wurden in den USA jährlich rund 300 Fälle bekannt. Da in vielen Fällen keine eindeutige Diagnose gestellt werden konnte, weil kein Erregernachweis möglich war, wird geschätzt, dass in diesem Zeitraum um 500 Fälle pro Jahr auftraten [136]. Diese Erkrankung betrifft Kinder meistens von weißer Hautfarbe und von fast ausschließlich unter fünf Jahren. Mädchen erkranken häufiger als Jungen [137]. Die Tendenz von Kleinkindern, vieles aus ihrer Umgebung oral zu erfassen, könnte die Beschränkung der Erkrankung auf die ersten Lebensjahre erklären [135].

Chronische pulmonale Erkrankungen, die auf eine MAC-Infektion zurückzuführen sind, traten in den USA in den Jahren 1981-1983 in rund 3000 Fällen pro Jahr auf [136]. Die meisten Patienten haben weiße Hautfarbe und sind über 40 Jahre alt, wobei Männer etwas häufiger erkranken als Frauen. Die Rate von 1,3 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner ist in Japan [138] und den Vereinigten Staaten [139] gleich und ähnlich der in der Schweiz mit einer Inzidenz von 0,9 pro 100.000 [140]. Doch sind generell in vielen Ländern ansteigende Raten zu verzeichnen, wobei die Ursache dafür bislang nicht bekannt ist [141]. Die chronischen Lungenerkrankungen bei Patienten mit vorgeschädigten Lungen, z.B. bei COPD (chronic obstructive pulmonary disease), einer chronisch obstruktiven Bronchitis, werden gleichermaßen durch *M. avium* und *M. intracellulare* verursacht [142].

Disseminierte MAC-Infektionen in AIDS-Patienten werden in 98% der Fälle durch *M. avium* verursacht [143]. Im Jahre 1992 waren von 100.000 AIDS-Patienten in den

USA 20.000 von dieser schweren Erkrankung betroffen, was diese somit zur Hauptmanifestation aller humanen Infektionen durch den MAC macht. 15-24% aller AIDS-Patienten haben diese Krankheit, und 20% entwickeln diese innerhalb nur eines Jahres [15;144]. Bei Autopsien werden bei rund jedem zweiten verstorbenen AIDS-Patienten MAC-Infektionen nachgewiesen [145].

Im Vergleich zu den USA, Australien, Deutschland und anderen europäischen Staaten ist die Häufigkeit disseminierter MAC-Infektionen in AIDS-Patienten in Entwicklungsländern sehr viel geringer. Lediglich 10-25% aller Erkrankungsfälle treten in Entwicklungsländern auf [146]. Das ist u. a. darauf zurückzuführen, dass in solchen Regionen die Überlebensdauer von AIDS-Patienten aufgrund unzureichender therapeutischer Maßnahmen geringer ist.

Eine Studie zeigte, dass der einzige signifikante Risikofaktor für disseminierte MAC-Infektionen in AIDS-Patienten die Anzahl der CD4⁺-T-Lymphozyten im Blut ist [146]. Es ist bekannt, dass HIV CD4⁺-T-Zellen zerstört. Sinkt die Zellzahl unter einen kritischen Wert, versagt die zelluläre Immunantwort, und es kommt zu einer Reihe von Infektionen durch opportunistischen Erreger [147]. Mit Abnahme dieser Zellzahl unter 100 pro mm³ Blut steigt das Risiko für disseminierte MAC-Erkrankungen dramatisch [146].

Analog der steigenden Inzidenz der AIDS-Erkrankung nimmt auch die der disseminierten MAC-Infektion jährlich zu. Doch zusätzlich dazu steigt auch der prozentuale Anteil an disseminierter MAC-Infektion zu AIDS. Eine Erklärung dafür ist der große Anteil an Patienten mit niedrigen CD4⁺-Zellen über einen langen Zeitraum unter retroviraler Therapie und früher medikamentöser Behandlung gegen opportunistische Infektionen. Viele AIDS-Patienten überleben heutzutage trotz niedriger CD4⁺-Zellen einen relativ langen Zeitraum, was sie hingegen für disseminierte MAC-Infektionen empfänglich macht [15].

Es konnte gezeigt werden, dass in koinfizierten Patienten die HIV-Replikation durch MAC gesteigert wird [148].

1.1.3.2 Klinik

Häufige klinische Erscheinungsbilder disseminierter *M. avium*-Infektionen in AIDS-Patienten sind Fieber, Anämie, Zytopenien und Hepatosplenomegalie [145]. In

selteneren Fällen treten Lungenentzündungen, Lymphadenopathien, Cholecystitis sowie Hautläsionen auf [149]. Hepatische Infiltrationen sind häufig und führen dadurch zu einem massiven Anstieg der alkalischen Phosphatase im Serum. Ein Befall des Dünndarms kann zu Diarrhöe und Malabsorption führen und in der Folge u. a. zu Gewichtsverlust. Bei Befall des Colons kommt es zu extrem starken Abdominalschmerzen. Häufige Manifestationen im Gastrointestinaltrakt lassen vermuten, dass es sich um den oralen Infektionsweg handelt. Die Ursachen, die zur Kolonisierung oder zur Entwicklung einer disseminierten Infektion führen, sind derzeit noch unklar [145]. Mit bis zu 10^6 Zellen pro ml Blut und bis zu 10^{10} Bakterien pro g Gewebe kann die Bakteriendichte des MAC bei Infektionen extrem hoch sein [145].

1.1.3.3 Therapie

Die Behandlung von MAC-Infektionen in AIDS-Patienten ist oft schwierig und unbefriedigend. Hinsichtlich des klinischen Nutzen einer antimykobakteriellen Therapie unter AIDS werden nur hoch symptomatische Patienten behandelt [150]. Gängige Antituberkulosemittel, wie Isoniazid, weisen gegenüber Erregern des MAC nur geringe Wirksamkeit auf oder werden, wie Ethionamid, nur schlecht toleriert. Derzeit nützliche Chemotherapeutika stellen die neueren Makrolide Clarithromycin und Azithromycin dar [151]. Sie zeichnen sich durch gute Bioverfügbarkeit aus, d. h. sie reichern sich in Makrophagen an und erreichen dort eine zehnfach höhere Konzentration als im Plasma. Werden sie als Monotherapie verabreicht, bilden sich rasch Resistenzen, was eine multimedikamentöse Therapie notwendig macht. Zusätzlich verabreichtes Ethambutol oder Rifampicin wirkt synergistisch und wird häufig in die Kombinationstherapie einbezogen [152]. Klinische Studien werden derzeit durchgeführt, um das optimale Behandlungsschema zu erstellen [153].

1.1.3.4 Mikrobiologie

1.1.3.4.1 Serovare

Der MAC wird beschrieben als langsam wachsend und weder skoto- noch photochromogen. Damit zählt er zur Gruppe III nach RUNYON (siehe 1.1.2.2). Nach sero-

logischen Gesichtspunkten (Serumagglutination) wird dieser unterteilt in 28 Serovare von zwei Spezies, *M. avium* und *M. intracellulare*, wobei auch eine dritte Spezies, *M. scrofulaceum*, einbezogen jedoch taxonomisch abgegrenzt wird [154]. Nach phänotypischen Merkmalen und molekularbiologischen Untersuchungen wird die Art *M. avium* weiterhin in drei Subspezies geteilt: *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis* und *M. avium* ssp. *silvaticum* (siehe 1.1.1.2). Die Grundlage der Einteilung in Serovare liegt in variablen Oligosaccharid-Resten von Glycopeptidolipiden (GPL), den sog. C-MycoSIDen, in der Zellwand der Mykobakterien (siehe 1.2.1). Unspezifische GPL (non-specific glycopeptidolipids, nsGPL), die in allen Serovaren vorkommen, werden von serovarspezifischen (serovar-specific glycopeptidolipids, ssGPL) unterschieden [155]. Die Oligosaccharid-Strukturen der am häufigsten isolierten Serovare aus AIDS-Patienten, nämlich 1, 4 und 8 wurden aufgeklärt [156]. DNA-Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass die Serovare 1-6 und 8-11 zu *M. avium* gezählt werden und die Serovare 7, 12-17, 19, 20 und 25 zu *M. intracellulare*. Die restlichen Serovare können nicht eindeutig einer Spezies zugeordnet werden [157]. Diese und andere Studien über DNA-Homologien und rRNA-Sequenz-Analysen lassen den Schluss zu, dass über 90% aller disseminierter MAC-Infektionen durch *M. avium* verursacht werden [158].

1.1.3.4.2 Koloniemorphologie

Eine Besonderheit von Isolaten des MAC ist das Wachstum in unterschiedlichen Kolonietypen. Es werden drei Morphotypen auf soliden Medien unterschieden: Ein Kolonietyp erscheint glatt, opak sowie erhaben und wird daher als SmO (smooth-opaque) oder auch als SmD (smooth-domed) bezeichnet. Ein weiterer glatter Morphotyp wächst als flache transparente Form und wird SmT (smooth-transparent) genannt. Ferner gibt es raue Kolonietypen (rough, Rg) [159]. Die meisten klinischen Isolate zeigen die Morphologie des SmT oder SmO oder zeigen eine Mischung aus beiden mit wenigen rauen Formen, obwohl Primärisolate aus Blut fast ausschließlich dem glatt-transparenten SmT angehören [160]. Dieser Koloniemorphotyp ist generell resistenter gegen Antibiotika als andere [154;161] und virulenter im Tiermodell der MAC-Infektion [162;163].

Es wurde gezeigt, dass die verschiedenen Kolonimorphotypen auch unterschiedliche Oberflächenantigene exprimieren. Ob es sich dabei um funktionelle Unterschiede, also um Kolonietyp-spezifische Antigene handelt, ist nicht geklärt [164].

Änderungen von der transparenten in die opake Kolonievariante oder umgekehrt sind möglich. Es handelt sich dabei jedoch nicht um Mutationen, sondern Plasmide sind dafür verantwortlich [165]. Der Switch vom SmT- in den SmO-Morphotypen tritt einmal pro 5×10^4 Zellen auf und ist damit vergleichsweise häufig. Denn umgekehrt liegt die Häufigkeit bei nur einer Zelle pro 10^6 Zellen [166].

1.1.3.4.3 Wachstum

Mycobacterium avium zählt zu den langsam wachsenden Mykobakterien (siehe 1.1.2.2). Die Generationszeit beträgt durchschnittlich 20 Stunden. Untersuchungen an Kulturen von transparenten und opaken Kolonietypen zeigten, dass das Wachstum von Isolaten des MAC in drei Stufen verläuft:

Zu Beginn vergrößern sich die Zellen durch rasche Aufnahme von Fettsäuren und Proteinen, und der DNA-Gehalt nimmt nicht zu, ohne dass es zu einer Zellteilung kommt. Erst in der zweiten Phase geschieht die binäre Teilung der Zellen. In dieser Wachstumsphase läuft die Proteinbiosynthese vermindert ab. Die Aufnahme von Fettsäuren nimmt ab, und intrazelluläre Triglyzeride werden katabolisiert, um Kohlenstoff und Energie bereitzustellen. In dieser Phase haben die meisten Zellen die Form von Kokken. Die dritte Phase verläuft analog der stationären Wachstumsphase bei schnell wachsenden Bakterien. Die Zellmasse wird eine pleomorphe Mischung aus Filamenten, Stäbchenzellen und Kokken. Es wird angenommen, dass die Zellzahl des SmO-Morphotyps auch in dieser Phase zunimmt, da er im Vergleich zum SmT-Kolonietypen weniger anspruchsvoll ist, was den Nährstoffbedarf betrifft [167].

Ebenfalls außergewöhnlich ist, dass die glatt-transparenten Zellen in allen Wachstumsphasen eine Vielzahl von Partikeln produzieren, die zu großen Teilen aus Sulfolipiden bestehen [168]. *M. avium* wächst in einem verhältnismäßig weiten pH-Bereich von 4,0 bis 7,5, während beispielsweise das Wachstum von *M. tuberculosis* auf den Bereich zwischen pH 6,0 und 6,5 beschränkt ist. Im Gegensatz dazu hat *M. smegmatis* als saprophytäre Mykobakterien-Spezies einen extrem ausgedehnten Toleranzbereich und wächst bei pH-Werten zwischen 3,5 und 9,5 [169]. Es gibt Hinweise darauf, dass *M. avium*

auch pH-Werte niedriger als 3 toleriert - Bedingungen, die bei Infektionen des Gastrointestinaltraktes während der Passage durch den Magen vorherrschen [170].

1.2 Spezieller Teil

1.2.1 Die Zellwand der Mykobakterien

Die mykobakterielle Zellhülle hat einen äußerst komplexen Aufbau, besteht aber im Wesentlichen aus drei Schichten: Membran, Zellwand und Kapsel (Abbildung 3) [40].

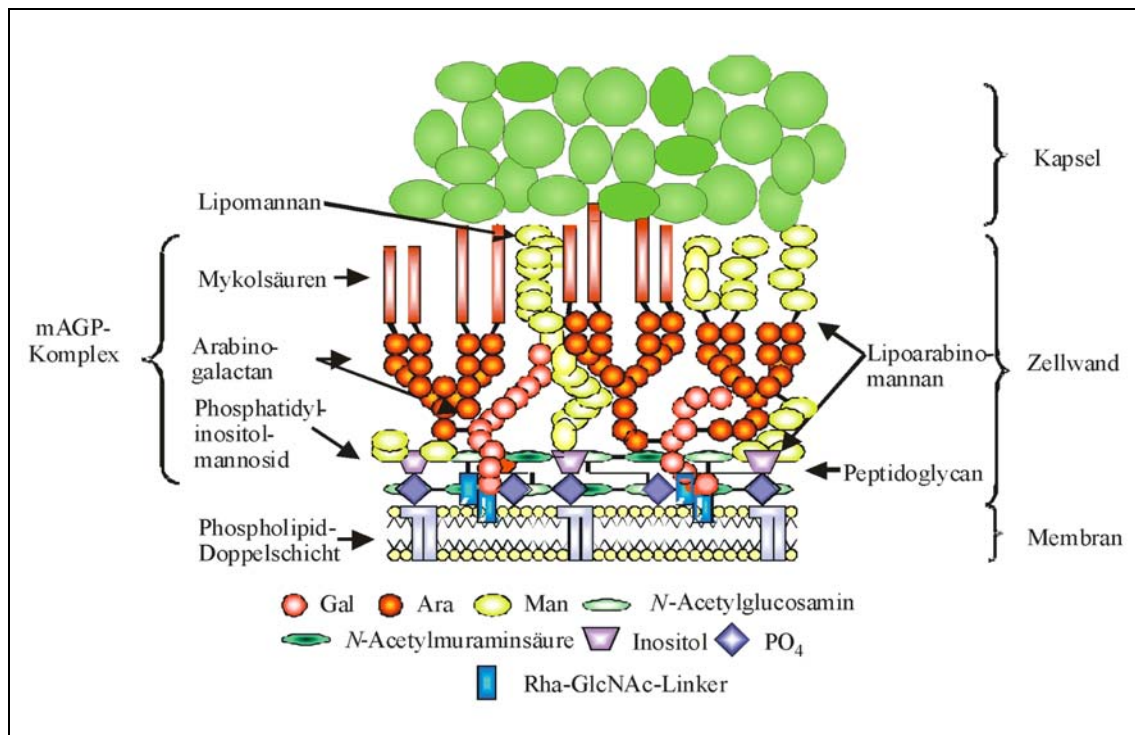


Abbildung 3: Schematische Darstellung der mykobakteriellen Zellhülle.

Die mykobakterielle Zellhülle zeichnet sich durch ihren einzigartigen komplexen Aufbau aus. Sie besteht im Wesentlichen aus Plasmamembran, Zellwand und Kapsel. Ein Hauptbestandteil der Zellwand ist der Mycoloyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplex (mAGP-Komplex), ein Polymer aus Arabino-furanosyl- und Galactofuranosyl-Resten, das kovalent an Peptidoglycan gebunden und an seinem nicht-reduzierenden Enden mit Mykolsäuren verestert ist. Weiterhin kommen Lipoglycane, wie Lipoarabino-mannan und Lipomannan vor, von denen angenommen wird, dass sie über einen Phosphatidylinositol-Anker in der Plasmamembran verankert sind. Nicht-kovalent gebunden, sondern lediglich mit der äußeren Zellwand assoziiert, befindet sich die Kapsel bestehend aus hauptsächlich Polysacchariden und Proteinen. Verändert nach [171].

Oberflächlich betrachtet scheint die Zellwand der Mykobakterien der der Gram-positiven Bakterien ähnlich zu sein. Tatsächlich reagieren Mykobakterien in der Gramfärbung schwach positiv [34]. Gram-negative Bakterien besitzen eine zweite äußere Membran auf der Zellwand [172], die den Mykobakterien zwar fehlt, aber deren Mykolsäuren (siehe 1.2.1.2) in der Zellwand bilden analog zu dieser äußeren Membran eine dicke Schicht. Strukturell jedoch ist eine Zuordnung weder zu den Gram-positiven noch zu den Gram-negativen Bakterien möglich [34]. Neuere Genom-basierte Phylogenie-Untersuchungen zeigen, dass *M. tuberculosis* mehr Gemeinsamkeiten mit Gram-positiven als mit Gram-negativen Bakterien hat [173].

1.2.1.1 Zytoplasmamembran

Die innere Schicht ist eine typische biologische Plasmamembran bestehend aus einer Lipiddoppelschicht [174]. Sie besteht aus häufig vorkommenden amphiphatischen polaren Membran-Phospholipiden, wie Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerin und Phosphatidylinositol [175] und einer Familie von Phosphatidylinositolmannosiden. Glycerin ist in Position 1 hauptsächlich mit Ölsäure, Stearinsäure oder Tuberkulostearinsäure acyliert, an Position 2 entweder mit Palmitinsäure oder Palmitoleinsäure [176;177]. Tuberkulostearinsäure (10-Methylstearinsäure) ist eine Fettsäure, die -wie der Name vermuten lässt- fast ausschließlich in Mykobakterien vorkommt und daher als Markermolekül für mykobakterielle Infektionen verwendet wurde [178]. Phosphatidylinositolmannoside (PIM) gehören zu den Hauptkomponenten der Zytoplasmamembran.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen deuten darauf hin, dass diese in der Membran verankert sind und in das Periplasma hineinragen [179]. Die kleinste dieser Verbindungen ist das PIM₂, in dem das Inositol sowohl an Position 2 als auch an Position 6 mannosyliert ist (siehe Abbildung 4). Der an Position 2 des Inositols gebundene Mannose-Rest ist an Position 6 mit Palmitinsäure acyliert.

PIM₂ bildet nicht nur die Grundstruktur der Phosphatidylinositolmannoside (PIM₂ bis PIM₆), sondern auch das Startermolekül in der Biosynthese von Lipomannan und Lipoarabinomannan (siehe 1.2.1.3) [180].

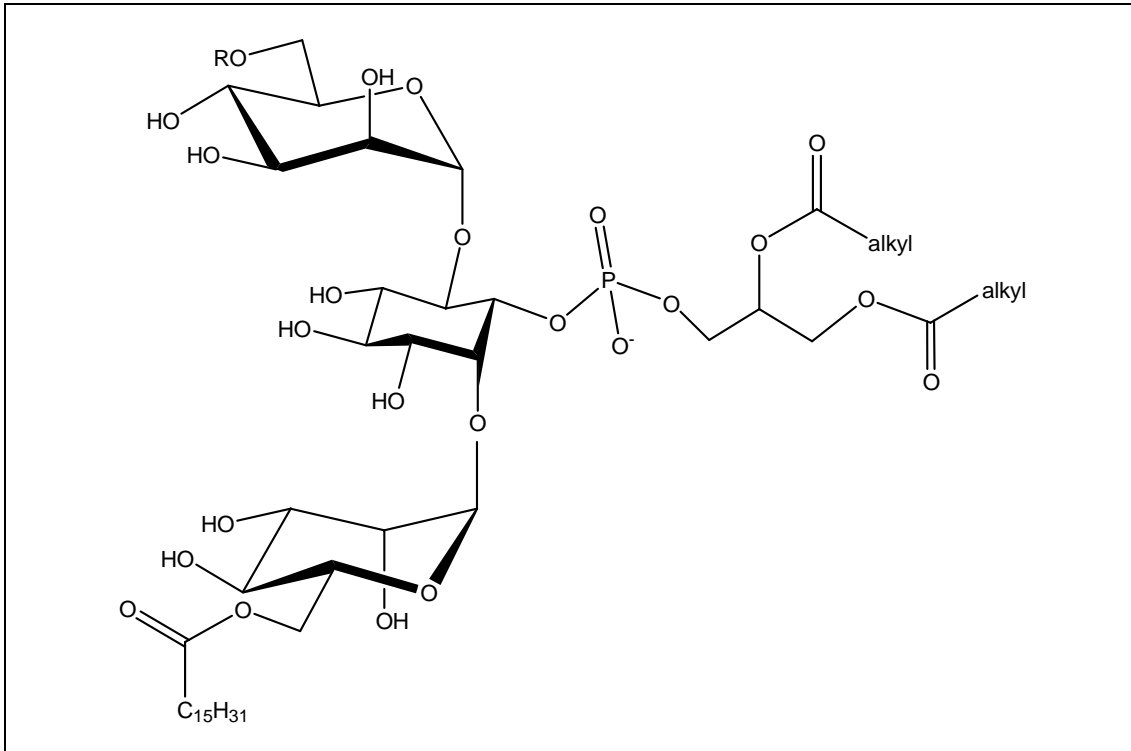


Abbildung 4: Grundstruktur der mykobakteriellen Phosphatidylinositolmannoside (PIM).

Das Inositol ist an Position 2 und 6 mit Mannose-Resten substituiert, von denen der an Position 2 gebundene Mannose-Rest an Position 6 mit Palmitinsäure acyliert ist. Dieses Molekül stellt damit auch die Kernregion dar, aus denen Lipoarabinomannan und Lipomannan aufgebaut werden. Der an Position 6 des Inositols gebundene Mannose-Rest kann durch bis zu vier weitere Mannose-Reste über entweder α -(1 \rightarrow 6)- oder α -(1 \rightarrow 2)- Bindung substituiert sein, um auf diese Weise längere Phosphoinositolmannosid- (PIM) -Strukturen auszubilden. R = H: PIM₂; R = α -D-Manp: PIM₃; R = α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp: PIM₄; R = α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp: PIM₅; R = α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp: PIM₆ [180].

Mit der Plasmamembran sind Glycosylphosphoprenole assoziiert, die als Zucker-Donoren Substrate vieler Glycosyltransferasen für die Biosynthese von Zellwandpolysacchariden darstellen. Die bislang isolierten beinhalten aktivierte Formen von D-Mannopyranose, D-Ribofuranose und D-Arabinofuranose. D-Mannopyranose wird als Substrat von Mannosyltransferasen für die Biosynthese des Mannans im Lipoarabinomannan verwendet, und D-Arabinofuranose gilt als Hauptquelle für die furanosidischen Arabinose-Reste im Arabinogalactan und LAM (siehe 1.2.2.2) [180].

1.2.1.2 Mycoloyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplex

Ein wichtiger Bestandteil der Zellwand ist das Peptidoglycan (Murein). Es ist ein einziges netzartiges Polymer, das die gesamte Zelle umspannt. Anders als bei Gram-positiven Bakterien, bei denen das Molekül bis zu 40 Schichten dick sein kann, liegt es bei Mykobakterien lediglich als einfache Schicht vor. Es stabilisiert als Netzwerk die Zellwand und kann durch Auflösen ganzer Zellen mit ethanolischer Kalilauge isoliert werden. In der Elektronenmikroskopie kann das verbleibende Peptidoglycan so als kollabierter, aber intakter „Sacculus“ visualisiert werden. Hinsichtlich der gesamten Zelle ist das Peptidoglycan gegenüber Lyse äußerst resistent [181].

In Abbildung 3 ist das Peptidoglycan parallel zur Plasmamembran in Übereinstimmung mit klassischen Modellen dargestellt [182;191]. Jedoch wird derzeit kontrovers diskutiert, ob Peptidoglycan und Arabinogalactan (AG) möglicherweise helikal vorliegen und senkrecht zur Plasmamembran angeordnet sind [183;184;185;186].

Die Struktur des Peptidoglycans in der mykobakteriellen Zellwand ist dem am häufigsten vorkommenden in Bakterien sehr ähnlich. Es besteht aus einer Glycan-Kette mit alternierenden Resten von *N*-Acetylglucosamin und *N*-Glycolylmuraminsäure in β -(1 \rightarrow 4)-Verknüpfung (siehe Abbildung 5). Diese Disaccharideinheiten sind durch Tetrapeptide quervernetzt.

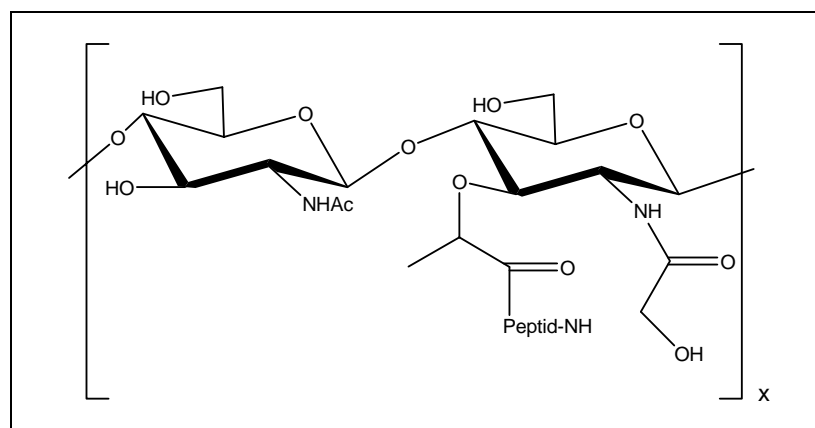


Abbildung 5: Wiederholungseinheit des mykobakteriellen Peptidoglycans.

β -(1 \rightarrow 4)-verknüpfte Disaccharide aus *N*-Acetylglucosamin und *N*-Glycolylmuraminsäure sind durch Peptide quervernetzt und bilden somit ein Makromolekül, das die gesamte Zelle umspannt [180].

Der Peptid-Anteil besteht aus kurzen Ketten von L-Alanin, D-iso-Glutamin, meso-Di-aminopimelinsäure (DAP) und D-Alanin. Im Gegensatz zu vielen Bakterien ist die

Peptid-Kette nicht nur zwischen D-Alanin und DAP vernetzt, sondern auch zwischen zwei DAP-Resten [187].

Den Großteil der mykobakteriellen Zellwand bildet der Mycoloyl-Arabinogalactan-Komplex, ein Makromolekül aus Arabinose und Galactose, das kovalent an Peptidoglycan gebunden und in den Seitenketten des Zuckeranteils mit Mykolsäuren verestert ist. Diese Struktur kommt auch in anderen Aktinomyzeten vor [188]. Die Biosynthese dieses Moleküls zu unterbinden, stellt nach wie vor ein Ziel der Arzneimittelentwicklung dar [171]. Eine schematische Darstellung des mAGP-Komplexes zeigt Abbildung 6.

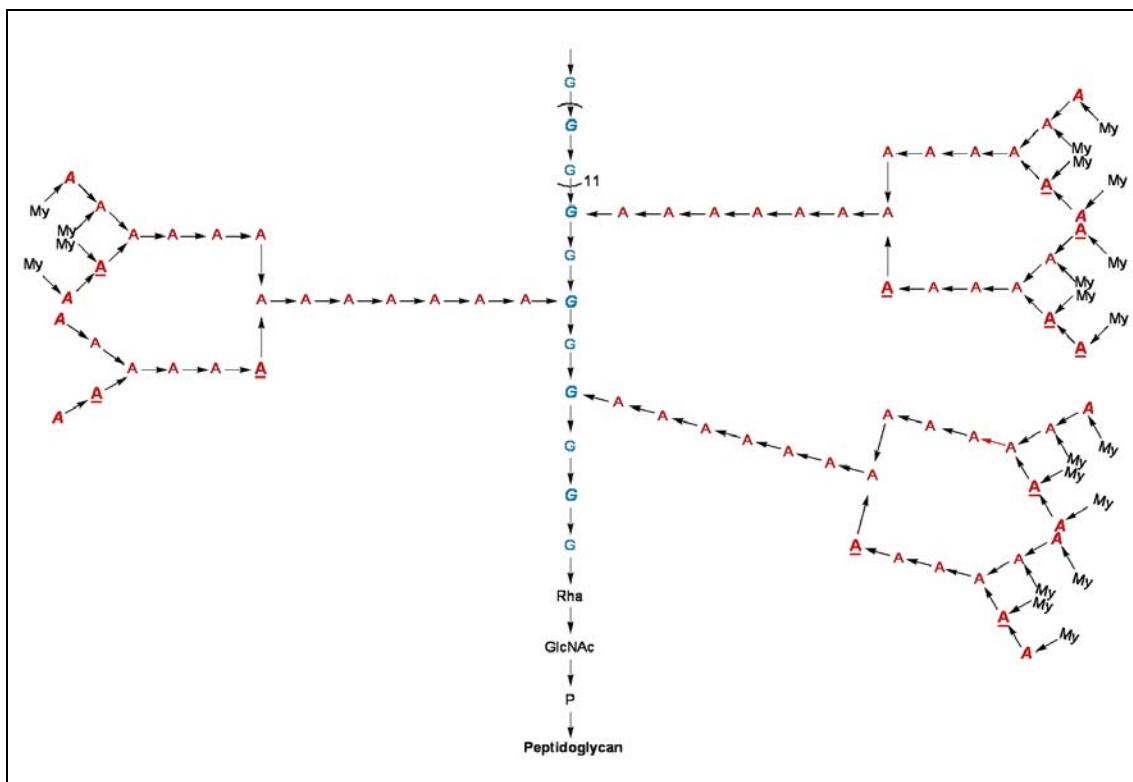


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Mycoloyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplexes als Hauptbestandteil der mykobakteriellen Zellwand.

Das Arabinogalactan ist kovalent an das Peptidoglycan über ein Phosphodisaccharid aus Rhamnose und N-Acetylglucosamin gebunden. Das Arabinogalactan besteht aus ausschließlich furanosidisch gebundenen Zucker-Resten. An einer linearen Galactan-Kette mit alternierenden β -(1 \rightarrow 5)- und β -(1 \rightarrow 6)-Bindungen befinden sich Verzweigungen aus α -(1 \rightarrow 5)-gebundenen Arabinan-Ketten, die ihrerseits jeweils an den Positionen 3 der Arabinose-Reste verzweigt sind. An den nicht-reduzierenden Enden befinden sich verzweigte Hexasaccharide aus β -(1 \rightarrow 2)-gebundenen Arabinose-Resten, dessen Hydroxygruppen zum Teil mit Mykolsäuren verestert sind. A = α -(1 \rightarrow 5)-Araf; A = α -(1 \rightarrow 3)-Araf; A = β -(1 \rightarrow 2)-Araf; G = β -(1 \rightarrow 5)-GalF; G = β -(1 \rightarrow 6)-GalF; My = Mykolsäure [180].

Mit seinen ausschließlich furanosidisch gebundenen Zuckern (Ara und Gal) ist das Arabinogalactan in seiner Struktur einzigartig. Das Arabinogalactan ist kovalent (*O*-6) an den Muraminsäure-Rest des Peptidoglycans über einen Phosphodisaccharid-Bindemolekül aus Rhamnose und *N*-Acetylglucosamin gebunden [189]. An Position 4 der Rhamnose befindet sich eine lineare Kette aus ungefähr 30 Galactose-Resten (Gal_f) mit alternierenden β -(1 \rightarrow 5)- und β -(1 \rightarrow 6)-Bindungen. An diesem Galactan befinden sich Verzweigungen, von denen weitere Ketten aus Arabinose-Resten (Ara_f) ausgehen. Jede Galactan-Kette besitzt zwei bis drei Arabinan-Ketten. Dieses Arabinan besteht in der Gesamtheit aus annähernd 70 Resten aus hauptsächlich linearen α -(1 \rightarrow 5)-gebundenen Ketten, in denen jedoch wiederum Verzweigungen mit linearen Arabinan-Ketten gebunden an Position 3 eines Arabinose-Restes auftreten. An den nicht-reduzierenden Enden dieser Arabinan-Ketten befindet sich jeweils ein verzweigtes Hexasaccharid mit zwei β -(1 \rightarrow 2)-gebundenen Arabinose-Resten [190].

Das Arabinogalactan stellt das Gerüst dar, an das die Mykolsäuren kovalent gebunden sind. Durchschnittlich zwei Drittel der verzweigten Hexasaccharide sind mit Mykolsäuren verestert [191].

Mykolsäuren sind hochmolekulare α -Alkyl- β -hydroxy-Fettsäuren, die in allen Mykobakterien-Spezies [192] und anderen Aktinomyzeten vorkommen [175]. Diese langkettigen Fettsäuren mit bis zu 90 C-Atomen tragen funktionelle Gruppen, wie Cyclopropyl-, Ketyl-, Hydroxy- und Methoxy-Gruppen. Die exakte Struktur der Fettsäuren ist jedoch speziesspezifisch. Die am häufigsten vorkommenden Mykolsäuren in *M. tuberculosis* können generell in drei Klassen unterteilt werden: α -Mykolsäuren, Methoxy-Mykolsäuren und Keto-Mykolsäuren [193].

In langsam wachsenden Mykobakterien, nicht jedoch in schnell wachsenden, wurde Galactosamin nachgewiesen. Es wird angenommen, dass in jeder Arabinogalactan-Kette ein einzelner Galactosamin-Rest, vermutlich in pyranosidischer Form, vorliegt und an *O*-2 mit einem α -Ara_f-Rest einer α -(1 \rightarrow 5)-Arabinan-Kette substituiert ist [194].

Das antimykobakteriell wirksame und standardmäßig verabreichte Ethambutol inhibiert wahrscheinlich die Biosynthese dieses Arabinogalactans durch Blockieren einer Arabinosyl-Transferase [195] und wirkt somit bakteriostatisch [196;197;198]. Andererseits inhibiert Ethambutol möglicherweise die Konversion von Glucose zu anderen Monosacchariden, die essentiell für die Zellwand-Biosynthese sind [199].

1.2.1.3 Lipoarabinomannan und Lipomannan

Die Strukturen des Lipoarabinomannans (LAM) und des Lipomannans (LM) - das Äquivalent mit fehlendem Arabinan und biosynthetisches Vorläufermolekül - sind heterogener als die des Mycoloyl-Arabinogalactan-Komplexes. Obwohl die überwiegenden strukturellen Eigenschaften gut untersucht sind, bleiben einige Details bislang noch ungeklärt [190].

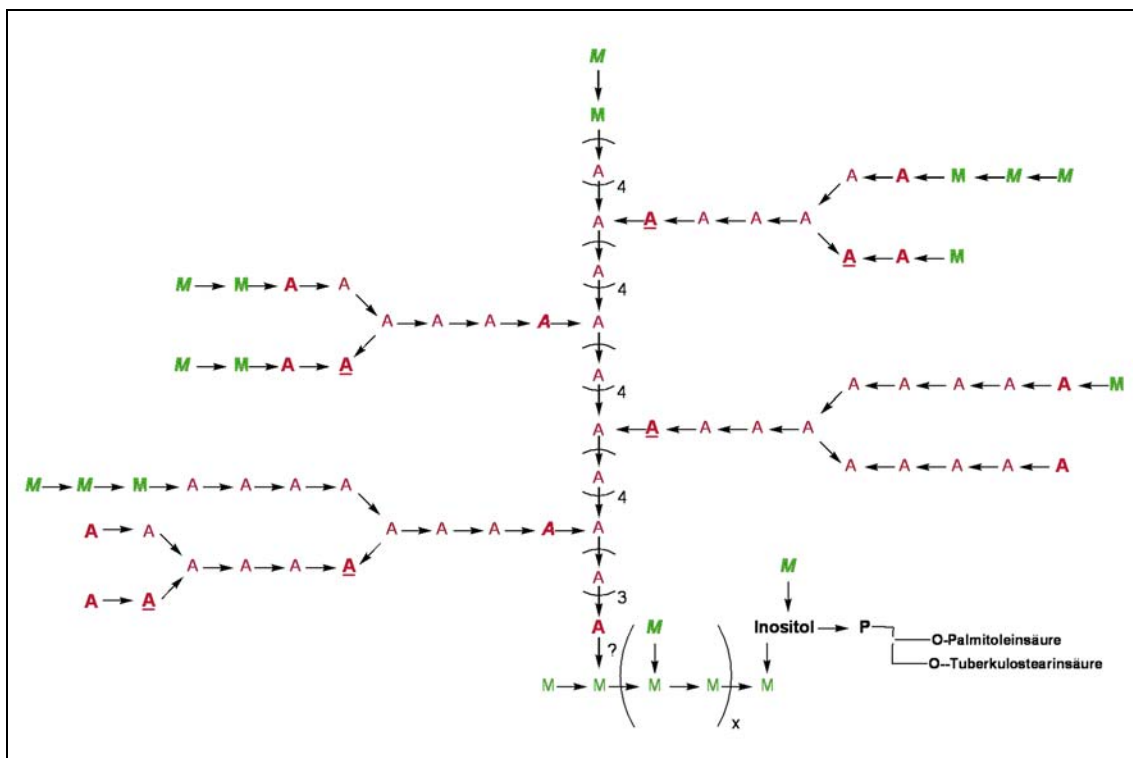


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Struktur des mykobakteriellen Lipoarabinomannans.

Eine α -(1 \rightarrow 6)-gebundene Mannan-Kette befindet sich an dem Mannose-Rest, der an Position 6 des Inositols in PIM₂ gebunden ist. An das Inositolphosphat sind Tuberkulostearinsäure und Palmitoleinsäure an das Inositolphosphat gebunden. An diese Mannan-Kette ist ein Arabinan mit vorwiegend α -(1 \rightarrow 5)-Bindungen und regelmäßigen Verzweigungen an bisher unbekannter Position verknüpft. **A** = α -(1 \rightarrow 5)-Araf; **A** = α -(1 \rightarrow 3)-Araf; **A** = β -(1 \rightarrow 2)-Araf; **M** = α -(1 \rightarrow 6)-Manp; **M** = α -(1 \rightarrow 2)-Manp; **M** = α -(1 \rightarrow 5)-Manp [180].

Beide Polymere sind sehr wahrscheinlich nicht-kovalent über den Lipid-Anteil des Phosphatidylinositols in der cytoplasmatischen Membran verankert.

Wie bereits erwähnt (siehe 1.2.1.1), bildet das PIM₂ die Basisstruktur, aus der LAM und LM aufgebaut werden.

In Abbildung 7 ist die Struktur des Lipoarabinomannans schematisch dargestellt.

Das Glycan beider Moleküle besteht aus einer linearen α -(1 \rightarrow 6)-gebundenen Mannan-Kette (Man_p), die von dem Mannose-Rest ausgeht, der an Position 6 des Inositols in PIM₂ gebunden ist [200]. Das Mannan ist speziesspezifisch von unterschiedlicher Kettenlänge [201] und weiter substituiert durch α -(1 \rightarrow 2)-gebundene Mannose-Reste (Man_p) an nahezu jedem zweiten Zucker. Im LAM vorkommende Fettsäuren sind Palmitoleinsäure und Tuberkulostearinsäure. Weiterhin kommen Succinat- und Lactat-Substitutionen vor [40]. Tuberkulostearinsäure und Palmitoleinsäure sind an das Inositolphosphat gebunden, während Succinat und Lactat wahrscheinlich an Hydroxygruppen des Polysaccharids verestert sind [202].

Im LAM ist die Mannan-Kette mit einem Arabinan verknüpft, das dem des Arabino-galactans ähnlich ist: eine lineare α -(1 \rightarrow 5)-gebundene Kette mit regelmäßigen Verzweigungen. Das Verhältnis zwischen linearen zu verzweigten Arabinofuranosen im LAM ist hingegen größer als im AG. Der größte Unterschied zwischen dem Arabinan im LM und im AG liegt in den nicht-reduzierenden Enden, an denen verschiedene Strukturen zu finden sind [200;203;204]. Es wurde ebenso wie im AG ein verzweigte Hexasaccharid gefunden, aber auch ein lineares Tetrasaccharid (Ara_f). In beiden Strukturen wurde die Substitution mit terminalen Mannose-Oligosacchariden unterschiedlicher Länge nachgewiesen, aus denen sich verschiedene Formen mannosylierter Lipoarabinomannane (ManLAM) ergeben. Es wurden jedoch auch weitere Modifikationen im LAM gefunden. So wurde im LAM von *M. smegmatis* das verzweigte Hexasaccharid mit endständigen Inositol-Phosphaten nachgewiesen, was zur Identifizierung einer weiteren Gruppe der Lipoarabinomannane, den PI-GAM (phosphoinositols-glyceroarabino-mannans), geführt hat [205;206].

Einerseits wird angenommen, dass das LAM nicht-kovalent über den Phosphoinositol-Anker in der Plasmamembran verankert ist und durch die gesamte Zellwand bis zur Oberfläche ragt. Andererseits wird diskutiert, ob das LAM, ebenfalls nicht-kovalent über den PI-Linker, in der Mykolsäureschicht verankert ist [207]. Außerdem besteht die Hypothese, dass LAM sowohl in der Membran verankert ist als auch in der äußeren Zellwand vorkommt, so dass zwei Schichten existieren [208] oder LAM kontinuierlich synthetisiert und von der Zellwand abgeschieden wird. In jedem Fall wird das Molekül an der Zell-Oberfläche präsentiert, so dass es mit dem Immunsystem des Wirtsorganismus interagiert.

Es konnte gezeigt werden, dass in der Kapsel Arabinomannane vorkommen, die dem Glycan des ManLAM strukturell ähnlich sind [40] (siehe 1.2.1.5). Das lässt die Annahme zu, dass das Molekül weder ausschließlich in der Plasmamembran noch ausschließlich mit den Mykolsäuren assoziiert ist, sondern permanent synthetisiert und auch an die Zelloberfläche abgestoßen wird [180].

1.2.1.4 Nicht-kovalent gebundene Lipide und Glycolipide

An der Oberfläche der Zellwand sind verschiedenartige Lipide und Glycolipide mit den Mykolsäuren wahrscheinlich nicht-kovalent assoziiert. Oft werden diese als „extrahierbare Lipide“ bezeichnet. Glycolipide sind so in der Zellwand lokalisiert, dass ihre Lipidanteile mit den Mykolsäuren interagieren und ihre Oligosaccharid-Reste an die äußerste Zelloberfläche ragen, wo sie mit dem Immunsystem des Wirtes in Kontakt treten können. Demzufolge sind diese Glycolipide, dessen Oligosaccharide zumeist speziesspezifisch sind, immunogen. Antikörper gegen diese Strukturen tragen möglicherweise dazu bei, mykobakterielle Infektionen zu diagnostizieren und auf Speziesebene zu differenzieren.

Extrahierbare Glycolipide können in vier Gruppen unterteilt werden: Lipooligosaccharide, phenolische Glycolipide, acylierte Trehalose-Derivate und Glycopeptidolipide. Es werden nicht alle dieser Verbindungen in allen Mykobakterien-Spezies gefunden, und überdies variieren die Strukturen innerhalb des Genus sehr stark. Zum Beispiel kommen phenolische Glycolipide in *M. tuberculosis* weniger häufig vor als in anderen Spezies [209;210]. Reed *et al.* haben gezeigt, dass phenolische Glycolipide biologisch hoch aktiv sind. Bei Infektionen mit hypervirulenten Stämmen von *M. tuberculosis* inhibieren sie die Antwort des angeborenen Immunsystems [211].

Alle Lipooligosaccharide, die sich an der Oberfläche der Zellhülle befinden, bestehen aus einer Kernstruktur aus Trehalose, die an einem Rest mit variablen Saccharid-Ketten glycosyliert und an dem anderen Rest mit drei bis vier Fettsäuren acyliert ist [212].

Phenolische Glycolipide bestehen aus einem hydrophoben acylierten Phenol-Rest, dessen Hydroxyl-Gruppe mit hydrophoben, mehrfach desoxygenierten und methylierten Zuckern glycosyliert ist [213].

Als acylierte Trehalose-Derivate kommen der Cord-Faktor (Trehalose-6,6'-dimycolat) [214], Sulfolipid-Derivate [215] und 2,3-di-*O*-acylierte Trehalose-Derivate [216] vor.

Von diesen Verbindungen wird angenommen, dass sie in der Pathogenese der Tuberkulose eine Rolle spielen [217]. Es ist bekannt, dass der Cord-Faktor (siehe 1.1.1.3) für die Hemmung der Leukozytenmigration verantwortlich ist [37] und in isolierter Form - mehrfach intraperitoneal in Mäusen injiziert - tödlich wirkt [59]. Der Cord-Faktor kommt nicht nur in pathogenen, sondern auch in apathogenen Mykobakterien-Spezies vor, und zwar unabhängig von dem charakteristischen zopfförmigen Wachstum [218].

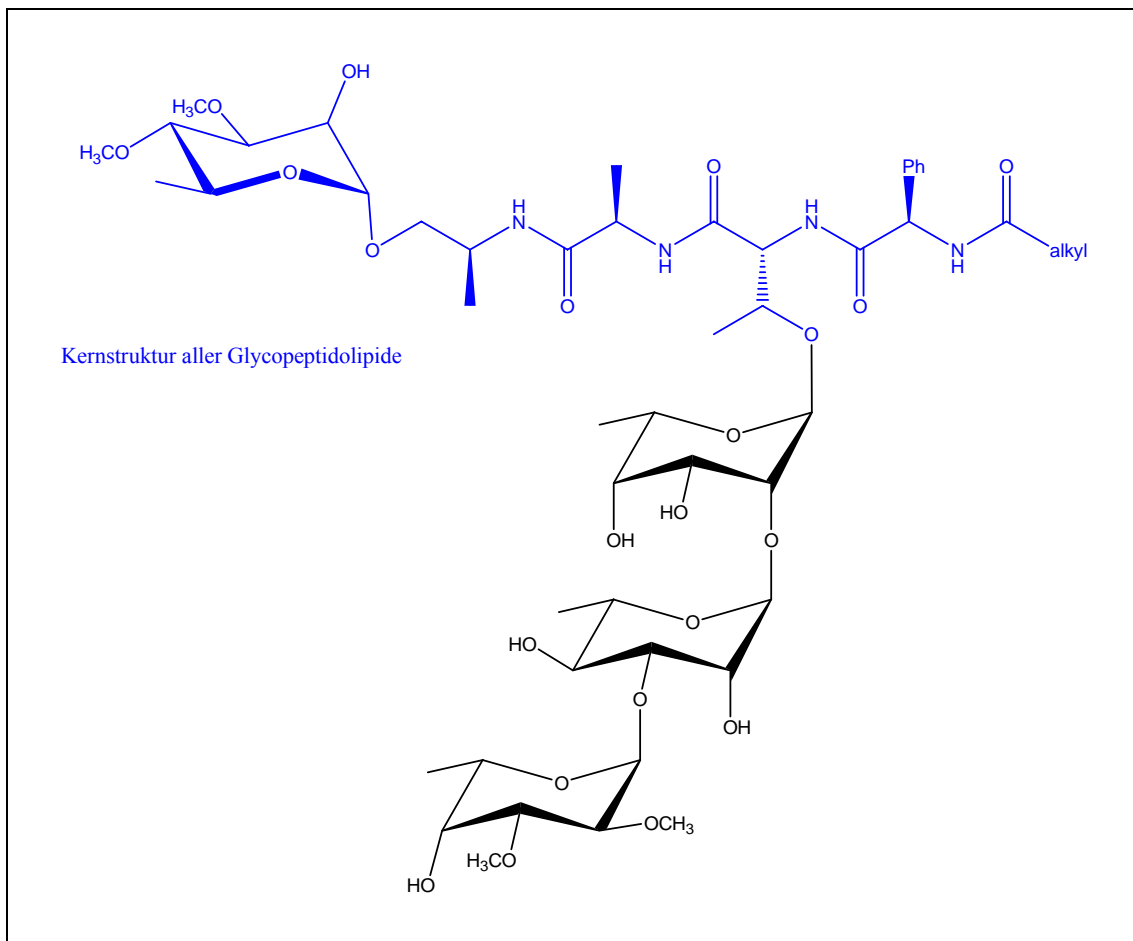


Abbildung 8: Struktur des Glycopeptidolipids aus *M. avium* Serovar 2.

Die Kernstruktur besteht aus dem Tetrapeptid D-Phe-D-*allo*-Thr-D-Ala-L-Ala. Über die Hydroxylgruppe des Alanins ist es mit einer 3,4-di-*O*-methylierten L-Rhamnose glycosyliert. Der Phenylalanin-Rest ist *N*-acyliert, und der Oligosaccharid-Rest ist über die Hydroxylgruppe des *allo*-Threonins gebunden [180].

Die Kernstruktur der Glycopeptidolipide besteht aus dem Peptid D-Phe-D-*allo*-Thr-D-Ala-L-alaninol, das an der Hydroxyl-Gruppe des Alaninols mit einer 3,4,-di-*O*-Methyl-L-Rhamnose glycosyliert ist [190]. Der Phenylalanin-Rest ist mit einer Fettsäure *N*-acyliert, und ein Oligosaccharid ist über die Hydroxyl-Gruppe des

allo-Threonins gebunden. Typischerweise handelt es sich um ein Disaccharid aus L-Rhamnose und 6-deoxy-L-Talose, aus dem sich komplexere, äußerst variable Strukturen aufbauen [171].

Ein Glycopeptidolipid aus *M. avium* Serovar 2 ist in Abbildung 8 dargestellt. Anders als lange angenommen, sind die speziesspezifischen Glycopeptidolipide nicht für das intrazelluläre Überleben verantwortlich [219].

1.2.1.5 Die Kapsel

Viele Bakterien sind von einer Kapsel umgeben. Es handelt sich dabei um eine Gel-artige Schicht, die zum großen Teil aus Polysacchariden besteht. Kapseln kommen sowohl in Gram-positiven als auch in Gram-negativen Bakterien vor. Bemerkenswert ist, dass Kapseln hinsichtlich ihrer Schichtdicken extrem variabel sind. Selbst innerhalb desselben Stammes können Isolate unterschiedlich ausgeprägte Kapseln besitzen [220].

In vielen Fällen führt die Existenz einer Kapsel zu gesteigerter Virulenz. Der Nachweis von Kapseln ist oft schwierig und kann auf verschiedene Weisen erfolgen. Lichtmikroskopisch können diese Strukturen nach vorangegangener Karbofuchsin-Behandlung und anschließender Färbung mit India-Ink als heller Hof zwischen pinkgefärbten Zellen und schwarzem Hintergrund sichtbar gemacht werden. Eine weitere Methode ist die so genannte Kapselquellungsreaktion, bei der die Kapsel durch Immunpräzipitation nach Inkubation spezifischer Antikapsel-Seren dicker erscheint [221]. Ferner dienen elektronenmikroskopische Untersuchungen, wie die Immuno-Elektronenmikroskopie unter Verwendung von spezifischen Anti-Kapsel-Antikörpern, zur Darstellung und Analyse von Kapseln [222].

Durch ihre Lokalisation an der äußersten Oberfläche der Zelle ist es möglich, Kapseln durch milde Extraktionen verhältnismäßig problemlos von der Zellwand zu entfernen oder aus Kulturüberständen zu isolieren [244;245;246;247]. Im Allgemeinen ist es ausreichend, die Zellen in isotonischer Kochsalzlösung unter Ultraschall oder höheren Temperaturen zu behandeln. Eine weitere Methode zur Kapselisolierung bietet die Extraktion mit Glaskugeln von geringem Durchmesser, wobei unter Schütteln Scherkräfte das Material ablösen [223]. Etablierte Methoden zur Lipopolysaccharid-Isolierung aus Gram-negativen Bakterien, wie die Extraktion mit 45%iger Phenol-Lösung bei 65-68°C [224], werden ebenfalls häufig verwendet [220].

Eine weitere Methode zur Kapselisolierung ist die Extraktion mittels 1% wässriger Phenol-Lösung, in der die Zellen für 48 h langsam gerührt werden [225]. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen von *M. avium* vor (siehe Abbildung 9a) und nach Phenolextraktion (siehe Abbildung 9b).

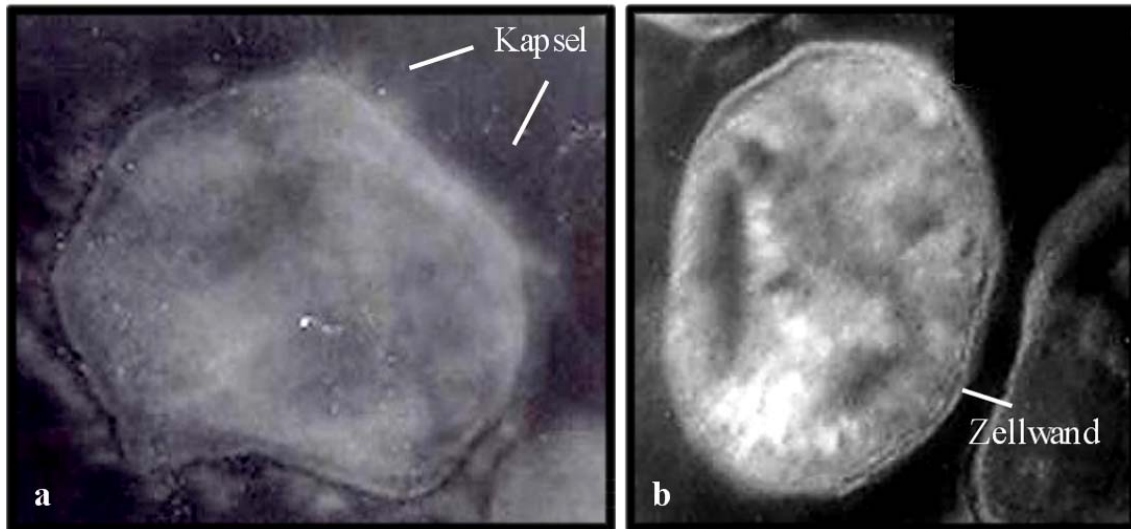


Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Aufnahmen mykobakterieller Zellen (*M. avium* Stamm 104) vor (a) und nach (b) Extraktion mit Phenol.

Die Zellen wurden in 1% (w/v) wässriger Phenol-Lösung für 48 h bei 4°C unter leichtem Rühren inkubiert. Abbildung der Aufnahmen mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Otto Holst, Strukturbiochemie, Forschungszentrum Borstel.

Vor der Behandlung mit Phenol konnten an der äußersten Zelloberfläche ausgedehnte diffuse Strukturen visualisiert werden, die Material der Kapsel darstellen. Nach dieser Behandlung erscheint die Zelle mit ihrer intakten Zellwand scharf abgegrenzt. Demnach ist es mit der beschriebenen Methode möglich, Kapselmateriale von der Zelle zu extrahieren, ohne die Zellwand zu zerstören.

Aufgrund der milden Extraktionsmethoden wird daher angenommen, dass die Kapsel lediglich mit der Zellwand assoziiert ist.

Es wurde gezeigt, dass auch in einigen Mykobakterien der Zellwand-Komplex von einer Kapsel umgeben ist, die aus Polysacchariden, Proteinen und geringen Mengen Lipiden besteht [40]. 1959 wurde erstmals die Existenz einer mykobakteriellen Kapsel beschrieben. Sie wurde zunächst als „kapsulärer Raum“ zwischen der Phagosomenmembran der infizierten Zelle und des Bakteriums bezeichnet [226]. Aufgrund von

elektronenmikroskopischen Beobachtungen wurde der Begriff „elektronentransparente Zone“ geprägt. Dabei wurde angenommen, dass diese nur in pathogenen Bakterien vorkommt [227;228;229]. Es konnte zunächst nicht geklärt werden, ob es sich tatsächlich um eine Kapsel handelt, oder ob die identifizierten Bestandteile bei der Isolierung durch Zellzerstörung aus der Zellwand herausgelöst wurden [230]. 1986 wurden die elektronenmikroskopischen Beobachtungen durch chemische Analysen bestätigt [231]. Heute gilt die Existenz einer Kapsel als bewiesen. In frischen Patientenisolaten ist die Kapselbildung am häufigsten und nimmt mit zunehmender Zahl von Passagen ab. Kohlenhydrat-Supplemente im Nährmedium können jedoch die Kapselbildung stabilisieren [232].

Aus verschiedenen Mykobakterien-Spezies wurde die Kapsel extrahiert und auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Sie besteht aus Proteinen, Lipoproteinen und Polysacchariden. Neben Enzymen, die unter anderem an der Zellwandbiosynthese beteiligt sind, und Transportproteinen, wie Porinen, wurden Proteine und Lipoproteine isoliert und teilweise charakterisiert. Von *M. tuberculosis* wurden bislang vier Lipoproteine näher untersucht, denen immunogene Eigenschaften zugesprochen werden.

Ein glycosyliertes 19 kDa-Lipoprotein stellt wahrscheinlich einen Virulenzfaktor dar [233]. Dieses konnte ebenfalls in *M. intracellulare* nachgewiesen werden.

Als phosphat-bindendes Protein wurde ein stark immunogenes 38 kDa-Protein identifiziert [234]. Es wird einerseits von den Zellen in das umgebende Medium abgeschieden, ist aber andererseits mit dem lipophilen Teil des Moleküls an der Zelloberfläche verbunden [235]. Dieses Lipoprotein ist in der Lage, ausgeprägte T-Zell-Antworten zu induzieren [236].

Ebenso hoch immunogene Lipoproteine aus *M. kansasii* (26 kDa) [237] und *M. intracellulare* (27 kDa) [238] zeigen Kreuzreaktivitäten zu anderen Mykobakterien-Spezies.

Ein Protein mit einer Molekularmasse von 23 kDa fungiert in *M. avium* als Superoxid-dismutase [239] und ein weiteres Protein von 29 kDa als β -Lactamase [220].

Obwohl lange angenommen wurde, dass Prokaryoten nicht zur Synthese von Glycoproteinen befähigt sind, wurde erstmals die Existenz von bakteriellen Glycoproteinen in *Halobacterium halobium* und später in einigen pathogenen Gram-negativen Bakterien nachgewiesen [240]. So wurde auch in Kulturüberständen von *M. tuberculosis* ein 45 kDa-Glycoprotein mit antigenen Eigenschaften isoliert und charakterisiert [241;242]. Ein weiteres mykobakterielles Glycoprotein wurde aus *M. bovis* isoliert. In diesem so

genannten Antigen MPB83 wurde die Glycosylierung als Trisaccharid aus (1→3)-gebundenen Mannose-Resten charakterisiert [243].

Aus der Kapsel von *M. tuberculosis* wurden als Hauptbestandteile der Polysaccharide ein Glucan, ein Arabinomannan und ein Mannan isoliert und strukturell charakterisiert. Das Glucan und das Arabinomannan konnten aus Kulturüberständen von *M. tuberculosis* isoliert werden [244]. Bereits 1938 wurden durch Seibert *et al.* serologisch aktive Polysaccharide aus *M. tuberculosis* isoliert, u.a. eine sog. „Polysaccharid-Fraktion II“, die Kulturüberstände opaleszieren ließ [245;246;247], und die aus heutiger Sicht sicher dem Glucan entspricht [248]. Das Glucan weist durch seine α -(1→4)-Bindungen strukturelle Ähnlichkeiten zum cytosolischen mykobakteriellen Glycogen auf. Das Arabinomannan und das Mannan hingegen ähneln strukturell den Glycan-Anteilen von LAM und LM [40].

Untersuchungen mit einem monoklonalen Antikörper, der das Glucan aus *M. tuberculosis* erkennt (mAb 24c5), weisen daraufhin, dass eine konstante Menge des Glucans *in vitro* und *in vivo* auf der äußersten Zelloberfläche von *M. tuberculosis* exprimiert wird, und dass ähnliche Antigene in weiteren Mykobakterien-Spezies vorhanden sind [248].

Analog dazu konnten in verschiedenen Substämmen von *M. bovis* BCG α -Glucane isoliert werden, die identische strukturelle Eigenschaften zu dem Glucan aus *M. tuberculosis* aufweisen, und denen anti-neoplastische Eigenschaften hinsichtlich oberflächlicher Harnblasenkarzinome (siehe 1.1.2.1.2) nachgewiesen werden konnten [249]. Da der Einsatz von ganzen Mykobakterien als Lebend-Vakzine in der Therapie des Urothelkarzinoms mit nicht zu unterschätzenden Komplikationen [250] und signifikanter Mortalität [251] assoziiert ist, könnten isolierte (Glyco)Strukturen aus *M. bovis* BCG mit nachgewiesenen Anti-Tumor-Effekten die Immuntherapie des Blasenkarzinoms entscheidend verbessern – wenn nicht sogar Behandlungen anderer Tumoren auf diese Weise ermöglichen. So identifizierten präklinische Studien im Mausmodell ein rekombinant hergestelltes Lipoprotein aus *M. tuberculosis* (PstS1 antigen) als potenten Wirkstoff für diese Krebstherapie [252].

Zudem wurde durch eine Heißwasser-Extraktion von einem Substamm von *M. bovis* BCG ein weiteres Glucan isoliert, das aus einer Wiederholungseinheit von α -(1→6)-verknüpften D-Glucose-Resten besteht [253].

Das Glucan aus *M. tuberculosis* mit angenommener Molekülmasse vom 100 kDa besteht in der Wiederholungseinheit aus fünf bis sechs α -(1→4)-verknüpften

D-Glucose-Resten, die an *O*-6 mit D-Glc oder α -D-Glc-(1 \rightarrow 4)-D-Glc substituiert sind [40] (siehe Abbildung 10).

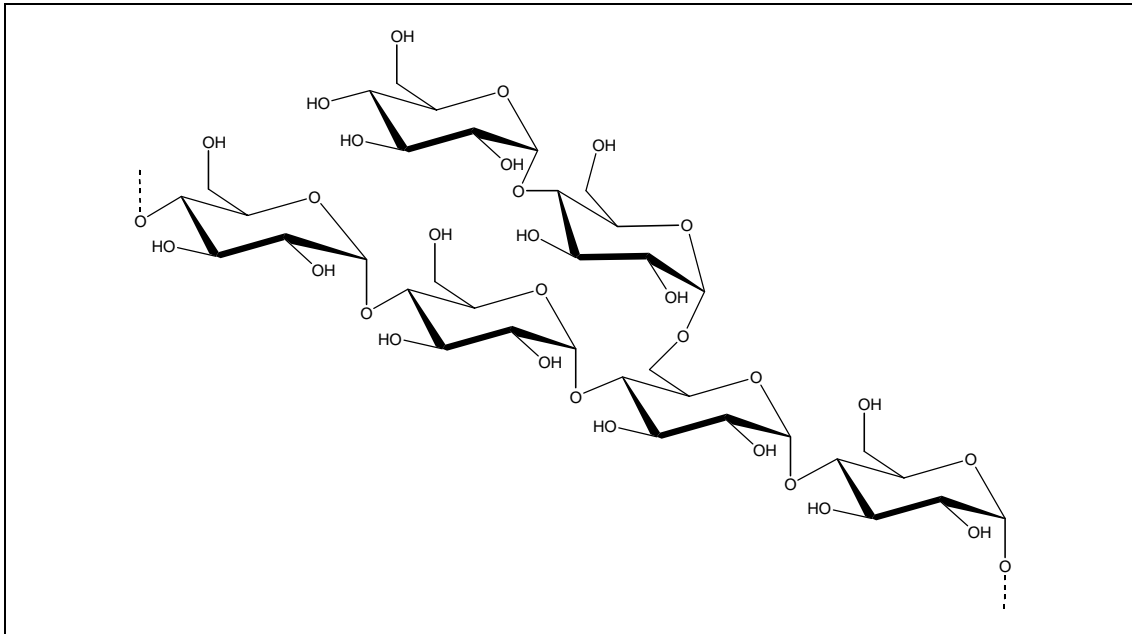


Abbildung 10: Strukturausschnitt des Glucans aus der Kapsel von *Mycobacterium tuberculosis*.

Es besteht aus α -(1 \rightarrow 4)-verknüpften D-Glucose-Resten, von denen durchschnittlich jeder fünfte bis sechste an Position 6 mit ein bis zwei D-Glucose-Resten [α -(1 \rightarrow 4)-] substituiert ist. Damit ist dieses Polymer dem Glycogen strukturell sehr ähnlich. Die angenommene Molekularmasse beträgt rund 100 kDa [40].

Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen mit einem monoklonalen Antikörper (mAb 9d8), der kapsuläres Arabinomannan [254], nicht aber ManLAM, erkennt, zeigen die Lokalisation des Arabinomannans in der mykobakteriellen Kapsel [255].

Das Arabinomannan wird sowohl *in vitro* als auch *in vivo* exprimiert, und die Biosynthese scheint innerhalb der Spezies *M. tuberculosis* stammspezifisch und abhängig von Wachstumsbedingungen zu sein. Erstaunlicherweise ist das Vorhandensein bzw. Fehlen von kapsulärem Arabinomannan abhängig von der Zugabe von Tween zu dem Nährmedium. Möglicherweise wird das Molekül allein durch die Wirkung des Detergenz' von der Kapsel abgelöst [256].

Ein modifiziertes Arabinomannan mit nachgewiesener serologischer Aktivität wurde aus *M. smegmatis* isoliert und charakterisiert [257].

Das Heteropolysaccharid Arabinomannan aus *M. tuberculosis* hat eine angenommene Molekülmasse von 13 kDa. Die exakte Struktur wurde nicht vollständig aufgeklärt. Es

wurde eine Struktur vorgeschlagen, in der das Arabinomannan aus einer verzweigten Mannose-Kette besteht, das an eine verzweigtes Arabinan gebunden ist, welches seinerseits mit terminalen Mannose-Resten substituiert sein kann [40] (siehe Abbildung 11).

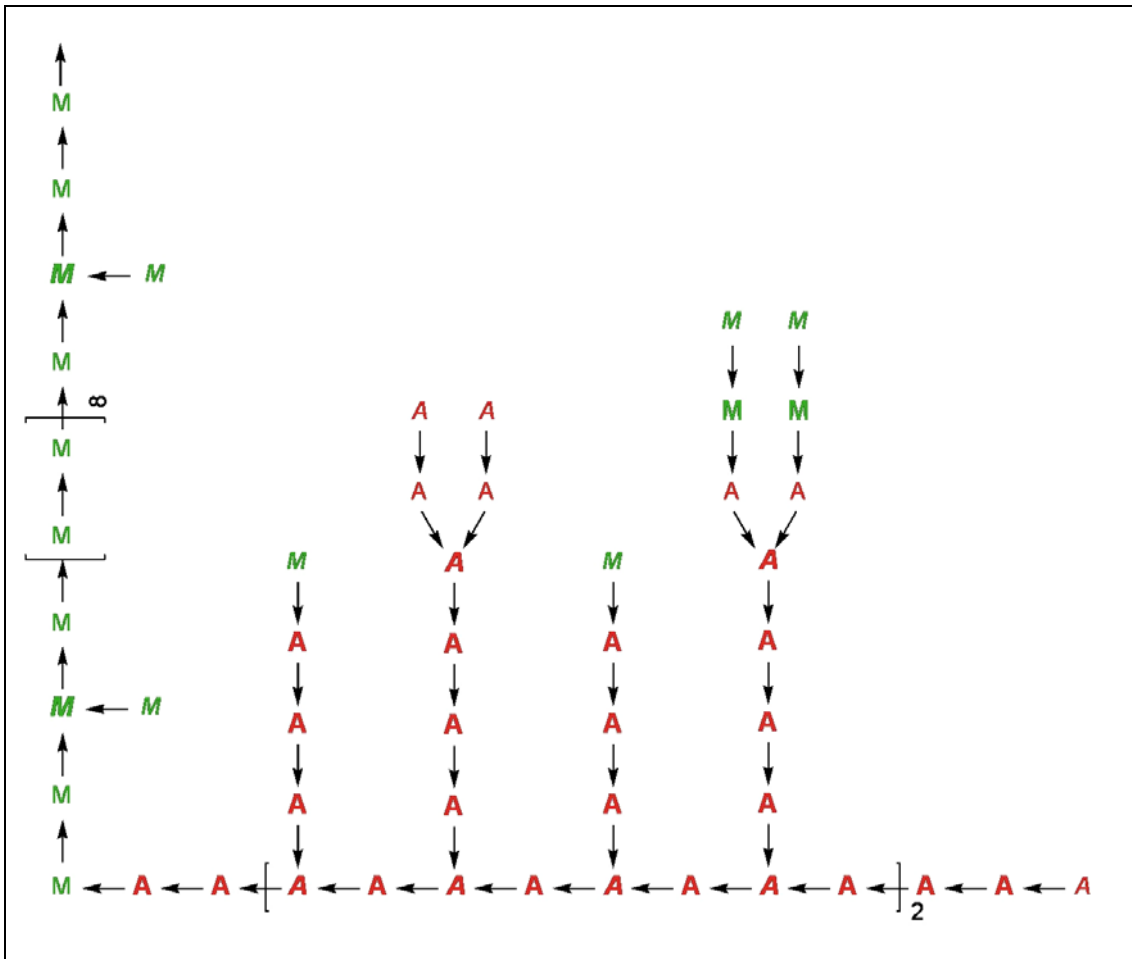


Abbildung 11: Vorgeschlagenes Strukturmodell des Arabinomannan aus der Kapsel von *M. tuberculosis*.

Die exakte Struktur ist nicht aufgeklärt. Es wurde eine Struktur vorgeschlagen, in der das Arabinomannan aus verzweigten Arabinan- und Mannan-Ketten besteht. Die Seitenketten können ihrerseits mit terminalen Arabinose- und Mannose-Reste substituiert sein. Das Mannan besteht vorwiegend aus α -(1 \rightarrow 6)-gebundenen Mannose-Resten. Das Arabinan weist strukturelle Gemeinsamkeiten zum dem Arabinogalactan aus der Zellwand auf. \overline{M} = 1-Manp; \overline{M} = 1,2,6-Manp; \overline{M} = 1,6-Manp; \overline{M} = 1,2-Manp; \overline{A} = 1-Araf; \overline{A} = 1,3,5-Araf; \overline{A} = 1,2-Araf; \overline{A} = 1,5-Araf. Verändert nach [40].

Das Mannan besteht aus α -(1 \rightarrow 6)-gebundenen Mannose-Resten, von denen einige an Position 2 mit einem weiteren Mannose-Rest substituiert sind. Das Arabinan besitzt strukturelle Ähnlichkeit zum dem Arabinogalactan aus der Zellwand (siehe 1.2.1.2). In

langsam wachsenden Spezies ist das Arabinomannan an den nicht-reduzierenden Enden mit Oligomannosiden substituiert [230;223;258], die im Arabinogalactan der Zellwand hingegen nicht vorkommen [259;260].

1.2.2 Biosynthese mykobakterieller Zellwand-Polysaccharide

Die äußerst komplexe Struktur der mykobakteriellen Zellwand grenzt die Gattung *Mycobacterium* von nahezu allen anderen Prokaryoten ab. Derzeit sind die Hauptbestandteile der Zellwand gut untersucht [40].

Dennoch ist es nach wie vor Ziel, Zellwandmoleküle pathogener Mykobakterien zu charakterisieren, um neue Chemotherapeutika entwickeln zu können. Dabei sind die Aufklärung der Zellwand-Biosynthese und die Identifizierung essentieller Enzyme von besonders großem Interesse. Die Entschlüsselung und Publikation des Genoms (4.411.532 bp) von *M. tuberculosis* 1998 [261] hat durch Proteom-Analysen [262] diese Untersuchungen entscheidend angetrieben. So konnten daraufhin 13 Enzyme identifiziert werden, die in der Synthese des Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplexes involviert sind [263].

1.2.2.1 Biosynthese des Mycoloyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplexes

Es wird davon ausgegangen, dass das gesamte Arabinogalactan an einem Polyprenol (Decaprenyl-Phosphat; C₅₀-P) als Trägermolekül synthetisiert und dann an das Peptidoglycan geknüpft wird, bevor es kovalent an die Mykolsäuren gebunden wird (siehe Abbildung 12) [180;264].

Es konnte gezeigt werden, dass *in vivo* die Biosynthese des Zellwand-Komplexes durch die Bereitstellung des Polyprenyl-Phosphats reguliert und initiiert wird [265], da langsam wachsende Stämme von *M. tuberculosis* weniger Polyprenyl-Phosphat synthetisieren als schnell wachsende von *M. smegmatis* [266].

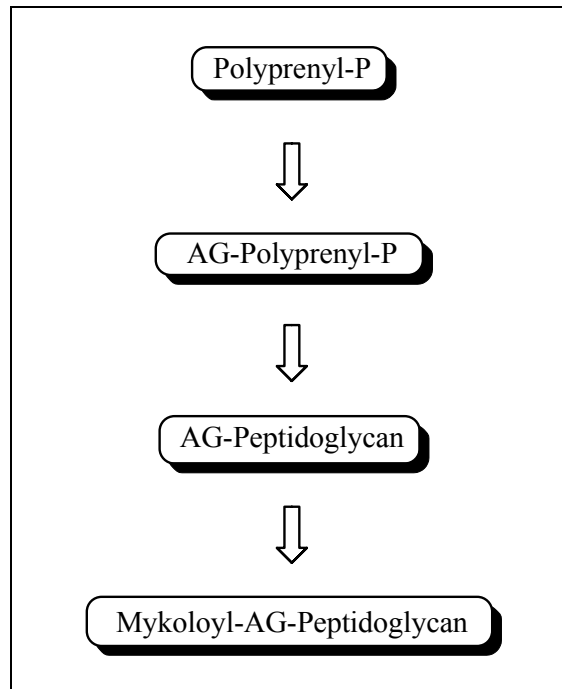


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Biosynthese des mykobakteriellen Mycoloyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplexes.

AG: Arabinogalactan. P: Phosphat. [180].

Die Biosynthese des Peptidoglycans scheint der in *E. coli* sehr ähnlich zu sein. Sie kann in vier Schritte unterteilt werden: Der erste ist die Synthese von UDP-*N*-Acetylmuraminsäure (UDP-MurNAc) aus UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc). Durch den Einbau von L-Alanin, D-Glutaminsäure, DAP und einem D-Alanyl-D-Alanin-Pentapeptid entsteht ein UDP-MurNAc-Pentapeptid. Anschließend wird das Lipid I aus dem MurNAc-Pentapeptid und Undecaprenylphosphat synthetisiert. Durch den Transfer eines GlcNAc-Rests auf das Lipid I entsteht so das Lipid II. Das Glycopeptid des Lipid II wird sehr wahrscheinlich von der Innenseite der Plasmamembran zum Periplasma transportiert, wo es zum Zusammenbau des Peptidoglycans kommt. Durch Transglycosylierungsreaktionen werden Disaccharid-Pentapeptide unter Freisetzung von Undecaprenyl-diphosphat zu einer Glycan-Kette synthetisiert. Anschließend erfolgen die Quervernetzungen der Ketten durch Peptid-Brücken [263].

Die Synthese des Arabinogalactans (in *M. tuberculosis*) beginnt mit dem Transfer von GlcNAc-1-P (durch UDP-GlcNAc) auf das Polyprenyl-Phosphat. Anschließend wird Rhamnose (durch dTDP-Rha) übertragen, so dass der so genannte Phosphodisaccharid-Anker aus Rhamnose und *N*-Acetylglucosamin entsteht [267], an dem das Arabinogalactan kovalent an den Muraminsäure-Rest des Peptidoglycans gebunden wird (siehe

1.2.1.2). (Dieser Rhamnose-Rest ist für die Synthese des Arabinogalactans essentiell. Die Enzyme, die für die Transformation von dTTP zu dTDP-Rha und Glucose-1-Phosphat verantwortlich sind, können spezifisch inhibiert werden. Das Wachstum von *M. tuberculosis* kann damit in Kulturen gehemmt werden [268].) Auf dieses Molekül werden dann furanosidisch gebundene Arabinose- und Galactose-Reste übertragen, so dass ein Lipid-gebundenes Arabinogalactan entsteht [269]. Dieses wiederum wird als gesamte Struktur durch eine Ligase unter Freisetzung von Decaprenyl-Phosphat auf das Peptidoglycan übertragen [263].

Die Zucker-Donoren in der Arabinogalactan-Synthese sind bereits identifiziert. Alle Gene, die zur Bereitstellung von TDP-Rha und UDP-Galf führen, sind bekannt. Ebenso ist das Enzym, das TDP-Rhamnose zur Synthese des Ankers nutzt, bekannt. Bei weitem sind derzeit jedoch nicht alle Enzyme identifiziert. Bisher ist auch nicht bekannt, welches Enzym das Arabinogalactan an das Peptidoglycan ligiert. Möglicherweise spielen hier mehrere eine Rolle [263].

Der Mycoloyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplex ist eine Struktur, die ausschließlich in Mykobakterien vorkommt. Die Aufklärung der Biosynthese mit den involvierten Enzymen ist von besonders großem Interesse, da sich aus Enzym-Inhibitoren neue Chemotherapeutika entwickeln lassen. Da das Peptidoglycan jedoch auch in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien vorkommt und seine Biosynthese in *M. tuberculosis* wahrscheinlich ähnlich reguliert ist wie in *E. coli*, können keine neuen Verbindungen diese Struktur Mykobakterien-spezifisch hemmen. Wenn aber die essentiellen Enzyme für die Arabinogalactan-Biosynthese identifiziert worden sind, ergeben sich gute Voraussetzungen für die Arzneimittelentwicklung hinsichtlich spezifischer antimykobakteriell gerichteter Enzym-Inhibitoren [269].

Grundsätzliche Fragen in der Synthese des Mycoloyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan-Komplexes bleiben jedoch ungeklärt. Es ist bekannt, dass die Vorläufermoleküle, wie Zucker-Nukleotide und Aminosäuren, im Zytoplasma lokalisiert sind, aber völlig unklar ist, auf welche Weise die synthetisierten Strukturen durch die Membran gelangen oder die Zellwand passieren [263].

1.2.2.2 Biosynthese des Lipoarabinomannans

Die Biosynthese sowohl des LM als auch des LAM wird initiiert an PIM₂ (siehe 1.2.1.1) als Vorläufermolekül. Dabei werden auf Phosphoinositol (PI) durch GDP-Man zwei Mannose-Reste übertragen und anschließend durch Palmitoyl-CoA palmitoyliert. Das entstandene Phosphoinositolmannosid PIM₂ kann auf dieselbe Weise durch weitere Mannose-Reste bis zum PIM₆ verlängert oder alternativ unter Einbau von Mannose-Resten mittels β -D-Mannopyranosyl-phosphodecaprenyl (C₅₀-Man) zum linearen α -(1 \rightarrow 6)-gebundenen Lipomannan aufgebaut werden. Es wird angenommen, dass die α -(1 \rightarrow 2)-gebundenen verzweigten Mannose-Reste ebenfalls durch die aktivierte Mannose GDP-Man übertragen werden.

Der Biosyntheseweg vom Phosphoinositol zum LAM ist in Abbildung 13 zusammengefasst.

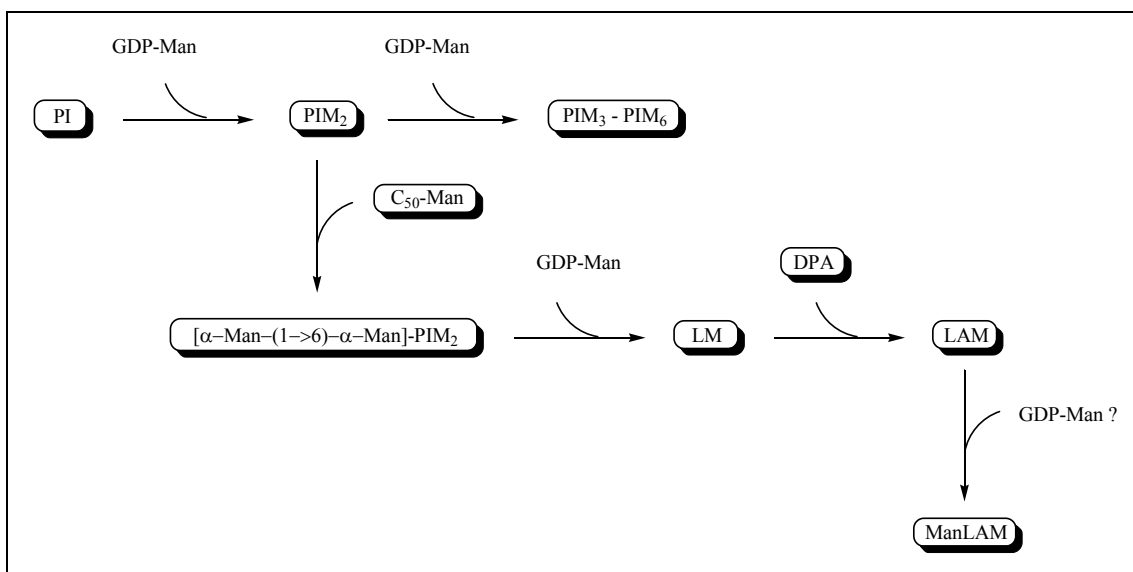


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Biosyntheseweges der mykobakteriellen Lipoglycane Lipomannan und Lipoarabinomannan.

Auf Phosphoinositol (PI) werden durch GDP-Man zwei Mannose-Reste übertragen, so dass Phosphoinositolmannosid PIM₂ entsteht. Durch den Einbau weiterer Mannose-Reste mittels β -D-Mannopyranosyl-phosphodecaprenyl (C₅₀-Man) wird lineares α -(1 \rightarrow 6)-gebundenes Lipomannan (LM) aufgebaut. Das Arabinan des Lipoarabinomannans (LAM) wird durch den Transfer einzelner furanosidisch gebundener Arabinosen durch β -D-Arabinofuranosyl-phosphodecaprenol (DPA) auf lineares oder bereits verzweigtes Lipomannan synthetisiert. Verändert nach [180].

Bisher sind die Mannosyltransferasen in diesem Biosyntheseweg nicht identifiziert. Sicher ist, dass Mykobakterien mindestens zwei dieser Enzyme besitzen, nämlich eines, das C₅₀-Man als Substrat verwendet, und ein weiteres, welches GDP-Man als Donor nutzt.

Das Arabinan des LAM wird durch den Transfer einzelner furanosidischer Arabinosen durch β -D-Arabinofuranosyl-phosphodecaprenol (DPA) auf entweder lineares oder bereits verzweigtes Lipomannan synthetisiert.

Auf welche Weise die terminalen Mannose-Oligosaccharide oder Inositolphosphate auf das LAM übertragen werden, ist bislang nicht geklärt. Da es sich bei den endständigen Mannose-Resten um α -(1 \rightarrow 2)-Bindungen wie im Mannan der Kernstruktur handelt, wird angenommen, dass auch hier eine Mannosyltransferase als Substrat GDP-Man verwendet [180].

1.2.3 Funktion mykobakterieller Zellwand-Polysaccharide

Mykobakterien können im Gegensatz zu den meisten anderen Mikroorganismen in humanen gewebständigen Makrophagen überleben und sich sogar in ihnen replizieren [42], anstatt von ihnen zerstört zu werden (siehe 1.1.2.1.1). Diese Tatsache wird zum größten Teil auf die einzigartige und komplexe Struktur der Zellhülle zurückgeführt [270] (siehe 1.2.1).

Einerseits, so wird angenommen, schützt die Zellwand den Erreger vor intrazellulärer Degradation durch den Makrophagen. Andererseits scheint die Zellwand eine bedeutende Rolle während der ersten Schritte der Infektion zu spielen, indem Zellwand-Komponenten mit Rezeptoren der Wirtszellen interagieren [271]. Ferner stellt die mykobakterielle Zellhülle eine äußerst undurchlässige Barriere für Antibiotika dar [272]. Für Bakteriostatika, die die Biosynthese bestimmter Strukturen inhibieren und somit nur in wachsenden Zellen wirken, ist dies weniger der Fall, aber Bakteriozide müssen durch die gesamte extrem komplexe Zellhülle in das Zellinnere penetrieren, um in den Replikationsmechanismus einzugreifen. Dabei werden an diese Antituberkulostatika hinsichtlich ihrer strukturellen und physiko-chemischen Eigenschaften hohe Anforderungen gestellt. Sie dürfen nicht zu groß sein, sie müssen hydrophil genug sein, um die Kapsel mit ihren Polysacchariden durchdringen, und sie müssen lipophil genug sein, um die extrem dicke Schicht aus Mykolsäuren zu passieren. Abgesehen davon ist

eine gute Gewebegängigkeit Voraussetzung [273], da es sich hier um Erreger handelt, die vorwiegend intrazellulär vorliegen und außerdem oftmals innerhalb von Granulomen von mehreren Zellschichten umschlossen sind [274].

1.2.3.1 Der Mycoloyl-Arabinogalactan-Komplex als hydrophobe Barriere

Die kovalent an das Arabinogalactan gebundenen Mykolsäuren sind parallel zueinander dicht angeordnet, so dass sie als Lipidschicht senkrecht zur Plasmamembran stehen (siehe 1.2.1.2). Die „extrahierbaren Lipide“ der äußeren Zellwand sind mit den Mykolsäuren assoziiert, so dass eine asymmetrische Lipiddoppelschicht an der Zelloberfläche entsteht. Die äußeren Lipide sind nicht so kompakt angeordnet wie die Mykolsäuren, so dass die Fluidität dieser Doppelschicht von innen nach außen zunimmt [275]. Furanosidisch gebundene Zucker, wie sie im Arabinogalactan vorliegen, sind in ihrer Konformation mobiler als Pyranosen, so dass das Arabinogalactan als flexibles Polysaccharid-Gerüst eine Struktur annehmen kann, um die extrem dichte Ausrichtung der Mykolsäuren zu ermöglichen [272].

Die Mykolsäure-Glycolipid-Doppelschicht fungiert an der Peripherie der Zelle als äußerst effektive Permeabilitätsbarriere für Antibiotika, was Resistenzen gegenüber vielen Substanzen erklärt [190]. Ebenso wird durch diese hydrophobe Struktur die Nährstoffaufnahme behindert. Die verzögerte Aufnahme von hydrophilen Nährstoffen gilt als Grund für das langsame Wachstum der Mykobakterien im Vergleich zu anderen Bakterien [276]. Aber es konnte gezeigt werden, dass Mykobakterien Porine in ihrer Zellwand besitzen, was sie zur Aufnahme von kleinen polaren Molekülen befähigt [277;278]. Diese scheinen jedoch ebenfalls, kleine polare Chemotherapeutika, wie Ethambutol und Isoniazid, in das Zellinnere zu befördern. Im Gegensatz zu anderen Bakterien besitzen Mykobakterien jedoch weniger Porine, die zudem weniger effizient sind. Unpolare Substanzen, einschließlich lipophile Antibiotika, können prinzipiell die Lipiddoppelschicht durchdringen, aber die geringe Fluidität der Mykolsäuren verzögert den Transport erheblich. Die Mykolsäure-Zusammensetzung hat hier einen entscheidenden Einfluss. Mykobakterien, die resistent gegenüber lipophilen Antibiotika sind, besitzen Mykolsäuren mit *trans*-Doppelbindungen oder *trans*-Cyclopropyl-Gruppen. Spezies, die suszeptibel gegenüber lipophilen Substanzen sind, besitzen

hingegen vermehrt *cis*-Doppelbindungen oder *cis*-Cyclopropyl-Gruppen in ihren Mykolsäuren [279].

Ferner können Antibiotika, die nur im Zellinneren wirken - wie Rifampicin, das die RNA-Polymerase hemmt [280] - durch diese Permeabilitätsbarriere lediglich eingeschränkt ihren Wirkort erreichen. Sie können die Mykolsäureschicht nicht oder nur sehr verzögert durchdringen und so die Erreger nur zu einem geringen Teil abtöten [180].

Verbindungen, die in der Lage sind, die Biosynthese von Zellwand-Molekülen zu inhibieren, gelten generell als antimykobakteriell wirksame Agenzien und können mit lipophilen Substanzen synergistische Effekte zeigen. So werden zum Beispiel in einer klassischen Kombinationstherapie Ethambutol oder Isoniazid als Inhibitoren der Arabinan-Biosynthese zusammen mit Rifampicin verabreicht, das folglich durch die defekte Zellwand effektiver in das Zellinnere gelangen kann [281;282;283].

1.2.3.2 Die Rolle des Lipoarabinomannans im Krankheitsverlauf

Als eines der mykobakteriellen Hauptantigene gilt derzeit das LAM (siehe 1.2.1.3). Es wird angenommen, dass es für die klinische Manifestation der Tuberkulose mitverantwortlich ist. Es wirkt während des Krankheitsverlaufes durch folgende Effekte vielseitig immunmodulatorisch: Inhibition von T-Zell- und Makrophagenaktivierung [284], Induktion von Zytokinen [285;286;287], Neutralisation zytotoxischer Sauerstoffradikale [288], Inhibition von Kinaseaktivitäten, Erhöhung der Tyrosin-Dephosphorylierung [289] und Expression von Kollagenasen, die zur Zerstörung von extrazellulärer Lungenmatrix führen [290].

Die strukturellen Eigenschaften des LAM, die für diese Effekte verantwortlich sind, sind bislang nicht vollständig verstanden.

Es gibt Hinweise darauf, dass die Fähigkeit zur Eliminierung von freien Radikalen auf den Glycan-Anteil des Polymers zurückzuführen ist. Werden die Fettsäuren des PIM durch alkalische Hydrolyse abgespalten, so werden vermehrt Radikale unschädlich gemacht [288].

Umgekehrt kommt es aber durch deacyliertes LAM zu keiner Induktion von Zytokinen mehr und durch kleine PIM-Strukturen lediglich zu geringer Induktion. Das deutet

daraufhin, dass der Phosphoinositol-Anteil für die Induktion von Zytokinen verantwortlich ist [291].

Weiterhin induzieren terminale Inositol-Phosphate, wie sie in der LAM-Struktur (PI-GAM) vom *M. smegmatis* vorkommen, sehr effektiv die Freisetzung von Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α), was durch Makrophagenaktivierung zur Abtötung des Bakteriums führt (siehe 1.1.2.1.1). Daher wird davon ausgegangen, dass diese endständigen Modifikationen in der Struktur des LAM [206] zum Teil die Avirulenz dieser Spezies begründen.

Eine größere Bedeutung wird den terminalen Mannose-Resten (Man_p) an den Hexasacchariden (Araf) des ManLAM zugesprochen. Es wurde gezeigt, dass ManLAM an humane Mannose-Rezeptoren (MMR) bindet, und somit die ersten Schritte der Phagozytose einleitet [292]. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass lediglich einige Stämme von *M. tuberculosis* mannosylierte LAM-Strukturen besitzen, die für die gesteigerte Pathogenität der Stämme verantwortlich sind [203]. Das konnte jedoch durch den Nachweis von ManLAM in *M. bovis* BCG widerlegt werden [293].

1.2.4 Funktion mykobakterieller Kapselpolysaccharide

Derzeit können den Kapselpolysacchariden noch keine spezifischen biologischen Aktivitäten eindeutig zugeordnet werden.

Es wird angenommen, dass diese Polysaccharide die Adhärenz an Wirtszellen vermitteln. Da sich Mykobakterien innerhalb von Makrophagen replizieren [42], haben sie Strategien entwickelt, gezielt in diese zu penetrieren. Dabei binden wahrscheinlich Kapselpolysaccharide an Rezeptoren der Wirtszellen, die dann die Mykobakterien phagozytieren. Ein gut untersuchter Rezeptor ist der Makrophagen-Mannose-Rezeptor, der auf Makrophagen, nicht aber auf Monozyten und neutrophilen Granulozyten lokalisiert ist, und eine entscheidende Rolle in der Aufnahme von Mykobakterien in die Wirtszelle spielt [294]. Das könnte erklären, weshalb bekapselte Bakterien im Allgemeinen virulenter sind als unbekapselte [295]. Jüngste *in vitro* Infektions-Studien mit *M. tuberculosis* geben jedoch Hinweise darauf, dass die Kapsel einen anti-phagozytierenden Effekt hat: Kapsel-extrahierte Zellen wurden von murinen sowie humanen Makrophagen häufiger phagozytiert als bekapselte. Dabei war der Effekt mit *M. tuberculosis* als pathogenen Keim stärker als bei dem opportunistischen Erreger *M. avium*.

Eine mögliche Erklärung für eine solche Funktion der Kapsel könnte eine durch Mykobakterien kontrollierte bzw. reduzierte Phagozytose darstellen. Damit könnten Mykobakterien verhindern, von Makrophagen z. B. in Geweberegionen mit geringen Serumopsonin-Spiegeln, wie im Alveolarspalt und in Granulomen, phagozytiert zu werden. Sie könnten damit erreichen, in Epithel- und Endothelzellen der Lunge zu penetrieren. Eine „anti-phagozytierende“ Kapsel könnte also die unspezifische Phagozytose reduzieren und somit die spezifische rezeptor-vermittelte Aufnahme der Mykobakterien erhöhen [296].

Nach der Phagozytose durch den Makrophagen liegt das Bakterium eingeschlossen im Phagosom vor. Normalerweise erfolgt die Fusion von Phagosom mit Lysosom und anschließendem Verdau. Doch Mykobakterien schützen sich vor enzymatischem Verdau. Auf welche Weise dies geschieht, ist bislang nur teilweise geklärt. Einerseits inhibieren intrazelluläre Mykobakterien diese Phagosom-Lysosom-Fusion [40], so dass sie innerhalb des Phagosoms persistieren und so den Enzymen nicht ausgesetzt sind. Im Phagosom wird durch eine membranständige Protonen-ATPase ein pH-Wert im sauren Bereich aufrechterhalten, was für die enzymatischen Aktivitäten der im Lysosom lokalisierten Nukleasen, Phosphatasen, Proteinase, Lipasen und Glycosidasen essentiell ist. Andererseits schützen sich Mykobakterien vor enzymatischem Verdau, indem sie die Protonen-ATPase entweder selektiv blockieren oder bereits ihren Einbau in die Membran unterbinden [297]. Es konnte gezeigt werden, dass Mykobakterien in der Lage sind, den pH-Wert innerhalb des Phagosoms innerhalb weniger Tage nach Infektion fast zu neutralisieren [298]. Obwohl der Prozess nicht vollständig verstanden ist, gibt es Hinweise darauf, dass mykobakterielle Kapsel-Komponenten dafür verantwortlich sind, in die Signal-Kaskade der Makrophagen einzugreifen und auf bisher unbekannte Weise die Reifung des Phagosoms zu unterbinden [299].

Weiterhin wird angenommen, dass Kapselpolysaccharide die mykobakterielle Zelle innerhalb des infizierten Makrophagen vor Wirtsbestandteilen, wie Enzymen schützt. Ferner trägt die Kapsel auch dazu bei, dass bakterielle Antigene geschützt vorliegen. Dadurch wird verhindert, dass das Bakterium als fremd erkannt wird [174].

Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Ausbildung der „elektronentransparenten Zone“ mit der Pathogenität der Bakterien einhergeht. Durch Makrophagen phagozytierte *M. avium* Zellen des SmT zeigten häufiger die Formation dieser Zone als Bakterien des Koloniemorphotypen des SmO. Im Gegensatz zu lebenden Mykobakterien wurden bei abgetöteten Zellen, die phagozytiert wurden, bei

nur einem Drittel das Vorhandensein einer „elektronentransparenten Zone“ nachgewiesen [300]. Eine Vielzahl von biologischen Aktivitäten konnten den Kapsel-Polysacchariden, insbesondere dem Arabinomannan, nachgewiesen werden:

Neben Zytokin-Induktionen in Mäusen nach Gabe von Arabinomannan-reichen Extrakten [301] wurden antigene Eigenschaften der kapsulären Arabinomannane nachgewiesen durch Antikörper im Serum TB-infizierter Menschen [302]. Mäuse, die mit Arabinomannan-Oligosacchariden (aus LAM) gekoppelt an mykobakterielle Glycoproteine immunisiert wurden, zeigten einen Schutz gegen experimentelle TB-Infektionen [303]. Damit stellen Arabinomannane möglicherweise eine Molekülklasse für Vakzin-Konjugate dar. In zahlreichen Untersuchungen im Maus-Modell konnte dem Arabinomannan eine anti-Tumor-Aktivität nachgewiesen werden [304;305]. Durch Kombination der klassischen Bestrahlungstherapie und der Gabe von Arabinomannan konnte eine verbesserte Anti-Tumor-Aktivität im Maus-Modell nachgewiesen werden [306].

Andererseits scheinen Arabinomannane dazu beizutragen, in immunsupprimierten Organismen einen verbesserten Schutz gegen Infektionen hervorzurufen [307;308]. Als klinisch relevante Eigenschaft wird die Wirkung von mykobakteriellem Arabinomannan bei Patienten mit Leukopenie in der Folge einer Radiotherapie ausgenutzt [309].

Die biologischen Aktivitäten scheinen jedoch nicht eindeutig auf kapsuläres Arabinomannan zurückzugehen. Viele der Untersuchungen wurden mittels dem so genannten Z-100 durchgeführt, einem Extrakt aus *M. tuberculosis* Stamm Aoyama B, der teilweise in der Literatur als Arabinomannan-reich sowie Lipid-Arabinomannan-reich beschrieben wird.

Neben den nachgewiesenen u. a. immunmodulatorischen Effekten verleihen Kapselpolysaccharide den Bakterien Schutz vor enzymatischem Verdau nach der Phagozytose und vermitteln bzw. kontrollieren die Adhärenz an Wirtszellen. Dadurch stellen sie äußerst potente Virulenzfaktoren dar. Die strukturelle Charakterisierung solcher Virulenzfaktoren ist für das Verständnis der Pathogenese mykobakterieller Infektionen wichtig und trägt möglicherweise dazu bei, neue Chemotherapeutika oder Impfstoffe entwickeln zu können.

2. ZIEL DER ARBEIT

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, aus *Mycobacterium avium* Kapselmaterial zu extrahieren und aus dem Gemisch Polysaccharide zu isolieren und diese strukturell zu charakterisieren. Dabei sollte eine teilweise entwickelte Methode zur Isolierung mykobakterieller Zellwandkomponenten weitergeführt bzw. eine in der Literatur beschriebene Methode zur Extraktion von Kapselbestandteilen aus Gram-positiven Bakterien getestet werden.

Da Kohlenhydrate in der Natur generell Adhäsionsfunktionen besitzen und somit bei Zell-Zell-Interaktionen eine wesentliche Rolle spielen, ist es von großem Interesse, inwieweit diese Kapsel-Strukturen als Virulenzfaktoren fungieren. Daher sollten zwei verschiedene Koloniemorphotypen des Stammes 2151, die sich im Maus-Modell in ihrer Pathogenität unterscheiden, untersucht werden. Der virulente glatt-transparente Morphotyp sollte mit dem avirulenten glatt-opaken verglichen werden.

Aufgrund beschriebener Funktionen von mykobakteriellen Kapsel-Kohlenhydraten sollten die isolierten Polysaccharide *in vitro* hinsichtlich biologischer Aktivität, insbesondere Zytokin-Induktion und immunmodulatorischer Eigenschaften, getestet werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Es wurden Chemikalien mit Analysegrad bzw. HPLC-Grad verwendet. Alle wässrigen Lösungen wurden, wenn nicht anders genannt, mit deionisiertem und filtriertem Wasser hergestellt (sterilfiltriert durch einen 0,22 µm-Filter, Milli-Q, MILLIPORE). Puffer-Lösungen wurden, wie von Sambrook *et al.* [310] und Ausubel *et al.* [311] beschrieben, hergestellt.

Acetanhydrid	FLUKA
Aceton	MERCK
Acetonitril	MERCK
Acrylamid	BIORAD
Ammoniak	MERCK
Ammoniumheptamolybdat	MERCK
Ammoniumhydrogencarbonat	MERCK
Ammoniumpersulfat (APS)	BIORAD
Ammoniumsulfat	ROTH
Aqua bidest.	MILLIPORE
Ascorbinsäure	MERCK
Bisacrylamid	BIORAD
2-Butanol	SIGMA
Bromphenolblau	MERCK
Calciumchlorid	MERCK
Chloroform	MERCK
4-Chloro-1-Naphthol	SIGMA
Coomassie Brilliant Blue R-250	BIORAD
Deuteriumoxid	DEUTERO
Dextranblau	SIGMA
Diazomethan [312]	SIGMA ¹
Diethylether	MERCK
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA
Dinatriumhydrogenphosphat	MERCK
Dioxan	MERCK

¹ Die Synthese von Diazomethan erfolgte durch Destillation von Diazald der Firma SIGMA in Anlehnung einer in der Literatur beschriebenen Methode [312].

Essigsäure	MERCK
Ethanol	MERCK
Formaldehyd	MERCK
Galactobiose	SIGMA
Glucose	MERCK
Glucose-6-Sulfat	SIGMA
Glycerin	MERCK
Glycin	SERVA
Kaliumchlorid	MERCK
Kaliumdihydrogenphosphat	MERCK
Magermilchpulver	SALITER
Magnesiumchlorid	SIGMA
Manganchlorid	MERCK
Methanol	MERCK
Methyljodid	FLUKA
Methyljodid- <i>d3</i>	SIGMA
Mercaptoethanol	SERVA
Methylmannopyranosid	SIGMA
Natriumacetat	MERCK
Natriumazid	MERCK
Natriumbordeuterid	MERCK
Natriumborhydrid	MERCK
Natriumchlorid	MERCK
Natriumcitrat	ROTH
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BIORAD
Natriumglutamat	MERCK
Natriumhydrogenphosphat	MERCK
Natriumhydroxid	MERCK
Natriummetabisulfit	SIGMA
Natriummetaperjodat	MERCK
Natriumpyruvat	MERCK
Natriumsulfat	MERCK
p-Nitrophenyl-Phosphat	MERCK
Perchlorsäure	MERCK
Perjodsäure	MERCK
Phenol	MERCK
Phthalsäure	MERCK
Pyridin	FLUKA
Salzsäure	MERCK
Schiffsches Reagenz	SIGMA
Schwefelsäure	MERCK
Silbernitrat	MERCK
TEMED	BIORAD
Trifluoressigsäure	MERCK
Tris	BIOMOL
Triton X-114	SIGMA
Tween 20	BIORAD
Wasserstoffperoxid	MERCK

3.1.2 Bakterien

In der vorliegenden Arbeit wurden die glatt-transparenten (engl. *smooth-transparent*; SmT) und glatt-opaken (engl. *smooth-opaque*; SmO) Koloniemorphotypen des *Mycobacterium avium* Stammes 2151 (Serovar 2) angezüchtet. Es handelt sich hierbei um ein Sputum-Isolat eines AIDS-Patienten mit pulmonaler Mykobakteriose [313].

3.1.3 Wachstumsbedingungen

Die Anzucht der Mykobakterien (siehe 3.1.2) erfolgte auf solidem 7H10-Agar-Nährboden [314] nach MIDDLEBROOK. Es wurden zwei verschiedene Mediumzusätze ausgetestet. Einerseits wurde der Nährboden mit OADC-Medium (O: Ölsäure; A: Albumin; D: Dextrose; C: Katalase) angereichert, andererseits mit Pyruvat.

Middlebrook-7H10/OADC-Agar:	19,0 g	Middlebrook-7H10-Agar (DIFCO)
	5,0 ml	Glycerin
	100 ml	OADC-Enrichment (BECTON-DICKINSON)
	ad 1000 ml	H ₂ O
Nährboden auf Pyruvat-Basis:	19,0 g	Middlebrook-7H10-Agar (DIFCO)
	4,0 g	Nutrient BROTH (DIFCO)
	0,76 g	Natriumpyruvat
	5,5 g	Glucose
	0,5 g	Natriumglutamat
	ad 1000 ml	H ₂ O

In beiden Fällen wurde der pH-Wert des Mediums mit 1 M Natronlauge auf 7,7 eingestellt. Nach dem Autoklavieren (2,1 bar, 121°C, 15 min, SYSTEC-Autoklav) wurde der Nährboden bei einer Temperatur von 55°C gegossen. Dabei wurden Petrischalen (150 x 20 mm, SARSTEDT) mit ca. 100 ml Medium befüllt. Auf den erkalteten Nährboden wurde zusätzlich eine für Nährstoffe permeable Nitrozellulosemembran (Protran BA 85, Ø 13,2 cm, Porengröße 0,45 µm, SCHLEICHER & SCHÜLL,

autoklaviert) gelegt, die beimpft wurde, und auf dessen Oberfläche die Zellen wachsen (siehe Abbildung 14).

Diese Membran erleichtert das Ernten der Zellen und verhindert dabei das Herauslösen von Agarbestandteilen. Die Anzucht erfolgte in einem Brutraum bei einer konstanten Temperatur von 37°C und weißem Dauerlicht. Der CO₂-Gehalt der Innenraumluft wurde nicht reguliert und entsprach bei einer Überprüfung 0,03%.

3.2 Präparative Methoden

3.2.1 Ernten der Zellen

Nach einer Kultivierungsdauer von fünf bzw. acht Wochen (siehe 3.1.3) wurden die Bakterien mit einem Drigalski-Spatel von der Nitrozellulosemembran abgeerntet. Kolonien von verändertem Phänotyp, die wahrscheinlich auf Spontanmutationen zurückzuführen waren (siehe 1.1.3.4.2), wurden dabei nicht erfasst.

3.2.2 Phenol/Wasser-Extraktion

[225]

Zur Isolierung des Kapselmaterials wurde jeweils 1 g (Feuchtmasse) der frisch geernteten Zellen (siehe 3.2.1) in 18 ml einer 1% (w/v) Phenol-Lösung für 48 h bei einer Temperatur von 4°C langsam (100 U min⁻¹) gerührt. Nach der Extraktion wurden die Zell-Suspensionen in 50 ml-Zentrifugen-Röhrchen (Polypropylen, NALGENE) überführt und bei 27000 × g (BECKMANN, Rotor JA-20) und 4°C für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die extrahierten Zellen bei -20°C gelagert. Der erhaltene Überstand wurde anschließend auf Eis sterilfiltriert (0,22 µm Steritop™, MILLIPORE) und gegen Aqua bidest. (3 x 10 l) bei 4°C für mindestens 24 h dialysiert (SpectraPor, ROTH, MWCO: 3500 Da). Das Dialysat wurde am Vakuumrotationsverdampfer (Rotavapor R110, BÜCHI) im Wasserstrahlvakuum auf ein Zehntel des Volumens eingengt, unter flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert (Lyovac GT 2 E, FINN-AQUA).

3.2.3 Triton-Extraktion

[315]

Um hydrophile und lipophile Substanzen voneinander zu trennen, wurde das Lyophilisat (siehe 3.2.2) mit Triton X-114 extrahiert. Dazu wurden in einem Zentrifugenröhrchen (30 ml-COREX) jeweils 40 mg Substanz in 18 ml Wasser gelöst, mit 10% (v/v; Endkonzentration) Triton X-114 versetzt und 1 h bei 20-22°C gerührt (200 U min⁻¹). Anschließend wurde die Extraktion bei 37°C im Wasserbad mindestens vier Stunden bis zur vollständigen Phasentrennung inkubiert und anschließend bei 2500 × g (ROTIXA/KS, HETTICH) bei 37°C für 10 min zentrifugiert. Die obere Wasser-Phase wurde abgenommen und erneut mit 10% (v/v; Endkonzentration) Triton X-114 extrahiert. Die untere Triton-Phase wurde erneut mit Wasser versetzt und der Vorgang wiederholt. Die beiden Wasser-Phasen wurden vereinigt, unter flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert (siehe 3.2.2). Um Reste von Triton zu entfernen, wurde das Lyophilisat dreimal mit Aceton gewaschen. Es wurde dazu in jeweils 20 ml Aceton resuspendiert, abzentrifugiert (10 min, 1000 × g) und der Überstand verworfen. Anschließend wurde die Präparation unter Stickstoffstrom getrocknet und zur Proteinpräzipitation mittels Ammoniumsulfat eingesetzt (siehe 3.2.4).

Die aus den beiden Extraktionsschritten erhaltenen Triton-Phasen wurden in 250 ml-Metallzentrifugenbechern vereinigt und mit dem zehnfachen Volumen Aceton für 4 d bei -20°C gefällt. Anschließend wurde bei 12000 × g (BECKMANN, Rotor JA-14) und -10°C für 30 min zentrifugiert, das Aceton dekantiert und das Sediment zweimal mit Aceton gewaschen und schließlich unter Stickstoffstrom getrocknet.

3.2.4 Proteinfällung mittels Ammoniumsulfat

[316]

Um Proteine abzutrennen, wurden jeweils 40 mg der lyophilisierten Wasser-Phasen nach der Triton-Extraktion (siehe 3.2.3) in 12 ml Wasser gelöst (50 ml-Zentrifugenröhrchen, Polypropylen, NALGENE). Dazu wurde sukzessiv Ammoniumsulfat hinzugegeben, bis eine Endkonzentration von 46% (w/v) erreicht war. Die Suspension wurde zunächst bei 20-22°C für 2 h gerührt (100 U min⁻¹) und anschließend bei 4°C für 16-22 h präzipitiert.

Die Präzipitate wurden bei $14000 \times g$ (BECKMANN, Rotor JA-20) und 4°C für 1 h abzentrifugiert, die Überstände anschließend erneut gefällt und der Vorgang wiederholt. Um das zur Fällung eingesetzte Ammoniumsulfat zu eliminieren, wurden die Sedimente und Überstände getrennt voneinander bei 4°C gegen Aqua bidest. ($12 \times 10 \text{ l}$) unter Zugabe von 0,02% (w/v) Natriumazid dialysiert (SpectraPor, ROTH, MWCO: 3500 Da) und anschließend am Vakuumrotationsverdampfer im Wasserstrahlvakuum (HB-140, BÜCHI) auf ein Zehntel des Volumens eingeeengt, unter flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert (siehe 3.2.2). Die Sedimente wurden unter Stickstoff bei -20°C gelagert.

3.2.5 Proteolytischer Verdau

Um Reste von Proteinen zu entfernen, wurden die Polysaccharid-enthaltenen Überstände nach der Proteinpräzipitation (siehe 3.2.4) proteolytisch verdaut. Dazu wurden sie mit Proteinase K ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$; BOEHRINGER) bei 50°C unter gelegentlichem Rühren für 5 h inkubiert und anschließend gegen Aqua bidest. ($5 \times 10 \text{ l}$) bei 4°C dialysiert (SpectraPor, ROTH, MWCO: 3500 Da) und lyophilisiert (siehe 3.2.2). Gegebenenfalls wurde zur weiteren Entsalzung eine Gelpermeations-Chromatographie (siehe 3.2.6) mit SephadexG-10 bzw. eine Ultrafiltration durchgeführt (siehe 3.2.8).

3.2.6 Gelpermeations-Chromatographie (GPC)

[317]

Es wurden unterschiedliche Trägermaterialien wie Sephadex G-200, Sephadex G-50, Sephadex G-10 (AMERSHAM BIOSCIENCES), TSK-40 sowie TSK-65 (MERCK) verwendet. Die Ausschlussvolumina der Trägermaterialien wurden mittels Dextranblau (10 mg ml^{-1} ; Molekularmasse: $2 \times 10^6 \text{ Da}$) bestimmt. Alle verwendeten Lösungsmittel wurden zuvor durch eingeleitetes Helium entgast. Flussraten wurden mit einer peristaltischen Schlauchpumpe (MINIPULS 3, ABIMED) eingestellt. Die Detektion erfolgte mittels eines Differentialrefraktometers (KNAUER). Die Änderung des Brechungsindex wurde durch einen Schreiber (2210 Recorder, PHARMACIA) mit einem Papiervorschub von $0,5 \text{ mm min}^{-1}$ aufgezeichnet. Das Eluat wurde durch einen Fraktionskollektor (ABIMED GILSON FC 203B) tropfenweise gesammelt. Saccharid-haltige Fraktionen wurden auf Dünnschichtplatten (Kieselgel 60, MERCK) identifiziert.

Dazu wurden Aliquots der Fraktionen auf die Platte aufgetragen, die dann in 10% (v/v) Schwefelsäure/Ethanol getaucht, getrocknet und anschließend bei 220°C verkohlt wurde. Die zu einem Signal gehörigen Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert (siehe 3.2.2).

3.2.7 Trennungen mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Trennungen wurden an einer ABIMED GILSON-HPLC-Anlage unter Verwendung der UniPoint System-Software durchgeführt. Die aufzutrennenden Proben wurden generell in Lösungsmittel A gelöst und vor der Injektion bei $1000 \times g$ für 1 min zentrifugiert (Biofuge, EPPENDORF) sowie anschließend durch einen 0,22 μm -Nylon-Spritzenvorsatzfilter (OSMONICS) filtriert. Alle Lösungsmittel wurden vor Gebrauch unter Wasserstrahlvakuum durch eine 0,2 μm -RC-Membran (Regenerierte Cellulose, SCHLEICHER & SCHÜLL) filtriert und anschließend durch Einleiten von Helium entgast. Die Detektion erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei den Wellenlängen 210 nm und 280 nm. Grundsätzlich wurde das System durch Injizieren eines Blindwertes (Lösungsmittel A) und gegebenenfalls durch eine Positiv-Kontrolle überprüft (siehe 3.2.7.3).

3.2.7.1 Reverse Phase-Chromatographie

Trennungen mittels Reverse Phase-Chromatographie wurden auf einer RP4-Säule (Hypersil PEP-300 C4; 250 x 4,6 mm; THERMO HYPERSIL-KEYSTONE) durchgeführt. Als Lösungsmittel A diente Millipore-Wasser und als Lösungsmittel B Acetonitril. Es wurde folgender Gradient angelegt: 4 - 85% B in 100 min, dann 100% B für 10 min bei einer Flussrate von $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Die Fraktionen wurden in einem zeitlichen Abstand von 1 min gesammelt (siehe 3.2.7).

3.2.7.2 Anionenaustausch-Chromatographie

Die Polysaccharid-enthaltenden Fraktionen wurden auf einer Diethylaminoethyl-Säule (NUCLEOGEN DEAE 60-7, 125 x 10 mm, MACHEREY & NAGEL) aufgetrennt. Als Lösungsmittel dienten 20 mM Natriumhydrogenphosphat, pH 7,7 (Lösungsmittel A)

und 20 mM Natriumhydrogenphosphat, 2 M Natriumchlorid, pH 7,7 (Lösungsmittel B) bei einer Flussrate von 2 ml min^{-1} . Es wurde folgender vierstufiger Gradient angelegt: 10 min 100% A, in 25 min auf 50% B, für 10 min 50% B, dann 100% B für 15 min. Das Eluat wurde in einem zeitlichen Abstand von 1 min fraktioniert (siehe 3.2.7).

3.2.7.3 Affinitäts-Chromatographie mittels ConcanavalinA

Die Trennungen wurden unter Verwendung einer Lektin-Sepharose-Säule (ConA-Sepharose 4B, 5 x 1 cm, SIGMA) durchgeführt. Als Lösungsmittel A wurde folgender Puffer verwendet: 0,1 M Natriumacetat, 0,1 M Natriumchlorid, 1 mM Magnesiumchlorid, 1 mM Manganchlorid, 1 mM Calciumchlorid, pH 6,1. Dieselbe Zusammensetzung wurde neben dem Zusatz von 1 M Methylmannopyranosid für Lösungsmittel B gewählt. Bei einer Flussrate von $0,8 \text{ ml min}^{-1}$ wurde mit 100% A für 40 min ein Binden des Probenmaterials an das Lektin ermöglicht, anschließend für 20 min mit 100% B gebundenes Material eluiert und schließlich mit erneut 100% A die Säule für 60 min regeneriert. Das Elutionsvolumen wurde in den ersten 60 min fraktioniert und mit einem Volumen von $0,8 \text{ ml Fraktion}^{-1}$ gesammelt. Zur Überprüfung der Säule wurde Ovalbumin (SIGMA) als glycosylierter Protein-Standard verwendet (siehe 3.2.7). ConA-negative und -positive Fraktionen wurden anschließend durch Gelpermeations-Chromatographie (siehe 3.2.6) entsalzt.

3.2.8 Entsalzung durch Ultrafiltration

Es wurden Zentrifugen-Filtrationseinheiten (Centriprep YM-3, AMICON/MILLIPORE) mit einer Molekulargrenze von 3000 Da verwendet. Die Filtration wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zentrifugiert wurde jeweils für 1 h bei $3000 \times g$ (ROTIXA/KS, HETTICH) und einer Temperatur von 30°C .

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 Färbung nach Ziehl-Neelsen

[318]

Zur Überprüfung der Säurefestigkeit der Bakterien wurde von den angezüchteten Kolonien (siehe 3.2.1) eine verdünnte Zellsuspension hergestellt. Diese wurde auf einem Objektträger ausgestrichen und hitzefixiert, mit Karbolfuchsin-Lösung (Ziehl-Neelsen Karbolfuchsin-Lösung, MERCK) bedeckt und über einer Bunsenbrennerflamme dreimal bis zur Dampfbildung erhitzt (nicht gekocht). Der Farbstoff wurde ohne nochmaligem Erhitzen für 10 min inkubiert, anschließend abgegossen und mit Aqua bidest. abgespült. Zur Entfärbung wurde 5% (v/v) Salzsäure/Ethanol aufgegeben und solange inkubiert, bis keine Farbwolken mehr abgingen. Nach Spülen mit Aqua bidest. wurde 1 min mit Methylenblau-Lösung gegengefärbt (Löfflers Methylenblau, MERCK) und anschließend erneut gespült.

Unter dem Lichtmikroskop erscheinen säurefeste Zellen rot, nicht säurefeste und umgebendes Material zartblau.

3.3.2 Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (Disk-SDS-PAGE)

[319;320]

Elektrophoretische Trennungen mittels SDS-PAGE wurden einerseits in einem HOEFER- und andererseits in einem BIORAD-System durchgeführt. Es wurden Gele mit einer Konzentration von 12% Acrylamid im Trenngel und 5% im Sammelgel gegossen. Zum Auspolymerisieren wurden die Gele unter Luftabschluss (mit Laufpuffer überschichtet) mindestens 45 min bei 20-22°C stehen gelassen.

Trenngel (12%)	12,0 ml Acrylamid/Bisacrylamid [29:1 (w/w)]
	7,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
	10,0 ml H ₂ O
	0,3 ml 10% (w/v) SDS/H ₂ O
	0,01 ml TEMED

	0,15 ml	10% (w/v) APS/H ₂ O entgast
Sammelgel (5%)	2,0 ml	Acrylamid/Bisacrylamid [29:1 (w/w)]
	3,0 ml	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
	6,76 ml	H ₂ O
	0,12 ml	10% (w/v) SDS/H ₂ O
	0,006 ml	TEMED
	0,12 ml	10% (w/v) APS/H ₂ O entgast
SDS-Laufpuffer (pH 8,3)	6,06 g	Tris
	28,82 g	Glycin
	2,0 g	SDS
	ad 2,0 l	H ₂ O
Molekularmassen-Standards		Low Range Standard (BIORAD)
		High Range Standard (BIORAD)
		α_1 -saures Glycoprotein (44 kDa, SIGMA)
Probenpuffer	12,5 ml	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
	20,0 ml	10% (w/v) SDS/H ₂ O
	5,0 ml	Mercaptoethanol
	10,0 ml	Glycerin
	0,01 g	Bromphenolblau
	ad 100 ml	H ₂ O

Die aufzutrennenden Proben wurden 1:1 mit Probenpuffer verdünnt und für 5 min bei 100°C erhitzt. Als Negativ-Kontrolle wurde nur Probenpuffer aufgetragen.

Die Gele wurden anschließend mit Coomassie (siehe 3.3.2.3.1), Silbernitrat (siehe 3.3.2.3.2) oder Perjodsäure-Schiff-Reagenz (siehe 3.3.2.3.3) gefärbt bzw. geblottet (siehe 3.3.2.4).

3.3.2.1 SDS-PAGE im HOEFER-System

Für das HOEFER-System (HOEFER Electrophoresis Unit SE600, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) wurden Gele von 18 cm x 12 cm x 0,75 mm gegossen. Jeweils 100-200 µg Substanz wurden pro Probestasche aufgetragen. Anschließend wurde eine konstante Spannung von 150 V angelegt. Die Trennungen waren nach ca. 5 h beendet.

3.3.2.2 SDS-PAGE im BIORAD-System

Die elektrophoretischen Trennungen aufgereinigter Substanzen wurden in einer Mini-PROTEAN 3 Cell (BIORAD) durchgeführt. Es wurden Gele von 8 cm x 7,3 mm x 1 mm hergestellt. Maximal 10 µg Substanz wurden pro Probestasche aufgetragen. Anschließend wurde eine konstante Spannung von 200 V angelegt. Die Trennungen waren nach ca. 50 min beendet.

3.3.2.3 Färbemethoden

Die Gele wurden nach der elektrophoretischen Trennung (siehe 3.3.2) durch verschiedene Färbemethoden auf das Vorhandensein von Proteinen, Polysacchariden und Lipoglycanen hin untersucht (siehe 3.3.2.3.1; 3.3.2.3.2; 3.3.2.3.3).

Alle Inkubationsschritte erfolgten bei 20-22°C unter leichtem Schütteln. Die gefärbten Gele wurden anschließend für mindestens 1 h in Glycerin/Ethanol/Wasser (5/22/73; v/v/v) äquilibriert zwischen gequollener Cellophan-Folie (24 x 24 cm, ROTH) getrocknet und konserviert.

3.3.2.3.1 Coomassie-Färbung

[321]

SDS-Gele (siehe 3.3.2) wurden mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt, um Proteine sichtbar zu machen. Die Gele wurden 1 h in der Coomassie-Lösung gleichzeitig fixiert und gefärbt. Zur Hintergrund-Entfärbung wurde diese zunächst in 200 ml Wasser in der Mikrowelle bei 700 Watt für 5 min erhitzt und anschließend durch

mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung I entfärbt. Bei nicht ausreichender Hintergrund-Entfärbung wurde gegebenenfalls die Entfärbelösung II eingesetzt.

Färbe-/Fixierlösung	2g	Coomassie Brilliant Blue R-250
	400 ml	Methanol
	100 ml	Eisessig
	ad 1000 ml	H ₂ O
		filtrieren durch Whatman #1-Papier
Entfärbelösung I	100 ml	Eisessig
	100 ml	Methanol
	ad 1000 ml	H ₂ O
Entfärbelösung II	500 ml	Acetonitril
	ad 1000 ml	H ₂ O

3.3.2.3.2 Silberfärbung

Die Färbung wurde nach der von TSAI und FRASCH [322] entwickelten und von HITCHCOCK und BROWN [323] modifizierten Methode durchgeführt.

Die Gele (siehe 3.3.2) wurden für 10-16 h fixiert und anschließend für 5 min in der Oxidationslösung inkubiert. Es folgten Waschschriffe mit Aqua. bidest. (8 x 30 min). Nach 10-minütiger Färbung mit Silbernitratlösung wurde erneut mit Aqua. bidest. gewaschen (4 x 10 min). Die Entwicklung der Gele erfolgte solange, bis die Banden gut sichtbar waren, ohne dass eine zu starke Hintergrundfärbung auftrat. Nach Inkubation in der Stopplösung für mindestens 1 h wurden die Gele mit Aqua. bidest. gewaschen.

Fixierlösung:	50 ml	Eisessig
	400 ml	Ethanol
	ad 1000 ml	H ₂ O
Oxidationslösung:	105 mg	Natriummetaperjodat
	150 ml	Fixierlösung

Färbelösung	142 ml	H ₂ O
	2 ml	25% Ammoniak
	0,56 ml	5 M Natronlauge
	5 ml	20% (w/v) Silbernitrat/H ₂ O
Entwickler	25 mg	Natriumcitrat
	500 ml	H ₂ O
	0,25 ml	Formaldehyd
Stopplösung	200 ml	7% (v/v) Essigsäure/H ₂ O

3.3.2.3.3 Perjodsäure-Schiff-Färbung (PAS-Färbung)

[324]

Die Gele (siehe 3.3.2) wurden für 1-2 h fixiert (in je 100 ml Fixier-/Entfärbelösung) und anschließend für 1 h mit 100 ml Perjodsäure-Lösung inkubiert. Die Gele wurden mit Aqua bidest. gewaschen (5 x 1 min) und für 5-10 min mit 100 ml Natriummetabisulfit behandelt. Dabei kam es zu einer zunehmenden Gelbfärbung und anschließender Entfärbung des Gels. Sofort nach Erreichen der vollständigen Entfärbung wurden die Gele in 100 ml Schiffischem Reagenz bis zur Rotfärbung der glycosylierten Banden inkubiert. Nach 2 h war in der Regel keine weitere Intensitätszunahme zu beobachten. Zur anschließenden Hintergrund-Entfärbung wurde die Entfärbelösung mehrmals gewechselt.

Fixier-/Entfärbelösung	100 ml	Eisessig
	350 ml	Methanol
	ad 1000 ml	H ₂ O
Perjodsäure-Lösung	0,7 g	Perjodsäure
	100 ml	5% (v/v) Essigsäure/H ₂ O
Natriummetabisulfit-Lösung	0,2 g	Natriummetabisulfit
	100 ml	5% (v/v) Essigsäure/H ₂ O

Schiffisches Reagenz 100 ml vor Gebrauch auf 20-22°C erwärmt

3.3.2.4 Westernblot

[325;326]

Unmittelbar nach der Gelelektrophorese (siehe 3.3.2) wurden die in der PAGE aufgetrennten Substanzen aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, MILLIPORE) transferiert. Die Membran wurde zuvor 15 s in Methanol gequollen, für 2 min mit Wasser gespült und anschließend für mindestens 5 min in Transferpuffer getränkt. Das Gel hingegen wurde wenigstens für 30 min in Transferpuffer äquilibriert. Die mit Transferpuffer benetzte Membran wurde auf eine Lage in Puffer getränktes Whatman-Papier (Blotter Paper, Hoefer No. TE46, AMERSHAM BIOSCIENCES) gelegt. Auf die Membran wurde luftblasenfrei das Gel mit einer weiteren Lage Whatman-Papier platziert.

Transferpuffer:	122 g	Glycin
	15,15 g	Tris
	1000 ml	Methanol
	ad 5000 ml	H ₂ O

Einerseits wurde der Transfer in einer HOEFER Blotkammer (HOEFER Tank Transphor Unit, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) für 10-16 h bei einer konstanten Spannung von 26 V durchgeführt. Andererseits wurde eine BIORAD-Blotkammer (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, BIORAD) verwendet. Dabei wurde für 1 h eine Spannung von 100 V angelegt.

Anschließend wurde die Membran nach vorangegangenen Waschsritten (3 x 50 ml TBST-Puffer) für 1 h mit 100 µg ConA (in 20 ml TBST-Puffer) bei 20-22°C inkubiert. Überschüssiges, nicht gebundenes Lektin wurde durch Waschsritte (5 x 100 ml Wasser) entfernt. Anschließend wurde der Blot so lange mit Entwickler unter Lichtausschluss inkubiert (max. 15 min), bis deutliche Banden zu erkennen waren. Zum Stoppen der Reaktion wurde einmal mit Wasser (100 ml) gewaschen.

TBST-Puffer:	150 mM	NaCl
	20 mM	Tris, pH 7,50
	0,1 mM	MnCl ₂
	0,1 mM	CaCl ₂
	0,1% (v/v)	Tween 20/H ₂ O

Lektin: POD-konjugiertes ConcanavalinA aus *Canavalia ensiformis* (SIGMA); erkennt spezifisch terminale α -D-Mannose- und (geringer) α -D-Glucose-Reste [327]

Entwickler:	7 ml	4-Chloro-1-Naphthol (3 mg ml ⁻¹ Methanol)
	39 ml	H ₂ O
	2 ml	0,2 M Tris, pH 7,50
	20 μ l	30% Wasserstoffperoxid

3.3.3 BCA-Mikro-Assay zur Proteinbestimmung

[328;329]

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der isolierten Fraktionen (siehe 4.2; 4.2.1; 4.2.2; 4.3; 4.4) wurde eine Bicinchoninsäure (BCA)-Mikro-Bestimmung durchgeführt. Das Prinzip besteht darin, dass bei der Reaktion von Proteinen mit Cu²⁺ in alkalischer Lösung Cu²⁺ zu Cu⁺ reduziert wird (Biuret-Reaktion), das seinerseits mit Bicinchoninsäure unter Bildung eines violetten Farbkomplexes reagiert, dessen Absorptionsmaximum bei 562 nm liegt. Die Nachweisgrenze liegt bei 1 μ g Protein.

Zu je 10 μ l Probe unterschiedlicher Konzentration (in Verdünnungsreihe) wurden in einer Mikrotiterplatte 200 μ l Reagenz (PIERCE) pipettiert. Als Standard diente eine Eichreihe von Rinderserum-Albumin (BSA, PIERCE) mit Konzentrationen von 2,5 bis 20 μ g. Nach Inkubation bei 37°C für 1 h wurde die Farbstoffbildung in einem Mikroplatten-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen. Ein Referenzfilter erzeugte monochromatisches Licht von 630 nm Wellenlänge, dessen Extinktion automatisch von der Extinktion bei 550 nm subtrahiert wurde, um Artefakte zu eliminieren.

3.3.4 Neutralzuckeranalyse

[330;331]

Zum Nachweis bzw. zur Quantifizierung neutraler Monosaccharide wurden die zu untersuchenden Substanzen hydrolysiert, reduziert, peracetyliert und anschließend gaschromatographisch analysiert.

Neben einem Blindwert, zur Überprüfung der Reinheit der Reagenzien, und einer Positiv-Kontrolle mit bekannter Zuckerzusammensetzung (LPS aus *Salmonella enterica*, sv. Minnesota, Stamm R345), wurden 100 µg der zu analysierenden Substanzen in einem 1ml-Probenglas mit 150 µl einer 2 M Trifluoressigsäure für 2 h bei 120°C hydrolysiert und anschließend evaporiert. Als interner Standard wurden 20 nmol Alloose hinzugegeben und erneut evaporiert. Die Zucker wurden nach Zugabe von 150 µl 0,3 M Natriumbordeuterid für 16 h bei 20-22°C unter Lichtausschluss reduziert. Durch tropfenweise Zugabe von 2 M Salzsäure wurde das überschüssige Bordeuterid zerstört. Anschließend wurden die Proben evaporiert und dreimal mit 0,5 ml 5% (v/v) Essigsäure/Methanol gewaschen. Zur Peracetylierung wurde 100 µl wasserfreies Acetanhydrid hinzugegeben und bei 85°C für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Reagenzien unter Stickstoffstrom verblasen und durch Zugabe von 100 µl destilliertem Pyridin und 50 µl wasserfreiem Acetanhydrid erneut bei 85°C für 30 min peracetyliert. Nach erneutem Trocknen unter Stickstoff wurden die Proben dreimal mit ca. 150 µl Chloroform in ein konisches (200µl-) Probenglas überführt und unter Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend wurden die Proben in einem definierten Volumen (20 µl) Chloroform aufgenommen. Jeweils 1 µl wurde in den Gaschromatographen injiziert (siehe 3.3.4.1).

3.3.4.1 Gaschromatographie (GLC) der Alditolacetate und acetylierten Methylglycoside

Die gaschromatographischen Trennungen der Alditolacetate (siehe 3.3.4) und acetylierten Methylglycoside (siehe 3.3.5) wurden an einem HEWLETT-PACKARD GASCHROMATOGRAPH 438A mit einem Flammenionisationsdetektor und einer Poly-(5%-diphenyl-95%-dimethyl)-siloxan SPB-5-Kapillarsäule (30 m x 0,32 mm, Schichtdicke: 0,25 µm, SUPELCO) durchgeführt. Als Trägergas diente Wasserstoff mit einem Druck von 60 kPa. Peaks wurden durch den Integrator CHROMATOPAC C-

R3A (SHIMADZU) dokumentiert. Für das Temperaturprogramm wurden folgende Parameter gewählt: Nach 3 min wurde die Starttemperatur von 150°C um 3°C min⁻¹ erhöht, bis die Endtemperatur von 300°C erreicht wurde.

Die Identifizierung der Zucker erfolgte über den Vergleich der Retentionszeiten zu einem zuvor injizierten Standardgemisch aus vier Pentosen, vier Hexosen und einer Heptose. Die Quantifizierung wurde durch Vergleich der Peakflächen zu dem internen Standard Allose durchgeführt.

3.3.4.2 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GLC-MS) der Alditolacetate und acetylierten Methylglycoside

Die massenspektrometrischen Analysen der Alditolacetate (siehe 3.3.4) und acetylierten Methylglycoside (siehe 3.3.5) im Anschluß an die Gaschromatographie wurden an einem HEWLETT-PACKARD-Massenspektrometer (HP 5989 A) durchgeführt. Die Trennung erfolgte auf einer HP-5MS-Kapillarsäule mit Helium als Trägergas bei einem Säulenvordruck von 10 psi.

Die EI (Elektronenstoßionisations-)Spektren wurden bei 70 eV aufgenommen [332]. Für die CI (chemische Ionisations-)Spektren wurde als Reaktandgas Ammoniak verwendet. Die Temperatur der Ionenquelle betrug 200°C. Für das Temperaturprogramm der gaschromatographischen Trennung wurden folgende Parameter gewählt: Nach 3 min startete der Gradient von der Initialtemperatur von 150°C mit 5°C min⁻¹ auf die Endtemperatur von 320°C.

3.3.5 Methanolyse

Zur Detektion von Neutralzuckern und Uronsäuren wurden in einem Schmelzröhrchen jeweils 100 µg der zu analysierenden Substanz (siehe 4.3; 4.4) in 500 µl 2 M methanolische Salzsäure gelöst. Das Röhrchen wurde zugeschmolzen und bei 85°C für 16 h inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch in ein 10 ml-Glasgefäß überführt und evaporiert. Die Peracetylierung wurde wie in 3.3.4 beschrieben durchgeführt. Die acetylierten Methylglycoside wurden durch GLC (siehe 3.3.4.1) getrennt und anschließend durch GLC-MS (siehe 3.3.4.2) identifiziert.

3.3.6 Methylierungsanalysen

Zur Bestimmung der Zuckersequenzen der isolierten Polysaccharide (siehe 4.3; 4.4.1) wurden Methylierungsanalysen durchgeführt. Die Methylierung erfolgte nach der von Ciucanu und Kerek entwickelten Methode [333].

Dazu wurden jeweils 100 µg lyophilisierte Probe in 500 µl wasserfreiem Dimethylsulfoxid (DMSO, destilliert und über Molekularsieb [4 Å] gelagert) gelöst. Parallel dazu wurde ein Blindwert mitgeführt, und als Positiv-Kontrolle und zur Überprüfung von Untermethylierungen diente Glycogen (AMBION) als Polysaccharid von bekannter Struktur.

5 mg Natriumhydroxid (trocken, gemörsert) wurden hinzugegeben, das Gefäß mit einem Magnetstäbchen versehen und verschlossen. Nach 15 min Rühren bei 20-22°C wurden 500 µl Methyljodid (bzw. Methyljodid-*d*3) hinzugegeben und 1 h gerührt. Überschüssiges Methyljodid wurde unter Stickstoffstrom verblasen. Anschließend wurde unter Rühren zunächst tropfenweise 7 ml Wasser hinzugegeben, und die (partiell) methylierten Polysaccharide wurden dreimal mit jeweils 2 ml Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, unter Stickstoffstrom eingedampft und erneut in DMSO gelöst. Die gesamte Methylierung wurde zweimal wiederholt.

Das Reaktionsprodukt wurde, wie in 3.3.4 beschrieben, hydrolysiert, reduziert, sowie peracetyliert und anschließend gaschromatographisch aufgetrennt (siehe 3.3.4.1) und massenspektrometrisch (siehe 3.3.4.2) analysiert.

3.3.6.1 Methylierungsanalysen nach Derivatisierung

Es wurde auf verschiedene Weise getestet, Substanzen vor der Methylierung zu desulfatieren. Einerseits wurden dazu 100 µg der lyophilisierten Proben (siehe 4.4.1) mit 500 µl Methanol und 5 µl einer 2 M methanolischen Salzsäure versetzt. Nach kurzzeitiger Ultraschall-Behandlung wurde tropfenweise Diazomethan bis zur Gelbfärbung zugegeben. Anschließend wurde die Probe unter Stickstoffstrom getrocknet.

Andererseits wurde eine Dioxan-Solvolyse [334] durchgeführt. Dazu wurde die Probe 20 min bei 100°C mit wasserfreiem 1,4-Dioxan inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz evaporiert.

Alternativ wurde zur Desulfatierung eine milde Methanolyse durchgeführt. Dazu wurde die getrocknete Probe für 16 h bei 20-22°C in 500 µl 20 mM methanolischer Salzsäure

inkubiert. Nach Trocknung unter Stickstoffstrom wurde zur vollständigen Entfernung der Salzsäure die Probe wiederholt mit 500 µl Methanol versetzt und erneut getrocknet. Schließlich wurde die Probe, wie in 3.3.6 beschrieben, methyliert und weiter derivatisiert.

3.3.7 Bestimmung der absoluten Konfiguration von Pentosen und Hexosen

[335]

Enantiomere Glycoside ohne chiralem Element können durch GLC nicht voneinander getrennt werden. Jedoch führt die Umsetzung mit (*R*)- oder (*S*)-2-Butanol zu optisch aktiven Diastereomeren mit unterschiedlichem chemischen und spektroskopischen Verhalten. Peracetylierte (*S*)-2-Butylglycoside können damit nach GLC aufgrund ihrer Retentionszeiten mit Standards verglichen werden, um auf diese Weise die absolute Konfiguration zu bestimmen.

Zur Bestimmung der D- bzw. L-Konfiguration der Zuckermonomere in den isolierten Polysacchariden wurden diese zunächst durch Methanolyse in ihre Methylglycoside überführt, anschließend mit (*S*)-2-Butanol umgesetzt und schließlich peracetyliert.

Dazu wurden jeweils 200 µg der isolierten Polysaccharide (siehe 4.3) in 10 ml-Ampullen gegeben und unter Vakuum getrocknet. Nach Zugabe von 500 µl 2 M methanolischer Salzsäure wurden die Ampullen in der Flamme zugeschmolzen und das Reaktionsgemisch bei 85°C für 16-22 h inkubiert. Die erhaltenen Methylglycoside wurden mit Methanol in 10 ml-Glasgefäße überführt und unter Stickstoffstrom getrocknet. Zur Überprüfung der Reaktion wurden die Reaktionsprodukte wie in 3.3.4 beschrieben peracetyliert und gaschromatographisch aufgetrennt (siehe 3.3.4.1). Nach Trocknung unter Stickstoffstrom wurden die Methylglycoside anschließend in ihre entsprechenden (*S*)-2-Butylglycoside durch Zugabe von 200 µl frisch angesetztem 2 M (*S*)-2-Butanol/HCl (172 µl Butanol + 28 µl Acetylchlorid²) überführt. Nach Inkubation bei 60°C für 16-22 h wurden die Reaktionsprodukte unter Stickstoffstrom getrocknet und anschließend wie in 3.3.4 beschrieben peracetyliert. Die acetylierten Butylglycoside wurden durch Vergleich zu authentischen Standards durch GLC (siehe 3.3.4.1) identifiziert.

² Die Reaktion wurde für 10 min bei 0°C durchgeführt.

3.3.8 Phosphatbestimmung

[336]

Der Gehalt organischen Phosphats wird durch die Differenz des Gesamtphosphatgehaltes und der Menge anorganischen Phosphats ermittelt.

Von den zu analysierenden Substanzen (siehe 4.3) wurden Stammlösungen von 5 mg ml^{-1} hergestellt. Als Standard diente 5 mM Dinatriumhydrogenphosphat hergestellt. Die Blindwerte (Wasser), sowie die Proben ($2 \mu\text{l}$, $4 \mu\text{l}$, und $8 \mu\text{l}$) und Standards ($2 \mu\text{l}$, $4 \mu\text{l}$, $6 \mu\text{l}$, $8 \mu\text{l}$ und $10 \mu\text{l}$) wurden in Schmelzröhrchen unter Vakuum getrocknet. Die Blindwerte wurden als Dreifachbestimmung, die Proben und Standards in Doppelbestimmungen angesetzt. Jeweils $100 \mu\text{l}$ des Aufschlussreagenz' wurden hinzugegeben. Nach Inkubation bei 100°C für 1 h wurden die Proben bei 165°C für weitere 2 h hydrolysiert. Nach Abkühlen auf $20\text{-}22^\circ\text{C}$ wurden diese im Eisbad auf 0°C gebracht. Nach Zugabe von je 1 ml des Farbreagenz' wurden die Reaktionsgemische bei 37°C für 1,5 h inkubiert. Zur Quantifizierung wurde die Extinktion bei 820 nm in einem Photometer (KONTRON, UVIKON 931) gemessen.

Aufschlussreagenz:	6,7 ml	70% (v/v) Perchlorsäure/ H_2O
	30,6 ml	konzentrierte Schwefelsäure
	ad 100 ml	H_2O
Farbreagenz:	1,0 ml	1 M Natriumacetat
	1,0 ml	2,5% (w/v) Ammoniumheptamolybdat/ H_2O
	7,0 ml	H_2O , mischen bei 0°C
	1,0 ml	10% (w/v) eisgekühlte Ascorbinsäure/ H_2O

Da für die analysierte Substanz kein Gesamtphosphat nachgewiesen wurde (siehe 4.3), wurde auf die Messung des anorganischen Phosphats verzichtet.

3.3.9 Fourier-Transform Infrarot- (FTIR-) Spektroskopie

[337]

Die Infrarot-spektroskopischen Messungen wurden an einem IFS-55 Spektrometer (BRUKER) unter Verwendung der ATR (abgeschwächte Totalreflexion) -Technik durchgeführt. Vor der Messung wurden sowohl die Standards als auch die Proben (siehe 4.3) in 20 mM Hepes durch mehrmalige Temperaturzyklen zwischen 5 und 70°C homogenisiert, anschließend auf einen ZnSe-Kristall gegeben und im Stickstoffstrom eingengt. Die Proben wurden in eine geschlossene Küvette platziert, die anschließend durch Wasserdampf gesättigt wurde.

Die Signalerfassung erfolgte mit einem Quecksilber-Cadmium-Tellur-Detektor und wurde über 1000 Scans gemittelt. Die Spektren wurden bei einer Auflösung von 2 Wellenzahlen cm^{-1} aufgenommen. Die Messungen wurden bei 28°C durchgeführt.

3.3.10 Sulfatnachweis mittels analytischer Anionenaustausch-Chromatographie

Der Nachweis von Sulfat wurde an einer HPLC-Anlage (siehe 3.2.7.1) auf einer analytischen Anionenaustausch-Säule GYNKOCHROM AX-5i (120 x 4,6 mm, GYNKOTEC) gebracht. Als Lösungsmittel wurde 1,5 mM Natrium-Phthalat, pH 5,8 bei einer Flussrate von $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ gewählt.

Zur Abspaltung des Sulfatrestes wurden jeweils 10 μg der Proben (siehe 4.3) zuvor mit 100 μl einer 2 M Salzsäure bei 100°C für 1 h hydrolysiert und anschließend mehrmals evaporiert. Die Detektion erfolgte durch UV-Absorption bei 280 nm. Die Identifikation des Sulfates erfolgte durch den Vergleich der Retentionszeit zu einem externen Anionen-Standard aus Natriumsulfat und Dinatriumhydrogenphosphat (je 25 nM). Zur Kontrolle wurden 10 μg der unhydrolysierten Probe, 25 nM Glucose-6-Sulfat (unter denselben Bedingungen hydrolysiert sowie nicht hydrolysiert), sowie als Blindwert nur das Laufmittel injiziert. Die Injektionsvolumina betragen jeweils 5 μl .

3.3.11 Sulfatnachweis mittels Bariumchlorid

Der Sulfatnachweis wurde nach einer modifizierten in der Literatur beschriebenen Methode [338] durchgeführt.

Alle verwendeten Lösungen wurden in einer Konzentration von $10 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ angesetzt. $0,5 \mu\text{l}$ einer Bariumchlorid-Lösung wurden auf ein Filterpapier (Blotter Paper, Hoefler No. TE46, AMERSHAM BIOSCIENCES) vorgelegt. Anschließend wurden $0,5 \mu\text{l}$ einer frisch angesetzten und filtrierten Natrium-Rhodizonat-Lösung hinzugegeben. Zum Ansäuern wurden ebenfalls $0,5 \mu\text{l}$ einer $0,5 \text{ M}$ Salzsäure hinzugefügt. Auf dieses Reaktionsgemisch von leuchtend roter Färbung wurden anschließend sowohl Standards als auch die zu testenden Substanzen $0,5 \mu\text{l}$ -weise gegeben. Mit Verschwinden der roten Färbung wurde Sulfat nachgewiesen.

Als Standardsubstanz wurde Dextransulfat (SIGMA) eingesetzt. Zur Freisetzung von Sulfatgruppen wurden sowohl die Proben (siehe 4.3) als auch die Standard-Substanzen durch Inkubation von 2 M Salzsäure bei 100°C für 1 h hydrolysiert. Nach Evaporation wurden die zu testenden Substanzen zur vollständigen Elimination von Salzsäure zweimal in Wasser aufgenommen und erneut evaporiert.

3.3.12 Massenspektrometrie

3.3.12.1 Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI TOF-MS)

[339;340]

MALDI TOF-MS-Analysen wurden mit einem Flugzeit-Massenspektrometer Bruker-Reflex III (BRUKER-DALTONICS) im Reflektor- oder linearen (LIN) Modus durchgeführt. Die Ionen wurden mit einer Spannung von 20 kV unter Anwendung der Post Source Decay beschleunigt. Die Proben (siehe 4.4.1) wurden in sterilem Wasser (Aqua B. Braun) mit einer Konzentration von $5\text{-}10 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ gelöst und - wenn nötig - durch Ionenaustauscherharz (AMBERLITE IR-120, MERCK) von störenden Kationen (Na^+ , K^+) befreit. Jeweils $0,5 \mu\text{l}$ der zu messenden Substanz wurde vorgelegt und anschließend 1:1 mit Matrixlösung auf dem Target gemischt. Dabei wurden folgende Matrizes getestet: 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) [341], 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP) [342] und 3-Aminoquinolin. Die Spektren wurden im negativen bzw. positiven Ionenmodus aufgenommen. Die Massenskala wurde mit Hilfe von vergleichbaren chemischen Substanzen bekannter Massen extern kalibriert.

3.3.12.2 Electrospray-Ionization Fourier-Transform-Ion-Cyclotron-Resonance-Mass Spectrometry (ESI FT-ICR MS)

ESI FT-ICR-MS wurde an einem APEX II (BRUKER DALTONICS) im positiven Ionenmodus durchgeführt. Das Gerät ist mit einem 7-Tesla-Magneten und einer APOLLO Ionenquelle ausgestattet. Die zu analysierenden Substanzen (siehe 4.4.1) wurden in einer Konzentration von $10 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ in einer 50:50:0,03 (v/v/v) Mischung aus 2-Propanol, Wasser und 30 mM Ammoniumacetat, pH 4,70 gelöst und mit einer Flussrate von $2 \mu\text{l } \text{min}^{-1}$ versprüht. Die Gastemperatur wurde auf 150°C gesetzt. Die Kapillar-Exit-Spannung bei Messungen unter Anwendung der Capillary Skimmer Dissociation (CSD) betrug 250 V.

3.3.13 Kernspin-Resonanz-Spektroskopie (NMR)

Mit einem BRUKER DRX AVANCE 600 MHz Spektrometer wurden NMR-Experimente unter Verwendung der Standardsoftware (BRUKER) durchgeführt. Für ^1H -NMR-Experimente lagen die Arbeitsfrequenzen bei 600,31 MHz, für ^{13}C -NMR-Experimente bei 150,96 MHz. Die Proben wurden wiederholt in $500 \mu\text{l}$ D_2O (99,9%) aufgenommen und lyophilisiert (Lyovac GT 2 E, FINN-AQUA). Zur Messung wurden die Proben (siehe 4.4.1) in $500 \mu\text{l}$ D_2O (99,99%) gelöst. Alle ein und zweidimensionalen Spektren wurden bei 27°C aufgenommen. Chemische Verschiebungen sind relativ zu Aceton (δ_{H} : 2,225; δ_{C} : 31,45) als internen Standard in ppm angegeben.

COSY-, TOCSY-, NOESY- und ROESY-Spektren wurden mit Datensätzen ($t_1 \times t_2$) von 512×2048 Punkten aufgenommen. TOCSY- und NOESY-Experimente wurden phasensensitiv mit Mischzeiten von 100 ms bzw. 200 ms durchgeführt. Heteronukleare zweidimensionale ^1H - ^{13}C -Korrelation wurde durch HMQC- und HMBC-Experimente mit Datensätzen von 256×2048 Punkten bestimmt.

Für homo- und heteronukleare Korrelationsexperimente wurden 128 Scans addiert.

Nach Abschluss aller NMR-Messungen wurden die Proben lyophilisiert und zum Protonenaustausch zweimal in Wasser aufgenommen und erneut lyophilisiert. Für weitere chemische Analysen wurden davon wässrige Stammlösungen ($5 \text{ mg } \text{ml}^{-1}$) hergestellt und diese zunächst bei -20°C gelagert.

3.3.14 Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)

3.3.14.1 TNF- α -ELISA

3.3.14.1.1 TNF- α -ELISA mit Überständen stimulierter Mauszellen

Murine Knochenmarksmakrophagen wurden aus 8 bis 10 Wochen alten C57BL/6 Mäusen (CHARLES RIVER) gewonnen. Aus den getöteten Mäusen wurden aus beiden Hinterbeinen Ober- und Unterschenkelknochen frei präpariert und abgetrennt. Die eröffneten Knochenmarkshöhlen wurden mit Medium (Dulbecco's Medium, 10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% HEPES, 1% Natriumpyruvat) durchspült und das Knochenmark aufgefangen. Die Zellen wurden bei 4°C und $160 \times g$ (Rotanta 460 R, HETTICH) für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu dem Zellpellet wurden 5 μ l (500 ng) MCSF hinzugegeben. Die resuspendierten Zellen wurden in eine Petrischale (NUNC) überführt und bei 37°C/5% CO₂ für 16-22 h bebrütet. Der Überstand mit nicht-adhärenenten Vorläuferzellen wurde abgenommen, abzentrifugiert und mit frischem Medium unter Zusatz von 5 μ l MCSF (500 ng) in unbeschichtete Petrischalen überführt. Unter Mediumwechsel wurden die Zellen zur Ausdifferenzierung 5 d bei 37°C/5% CO₂ inkubiert. Die Adhärenz der Makrophagen wurde durch Zugabe von 5 ml Accutase (Accutase II, PAA) aufgehoben. Die Zellen wurden geerntet, in definierter Zellzahl ausgesät und für 16-22 h bei 37°C/5% CO₂ bebrütet.

Jeweils 10^6 Knochenmarksmakrophagen pro ml wurden mit den isolierten ConA-positiven und -negativen Polysacchariden sowie mit LPS aus *Salmonella enterica* sv. Friedenau Stamm H909 und ganzen Zellen von *M. avium* Stamm SE01 als Positivkontrollen stimuliert. Dabei wurden die Zellen mit jeweils $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ und $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ der mykobakteriellen Polysaccharide (siehe 4.4.1), 10 ng ml^{-1} LPS oder mit *M. avium* in einer MOI von 3 pro Zelle bei 37°C/5% CO₂ für 24 h kokultiviert. Als Negativkontrolle wurden die Makrophagen nur mit PBS kultiviert. Die Überstände wurden entnommen, und die Messung der TNF- α -Konzentration wurde in einem Sandwich-ELISA (DuoSet mouse TNF- α /TNFSF1A, R&D SYSTEMS) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden Mikrotiterplatten (Maxisorp, NUNC) zunächst mit einem Ziege-anti-Maus-TNF- α -Antikörper beschichtet. Die Überstände stimulierter Zellen wurden zur Bindung von TNF- α an den Antikörper auf die gecoateten Platten gegeben. Zur Detektion wurde ein zweiter biotinylierter Ziege-anti-Maus-TNF- α -

Antikörper eingesetzt. Nach Zugabe von Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin und Substrat (Mischung aus Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) wurde anschließend die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem Mikropplatten-Lesegerät (TECAN Sunrise) gemessen. Aus der optische Dichte wurde anhand einer Eichkurve, die mit *E. coli* exprimiertem rekombinanten Maus-TNF- α erstellt wurde, die Konzentration an TNF- α ermittelt.

3.3.14.1.2 TNF- α -ELISA mit Überständen stimulierter Humanzellen

Mononukleäre Zellen (MNC) wurden aus Citratblut gesunder Spender durch Dichtegradientenzentrifugation (Biocoll, Separating Solution, BIOCHROM) gewonnen. Aus diesen MNC wurden durch Elutriation Monozyten isoliert, die auf 1×10^6 Zellen ml^{-1} RPMI-1640-Medium (5% fötales Kälberserum, 100 U ml^{-1} Penicillin, $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Streptomycin) konzentriert wurden. Durch Zugabe von jeweils 250000 U ml^{-1} GM-CSF und IL-4 wurde die Differenzierung zu dendritischen Zellen induziert. An Tag 5 wurden die Zellen geerntet. 10^6 Zellen ml^{-1} wurden mit jeweils $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ der mykobakteriellen Polysaccharide (siehe 4.4.1) bei $37^\circ\text{C}/5\% \text{ CO}_2$ für 18 h stimuliert. Als Referenz-Stimulus wurde LPS aus *S. enterica* sv. Minnesota Stamm HL 150 eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle wurden unreife dendritische Zellen verwendet.

In den Überständen dieser stimulierten Zellen wurden die Konzentrationen an freigesetztem TNF- α durch einen Sandwich-ELISA gemessen. Dieser wurde gemäß den Angaben des Herstellers (Ready Set go, Human TNF- α -ELISA, eBIOSCIENCES) durchgeführt. Als Standard wurde rekombinantes TNF- α eingesetzt.

Dieselben Überstände wurden verwendet, um die Konzentrationen an IL-10 (siehe 3.3.14.3.2) und IL-12 (siehe 3.3.14.4) zu ermitteln.

3.3.14.2 IFN- γ ELISA

Überstände von humanen mononukleären Zellen (siehe 3.3.15.2), die mit BCG sowie mit mykobakteriellen ConA-positiven und -negativen Polysacchariden (siehe 4.4.1) stimuliert wurden, wurden nach Tag 7 auf das Vorhandensein von IFN- γ hin untersucht. Zur Stimulation wurden dabei lyophilisierte *M. bovis* Zellen des Stammes BCG mit einer MOI von $0,04 \text{ Zelle}^{-1}$ (entspricht 1 Zelle auf 0,04 lebende BCG-Keime) eingesetzt. Nach der Stimulation handelt es sich damit um BAK (BCG-aktivierte Killerzellen). Von den mykobakteriellen Polysacchariden wurden jeweils $10 \mu\text{g}$ und $40 \mu\text{g}$ verwendet. Der

Nachweis wurde mit einem anti-human-IFN- γ ELISA-Kit gemäß den Angaben des Herstellers (eBIOSCIENCES) durchgeführt.

3.3.14.3 IL-10-ELISA

3.3.14.3.1 IL-10-ELISA mit Überständen stimulierter Mauszellen

In Überständen von stimulierten Knochenmarksmakrophagen (siehe 3.3.14.1.1) wurden die Konzentrationen an IL-10 gemessen. Dazu wurde ein Sandwich-ELISA (BD OptEIA Set Mouse Il-10, BD BIOSCIENCES) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein Detektionssystem auf Biotin-Streptavidin-Basis (siehe 3.3.14.1). Zur Beschichtung der Platten (Maxisorp, NUNC) wurde ein anti-Maus-IL-10- und als Detektions-Antikörper ein biotinylierter anti-Maus-IL-10-Antikörper eingesetzt. Als Enzym-Reagenz wurde Meerrettich-Peroxidase-konjugiertes Streptavidin verwendet. Als Standard diente rekombinantes Maus-IL-10.

3.3.14.3.2 IL-10-ELISA mit Überständen stimulierter Humanzellen

In Überständen humaner dendritischer Zellen, die mit den isolierten Polysacchariden stimuliert wurden, (siehe 3.3.14.1.2) wurde der Gehalt an IL-10 bestimmt. Dazu wurde ein Sandwich-ELISA-Kit (Ready Set go, Human IL-10-ELISA, eBIOSCIENCES) nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Referenz zur Erstellung der Eichgerade diente rekombinant hergestelltes IL-10.

3.3.14.4 IL-12-ELISA

In Überständen stimulierter humaner dendritischer Zellen (siehe 3.3.14.1.2) wurden die Konzentrationen an IL-12 gemessen. Es wurde ein Sandwich-ELISA-Kit (Ready Set go, Human IL-12-ELISA, eBIOSCIENCES) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Als Standardsubstanz diente rekombinantes IL-12.

3.3.15 Zytotoxizitäts-Tests

3.3.15.1 Zellkultur der Tumor-Zelllinie T-24

Bei der humanen Blasentumor-Zelllinie T-24 handelt es sich um einen papillären Tumor im Stadium T1 und vom Differenzierungsgrad G3. Die Zelllinie zeigt den Phänotyp eines wenig differenzierten Harnblasenkarzinoms.

Die Zellen wurden bei 37°C/5% CO₂ in RPMI-1640-Medium (PAA LABORATORIES) unter Zusatz von 10% FCS (LINARIS), 1% Glutamat, 100 U ml⁻¹ Penicillin und 100 µg ml⁻¹ Streptomycin kultiviert.

3.3.15.2 Isolierung und Stimulation humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Mononukleäre Zellen wurden aus heparinisiertem Vollblut gesunder Spender durch diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation (Biocoll Separating Solution, BIOCHROM) gewonnen und auf 10⁶ Zellen ml⁻¹ RPMI-1640-Medium (5% Humanserum, 100 U ml⁻¹ Penicillin, 100 µg ml⁻¹ Streptomycin) konzentriert. Neben BCG (siehe 3.3.14.2) und PBS (100 µl) wurden ConA-positive und -negative mykobakterielle Polysaccharide (siehe 4.4.1) in den Konzentrationen 10 µg ml⁻¹ und 40 µg ml⁻¹ hinzugegeben. Die Zellen wurden für 7 d in 6-Well-Mikrotiterplatten bei 37°C/5% CO₂ kultiviert. In den Überständen wurden die Konzentrationen an IFN-γ (siehe 3.3.14.2) bestimmt. Der Effekt dieser stimulierten Zellen auf markierte Tumorzellen wurde in einem Chromat-Assay (siehe 3.3.15.3) ermittelt.

3.3.15.3 Chromat-Assay

Zur Messung der Zytotoxizität der stimulierten Effektorzellen gegen [⁵¹Cr]-markierte Tumorzellen wurde die Freisetzung von Radioaktivität nach Zellyse gemessen.

Die Zielzellen (siehe 3.3.15.1) wurden geerntet, gewaschen und nach Überprüfung der Viabilität mit 50 µCi Na₂⁵¹CrO₄ (HARTMANN) pro 10⁶ Zellen für 1,5 h bei 37°C markiert, gewaschen und resuspendiert (5 x 10⁴ Zellen ml⁻¹).

Die Effektorzellen (siehe 3.3.15.2) wurden geerntet und mit Effektor-Zielzell-Verhältnissen von 40:1, 20:1 und 10:1 zu einem Endvolumen von 100 µl der Zielzellen gegeben.

Durch Zugabe von jeweils 100 µl Medium wurde die spontane Freisetzung an Radioaktivität (R_{spo}) bestimmt. Die maximale Freisetzung an Radioaktivität wurde durch Zugabe von jeweils 100 µl Lyselösung erreicht (R_{max}). Die Freisetzung an Radioaktivität, die durch die Effektorzellen hervorgerufen wird (R_{eff}), wurde in Triplikaten gemessen. Der Gehalt an Radioaktivität im Überstand wurde in einem Gamma-Counter (BERTHOLD) nach 5 h Inkubation bei 37°C/5% CO₂ gemessen.

Die spezifische Lyse wurde durch folgende Berechnung bestimmt:

$$\text{spezifische Lyse [\%]} = \frac{R_{\text{eff}} - R_{\text{spo}}}{R_{\text{max}} - R_{\text{spo}}} \cdot 100$$

3.3.15.4 Apoptose-Assay

Humane Monozyten (siehe 3.3.14.1.2) sowie Zellen der humanen Tumorzelllinie THP1 (Zelllinie der akuten myeloischen Leukämie) wurden in 20 ml-FACS-Rörchen (Polystyren) auf eine Zellzahl von $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ Medium (RPMI 1640, 10% FCS, 1% L-Glutamat) eingestellt. Die Zellen wurden mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ der ConA-positiven und -negativen Arabinomannane aus SmT und SmO für 48 h bei 37°C/0,5% CO₂ stimuliert. Als Negativ-Kontrollen diente LPS aus *Salmonella enterica* sv. Friedenau Stamm H909 (10 ng ml^{-1}). Zur Bestimmung der spontanen Apoptose wurden die Zellen unstimuliert eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurde zur Stimulation das hoch toxische Staurosporin (200 nM in DMSO) aus *Streptomyces* (CALBIOCHEM) verwendet. Anschließend wurden die Zellen bei 200 x g und 4°C für 10 min (Rotanta 460 R, HETTICH) abzentrifugiert und die Überstände verworfen. Zu dem Pellet wurden pro 100 µl Zellsuspension 5 µl FCS und 25 µl Caspase 3/7 Substrat (Z-DEVD-R110, PROMEGA) hinzugegeben. Die Zellen wurden lichtgeschützt für 30 min bei 37°C/0,5% CO₂ inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl FACS-Puffer (0,02% [w/v] Natriumazid/PBS) erfolgte die Messung der Lichtstreuung der Zellen bzw. der Fluoreszenz in einem präparativen FACS-Gerät (FACSCalibur, BD BIOSCIENCES).

3.3.16 Limulus Amöbozyten Lysat (LAL)-Test

[343,344]

Zur Bestimmung des Endotoxin-Gehalts in den isolierten Polysacchariden wurde ein chromogenkinetischer LAL (Limulus-Amöbozyten-Lysat)-Test (COAMATIC Chromo-LAL) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Bakterienanzucht

In der vorliegenden Arbeit wurden die zwei Morphotypen SmT und SmO des *Mycobacterium avium* Stammes 2151, Serovar 2 (siehe 3.1.2) angezüchtet und zur Isolierung und Strukturanalyse von Kapselpolysacchariden herangezogen.

Die Bakterien wurden auf solidem 7H10-Middlebrook-Nährmedium mit zusätzlicher Nitrocellulose-Membran bei 37°C kultiviert (siehe 3.1.3). Abbildung 14a zeigt einen Ausschnitt einer Agarplatte mit aufliegender Nitrocellulose-Membran, auf der Zellen des SmT Morphotypen mit charakteristischen flachen glatt-transparenten (siehe 1.1.3.4.2) Kolonien gewachsen sind.

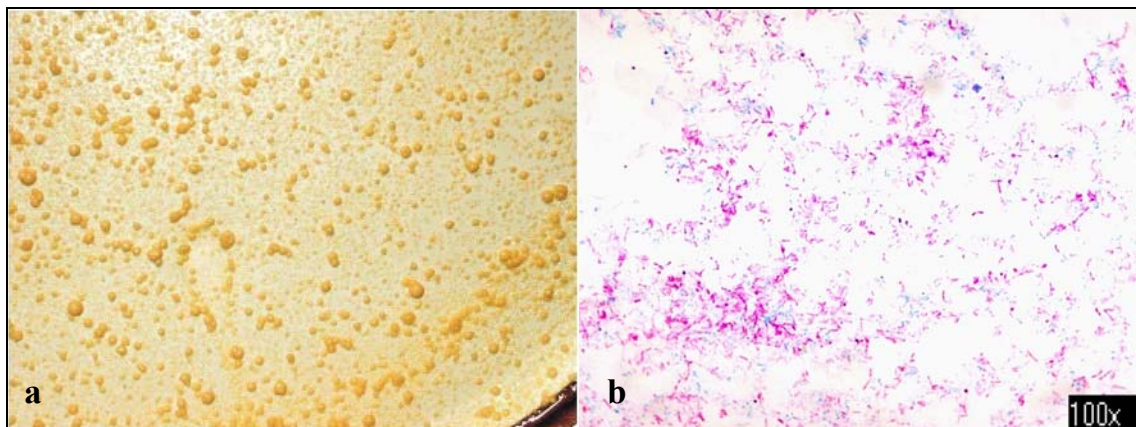


Abbildung 14: Auf Nitrozellulosemembran gewachsene *M. avium* Kolonien (Stamm 2151, Serovar 2, Morphotyp SmT) nach fünf Wochen Kultivierungsdauer (a) mit Nachweis säurefester Stäbchen durch Ziehl-Neelsen-Färbung (b).

Die Zellen wurden auf Middlebrook 7H10-Agar bei einer Wachstumstemperatur von 37°C und einem pH-Wert des Mediums von 7,7 angezüchtet.

Zum Nachweis säurefester Stäbchen wurde nach der Zellernte eine Ziehl-Neelsen-Färbung (siehe 3.3.1) durchgeführt und diese mikroskopisch begutachtet (siehe Abbildung 14b).

Die Ausbeuten lagen bei beiden gezüchteten Morphotypen durchschnittlich zwischen 0,5 und 1 g Bakterien-Feuchtmasse pro Platte. Eine Anzucht über eine Dauer von sieben

Wochen ergab somit eine Bakterienfeuchtmasse von jeweils rund 150 g des SmT und SmO (siehe Tabelle 1).

4.2 Extraktion von Kapselmaterial

Im Rahmen eines Vorversuches wurden die Extraktion von Kapselmaterial und die weitere Isolierung von Proteinen, Lipoglycanen und Polysacchariden etabliert.

Die frisch geernteten Zellen (siehe 4.1) beider Kolonimorphotypen, SmT und SmO, wurden zur Gewinnung von Kapselmaterial in einer wässrigen 1%igen (w/v) Phenol-Lösung für 48 h bei 4°C gerührt und anschließend abzentrifugiert (siehe 3.2.2). Eine Übersicht über die Extraktion der Zellen und weiteren Aufarbeitung der Extrakte zeigt Abbildung 15.

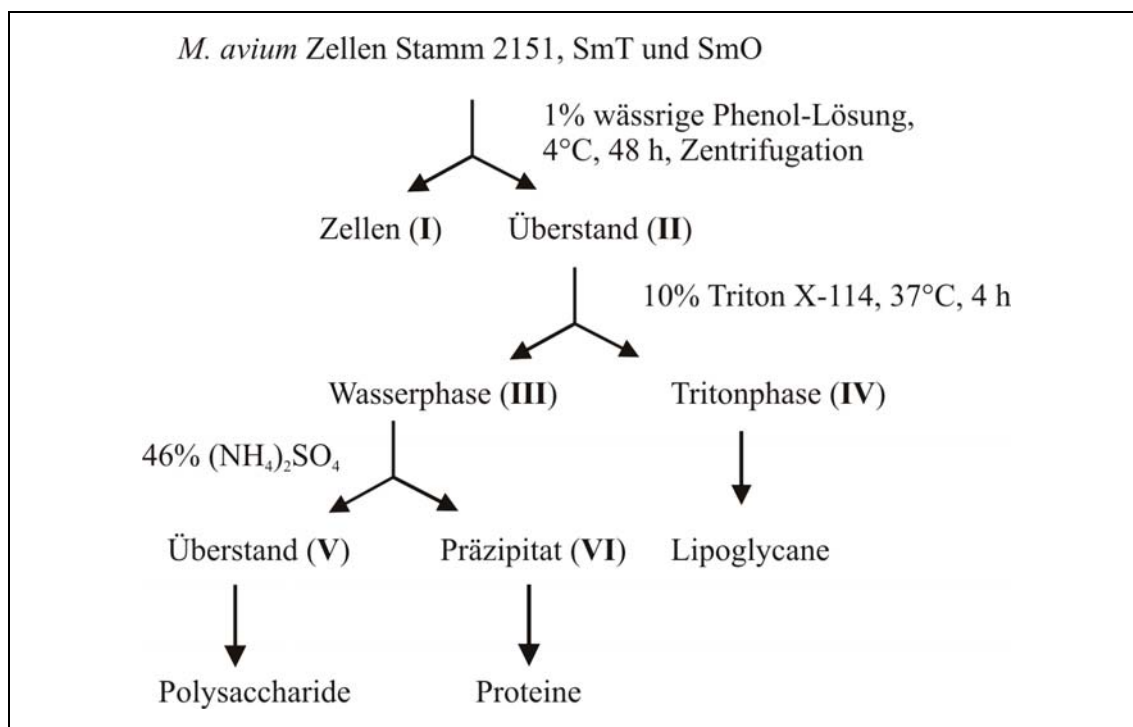


Abbildung 15. Extraktionsschema zur Gewinnung von Kapselpolysacchariden aus *M. avium* 2151 SmT und SmO.

Der Überstand (siehe Abbildung 15, II) nach der Phenol-Extraktion und Zentrifugation wurde sterilfiltriert, dialysiert und lyophilisiert (siehe 3.2.2). Die Ausbeuten der erhaltenen Sedimente (siehe Abbildung 15, I) und Überstände (siehe Abbildung 15, II)

nach der Phenol-Extraktion wurden bestimmt. Die Sedimente, die die Bakterienzellen enthalten, machten durchschnittlich 99% der Feuchtmasse aus. Diese wurden jedoch nicht näher untersucht und bei -20°C gelagert. Die Überstände hingegen, die Kapselmaterial enthalten und zur weiteren Aufreinigung verwendet wurden, wurden mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 1% gewonnen (siehe auch Tabelle 1).

4.2.1 Ergebnisse der Triton-Extraktion

Die Lyophilisate aus den Überständen (siehe Abbildung 15, II) nach der Phenol-Extraktion (siehe 4.2) wurden einer wiederholten Triton-Extraktion unterzogen, um hydrophile von lipophilen Substanzen voneinander zu separieren. Es wurden eine Wasser- (siehe Abbildung 15, III) und eine Triton-Phase (siehe Abbildung 15, IV) erhalten. Um Reste des Detergenz zu entfernen, wurden die erhaltenen Wasser-Phasen anschließend dreimal mit Aceton gewaschen und die Triton-Phasen mit Aceton gefällt (siehe 3.2.3).

Die Wasser-Phasen (siehe III, Abbildung 15) sollten Proteine und Kohlenhydrate, die Triton-Phasen (siehe IV, Abbildung 15) Lipoglycane und möglicherweise Lipoproteine enthalten. Dies wurde im Rahmen eines Vorversuchs, in dem die Triton-Extraktion an einem Phenol-Extrakt (siehe 3.2.2) aus *M. avium* Stamm 104 optimiert wurde, überprüft. Dazu wurden die gewaschenen Wasser-Phasen und gefällten Triton-Phasen elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.3.2) und mit kombinierter Coomassie- (siehe 3.3.2.3.1) und PAS-Färbung (siehe 3.3.2.3.3) auf das Vorhandensein von Proteinen und Kohlenhydraten hin untersucht. Zusätzlich dazu wurden die Substanzen anschließend durch Elektroblothing auf eine PVDF-Membran transferiert. Entwickelt wurde dieser Westernblot mit dem Lektin ConcanavalinA (siehe 3.3.2.4), das spezifisch terminale α -Mannose- und (geringer) α -Glucose-Reste erkennt [327]. In Abbildung 16 sind das SDS-Gel und der Lektin-Blot mit Sedimenten und Überständen der Triton-Phase (siehe IV, Abbildung 15) dargestellt.

Das SDS-Gel (siehe Abbildung 16a) zeigt bei ca. 22, 25, 31, 60 und 66 kDa distinkte Proteinbanden in dem Sediment (1b) der Triton-Phase, von denen mindestens die Banden bei 60 und 66 kDa ebenfalls in dem Überstand (2b) der Triton-Phase zu finden sind. Zusätzlich dazu sind hauptsächlich in dem Sediment (1a, 1b) im mittleren (ca. 30 bis 40 kDa) und unteren (bis ca. 25 kDa) Molekularmassenbereich diffuse Schmier-

banden zu erkennen, die teilweise eine positive PAS-Reaktion zeigen. Diese Banden sind analog dazu in dem Lektinblot (siehe Abbildung 16b) nachgewiesen.

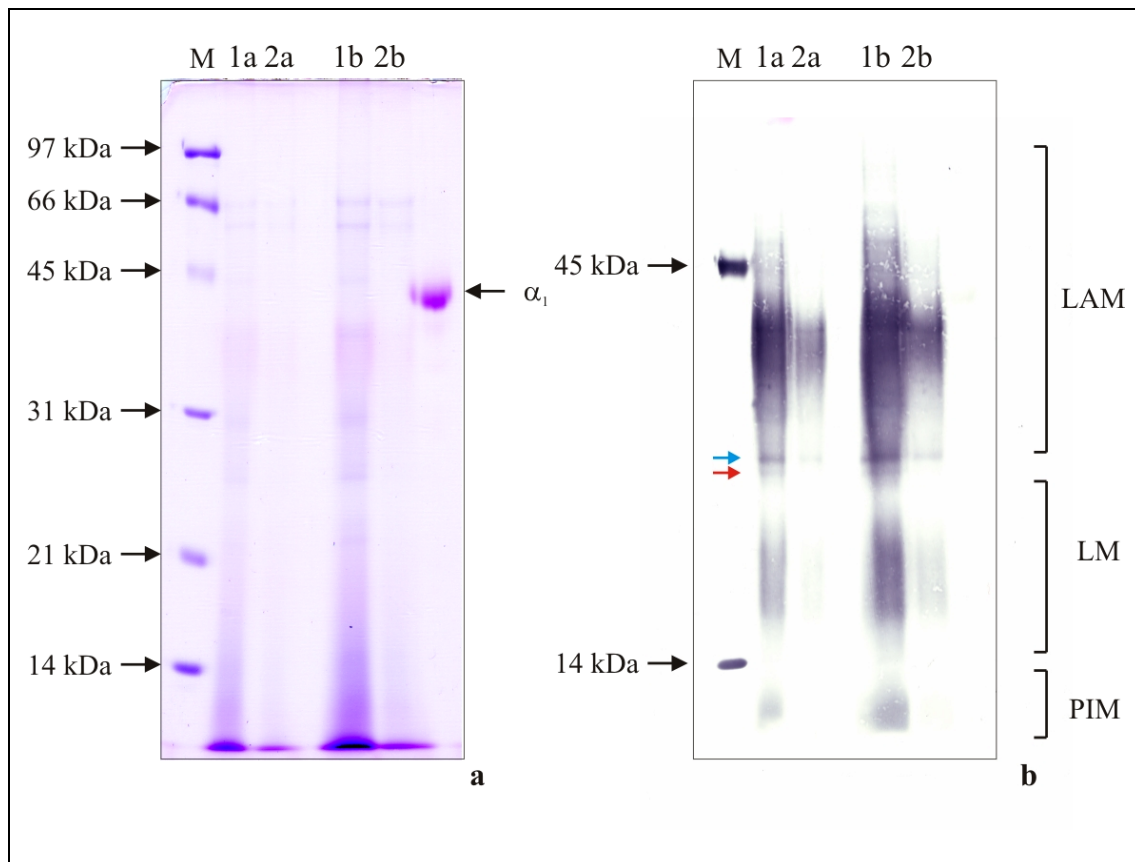


Abbildung 16: SDS-Gel (a) und Lektin-Blot (b) der Sedimente und Überstände nach der Fällung der Triton-Phase aus *M. avium* Stamm 104.

Die Proben wurden in einem 12%igen Gel (12 cm x 0,75 mm) bei konstanter Spannung von 150 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese-Dauer betrug 5 h. Eine Hälfte des Gels wurde mit Perjodsäure-Schiff-Reagenz und anschließend mit Coomassie gefärbt (a). Die andere Hälfte wurde für einen Westernblot eingesetzt. Die aufgetrennten Substanzen wurden für 10-16 h mit 26 V auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Blot wurde mit 100 µg Lektin (ConA) entwickelt (b). (1a): Sediment nach Fällung (50 µg); (2a): Überstand nach Fällung (50 µg); (1b): Sediment nach Fällung (100 µg); (2b): Überstand nach Fällung (100 µg); (M): Low Molecular Weight Standard (1:20; 10 µl) mit Hühnereiweiß-Ovalbumin bei 45 kDa [345] und Hühnereiweiß-Lysozym bei 15 kDa [346] als Lektin-positive Glycoproteine. (α_1): α_1 -saurer Glycoprotein (5 µg).

Der Blot zeigt dabei in allen Spuren Lektin-positive breite, diffuse Banden, wie sie für homogene Lipoglycane (LAM, LM und PIM) typisch sind [223]. LAM zeigt eine Bande zwischen 30 und 45 kDa, LM zwischen 15 und 20 kDa und PIM als kleinstes Vorläufermolekül unter 12 kDa. Dabei zeigen die Sedimente (1a, 1b) nach der Fällung die zwei- bis dreifache Menge an Lipoglycanen. Zusätzlich zu den diffusen Banden sind

zwei distinkte Lektin-positive Banden von ca. 31 kDa (→) und 33 kDa (→) im Sediment (1a, 1b) nachgewiesen, von denen mindestens eine ebenso - wenn auch schwächer- im Überstand (2b) zu erkennen ist. Dabei könnte es sich um Glycolipoproteine handeln, da diese einerseits in der Triton-Phase als lipophile Strukturen angereichert sind und andererseits durch Lektin detektierte Kohlenhydratanteile besitzen.

Damit konnte gezeigt werden, dass neben Proteinen auch Lipoglycane in der Triton-Phase angereichert vorliegen.

Entsprechend des Vorversuchs wurde die Triton-Extraktion der Phenol-Extrakte (siehe 4.2) aus *M. avium* Stamm 2151 durchgeführt.

Dabei betragen die Ausbeuten der Wasser-Phasen der Triton-Extraktion 33% (SmT) und 64% (SmO) des Phenol-Extraktes bzw. 0,2% (SmT) und rund 0,5% (SmO) der Bakterienfeuchtmasse (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht über die Ausbeuten nach Zellernte, Kapselisolierung, Triton-Extraktion und Proteinpräzipitation im Vergleich zwischen SmT und SmO.

Die Werte beziehen sich auf eine Bakterienanzucht, die nach sieben Wochen Kultivierungsdauer geerntet wurde. Die römischen Ziffern kennzeichnen die Extrakte aus Abbildung 15).

	SmT		SmO	
	absolut	relativ	absolut	relativ
Bakterienfeuchtmasse	~ 150 g	100%	~ 150 g	100%
Phenol-Extrakt (II)	0,90 g	0,60%	1,10 g	0,73%
Wasser-Phase nach Triton-Extraktion (III)	0,30 g	0,20%	0,70 g	0,47%
Überstand nach Präzipitation, Verdau und Entsalzung (V)	91 mg	0,06%	214 mg	0,14%

4.2.2 Ergebnisse der Proteinpräzipitation

Die Wasser-Phasen (siehe Abbildung 15, III) der Triton-Extraktion (siehe 4.2.1) wurden einerseits durch zweimalige Proteinpräzipitation (siehe 3.2.4) und andererseits durch einen anschließenden proteolytischen Verdau (siehe 3.2.5) von Proteinen befreit.

Die Ausbeuten betragen 0,06% (SmT) bzw. 0,14% (SmO) der Bakterienfeuchtmasse (siehe Tabelle 1).

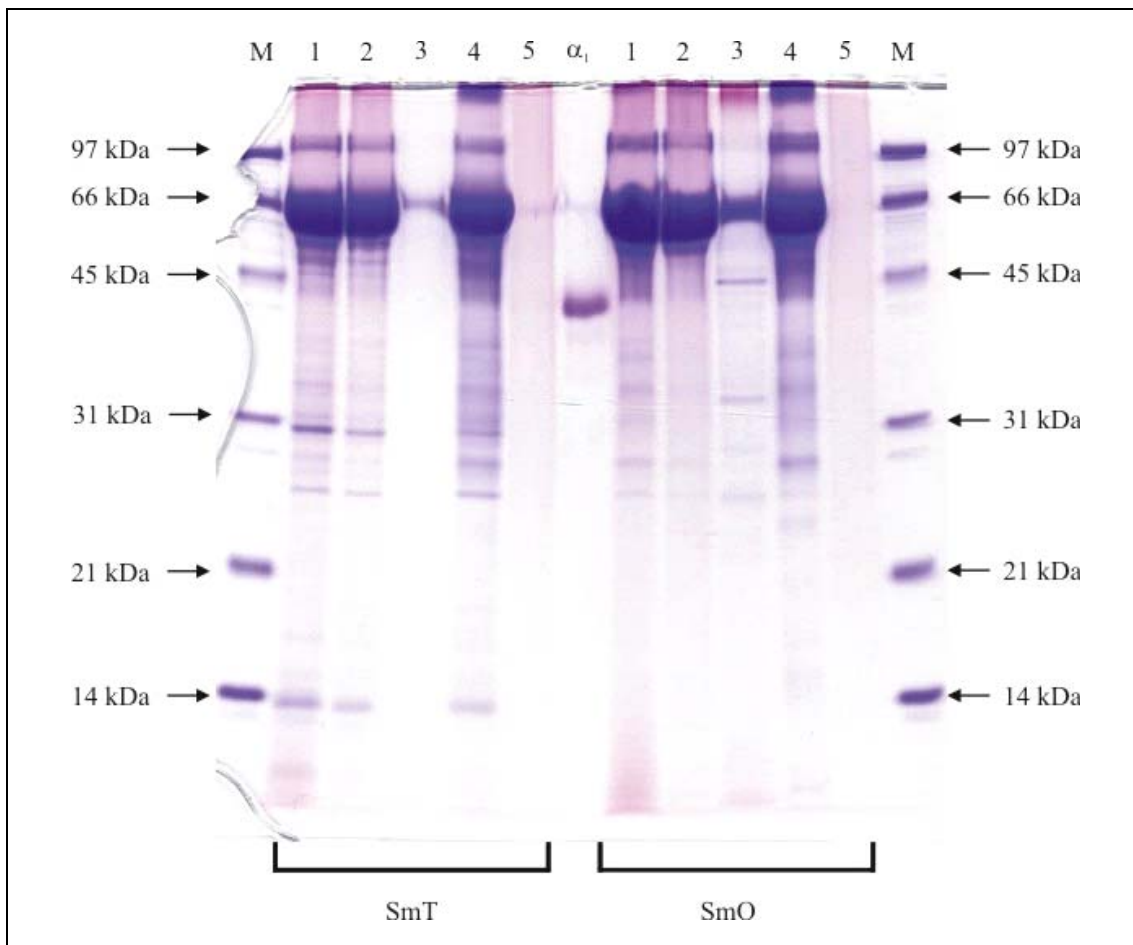


Abbildung 17: SDS-Polyacrylamid-Gel nach Perjodsäure-Schiff- (PAS) und anschließender Coomassie-Färbung zum Kohlenhydrat- und Proteinnachweis in Fraktionen aus *M. avium* SmT und SmO.

Es wurde ein 12%iges Gel von 12 cm x 0,75 mm gegossen. (1): 200 µg Phenol-Extrakt (II, Abbildung 15); (2): 150 µg Wasser-Phase nach Triton-Extraktion (III, Abbildung 15); (3): 150 µg Triton-Phase nach Triton-Extraktion (IV, Abbildung 15); (4): 100 µg Sediment nach Proteinpräzipitation (VI, Abbildung 15); (5): 100 µg Überstand nach Proteinpräzipitation (V, Abbildung 15). Die Proben wurden jeweils mit einem Volumen von 20 µl aufgetragen. (α_1): α_1 -saures Glycoprotein (4 µg); (M): Low Molecular Weight Standard (1:20; 10 µl); Die Elektrophorese-Dauer betrug 5 h bei konstanter Spannung von 150 V. Zunächst wurde das Gel PAS- und anschließend mit Coomassie gefärbt.

Abbildung 17 zeigt ein SDS-Gel (siehe 3.3.2) der aufgetrennten Phenol-Extrakte (siehe 4.2), Wasser- und Triton-Phasen (siehe 3.2.3), sowie Sedimente und Überstände nach der Proteinpräzipitation (siehe 3.2.4) aus einem Vorversuch zur Optimierung der Aufreinigung von Kapselpolysacchariden aus SmT und SmO. Zur Detektion von Kohlen-

hydratstrukturen wurde zunächst eine PAS-Färbung (siehe 3.3.2.3.3) durchgeführt. Anschließend wurde das Gel zum Nachweis von Proteinen zusätzlich mit Coomassie. (siehe 3.3.2.3.1) gefärbt.

Polysaccharide können aufgrund fehlender lipophiler Strukturen nicht mit SDS reagieren, so dass in einem SDS-Gel keine Migration möglich ist. Sie verbleiben vielmehr im Sammelgel, bzw. diffundieren lediglich in das Trenngel, und können dort als diffuse rotgefärbte Banden sichtbar gemacht werden. Das Gel zeigt in allen Fraktionen rote diffuse Banden im hohen Molekularmassenbereich. Das Vorhandensein von Polysacchariden war damit sehr wahrscheinlich.

Die Coomassie-Färbung zeigt eine auffällige Bande zwischen 60 und 70 kDa in den Spuren (1) bis (4). Es handelt sich dabei nachgewiesenermaßen um Albumin (66 kDa), das aus dem OADC-Zusatz des Nährmediums stammt (siehe 3.1.3). Denn in Kapsel- und Zellwand-Extrakten aus Bakterien, die auf albuminfreien Nährböden gezüchtet werden, tritt diese störende Bande nicht auf. Daher wurde dieses albuminhaltige Supplement (OADC) nicht weiterhin verwendet und die Zellen mit Medien auf Pyruvat-Basis angezogen (siehe 4.4).

Die Phenol-Extrakte (1) zeigen zahlreiche Proteinbanden verschiedener Molekularmassen. Im Massenbereich von ca. 100-110 kDa, zwischen 50 und 60 kDa, um 30 kDa, 26-27 kDa, sowie um 14 kDa zeigt der Phenol-Extrakt aus SmT deutliche distinkte Banden, die bis auf eine Bande um 14 kDa ebenso in dem entsprechenden Extrakt aus SmO vorhanden sind. Ähnliche Bandenmuster zeigen die Wasser-Phasen nach Triton-Extraktion (2), wenngleich die entsprechende Spur des SmO schwächere Banden zeigt als die des SmT.

In den Spuren (3) sind die Triton-Phasen aufgetrennt. Während der Extrakt aus SmT, abgesehen von geringen Mengen an Albumin, keine sichtbaren Banden zeigt, sind in dem des SmO mindestens vier distinkte Proteinbanden um 45 kDa, 34 kDa, 30 kDa und bei 26-27 kDa zu erkennen.

In den Spuren (4) sind die Proteinsedimente nach Präzipitation der Wasser-Phase (siehe III, Abbildung 15) aufgetrennt, die ähnlich den Phenol-Extrakten (1) in allen Molekularmassenbereichen Banden zeigen. Im Gegensatz zu den Phenol-Extrakten wurde nur die Hälfte an Probenmenge der Proteinsedimente eingesetzt, da es sich hier um einen Aufreinigungsschritt handelt.

In den Spuren (5) sind jeweils 100 µg der Überstände nach der Proteinfällung aufgetragen. Es sind keine Proteinbanden durch die Coomassie-Färbung sichtbar. Ein Gel, das durch Silbernitrat (siehe 3.3.2.3.2) gefärbt wurde, zeigte ähnliche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Es wurden demnach durch die Ammoniumsulfat-Fällung Proteine weitestgehend eliminiert. Um eventuell dennoch geringe Mengen an Proteinen zu entfernen, wurde zusätzlich ein proteolytischer Verdau (siehe 3.2.5) dieser Phase durchgeführt. Dadurch kann davon ausgegangen werden, dass die Polysaccharid-enthaltenen Überstände proteinfrei sind.

4.2.3 Auftrennung der proteinfreien Extrakte durch Gelpermeations-Chromatographie

Die Vorversuche zur Aufreinigung von Kapselmaterial haben gezeigt, dass durch Triton-Extraktion und Ammoniumsulfat-Fällung Lipoglycane, Proteine und Polysaccharide isoliert werden können (siehe Abbildung 15).

Zur weiteren Aufreinigung der Polysaccharide wurden die proteinfreien Überstände nach Präzipitation und proteolytischem Verdau (siehe 4.2.2 und Abbildung 15, V) durch Gelpermeations-Chromatographie (siehe 3.2.6) mit Sephadex G-50 nach Molekülgröße aufgetrennt. SephadexG-50 trennt globuläre Proteine mit einer Molekularmasse von 1,5 -30 kDa und Dextrane mit einer Molekularmasse von 0,5 bis 10 kDa [347]. Die Trennungen der Extrakte aus SmT und SmO lieferten annähernd identische Elutionsprofile. Es wurden jeweils zwei Saccharid-haltige (siehe 3.2.6) Fraktionen erhalten, deren Signale einerseits in dem Ausschlussvolumen von ca. 60 bis 80 ml sowie im Trennbereich des Materials von 180 bis 220 ml detektiert wurden. Eine weitere Fraktion wurde im niedermolekularen Bereich erhalten, die nachgewiesenermaßen das zur Fällung eingesetzte Ammoniumsulfat enthielt (siehe Abbildung 18b).

Die Saccharid-positiven Fraktionen wurden vereinigt, lyophilisiert und weiter untersucht.

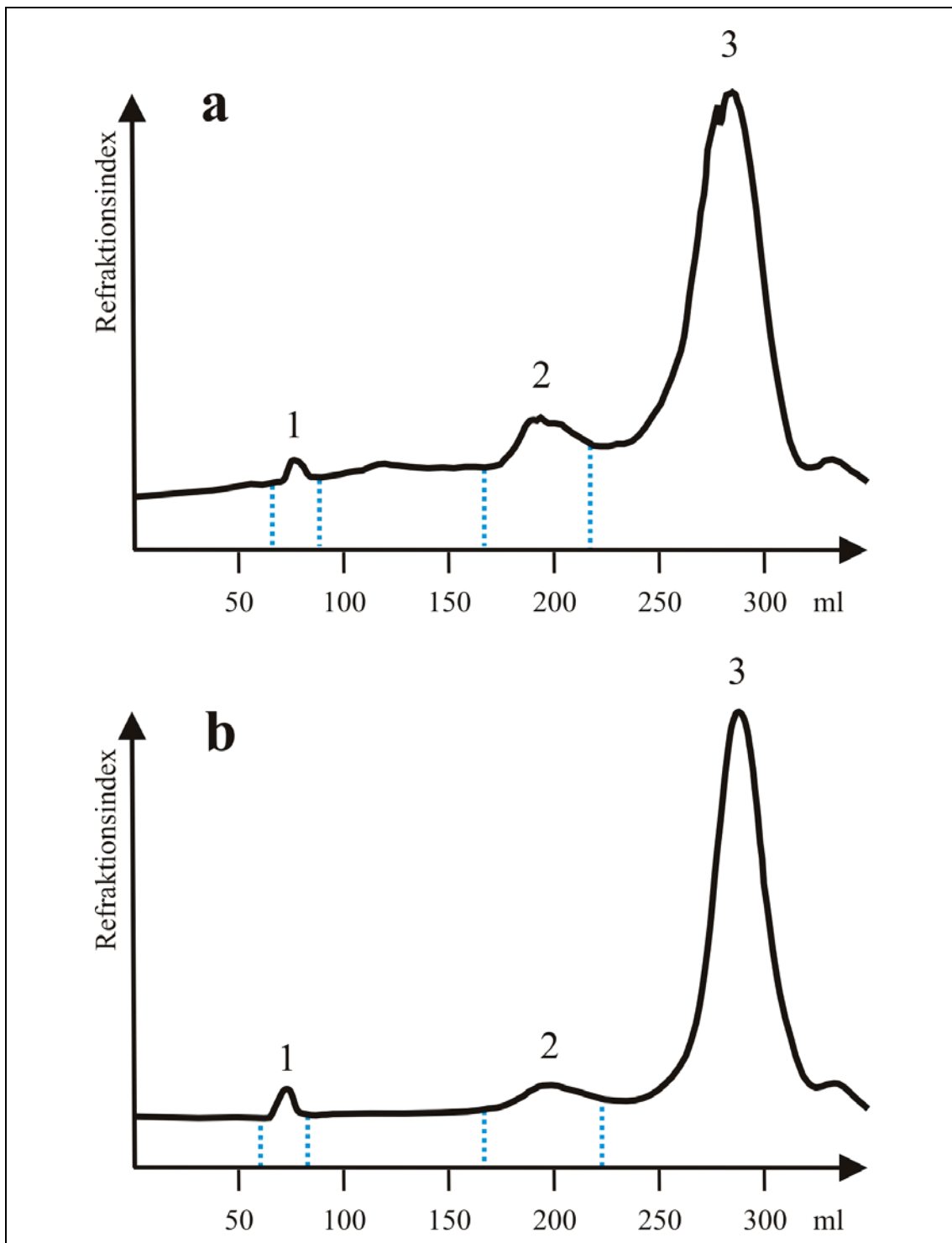


Abbildung 18: Gelpermeations-Chromatogramm der proteinfreien Extrakte aus *M. avium* SmO (a) und SmT (b).

Die Trennungen wurden mit Sephadex-G-50 als Trennmateriale (3 x 80 cm) bei 20-22°C durchgeführt. Als Eluent diente Pyridin/Essigsäure/Wasser (4/10/1000; v/v/v). Es wurde eine Flussrate von 0,5 ml min⁻¹ gewählt. Die Markierungen unter der Kurve geben an, in welchen Bereichen die Fraktionen vereinigt wurden. Fraktion 3 wurde als Salz identifiziert und nicht vereinigt.

4.3 Isolierung von Galactansulfaten

Für Fraktion 1 aus der Gelpermeations-chromatographischen Trennung (siehe Abbildung 18) aus SmT wurde die Zuckerzusammensetzung durch eine Neutralzuckeranalyse (siehe 3.3.4) sowie durch Methanolyse (siehe 3.3.5) bestimmt. Diese ergab ein Verhältnis von Glucose zu Galactose wie annähernd 1:3. Ebenso wurde Galactose in furanosidischer Form, Hexuronsäure sowie eine Pentose in geringer Menge nachgewiesen.

Um Informationen über die Substitutionsmuster der Zuckermonomere der Polysaccharide zu erhalten, wurde von dieser Fraktion eine Methylierungsanalyse (siehe 3.3.6) durchgeführt. Die Analyse resultierte trotz Vorhandensein von Galactose als Hauptbestandteil lediglich in der Detektion von Glucose (Daten nicht gezeigt). Durch Vergleich der Retentionszeiten zu entsprechenden Zucker-Resten in geeigneten Standards, wie Glycogen und Isomaltose, war es möglich, in dieser Analyse alle Derivate zuzuordnen. Somit wurden lediglich substituierte Glucose-Reste nachgewiesen. Die durch die Neutralzuckerbestimmung nachgewiesene Galactose als Hauptbestandteil dieser Fraktion lieferte keine Signale. Die mitgeführte Glycogen-Kontrolle ergab jedoch ein positives Ergebnis mit folgenden zu erwartenden Substanzen: 4-substituierte Glucopyranose, 4,6-di-substituierte Glucopyranose und terminale Glucose in dem Verhältnis 14:2:3. Im Vergleich zum Glycogen als Standard wurden bezüglich der Flächen unter den Kurven in der Summe nur rund 25% der Zucker detektiert (Daten nicht gezeigt). Diese Diskrepanz könnte durch eventuell vorhandene anorganische Substituenten erklärt werden. Derartig substituierte Polysaccharide sind nur unzureichend in DMSO, dem zur Methylierung eingesetzten Lösungsmittel (siehe 3.3.6), löslich und wären einer Derivatisierung somit nicht zugänglich. Sind Zucker beispielsweise durch Phosphat- oder Sulfatgruppen in einem gewissen Maße substituiert, ist deren Löslichkeit in DMSO drastisch herabgesetzt. Um zu klären, ob Substitutionen durch Phosphat- oder Sulfatgruppen vorliegen, wurde zunächst eine photometrische Mikroanalyse zur Phosphatbestimmung durchgeführt (siehe 3.3.8). Ein Nachweis von Phosphat war für diese Fraktion eindeutig negativ (Daten nicht gezeigt). Da kein Phosphat in der Fraktion nachgewiesen werden konnte, wurden von dieser Substanz neben Standards Infrarot-Spektren (siehe 3.3.9) aufgenommen, um möglicherweise durch Absorptionsbanden bei charakteristischen Wellenzahlen Hinweise auf Sulfatsubstitutionen zu erhalten. Als Positiv-Kontrolle diente Glucose-6-Sulfat, und als

Zucker-Standard ohne Sulfatierung wurde Galactose eingesetzt. Absorptionsbanden im Wellenzahl-Bereich um 1200 cm^{-1} (~ 1170 bis $\sim 1270\text{ cm}^{-1}$) sind charakteristisch für das Vorhandensein von Sulfat- und Phosphatgruppen. Das Vorhandensein von Phosphat in dieser Fraktion wurde bereits ausgeschlossen. Im Vergleich der analysierten Probe zu den Standards konnte eine schwache Absorption in dem beschriebenen Wellenzahl-Bereich gezeigt werden. Daher ergibt sich aufgrund der IR-Spektroskopie somit lediglich der Hinweis auf das Vorhandensein von Sulfatsubstitutionen in dieser Fraktion, ein zweifelsfreier Nachweis konnte mit dieser Methode jedoch nicht erbracht werden. Aufgrund der Hinweise auf Sulfatsubstitution durch die IR-Spektroskopie jedoch ausgeschlossenen Phosphat, wurden anhand dieser Fraktion verschiedene Methoden zur Desulfatierung (siehe 3.3.6.1) mit anschließender Methylierungsanalyse ausgetestet. Die Behandlung der Probe mit Diazomethan ergab dasselbe Ergebnis wie ohne diese Derivatisierung. Ebenso wurden durch die Inkubation in Dioxan lediglich Glucose-Reste und nicht die als Hauptbestandteil dieser Fraktion identifizierte Galactose nachgewiesen. Durch eine zuvor durchgeführte milde Methanolyse (siehe 3.3.6.1) hingegen zeigte sich nach der Methylierungsanalyse folgendes Ergebnis: Es wurden sechs verschieden substituierte Galactose-Reste, vier unterschiedliche Glucose-Reste sowie zwei Pentosen (Arabinose und Xylose) nachgewiesen. Durch Vergleich der Retentionszeiten zu den entsprechenden Zucker-Resten in den Standards Glycogen sowie Isomaltose war es möglich, in dieser Analyse Glucose- und Galactose-Reste zu identifizieren (Daten nicht gezeigt). Da die Methylierungsanalysen nach milder Methanolyse zur Desulfatierung erfolgreich waren, wurde versucht, durch analytische Anionenaustausch-Chromatographie (siehe 3.3.10) in dieser Fraktion Sulfatsubstitutionen nachzuweisen. Sulfat wurde bei Verwendung von hydrolysierten Standards (Glucose-6-Sulfat) nach einer Retentionszeit von 6,5 min detektiert. Analog dazu wurde die Probe einerseits hydrolysiert und zur Kontrolle nicht-hydrolysiert injiziert. In Abbildung 19 sind die Chromatogramme dargestellt.

Die hydrolysierte Probe zeigte ein für Sulfatgruppen charakteristische Signal zwischen 6,3 und 6,7 min. Bei der unhydrolysierten Probe hingegen zeigte sich kein Signal zwischen 6 und 7 min. Damit kann auch ausgeschlossen werden, dass das detektierte Sulfat freie Reste von Ammoniumsulfat darstellt, das zur Proteinpräzipitation eingesetzt wurde (siehe 3.2.4). Damit konnte für diese Fraktionen das Vorhandensein von kovalenter Sulfatsubstitutionen nachgewiesen werden. Gleiche Resultate konnten für die entsprechende Fraktion aus SmO gewonnen werden.

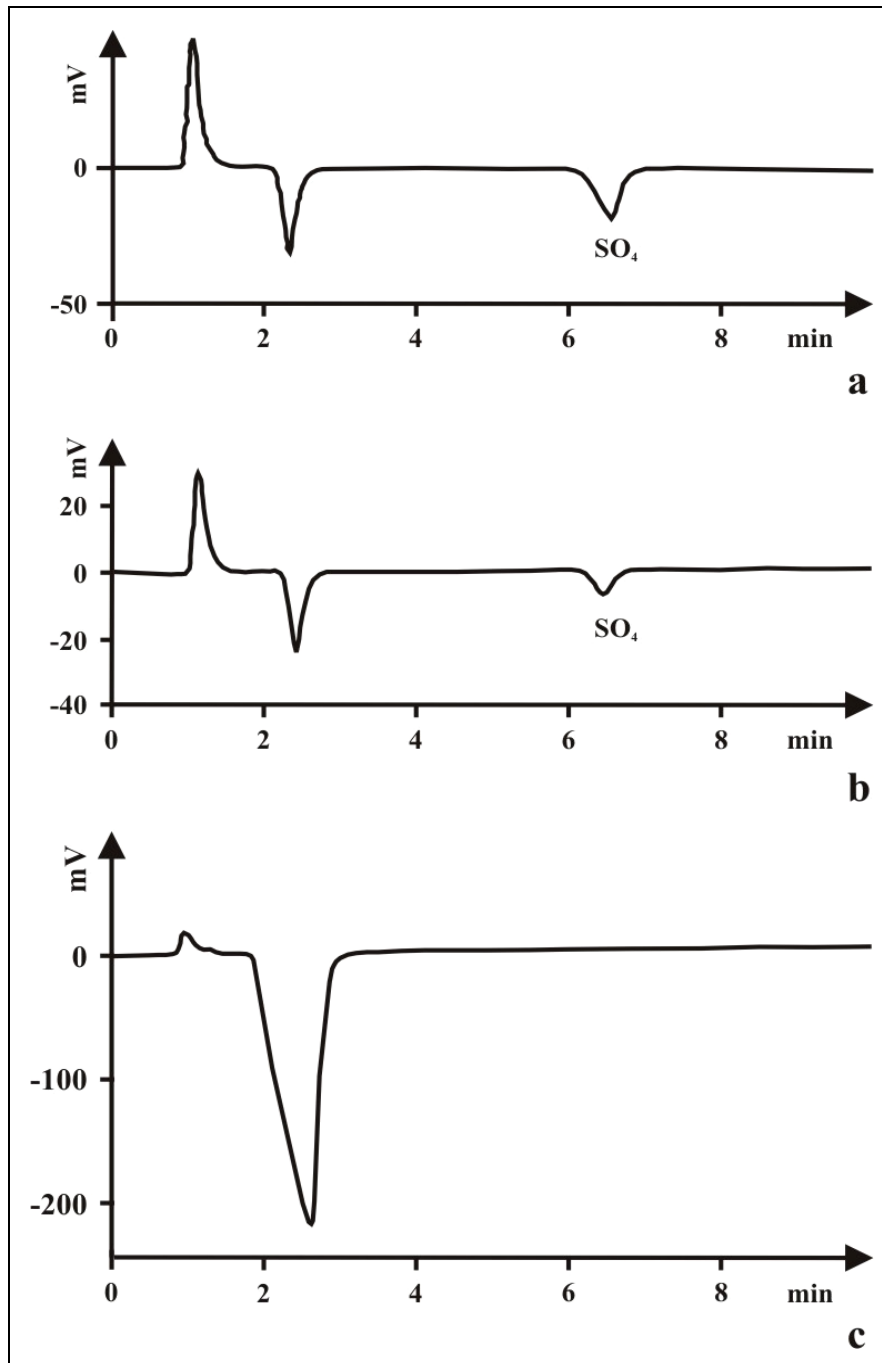


Abbildung 19: Sulfatnachweis mittels analytischer Anionenaustausch-Chromatographie der proteinfreien Fraktion nach Sephadex-G-50 aus SmT.

Die Trennungen wurden isokratisch auf einer analytischen Anionenaustausch-Säule GYNKOCHROM AX-5i (120 x 4,6 mm, GYNKOTEC) an einer ABIMED GILSON-HPLC-Anlage bei 20-22°C durchgeführt. Als Lösungsmittel diente 1,5 mM Natrium-Phthalat, pH 5,8 bei einer Flussrate von 1,5 ml min⁻¹. Die Detektion erfolgte durch UV-Absorption bei 280 nm. Zur Abspaltung der Sulfatreste wurden sowohl die Probe als auch der Standard zuvor mit 2 M HCl bei 100°C für 1 h. hydrolysiert. Die Injektionsvolumina betragen jeweils 5 bzw. 10 µl. **a:** 25 nM hydrolysiertes Glucose-6-Sulfat als externer Anionen-Standard. **b:** 10 µg der hydrolysierten Fraktion nach Sephadex-G-50 aus SmT. **c:** 10 µg der unhydrolysierten Fraktion nach Sephadex-G-50 aus SmT.

Aufgrund der nachgewiesenen Sulfatsubstitution der aufgereinigten Fraktionen aus SmT und SmO wurde getestet, ob sich die Fraktion im Ausschlussvolumen der Gel-permeations-Chromatographie ohne vorherige Aufreinigung von anderen Substanzen durch präparative Anionenaustausch-Chromatographie abtrennen lässt.

Die jeweils erste Fraktion aus der gelpermeations-chromatographischen Trennung durch Sephadex G-50 wurde durch präparative Anionenaustausch-Chromatographie (siehe 3.2.7.2) aufgetrennt. Dabei wurden jeweils drei proteinfreie (siehe 3.3.3) Signale bei 210 nm und z. T. auch bei 280 nm detektiert (Daten nicht gezeigt). In der ersten Fraktion wurden fünf verschiedene Zucker detektiert – zwei Pentosen und drei Hexosen. Die Hauptbestandteile sind Arabinose, Galactose und Mannose. Xylose und Glucose wurden in deutlich geringeren Konzentrationen nachgewiesen. Die zweite und dritte Fraktion weisen mit lediglich drei Zuckern eine ähnliche Zuckerzusammensetzung auf. Den größten Anteil macht jeweils Galactose aus. Als einzige Pentose wurde Xylose nachgewiesen. In ähnlichen Konzentrationen wurde in beiden Fraktionen Glucose nachgewiesen.

Die dritte Fraktion wurde aufgrund verminderter Löslichkeit in Wasser und DMSO auf das Vorhandensein von Sulfatsubstitutionen hin untersucht (siehe 3.3.11). Der Test ergab einen positiven Nachweis von Sulfat. Aufgrund der Zuckerzusammensetzung und des Ionennachweises ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um ein Galactansulfat handelt. Dieses wurde sowohl aus SmT als auch aus SmO isoliert.

Galactansulfate sind typischerweise Biosynthese-Produkte von Algen, die industriell für die Herstellung von Agar verwendet werden. Durch folgende Experimente konnte nachgewiesen werden, dass diese Polysaccharide aus dem zur Anzucht der Mykobakterien verwendeten Nährmedium stammen:

Die Bestimmung der absoluten Konfiguration (siehe 3.3.7) der Zucker zeigte sowohl das Vorhandensein von D- als auch von L-Galactose-Resten (Daten nicht gezeigt). L-Galactose kommt in bakteriellen Sacchariden nicht vor, ist jedoch Bestandteil von Agarose.

Vergleichende NMR-Experimente (siehe 3.3.13) dieses Galactansulfates mit Agarose sowie dem Agarose-haltigen Nährmedium, das zur Anzucht der Mykobakterien verwendet wurde, haben eindeutig gezeigt, dass es sich um dieselbe Substanz handelt. Alle Messungen lieferten folgende Signale: α -Galactose (^1H : δ 5,110/ ^{13}C : δ 99,09), β -Galactose (^1H : 4,549/ ^{13}C : 102,93) sowie drei verschiedene sulfatierte Zucker-Reste (^1H : 4,620/ ^{13}C : 77,87; ^1H : 4,525/ ^{13}C : 76,28; ^1H : 4,515/ ^{13}C : 80,73). Damit war

bewiesen, dass die Galactansulfate aus dem Nährmedium stammen. Daher wurden diese Präparationen (siehe 1, Abbildung 18) nicht weiter untersucht. Die Fraktionen 2 nach Gelpermations-Chromatographie (siehe 2, Abbildung 18) wurden analysiert und weiter aufgereinigt.

4.4 Isolierung und Untersuchungen zur Struktur von Arabinomannanen

Für Fraktion 2 aus der gelpermeations-chromatographischen Trennung aus SmT sowie aus SmO (siehe Abbildung 18) wurde die Zuckerszusammensetzung durch eine Neutralzuckeranalyse (siehe 3.3.4) bestimmt. In beiden Fraktionen wurden dieselben Zucker, jedoch in unterschiedlichen Anteilen detektiert (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht über die Zuckerszusammensetzung der Fraktionen 2 (siehe Abbildung 18) nach Sephadex-G-50 aus SmO und SmT.

Zucker	SmO	SmT
	nmol mg ⁻¹	
Arabinose	1255	1602
6-O-Me-Hexose	607	588
3-O-Me-Hexose	217	554
Mannose	1009	1124
Glucose	444	489

Es wurden jeweils nur eine Pentose und vier Hexosen nachgewiesen. In beiden Substanzen stellten Arabinose und Mannose die größten Anteile dar. In der Fraktion aus SmO ist das Verhältnis von Arabinose zu Mannose wie etwa 5:4. In der entsprechenden Fraktion aus SmT ist dieses Verhältnis annähernd 10:7. Auffällig war der Nachweis von zwei Methyl-Hexosen, nämlich einer 6-O-methylierten und 3-O-methylierten Hexose. In ähnlichen Konzentrationen wurde Glucose in beiden Substanzen nachgewiesen. In der Summe wurden mit rund 3500 nmol mg⁻¹ (SmO) und 3400 nmol mg⁻¹ (SmT) ähnliche Gesamt-Konzentrationen an Neutralzuckern nachgewiesen. Dieser Zucker-Gehalt beider Substanzen spricht für das Vorhandensein von Polysacchariden. Die

großen Mengen an Arabinose und Mannose geben Hinweise darauf, dass es bei den Fraktionen um Gemische handelt, die Arabinomannane beinhalten.

Beide Fraktionen zeigten in einem SDS-Gel keine Migration und waren daher in einer anschließenden Färbung durch kohlenhydratspezifische Perjodatspaltung sowie in einem Westernblot mit ConA negativ (Daten nicht gezeigt).

Eindimensionale NMR-Experimente der isolierten Polysaccharide deuten auf strukturelle Ähnlichkeiten zwischen SmO (siehe Abbildung 20) und SmT (siehe Abbildung 21) hin. Die Protonenspektren zeigen jeweils in der Region der anomeren Protonen (4,2 ppm bis 5,7 ppm) mindestens zehn Signale (siehe unten).

Die Spektren zeigen im Anomeren-Bereich Signale zwischen 4,919 ppm und 5,245 ppm. Diese liegen teilweise überlappend vor, so dass keine Aussage über die Anzahl der Zucker-Reste gemacht werden kann. Unter Berücksichtigung der Neutralzuckerbestimmungen (siehe 4.4.2.1) deuten die chemischen Verschiebungen darauf hin, dass es sich ausschließlich um Zucker in α -Konfiguration handelt.

Signale bei 0,9 ppm und 1,3 ppm geben Hinweise auf das Vorhandensein von Fettsäuren. Bei 3,6 ppm weisen Signale auf das Vorhandensein von *O*-Methyl-Gruppen hin, wie sie gaschromatographisch als Substitutionen von methylierten Hexosen nachgewiesen wurden (siehe 4.4.2.1).

Aufgrund der Ergebnisse der Gelpermeations-Chromatographie (siehe Abbildung 18) können zunächst die Molekularmassen für diese Substanzen auf maximal ca. 7000 Da geschätzt werden. Massen von mindestens 3500 Da sollten jedoch wegen der verwendeten Molekulargrenzen während der Dialysen (siehe 3.2.2) zu erwarten sein.

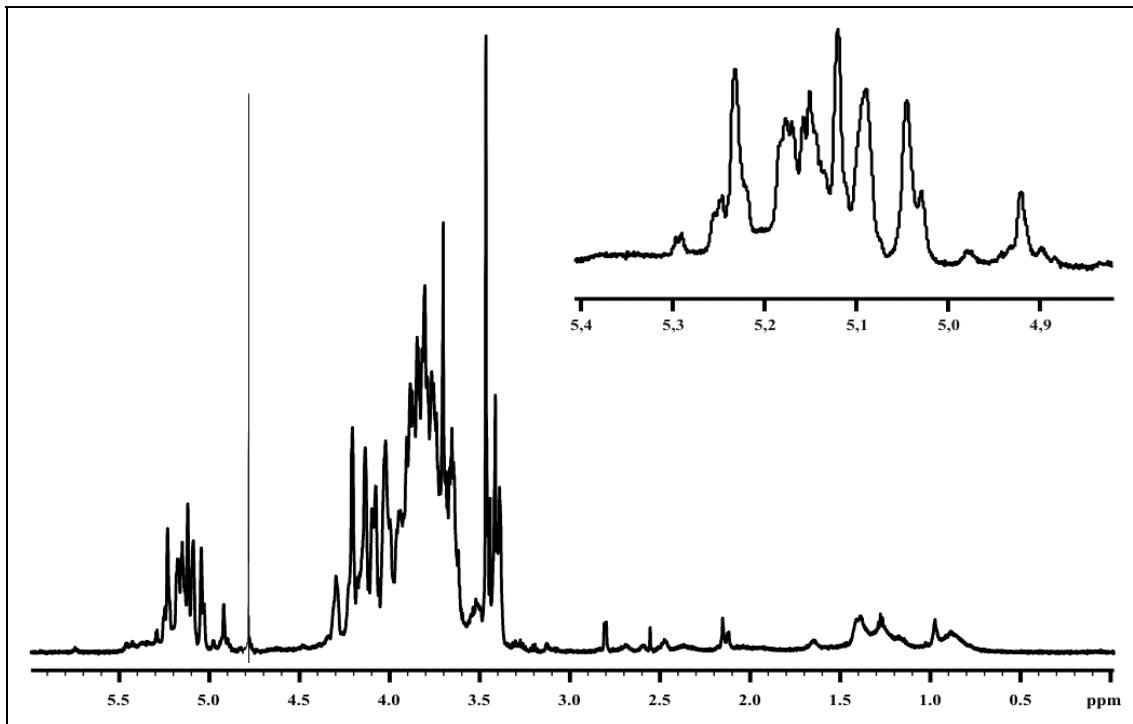


Abbildung 20: ^1H -NMR-Spektrum der Fraktion 2 nach Sephadex-G-50 aus SmT mit Ausschnittsvergrößerung der Anomeren-Region.

Die Messung erfolgte bei einer Frequenz von 600 MHz und einer Temperatur von 27°C in D_2O .

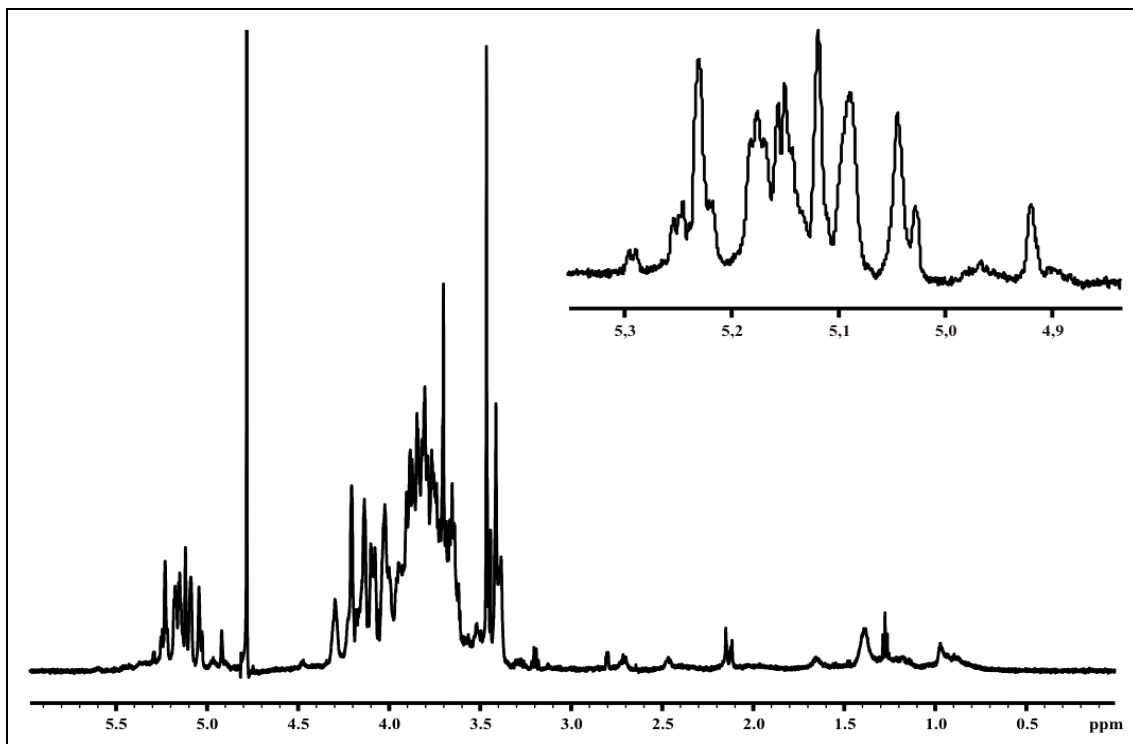


Abbildung 21: ^1H -NMR-Spektrum der Fraktion 2 nach Sephadex-G-50 aus SmO mit Ausschnittsvergrößerung der Anomeren-Region.

Die Messung erfolgte bei einer Frequenz von 600 MHz und einer Temperatur von 27°C in D_2O .

4.4.1 Isolierung der Arabinomannane durch Affinitäts-Chromatographie

Die ersten chemischen Analysen (siehe 4.4) deuten darauf hin, dass es sich bei den isolierten Substanzen um Gemische handelt, die hauptsächlich Arabinomannane beinhalten. Mykobakterielle Arabinomannane sollen dem Glycan-Anteil des Lipoarabinomannans strukturell sehr ähnlich sein und sollten weisen somit zum Teil terminale Mannose-Reste aufweisen (siehe 1.2.1.3). Mit Hilfe des Lektins ConcanavalinA ist es möglich, solche endständigen Mannosen spezifisch zu binden. Diese Eigenschaft wurde bereits genutzt, um in Western-Blots Lipoglycane nachzuweisen (siehe Abbildung 16). Dasselbe Prinzip wurde auf eine präparative Affinitäts-Chromatographie übertragen, um auf diese Weise durch ConA-gekoppelte Sepharose spezifisch terminal mannosylierte Arabinomannane aus dem Substanzgemisch zu isolieren (siehe 3.2.7.3). Eine Übersicht über die Aufreinigung der Arabinomannane gibt Abbildung 22.

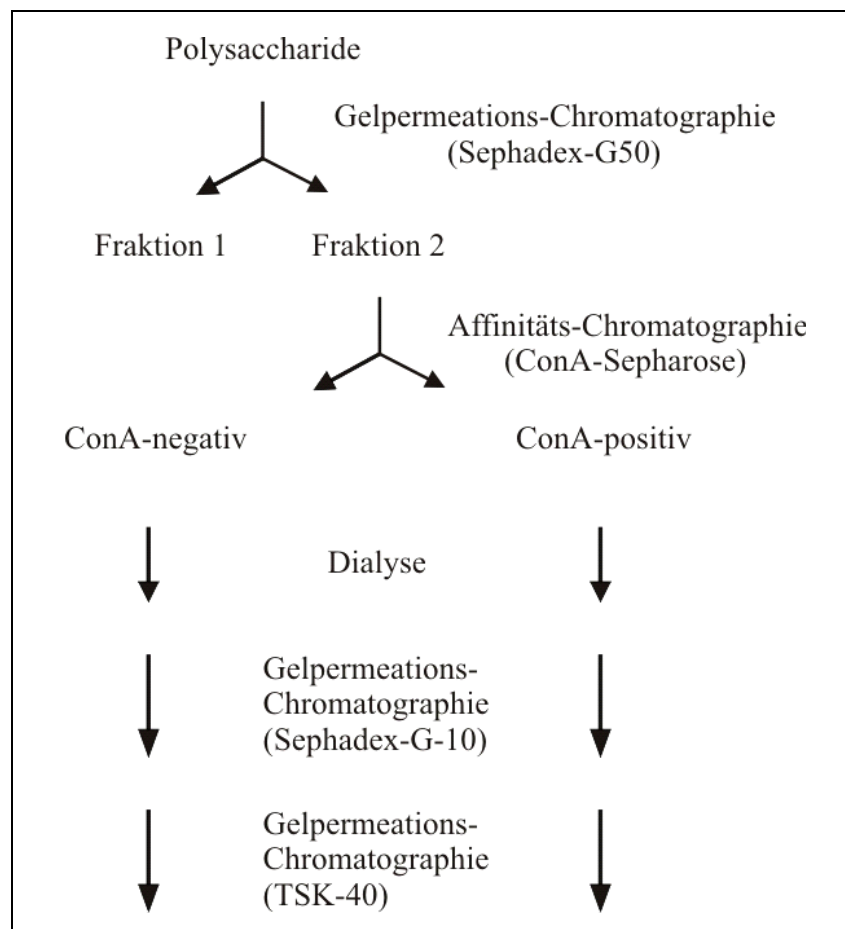


Abbildung 22: Übersicht über die Aufreinigung der Polysaccharide (siehe 2, Abbildung 18) aus SmO und SmT.

Die Fraktionen 2 nach Sephadex-G-50 (siehe Abbildung 18) aus SmO und SmT konnten so durch Affinitäts-Chromatographie aufgetrennt werden (siehe Abbildung 23, I und II). Auf dieselbe Weise wurden zwei weitere entsprechende Fraktionen jeweils aus SmO und SmT, die nach einer erneuten Anzucht gewonnen wurden, aufgetrennt (siehe Abbildung 23, III und IV).

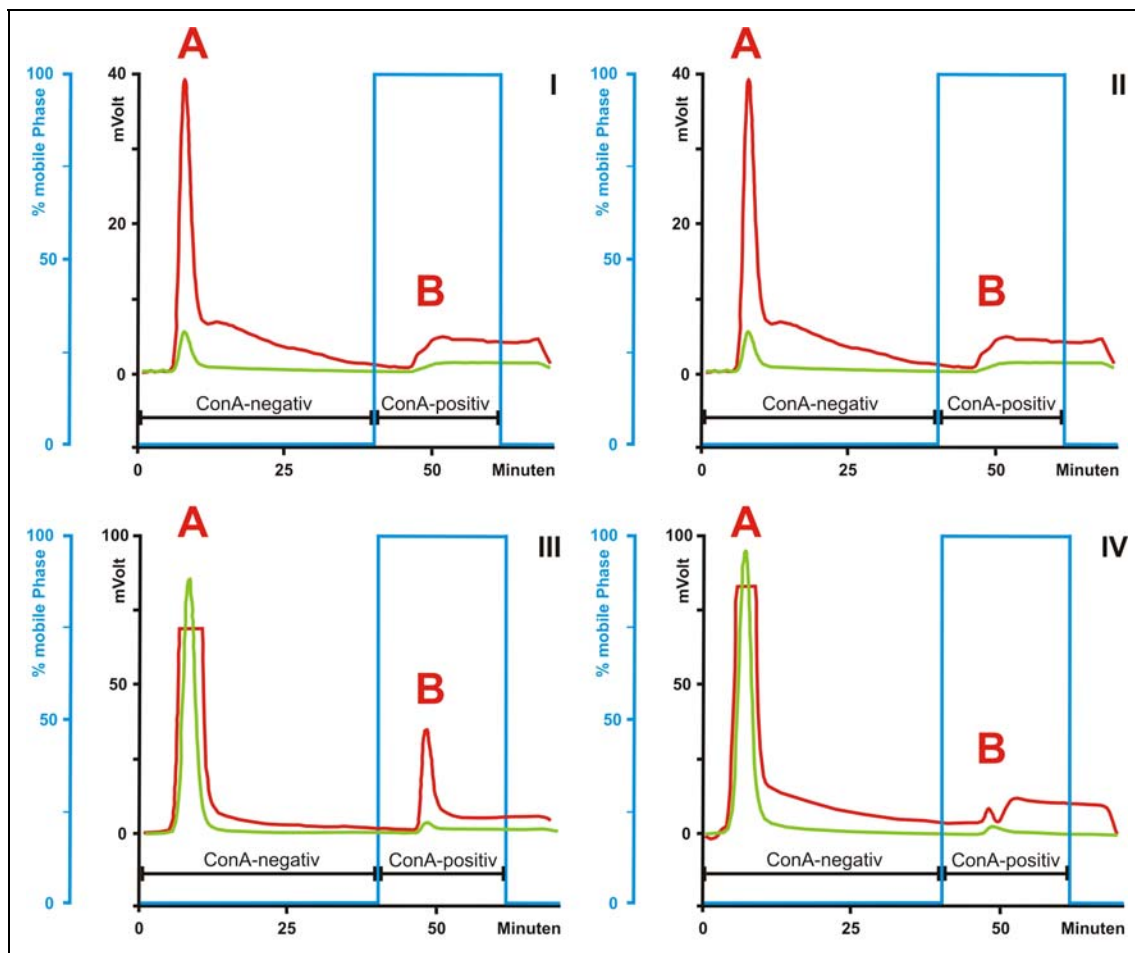


Abbildung 23: Übersicht über die Trennungen von Fraktion 2 nach Sephadex-G-50 aus SmO (I, III) sowie aus SmT (II, IV) mittels Affinitäts-Chromatographie.

Die Trennungen wurden unter Verwendung einer Lektin-Sepharose-Säule (ConA-Sepharose 4B, 5 x 1 cm) an einer HPLC-Anlage bei 20-22°C durchgeführt. Lösungsmittel A: 0,1 M Natriumacetat, 0,1 M Natriumchlorid, 1 mM Magnesiumchlorid, 1 mM Manganchlorid, 1 mM Calciumchlorid, pH 6,1. Lösungsmittel B: Lösungsmittel A + 1 M Methylmannopyranosid. Bei einer Flussrate von 0,8 ml min⁻¹ wurde folgender dreistufiger Gradient angelegt: für 40 min 100% A, für 20 min 100% B, für 60 min 100% A. Detektiert wurde die UV-Absorption bei 210 nm (-) und 280 nm (-). Das Eluat wurde in den ersten 60 min fraktioniert und mit einem Volumen von 0,8 ml Fraktion⁻¹ gesammelt.

Es wurden jeweils zwei Signale sowohl bei 210 nm als auch bei 280 nm in unterschiedlichen Intensitäten detektiert. Fraktion A wurde nach dem ersten Säulenvolumen

detektiert und entspricht daher ungebundener Substanz ohne (oder mit nicht ausreichender) endständiger Mannosylierung. Fraktion B wurde von dem Säulenmaterial gebunden und erst bei Regeneration durch 1 M Methylmannosid eluiert. Dieses Signal entspricht daher Substanz, die ein gewisses Maß an terminalen Mannose-Resten aufweist, und aufgrund der großen Mengen an Arabinose und Mannose (siehe 4.4) damit wahrscheinlich ein Arabinomannan darstellt.

In allen Trennungen zeigten die Substanzen der Fraktionen A und B ein deutlich unterschiedliches Absorptionsverhalten bei den gemessenen Wellenlängen. Das Verhältnis der Peakflächen von A zu B lag in allen Trennungen bei rund 40 zu 1. Da jedoch die UV-Absorption keine Messgröße für Substanzmenge ist, können anhand der Chromatogramme zunächst keine Abschätzungen über die Ausbeuten getroffen werden.

Direkt nach der Trennung wurden jeweils die zu einem Signal gehörigen Elutionsvolumina vereinigt und dialysiert (MWCO 3500 Da), um sowohl die Salze, die zur Aktivität des Lektins notwendig waren, als auch das Methylmannosid, das zur Elution verwendet wurde, zu eliminieren. Die Retentate wurden zur Überprüfung vollständiger Entsalzung zusätzlich über Sephadex-G-10 (siehe 3.2.6) gegeben und anschließend durch eindimensionale NMR-Spektroskopie (3.3.13) untersucht. Es wurden im Ausschlussvolumen des Trennmaterials zum Teil angetrennte Substanzen erhalten. Diese Saccharid-haltigen Fraktionen (3.2.6) in den Ausschlussvolumina wurden durch NMR-Spektroskopie untersucht. Protonenspektren zeigten, dass sowohl die Substanzen der Fraktion A als auch die aus B Oligo- bzw. Polysaccharide darstellten. In dem Bereich der anomeren Protonen wurden zahlreiche Signale mit chemischer Verschiebung erhalten, die typisch für Zucker von α -Konfiguration sind. Ein Signal bei 1,3 ppm stellte eine Kontamination dar und machte eine weitere Aufreinigung erforderlich. Dazu wurden die Proben über eine erneute Gelpermeations-Chromatographie mittels TSK-40 (siehe 3.2.6) aufgetrennt. Die erneute Chromatographie führte in den entsprechenden Ausschlussvolumina zu homogenen Signalen. Auf diese Weise konnten die Polysaccharide der Fraktionen A und B jeweils aus SmT und SmO in reiner Form erhalten werden (siehe Abbildung 22). Anschließend wurden diese zur Bestimmung der Substanzmenge lyophilisiert und zu Strukturanalysen herangezogen. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die erhaltenen Substanzmengen.

Tabelle 3: Übersicht über die gewonnenen Substanzmengen nach Affinitäts-Chromatographie und Gelpermeations-Chromatographie.

	Fraktion A	Fraktion B
SmO	3,02 mg	1,10 mg
SmT	1,20 mg	1,19 mg

4.4.2 Strukturanalysen der Arabinomannane

4.4.2.1 Ergebnisse der Neutralzuckerbestimmung

Von je 100 µg der Substanzen, die aus den Fraktionen A und B der Affinitäts-Chromatographie erhalten wurden, wurde eine Neutralzuckerbestimmung (siehe 3.3.4) durchgeführt.

Abbildung 24 gibt eine Übersicht über die Zuckerzusammensetzungen der Fraktion A im Vergleich zwischen SmO und SmT.

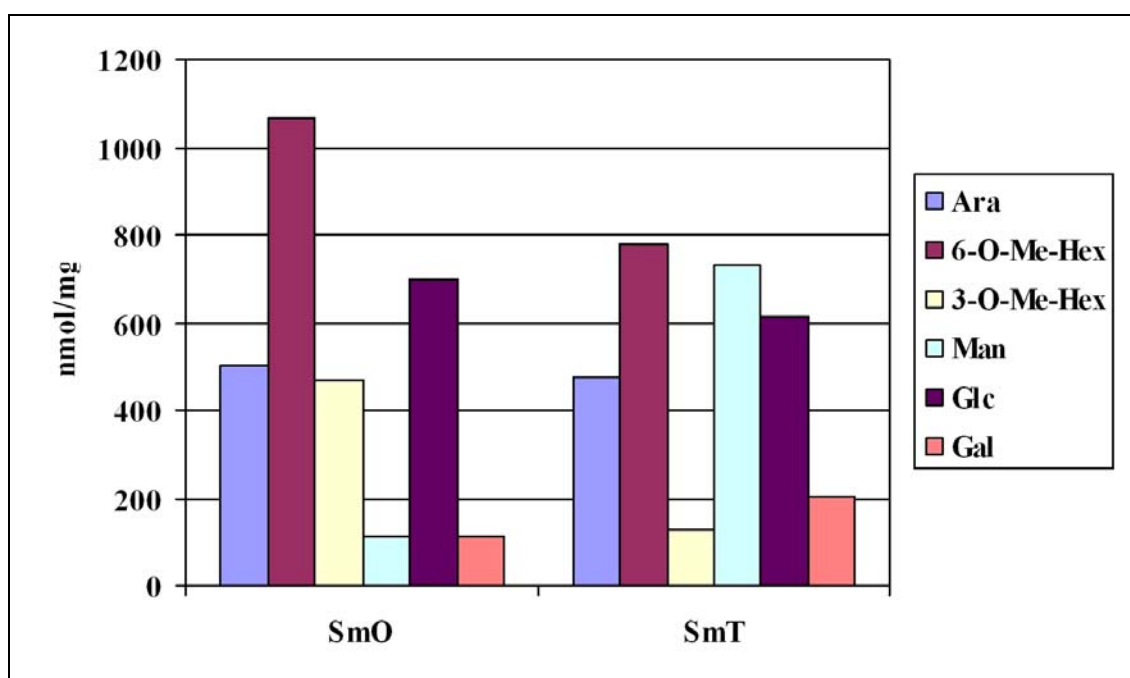


Abbildung 24: Zuckerzusammensetzung der Fraktion A-Polysacchariden nach Affinitäts-Chromatographie im Vergleich zwischen SmO und SmT.

Zur Hydrolyse (2 M Trifluoressigsäure, 120°C, 2 h) wurden 100 µg der Polysaccharide eingesetzt. Die Zucker wurden reduziert und peracetyliert. Die Alditolacetate wurden gaschromatographisch getrennt und quantifiziert.

In beiden Substanzen wurden dieselben Zucker in zum Teil unterschiedlichen Verhältnissen nachgewiesen. Als einzige Pentose kommt in beiden Proben in ähnlichen Konzentrationen (SmO: 502 nmol mg⁻¹, SmT: 477 nmol mg⁻¹) Arabinose vor. Hauptbestandteil beider Substanzen ist eine 6-*O*-Methyl-Hexose mit 1069 nmol mg⁻¹ in SmO und 779 nmol mg⁻¹ in SmT. Ein deutlicher Unterschied ist in dem Vorkommen einer 3-*O*-methylierten Hexose mit 467 nmol mg⁻¹ in SmO und 126 nmol mg⁻¹ in SmT sowie von Mannose mit 113 nmol mg⁻¹ in SmO und 732 nmol mg⁻¹ in SmT zu erkennen. Als weitere Hexosen kommen Glucose (697 nmol mg⁻¹ in SmO, 616 nmol mg⁻¹ in SmT) und Galactose (113 nmol mg⁻¹ in SmO, 204 nmol mg⁻¹ in SmT) in beiden Proben vor.

Abbildung 25 gibt eine Übersicht über die Zuckerzusammensetzungen der Fraktionen B im Vergleich zwischen SmO und SmT.

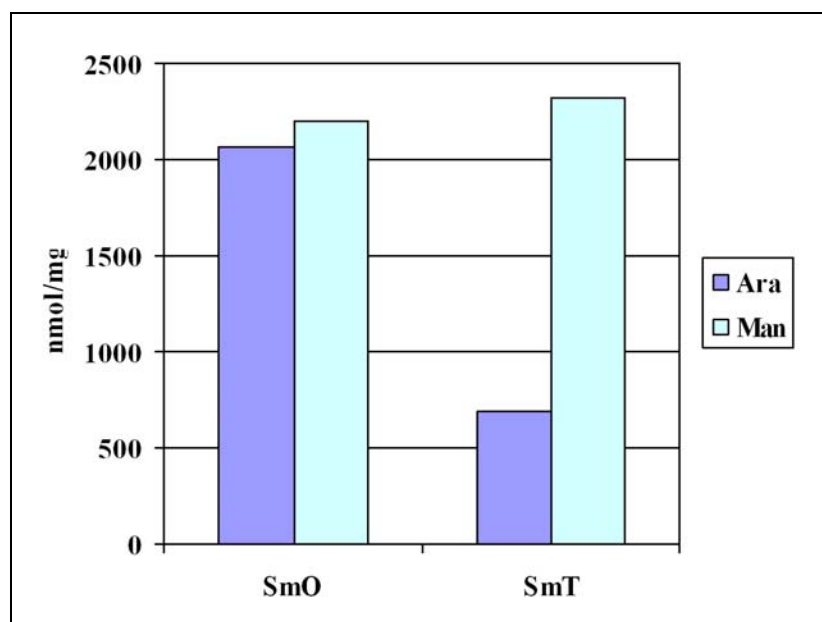


Abbildung 25: Zuckerzusammensetzung der Fraktion B-Polysacchariden nach Affinitäts-Chromatographie im Vergleich zwischen SmO und SmT.

Zur Hydrolyse (2 M Trifluoressigsäure, 120°C, 2 h) wurden 100 µg der Polysaccharide eingesetzt. Die Zucker wurden reduziert und peracetyliert. Die Alditolacetate wurden gaschromatographisch getrennt und quantifiziert.

Beide Polysaccharide bestehen ausschließlich aus Arabinose und Mannose und stellen damit reine Arabinomannane dar. Ein deutlicher Unterschied liegt in den Verhältnissen von Pentose zu Hexose. Das Arabinomannan aus SmO weist mit 2070 nmol mg⁻¹ Arabinose und 2201 nmol mg⁻¹ Mannose ein Verhältnis von Pentose zu Hexose von

rund 1:1 auf. Im Gegensatz dazu zeigt das entsprechende Arabinomannan aus SmT ein Verhältnis von Pentose (692 nmol mg^{-1} Arabinose) zu Hexose ($2319 \text{ nmol mg}^{-1}$ Mannose) wie ca. 3:10.

4.4.2.2 Ergebnisse der Methylierungsanalysen

4.4.2.2.1 Methylierungsanalysen der Fraktion A-Polysaccharide

4.4.2.2.1.1 Methylierung mit Methyljodid

Zur Bestimmung der Zuckersequenzen wurden von jeweils $100 \mu\text{g}$ der Fraktion A-Polysaccharide Methylierungsanalysen (siehe 3.3.6) durchgeführt. Die nach Methylierung, Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung entstandenen Alditolderivate wurden gas-chromatographisch aufgetrennt und massenspektrometrisch identifiziert (Chromatogramme und Massenspektren nicht gezeigt).

Tabelle 4 gibt eine vergleichende Übersicht über die identifizierten partiell methylierten Alditolacetate und die entsprechend substituierten Zuckerreste der Fraktion A-Polysaccharide aus SmT und SmO. Da durch die Neutralzuckerbestimmungen für diese Substanzen u. a. mit Mannose, Glucose und Galactose drei verschiedene Hexosen als Zucker-Bestandteile nachgewiesen wurden (siehe Abbildung 24), ist eine Zuordnung der Hexosen allein aufgrund der Retentionszeiten ohne Vergleich zu Standards nicht möglich. Aus beiden Substanzen wurden jeweils zwei terminale, zwei 1,4-gebundene, eine 1,3-gebundene, eine 1,6-gebundene sowie eine 1,3,4-substituierte Hexose erhalten. Möglicherweise aufgrund von Untermethylierungen wurden in SmO zwei 1,4,6- und in SmT eine 1,2,6-gebundene Hexose nachgewiesen (siehe unten). Da jedoch mit Arabinose nur *eine* Pentose nachgewiesen wurde, konnten alle Pentitole als Arabinose-Reste identifiziert werden. Diese wurden in der Fraktion aus SmT mit fünf und in der entsprechenden aus SmO mit vier verschiedenen Substitutionsmustern nachgewiesen. Generell kann aufgrund von GLC-MS-Analysen bei Zuckern nicht zwischen furanosidischer und pyranosidischer Ringform unterschieden werden, sofern ein methyliertes Alditolacetat vorliegt, das sowohl in Position 4 als auch in Position 5 acetyliert ist. Durch zusätzliche NMR-Untersuchungen können jedoch Pyranosen von Furanosen unterschieden werden. Dadurch konnte für alle Arabinose-Reste die furanosidische Ringform festgestellt werden (siehe 4.4.2.4).

Tabelle 4: Übersicht über die identifizierten partiell methylierten Alditolacetate nach Methylierungsanalyse der Fraktion A-Polysaccharide aus SmT und SmO.

Die Identifizierung der Pentosen als Arabinose-Reste ergibt sich aufgrund der Ergebnisse der Neutralzuckerbestimmung. Die Derivate sind nicht nach ihren Retentionszeiten geordnet. Die Quantifizierung erfolgte ohne Berücksichtigung von Response-Faktoren.

Komponente	methylierte Alditolacetate	Zuckerrest	SmT [mol%]	SmO [mol%]
1	1,4-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,5-tri- <i>O</i> -methyl-[² H]-pentitol	terminale Arabinofuranose	5,6	3,9
2	1,2,4-Tri- <i>O</i> -acetyl-3,5-di- <i>O</i> -methyl-[² H]-pentitol	2-subst. Arabinofuranose	3,9	2,7
3	1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3-di- <i>O</i> -methyl-[² H]-pentitol	5-subst. Arabinofuranose (4-subst. Arabinopyranose) ³	6,1	7,4
4	1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3-di- <i>O</i> -methyl-[² H]-pentitol	5-subst. Pentofuranose (4-subst. Pentopyranose) ³	2	-----
5	1,3,4,5-Tetra- <i>O</i> -acetyl-2- <i>O</i> -methyl-[² H]-pentitol	3,5-disubst. Arabinofuranose (3,4-disubst. Arabinopyranose) ³	9	8,9
6	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-[² H]-hexitol	terminale Hexopyranose	5	10,9 ⁴
7	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-[² H]-hexitol	terminale Hexopyranose	4,8	
8	1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -methyl-[² H]-hexitol	4-subst. Hexopyranose (5-subst. Hexofuranose) ⁵	8,6	20
9	1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3,6-tri- <i>O</i> -methyl-[² H]-hexitol	4-subst. Hexopyranose (5-subst. Hexofuranose) ⁵	27	30,9
10	1,3,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,4,6-tri- <i>O</i> -methyl-[² H]-hexitol	3-subst. Hexopyranose	6,7	2,1
11	1,5,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-[² H]-hexitol	6-subst. Hexopyranose	11,8	3,9
12	1,3,4,5-Tetra- <i>O</i> -acetyl-2,6-di- <i>O</i> -methyl-[² H]-hexitol	3,4-disubst. Hexopyranose/ (3,5-disubst. Hexofuranose) ⁵	4,8	6,5
13	1,4,5,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-2,3-di- <i>O</i> -methyl-[² H]-hexitol	4,6-disubst. Hexopyranose/ (5,6-disubst. Hexofuranose) ⁵	-----	1,1

³ Aufgrund der Ergebnisse der NMR-Spektroskopie können Arabinose-Reste in pyranosidischer Ringform ausgeschlossen werden.

⁴ Durch unvollständige Trennung war die Integration der einzelnen terminalen Hexopyranosen nicht möglich.

⁵ Aufgrund der Ergebnisse der NMR-Spektroskopie können Mannose-Reste in furanosidischer Ringform ausgeschlossen werden.

14	1,4,5,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-2,3-di- <i>O</i> -methyl-[² H]-hexitol	4,6-disubst. Hexopyranose/ (5,6-disubst.Hexofuranose) ⁵	-----	1,6
15	1,2,5,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-3,6-di- <i>O</i> -methyl-[² H]-hexitol	2,6-disubst.Hexopyranose	4,6	-----

Die EI-MS-Analyse ergab für Komponente **1** (Tabelle 4) aus der Spaltung zwischen C2/C3 die Primärfragmente mit m/z 118 (reduzierendes Ende) und m/z 161 (nicht-reduzierendes Ende), welches in Sekundärionen mit m/z 129 (161-32) durch Methanol-Abspaltung und in m/z 101 (161-60) durch Essigsäure-Abspaltung zerfiel. Die Fragmentierung zwischen C3/C4 ergab ein Primärfragment mit m/z 162 und ein Sekundärion mit m/z 102 (162-60). Das Acetylierungsmuster ist damit für C1 bis C3 festgelegt. Ein Ion mit m/z 90 geht aus dem Primärfragment mit m/z 234 (C4/C5, reduzierendes Ende) durch sequentielle Abspaltung von Essigsäure und Keten (234-60-42-42) hervor. Aufgrund dieses Fragmentierungsmusters ist diese Komponente als ein 1-Deutero-1,4-di-*O*-acetyl-2,3,5-tri-*O*-methyl-pentitol identifiziert und entspricht damit einer terminalen Arabinofuranose.

Die EI-MS-Analyse von Komponente **2** (Tabelle 4) ergab durch Spaltung zwischen C2/C3 am nicht-reduzierenden Ende ein Primärfragment mit m/z 161, das in Sekundärionen mit m/z 101 (161-60) und m/z 129 (161-32) zerfiel (siehe oben). Durch Spaltung zwischen C3/C4 entstand ein Fragment mit m/z 190, das seinerseits durch Essigsäure-Abspaltung ein Sekundärion mit m/z 130 (190-60) erzeugte. Sekundärfragmente mit m/z 160 und m/z 100 gehen von m/z 262 aus, das durch Spaltung von C4/C5 am reduzierenden Ende entsteht. Daher wurde dieses Derivat als 1-Deutero-1,2,4-tri-*O*-acetyl-3,5-di-*O*-methyl-pentitol und somit als 2-substituierte Arabinofuranose identifiziert.

Das EI-Spektrum von **3** (Tabelle 4) weist Primärfragmente am reduzierenden Ende mit m/z 118 durch Spaltung zwischen C2/C3 und mit m/z 162 durch Spaltung zwischen C3/C4 auf. Die C2/C3-Spaltung erzeugte am nicht-reduzierenden Ende ein Fragment mit m/z 189. Jeweils durch Abspaltung von Essigsäure aus m/z 162 (162-60) und m/z 189 (189-60) entstanden die Sekundärionen mit m/z 102 sowie mit m/z 129 (Daten nicht gezeigt). Diese Fragmentierung identifizierte diesen Zucker als 1-Deutero-1,4,5-tri-*O*-acetyl-2,3-di-*O*-methyl-pentitol und damit als 5-substituierte Arabinofuranose.

Komponente **4** (Tabelle 4) zeigt in der EI-MS-Analyse Fragmente mit m/z 85, m/z 102, m/z 118, m/z 129 (189-60), m/z 59 (233-42-32) und m/z 162. Ein Sekundärfragment mit m/z 85 geht aus m/z 145 hervor (145-60) und legt Acetylierungen für C5 und C6 fest.

Am reduzierenden Ende zeigen Primärfragmente mit m/z 118 (C2/C3) und m/z 162 (C3/C4), sowie dem daraus erzeugten Ion mit m/z 102 (162-60), Methylierungen an C2 und C3. Es handelt sich daher wie bei Komponente **3** um ein 1-Deutero-1,4,5-tri-*O*-acetyl-2,3-di-*O*-methyl-pentitol, das als 5-substituierte Arabinofuranose vorliegt.

Komponente **5** (Tabelle 4) wurde durch Primärfragmente m/z 118 (C2/C3, red. Ende), m/z 261 (C1/C2, nicht-red. Ende) und folgende Sekundärfragmente identifiziert: m/z 85 (C3/C4, nicht-reduzierendes Ende: 145-60) sowie m/z 115 (C2/C3, nicht-reduzierendes Ende: 217-60-60,). Komponente **5** stellt damit ein 1-Deutero-1,3,4,5-tetra-*O*-acetyl-2-*O*-methyl-pentitol dar und ist eine 3,5-disubstituierte Arabinofuranose.

Die Komponenten **6** und **7** (Tabelle 4) zeigen identische EI-MS-Spektren. Aus der Spaltung zwischen C2/C3 bzw. C3/C4 resultieren Primärfragmente mit m/z 118 und m/z 162 (am reduzierenden Ende) und mit m/z 205 und m/z 161 (am nicht-reduzierenden Ende). Durch Abspaltung von Essigsäure ergaben sich folgende Sekundärionen: m/z 101 (161-60), m/z 102 (162-60) sowie m/z 145 (205-60). Durch Methanol-Abspaltung entstand m/z 129 (161-32). Zur Identifizierung dieser 1-Deutero-1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-hexitole führte ein Sekundärion mit m/z 174, welches aus m/z 206 (C4/C5 nicht-reduzierendes Ende) entstand. Damit liegen zwei verschiedene terminale Hexose-Reste vor.

Die Komponenten **8** und **9** (Tabelle 4) weisen ebenfalls identische Fragmentierungsmuster auf. Ionen mit m/z 118, m/z 162, m/z 189, m/z 233 und m/z 277 können durch Spaltungen zwischen C1/C2, C2/C3 bzw. C3/C4 erklärt werden (siehe oben). Aus einem Primärfragment mit m/z 233 entstand durch Essigsäure-Abspaltung ein Sekundärion mit m/z 173 (233-60). Durch weiteren Verlust von Essigsäure ergab sich m/z 113 (173-60) sowie durch Keten-Abspaltung ein Fragment mit m/z 131 (173-42) und weiterhin m/z 99 durch Abgang von Methanol (131-32). Aus einem Primärfragment mit m/z 189 entstand ein Sekundärion mit m/z 129 (189-60). Beide Komponenten stellen daher 1-Deutero-1,4,5-tri-*O*-acetyl-2,3,6-tri-*O*-methyl-hexitole dar und gehen aus 4-substituierten Hexopyranosen hervor.

Das EI-MS-Spektrum der Komponente **10** (Tabelle 4) zeigt folgende Primärfragmente: m/z 118 (Spaltung C2/C3, red. Ende), m/z 161 (C3/C4, nicht-reduzierendes Ende), m/z 234 (C4/C5, reduzierendes Ende) und m/z 277 (C1/C2, nicht-reduzierendes Ende). Die entstandenen Sekundärfragmente können durch Essigsäure- und Methanol-Abspaltung erklärt werden [m/z 101 (161-60), m/z 129 (161-32), m/z 174 (234-60), m/z 202 (234-32), m/z 217 (277-60)], sind jedoch für die Identifizierung dieses

1-Deutero-1,3,5-tri-*O*-acetyl-2,4,6-tri-*O*-methyl-hexitols nicht erforderlich. Damit handelt es sich um eine 3-substituierte Hexopyranose.

Das EI-MS-Spektrum der Komponente **11** (Tabelle 4) zeigt Primärfragmente mit m/z 118, m/z 162, m/z 189 und m/z 233, die wie in den Komponenten **8** und **9** erklärt werden können (siehe oben). Zusätzlich identifiziert ein Fragment mit m/z 145 am nicht-reduzierenden Ende Acetylgruppen an C5 und C6. Es liegt somit ein 1-Deutero-1,5,6-tri-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methyl-hexitol vor, was einer 6-substituierten Hexopyranose entspricht.

Die Komponente **12** (Tabelle 4) wurde durch Primärfragmente mit m/z 118, m/z 261 (siehe oben) und m/z 305 (C1/C2, nicht-reduzierendes Ende) sowie durch Sekundärfragmente mit m/z 129 (189-60), m/z 160 (262-60-42) und m/z 232 (274-60-42) als Tetra-*O*-acetyl-hexitol identifiziert. Die Stellung der Acetylgruppe an C5 kann aufgrund fehlender Fragmentationen direkt nicht gezeigt werden. Würde jedoch O6 acetyliert sein, so würde das Gesamtmolekül eine Symmetrie erhalten, die eine ebenso starke Fragmentierung am nicht-reduzierenden wie am reduzierenden Ende hervorrufen würde. Zu erwarten wären dann u. a. Primärfragmente mit m/z 117 und m/z 306. Da dies nicht der Fall ist, handelt sich bei dieser Komponente um ein 1-Deutero-1,3,4,5-tetra-*O*-acetyl-2,6-di-*O*-methyl-hexitol als 3,4-disubstituierte Hexopyranose.

Die Fragmentierungsmuster der Komponenten **13** und **14** (siehe Tabelle 4) sind identisch und zeigen Primärfragmente mit m/z 118, m/z 162 und m/z 261 (siehe oben). Lediglich durch diese Hauptfragmente war es möglich, diese Derivate als 1-Deutero-1,4,5,6-tetra-*O*-acetyl-2,3-di-*O*-methyl-hexitole zu bestimmen. Zusätzliche Sekundärionen mit m/z 85 (siehe oben) und m/z 142 (C4/C5, nicht-reduzierendes Ende: 234-60-32) bestätigen die Acetylierungsmuster.

Komponente **15** (Tabelle 4) zeigt ausschließlich die Primärfragmente mit m/z 189 und m/z 190, die aus der Spaltung zwischen C3/C4 resultieren, und aus denen jeweils durch Essigsäure-Abspaltung die Sekundärionen mit m/z 129 (189-60) und m/z 130 (190-60) entstanden. Dieses Fragmentierungsmuster erklärt eine Symmetrie des Moleküls, so dass diese Komponente als 1-Deutero-1,2,5,6-tetra-*O*-acetyl-3,4-di-*O*-methyl-hexitol identifiziert wurde, was einer 2,6-disubstituierten Hexopyranose entspricht.

4.4.2.2.1.2 Methylierung mit deuteriertem Methyljodid

Zur Bestimmung der Substitution der methylierten Hexosen (siehe 4.4.2.1) wurden von jeweils 100 µg der Fraktion A-Polysaccharide zusätzlich Methylierungsanalysen mit

deutertem Methyljodid (siehe 3.3.6) durchgeführt. Dadurch können Fragmente mit zuvor vorhandenen *O*-Methylierungen von Fragmenten mit eingeführten deuterierten Methylgruppen aufgrund von Massendifferenzen ($\Delta 3/ -OD_3$) unterschieden werden. Abbildung 26 stellt als Beispiel das Chromatogramm der partiell methylierten Alditolacetate des ConA-negativen Polysaccharids aus SmT dar.

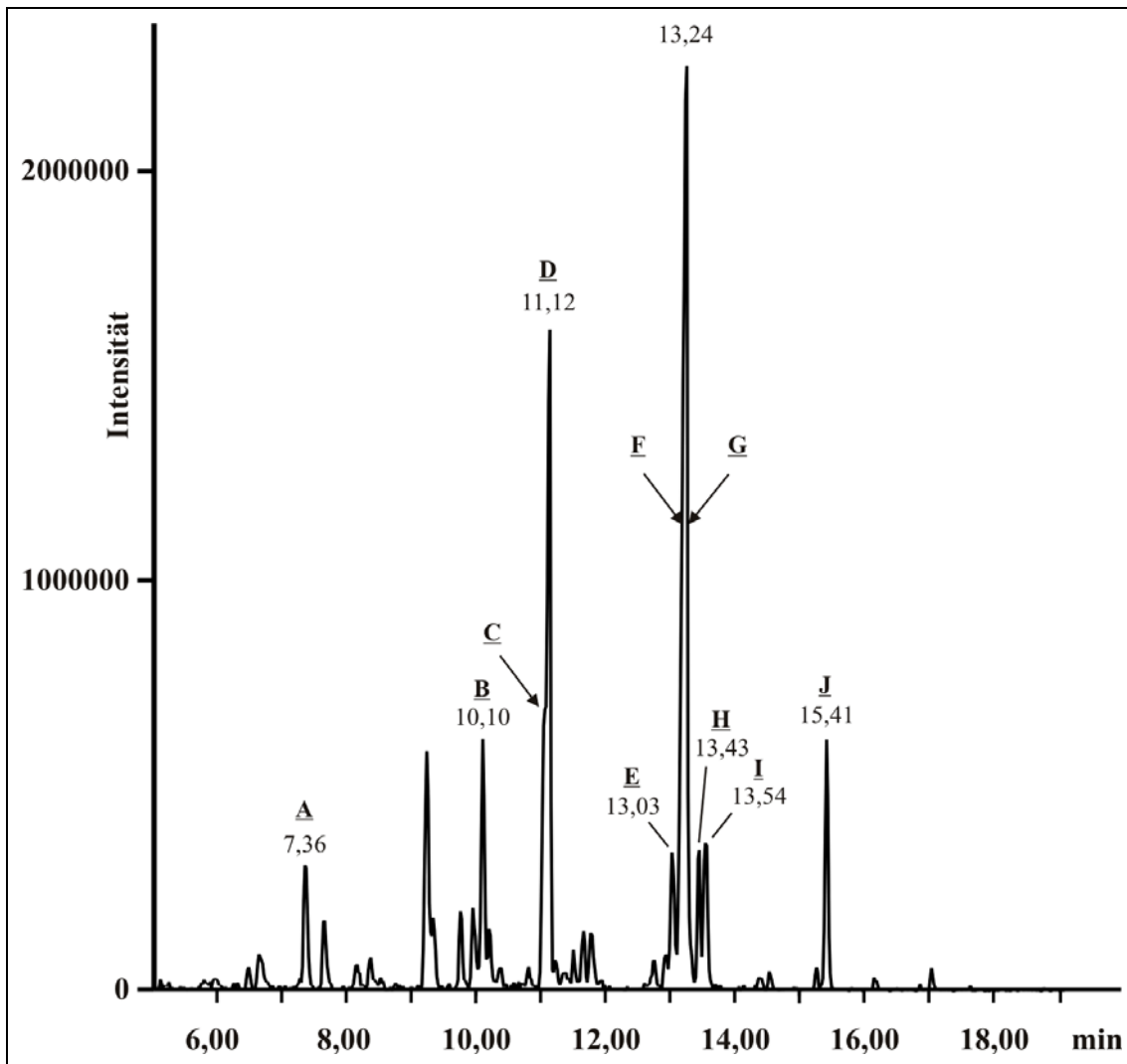


Abbildung 26: Chromatogramm der partiell methylierten Alditolacetate nach Methylierung mit Deutero-Methyljodid des Fraktion A- Polysaccharids aus SmT.

Für die Methylierungsanalyse wurden 100 μg Substanz eingesetzt. Die Trennung der partiell methylierten Alditolacetate wurde auf einer HP-5MS-Kapillarsäule mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt: 150°C für 3 min, mit 5°C min^{-1} auf 320°C.

Diese Analysen sind in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Methylierungsanalysen unter Verwendung von undeutertem Methyljodid (siehe 4.4.2.2.1.1).

In beiden Polysacchariden - sowohl aus SmT als auch aus SmO - wurden dieselben Substitutionsmuster der nachgewiesenen 3-*O*-Methyl- und 6-*O*-Methyl-Hexosen identifiziert. Im nachfolgenden werden die Massenspektren der Derivate erläutert.

Die Derivate **A**, **B**, **D**, **H**, **I** und **J** (siehe Abbildung 26) wurden als Pentosen bzw. Hexosen mit den zu erwartenden Substitutionsmustern (siehe Tabelle 4) identifiziert. **A**: terminale Pentofuranose, **B**: 5-substituierte Pentofuranose/ 4- substituierte Pento-
pyranose, **D**: terminale Hexopyranose, **H**: 3-substituierte Hexopyranose, **I**: 6-sub-
stituierte Hexopyranose, **J**: 2,6-disubstituierte Hexopyranose (Massenspektren nicht
gezeigt).

Lediglich die Signale **C**, **E**, **F** und **G** lieferten Massenspektren, die das Vorhandensein
von Methyl-Hexosen beweisen (siehe unten).

Abbildung 27 zeigt das Fragmentmuster des Gemisches aus 1-Deutero-1,4,5-tri-*O*-
acetyl-2,3,6-tri-*O*-deutero-methyl-hexitol und 1-Deutero-1,4,5-tri-*O*-acetyl-6-*O*-methyl-
2,3-di-*O*-deutero-methyl-hexitol (siehe **F** in Abbildung 26).

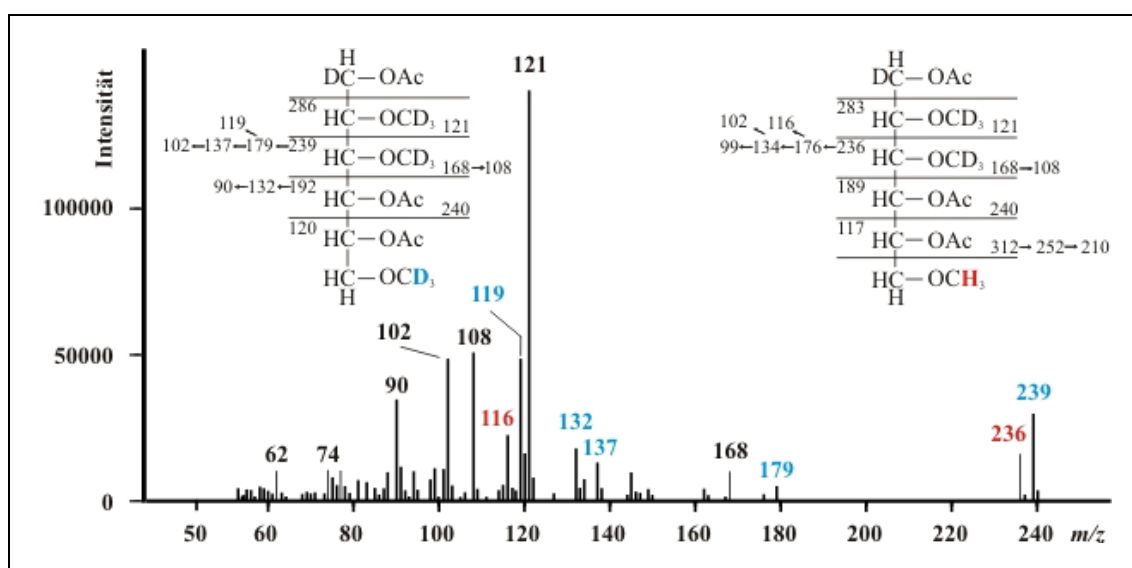


Abbildung 27: EI-Massenspektrum des Gemisches aus 1-Deutero-1,4,5-tri-*O*-acetyl-2,3,6-tri-*O*-deutero-methyl-hexitol und 1-Deutero-1,4,5-tri-*O*-acetyl-6-*O*-methyl-2,3-di-*O*-deutero-methyl-hexitol.

Die beiden Derivate wurden nach Methylierungsanalyse unter Verwendung von deuteriertem Methyljodid des Fraktion A-Polysaccharids aus SmT und gaschromatographischer Trennung bei einer Retentionszeit von 13,165 min erhalten (siehe **F** in Abbildung 26). Sie konnten gaschromatographisch nicht voneinander getrennt werden.

Das Primärfragment mit m/z 239 sowie die entsprechenden Sekundärionen mit m/z 179 (239-60), m/z 137 (239-60-42) und m/z 119 (239-60-60) gehen aus der Spaltung

zwischen C2/C3 hervor und zeigen das Vorhandensein von jeweils zwei *O*-acetylierten und zwei *O*-deutero-methylierten C-Atomen am nicht-reduzierenden Ende an. Analog dazu weisen die Fragmente mit m/z 236, m/z 176 und m/z 116, die jeweils um drei Masseneinheiten geringer sind, am nicht-reduzierenden Ende zwei *O*-Acetylierungen, eine *O*-Methylierung und eine *O*-deutero-Methylierung nach. Die Primärfragmente mit m/z 121 und m/z 168 (C3/C4) sowie das daraus resultierende Sekundärion mit m/z 108 (168-60) zeigen am reduzierenden Ende *O*-deutero-Methylgruppen in Position 2 und 3. Dadurch ist nachgewiesen, dass es sich bei diesem Derivat aufgrund des Massenspektrums um ein Gemisch aus (mindestens) einer Hexose und einer 6-*O*-Methyl-Hexose handelt, die beide 1,4,5-tri-*O*-acetyliert vorliegen und damit entweder 4-substituierte Pyranosen und/oder 5-substituierte Furanosen darstellen.

In Abbildung 28 ist das Massenspektrum eines 1-Deutero-1,4,5-tri-*O*-acetyl-6-*O*-methyl-2,3-di-*O*-deutero-methyl-hexitols dargestellt (siehe **G** in Abbildung 26).

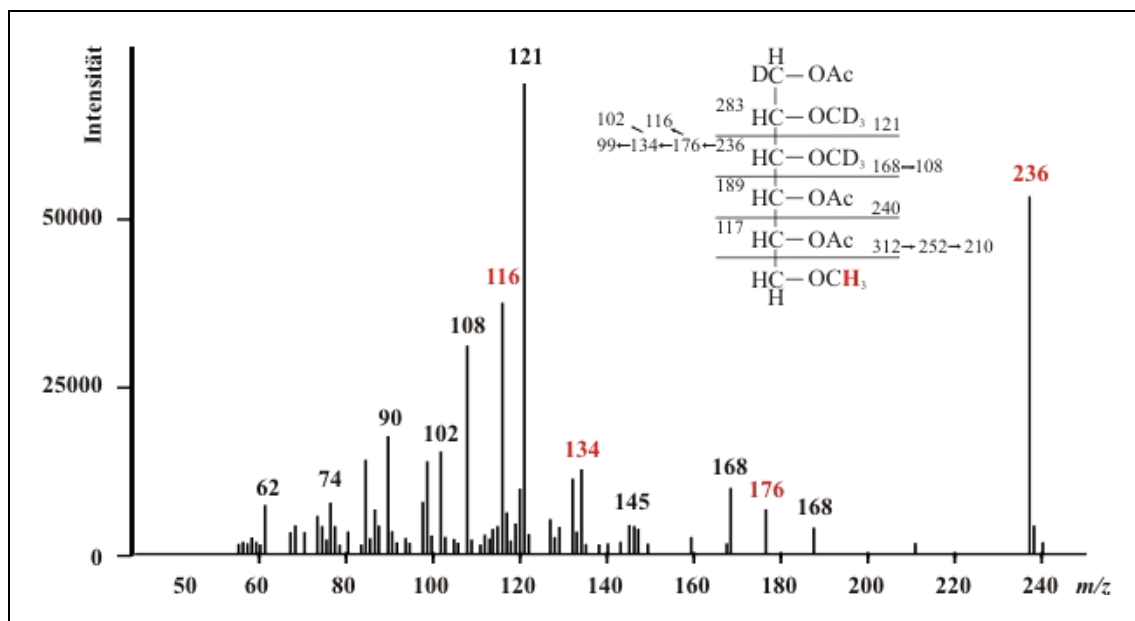


Abbildung 28: EI-Massenspektrum eines 1-Deutero-1,4,5-tri-*O*-acetyl-6-*O*-methyl-2,3-di-*O*-deutero-methyl-hexitols.

Das Derivat wurde nach Methylierungsanalyse unter Verwendung von deuteriertem Methyljodid des Fraktion A-Polysaccharids aus SmT und gaschromatographischer Trennung bei einer Retentionszeit von 13,242 min erhalten (siehe **G** in Abbildung 26).

Primär- und Sekundärfragmente mit m/z 108, m/z 116, m/z 121, m/z 168 und m/z 236 (siehe oben) beweisen das Vorhandensein einer mono-*O*-methylierten Hexose. Durch das fehlende Primärfragment mit m/z 165 (C3/C4) bzw. das fehlende Sekundärion mit m/z 105 (165-60) am reduzierende Ende wird ausgeschlossen, dass es sich um eine 3-*O*-

Methyl-Hexose handelt und gezeigt, dass hier eine 6-*O*-Methyl-Hexose vorliegt. Diese ist im Falle des Pyranose-Rings 4-substituiert und im Falle der furanosidischen Ringform 5-substituiert.

Abbildung 29 zeigt das Fragmentierungsmuster des Gemisches aus (mindestens) zwei terminalen Hexopyranosen (siehe **C** in Abbildung 26). In beiden Derivaten zeigen die Primärfragmente mit m/z 121 (C2/C3, reduzierendes Ende) und mit m/z 167 (C3/C4, nicht-reduzierendes Ende) in Position 2,4 und 6 eine Deutero-Methylierung an. Lediglich ein Derivat liefert die Primärfragmente mit m/z 168 (C3/C4, reduzierendes Ende) und m/z 214 (C2/C3, nicht-reduzierendes Ende) sowie die Sekundärionen mit m/z 108 (168-60) und m/z 154. Damit handelt es sich bei allen Methylierungen um deuterierte Substitutionen, also um terminale Hexopyranosen. Zusätzliche Fragmente mit Massendifferenzen von 3 (m/z 105, m/z 151, m/z 165, m/z 211) identifizieren eine terminale 3-*O*-methylierte Hexopyranose.

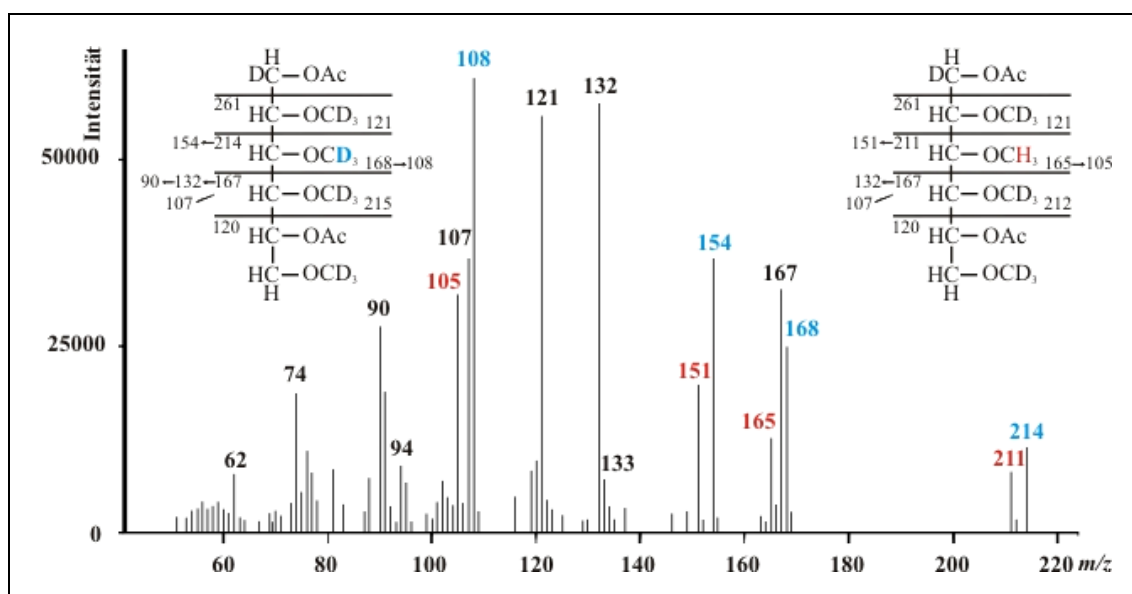


Abbildung 29: EI-Massenspektrum des Gemisches aus 1-Deutero-1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-deutero-methyl-hexitol und 1-Deutero-1,5-di-*O*-acetyl-3-*O*-methyl-2,4,6-tri-*O*-deutero-methyl-hexitol.

Die Derivate wurden nach Methylierungsanalyse unter Verwendung von deuteriertem Methyljodid des Fraktion A- Polysaccharids aus SmT und gaschromatographischer Trennung bei einer Retentionszeit von 11,047 min erhalten (siehe **C** in Abbildung 26).

Eine weitere 3-*O*-Methyl-Hexose wurde als 4-substituierte Pyranose bzw. 5-substituierte Furanose identifiziert (siehe **E** in Abbildung 26, Massenspektrum nicht gezeigt).

Die entsprechenden EI-Massenspektren der einzelnen Derivate zeigen damit, dass die nachgewiesene 6-*O*-Methyl-Hexose (siehe 4.4.2.1) als 4-substituierte Hexopyranose bzw. 5-substituierte Hexofuranose vorliegt. Die nachgewiesene 3-*O*-Methyl-Hexose (siehe 4.4.2.1) liegt einerseits terminal und andererseits als 4-substituierte Hexopyranose bzw. 5-substituierte Hexofuranose vor. Aufgrund der NMR-Ergebnisse (siehe 4.4.2.4) ist das Vorhandensein der pyranosidischen Ringform auch für diese Hexosen sehr wahrscheinlich.

Für das entsprechende Polysaccharid aus SmO wurden für diese methylierten Zucker dieselben Substitutionsmuster nachgewiesen.

Die Arabinane dieser Polysaccharide scheinen strukturelle Ähnlichkeiten aufzuweisen. Terminale, 2-substituierte, 5-substituierte und als Verzweigungsstellen 3,5-disubstituierte Arabinofuranosen kommen in beiden Substanzen in ähnlichen Anteilen vor. In der Summe wurden in der Fraktion aus SmT 27% Pentosen und in der entsprechenden Fraktion aus SmO 23% Pentosen nachgewiesen. Dementsprechend macht die Gesamtheit aller Hexose-Reste in der Substanz aus SmT 74% aus, während in SmO 77% nachgewiesen wurden. Es wurden acht Hexose-Reste in SmT und neun in SmO identifiziert, von denen drei jeweils dieselbe Substitution aufweisen und daher unterschiedliche Zucker darstellen. Im Gegensatz zu den Arabinose-Resten wurde in Verbindung mit den Ergebnissen der NMR-Spektroskopie für alle Hexosen die pyranosidische Ringform nachgewiesen (siehe oben). Deutliche Unterschiede hinsichtlich der Hexose-Reste zwischen SmT und SmO sind in den Anteilen einer der 4-substituierten Hexopyranose zu sehen. In SmO ist mit 20% der Anteil mehr als doppelt so groß wie in SmT (rund 9%). Eine 3-substituierte Hexopyranose kommt in SmT (6,7%) dreifach häufiger vor als in SmO (2,1%). Im Gegensatz dazu wurde eine 6-substituierte Hexose im Vergleich zu SmT (11,8%) nur zu einem Drittel nachgewiesen (3,9%).

4.4.2.2.2 Methylierungsanalysen der Arabinomannane

Analog zu den Sequenzanalysen der Polysaccharide aus Fraktion A (siehe 4.4.2.2.1) wurden von jeweils 100 µg der Arabinomannane (Fraktion B) Methylierungsanalysen durchgeführt (siehe 3.3.6). Da zuvor für diese Fraktionen keine methylierten Zucker nachgewiesen wurden (siehe 4.4.2.1), war eine Methylierung mit deuteriertem Methyljodid nicht erforderlich. Die nach Methylierung mit Methyljodid, Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung entstandenen Alditolderivate wurden gaschromatographisch aufgetrennt und massenspektrometrisch identifiziert. Tabelle 5 gibt eine vergleichende

Übersicht über die identifizierten partiell methylierten Alditolacetate und die entsprechend substituierten Zuckerreste der ConA-positiven Arabinomannane aus SmT und SmO.

Da durch die Neutralzuckerbestimmungen für diese Substanzen ausschließlich Arabinose- und Mannose-Reste als Zucker-Bestandteile nachgewiesen wurden (siehe Abbildung 25), konnten alle Pentosen als Arabinosen sowie alle Hexosen als Mannosen identifiziert werden. Den Analysen der Fraktion A-Polysaccharide entsprechend konnten für die Arabinomannane sowohl aus SmT als auch aus SmO Arabinose-Reste in ausschließlich furanosidischer Ringform nachgewiesen werden, während alle Mannose-Reste pyranosidisch vorliegen (siehe 4.4.2.4). Beide Arabinomannane weisen dieselben substituierten Zucker auf, die jedoch in unterschiedlichen Verhältnissen vorkommen (siehe Tabelle 5).

Die Komponenten **a** bis **d** (Tabelle 5) zeigen nach gaschromatographischer Trennung dieselben Retentionszeiten wie die entsprechenden Komponenten der Fraktion A-Polysaccharide. Durch den Vergleich der Fragmentierungsmuster konnte bestätigt werden, dass diese Derivate dieselben Arabinose-Reste darstellen (siehe 4.4.2.2.1).

Bei der Komponente **a** (Tabelle 5) handelt sich damit um eine terminale Arabinfuranose. Komponente **b** wurde als 2-substituierte Arabinfuranose, Komponente **c** als 5-substituierte Arabinfuranose sowie Komponente **d** als 3,5-disubstituierte Arabinfuranose identifiziert (siehe 4.4.2.2.1).

Die Komponenten **e** bis **j** (Tabelle 5) stellen aufgrund ihrer Retentionszeiten sowie Fragmentierungsmuster Hexosen (Mannosen) dar.

Komponente **e** (Tabelle 5) entspricht Komponente **7** der Fraktion A-Polysaccharide (Tabelle 4) und damit einer terminalen Mannopyranose (siehe 4.4.2.2.1).

Komponente **f** (Tabelle 5) wurde in den Fraktion A-Polysacchariden nicht nachgewiesen (siehe 4.4.2.2.1). Das EI-MS-Spektrum zeigt durch Spaltung zwischen C3/C4 am reduzierenden Ende ein Primärfragment mit m/z 190, welches eine *O*-Methylierung und zwei *O*-Acetylierungen anzeigt. Da ein Fragment mit m/z 118 fehlt, das am reduzierenden Ende durch eine *O*-Acetyl- und eine *O*-Methylgruppe erzeugt würde, liegen die Acetylgruppen an C1 und C2. Ein Sekundärion mit m/z 100 geht am reduzierenden Ende aus der Spaltung zwischen C4/C5 hervor (234-60-42-32) und legt für C4 eine Acetylierung fest. Ein Primärfragment mit m/z 161 und ein korrespondierendes Ion mit m/z 100 (161-60), die aus der Spaltung zwischen C3/C4 hervorgehen, zeigen an C5 zusätzlich eine Acetylgruppe an (Daten nicht gezeigt). Damit handelt es

sich um ein 1-Deutero-1,2,5-tri-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-methyl-hexitol, also um eine 2-substituierte Mannopyranose.

Tabelle 5: Übersicht über die partiell methylierten Alditolacetate nach Methylierungsanalyse der ConA-positiven Arabinomannane aus SmT und SmO.

Die Identifizierung der Pentosen und Hexosen als Arabinose- bzw. Mannose-Reste ergibt sich aufgrund der Ergebnisse der Neutralzuckerbestimmung. Die Derivate sind nicht nach ihren Retentionszeiten geordnet. Die Quantifizierung erfolgte ohne Berücksichtigung von Response-Faktoren.

Komponente	methylierte Alditolacetate	Zuckerrest	SmT [mol%]	SmO [mol%]
a	1,4-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,5-tri- <i>O</i> -methyl-[² H]-pentitol	terminale Arabinofuranose	+ ⁶	7,9
b	1,2,4-Tri- <i>O</i> -acetyl-3,5-di- <i>O</i> -methyl-[² H]-pentitol	2-subst. Arabinofuranose	6,6	11,5
c	1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3-di- <i>O</i> -methyl-[² H]-pentitol	5-subst. Arabinofuranose (4-subst. Arabinopyranose) ⁷	17,7	27,6
d	1,3,4,5-Tetra- <i>O</i> -acetyl-2- <i>O</i> -methyl-[² H]-pentitol	3,5-disubst. Arabinofuranose (3,4-disubst. Arabinopyranose) ⁷	16,1	11,5
e	1,5-Di- <i>O</i> -acetyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-[² H]-hexitol	terminale Mannopyranose	14,9	17,1
f	1,2,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-3,4,6-tri- <i>O</i> -methyl-[² H]-hexitol	2-subst. Mannopyranose	6	6,3
g	1,3,5-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,4,6-tri- <i>O</i> -methyl-[² H]-hexitol	3-subst. Mannopyranose	5,2	3,9
h	1,5,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-[² H]-hexitol	6-subst. Mannopyranose	18,8	6,3
i	1,2,5,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-3,4-di- <i>O</i> -methyl-[² H]-hexitol	2,6-disubst. Mannopyranose	11,8	6,6
j	1,2,3,5,6-Penta- <i>O</i> -acetyl-4- <i>O</i> -methyl-[² H]-hexitol	2,3,6-trisubst. Mannopyranose	2,9	1,3

Die Komponente **g** (Tabelle 5) zeigt bei unterschiedlicher Retentionszeit ein ähnliches Fragmentierungsmuster wie die Komponente **10** der Fraktion A-Polysaccharide

⁶ Eine Integration dieses Alditolacetates war aufgrund unvollständiger gaschromatographischer Trennung nicht möglich.

⁷ Aufgrund der Ergebnisse der NMR-Spektroskopie können Arabinose-Reste in pyranosidischer Ringform ausgeschlossen werden.

(Tabelle 4). Fragmente mit m/z 118, m/z 161 und m/z 190 (siehe oben) zeigen, dass es sich um ein tri-*O*-acetyliertes Hexitol handelt, dessen C1 und C3 acetyliert sind. Durch ein fehlendes Primärfragment mit m/z 89 (C4/C5, nicht-reduzierendes Ende) wird die dritte Position der Acetylierung für C5 festgelegt. Damit liegt ein 1-Deutero-1,3,5-tri-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-methyl-hexitol vor. Anders als in dem entsprechenden Derivat aus den Fraktion A-Polysacchariden handelt sich dabei um eine 3-substituierte *Mannopyranose*.

Das EI-MS-Spektrum der Komponente **h** (Tabelle 5) zeigt ein identisches Fragmentierungsmuster zu denen der Komponenten **11** aus den Fraktion A-Polysacchariden (Tabelle 4) Es liegt eine 6-substituierte Mannopyranose vor.

Die Komponente **i** (Tabelle 5) entspricht der Komponente **15** aus dem Fraktion A-Polysaccharid aus SmT (siehe 4.4.2.2.1). Dabei handelt es sich um eine 2,6-disubstituierte Mannopyranose.

Das Fragmentierungsmuster der Komponente **j** (Tabelle 5) zeigt folgende Primär- und Sekundärfragmente, die das Derivat als 1-Deutero-1,2,3,5,6-penta-*O*-acetyl-4-*O*-methyl-hexitol identifizieren: m/z 85 (C4/C5, nicht-reduzierendes Ende: 145-60) zeigt an C5 und C6 eine Acetylgruppe an. m/z 189 (C3/C4, nicht-reduzierendes Ende) sowie m/z 129 (189-60) legen für C4 eine Methylgruppe fest. m/z 261 (C2/C3, nicht-reduzierendes Ende) und ein daraus resultierendes Sekundärfragment mit m/z 201 (261-60) zeigen an C3 eine weitere Acetylierung an. Durch ein Primärfragment mit m/z 262 (C3/C4, reduzierendes Ende) sowie durch ein fehlendes Ion mit m/z 118 werden für C1 und C2 Acetylierungen festgelegt. Es handelt sich somit um eine Penta-*O*-acetylierte Hexose, deren Nachweis jedoch wahrscheinlich eine Folge von Untermethylierung ist (siehe unten).

In beiden Analysen wurden vier verschieden substituierte Arabinofuranosen und sechs verschieden gebundene Mannopyranosen nachgewiesen. Dennoch ist aufgrund dieser Analysen ein deutlicher struktureller Unterschied zwischen diesen Polysacchariden erkennbar. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Neutralzuckerbestimmungen (siehe 4.4.2.1) wurden für das Arabinomannan aus SmT in der Gesamtheit rund 60% Hexosen und für das entsprechende Arabinomannan aus SmO in der Summe lediglich 41% Hexosen nachgewiesen. Hinsichtlich der Pentose-Reste unterscheiden sich die Substanzen in den Anteilen an 5-substituierten Arabinofuranose-Resten. Das Arabinomannan aus SmT besteht zu rund 18% aus dieser unverzweigten Pentose, während das

entsprechende Arabinomannan aus SmO ca. 28% diesen Zucker beinhaltet. 2-substituierte Arabinofuranosen kommen in SmT nur zu rund 7% vor, während in SmO ca. 12% dieses Zuckers nachgewiesen wurden. Hinsichtlich der Hexosen ist ein deutlicher Unterschied in den Anteilen der 6-substituierten Mannose-Reste erkennbar. In dem Arabinomannan aus SmT wurden rund 19% und in dem entsprechenden aus SmO nur rund 6% dieses Zuckers nachgewiesen. Ebenso kommen 2,6-disubstituierte Mannopyranosen als Verzweigungsstellen in SmT (11,8%) fast doppelt so häufig vor wie in SmO (6,6%). Der Nachweis von geringen Anteilen (SmT: 2,9%; SmO: 1,3%) an 2,3,6-trisubstituierten Hexose-Resten ist wahrscheinlich eine Folge von Unter-methylierungen. Sterisch ist eine derartige Substitution einer α -Mannose durchaus möglich. Jedoch liegt es nahe, dass dieses Acetylierungsmuster durch unvollständige Methylierung entstanden ist- zum Beispiel durch fehlende Methylierung der OH-Gruppe in Position 3 der 2,6-disubstituierten Mannopyranose. Ferner kann diese Substitution aus allen weiteren nachgewiesenen Mannose-Reste durch zwei bzw. drei unmethylierte Hydroxygruppen entstanden sein (fehlende Methylierung der Positionen: 2 und 3 der 6-substituierten, 2 und 6 der 3-substituierten, 3 und 6 der 2-substituierte sowie 2,3 und 6 der terminalen Mannose).

2-substituierte Mannopyranosen wurden in beiden Arabinomannanen mit jeweils rund 6% in SmT und SmO in ähnlichen Anteilen nachgewiesen. Ebenso kommen 3-substituierte Mannopyranosen mit ca. 5% in SmT und ca. 4% in SmO vor. Terminale Mannose-Reste, die die affinitäts-chromatographische Trennung ermöglichten, kommen in beiden Polysacchariden ähnlich häufig vor (SmT: 15%; SmO: 17%).

Die Methylierungsanalysen ergeben also einen strukturellen Unterschied der beiden Arabinomannane. Das Polysaccharid aus SmT weist ein größeres Mannan (~60%) und kürzeres Arabinan (~40%) auf. Im Gegensatz dazu besteht das entsprechende aus SmO aus einem kleinerem Mannan (41%) und einem längeren Arabinan (~59%). Das ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Neutralzuckerbestimmungen (siehe 4.4.2.1) und NMR-Untersuchungen (siehe 4.4.2.4).

4.4.2.3 Ergebnisse der Massenspektrometrie

Zur Bestimmung der Molekularmassen wurden die Arabinomannane aus SmT und SmO massenspektrometrisch untersucht. Im Gegensatz zu massenspektrometrischen

Analysen von Proteinen, bei denen in der Regel für jedes Masse-zu-Ladungs-Verhältnis der Substanz ein einzelner Peak erhalten wird, liefern Massenspektren von Polysacchariden aufgrund ihrer Heterogenität generell eine Vielzahl von Signalen. Vorversuche mit hochmolekularen Standards haben dies für Dextran (Molekularmasse 10000 Da) und Glycogen als Homopolymere bestätigt. Massenspektrometrie erlaubt sowohl die Bestimmung der Molekularmasse als auch eine bedingte Strukturaufklärung durch Fragmentierungsexperimente. Durch in der Ionenquelle induzierte starke Fragmentierungen der Zucker können Informationen über deren strukturelle Eigenschaften gewonnen werden (siehe 4.4.2.3.2).

4.4.2.3.1 MALDI-TOF Massenspektrometrie

MALDI-TOF Messungen der Arabinomannane (Fraktion B, Abbildung 23) aus SmO und SmT wurden unter Verwendung verschiedener Matrizes (siehe 3.3.12.1) durchgeführt. Optimale Ergebnisse hinsichtlich der Ionisation ließen sich mit 3-Aminoquinolin als Matrix erzielen. Die Spektren beider Fraktion B-Arabinomannane zeigen Signale zwischen m/z 1000 und m/z 4000. Dabei lieferten beide Spektren in allen m/z -Bereichen Peaks mit charakteristischen Differenzen von Δ 132 und 162 amu, die durch die Abspaltung von Pentosen und Hexosen hervorgerufen werden. Fragmente, die dieselbe Anzahl an Zuckern, jedoch unter Austausch einer Hexose gegen eine Pentose beinhalten, sind untereinander durch Massenunterschiede von Δ 30 getrennt (siehe 4.4.2.3.2). In Abbildung 30 ist das Massenspektrum des Arabinomannans aus SmO dargestellt.

Das Spektrum zeigt bis zu einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von etwa m/z 3500 Signale. Durch Δ 132 amu und/oder Δ 162 amu zeigt jeder Peak zu einem weiteren, dass es sich jeweils um Ionen handelt, die Pentosen bzw. Hexosen beinhalten. Da durch Neutralzuckeranalysen ausschließlich Arabinosen und Mannosen nachgewiesen wurden (siehe 4.4.2.1), handelt es sich bei Δ 132 amu um die Masse einer Arabinose sowie bei Δ 162 amu um die Masse einer Mannose. Es treten keine weiteren Differenzen auf, die nicht auf diese Zucker zurückgehen. Massenunterschiede, die auf andere Zucker oder auf Substitutionen von Zuckern hinweisen, treten nicht auf. Desweiteren gibt es keine Differenzen, die auf andere Substanzen, wie beispielsweise Proteine oder Lipide, hinweisen. Damit sind Verunreinigungen in diesem Massenbereich ausgeschlossen. Ähnliche Ergebnisse lieferte das MALDI-TOF-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmT (Spektrum nicht gezeigt). Es handelt sich daher bei den isolierten

Polysacchariden um reine Arabinomannane. Das ist in Übereinstimmung mit den zuvor durchgeführten chemischen Analysen.

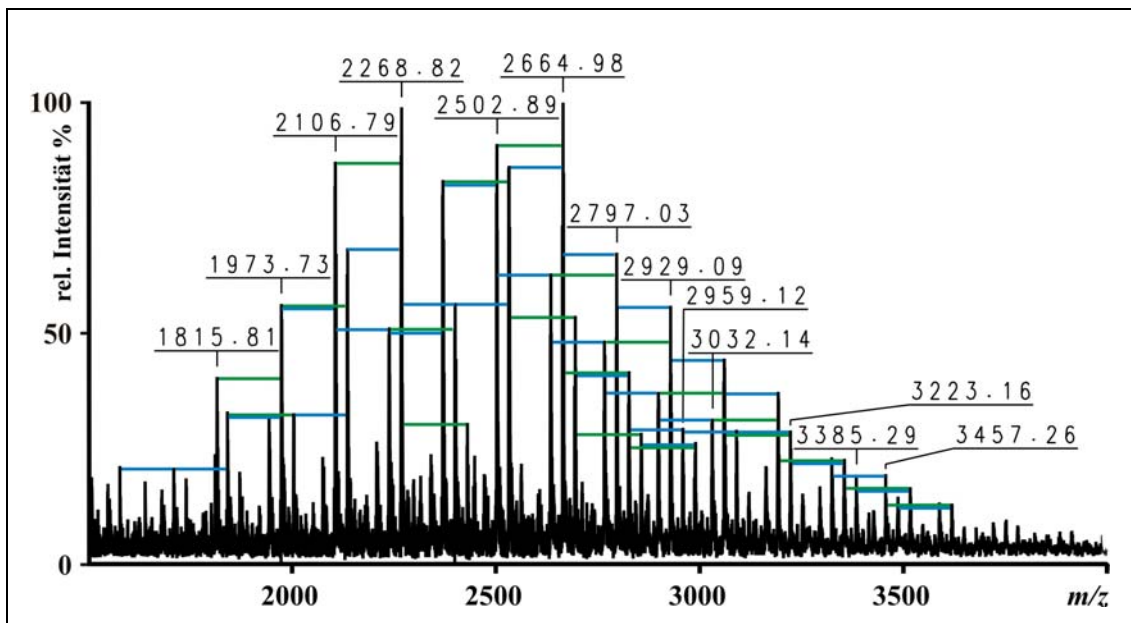


Abbildung 30: MALDI-TOF-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmO.

Die Messung wurde im positiven Ionen-Modus durchgeführt. Als Matrix wurde 3-Aminoquinolin verwendet. Differenzen von 132 amu (—) bzw. 162 amu (—) sind graphisch dargestellt.

MALDI-TOF Messungen der Fraktion A-Polysaccharide aus SmO und SmT lieferten Spektren mit Signalen zwischen m/z 1600 und m/z 3800 (Spektrum nicht gezeigt). Neben Differenzen, die durch Pentosen und Hexosen hervorgerufen werden (siehe oben), sind Massenunterschiede von Δ 176 auffällig. Diese sind auf das Vorhandensein von Methyl-Hexosen zurückzuführen, in guter Übereinstimmung mit zuvor durchgeführten Neutralzucker- (siehe Abbildung 24) und Methylierungsanalysen, in denen methylierte Hexosen als Bestandteile der Polysaccharide nachgewiesen wurden, (siehe 4.4.2.2.1.2).

Zur Berechnung theoretischer Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse der einzelnen Ionen wurden nicht die MALDI- sondern ESI-Spektren mit höheren Massengenauigkeiten herangezogen (siehe Abbildung 31 und Abbildung 32).

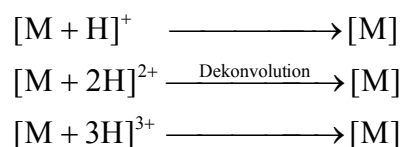
4.4.2.3.2 ESI FT-ICR Massenspektrometrie

Zur Bestimmung von genauen Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen wurden Messungen der hochauflösenden ESI FT-ICR Massenspektrometrie mit den damit verbundenen Massengenauigkeiten im ppm-Bereich (siehe unten) herangezogen. Anders als Peptide und Proteine sind neutrale Polysaccharide durch Elektrospray ohne vorherige Derivatisierungen äußerst schwierig zu ionisieren. So konnten die Polysaccharide aus Fraktion A und B (siehe Abbildung 23) nur bei leicht erhöhter Kapillar-Exit-Spannung (siehe unten) ionisiert werden mit der Folge, dass neben Molekülonen zusätzliche Fragmentionen auftreten.

Massenspektrometrisch ist eine Unterscheidung zwischen Monosacchariden gleicher Massen nicht möglich. Die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Monosacchariden können auch nur bedingt bestimmt werden. Jedoch ist es im Speziellen möglich, für Heteropolysaccharide, die nicht ausschließlich aus Wiederholungseinheiten bestehen, Informationen über die Struktur von Haupt- und Seitenketten zu erhalten. Die isolierten Fraktion B-Arabinomannane (siehe 4.4.1) bestehen ausschließlich aus Arabinose- und Mannose-Resten und damit aus jeweils einer Spezies von Pentosen und Hexosen. Diese können massenspektrometrisch durch die Massendifferenz von 30 amu unterschieden werden. Auftretende Massendifferenzen von 132 amu (Δm_{Pent}) bzw. 162 amu (Δm_{Hex}) lassen sich daher eindeutig auf das Abspalten von Arabinosen bzw. Mannosen zurückführen. Daher ermöglicht die nachgewiesene Zuckerzusammensetzung mit ausschließlich Arabinosen und Mannosen die Interpretation massenspektrometrischer Experimente, bei denen eine starke Fragmentierung der Polysaccharide induziert wird. Diese Fragmentierung kann bei der Elektrospray-Ionisation durch eine zusätzlich angelegte Beschleunigungs-Spannung in der Ionenquelle, einer erhöhten Kapillar-Exit-Spannung (Capillary Skimmer Dissociation, CSD), erreicht werden. Die entstandenen Ionen erhalten dadurch eine erhöhte kinetische Energie, die bei Kollision mit Restgas-Ionen zu gesteigerter Fragmentierung führt. Dabei sind alle Molekül-Ionen gleichermaßen betroffen. Es handelt sich damit um eine unspezifische Fragmentierung: Liegt bereits vor dem Ionisierungsprozess ein Gemisch vor, wie es typischerweise bei heterogenen Polysacchariden der Fall ist, werden alle Molekül-Ionen gleichermaßen fragmentiert. Daher kann anschließend anhand des Massenspektrums nicht unterschieden werden, welche Fragment-Ionen aus welchen Molekül-Ionen hervorgegangen sind. Dennoch lassen sich aus den Fragmentspektren Aussagen über die vorliegenden Strukturelemente der Polysaccharide treffen. Besteht zum Beispiel ein solches Arabino-

mannan aus einer einzigen Arabinan-Domäne, die nur über *eine* Bindung an ein Mannan geknüpft ist, so wird bei einer künstlich erzeugten Fragmentierung ein solches Polysaccharid ein Massenspektrum liefern, das Fragmentationen aus ausschließlich Arabinosen beinhaltet und Fragmentationen nur aus Mannosen. Im Gegensatz dazu wird ein Arabinomannan mit beispielsweise alternierenden Arabinose- und Mannose-Resten Fragmentationen bilden, die sowohl aus Pentosen als auch aus Hexosen bestehen. Auf diese Weise ist es unter Umständen möglich, Rückschlüsse auf die Verteilung der einzelnen Monomere sowie auf Haupt- und Seitenketten zu ziehen.

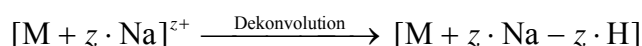
Die erhaltenen ESI-Spektren der isolierten Polysaccharide weisen im Vergleich zu den MALDI-Spektren (siehe Abbildung 30) in den gleichen m/z -Bereichen ähnliche Serien von Molekülionen auf, die sich jedoch in der Anzahl der Natrium-Anlagerung unterscheiden. Eine Besonderheit der Ionisation durch Elektrospray ist die Tatsache, dass aus hochmolekularen Substanzen mehrfach geladene Ionen entstehen. Die Formation dieser Ionen wird durch die Ladungsakkumulation in dem Elektrospray hervorgerufen [348]. ESI-Spektren mit mehrfach geladenen Ionen erschweren durch die Vielzahl von Signalen die Interpretation der Spektren erheblich. Zur Erleichterung der Auswertung wurden daher in den Spektren durch anschließende algorithmische Ladungs-Dekonvolution mehrfach geladene Ionen rechnerisch in neutrale Moleküle transformiert. Im Falle von Protonierungen geben unterschiedlich geladene Ionen desselben Moleküls in den Original-Spektren jeweils ein Peak mit dem entsprechenden m/z -Wert. Nach Ladungs-Dekonvolution entsteht aus allen Signalen ein einziger Peak mit $[M]$, der zwar im Masse-zu-Ladungs-Verhältnis angegeben wird, als neutrales Molekül aber der Molekülmasse entspricht.



Entsprechend der Anzahl der Ladungen werden somit Protonen-Massen subtrahiert. Der Algorithmus der Ladungs-Dekonvolution berücksichtigt dabei lediglich das Vorhandensein von Protonen bei Addukt-Ionen. Durch Ionisierungsverfahren, wie MALDI, FAB (Fast Atom Bombardement) und ESI, werden neben $(M + H)^+$ -Ionen durch Protonierung auch $(M + K)^+$ - und $(M + Na)^+$ -Ionen als Folge von Kationisierungen durch Alkalimetalle hervorgerufen [349]. Es kann generell nicht unterschieden werden, ob es sich

um $(M + H)$, $(M + Na)$ oder um $(M + K)$ handelt. Werden Alkalimetall-Addukte in neutrale Moleküle transformiert, so werden bei der Dekonvolution ebenso entsprechend der Anzahl der Ladungen dieselbe Anzahl an Protonen-Massen subtrahiert. Im Falle der einfachen Natrium-Anlagerung wird so aus $[M + Na]^+$ unter Abzug der Masse eines Protons das neutrale $[M + Na - H]$. Bei mehrfach geladenen Natrium-Addukten entstehen dabei dementsprechend zusätzliche Signale. Aus $[M + 2Na]^{2+}$ wird dabei $[M + 2Na - 2H]$ und aus $[M + 3Na]^{3+}$ wird $[M + 3Na - 3H]$, usw.

Verallgemeinert gilt daher:



Es entsteht auf diese Weise für jede Anzahl der Ladung ein Peak. Die künstlich erzeugten Signale nach Dekonvolution mehrfach geladener Natrium-Addukt-Ionen unterscheiden sich daher nicht um die Masse 23 (m_{Na}), sondern um die Masse 22:

$$(z \cdot m_{Na}) - (z \cdot m_H) = 22$$

Hinsichtlich der Addukt-Ionenbildung ist jedoch die Anzahl der erzeugten Ladungen eines Moleküls oder Fragments durch Elektrospray-Ionisation begrenzt. Biomoleküle erhalten eine Ladung pro ca. 1000 Da [348]. Das heißt, bei einer Molekularmasse von 4000 Da sind bis zu vierfach positive Ionen zu erwarten.

Abbildung 31 zeigt ein dekonvoliertes ESI-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmO. Zahlreiche Signale spiegeln die Heterogenität des Polysaccharids bzw. die in der Ionenquelle induzierte zusätzliche Fragmentierung durch CSD wider.

Das Massenspektrum zeigt zwischen m/z 700 und m/z 4500 zahlreiche Signale mit Differenzen untereinander von $\Delta 22$, $\Delta 30$, $\Delta 132$ und $\Delta 162$ amu. Der größte Peak wurde bei m/z 2558,791 detektiert (siehe unten).

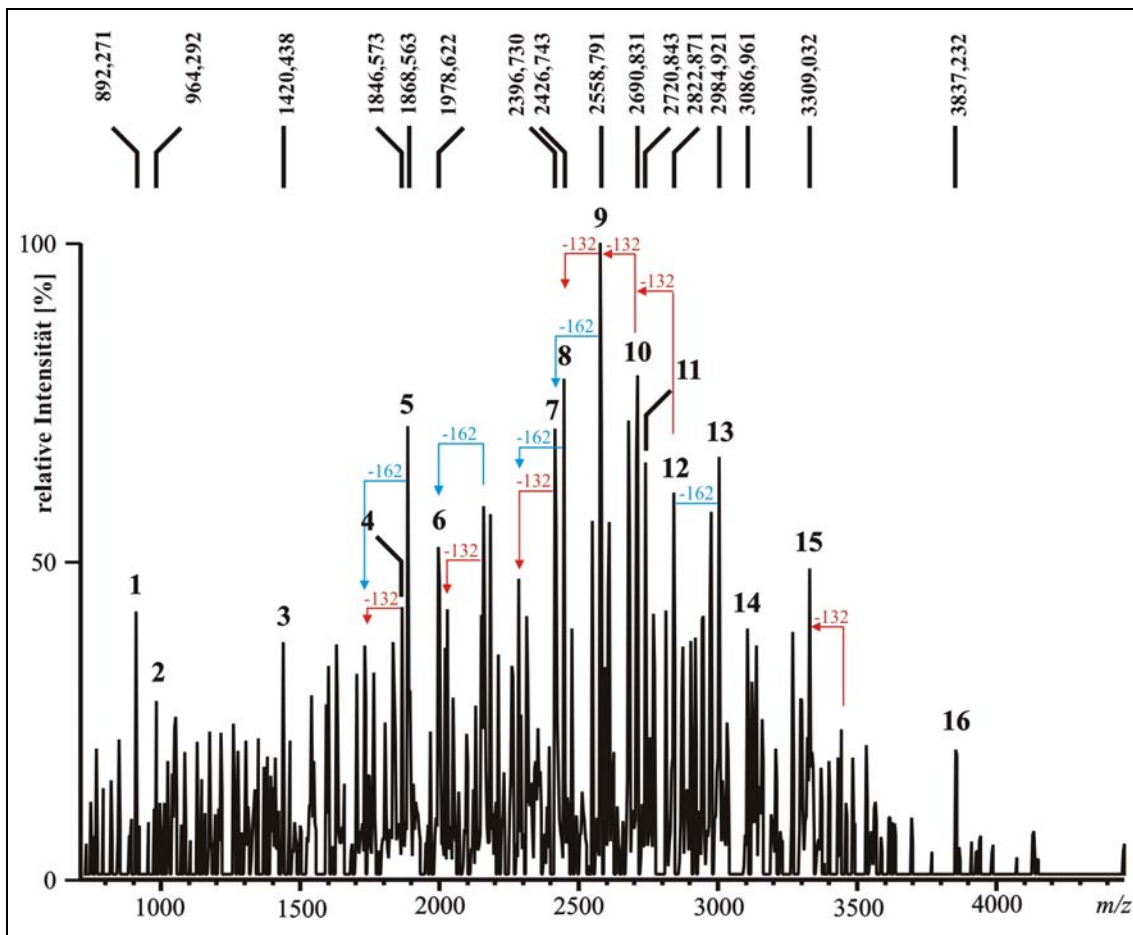


Abbildung 31: ESI-Massenspektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmO.

Die Messung wurde im positiven Ionenmodus aufgenommen. Das Spektrum wurde anschließend Ladungs-dekonvolviert. Die Kapillar-Exit-Spannung betrug 250 V. Die angegebenen m/z -Werte entsprechen denen der Monoisotopen-Peaks.

Auffällig sind Massenunterschiede von 162 amu, die genau der Masse eines Hexose-Restes entsprechen (siehe z. B. $m/z_{13} - m/z_{12}$, $m/z_{11} - m/z_{10}$, $m/z_{11} - m/z_9$, Abbildung 31). Entsprechend werden Differenzen von 132 amu von einer Pentose hervorgerufen (siehe z. B. $m/z_{12} - m/z_{10}$, $m/z_{10} - m/z_9$, $m/z_9 - m/z_8$, $m/z_6 - m/z_5$, Abbildung 31). Aufgrund vorangegangener Neutralzucker-Analysen für diese Fraktion B-Polysaccharide (siehe 4.4.2.1) handelt es sich bei den Pentosen um Arabinose-Reste und bei den Hexosen um Mannose-Reste. Dabei ist zu beachten, dass unterschiedliche Serien von Signalen vorkommen, die möglicherweise durch weitere Fragmentierung eines Ions entstehen, und die mit anderen Clustern überlappen. Das wird u. a. durch Massenunterschiede von 30 amu deutlich (siehe z. B. $m/z_{11} - m/z_{10}$, $m/z_8 - m/z_7$, Abbildung 31). Diese gehen aus dem Austausch von einer Pentose gegen eine Hexose hervor:

$$30 = (a \cdot m_{\text{Hex}} + a \cdot m_{\text{Pent}}) - [(a + 1) \cdot m_{\text{Hex}} + (a - 1) \cdot m_{\text{Pent}}]$$

Dabei kann es sich generell um zwei verschiedene Ionen handeln, von denen eines eine Hexose mehr und gleichzeitig eine Pentose weniger aufweist. Denn ein Ion mit beispielsweise zwei Hexosen und zwei Pentosen hat einen Massenunterschied von 30 amu zu einem Fragment mit drei Hexosen und einer Pentose, kann jedoch nicht durch Austausch von Zucker-Resten aus diesem hervorgegangen sein.

Mit abnehmendem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis können Fragmentierungsreihen vorkommen, die durch sequentielles Abspalten von einer oder mehr Hexosen und/oder Pentosen entstanden sind. Diese Fragmentierungsreihen können mit weiteren überlappen, die aus anderen Ionen von höherem oder niedrigerem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis hervorgegangen sind, aber ebenso durch Abspaltung von Hexosen und Pentosen weiter fragmentiert sind. Generell kann somit nicht unterschieden werden, ob ein Ion in einem CSD-Spektrum ein Molekül- oder Fragment-Ion darstellt. Das heißt, es ist nicht möglich zu bestimmen, ob ein Ion bereits vor dem Ionisierungsprozess aufgrund der Heterogenität der Substanz vorgelegen hat, oder nach der Ionisierung durch die induzierte Fragmentierung entstanden ist.

Auffällige weitere Differenzen, die auf Substitutionen der Zucker, andere Monosaccharide außer Pentosen und Hexosen oder Kontaminationen hinweisen, sind nicht vorhanden. Dies ist guter Übereinstimmung mit den zuvor durchgeführten Ergebnissen (siehe 4.4.2.1 und 4.4.2.2.2).

Jedes Signal in dem Spektrum (siehe Abbildung 31) stellt ein Ion des Polysaccharids dar, das aus Arabinosen und/oder aus Mannosen besteht. Die Berechnungen der einzelnen Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse gehen ausschließlich auf Natrium-Addukte zurück. Weitere auffällige Massendifferenzen zwischen den einzelnen Peaks betragen $\Delta 22$ amu ($m/z_5 - m/z_4$, Abbildung 31). Dieser Unterschied entsteht durch weitere Anlagerung von Natrium unter Abzug eines Protons ($m_{\text{Na}} - m_{\text{H}}$) und geht auf zweifach geladene Ionen im Original-Spektrum zurück (siehe oben). Signalintensive Molekül-Ionen durch Wasserstoff-Protonierungen ($M + H$) sind nicht zu beobachten. Das kann damit erklärt werden, dass die Arabinomannane durch ein Natrium-haltiges Lösungsmittel bei der Affinitäts-Chromatographie isoliert wurden (siehe 3.2.7.3). Der überwiegende Teil der Fragmente weist zweifache Natrium-Anlagerungen auf. Drei- oder mehrfach geladene Ionen sind bei Molekularmassen ab ca. 3000 Da in geringerem

Maße ebenfalls zu erwarten. Die Intensität solcher Signale verringert sich jedoch nach Dekonvolution zusätzlich, so dass diese möglicherweise an der Nachweisgrenze liegen. Zum Nachweis von Addukt-Ionen mit teilweise *zweifacher* Natrium-Anlagerung wurde das Fraktion A-Polysaccharid aus SmO durch Zugabe von Cäsiumjodid im Überschuss in eine andere Salzform überführt und erneut massenspektrometrisch gemessen. Anschließend konnten zum Teil Addukt-Ionen mit zweifacher Cäsium-Anlagerung nachgewiesen werden. Damit konnte eine mehrfache Natrium-Anlagerung bestätigt werden.

Zur exakten Berechnung der Kombinationsmöglichkeiten von Arabinosen und Mannosen wurden die Massen der monoisotopischen Peaks herangezogen. Dabei ist zu betonen, dass durch starke Überlagerung der Signale nicht immer eindeutig der Monoisotopen-Peak aus der Isotopen-Verteilung identifizierbar war. Nach der Dekonvolution handelt es sich bei den Spektren nicht um die Original-Messungen, sondern um künstlich erzeugte Spektren, so dass Signale zum Teil an der Nachweisgrenze liegen. Von einigen Signalen ließen sich jedoch aus der Isotopen-Verteilung eindeutig die Monoisotopen-Peaks identifizieren, die zur Berechnung herangezogen wurden. Die exakte Massen-Berechnung der Fragmente ergibt sich aus der Summe der monoisotopischen Massen der einzelnen Zucker-Reste unter Addition der Masse eines Wasser-Moleküls und eines Natrium-Atoms (zweier Natrium-Atome) nach Subtraktion der Masse eines Protons (zweier Protonen):

$$m/z = (a \cdot m_{\text{Ara}}) + (b \cdot m_{\text{Man}}) + m_{\text{H}_2\text{O}} + (c \cdot m_{\text{Na}}) - (c \cdot m_{\text{H}})$$

Die Differenzen zwischen gemessenen und berechneten Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen wurden in Fehlern angegeben. Neben den absoluten Fehlerangaben in atomaren Milli-Masseneinheiten wurden auch die relativen Massenabweichungen gemäß unten aufgeführter Gleichung in ppm berechnet:

$$\Delta_m \text{ [ppm]} = \frac{m/z_{\text{gemessen}} - m/z_{\text{theoret}}}{m/z_{\text{theoret}}} \cdot 10^6$$

Die Fehlerangabe in ppm ist anders als die absolute Massenabweichung umgekehrt proportional zur Masse. Das heißt, derselbe absolute Fehler ist bei einem Ion von geringer Molekularmasse relativ groß, bei einem hochmolekularen Ion verhältnismäßig gering.

Eine Übersicht über die gemessenen und berechneten Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse der Signale mit ihren Fragmenten aus Zucker-Resten zeigt Tabelle 6. Alle berechneten und gemessenen Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (mit Ausnahme des Fragments **16**) sind mit maximaler Abweichung von 4,3 ppm in guter Übereinstimmung.

Einige Cluster sind auffällig und lassen sich folgendermaßen erklären:

Peak **16** (m/z 3837,232) kann einem Fragment aus 20 Arabinosen und sieben Mannosen unter Anlagerung von zwei Natrium-Atomen entsprechen. Das errechnete Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von m/z 3837,204 weicht mit 7,3 ppm (hinsichtlich der gerätespezifischen Massengenauigkeit von unter 5 ppm) verhältnismäßig stark ab. Jedoch ergibt keine andere Kombination aus ausschließlich Mannosen und Arabinosen eine theoretische Masse von $3837,232 \pm 0,004$ (= 5 ppm). Aus diesem Fragment kann das Fragment **15** (m/z 3309,032) durch Abspaltung von vier Arabinose-Resten ($\Delta 528 = 4 \times 132$) entstanden sein ($m/z_{\text{theoret.}}$ 3309,035). Unter Abgang von zwei Mannosen kann dieses Fragment wiederum zu Peak **13** (m/z 2984,921) mit 16 Arabinosen und fünf Mannosen ($m/z_{\text{theoret.}}$ 2984,929) geführt haben. Nach weiterer Abspaltung von einer Mannose zu Peak **12** (m/z 2822,871; $m/z_{\text{theoret.}}$ 2822,876) und Abgang einer Arabinose kann Peak **10** (m/z 2690,831; $m/z_{\text{theoret.}}$ 2690,834) mit 15 Arabinosen und vier Mannosen unter Anlagerung von zwei Natrium-Atomen entstanden sein. Von diesem Fragment ausgehend lässt sich ein Cluster über Peak **9** (m/z 2558,791; $m/z_{\text{theoret.}}$ 2558,792) und Peak **7** (m/z 2396,730; $m/z_{\text{theoret.}}$ 2396,739) und eines über Peak **8** (m/z 2426,743; $m/z_{\text{theoret.}}$ 2426,750) zu Peak **6** (m/z 1978,622; $m/z_{\text{theoret.}}$ 1978,623) und weiterhin über die Peaks **5** (m/z 1868,563; $m/z_{\text{theoret.}}$ 1868,570), **4** (m/z 1846,573; $m/z_{\text{theoret.}}$ 1846,581) und **3** (m/z 1420,438; $m/z_{\text{theoret.}}$ 1420,444) bis Peak **2** (m/z 964,292; $m/z_{\text{theoret.}}$ 964,296) mit sieben Arabinosen unter Anlagerung von einem Natrium-Atom verfolgen.

Ein weiteres Cluster kann von dem Fragment **16** (m/z 3837,232; $m/z_{\text{theoret.}}$ 3837,204) über die Peaks **14** (m/z 3086,961; $m/z_{\text{theoret.}}$ 3086,961), **12** (m/z 2822,871; $m/z_{\text{theoret.}}$ 2822,876) zu Peak **10** (m/z 2690,831; $m/z_{\text{theoret.}}$ 2690,834) usw. durch Abspaltung von Hexosen und/oder Pentosen erklärt werden (siehe oben).

Ausgehend von Peak **13** (siehe oben) können alle Fragmente bis hin zu Peak **2** (siehe oben) unter Abspaltung von Hexosen und/oder Pentosen verfolgt werden.

Tabelle 6: Übersicht über die monoisotopischen gemessenen und berechneten Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse der Fragmente des Fraktion B-Arabinomannans aus SmO nach ESI FT-MS.

Die Identifizierung der Pentosen als Arabinose- und der Hexosen als Mannose-Reste ergibt sich aufgrund der Neutralzucker-Bestimmungen. Die Nummerierung der Peaks bezieht sich auf Abbildung 31.

Peak	m/z_{gemessen}	Fragment	$m/z_{\text{theoret.}}$	Δ_m absolut [mmu]	Δ_m relativ [ppm]
1	892,271	[4 Ara + 2 Man + Na - H]	892,274	3	3,4
2	964,292	[7 Ara + Na - H]	964,296	4	4,1
3	1420,438	[8 Ara + 2 Man + Na - H]	1420,444	6	4,2
4	1846,573	[10 Ara + 3 Man + Na - H]	1846,581	8	4,3
5	1868,563	[10 Ara + 3 Man + 2 Na - 2 H]	1868,570	7	1,6
6	1978,622	[11 Ara + 3 Man + Na - H]	1978,623	1	0,5
7	2396,730	[14 Ara + 3 Man + 2 Na - 2 H]	2396,739	9	3,8
8	2426,743	[13 Ara + 4 Man + 2 Na - 2 H]	2426,750	7	2,9
9	2558,791	[14 Ara + 4 Man + 2 Na - 2 H]	2558,792	1	0,4
10	2690,831	[15 Ara + 4 Man + 2 Na - 2 H]	2690,834	3	1,1
11	2720,843	[14 Ara + 5 Man + 2 Na - 2 H]	2720,845	2	0,7
12	2822,871	[16 Ara + 4 Man + 2 Na - 2 H]	2822,876	5	1,8
13	2984,921	[16 Ara + 5 Man + 2 Na - 2 H]	2984,929	8	2,7
14	3086,961	[18 Ara + 4 Man + 2 Na - 2 H]	3086,961	0	0,0
15	3309,032	[16 Ara + 7 Man + 2 Na - 2 H]	3309,035	3	0,9
16	3837,232	[20 Ara + 7 Man + 2 Na - 2 H]	3837,204	28	7,3

Diese dargestellten Cluster sind nicht zwingend Serien, in denen ein Fragment aus einem anderen hervorgeht. Theoretisch können beispielsweise zwei Fragmente (siehe Peak 12 und 13, Tabelle 6), die sich nur in der Masse eines Zucker-Restes unterscheiden durch anschließende Fragmentierung unter Abspaltung eines Zucker-Restes auseinander hervorgegangen sein. Andererseits können sie unabhängig voneinander bei der Ionisation aufgrund der Heterogenität des Polysaccharids entstanden sein und eine andere Struktur, wie Zucker-Sequenz und/oder Bindungsart, aufweisen.

Auffällig ist, dass alle signalintensiven Fragmente mehr Arabinose- als Mannose-Reste aufweisen. Dabei kommt in jedem Fragment mindestens die doppelte Anzahl von Arabinosen wie von Mannosen vor. Im Durchschnitt sind sogar viermal so viele Arabinosen im Vergleich zu Mannosen pro Fragment vorhanden.

Das Vorhandensein von überwiegend Arabinosen ist in Übereinstimmung mit den zuvor durchgeführten Neutralzucker-Bestimmungen (siehe 4.4.2.1) und Methylierungsanalysen (siehe 4.4.2.2.2).

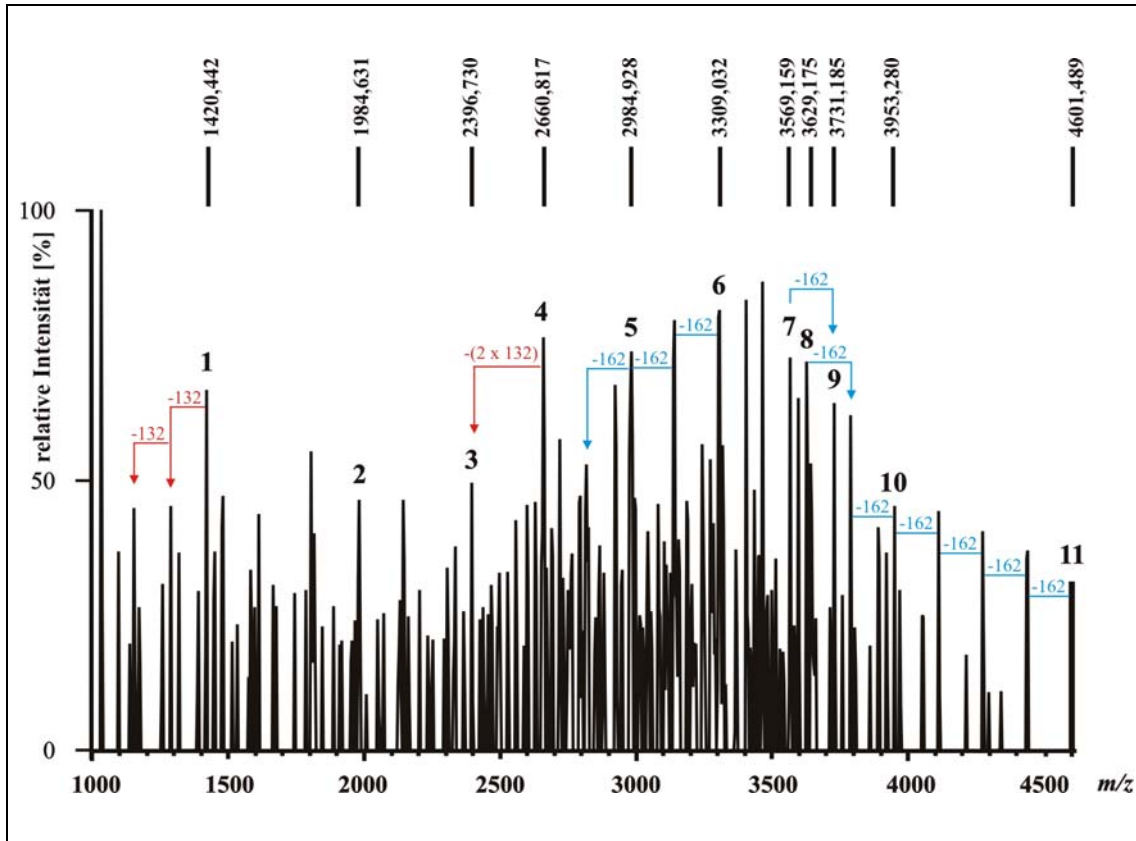


Abbildung 32: ESI-Massenspektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmT.

Die Messung wurde im positiven Ionenmodus aufgenommen. Die Kapillar-Exit-Spannung betrug 250 V. Das Spektrum wurde anschließend Ladungs-dekonvolviert. Die angegebenen m/z -Werte entsprechen denen der Monoisotopen-Peaks.

Abbildung 32 zeigt ein dekonvolviertes ESI-Massenspektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmT. Das Spektrum zeigt zwischen m/z 1100 und m/z 4600 zahlreiche Signale mit charakteristischen Differenzen von $\Delta 22$, $\Delta 30$, $\Delta 132$ und $\Delta 162$ amu, die auf Massenunterschiede von Natrium, Pentosen und Hexosen zurückzuführen sind (siehe oben). Die intensivsten Signale liegen in dem Bereich von m/z 2660 bis m/z 3660. Auch in diesem Spektrum treten keine weiteren Differenzen auf, die auf Substitutionen der Zucker, andere Monosaccharide außer Pentosen und Hexosen oder Kontaminationen hinweisen. Auch dies ist damit in Übereinstimmung mit den zuvor durchgeführten Ergebnissen (siehe 4.4.2.1, 4.4.2.2).

Wie man diesem Spektrum entnimmt, liegen zahlreiche Signale stark überlagert vor, so dass die Isotopen-Verteilung schwer zu erkennen ist. Von einigen Signalen konnten dennoch die Monoisotopen-Peaks identifiziert werden, um Kombinationen aus Hexosen und Pentosen zu berechnen. Tabelle 7 stellt eine Übersicht über die gemessenen und berechneten Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse einiger Signale mit ihren Fragmenten aus Zucker-Resten dar.

Die berechneten und gemessenen Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse sind auch hier mit maximaler Abweichung von 5,0 ppm in guter Übereinstimmung. Einige Cluster können auch in diesem Spektrum erklärt werden. Mit einfacher Anlagerung von Natrium können folgende Fragmente berechnet werden: Von Peak **11** mit zehn Arabinosen und 20 Mannosen (m/z 4601,489; $m/z_{\text{theoret.}}$ 4601,479) kann durch Abspaltung von vier Mannose-Resten das Fragment **10** mit zehn Arabinosen und 16 Mannosen (m/z 3953,280; $m/z_{\text{theoret.}}$ 3953,268) entstanden sein und durch weitere Abspaltung von zwei Mannosen das Fragment **8** mit zehn Arabinosen und 14 Mannosen (m/z 3629,175; $m/z_{\text{theoret.}}$ 3629,162). Ein weiteres Cluster bilden die Peaks **9**, **7**, **2** und **1**, die ebenso Fragmente mit einfacher Natrium-Anlagerung darstellen, und möglicherweise auseinander hervorgehen.

Mit zweifacher Anlagerung von Natrium sind die Peaks **3**, **4**, **5** und **6** zu erklären. Aus dem Fragment **6** mit 16 Ara und sieben Man (m/z 3309,031; $m/z_{\text{theoret.}}$ 3309,035) können durch sequentielle Abspaltung von Mannosen und Arabinosen die Fragmente **5** und **4** bis **3** mit 14 Ara und drei Man (m/z 2396,731; $m/z_{\text{theoret.}}$ 2396,739) entstanden sein.

Auch an dieser Stelle ist zu erwähnen, dass theoretisch jedes Ion unabhängig von anderen durch zusätzlich induzierte Fragmentierung in der Ionenquelle entstanden sein kann und nicht zwingend aus anderen hervorgegangen sein muss.

Ein einziges Fragment besteht ausschließlich aus Mannosen (siehe **2**, Tabelle 7). Ein derartiges Fragment wurde in dem Arabinomannan aus SmO nicht nachgewiesen. Weiterhin fällt im Vergleich zu dem Spektrum des Arabinomannans aus SmO (siehe Abbildung 31) auf, dass dieses Spektrum (siehe Abbildung 32) ein Cluster mit Fragmenten mit mehr Mannosen als Arabinosen aufweist (**2**, **7** bis **11**, Tabelle 7), während ein Cluster Fragmente mit deutlich mehr Arabinosen aufweist (**1** und **3** bis **6**, Tabelle 7). Auch dies in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Neutralzuckerbestimmung (siehe 4.4.2.1) und Methylierungsanalyse (siehe 4.4.2.2).

Tabelle 7: Übersicht über die monoisotopischen gemessenen und berechneten Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse der Fragmente des Fraktion B-Arabinomannans aus SmT nach ESI FT-MS.

Die Identifizierung der Pentosen als Arabinose- und der Hexosen als Mannose-Reste ergibt sich aufgrund der Neutralzucker-Bestimmungen. Die Nummerierung der Peaks bezieht sich auf Abbildung 32.

Peak	m/z_{gemessen}	Fragment	$m/z_{\text{theoret.}}$	Δ_m absolut [mmu]	Δ_m relativ [ppm]
1	1420,442	[8 Ara + 2 Man + Na - H]	1420,444	2	1,4
2	1984,631	[12 Man + Na - H]	1984,634	3	1,5
3	2396,731	[14 Ara + 3 Man + 2 Na - 2 H]	2396,739	8	3,3
4	2660,817	[16 Ara + 3 Man + 2 Na - 2 H]	2660,824	7	2,6
5	2984,928	[16 Ara + 5 Man + 2 Na - 2 H]	2984,929	1	0,3
6	3309,031	[16 Ara + 7 Man + 2 Na - 2 H]	3309,035	4	1,2
7	3569,159	[12 Ara + 12 Man + Na - H]	3569,141	18	5,0
8	3629,175	[10 Ara + 14 Man + Na - H]	3629,162	5	1,4
9	3731,185	[12 Ara + 13 Man + Na - H]	3731,194	9	2,4
10	3953,280	[10 Ara + 16 Man + Na - H]	3953,268	12	3,0
11	4601,489	[10 Ara + 20 Man + Na - H]	4601,479	10	2,2

Die ESI-Spektren liefern neue Informationen über die Struktur der Arabinomannane. Die größten Fragmente bestehen in beiden Arabinomannanen aus Arabinosen und Mannosen. Es kommen kaum Fragmente mit ausschließlich Arabinosen oder Mannosen vor. Die Signale mit m/z 1420,44, m/z 2396,73 und m/z 3309,03 (siehe **3**, **7**, **15**, Tabelle 6; **1**, **3**, **6**, Tabelle 7) kommen in beiden Arabinomannanen vor. Dabei handelt es sich um Fragmente mit überwiegendem Arabinose-Anteil. Während das Spektrum aus SmO Fragmente mit mindestens 18 Arabinosen aufweist (siehe **14**, Tabelle 6), liefert das entsprechende Spektrum aus SmT Fragmente mit nicht mehr als 16 Arabinosen (siehe **4**, **5**, **6**, Tabelle 7). Andererseits wurden in der Messung des Arabinomannans aus SmT Fragmente mit bis zu 20 Mannosen nachgewiesen (siehe **11**, Tabelle 7). In der entsprechenden Messung von SmO wurden Fragmente mit nicht mehr als sieben Mannosen nachgewiesen (siehe **15**, **16**, Tabelle 6).

Auffällig ist auch, dass Fragmente mit überwiegend Mannose-Resten jeweils einfache Natrium-Anlagerungen aufweisen, während die Fragmente mit mehr Arabinosen zweifache Natrium-Anlagerungen zeigen. Die Ursache dafür ist zunächst nicht zu erklären.

Die ESI-Spektren der Fraktion A-Polysaccharide zeigten zu den Massendifferenzen von $\Delta 162$ zusätzliche Differenzen von $\Delta 176$. Diese sind auf das Vorhandensein methylierter Hexosen zurückzuführen, die zuvor bereits durch Neutralzuckerbestimmungen (siehe 4.4.2.1) und Methylierungsanalysen (siehe 4.4.2.2.1.2) nachgewiesen wurden. Beide Spektren zeigen eine ähnliche charakteristische Verteilung von Signalen im Bereich von m/z 1000 bis m/z 3800. Die Messungen lieferten einige identische Signale bei m/z 1976,7, m/z 3024,1, m/z 3686,3. Die Berechnung theoretischer Massen ist durch die Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten von Pentosen, Hexosen und Methylhexosen äußerst schwierig. Die vorangegangenen Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich bei den Fraktion A-Polysacchariden nicht um Reinisolate handelt. Dies erschwert die Interpretation der Spektren zusätzlich. Für jede Kombination muss berücksichtigt werden, dass bei Molekularmassen von ca. 1000 Da und mehr mehrfach geladene Addukt-Ionen entstanden sein können, dessen Massen nach Dekonvolution dementsprechend um 22 amu erhöht sind. Somit liefert jedes Signal eine Vielzahl von möglichen Kombinationen. Da die notwendigen Monoisotopenpeaks nicht immer eindeutig erkennbar waren, konnten generell keine Massenberechnungen durchgeführt werden. Das Signal bei m/z 1976,756 konnte als monoisotopischer Peak identifiziert werden. Rechnerisch sind für dieses Fragment folgende Kombinationen möglich:

[8 Pent + 5 Hex + 5 MeHex + Na – H]:	$m/z_{\text{theoret.}}$ 1976, 680
[4 Pent + 8 Hex + 8 MeHex + Na – H]:	$m/z_{\text{theoret.}}$ 1976, 716
[11 MeHex + Na – H]:	$m/z_{\text{theoret.}}$ 1976, 753

Das Fragment von 11 Methylhexosen unter Anlagerung eines Natrium-Atoms ist sehr wahrscheinlich. Die theoretische Masse von 1976,753 ist in optimaler Übereinstimmung.

Für das Fragment bei m/z 3685,356 sind rechnerisch u. a. folgende Kombinationen aus Zuckern möglich:

[14 Pent + 10 Hex + 1 MeHex + Na – H]: $m/z_{\text{theoret.}}$ 3685,188

[10 Pent + 10 Hex + 4 MeHex + Na – H]: $m/z_{\text{theoret.}}$ 3685,224

[6 Pent + 10 Hex + 7 MeHex + Na – H]: $m/z_{\text{theoret.}}$ 3685,261

[2 Pent + 10 Hex + 10 MeHex + Na – H]: $m/z_{\text{theoret.}}$ 3685,297

Keine dieser Kombinationsmöglichkeiten ist jedoch hinsichtlich des theoretischen Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses in ausreichender Übereinstimmung mit der gemessenen. Daher kann diesem Ion keine Zucker-Kombination zugeordnet werden. Ähnlich dazu konnten alle weiteren Peaks in den Spektren nicht erklärt werden.

4.4.2.4 Ergebnisse der NMR-Spektroskopie

Die Ergebnisse der NMR-Spektroskopie unterstützen die vorangegangenen physikochemischen Analysen.

In Abbildung 33 ist das eindimensionale ^1H -NMR-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmT dargestellt. Im Bereich der anomeren Protonen (5,5 – 4,5 ppm) liegen zwei dominante Signale mit chemischer Verschiebung, die typisch für Zucker von α -Konfiguration sind. Abbildung 34 zeigt das entsprechende ^1H -NMR-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmO. In der Region der anomeren Protonen liegen mindestens zehn Signale zum Teil überlappend vor. Schwache Signale zwischen 1,05 ppm und 2,8 ppm gehen auf gerinfügige Kontaminationen sowie Signale bei 1,9 ppm auf Essigsäure zurück. Das Vorhandensein von Fettsäuren kann für beide Arabinomannane durch das Fehlen charakteristischer Signale um 0,9 ppm (für $-\text{CH}_3-$) und 1,3 ppm (für $-\text{CH}_2-$) ausgeschlossen werden.

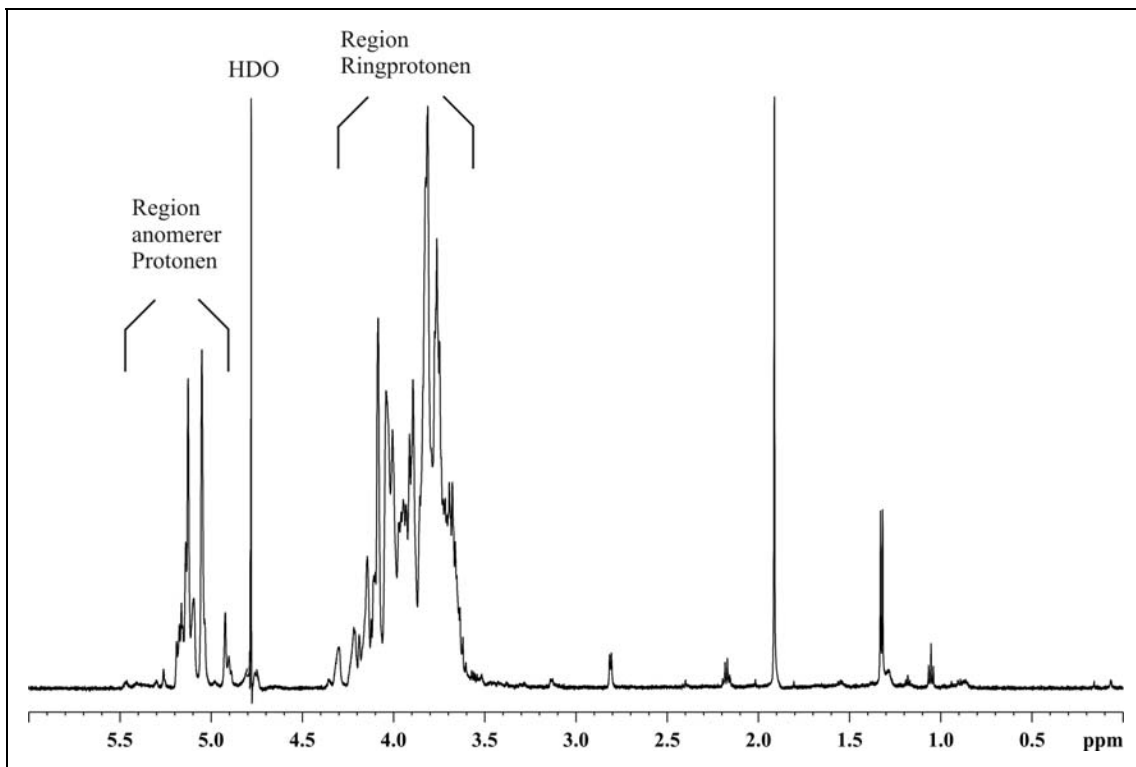


Abbildung 33: ^1H -NMR-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmT.

Die Messungen wurden bei 27°C in D_2O bei 600 MHz durchgeführt (interner Standard Aceton 2,225 ppm). Bezeichnung der Monosaccharid-Einheiten siehe Tabelle 8.

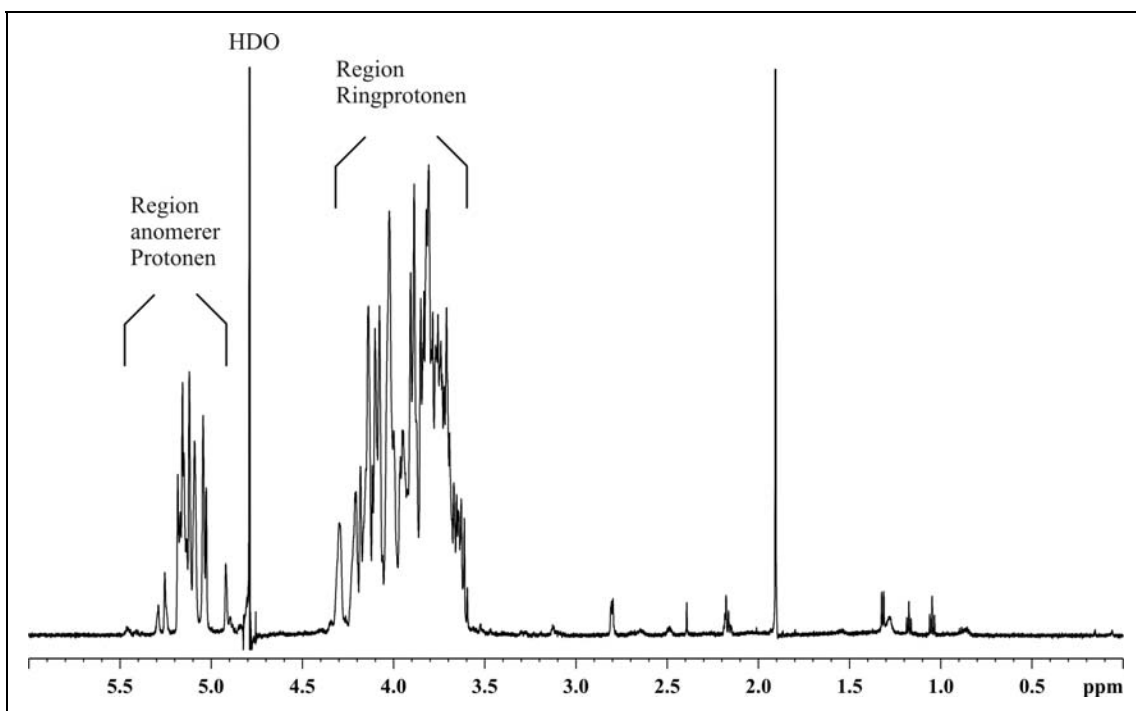


Abbildung 34: ^1H -NMR-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmO.

Die Messungen wurden bei 27°C in D_2O bei 600 MHz durchgeführt (interner Standard Aceton 2,225 ppm). Bezeichnung der Monosaccharid-Einheiten siehe Tabelle 9.

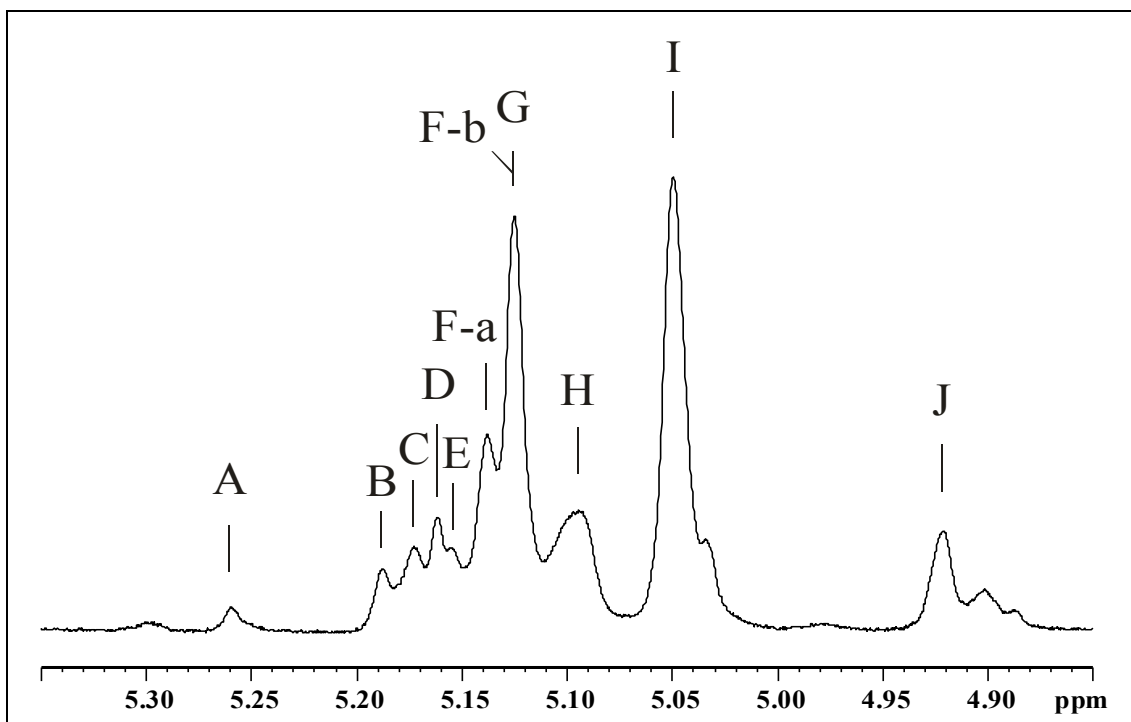


Abbildung 35: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmT. Die Messungen wurden bei 27°C in D_2O bei 600 MHz durchgeführt (interner Standard Aceton 2,225 ppm). Gezeigt ist die Region der anomeren Protonen (4,85 – 5,35 ppm). Bezeichnung der Monosaccharid-Einheiten siehe Tabelle 8.

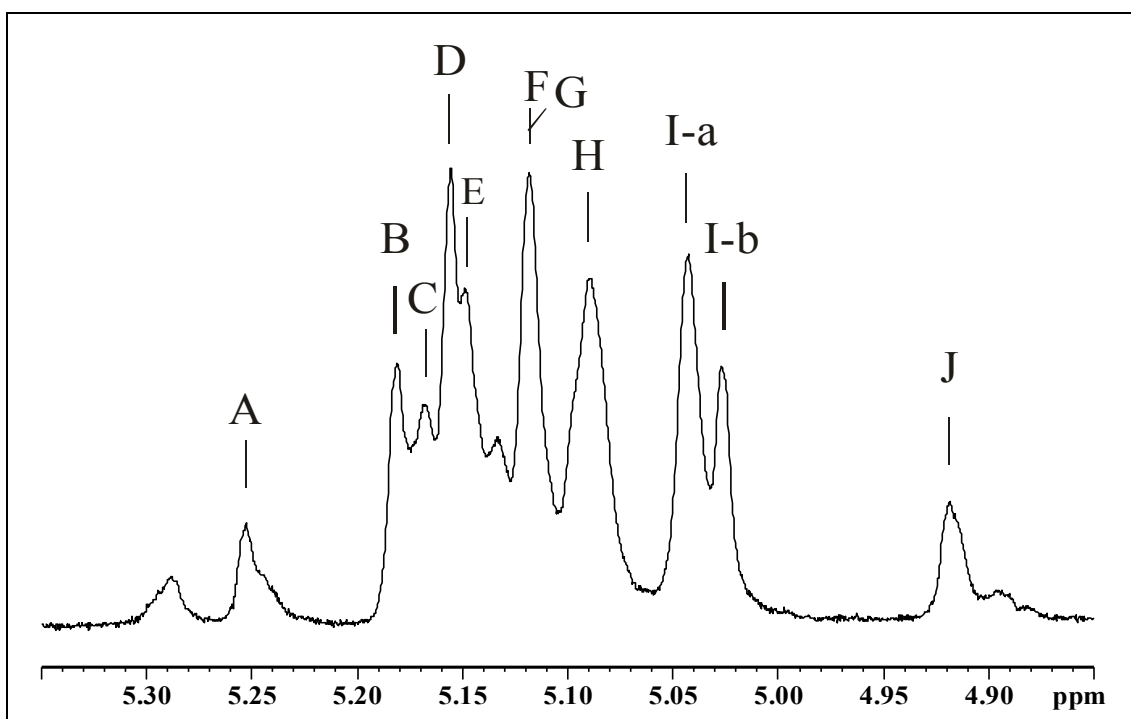


Abbildung 36: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmO. Die Messungen wurden bei 27°C in D_2O bei 600 MHz durchgeführt (interner Standard Aceton 2,225 ppm). Gezeigt ist die Region der anomeren Protonen (4,85 – 5,35 ppm). Bezeichnung der Monosaccharid-Einheiten siehe Tabelle 9.

Die eindimensionalen ^1H -NMR-Spektren (siehe Abbildung 35 und Abbildung 36) der Arabinomannane aus SmT und SmO zeigen im Bereich der anomeren Protonen (4,5 – 5,5 ppm) zehn zum Teil überlappende Signale (siehe **A – J**). Es wurden in beiden Spektren dieselben Signale unterschiedlicher Intensitäten identifiziert. Durch zweidimensionale NMR-Experimente, wie COSY (siehe Abbildung 37 und Abbildung 38) und HMQC (siehe Abbildung 39 und Abbildung 40) konnten überlappende Signale differenziert werden. So konnte in dem ^1H -NMR-Spektrum des Arabinomannans aus SmT das Signal bei 5,13 ppm (siehe Abbildung 35) durch zweidimensionale COSY- und HMQC-Spektren als drei Signale identifiziert werden. Ein H1-Signal bei 5,123 ppm korreliert mit H2 bei 4,300 ppm (siehe **G1,2** in Abbildung 37), ein weiteres H1-Signal bei 5,123 ppm zeigt ein Kreuzsignal im COSY-Spektrum mit H2 bei 4,042 ppm (siehe **F-c1,2** in Abbildung 37). Ein drittes Signal wurde bei 5,132 ppm (siehe Abbildung 35) durch Korrelation mit H2 bei 4,034 ppm (siehe **F-b1,2** in Abbildung 37) identifiziert. Daraus ergibt sich die Bezeichnung der Monosaccharid-Einheiten. Versalien **A** bis **J** kennzeichnen unterschiedliche Monosaccharid-Reste. Die Zusätze **-a** bis **-c** unterscheiden identische Reste desselben Substitutionsmusters mit anderer chemischer Verschiebung (aufgrund von unterschiedlichen Positionen innerhalb des Moleküls). Weiterhin wurden zwei überlappende Signale bei 5,095 ppm (siehe **H** in Abbildung 35) als 5,089 ppm (siehe **H-b** in Abbildung 39 und **H-b1,2** in Abbildung 37) und 5,098 ppm (siehe **H-a** in Abbildung 39 und **H-a1,2** in Abbildung 37) in zweidimensionalen Spektren differenziert. Das größte Signal bei 5,045 ppm (siehe **I** in Abbildung 35) ließ sich auf dieselbe Weise in zwei Signale bei 5,031 ppm (siehe **I-b** in Abbildung 39 und **I-b1,2** in Abbildung 37) und 5,048 ppm (siehe **I-a** in Abbildung 39 und **I-a1,2** in Abbildung 37) trennen.

Analog dazu wurden in dem ^1H -NMR-Spektrum des Arabinomannans aus SmO (siehe Abbildung 36) überlappende Signale durch zweidimensionale Experimente differenziert. Das Signal bei 5,12 ppm (siehe Abbildung 36) wurde als zwei Signale bei 5,116 ppm (siehe **G1,2** in Abbildung 38) und 5,132 ppm (siehe **F1,2** in Abbildung 38) identifiziert. Dementsprechend wurden die Signale **H** (5,09 ppm) und **C** (5,17 ppm) in Abbildung 36 weiter in **H-a**, **H-b** und **H-c** sowie in **C-a** und **C-b** separiert (siehe Abbildung 38).

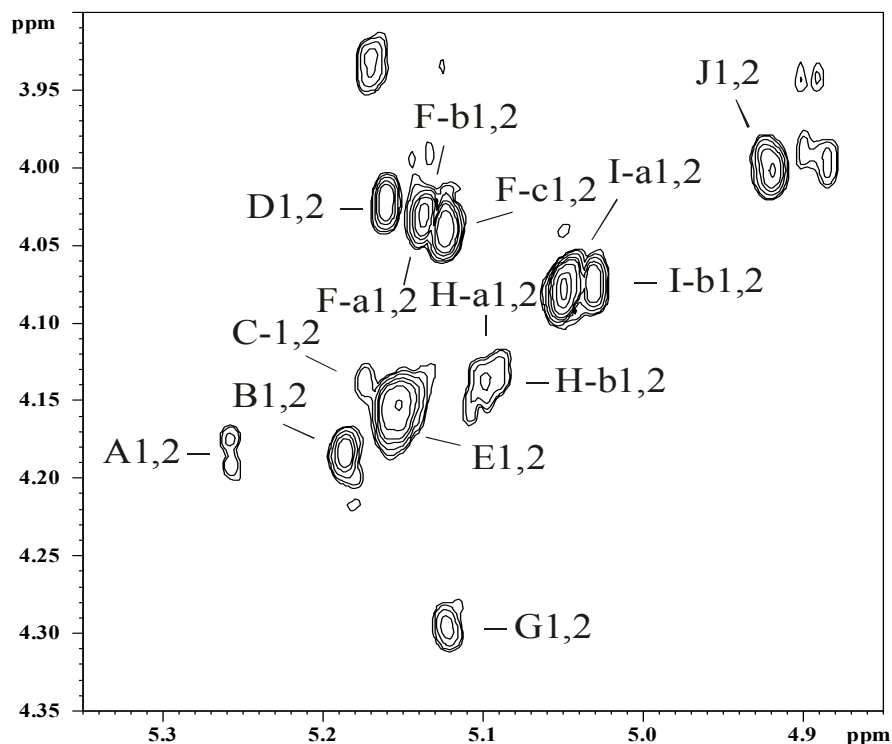


Abbildung 37: ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmT.

Die Messungen wurden bei 27°C in D_2O bei 600 MHz durchgeführt (interner Standard Aceton 2,225 ppm). Gezeigt ist die Region der anomeren Protonen (4,85 – 5,35 ppm). Bezeichnung der Monosaccharid-Einheiten siehe Tabelle 8.

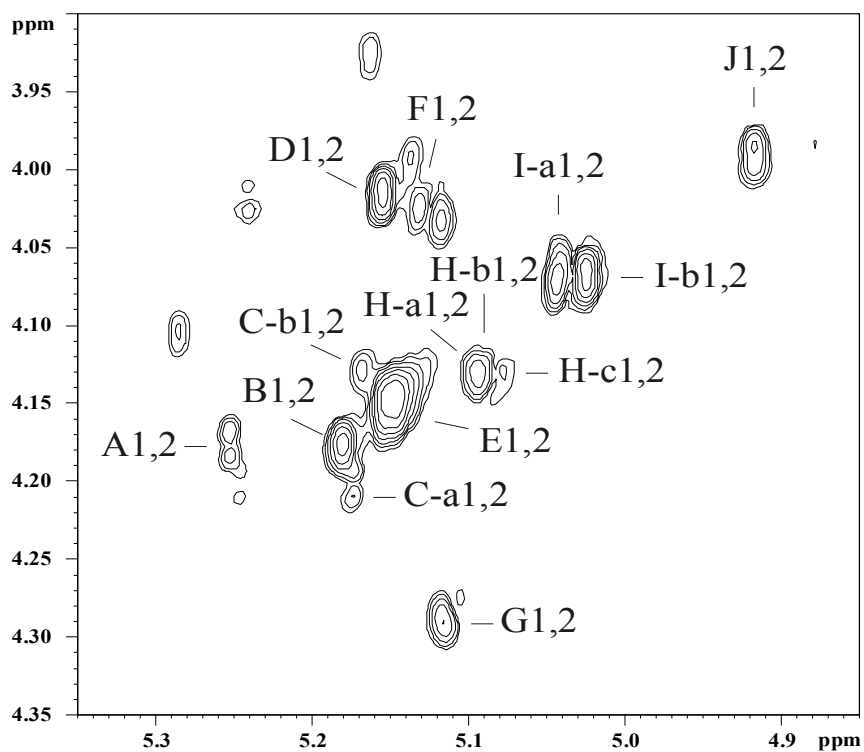


Abbildung 38: ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmO.

Die Messungen wurden bei 27°C in D_2O bei 600 MHz durchgeführt (interner Standard Aceton 2,225 ppm). Gezeigt ist die Region der anomeren Protonen (4,85 – 5,35 ppm). Bezeichnung der Monosaccharid-Einheiten siehe Tabelle 9.

Die Zuordnungen der chemischen Verschiebung einzelner Protonen erfolgte durch COSY- und TOCSY-Spektren (TOCSY-Spektren nicht gezeigt). Die chemische Verschiebung der einzelnen Kohlenstoffatome wurde durch HMQC- und HMBC-Spektren ermöglicht. Es wurden ausschließlich Zuckerreste in α -Konfiguration identifiziert. Für alle Mannose-Reste wurde diese Konfiguration durch Bestimmung der Kopplungskonstanten von $J_{H1,C1} > 170$ Hz in einem HMQC-Experiment ohne Entkopplung (Spektren nicht gezeigt) festgelegt. Die Zuordnung der glycosidischen Konfiguration für alle Arabinose-Reste war allein anhand der chemischen Verschiebung des jeweiligen C1 möglich.

Es wurden in dem Arabinomannan aus SmT sechs verschiedene Arabinose-Reste zugeordnet (**A**, **B**, **C**, **G**, **H-a** und **H-b** in Tabelle 8), die ausschließlich in furanosidischer Ringform vorliegen. Die Signallagen der einzelnen ^{13}C -Signale wurden mit denen unsubstituierter Monosaccharide verglichen [350] und führten zur Identifizierung substituierter Kohlenstoffatome. So war die C2-Resonanz der Ara **A** um ca. 2,4 ppm zum Tieffeld hin (Substitution an O2) verschoben und damit Ara **A** als 2-substituiert identifiziert. Weitere Substitutionen wurden aufgrund fehlender Zuordnung der restlichen Ringprotonen nicht nachgewiesen. Desgleichen wurde Ara **B** (Δ 2,4 ppm) als 2-substituierte Ara identifiziert. Für Ara **C** kann eine Substitution an O2 ausgeschlossen werden, obwohl die chemische Verschiebung für C2 mit 76,0 – 80,9 nicht eindeutig festgelegt ist. Für Ara **G** ist die C3-Resonanz aufgrund des Glycosylierungseffektes um ca. 2,4 ppm zum Tieffeld verschoben. Damit konnte Ara **G** als 3-substituierte Ara identifiziert werden. Ob es sich dabei um eine 3,5-substituierte Ara handelt, wie sie aufgrund der Methylierungsanalyse (siehe 4.4.2.2.2) als Bestandteil (~16 mol%) dieses Arabinomannans nachgewiesen wurden, ist aufgrund der fehlenden Zuordnung restlicher Protonen (H4, H5, H5') nicht eindeutig. Die C5-Resonanzen waren für Ara **H-a** und Ara **H-b** jeweils um etwa 2,2 ppm zum Tieffeld verschoben und zeigen damit Substitutionen an O5 an. Neben diesen Arabinose-Resten wurden acht verschiedene Mannose-Reste identifiziert (**D**, **E**, **F-a**, **F-b**, **F-c**, **I-a**, **I-b** und **J** in), die ausschließlich pyranosidisch vorliegen. Die chemische Verschiebung der C2 von jeweils Man **D** und Man **E** zeigen im Vergleich zu terminalen Mannosen [351] eine Substitution an O2 an (Δ 3,6 ppm für C2_{Man D} bzw. Δ 2,9 ppm für C2_{Man E}). Für Man **D** und Man **E** sind weitere Substitutionen möglich, insbesondere an O6, da aufgrund der Methylierungsanalyse als einzige 2-gebundene disubstituierte Mannose eine 2,6-Man zu erwarten ist (siehe 4.4.2.2.2).

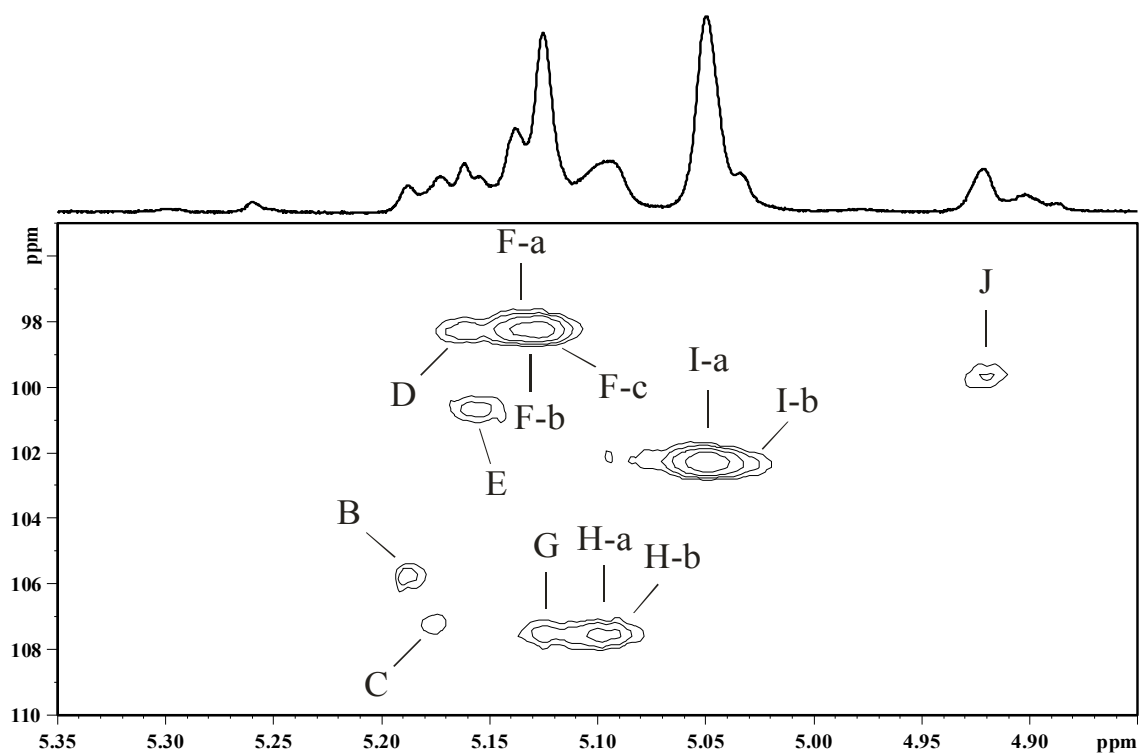


Abbildung 39: Ausschnitt aus dem HMQC-NMR-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmT.

Bedingungen siehe Abbildung 35. Gezeigt ist die Region der anomeren Protonen (4,5 – 5,35 ppm). Bezeichnung der Monosaccharid-Einheiten siehe Tabelle 8.

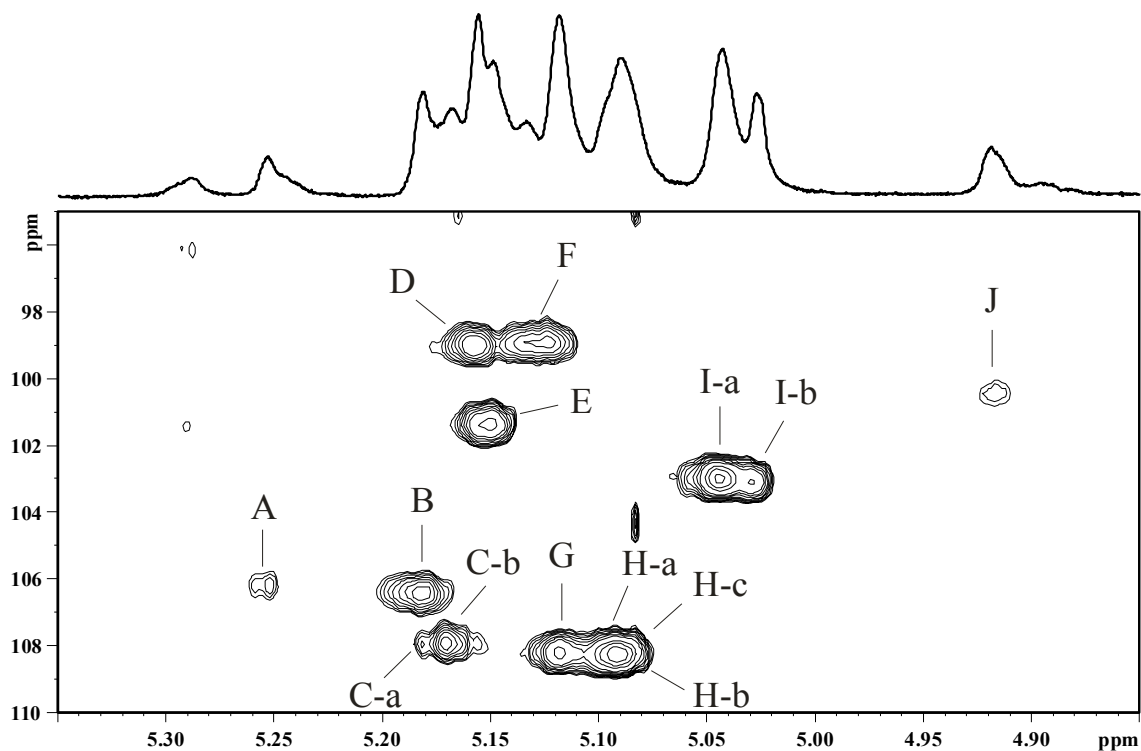


Abbildung 40: Ausschnitt aus dem HMQC-NMR-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmO.

Bedingungen siehe Abbildung 36. Gezeigt ist die Region der anomeren Protonen (4,5 – 5,4 ppm). Bezeichnung der Monosaccharid-Einheiten siehe Tabelle 9.

Die Bestimmung weiterer Substitutionen ist wegen fehlender Zuordnung der Resonanzen an H3 (bei Man **E**) H4, H5 und im Speziellen an H6/H6' nicht möglich. Man **F-a**, Man **F-b** und Man **F-c** wurden als 2,6-substituierte Mannosen (siehe oben) identifiziert, da jeweils C2 und C6 Tieffeld-verschoben erscheinen (ca. $\Delta 5,6$ ppm für je C2 und etwa $\Delta 2,4$ ppm für je C6). Die Resonanzen der C2, C3, C4 und C6 der Man **I-a** und Man **I-b** zeigen keine auffälligen Abweichungen, die auf Substitutionen hinweisen. Sie wurden daher jeweils als terminale Mannosen identifiziert. Man **J** zeigt bezüglich C6 eine Tieffeld-Verschiebung von $\Delta 1,3$ ppm. Damit handelt es sich um eine 6-substituierte Mannose.

Entsprechend wurden die Substitutionen der Zuckerreste des Arabinomannans aus SmO (siehe Tabelle 9) festgelegt.

Tabelle 8: ¹H-NMR-Daten des Arabinomannans aus SmT.

Die Messungen wurden bei 27°C in D₂O bei 600 MHz durchgeführt (interner Standard Aceton 2,225 ppm). Zuordnungen der chemischen Verschiebungen erfolgten durch homonukleare ¹H,¹H-COSY und TOCSY sowie durch HMQC. Versalien A bis J kennzeichnen unterschiedliche Monosaccharid-Einheiten. Die Zusätze –a bis –c unterscheiden identische Monosaccharid-Reste desselben Substitutionsmusters mit anderer chemischer Verschiebung. n. b.: nicht bestimmt.

Zuckerrest	chemische Verschiebung (ppm)					
	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5/H-5' C-5	H-6/H-6' C-6
A	5,259	4,189	4,099	4,041	n.b.	-
2- α -Araf	105,4	87,0	n.b.	n.b.	n.b.	-
B	5,186	4,189	4,107	4,107	3,735/3,871	-
2- α -Araf	105,6	87,0	75,0	83,0	61,0	-
C	5,173	4,146	n.b.	n.b.	n.b.	-
α -Araf	107,0	76,0-80,9	n.b.	n.b.	n.b.	-
D	5,160	4,029	3,967	n.b.	n.b.	n.b.
2- α -Manp	98,2	76,7	70,4	n.b.	n.b.	n.b.
E	5,153	4,157	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
2- α -Manp	101,3	76,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
F-a	5,137	4,034	3,966	3,822	n.b.	3,763/3,906
2,6- α -Manp	98,1	78,7	70,3	66,4	n.b.	66,6
F-b	5,132	4,034	3,966	3,822	n.b.	3,763/3,906
2,6- α -Manp	98,1	78,6	70,3	66,4	n.b.	66,6
F-c	5,123	4,042	3,933	3,815	3,815	4,000/3,705
2,6- α -Manp	98,1	78,7	70,5	66,5	71,0	65,6
G	5,123	4,300	4,100	n.b.	n.b.	-
3- α -Araf	107,4	79,0	82,3	n.b.	n.b.	-
H-a	5,098	4,139	4,027	4,217	3,904/3,810	-
5- α -Araf	107,4	80,9	78,6	82,2	66,7	-
H-b	5,089	4,139	4,038	4,210	3,896/3,810	-
5- α -Araf	107,4	80,9	76,6	82,3	66,7	-
I-a	5,048	4,080	3,820	3,682	3,767	3,898/3,760
t- α -Manp	102,2	70,0	70,5	66,7	73,2	61,0
I-b	5,031	4,075	3,851	3,659	3,764	3,899/3,764
t- α -Manp	102,2	70,0	70,5	66,4	73,3	61,0
J	4,921	4,004	3,816	n.b.	n.b.	4,036/n.b.
6- α -Manp	99,6	69,9	70,5	n.b.	n.b.	65,5

Tabelle 9: ¹H-NMR-Daten des Arabinomannans aus SmO.

Die Messungen wurden bei 27°C in D₂O bei 600 MHz durchgeführt (interner Standard Aceton 2,225 ppm). Zuordnungen der chemischen Verschiebungen erfolgten durch homonukleare ¹H,¹H-COSY und TOCSY sowie durch HMQC. Versalien A bis J kennzeichnen unterschiedliche Monosaccharid-Einheiten. Die Zusätze –a bis –c unterscheiden identische Monosaccharid-Reste desselben Substitutionsmusters mit anderer chemischer Verschiebung. n. b.: nicht bestimmt. n. b.: nicht bestimmt.

Zuckerrest	chemische Verschiebung (ppm)					
	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5/H-5' C-5	H-6/H-6' C-6
A	5,252	4,179	4,092	4,031	3,850/3,733	-
2- α -Araf	106,1	87,8	n.b.	n.b.	n.b.	-
B	5,181	4,181	4,100	4,098	3,856/3,740	-
2- α -Araf	106,4	87,9	75,7	84,1	61,5	-
C-a	5,174	4,211	n.b.	n.b.	n.b.	-
α -Araf	107,9	83,0	n.b.	n.b.	n.b.	-
C-b	5,168	4,136	4,025	4,205	3,889/3,805	-
5- α -Araf	107,9	81,7	79,6	n.b.	67,3	-
D	5,156	4,020	3,955	n.b.	n.b.	n.b.
2- α -Manp	98,9	77,5	71,1	n.b.	n.b.	n.b.
E	5,151	4,151	4,114	4,018	3,739	3,839/3,704
2,6- α -Manp	101,3	76,7	74,9	70,9	74,1	68,9
F	5,132	4,025	3,954	n.b.	n.b.	n.b.
2,6- α -Manp	98,9	79,0	71,0	n.b.	n.b.	n.b.
G	5,116	4,292	4,097	n.b.	n.b.	-
3- α -Araf	108,1	79,8	83,8	n.b.	n.b.	-
H-a	5,097	4,138	4,014	4,226	3,795/3,897	-
5- α -Araf	108,2	81,7	77,4-79,5	83,0	67,3	-
H-b	5,089	4,137	4,013	n.b.	n.b.	-
α -Araf	108,2	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	-
H-c	5,085	4,132	4,030	n.b.	n.b.	-
α -Araf	108,2	81,7	n.b.	n.b.	n.b.	-
I-a	5,043	4,075	3,818	3,666	3,756	3,884/3,900
t- α -Manp	102,9	70,7	71,5	76,5	74,1	61,7
I-b	5,026	4,076	3,845	n.b.	n.b.	n.b.
α -Manp	103,0	70,8	71,3	71,3	n.b.	n.b.
J	4,918	3,993	3,844	n.b.	n.b.	n.b.
α -Manp	100,4	71,0	71,3	67,5	n.b.	n.b.

Die Primärstruktur der Arabinomannane wurde durch ROE-Experimente (siehe Abbildung 41 und Abbildung 42) anhand von interresidualen Kontakten bestimmt. In dem Arabinomannan aus SmT wurden dabei Kern-Overhauser-Effekte von dem Proton **D1** sowie von dem Proton **E1** zu dem Proton **B2** beobachtet. Damit sind jeweils 2-substituierte Mannose-Reste an Position 2 der Arabinose-Reste geknüpft. Weiterhin wurden interresiduale Effekte zwischen Proton **I-a1** und Proton **F-c2** beobachtet. Damit sind terminale Mannosen an Position 2 der 2,6-substituierten Mannosen gebunden. Ein NOE zwischen Proton **F-a1** und Proton **J6** zeigt die Substitution der 6-substituierten Mannose mit der 2,6-substituierten Mannosen an. Entsprechend liegt ein interresidualer Kontakt zwischen Proton **J1** und Proton **F6** vor. Damit liegt eine Kette aus 6- und 2,6-substituierten Mannosen vor, die über eine 1→6 Bindung miteinander verknüpft sind. Davon ist wiederum jede 2,6-substituierte Mannose an Position 2 mit terminalen Mannosen substituiert. Ferner liegt eine Verknüpfung mit terminalen Mannosen an Position 2 der 2-substituierten Mannosen vor. Diese Bindung wird durch den NOE zwischen Proton **I-b1** und Proton **D2** identifiziert.

Für das Arabinomannan aus SmO wurden folgende NOE beobachtet: Zwischen Proton **B1** und Proton **G3** wird die Bindung der 2-substituierten Arabinose an Position 3 der 3-substituierten Arabinose deutlich. Der interresiduale Effekt zwischen Proton **D1** und Proton **B2** zeigt die 1→2 Bindung zwischen 2-substituierter Arabinose und 2-substituierter Mannose. Der NOE zwischen Proton **G1** und Proton **C5** zeigt, dass die 5-substituierte Arabinose an Position 5 mit einer 3-substituierten Arabinose verknüpft ist. Kontakte zwischen Proton **J1** und **E6** sowie zwischen **I-b1** und **F2** zeigen einerseits, dass die 6-substituierten Mannosen an Position 6 und terminale Mannosen an Position 2 der 2,6-substituierten Mannosen geknüpft sind.

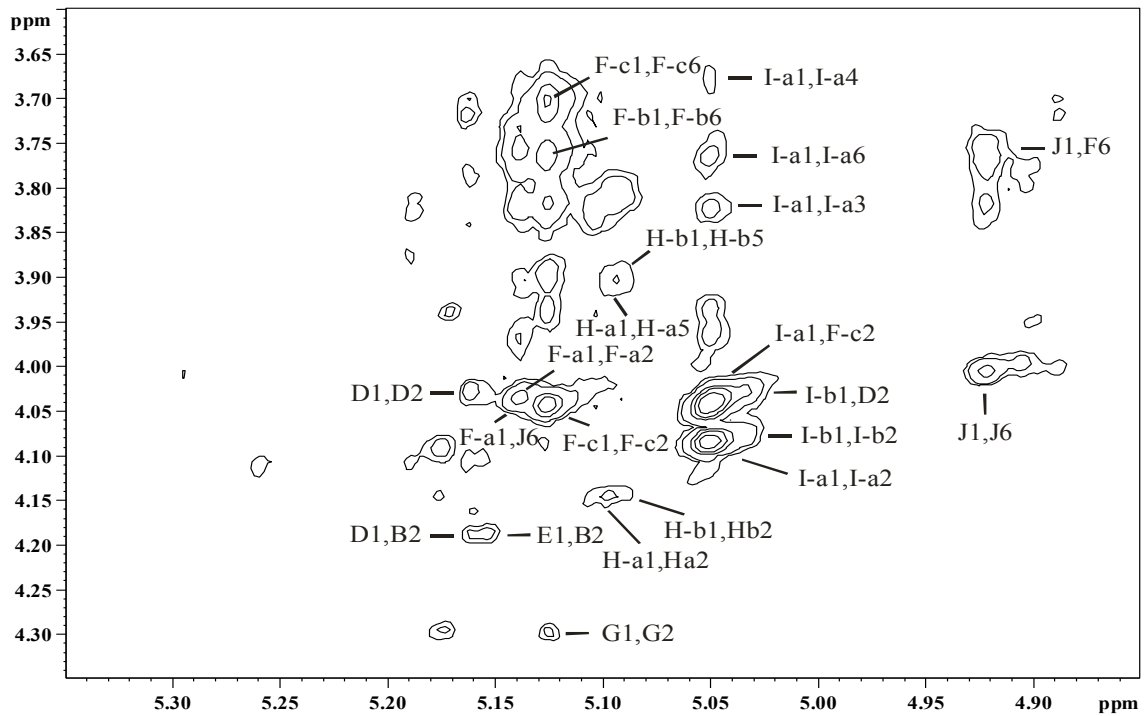


Abbildung 41: Ausschnitt aus dem ROESY-NMR-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmT.

Gezeigt ist die Region der anomeren Protonen (4,5 – 5,35 ppm). Die Messungen wurden bei 27°C in D₂O bei 600 MHz durchgeführt (interner Standard Aceton 2,225 ppm). Bezeichnung der Monosaccharid-Einheiten siehe Tabelle 8.

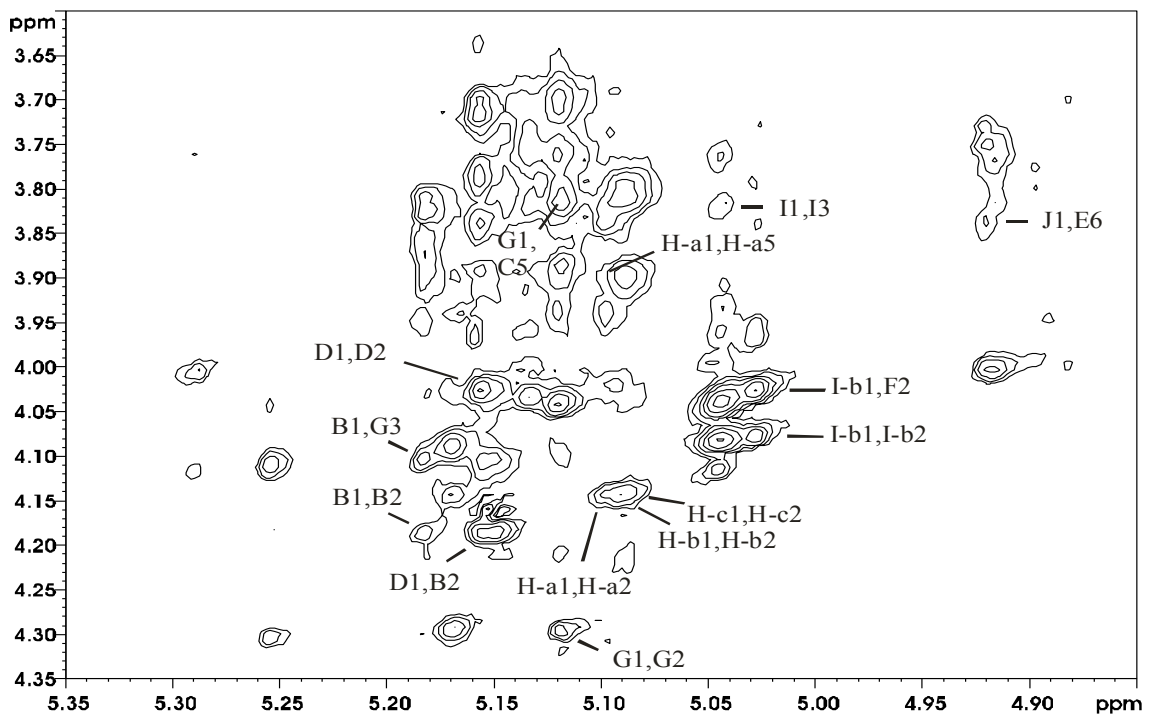


Abbildung 42: Ausschnitt aus dem ROESY-NMR-Spektrum des Fraktion B-Arabinomannans aus SmO.

Gezeigt ist die Region der anomeren Protonen (4,5 – 5,35 ppm). Die Messungen wurden bei 27°C in D₂O bei 600 MHz durchgeführt (interner Standard Aceton 2,225 ppm). Bezeichnung der Monosaccharid-Einheiten siehe Tabelle 9.

4.5 Untersuchungen zur biologischen Aktivität der Arabinomannane

Ob die isolierten Polysaccharide aus der Kapsel von *M. avium* biologische Aktivität besitzen, wurde durch *in vitro* Systeme getestet.

Dabei wurde die TNF- α -und IL-10-Freisetzung muriner Makrophagen und humaner dendritischer Zellen, sowie die INF- γ -Produktion humaner mononukleärer Zellen nach Stimulation mit diesen isolierten Arabinomannanen bestimmt.

Nach einer mykobakteriellen Infektion wird TNF- α als proinflammatorisches Zytokin von ruhenden Makrophagen sezerniert, um Lymphozyten an den Ort der Infektion zu rekrutieren und um lokale Entzündungsreaktionen zu induzieren. Von T-Lymphozyten sezerniertes INF- γ aktiviert Gewebsmakrophagen, die dann zur körpereigenen Abwehr beitragen. IL-10 gilt als immuninhibitorisches Zytokin und wird wahrscheinlich freigesetzt, um eine überschüssige Immunantwort zu unterdrücken (siehe 1.1.2.1.1). Um eine mögliche biologische Aktivität der isolierten mykobakteriellen Polysaccharide zu bestimmen, wurden diese Zytokine nach Stimulierung von Immunzellen gemessen, da es sich bei diesen Mediatoren um Substanzen handelt, die in Rahmen jeder Immunantwort auf eine Infektion eine Rolle spielen. Dabei wurden sowohl humane als auch murine Zellkulturen herangezogen.

In der Literatur ist beschrieben, dass Arabinomannan-Präparate aus *M. tuberculosis* immunmodulatorische Eigenschaften besitzen. Es wurde festgestellt, dass diese Substanzen im Maus-Modell eine Anti-Tumor-Wirkung hervorrufen [304;305]. Daher wurde *in vitro* getestet, ob die isolierten Arabinomannane ebenfalls immunmodulatorische Eigenschaften besitzen, die zur Zytotoxizität mononukleärer Zellen gegen eine humane Tumor-Zelllinie führen. Ferner wurde untersucht, ob die Arabinomannane direkt Apoptose zu induzieren vermögen.

4.5.1 TNF- α -Freisetzung stimulierter muriner Makrophagen und humaner dendritischer Zellen

Nach Stimulation muriner Knochenmarksmakrophagen mit den isolierten Arabinomannanen wurden in den Überständen die Konzentrationen an freigesetztem TNF- α gemessen. Jeweils 1 μ g und 10 μ g der Lipoglykan-Gemische (Fraktion A) und Arabino-

mannane (Fraktion B) aus SmO und SmT wurden als Stimuli eingesetzt. Nach 24 h Stimulation wurden die Konzentrationen in einem ELISA gemessen (siehe 3.3.14.1). In Abbildung 43 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

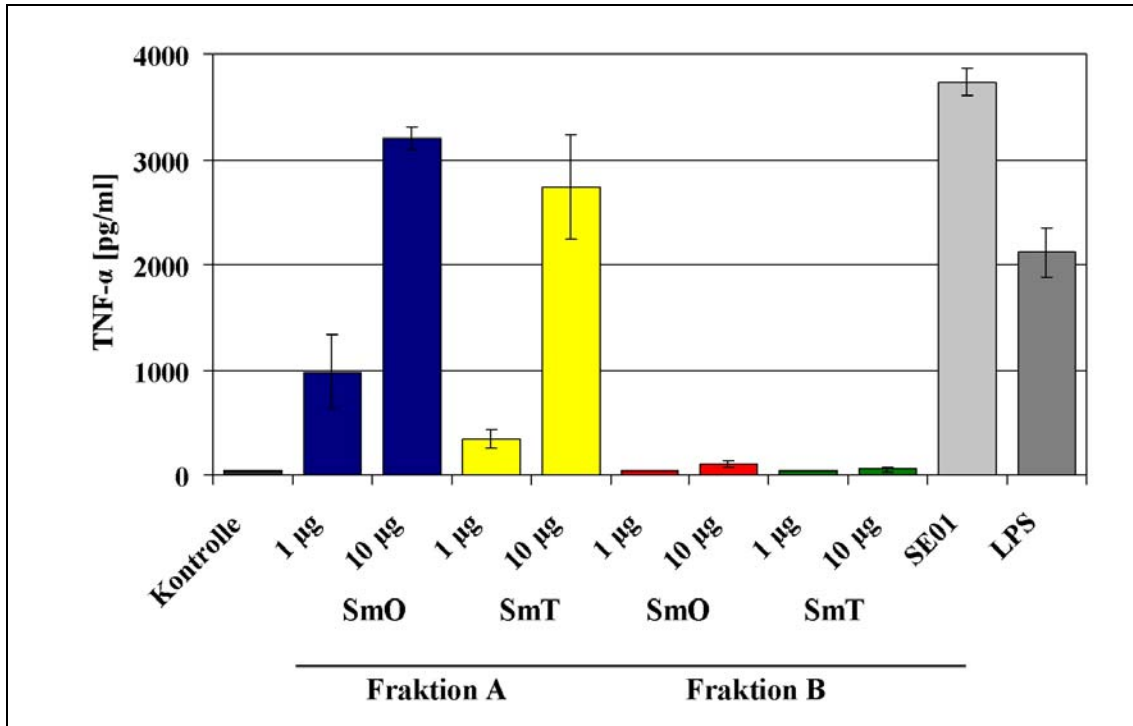


Abbildung 43: TNF- α -Freisetzung muriner Knochenmarks-Makrophagen nach Stimulation mit Fraktionen A und B aus SmO und SmT.

Jeweils 10^6 Makrophagen ml^{-1} wurden mit $1 \mu\text{g}$ bzw. $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ der Stimuli für 24 h bei $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ kultiviert. Als Negativ-Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Als Positiv-Kontrollen wurden die Makrophagen einerseits mit 10 ng ml^{-1} LPS aus *Salmonella enterica* sv. Friedenau Stamm H909 und andererseits mit *Mycobacterium avium* Stamm SE01 mit einem Verhältnis von 3 lebenden Bakterien pro Zelle stimuliert. In den Überständen wurden nach 24 h die Konzentrationen an TNF- α mittels eines ELISA bestimmt.

Dabei zeigt sich eindeutig, dass die Lipoglykan-Gemische (Fraktion A) TNF- α -Produktion durch Makrophagen induzieren. Dabei sind keine signifikanten Unterschiede zwischen SmO und SmT erkennbar. Im Mittel wurde nach Stimulation mit $10 \mu\text{g}$ des ConA-negativen Polysaccharids aus SmO eine TNF- α -Konzentration von 3203 pg ml^{-1} erreicht. Ähnlich dazu wurden durchschnittlich 2735 pg ml^{-1} TNF- α nach Stimulation mit der entsprechenden Substanz aus SmT gemessen. Damit liegen diese Werte zwischen den Konzentrationen, die die Positiv-Kontrollen LPS (2114 pg ml^{-1}) und *M. avium* (3733 pg ml^{-1}) induzieren. Somit sind die Lipoglykan-Gemische

(Fraktion A) hinsichtlich der Stimulation potenter als das Lipopolysaccharid. Im Vergleich zu den ganzen Mykobakterien als Kontrolle wird durch die Stimulation mit 10 µg der Substanz aus SmO 86% der TNF-α-Konzentration erreicht. Vergleichbar wurden 73% des Zytokin-Gehalts durch die Stimulation mit der entsprechenden Substanz aus SmT gemessen. Die Messungen bei 1 µg und 10 µg zeigen deutlich eine konzentrationsabhängige TNF-α-Produktion.

Die Arabinomannane (Fraktion B) zeigen hingegen keine Induktion von TNF-α nach Stimulation von Knochenmarksmakrophagen. Bei 10 µg der Stimuli wurden lediglich Konzentrationen von 105 pg ml⁻¹ (SmO) und 53 pg ml⁻¹ (SmT) gemessen. Damit liegen diese Werte nur unwesentlich höher als die der Negativ-Kontrolle (39 pg ml⁻¹).

Die gleichen Ergebnisse zeigten sich nach Stimulation humaner Zellen. Dabei wurden dendritische Zellen aus humanen mononukleären Zellen generiert, von denen 10⁶ ml⁻¹ mit jeweils 10 µg ml⁻¹ der Stimuli kokultiviert wurden (siehe 3.3.14.1.2). In Abbildung 44 sind die Ergebnisse dargestellt.

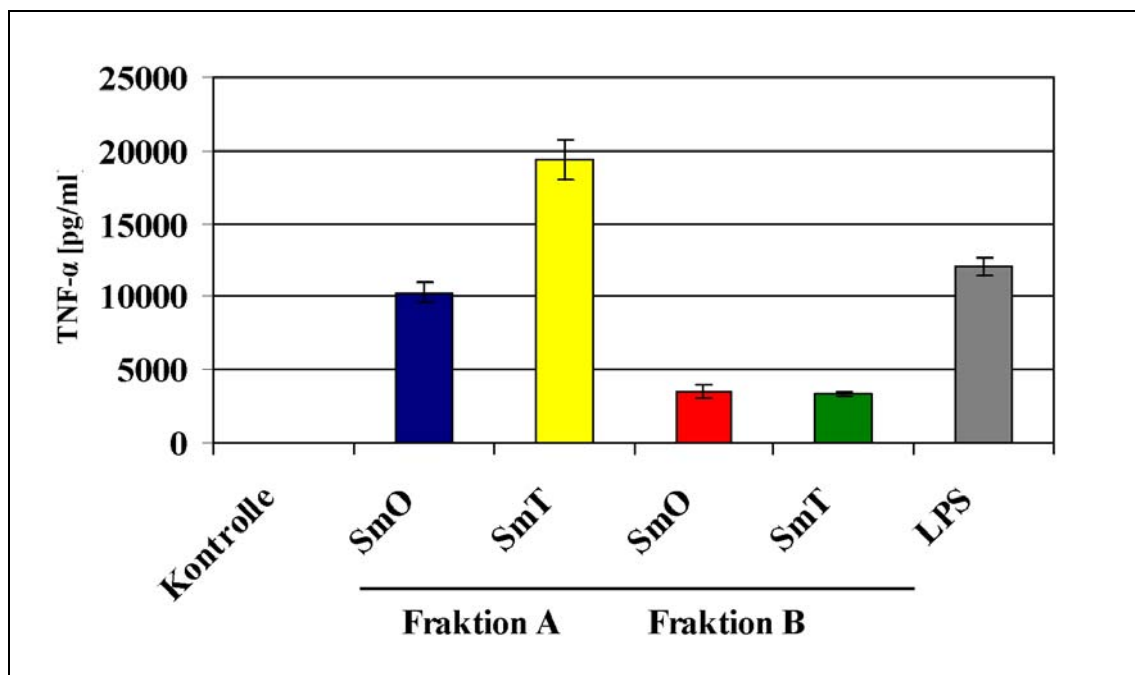


Abbildung 44: TNF-α-Freisetzung humaner dendritischer Zellen nach Stimulation mit Fraktionen A und B aus SmT und SmO.

Es wurden 10⁶ Zellen ml⁻¹ mit jeweils 10 µg ml⁻¹ der Stimuli für 18 h bei 37°C/5% CO₂ kultiviert. Als Negativ-Kontrolle wurden unreife dendritische Zellen verwendet. Als Referenz-Stimulus diente LPS aus *Salmonella enterica* sv. Minnesota, Stamm R345 (10 ng ml⁻¹). Die Konzentrationen an TNF-α in den Überständen wurden mittels eines ELISA bestimmt.

Die Lipoglykan-Gemische induzierten mit rund 10000 pg ml⁻¹ (SmO) und 19500 pg ml⁻¹ (SmT) eine vergleichsweise hohe TNF- α -Freisetzung. Durch LPS als Referenz-Stimulus wurde eine TNF- α -Konzentration von ca. 12000 pg ml⁻¹ erreicht. Damit war das Lipoglykan-Gemisch aus SmT potenter als LPS und etwa doppelt so potent wie das aus SmO. Die Arabinomannane (Fraktion B) zeigten eine relativ geringe Induktion von TNF- α . Anders als nach Stimulation der Maus-Makrophagen, wobei keine Zytokin-Freisetzung messbar war, zeigten diese Substanzen in humanen Zellen eine geringe Induktion von TNF- α mit rund 3600 pg ml⁻¹ und 3400 pg ml⁻¹.

Grundsätzlich liefern beide Experimente, die Stimulation muriner und humaner Zellen, übereinstimmende Ergebnisse. Die Lipoglykan-Gemische (Fraktion A) sind starke und die Arabinomannane (Fraktion B) schwache Induktoren für eine TNF- α -Freisetzung.

4.5.2 IL-10-Freisetzung stimulierter muriner Makrophagen und humaner dendritischer Zellen

In den Überständen stimulierter Maus-Makrophagen wurde die Konzentration des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 gemessen (siehe 3.3.14.3.1).

Die Messungen liefern prinzipiell die gleichen Ergebnisse wie die der TNF- α -Bestimmungen (siehe Abbildung 43) d. h. die Lipoglykan-Gemische induzieren eine relativ zu den Positiv-Kontrollen starke IL-10-Antwort (siehe Abbildung 45).

Die Lipoglykan-Gemische induzieren IL-10-Konzentrationen von rund 270 pg ml⁻¹ (SmO) und 130 pg ml⁻¹ (SmT). Auffällig ist, dass die Substanz aus SmO im Vergleich zu der aus SmT eine doppelt so hohe Freisetzung dieses Zytokins hervorruft, während die umgekehrte Situation hinsichtlich der TNF- α -Produktion zu beobachten ist (siehe Abbildung 44). Die Arabinomannane zeigen keine (SmO) bzw. eine äußerst geringe (SmT) Stimulation der Makrophagen, die zur Freisetzung von IL-10 führt.

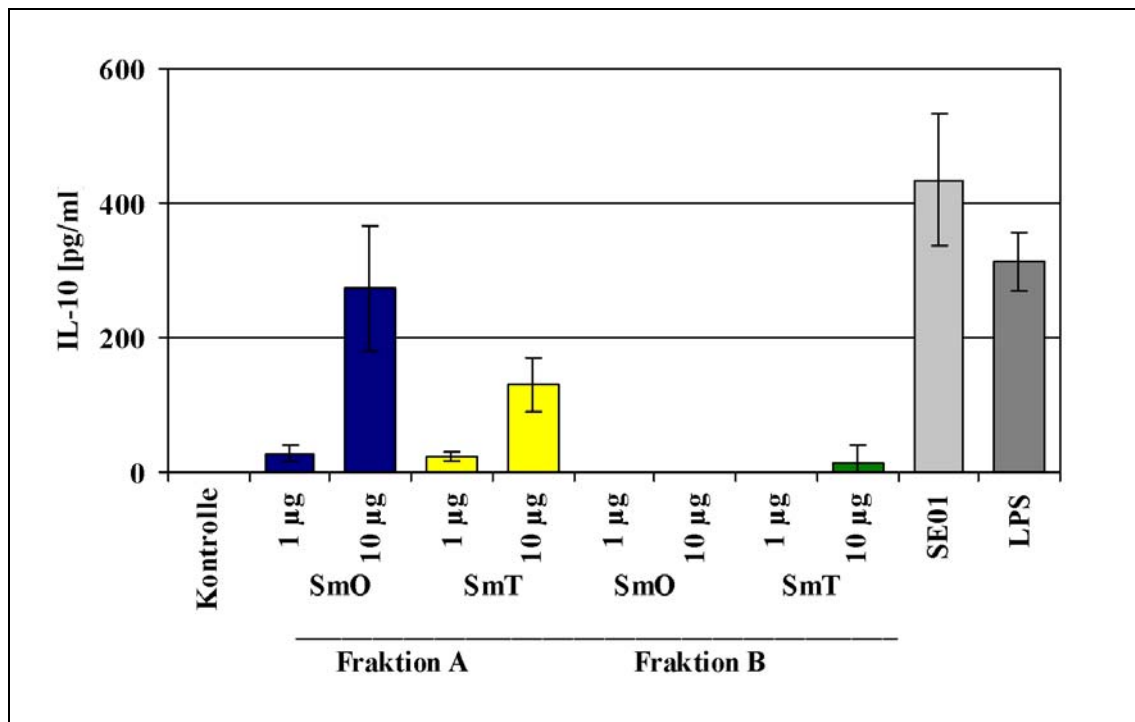


Abbildung 45: IL-10-Freisetzung muriner Knochenmarks-Makrophagen nach Stimulation mit Fraktionen A und B aus SmO und SmT.

10^6 Makrophagen ml^{-1} wurden mit jeweils $1 \mu\text{g}$ und $10 \mu\text{g}$ ml^{-1} der Stimuli für 24 h bei $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$ kultiviert. Als Negativ-Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Als Positiv-Kontrollen wurden Makrophagen einerseits mit 10 ng ml^{-1} Lipopolysaccharid aus *Salmonella enterica* sv. Friedenau Stamm H909 und andererseits mit *Mycobacterium avium* Stamm SE01 mit einem Verhältnis von 3 lebenden Bakterien pro Zelle stimuliert. In den Überständen wurden nach 24 h die Konzentrationen an IL-10 durch einen ELISA bestimmt.

Die IL-10-Messung wurde auch in Überständen von stimulierten humanen Zellen durchgeführt. Dabei wurden die dendritischen Zellen verwendet, die auch für die TNF- α -Messungen herangezogen wurden (siehe 3.3.14.3.2). Erwartungsgemäß induzierten die Lipoglykan-Gemische (Fraktion A) eine relativ hohe Produktion an IL-10, während die Arabinomannane (Fraktion B) nur eine geringe IL-Freisetzung hervorrufen (siehe Abbildung 46). SmT ($\sim 1600 \text{ pg ml}^{-1}$) zeigt dabei eine stärkere Wirkung als SmO ($\sim 870 \text{ pg ml}^{-1}$), anders als nach Stimulation muriner Zellen (siehe Abbildung 45), aber identisch mit den Ergebnissen der TNF- α -Messungen humaner Zellen (siehe Abbildung 44).

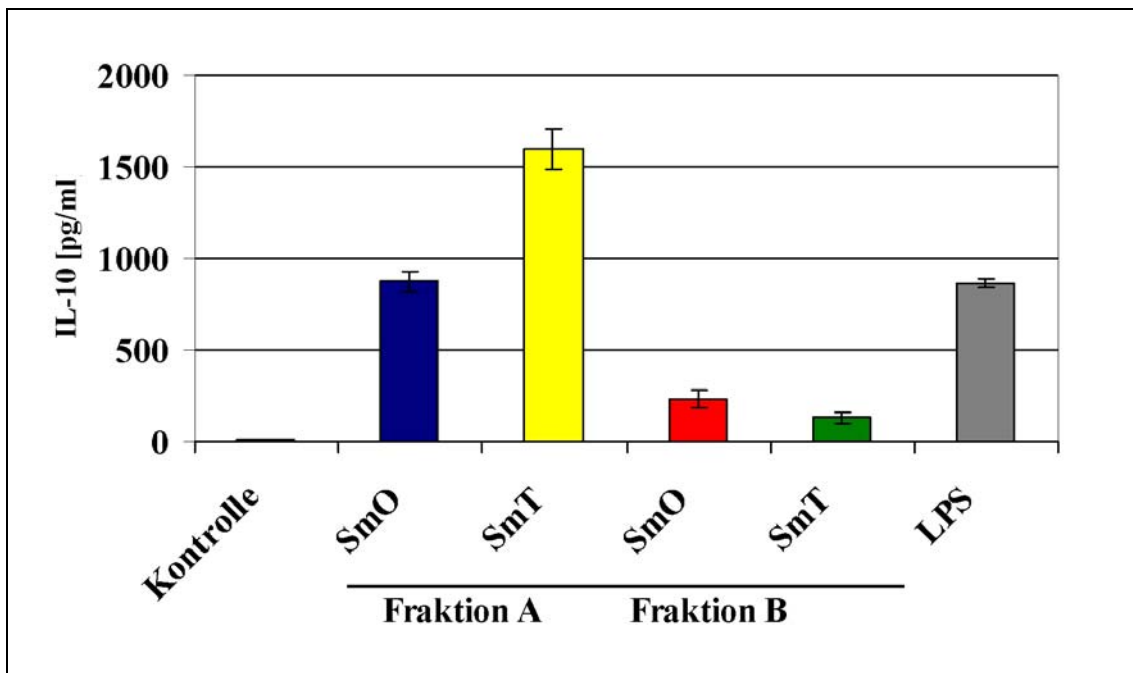


Abbildung 46: IL-10-Freisetzung humaner dendritischer Zellen nach Stimulation mit Fraktionen A und B aus SmT und SmO.

Es wurden 10^6 Zellen ml^{-1} mit jeweils $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ der Stimuli für 18 h bei $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$ kultiviert. Als Negativ-Kontrolle wurden unreife dendritische Zellen verwendet. Als Referenz-Stimulus diente Lipopolysaccharid aus *Salmonella enterica* sv. Minnesota, Stamm R345 (10 ng ml^{-1}). Die Konzentrationen an IL-10 in den Überständen wurden durch einen ELISA bestimmt.

Zusammenfassend haben die Zytokin-Messungen ergeben, dass die Induktion von proinflammatorischem $\text{TNF-}\alpha$ und antiinflammatorischem IL-10 nach Stimulation mit den isolierten mykobakteriellen Polysacchariden strukturabhängig ist. Die Lipoglykangemische (Fraktion A) sind starke Induktoren, während die Arabinomannane (Fraktion B) eine äußerst schwache Produktion von $\text{TNF-}\alpha$ und IL-10 in diesen untersuchten Zellen verursachen. Ein Morphotyp-spezifischer Unterschied konnte nicht eindeutig festgestellt werden.

4.5.3 $\text{INF-}\gamma$ -Freisetzung stimulierter humaner mononukleärer Zellen

Neben der Freisetzung von $\text{TNF-}\alpha$ (siehe 4.5.1) und IL-10 (siehe 4.5.2) wurde als weiteres Zytokin $\text{INF-}\gamma$ in Überständen von humanen mononukleären Zellen gemessen, die mit BCG sowie mit Fraktion A und B stimuliert wurden. Von den mykobakteriellen Polysacchariden wurden jeweils $10 \mu\text{g}$ und $40 \mu\text{g}$ zur Stimulation eingesetzt (siehe 3.3.14.2). In Abbildung 47 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

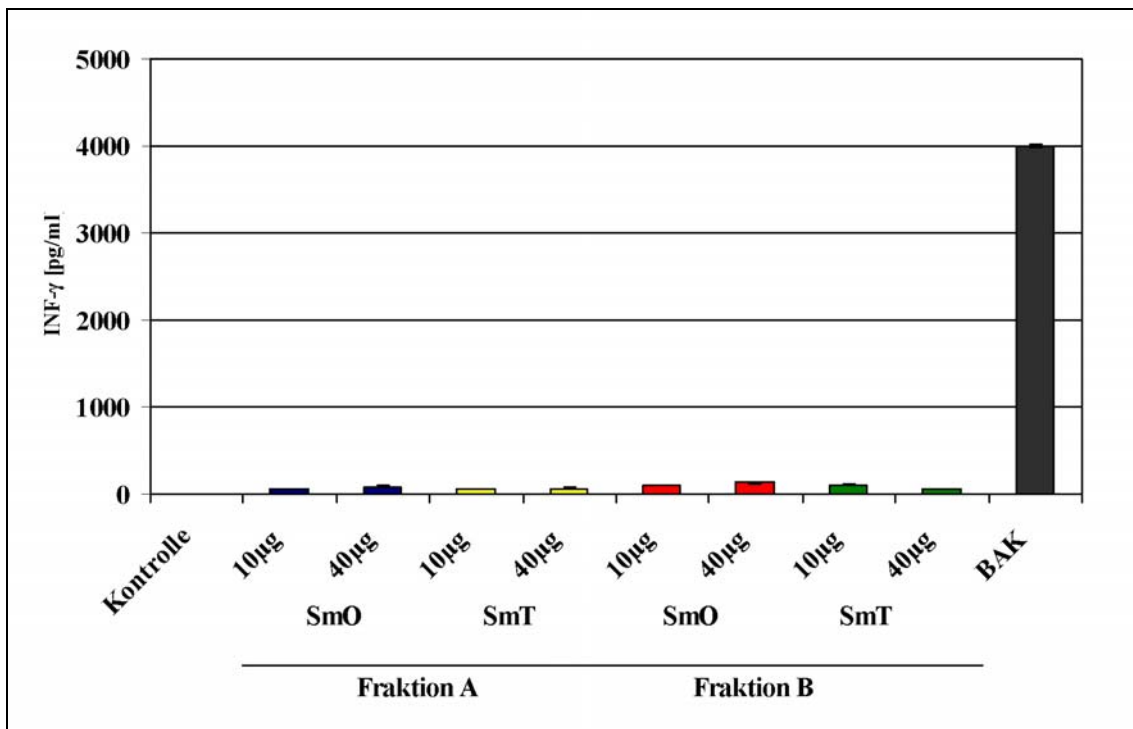


Abbildung 47: INF- γ -Freisetzung humaner mononukleärer Zellen nach Stimulation mit Fraktionen A und B aus SmO und SmT.

10^6 Humane mononukleäre Zellen ml^{-1} wurden mit jeweils $10 \mu\text{g}$ und $40 \mu\text{g}$ ml^{-1} der mykobakteriellen Polysaccharide für 7 d bei $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$ kultiviert. Als Negativ-Kontrolle dienten unstimulierte Zellen, und als Positiv-Kontrollen wurden die Zellen mit *Mycobacterium bovis* Stamm BCG in einem Verhältnis von 0,04 lebenden Keimen pro Zelle stimuliert. In den Überständen wurden die Konzentrationen an freigesetztem INF- γ mittels ELISA bestimmt. BAK: BCG-aktivierte Killerzellen.

Anders als aufgrund der TNF- α -Messungen (siehe Abbildung 43 und Abbildung 44) sowie der IL-10-Bestimmungen (siehe Abbildung 45 und Abbildung 46) erwartet, induzierten alle Substanzen nur sehr schwach eine INF- γ -Produktion. Im Vergleich zu den BCG-aktivierten Killerzellen, die 4000 pg ml^{-1} INF- γ produzieren, liegen die IFN- γ -Werte mit rund 54 bis 128 pg ml^{-1} im Bereich der unstimulierten Negativ-Kontrolle. Dabei ist dennoch eine - wenn auch äußerst geringe - Produktion nachgewiesen. Es kann weder ein Unterschied zwischen Fraktion A und B noch zwischen SmO und SmT festgestellt werden.

4.5.4 IL-12

In Überständen stimulierter humaner Zellen wurde der Gehalt an freigesetztem IL-12 gemessen. Dabei wurden dendritische Zellen aus humanen mononukleären Zellen generiert, von denen 10^6 ml^{-1} mit jeweils $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ der Fraktionen A und B aus SmT und SmO stimuliert wurden (siehe 3.3.14.1.2). In Abbildung 48 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Lipoglykan-Gemische (Fraktion A) induzierten mit 302 pg ml^{-1} (SmO) und 1334 pg ml^{-1} (SmT) eine höhere IL-12-Freisetzung als die Arabinomannane (Fraktion B)(SmO: 159 pg ml^{-1} ; SmT: 20 pg ml^{-1}). Durch LPS als Referenz-Stimulus wurde eine IL-12-Konzentration von ca. 4423 pg ml^{-1} erreicht.

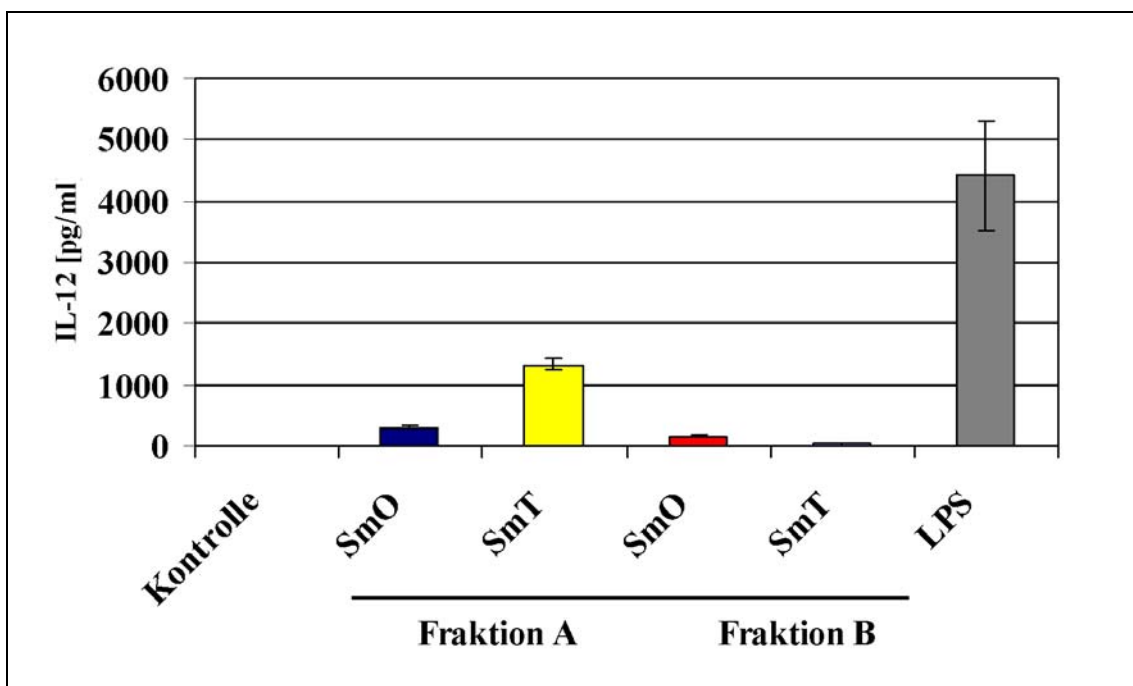


Abbildung 48: IL-12-Freisetzung humaner dendritischer Zellen nach Stimulation mit Fraktionen A und B aus SmT und SmO.

Es wurden 10^6 Zellen ml^{-1} mit jeweils $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ der Stimuli für 18 h bei $37^\circ\text{C}/5\% \text{ CO}_2$ kultiviert. Als Negativ-Kontrolle wurden unreife dendritische Zellen verwendet. Als Referenz-Stimulus diente LPS aus *Salmonella enterica*, sv. Minnesota, Stamm R345 (10 ng ml^{-1}). Die Konzentrationen an IL-12 in den Überständen wurden mittels eines ELISA bestimmt.

4.5.5 Zytotoxizitäts-Tests

Zur Überprüfung immunmodulatorischer Eigenschaften der Arabinomannane wurden diese zur Stimulation humaner mononukleärer Zellen eingesetzt, deren Zytotoxizitäten

anschließend gegen die humane Blasen-Tumorzelllinie T24 getestet wurden. Dabei wurden jeweils 10 µg und 40 µg der Fraktionen A und B aus SmO und SmT zur Stimulation verwendet. Nach 5 h Kokultivierung der stimulierten Zellen mit radioaktiv-markierten Tumorzellen wurde durch Messung freigesetzter Radioaktivität die spezifische Lyse der Zellen als Zytotoxizität bestimmt (siehe 3.3.15).

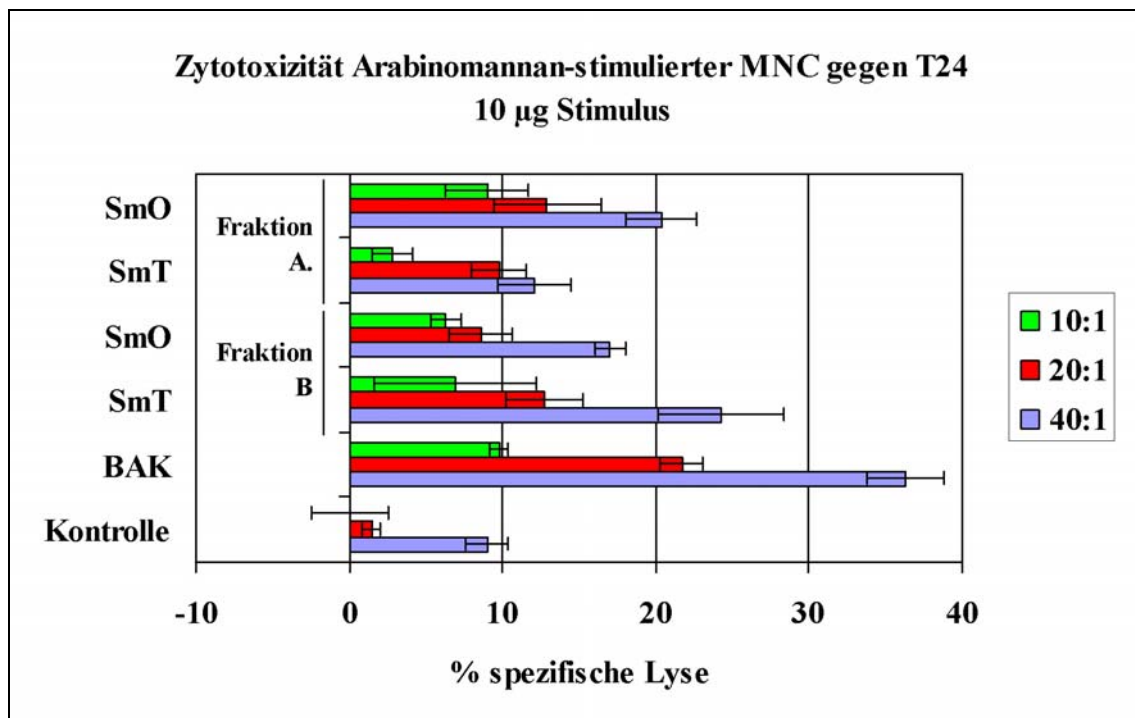


Abbildung 49: Zytotoxizität humaner mononukleärer Zellen (MNC) nach Stimulation mit 10 µg der Fraktionen A und B aus SmO und SmT gegen die humane Blasen-Tumorzelllinie T24.

10⁶ Humane mononukleäre Zellen ml⁻¹ wurden für 7 d mit 10 µg ml⁻¹ der Polysaccharide bei 37°C/5%CO₂ stimuliert. Gemessen wurde die ⁵¹Cr-Freisetzung aus markierten Tumorzellen nach 5 h Kokultivierung mit den stimulierten Effektorzellen. Daraus wurde die spezifische Lyse als Messgröße für Zytotoxizität ermittelt. Es wurden Effektor-Zielzell-Verhältnisse von 10:1, 20:1 und 40:1 gewählt.; BAK: BCG-aktivierte Killerzellen.

Die Messungen zeigen, dass alle MNC nach Stimulation mit jeweils 10 µg der Substanzen eine signifikant höhere spezifische Lyse hervorrufen als die unstimulierten Zellen (siehe Abbildung 49).

Bei dem Effektor-Zielzell-Verhältnis von 20:1 wurde im Vergleich zu den BCG-aktivierten Zellen (BAK) als Positiv-Kontrolle bei allen Zellen durchschnittlich die Hälfte der Aktivität nachgewiesen. Die mit dem Arabinomannan (Fraktion B) aus SmO stimulierten Zellen zeigten im Vergleich zu den BAK eine Aktivität von 40%. Die Zellen, die mit dem entsprechenden Arabinomannan aus SmT stimuliert wurden, zeigen

eine relative Aktivität von 59%. Die Zellen, die mit den Lipoglykan-Gemischen (Fraktion A) stimuliert wurden, zeigten 45% (SmT) und 59% (SmO) der Aktivität im Vergleich zu den BCG-stimulierten Zellen. Ein Unterschied zwischen SmO und SmT, bzw. zwischen A und B ist nicht eindeutig feststellbar.

Bei vierfach höher eingesetzter Konzentration der Stimuli zeigt sich jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen SmO und SmT (siehe Abbildung 50).

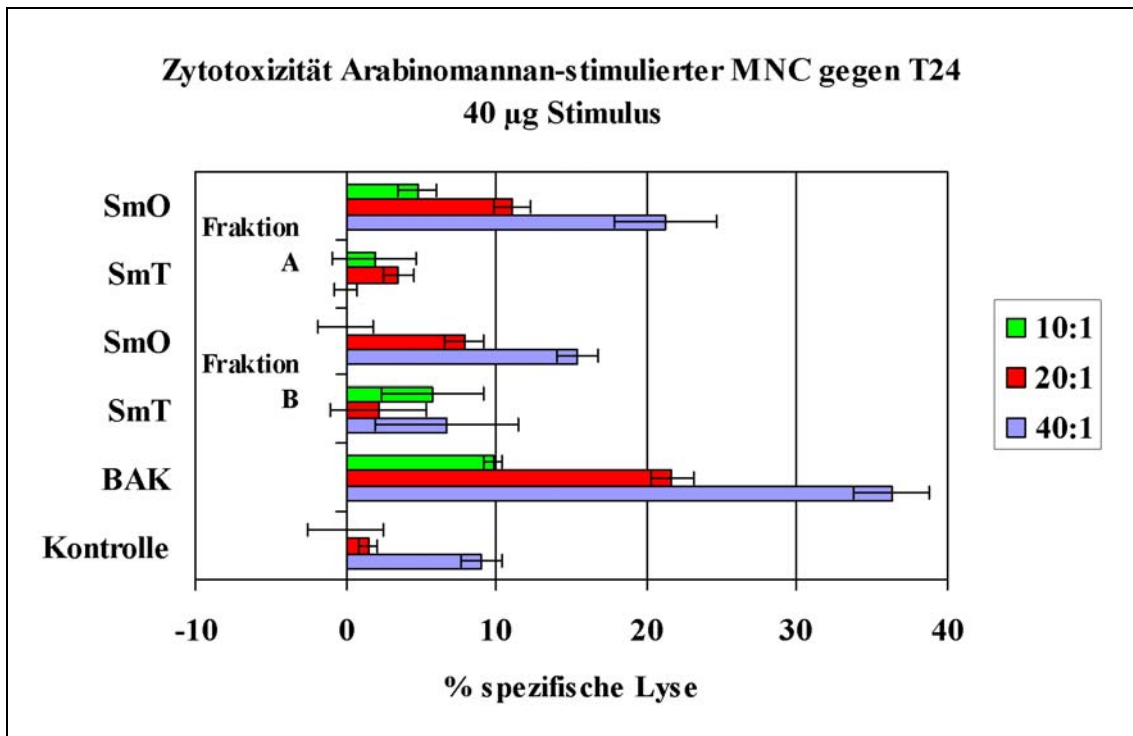


Abbildung 50: Zytotoxizität humaner mononukleärer Zellen (MNC) nach Stimulation mit 40 µg der Fraktionen A und B aus SmO und SmT gegen die humane Blasen-tumor-Zelllinie T24.

10⁶ Humane mononukleäre Zellen ml⁻¹ wurden für 7 d mit 40 µg ml⁻¹ der Polysaccharide bei 37°C/5%CO₂ stimuliert. Gemessen wurde die ⁵¹Cr-Freisetzung aus markierten Tumorzellen nach 5 h Korkultivierung mit den stimulierten Effektorzellen. Daraus wurde die spezifische Lyse als Messgröße für Zytotoxizität ermittelt. Es wurden Effektor-Zielzell-Verhältnisse von 10:1, 20:1 und 40:1 gewählt.; BAK: BCG-aktivierte Killerzellen.

Die Messungen nach Stimulation mit jeweils 40 µg Substanz zeigen bei den Zellen, die mit Fraktion A bzw. B aus SmO stimuliert wurden, weder eine Verstärkung noch eine Reduktion der spezifischen Lyse im Vergleich zur Stimulation mit 10 µg. Bei dem Effektor-Zielzell-Verhältnis von 20:1 liegen die relativen Aktivitäten bezogen auf BAK bei 36% (SmO, Fraktion B) und 51% (SmO, Fraktion A). Bei den Zellen, die mit 40 µg Substanz aus SmT stimuliert wurden, konnte hingegen eine stark reduzierte Zytotoxizität festgestellt werden (ConA-positiv: 10%, ConA-negativ: 16%). Da die Werte

im Bereich der unstimulierten Negativ-Kontrolle liegen, ist eine Aktivität bei dieser Dosis nicht eindeutig.

Die vergleichenden Messungen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Stimuli deuten darauf hin, dass SmT potenter ist als SmO. Denn bei Erhöhung der Konzentration von SmO zeigt sich keine weitere Zunahme der spezifischen Lyse durch die Effektorzellen. Konzentrationen von 10 µg und 40 µg bewirken eine biologische Aktivität, dessen Messgrößen in Dosis-Wirkungs-Optimum liegen. Bei Erhöhung der Konzentration von SmT ist eine starke Reduktion der spezifischen Lyse zu verzeichnen. Das heißt, das Dosis-Wirkungs-Optimum ist wahrscheinlich bereits bei derartigen Konzentrationen überschritten.

Es ist damit eindeutig gezeigt, dass die isolierten Arabinomannane immunmodulatorisch wirken, indem sie nach Stimulation humaner mononukleärer Zellen Zytotoxizität gegen die humane Blasen-tumor-Zelllinie induzieren.

Ein Unterschied zwischen Fraktion A und B ist nicht erkennbar. Sie sind gleichermaßen aktiv. Es scheint somit, dass der Lipidanker keinen Einfluss auf die immunmodulatorische Eigenschaft hat. Ein Morphotyp-spezifischer Unterschied konnte hier im Gegensatz zu den Ergebnissen der TNF- α -Produktion (siehe 4.5.1) eindeutig festgestellt werden.

4.5.6 Apoptose-Tests

Es wurde getestet, ob die immunmodulatorischen Eigenschaften, die zur Zytotoxizität führen, mit einer Apoptose-induzierenden Wirkung einhergehen. Dazu wurden humane Monozyten mit den Arabinomannanen stimuliert und spezifisch auf das Vorhandensein der Endstreckenenzyme Caspase 3 und 7 hin untersucht. Caspasen sind Cystein Aspartat-spezifische Proteasen, die als Effektoren des programmierten Zelltodes wirken. Der Nachweis von Caspasen ist somit ein spezifisches Merkmal zur Bestimmung von Apoptose. Zum Vergleich bzw. als externe Negativ-Kontrolle wurden Tumorzellen (myeloische Leukämie-Zelllinie) stimuliert und untersucht (siehe Abbildung 51).

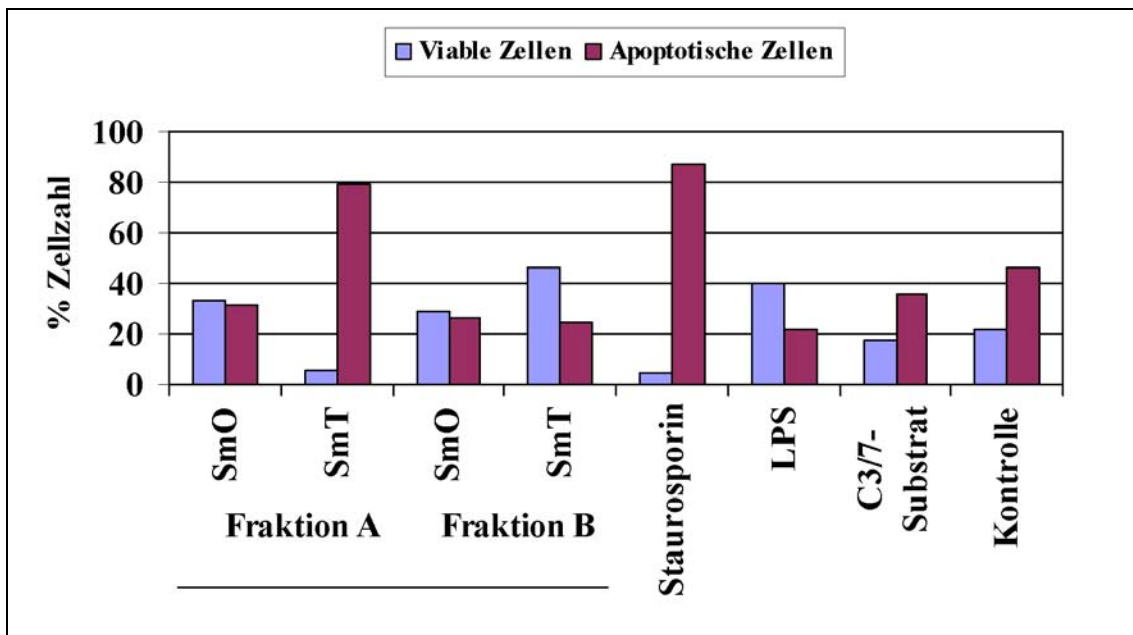


Abbildung 51: Anteile viabler und apoptotischer humaner Tumor-Zellen nach Stimulation mit Fraktion A und B aus SmO und SmT.

Von der humanen myeloischen Leukämiezelllinie THP1 wurden jeweils 2×10^5 Zellen ml^{-1} mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ der Polysaccharide für 48 h bei $37^\circ/5\%\text{CO}_2$ stimuliert. Als Negativ-Kontrollen dienten Zellen, die mit Lipopolysaccharid (LPS) aus *Salmonella enterica* sv. Friedenau Stamm H909 (10 ng ml^{-1}) bzw. mit Caspase-Substrat ($25 \mu\text{l}$ C3/7-Substrat, PROMEGA) kokultiviert wurden. Zur Messung der spontanen Apoptose wurden unstimulierte Zellen verwendet. Als Positiv-Kontrolle wurde Staurosporin (200 nM) aus *Streptomyces staurosporeus* eingesetzt. Gemessen wurde die Lichtstreuung der Zellen mittels eines präparativen FACS.

Wiederholte Experimente zeigen, dass eine Stimulation mit den Arabinomannanen nicht zur Apoptose von Monozyten führt (siehe Abbildung 52). Die Werte geben Hinweise darauf, dass die Monozyten im Gegenteil geringfügig stimuliert werden. Bleiben Monozyten in Zellkultur unstimuliert, so sterben nach spätestens 48 h ab. Werden sie jedoch stimuliert, z.B. mit LPS, so gehen sie nicht in Apoptose, sondern sichern ihr Überleben. Die Anteile der Zellen, die diese Endstrekenenzyme Caspase 3 und 7 exprimieren, sind nach Stimulation mit LPS und den Arabinomannanen am geringsten.

Eine Apoptose-induzierende Wirkung kann daher für die Arabinomannane in der eingesetzten Konzentration von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ausgeschlossen werden. Möglicherweise wird Apoptose von Monozyten durch höhere Konzentrationen induziert. Dies wurde nicht weiter untersucht.

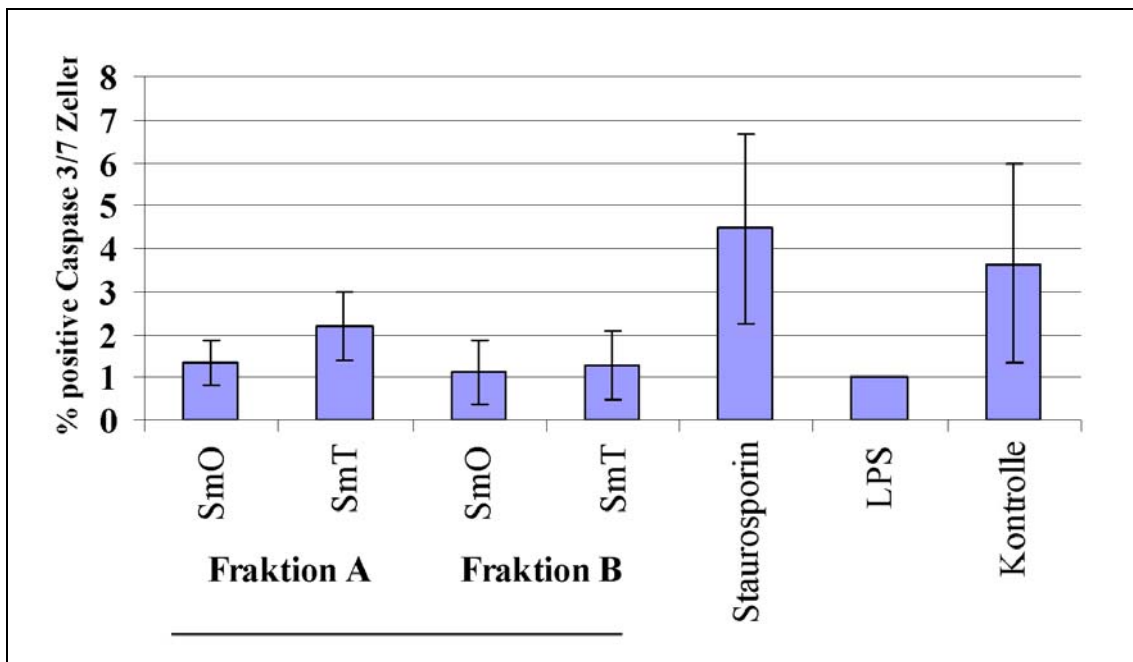


Abbildung 52: Anteile viabler und apoptotischer humaner Monozyten nach Stimulation mit Fraktion A und B aus SmO und SmT.

Jeweils 2×10^5 Monozyten ml^{-1} wurden mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ der Polysaccharide für 48 h bei $37^\circ/5\%\text{CO}_2$ stimuliert. Als Negativ-Kontrollen dienten Zellen, die mit Lipopolysaccharid (LPS) aus *Salmonella enterica* sv. Friedenau Stamm H909 (10 ng ml^{-1}) bzw. mit Caspase-Substrat ($25 \mu\text{l C3/7-Substrat}$, PROMEGA) kokultiviert wurden. Zur Messung der spontanen Apoptose wurden unstimulierte Zellen verwendet. Als Positiv-Kontrolle wurde Staurosporin (200 nM) aus *Streptomyces staurosporeus* eingesetzt. Gemessen wurde die Lichtstreuung der Zellen mittels eines präparativen FACS.

In Tabelle 10 sind die Daten der gemessenen biologischen Aktivitäten zusammengefasst. Auffällig ist, dass die Lipoglykan-Gemische (Fraktion A) eine verstärkte und die Arabinomannane (Fraktion B) eine nur sehr geringe Zytokin-Produktion (insbesondere $\text{TNF-}\alpha$ und IL-10) induzieren. Der strukturelle Unterschied zwischen diesen Substanzen liegt in dem Lipidanteil. Die Lipoglykan-Gemische besitzen einen Lipidanteil und verursachen Zytokin-Produktion. Die Arabinomannane besitzen keinen Lipidanteil und induzieren eine nur geringe Zytokin-Produktion.

Hinsichtlich immunmodulatorischer Eigenschaften, d. h. der Induktion von Zytotoxizität, konnte dieser strukturelle Unterschied nicht festgestellt werden.

Tabelle 10: Übersicht der biologischen Aktivitäten der Fraktionen A und B (10 µg ml⁻¹) aus SmO und SmT *in vitro*.

Die Quantifizierung bezieht sich prozentual auf den maximalen Wert, der jeweils durch die Positiv-Kontrolle nach Abzug der Negativ-Kontrolle erreicht wurde.

0%: -, 1 - 19%: +, 20 - 49%: ++, 50 - 69%: +++, 70 - 99%: +++++, ≥100%: ++++++.

*Effektor-Zielzell-Verhältnis.

Effekt	Fraktion A		Fraktion B		Stimulation
	SmO	SmT	SmO	SmT	
TNF-α	+++++	+++++	+	+	24 h, murine Φ
TNF-α	++++	+++++	++	++	18 h, humane DC
INF-γ	+	+	+	+	7 d, humane MNC
IL-12	+	++	+	-	18 h, humane DC
IL-10	++++	++	-	+	24 h, murine Φ
IL-10	+++++	+++++	++	+	18 h, humane DC
	++++	++	+++	++++	10:1*
Zytotoxizität	+++	++	++	+++	20:1* 7 d, humane MNC
	++	+	++	+++	40:1*

5. DISKUSSION

Die Mechanismen der angeborenen Immunität sind bei der Bekämpfung von Krankheitserregern sehr effektiv. Überwinden Pathogene die Epithelbarriere und gelangen in den Wirtsorganismus, so werden sie sofort von Phagozyten erkannt. Mit Hilfe von Gewebsmakrophagen, neutrophilen Granulozyten, antimikrobiellen Peptiden und des Komplementsystems werden eingedrungene Mikroorganismen umgehend bekämpft. Die frühe Pathogenerkennung erfolgt über hochkonservierte Strukturen, wie z. B. Lipopolysaccharide, Peptidoglycane, Lipoteichonsäuren, Glycane, bakterielle DNA und doppelsträngige RNA [352;353]. Das bedeutet, die Mechanismen der angeborenen Immunität sind auf Organismen beschränkt, die evolutionsbiologisch unveränderte Oberflächenmoleküle exprimieren, so dass sie von neutrophilen Zellen und Makrophagen von Vertebraten erkannt werden können. Viren besitzen auf ihrer Oberfläche mutationsbedingt äußerst schnell veränderliche Moleküle, so dass sie nur selten von phagozytierenden Zellen erkannt werden. Zahlreiche Bakterien - besonders extraintestinale und invasive Erreger - bilden Kapseln aus [222], die es ihnen ermöglichen, Oberflächen-Moleküle zu verdecken und somit einer Phagozytose zu unterlaufen [354]. Darunter sind die zwei klinisch relevanten Erreger *Enterococcus faecalis* [355] als ein bedeutender Nosokomialkeim, der u. a. Endocarditis verursacht [356], und *Streptococcus pneumoniae* [357]. Werden nur einige Zellen eines bekapselten Stammes von *Streptococcus pneumoniae* in eine Maus injiziert, so entsteht eine Infektion, die in nur wenigen Tagen zum Tode führt [358]. Hingegen sind sogar große Mengen einer unbekapselten Mutante desselben Stammes vollkommen avirulent. Andere bekapselte intrazelluläre Pathogene schützen sich vor einem Verdau durch Phagozyten, in dem sie aktiv Makrophagen töten. Dazu produzieren sie so genannte Leukozidine, die die Membranen der Immunzellen auflösen, die Zellen dabei töten und sich selbst freisetzen [359]. Als zwei Beispiele für Erreger, die sich diesem Mechanismus bedienen, sind *Streptococcus pyogenes* [360] und *Staphylococcus aureus* [361] zu nennen. Diese beiden Spezies sind die wichtigsten Leukozidin-Produzenten. Infektionen durch diese Keime sind oft lokal begrenzt und durch Abszess- und Eiterbildung charakterisiert, denn Eiter besteht zum größten Teil aus abgestorbenen Leukozyten [359]. Ferner produziert *Staphylococcus aureus* Carotinoid-Pigmente, mit Hilfe

derer sie in der Lage sind, den für sie toxischen Singulett-Sauerstoff zu inaktivieren [362].

Darüber hinaus scheinen Kapseln zur Resistenz gegenüber Austrocknung beizutragen [33], da die äußeren Polysaccharid-Schichten eine beträchtliche Menge Wasser binden können [222;363].

Auch Mykobakterien bilden Kapseln aus, jedoch scheint deren Funktion nicht darauf zu zielen, sich vor einer Phagozytose durch Immunzellen zu schützen. Das Gegenteil ist wahrscheinlich der Fall. Mykobakterien haben Strategien entwickelt, gezielt in Makrophagen zu penetrieren. Denn gerade diese Zellen, die typischerweise für die erste unspezifische Degradation von Krankheitserregern im Zuge der angeborenen Immunantwort verantwortlich sind, bieten Mykobakterien optimalen Schutz zum Überleben und sogar Replizieren [42]. Mit Ausnahme der Poly- γ -D-Glutaminsäure-Kapsel aus *Bacillus anthracis* [364] bestehen bakterielle Kapseln aus Polysacchariden, die in den meisten Fällen negativ geladen sind [222]. Auch mykobakterielle Kapseln bestehen zu einem großen Teil aus Polysacchariden [40]. Die Funktion dieser Kapsel-Polysaccharide ist bislang nicht eindeutig geklärt. Sie verleihen den Bakterien Schutz vor enzymatischem Verdau nach der Phagozytose und vermitteln möglicherweise in den ersten Schritten der Infektion die Adhärenz an Wirtszellen [42].

Im Allgemeinen spielt die enorme Strukturvielfalt von Zuckern in biologischen Prozessen der Zellerkennung und -kommunikation eine entscheidende Rolle [365]. Im Eukaryoten-Reich sind zahlreiche Adhäsionsprozesse, bei denen Kohlenhydrate als Informationsträger fungieren, aufgeklärt. Beispielsweise wird die Blutgruppenzugehörigkeit in Säugetieren durch Kohlenhydratstrukturen an der Oberfläche von Erythrozyten bestimmt. Dabei sind nur geringe strukturelle Unterschiede ausschlaggebend, ob eine Blutzelle von dem komplementären Blutgruppen-Antigen erkannt wird oder nicht [366]. Auch die Kaskade der Blutgerinnung wird durch spezifische Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen zwischen Heparin und Antithrombin III inhibiert [367]. Die Befruchtung einer Eizelle ist ebenso ein Prozess, der auf der Erkennung von Oberflächen-Sacchariden beruht. Rezeptoren auf einer Spermien-Zelle erkennen spezifisch Kohlenhydrat-Liganden auf der Ei-Oberfläche, was dazu führt, dass das Spermium Enzyme freisetzt, die ein Eindringen in die Eizelle ermöglichen [365;368]. Weiterhin stellen Kohlenhydrate spezifische Liganden für eine Vielzahl biologischer Erkennungsprozesse dar, wie die Lymphozyten-Rekrutierung an den Ort einer Entzündung [369], die Klärung von „gealterten“ funktionslosen roten Blutkörperchen

aus dem Blutstrom [370] oder die Adhäsion von Mikroorganismen an ihre Wirtszellen [371]. Die dafür verantwortlichen Rezeptoren, die solche Kohlenhydrate spezifisch erkennen und binden können, sind so genannte Lektine oder Selektine [372]. Die Spezifität der molekularen Erkennung beruht auf der dreidimensionalen Epitop-Struktur bzw. wird durch die räumliche Anordnung ihrer funktionellen Gruppen gewährleistet. Lange wurde vermutet, dass nur Proteine die Biomoleküle sind, die Informationen tragen und Signale auslösen und weitergeben können. Kohlenhydrate gewinnen mehr und mehr an Bedeutung hinsichtlich molekularer Erkennungsprozesse.

Die Adhärenz von Mykobakterien an ihre Zielzellen, den Makrophagen, wird hinsichtlich des Makrophagen-Mannose-Rezeptors [292] und des Komplement-Rezeptors CR3 [373] auch durch Kohlenhydrat-Rezeptor-Wechselwirkungen vermittelt. Es wird vermutet, dass weitere Kohlenhydratstrukturen mit möglicherweise bisher unbekanntem Rezeptoren diese Adhäsion zwischen Erreger und Wirtszelle ermöglichen. Daher wird auch angenommen, dass mykobakterielle Kapselpolysaccharide dabei eine entscheidende Rolle spielen, weil sie u. a. an der äußersten Zelloberfläche lokalisiert sind und somit den ersten Kontakt zu Zielzellen vermitteln können. Weiterhin wird diskutiert, dass sie zur intrazellulären Persistenz und Replikation beitragen. Sie werden daher als äußerst potente Virulenzfaktoren angesehen.

Die strukturelle Charakterisierung solcher Virulenzfaktoren ist für das Verständnis der Pathogenese mykobakterieller Infektionen wichtig und trägt möglicherweise dazu bei, Inhibitoren darzustellen, die die Biosynthese solcher Moleküle unterbinden. Ferner könnte die Isolierung und Charakterisierung solcher Oberflächenantigene unter Umständen die Entwicklung einer geeigneten Vakzine gegen mykobakterielle Infektionen zur Folge haben.

Im Gegensatz zur Kapsel ist die mykobakterielle Zellwand gut untersucht [171]. Zahlreiche Moleküle und Komplexe sind nicht nur strukturell charakterisiert, sondern auch deren Biosynthesen mit den beteiligten Enzymen sind bereits aufgeklärt. Dazu hat die Entschlüsselung des Genoms von *M. tuberculosis* [261] entscheidend beigetragen. Eine Vielzahl von Genen konnten Genprodukten, wie Enzymen, zugeordnet werden (siehe 1.2.2). Daher ist die Zellwand von *M. tuberculosis* im Vergleich zu anderen Mykobakterien-Spezies am besten untersucht.

Aus der Kapsel von *M. tuberculosis* sind bereits Polysaccharide isoliert und teilweise strukturell charakterisiert worden: Ein Glucan mit angenommener Molekülmasse von 100 kDa und ein Arabinomannan von rund 13 kDa [40]. Genaue Kenntnisse über die

Anordnung dieser Kapselmoleküle und deren Lokalisation liegen nicht vor. Beide Strukturen werden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* synthetisiert. Dem Glucan konnte biologische Aktivität nachgewiesen werden [249]. Das Arabinomannan scheint Stammspezifität aufzuweisen (siehe 1.2.1.5).

M. avium bildet auf festen Nährböden drei verschiedene Phänotypen aus: glatt-transparent, glatt-opak und rau (siehe 1.1.3.4.2). Der glatt-transparente Phänotyp ist generell virulent, der glatt-opake avirulent. Der raue Morphotyp kann in seiner Virulenz variieren. Die molekulare Grundlage für die Ausprägung unterschiedlicher Koloniemorphotypen ist nur unvollständig verstanden. Das Vorhandensein bzw. das Fehlen von Glycopeptidolipiden in der Zellwand wird als Grundlage für die verschiedenen Phänotypen und deren Infektionsverhalten diskutiert [159;155;374].

5.1 Anzucht der Mykobakterien

In der vorliegenden Arbeit sollte der glatt-transparente (SmT) mit dem glatt-opaken Morphotypen (SmO) des *M. avium* Stammes 2151 (Serovar 2) verglichen werden (siehe 3.1.2), da sich diese beiden Morphotypen in ihrer Virulenz im Maus-Modell unterscheiden [375;376]. Aufgrund der verhältnismäßig langen Generationszeit von *M. avium* [27;377] konnten die Kolonien erst nach einer Kultivierungsdauer von mehreren Wochen geerntet werden. Um nach der Kapselextraktion ausreichend Substanzmengen zur Isolierung der Polysaccharide zu gewinnen, war es notwendig, große Ansätze zur Anzucht zu verwenden. Üblicherweise werden dazu die Bakterien in Flüssigmedien kultiviert. Die Zellen scheiden dabei Kapselmaterial in das umgebene Medium ab, das durch Zentrifugation des Kulturüberstands gewonnen werden kann [220]. Da es jedoch zwischen diesen Koloniemorphotypen zu ständigen Spontanmutationen und somit zu Mischungen beider Typen kommt [165,166], war es notwendig, die Zellen auf soliden Nährböden zu züchten. Die Anzucht wurde daher auf Agarplatten durchgeführt. Um die Zellen ernten zu können, ohne mechanisch Agarbestandteile herauszulösen, wurden die Platten mit aufliegender Nitrocellulose-Membran beimpft (siehe 3.1.3). Diese ist für Nährstoffe permeabel und gewährleistet ein optimales Zellwachstum (siehe Abbildung 14). Im Gegensatz dazu bietet im Allgemeinen die Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur den Vorteil, dass zu jedem Zeitpunkt der Kultivierung die optische Dichte bestimmt werden kann, um so die

Wachstumsphasen zu verfolgen. Bei Anzuchten auf Agarplatten ist dies nicht gewährleistet. Dabei steht allein die makroskopische Begutachtung der Kolonien zur Verfügung.

Aufgrund des langsamen Wachstums dieser Spezies [27;377] ist die Anzucht durch mikrobielle Kontaminationen gefährdet, da ubiquitäre Fremdkeime im Allgemeinen kürzere Generationszeiten haben als langsam wachsende Mykobakterien.

Die Kultivierung bei einer Temperatur von 37°C und einem pH-Wert des Mediums von 7,7 erwies sich als optimal. Hinsichtlich dieser Bedingungen wurden (nicht im Rahmen dieser Arbeit) Vorversuche durchgeführt, inwieweit die Mutationsrate der Bakterien von einem Kolonimorphotypen in den anderen durch eine Wachstumstemperatur von 40°C bzw. durch den pH-Wert des Mediums von 7,0 beeinflusst wird. Dabei zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Mutationsrate zwischen den einzelnen Kolonimorphotypen [378].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei komplexe synthetische Nährböden mit unterschiedlicher Kohlenstoff-Quelle ausgetestet. Einerseits wurden die Zellen auf MIDDLEBROOK 7H10-Agar mit OADC als Supplement-Gemisch angezüchtet (siehe 3.1.3). Dieses beinhaltet neben Ölsäure (O), Dextrose (D) und Katalase (C) auch Albumin (A). Dieses Albumin (Kälberserum-Albumin, 66 kDa) lies sich in SDS-Gelen, die zur Überprüfung der isolierten Fraktionen durchgeführt wurden, als „überladene“ Bande zwischen 60 und 70 kDa (siehe Abbildung 17) anfärben. In anschließenden Lektin-entwickelten Western-Blots wurde dieses Albumin indirekt durch fehlende Glycosylierung in großer Menge nachgewiesen. Daher wurde auf diesen albuminhaltigen Nährmedien-Zusatz in folgenden Anzuchten verzichtet und ein Agar auf Pyruvat-Basis gewählt (siehe 3.1.3). Im Gegensatz zu *M. tuberculosis* [379] wächst *M. avium* auch ohne den Zusatz von OADC im Medium. Auf die Wachstumsdauer hatte dies keinen Einfluß. Lediglich die Ausbeute war unwesentlich geringer. Die störende Albumin-Bande trat somit in weiteren elektrophoretisch aufgetrennten Fraktionen nicht mehr auf.

Die Ausbeuten der Bakterien lagen bei etwa 0,5 g Feuchtmasse pro Platte, wobei mehrere Hundert Platten zur Anzucht verwendet wurden. Zellen, die konfluentes Wachstum zeigten, wurden nicht geerntet, da der Kolonimorphotyp nicht identifizierbar war. Ferner wurden kontaminierte Agarplatten und Kolonien, die phänotypisch nicht dem angezüchteten Morphotyp entsprachen, nicht zur Zellernte herangezogen. Damit wurden durchschnittlich 10% aller beimpften Platten verworfen.

Ein Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen den Koloniemorphotypen wurde nicht festgestellt.

5.2 Isolierung der Polysaccharide

Zur Isolierung von Kapselmaterial wurden die unmittelbar zuvor geernteten Zellen (siehe 3.2.1) in einer 1% wässrigen Phenol-Lösung langsam gerührt (siehe 3.2.2). Mit der beschriebenen Methode [225] ist es möglich, Kapselmaterial von der Zelle zu extrahieren, ohne die Zellwand zu zerstören. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mykobakterien vor und nach Behandlung mit Phenol belegen dies (siehe Abbildung 9). Eine Alternative zur Phenol/Wasser-Extraktion, um Kapselmaterial zu gewinnen, stellt nach Kultivierung in Flüssigmedium die Zentrifugation des Kulturüberstands dar (siehe oben). Weiterhin bietet die Extraktion mittels Glaskugeln von geringem Durchmesser unter Schütteln die Möglichkeit, Kapselmaterial durch Scherkräfte von der Zelle abzulösen [223]. Ferner können die Bakterienzellen unter Verwendung der *french press*-Methode [380] durch Hochdruck (bis zu 2000 bar) mechanisch zerstört werden, so dass u. a. Kapselmaterial gewonnen werden kann. Der Nachteil ist einerseits darin zu sehen, dass nach einer derartigen Behandlung alle Zellbestandteile als ein Gemisch vorliegen, was die anschließende Fraktionierung erschwert. Andererseits ist bekannt, dass Mykobakterien und Gram-positive Bakterien im Vergleich zu den meisten anderen prokaryotischen Zellen aufgrund ihrer äußerst komplexen Zellwand (siehe 1.2.1) mechanischen Kräften gegenüber weitaus widerstandsfähiger sind (siehe 1.1.1.3), so dass ein vollständiger Zellaufschluss mit dieser Methode nicht gewährleistet ist. Das haben Versuche gezeigt, bei denen der Aufschlussgrad unterschiedlicher Mikroorganismen bei verschiedenen Drücken in der *french press* bestimmt wurde [381]. Zahlreiche weitere Methoden zum mechanischen Aufschluss von Mikroorganismen wurden etabliert [382;383;384;385;386], resultieren jedoch stets in der mehr oder weniger vollständigen Zerstörung der Zellen. Es wurde daher in der vorliegenden Arbeit mittels wässriger Phenol-Lösung eine milde chemische Extraktionsmethode zur Kapselisolierung gewählt, die nachgewiesenermaßen (siehe 1.2.1.5) Material von der äußeren Zelloberfläche ablöst, ohne die Zellwand zu zerstören, so dass keine störenden Zellwandbestandteile die weitere Aufreinigung erschweren.

Die Ausbeute dieses Kapselextraktes machte ungefähr 1% der eingesetzten Bakterienfeuchtmasse aus (siehe 4.2). Den größten Anteil stellten die Zellen selbst dar, die jedoch nach der Extraktion nicht näher untersucht wurden. Dies verdeutlicht die enorme Menge an benötigtem Ausgangsmaterial (siehe 4.2).

Zur weiteren Isolierung und Fraktionierung des erhaltenen Gemisches wurde eine Extraktionsmethode optimiert, mit der Kohlenhydrate einerseits von Proteinen und andererseits in Fraktionen getrennt werden konnten (siehe Abbildung 15).

Mit Hilfe der phenolischen Extraktion (siehe 4.2) wurde Material gewonnen, das ein Gemisch aus Proteinen und Kohlenhydraten darstellt. Dies wurde anhand von SDS-Gelen nach elektrophoretischer Trennung und anschließender Färbung gezeigt werden. Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie sichtbar gemacht sowie Kohlenhydratstrukturen durch Färbung mit Perjodsäure-Schiff-Reagenz (siehe Abbildung 17).

Die Phenol-Extrakte wurden einer Triton-Extraktion unterzogen, um hydrophile und lipophile Substanzen voneinander zu trennen (siehe 4.2.1). Die Wasser-Phase enthielt Proteine und Kohlenhydrate, was ebenfalls anhand von SDS-Gelen gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 17). Die Triton-Phase enthielt Proteine (siehe Abbildung 17) und Lipoglycane, wie Lipoarabinomannan, Lipomannan und das biosynthetische Vorläufer-Molekül Phosphatidylinositolmannosid [180]. Das konnte anhand von Western-Blots mit anschließender Entwicklung durch das Lektin ConcanavalinA gezeigt werden (siehe Abbildung 16b). ConcanavalinA wurde aus dem Grund verwendet, da es spezifisch u. a. terminale α -Mannose-Reste erkennt [327], wie sie in allen beschriebenen mykobakteriellen Lipoglycanen vorkommen [180]. Auch die Glycoproteine können auf diese Weise sichtbar gemacht werden, da Mannose ein häufig vorkommender Zucker prokaryotischer Proteinglycosylierungen ist [387]. So konnten auch Glycoproteine aus *M. tuberculosis* durch ConA nachgewiesen werden [388;389;390]. Ob es sich bei den Proteinen in der Triton-Phase um Lipoproteine handelt, wurde nicht im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Da der Western-Blot (Abbildung 16b) dieser Fraktion neben LAM, LM und PIM auch zwei distinkte Banden zeigt, die damit nachgewiesenermaßen glycosyliert sind, könnte es sich dabei um Glycolipoproteine handeln, die bevorzugt in der Triton-Phase angereichert werden. Diese wurden nicht weiter untersucht.

Zur Eliminierung der enthaltenen Proteine in der Wasser-Phase wurde eine Proteinpräzipitation mit einer 46%igen Ammoniumsulfat-Lösung durchgeführt (siehe 4.2.2). Die elektrophoretisch aufgetrennten Fraktionen der erhaltenen Sedimente und Über-

stände zeigten durch Färbung mit Coomassie das Vorhandensein von Proteinen zum größten Teil in den Sedimenten nach der Fällung, während die Polysaccharid enthaltenen Überstände proteinfrei erscheinen (siehe Abbildung 17). Folglich war es gelungen, den Großteil der Proteine durch Präzipitation zu eliminieren. Dennoch wurde zusätzlich zur Fällung ein unspezifischer proteolytischer Verdau (siehe 4.2.2), um auch geringe Reste von Proteinen zu entfernen, die eventuell durch die Coomassie-Färbung nicht sichtbar waren. Die Ammoniumsulfat-Fällung mit anschließenden proteolytischen Verdau führten zu vollständig proteinfreien Präparationen. Die proteinhaltigen Sedimente nach der Fällung wurden in dieser Arbeit bis auf die elektrophoretische Trennung nicht näher charakterisiert.

Der Nachweis von Kohlenhydratstrukturen in den Überständen wurde zunächst ebenfalls in einem SDS-Gel mit anschließender PAS-Färbung sichtbar gemacht (siehe Abbildung 17). Da Polysaccharide aufgrund fehlender lipophiler Strukturen keine Migration in einem solchen Gel zeigen, verbleiben sie im Sammelgel bzw. diffundieren lediglich in das Trenngel (siehe 4.2.2). Somit detektierte Polysaccharide resultieren einerseits in einer konzentrierten Bande vor dem Eintritt in das Trenngel und andererseits als Schmierbande im hochmolekularen Bereich von leuchtend roter Färbung. Wird das Sammelgel nach der Elektrophorese nicht abgetrennt, sondern ebenfalls gefärbt, so ist die erfolgte Diffusion der Polysaccharide visualisierbar. Damit wurde gezeigt, dass die proteinfreien Überstände mit neutralen Kohlenhydraten angereichert waren.

Diese Überstände aus der Proteinfällung wurden durch Gelpermeations-Chromatographie nach Molekülgröße aufgetrennt (siehe 4.2.3). Dabei wurde als Trägermaterial Sephadex-G-50 verwendet, das Dextrane mit Molekularmassen von 500 bis 10000 Da trennt. Dabei wurden jeweils zwei Signale detektiert (siehe Abbildung 18). Diese wurden auf das Vorhandensein von organischer Substanz durch Verkohlen nach ethanolischer Schwefelsäure-Behandlung getestet. Die erste Fraktion zeigte dabei eindeutig eine positive Reaktion und wurde mit dem Ausschlussvolumen der Säule eluiert (siehe Abbildung 18). Das bedeutet, dass die Moleküle von 10000 Da oder mehr Molekularmasse sind. Da zur Detektion der Signale die Änderung des Brechungsindex gemessen wurde, um die Gesamtheit der eluierten Substanzen zu erfassen, kann keine Aussage zu strukturellen Eigenschaften der Substanzen in der erhaltenen Fraktion getroffen werden. Im Gegensatz zur Detektion durch Messung der UV-Absorption, bei der für verschiedene Substanzklassen charakteristische Wellenlängen gewählt werden können, kann refraktometrisch nur das Vorhandensein von Substanz gemessen werden,

die einen anderen Brechungsindex als das verwendete Laufmittel besitzt. Die letzte Fraktion erwies sich u. a. als Ammoniumsulfat, das zur Fällung eingesetzt wurde. Die hohe Konzentration dieses Salzes, das notwendig war, um die Proteine zu eliminieren, stellte sich in der weiteren Präparation der Substanzen als problematisch heraus. Einerseits ist es möglich, dass derart hohe Konzentrationen an Ammoniumsulfat nicht nur Proteine fällen, sondern auch die zu isolierenden Polysaccharide. Andererseits konnte das Salz durch Dialyse selbst nicht vollständig entfernt werden, was durch die Gelpermeations-Chromatographie gezeigt wurde (siehe Abbildung 18). Daher wurde in einer weiteren Aufarbeitung des Phenolextrakts auf diese Proteinfällung verzichtet. Phenol-Extrakte ohne vorherige Proteinfällung und proteolytischem Verdau wurden analog zu den proteinfreien Extrakten mittels Sephadex-G-50 aufgetrennt. Erste Hinweise auf die chemische Zusammensetzung der beiden Fraktionen nach der Gelpermeations-Chromatographie (siehe Abbildung 18) wurden einerseits durch Neutralzuckeranalysen und andererseits durch Proteinbestimmungen gewonnen. Diese Analysen zeigten, dass sich die beiden Fraktionen voneinander unterscheiden. Die Zuckerzusammensetzung der Fraktion 1 zeigt, dass diese in ungefähr gleichem Verhältnis Arabinose, Xylose, und Mannose und in geringen Mengen Glucose beinhaltet. Als Hauptbestandteil wurde jedoch Galactose nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Nach weiterer Aufreinigung dieses Gemisches wurde ein Galactansulfat mit geringem Anteil von Xylose erhalten. Xylose ist eine relativ selten vorkommende Pentose in Zellwänden von Prokaryoten - im Gegensatz zu Pflanzen. In D-Konfiguration wurde sie im Lipopolysaccharid von *Neisseria* und in L-Konfiguration im LPS von *Pseudomonas* nachgewiesen [391]. Sulfatierte Polysaccharide sind weniger im Prokaryoten-Reich, sondern vermehrt im Pflanzen- und Tierreich als Bestandteile extrazellulärer Matrix verbreitet. Darunter sind Glycosaminoglycane, wie Heparin, Heparansulfat, Chondroitinsulfat und Dermatanulfat zu nennen [392]. Eine weitere Kategorie stellen die Rot- und Braunalgen-Polysaccharide dar, die nachgewiesene biologische Aktivität besitzen (Fucoïdan) [393], bzw. aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften für industrielle Zwecke genutzt werden (z. B. Carragenane, Agar, Agarose).

Im Speziellen werden Galactansulfate u. a. von Algen synthetisiert und für die Herstellung von Agar verwendet. Xylose kann auch Bestandteil von Agarose sein.

Von der isolierten Galactansulfat-Fraktion wurde eine Analyse zur Bestimmung der absoluten Konfiguration durchgeführt, die gezeigt hat, dass die Galactose - wie in

Agarose - sowohl in D- als auch in L-Konfiguration vorliegt. Durch weitere Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass dieses Galactansulfat aus dem Nährboden stammt, der zur Anzucht verwendet wurde. So zeigten vergleichende NMR-Messungen von diesen isolierten Galactansulfaten, dem Middlebrook-Agar (siehe 3.1.3) und reiner Agarose identische Signale.

Für Fraktion 2 wurden jeweils Arabinose und Mannose nachgewiesen. Außerdem wurde Glucose identifiziert. Auffällig war das Vorhandensein von methylierten Hexosen. Einerseits wurde in großen Mengen eine 6-O-Methyl-Hexose und geringer eine 3-O-Methyl-Hexose nachgewiesen (siehe Tabelle 2). Um welche Hexosen es sich dabei handelt, konnte aufgrund von fehlenden Standard-Substanzen nicht ermittelt werden. Die Zuckerzusammensetzung mit Arabinose und Mannose als Hauptbestandteile sowie erste NMR-Experimente (siehe 4.2.3) in dieser zweiten Fraktion gaben Hinweise darauf, dass es sich bei dieser Fraktion um ein Gemisch handelt, das ein Arabinomannan beinhaltet, wie es bereits aus der Kapsel von *M. tuberculosis* isoliert und teilweise charakterisiert wurde [40]. Ferner könnte es sich dabei um Lipoarabinomannan handeln, einem Glycolipid, das in allen Mykobakterien-Spezies Bestandteil der Zellwand darstellt und möglicherweise auch in einer zweiten Schicht an der äußersten Zelloberfläche vorkommt [208]. Der Glycan-Anteil beider Polymere weist strukturelle Ähnlichkeiten auf [40]. Ein eindeutiger Unterschied zwischen dem Arabinomannan und dem Lipoarabinomannan ist der Lipidanker [40], der im Lipoarabinomannan vorhanden ist, und der dem Arabinomannan fehlt. Daher wurde versucht, durch eine Fettsäure-Analyse dieser Fraktion das Vorhandensein des Lipids nachzuweisen bzw. auszuschließen. Charakteristische Fettsäuren im Lipoarabinomannan sind Tuberkulostearinsäure (C19:0) und Palmitoleinsäure (C16:0) [201]. Die Fettsäure-Analyse stellte sich allerdings als schwierig heraus, da der Fettsäure-Anteil im Lipoarabinomannan im Verhältnis zum Gesamtmolekül äußerst gering ist [180]. Bei dieser Analytik der Fettsäuren war bei einer eingesetzten Substanzmenge von 500 µg die untere Nachweisgrenze erreicht, so dass weder qualitativ noch quantitativ eine eindeutige Aussage getroffen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die limitierte Substanzmenge lies jedoch keine weitere Analyse in einem größeren Maßstab zu. Zunächst konnte daher nicht geklärt werden, ob es sich bei dieser Fraktion um ein Gemisch handelt, das ein Arabinomannan oder ein Lipoarabinomannan beinhaltet. Zur weiteren Aufreinigung dieses Gemisches wurde eine Affinitäts-Chromatographie durchgeführt. Generell ist es erforderlich, komplexe Substanzgemische mehrmals durch

unterschiedliche chromatographische Methoden aufzutrennen. Dabei ist es sinnvoll, beispielsweise einerseits nach Molekularmasse und andererseits nach Ladung, Hydrophilie oder spezifischer nach Bindungsaffinität zu anderen Molekülen zu trennen. Affinitäts-Chromatographie ist äußerst spezifisch und wird mittels Antikörper oder Lektinen durchgeführt, die selektiv Moleküle aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften zu binden vermögen. Das erhaltene Gemisch wurde durch Affinitäts-Chromatographie mittels ConcanavalinA (siehe oben) aufgetrennt. Strukturen mit endständigen α -gebundenen Mannose-Resten kommen zum Teil in mykobakteriellen Arabinomannanen vor [40]. Diese bilden jedoch auch so genannte „Mannose-Caps“ in Lipoarabinomannanen [180]. Terminale α -gebundene Glucose-Reste, die auch von ConA gebunden werden, kommen auch in dem beschriebenen Glucan aus *M. tuberculosis* vor [40].

Durch die Affinitäts-Chromatographie mittels ConA wurde versucht, aus dem erhaltenen Gemisch Arabinomannane mit terminalen Mannose-Resten zu isolieren. Dabei wurde zur Detektion die UV-Absorption sowohl bei 210 nm als auch bei 280 nm gemessen. Bei letzterer Wellenlänge absorbieren typischerweise Proteine durch das Vorhandensein aromatischer Aminosäuren, wie Tyrosin und Tryptophan [394]. Die Chromatographie der Gemische aus beiden Morphotypen ergab bei den jeweils gemessenen Wellenlängen zwei Signale, die sich in ihrer Absorption stark unterschieden (siehe Abbildung 23). Das intensivste Signal zeigte die ConA-negative Fraktion (Fraktion A). Gebundene Substanz (Fraktion B) absorbierte bei 210 und 280 nm im Vergleich dazu hingegen nur schwach. Damit wurde Substanz abgetrennt, die damit nachgewiesenermaßen terminal glycosyliert ist. Erste Analysen durch NMR-Messungen und Neutralzucker-Bestimmungen zeigten, dass diese zwei Fraktionen sich strukturell unterscheiden, wobei Fraktion A wahrscheinlich ein Lipoarabinomannan darstellt und Fraktion B ein reines Arabinomannan. (siehe 5.3). In Fraktion A wurden Arabinose, Mannose, 6-*O*- und 3-*O*-Methyl-Hexose, sowie Glucose und Galactose nachgewiesen (siehe Abbildung 24). NMR-Spektren zeigen das Vorhandensein von Fettsäuren. Damit liegt ein Lipoglycan-Gemisch vor. In den Fraktionen B wurde ausschließlich Arabinose und Mannose nachgewiesen (siehe Abbildung 25). Das Prinzip der Trennung dieser Substanz aus dem Gemisch beruht auf der Bindung an ConA, was endständige Mannosylierungen beweist. Das Vorhandensein von Fettsäuren wurde aufgrund von NMR-Spektroskopie und SDS-PAGE ausgeschlossen. Damit liegen neutrale nicht-acylierte Arabinomannane vor, die terminale Mannose-Reste aufweisen.

5.3 Strukturanalysen

Kohlenhydrate haben das Potential zur beinahe unbegrenzten Strukturvielfalt. Anders als Aminosäuren, die lineare unverzweigte Peptide bilden, können Monosaccharide über verschiedene Hydroxylgruppen glycosidische Bindungen eingehen. So können auch bakterielle Kapsel-Polysaccharide generell zahllose verzweigte Strukturen ausbilden. Als Homo- und Heteropolymere bestehen sie aus Zuckern und Nicht-Zucker-Bestandteilen mit zahlreichen Substitutionen und Bindungsmöglichkeiten. Ungewöhnliche Zucker kommen nicht selten vor [395]. Die meisten bakteriellen Polysaccharide stellen Heteropolymere dar und bestehen aus einer Wiederholungseinheit aus Oligosacchariden [222;396;397;398;399]. Dem Großteil werden antigene Eigenschaften zugesprochen. Daher sind sie häufig für die immunologischen Typ-, Spezies- oder Gruppen-Spezifitäten der Bakterien verantwortlich [391].

Die in dieser Arbeit isolierten mykobakteriellen Polysaccharide wurden strukturell untersucht. Da die Ausbeuten der erhaltenen Fraktionen generell gering waren, wurden die chemischen Analysen zur Strukturaufklärung an Minimalmengen durchgeführt.

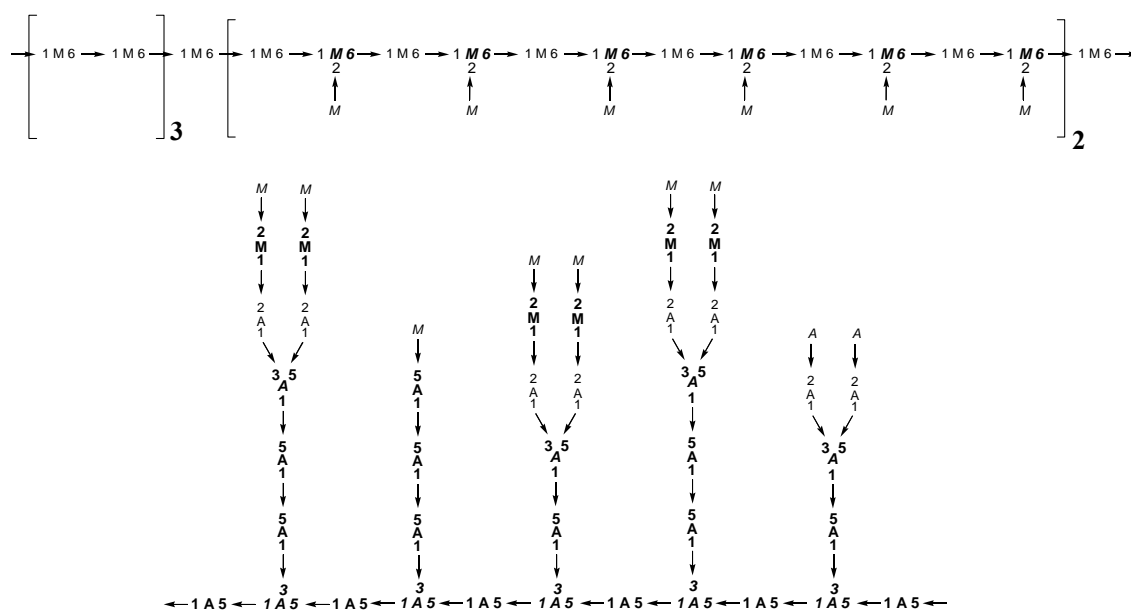
Die Polysaccharide der Fraktion A wurden aufgrund der Neutralzucker-Zusammensetzung als Arabinomannane identifiziert. In den NMR-Spektren geben Signale um 1,0 ppm und 1,5 ppm, die durch CH_3 - bzw. $-\text{CH}_2$ -Gruppen hervorgerufen werden, Hinweise auf das Vorhandensein eines Lipidankers. Aus Gründen der limitierten Substanzmenge wurde auf eine qualitative Fettsäure-Analyse verzichtet. Es handelt sich bei den ConA-negativen Polysacchariden damit sehr wahrscheinlich um Lipoarabinomannane. Durch Methylierungsanalysen wurden die für LAM zu erwartenden Zuckerreste nachgewiesen (siehe 4.4.2.2.1.1). 3-O-Methyl-Hexosen wurden als terminale und 5-substituierte Hexapyranosen nachgewiesen. 6-O-Methyl-Hexosen liegen sowohl 4- als auch 5-substituiert in pyranosidischer Ringform vor (siehe 4.4.2.2.1.2). Anders als gebundene stellen ungebundene Fraktionen nach Affinitäts-Chromatographie nicht zwingend Reinsubstanzen dar, denn bei fehlender Affinität zu dem Antikörper oder Lektin kommt es zu keiner weiteren Auftrennung des Gemisches. Somit war zunächst nicht auszuschließen, dass es sich bei den LAM dennoch um Gemische handelt. Der Nachweis von Glucose (siehe 4.4.2.1) in diesen Präparationen spricht dafür, dass es sich nicht um aufgereinigte Isolate handelt.

Zu erwähnen ist, dass diese LAM nach milder Extraktionsmethode mit 1% wässriger Phenol-Lösung (siehe 4.2) gewonnen wurden. Üblicherweise wird zur Extraktion von

Lipoglycanen die *french press*-Methode angewandt, um dann aus Zellwand-Bestandteilen Lipoglycane zu isolieren. Dies stützt die Hypothese, dass Lipoglycane, insbesondere LAM, nicht nur in der Zellwand verankert vorkommen, sondern entweder kontinuierlich synthetisiert werden oder in einer zweiten Schicht in der Zellhülle lokalisiert sind [208].

Massenspektrometrische Untersuchungen dieser LAM lieferten Spektren, die durch die Vielzahl an Kombinationen aus Hexosen, Pentosen und Methyl-Hexosen nicht interpretierbar waren (siehe 4.4.2.3.2). Diese Substanzen wurden nicht vollständig charakterisiert.

Die Polysaccharide der Fraktion B erwiesen sich als Arabinomannane in Reinstform. Es gab keine Hinweise auf Verunreinigungen mit anderen Substanzen. Die Zucker-Zusammensetzung zeigte eindeutige Unterschiede zwischen den beiden Arabinomannanen aus SmT und SmO. Das Polysaccharid aus SmT zeigt ein Verhältnis von Arabinose zu Mannose wie 1:4, während das Arabinomannan aus SmO Arabinose und Mannose in annähernd gleichen Anteilen beinhaltet (siehe 4.4.2.1). Methylierungsanalysen lieferten dieselben substituierten Zucker-Reste in beiden Arabinomannanen. Es wurden hauptsächlich vier verschiedene Arabinose-Reste (tAraf, 2-Araf, 5-Araf, 3,5-Araf) und fünf verschiedene Mannose-Reste (tManp, 2-Manp, 3-Manp, 6-Manp, 2,6-Manp) identifiziert. Damit beinhalten die in dieser Arbeit isolierten Arabinomannane dieselben Zucker mit identischen Substitutionsmustern, wie sie für mykobakterielle Arabinomannane beschrieben sind [227]. Zur Strukturaufklärung der Arabinomannane wurden ein- und zweidimensionale NMR-Experimente auf der Grundlage der Ergebnisse der Methylierungsanalyse herangezogen. Starke Überlagerungen der Signale in den NMR-Spektren ließen nicht immer eine vollständige Identifizierung der Zucker-Reste zu (siehe Abbildung 39 und Abbildung 40). Insbesondere Mannose-Reste zeigten in den TOCSY-Spektren (nicht gezeigt) nicht alle zu einer Zucker-Einheit gehörigen Protonen, dessen Korrelationssignale mit benachbarten Protonen auch in den COSY-Spektren nicht immer identifizierbar waren. Somit konnten in NOESY- und ROESY-Spektren nicht alle interresidualen Kontakte zugeordnet werden. Die Ergebnisse der Methylierungsanalysen in Kombination mit den NMR-Daten ließen dennoch Strukturvorschläge zu. Für das Arabinomannan aus SmT kann folgende mögliche Struktur vorgeschlagen werden:

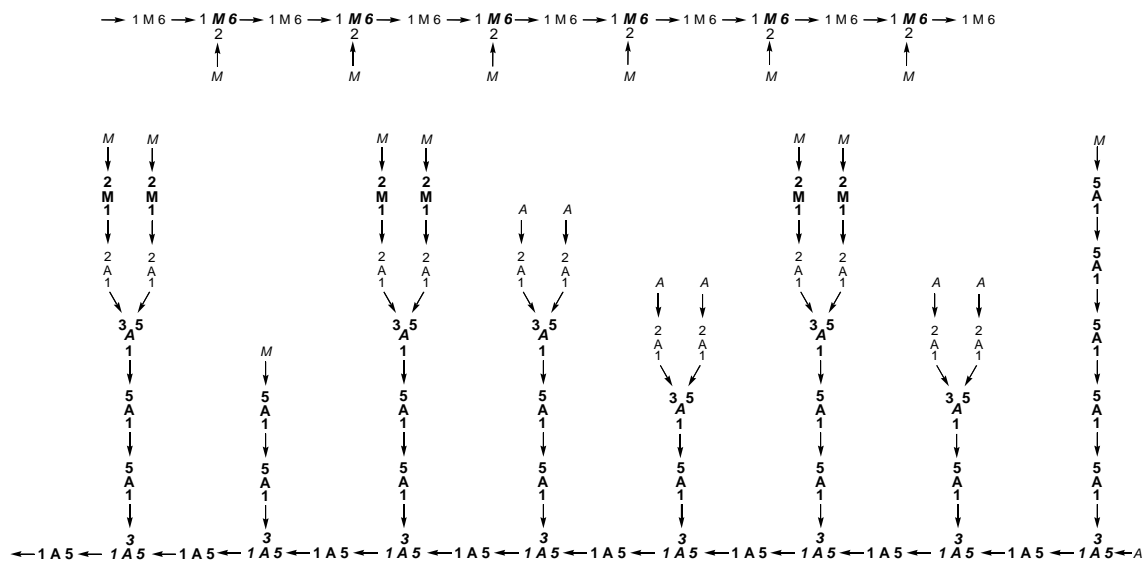


Die Anzahl der jeweiligen Zucker-Reste ergibt sich aus der Quantifizierung der einzelnen Monomere nach Methylierungsanalyse (siehe 4.4.2.2.2). Die NMR-Daten geben Beweise für eine Mannan-Hauptkette aus 1→6-gebundenen Mannose-Resten. Dabei kommen 6- und 2,6-substituierte Mannose-Reste alternierend vor. NOE-Kontakte zwischen Proton 1 und Proton 6 der 6-gebundenen Mannose zeigen (siehe Abbildung 41), dass auch eine Kette aus 6-gebundenen Mannosen vorliegt. Ob diese 1→6 gebundenen Mannosen als Ketten zwischen den 2,6-substituierten Resten vorliegt, kann nicht geklärt werden. NOE-Kontakte zwischen Proton 1 der terminalen Mannosen und Proton 2 der 2,6-substituierten Mannose (siehe Abbildung 41) zeigen, dass diese alle in Position 2 terminal mannosyliert sind. Die NMR-Daten geben Beweise für eine 1→5 gebundene Arabinan-Kette, von denen einige Arabinose-Reste an Position 3 mit Seitenketten aus weiteren 1→5 Arabinan-Ketten substituiert sind. Es kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob in der Hauptkette die 5- und 3,5-substituierten Reste alternierend vorliegen, oder ob zwischen den Verzweigungsstellen auch lediglich 1→5 gebundene Arabinose-Reste vorliegen. Die Länge bzw. die Lage der einzelnen Seitenketten ist nicht identifizierbar. Nachgewiesenermaßen befinden sich terminale Mannose-Reste an den Seitenketten – einerseits direkt an den 1→5 gebundenen Arabinose-Resten und andererseits an den Cap-Strukturen, die von 2-substituierten Mannosen gebildet werden. Durch Methylierungsanalyse wurden ebenfalls 3-substituierte Mannosen nachgewiesen. Möglicherweise existieren nicht nur Cap-Strukturen aus 1→2 gebundenen, sondern auch aus 1→3 gebundenen Mannosen. Da die Identifizierung der 3-substituierten Mannose durch NMR nicht erfolgte, konnten so

auch keine interresidualen Kontakte von diesem oder zu diesem Zucker zugeordnet werden. Die Lage der 3-substituierten Mannose-Reste bleibt daher ungeklärt. Eine Existenz als Cap-Strukturen aus 1→3 gebundenen Mannosen ist aber wahrscheinlich. Die Verknüpfung der Arabinan-Kette (1→5) an die Mannan-Kette (1→6) ist von einer 5-substituierten Arabinose an eine 6- oder 2,6-substituierte Mannose wahrscheinlich. Ein interresidualer Kontakt zwischen 6-substituierten Mannosen und 5-substituierten Arabinosen wurde nicht identifiziert. Das kann damit zu erklären sein, dass nur eine Verknüpfung pro Molekül auftritt und deren interresidualer Kontakt neben zahlreichen weiteren intra- und interresidualen Kontakten nicht zu beachten ist. Die Verknüpfung der Arabinan-Kette an die Mannan-Kette ist dennoch entweder über eine 6- oder 2,6-substituierte Mannose sehr wahrscheinlich.

Die massenspektrometrischen Analysen der Arabinomannane wurden unter Induzierung hoher Fragmentierung durchgeführt, um Informationen über die strukturellen Eigenschaften zu gewinnen. Daher wurden keine Molekülpeaks mit den Molekularmassen des gesamten Arabinomannans erwartet, sondern vorwiegend einzelne Fragmente des Moleküls. Auf der Grundlage der vorgeschlagenen Struktur können die Fragmente nach ESI-MS u. a. als Seitenketten interpretiert werden. Fragmente, die nur aus Mannosen bestehen, wurden nur in einem Fall nachgewiesen (siehe Tabelle 7). Ein Grund dafür kann sein, dass das Mannan aufgrund seiner Struktur ohne Seitenketten ein anderes Fragmentierungsverhalten zeigt als das Arabinan mit seinen zum Teil langen Seitenketten. Es kann somit angenommen werden, dass das langkettige unverzweigte Mannan, das lediglich terminale Mannose-Reste aufweist, in geringerem Maße fragmentiert und daher aufgrund der Masse nur eingeschränkt detektiert wird. Das Arabinan mit seinen Seitenketten lässt eine verstärkte Fragmentierung erwarten. Insbesondere zwischen den einzelnen Seitenketten ist die Stabilität des Moleküls verringert, so dass eine Fragmentierung zu erwarten ist. Auf dieser Grundlage können die identifizierten Fragmente (siehe Abbildung 32) vorwiegend als Arabinan-Seitenketten (mit mehr oder weniger Teilen der Hauptkette) erklärt werden. Nicht jedes Fragment stellt somit eine Seitenkette dar. Es muss berücksichtigt werden, dass jede Seitenkette der postulierten Struktur eine gerade Anzahl von Mannose-Resten trägt. Das Auftreten von Fragmenten mit ungerader Anzahl von Mannose-Resten kann jedoch wiederum damit erklärt werden, dass ein Fragment durch Abspaltung von (Pentosen und) Hexosen aus einem anderen hervorgegangen sein kann. Die ESI-MS-Daten sind somit im Einklang mit der postulierten Struktur, können aber nicht eindeutig Strukturelemente zugeordnet werden.

Für das Arabinomannan aus SmO ist folgende Struktur möglich:



Dieses Arabinomannan aus SmO weist im Vergleich zu SmT ein verkürztes Mannan und größeres Arabinan auf. Ob es sich dabei um eine längere Hauptkette handelt oder um längere oder mehr Seitenketten, kann durch die chemischen Analysen und NMR-Messungen nicht bestimmt werden. Weitere strukturelle Unterschiede zwischen dem Arabinomannan aus SmT und SmO können nicht festgestellt jedoch auch nicht ausgeschlossen werden.

Die massenspektrometrischen Analysen dieses Arabinomannans (siehe Abbildung 31) zeigen ausschließlich Fragmente, die mehr Arabinose-Reste als Mannose-Reste aufweisen. Aufgrund des größeren Arabinans ist dies in guter Übereinstimmung. So können die Fragmente zum Teil als Arabinan-Seitenketten (mit oder ohne Teilen der Hauptkette) erklärt werden.

5.4 Biologische Aktivität

Allen isolierten mykobakteriellen Polysacchariden konnte biologische Aktivität nachgewiesen werden.

Um auszuschließen, dass die zu testenden Substanzen kontaminiert sind, wurde der Gehalt an LPS, einem starken Zytokin-Induktor, durch einen LAL-Test (siehe 3.3.16)

bestimmt. Dabei wurden nur geringe Mengen LPS nachgewiesen (Fraktion A: SmT: 97 pg/ μ g; SmO: 81 pg/ μ g; Fraktion B: SmT: 15 pg/ μ g; SmO: 3 pg/ μ g). Derartig geringe Konzentrationen an LPS-Verunreinigungen sind im Hinblick auf biologische Aktivität, insbesondere Zytokin-Induktion, zu vernachlässigen.

Zunächst wurde die TNF- α -Freisetzung aktivierter Knochenmarksmakrophagen nach Stimulation mit den Polysacchariden bestimmt. TNF- α gilt als proinflammatorisches Zytokin, das in einer frühen Phase der Infektion lokal produziert wird. Überwiegend wird es von Zellen des mononukleären Phagozytensystem gebildet. Es ist ein so genanntes endogenes Pyrogen, das nach Stimulation durch exogene Pyrogene gebildet wird. Es bewirkt proinflammatorische Funktionen wie Aktivierung des Endothels, Förderung der Adhäsion und Extravasation von Leukozyten, Permeabilitätssteigerung der Gefäße und Förderung der Gerinnung auf der Oberfläche von Endothelzellen. Auf diese Weise wird möglicherweise der Verschluss kleiner Blutgefäße erreicht, um eine systemische Ausbreitung der Infektion zu verhindern. Darüber hinaus wird durch TNF- α die Phagozytose durch neutrophile Granulozyten gesteigert. TNF- α wirkt auch als Kofaktor der Makrophagenaktivierung [400].

Die Messungen der TNF- α -Freisetzung stimulierter Knochenmarksmakrophagen zeigen, dass die Lipoglycan-Gemische (Fraktion A) eine verhältnismäßig hohe TNF- α -Produktion induzieren können, während die lipidfreien Arabinomannane (Fraktion B) keine Freisetzung an TNF- α induzieren (siehe Abbildung 43). Die Mengen an freigesetztem TNF- α nach Stimulation mit den Lipoglycan-Gemischen sind höher als diejenigen, die nach Aktivierung durch LPS erreicht wurden, wobei LPS als Reinstanz als wahrscheinlich stärkster Stimulus gilt. Im Vergleich zu der Stimulation mit ganzen Mykobakterien wurde allerdings weniger Zytokin freigesetzt. Die Ergebnisse wurden nach Stimulation humaner dendritischer Zellen bestätigt (siehe Abbildung 44). Die verstärkte Zytokin-Produktion humaner Zellen (um mehr als Faktor 10) im Vergleich zu murinen Zellen erklärt sich durch die Tatsache, dass das murine Immunsystem generell unempfindlicher gegen Stimuli ist. Durch beide *in vitro* Systeme wurde gezeigt, dass es sich damit bei den Lipoglycan-Gemischen um starke Induktoren für TNF- α handelt. Im Gegensatz dazu führen die reinen Arabinomannane zu einer äußerst geringen Produktion von TNF- α . Es scheint somit ein struktureller Unterschied der Substanzen für die Stimulation mononukleärer Zellen verantwortlich zu sein. Dieser Unterschied kann auf den Lipidanker zurückgehen oder in den terminalen Mannosen begründet sein.

Weiterhin wurde die INF- γ -Produktion humaner mononukleärer Zellen nach Stimulation mit den isolierten mykobakteriellen Polysacchariden gemessen.

INF- γ ist als proinflammatorisches Zytokin für die Infektabwehr essentiell. Es wird von aktivierten Lymphozyten und NK-Zellen produziert und ist ein Schlüssel-Zytokin in der Th1-Immunantwort. In NK-Zellen wird es durch Makrophagen-Zytokine, wie TNF- α und IL-12, stimuliert. Damit steht INF- γ insbesondere in der frühen Phase der Infektion als Makrophagenaktivator zur Verfügung. Es induziert die Makrophagenaktivierung und ist damit wichtig für das Abtöten von Erregern, die wie beispielsweise Mykobakterien intrazellulär überleben [400].

Die Messungen zeigen, dass sowohl die Lipoglycan-Gemische als auch die Arabinomannane alle sehr schwache Induktoren für eine INF- γ -Freisetzung sind (siehe Abbildung 47). Die Messungen wurden nach Stimulation für 7 d durchgeführt. Möglicherweise wäre zu einem früheren Zeitpunkt eine vermehrte INF- γ zu erwarten, da es sich bei INF- γ um ein frühes Zytokin handelt (siehe oben). Das Ergebnis ist daher nicht eindeutig zu bewerten.

Ferner wurde die IL-10-Freisetzung von murinen Makrophagen und humanen dendritischen Zellen nach Stimulation mit den Fraktionen A und B aus SmT und SmO quantifiziert. IL-10 gilt als antiinflammatorisches Zytokin. Es ist in der Lage, Entzündungen infolge von Infektionen einzudämmen. IL-10 wird von zahlreichen Zellen gebildet, wobei die wichtigsten Produzenten Monozyten, Makrophagen und Th2-Zellen sind. Im Gegensatz zu anderen Zytokinen wird IL-10 in einer späten Phase gebildet. Es wird nach den proinflammatorischen Zytokinen freigesetzt und gilt als negativer Rückkoppler. Wahrscheinlich ist IL-10 dafür verantwortlich, überschießende Reaktionen in der Infektabwehr zu inhibieren. Damit gilt IL-10 als immun-supprimierendes Zytokin [400].

Die Messungen der IL-10 Produktion muriner Knochenmarksmakrophagen nach Stimulation mit den Fraktionen A und B aus SmT und SmO zeigen ähnliche Ergebnisse (siehe Abbildung 45) wie die der TNF- α -Messungen (siehe Abbildung 43). Nach nur 24 h Stimulation mit den Lipoglycan-Gemischen wurden sehr hohe Konzentrationen an IL-10 freigesetzt. Da es sich bei IL-10 um ein Zytokin handelt, das verhältnismäßig spät produziert wird (siehe oben), wären nach 96 h, dem Zeitraum, nach dem typischerweise IL-10 *in vitro* gemessen wird, höhere IL-10-Werte zu erwarten.

Die Messungen von IL-12 in Überständen stimulierter Zellen zeigen generell eine geringe Zytokin-Antwort (siehe Abbildung 48). IL-12 wird vorwiegend von Monozyten

bzw. Makrophagen sowie von dendritischen Zellen produziert und ist wichtig in der frühen Phase zellulärer Immunität. Es ist ein potenter Induktor von Anti-Tumor-Aktivität [401] und wirkt zusammen mit INF- γ und TNF- α [402].

Im Zusammenhang mit mykobakteriellen Arabinomannanen wurden bereits zytotoxische Eigenschaften beschrieben [304;305]. Die Zytotoxizitäten wurden *in vivo* in Maus-Modellen gegen Fibrosarkome und Metastasen von Lungenkarzinomen und Melanomen festgestellt. Dabei handelt es sich allerdings nicht um aufgereinigte kapsuläre Arabinomannane, sondern um Arabinomannan-reiche Extrakte, die aus *M. tuberculosis* Stamm Aoyama B gewonnen wurden.

Um ähnliche immunmodulatorische Aktivitäten von reinen Arabinomannanen aus *M. avium* zu testen, wurden diese zur *in vitro*-Stimulation humaner mononukleärer Zellen eingesetzt, deren Aktivität gegen eine humane Blasen-tumor-Zelllinie getestet wurde. Die Lipoglycan-Gemische induzierten eine starke Zytotoxizität. Analog dazu induzierten die reinen Arabinomannane eine ebenso ausgeprägte Anti-Tumor-Aktivität (siehe Abbildung 49). Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde als Referenz-Stimulus ein BCG-Lyophilisat eingesetzt, da BCG als potenter Aktivator humaner MNC-Funktionen beschrieben ist [403]. Als Negativ-Kontrolle wurden unstimulierte Zellen eingesetzt. Nicht im Rahmen dieser Arbeit wurden Experimente durchgeführt, die zeigen, dass Zellen, die mit Substanzen kultiviert werden, die keinerlei immunmodulatorische Eigenschaften besitzen, gleichermaßen inaktiv sind wie unstimulierte Zellen [404]. Damit sind unstimulierte Zellen als reelle Negativ-Kontrolle anzusehen. Die Zytotoxizität wurde gegen die humane Blasen-tumor-Zelllinie T24 bestimmt. Diese ist im Vergleich zu der Leukämie-Zelllinie K562 verhältnismäßig unempfindlich gegen BCG [405]. Um selbst geringe Mengen an zytotoxischer Aktivität festzustellen, bietet sich daher BCG als Positiv-Kontrolle gegen T24 an.

Eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität konnte für alle isolierten Substanzen eindeutig festgestellt werden. Auffällig ist, dass die jeweils getesteten Lipoglycan-Gemische (Fraktion A) und Arabinomannane (Fraktion B) aus SmO ein anderes Dosis-Wirkungs-Optimum als die aus SmT zeigen. Denn bei Erhöhung der Konzentration von 10 μg auf 40 μg der Stimuli ist bei SmO die Messgröße für die Zytotoxizität unverändert. Bei SmT hingegen ist eine starke Abnahme dieser Aktivität zu verzeichnen (siehe Abbildung 50). Damit scheint bereits das Optimum für 40 μg dieser Substanz überschritten zu sein. Um diesen Dosis-Wirkungs-Effekt eindeutig nachzuweisen und die Optima der einzelnen Substanzen zu bestimmen, wären weitere Experimente nötig.

Dabei könnte der Effekt mit geringeren Mengen der Stimuli und in weiteren Effektor-Zielzell-Verhältnissen gemessen werden, so wie es für BCG etabliert ist. Bei BCG liegt das Optimum des Dosis-Wirkungs-Effekt bei 7 Tagen Stimulation mit 0,04 MOI pro Zelle. Aus Gründen der limitierten Substanzmengen (siehe Tabelle 3) wurde an dieser Stelle auf weitere Experimente verzichtet.

Werden mononukleäre Zellen in Kultur gehalten, unabhängig davon, ob sie stimuliert werden oder nicht, ist der Anteil an Monozyten nach 7 Tagen fast vollständig zugrunde gegangen. Übrig bleiben Lymphozyten und NK-Zellen. Das heißt, nach derart langen Stimulationszeiten von mononukleären Zellen sind wahrscheinlich NK-Zellen für die nachgewiesene Zytotoxizität verantwortlich. Für BCG-aktivierte Killerzellen konnte dies gezeigt werden: Die Stimulation von humanen mononukleären Zellen für 7 Tage mit *M. bovis* BCG führt zur Aktivierung von zytotoxischen Lymphozyten von NK-Zell-Phänotyp [406].

Im Vergleich zu BCG sind die isolierten mykobakteriellen Polysaccharide relativ potente Immunmodulatoren. Bei den eingesetzten Substanzmengen zur Stimulation wurde jeweils rund die Hälfte der Aktivität von BCG nachgewiesen. Möglicherweise sind höhere Werte zu erreichen, wenn die Dosis von 10 µg des jeweiligen Stimulus weiter verringert wird. Anhand der Messwerte ist nicht erkennbar, ob bei 10 µg das Maximum erreicht oder bereits überschritten ist.

Eindeutig ist, dass die nachgewiesenen immunmodulatorischen Eigenschaften auf morphotypspezifische Unterschiede zurückgehen und weniger in Strukturunterschieden wie den Lipidanker oder das Vorhandensein terminaler Mannosen, begründet sind.

Hingegen ist ein Lipidanteil in den Arabinomannanen für eine verstärkte Zytokin-Produktion verantwortlich. Arabinomannane mit Lipidanker sind starke Induktoren für Zytokin-Produktion, während nicht acylierte Arabinomannane eine nur schwache Zytokin-Antwort hervorrufen (siehe 4.5). In der Literatur ist die Induktion von Zytokinen durch acylierte mykobakterielle Arabinomannane beschrieben [285;286;287]. Dass diese Wirkung auf den Lipidanker zurückzuführen ist, konnte für Lipoarabinomannane (AraLAM) aus *M. smegmatis* gezeigt werden. Nach Abspalten der Fettsäuren durch Alkali-Behandlung zeigte sich eine verminderte biologische Aktivität [407].

Dass Lipidanker essentiell für die Induktion proinflammatorischer Zytokine sind, zeigt sich auch durch die Wirkung von Lipopolysaccharid, dem wohl stärksten Induktor für TNF- α .

5.5 Ausblick

Eine vollständige Strukturaufklärung der isolierten Arabinomannane gestaltet sich äußerst schwierig. Durch einen Verdau mit einem Enzym, das zum Beispiel spezifisch α -(1 \rightarrow 5)-Bindungen zwischen Arabinose-Resten spaltet, könnten Mannan-Ketten und Cap-Strukturen aus 3,5-disubstituierten Arabinose-Resten mit Mannose-Resten erhalten werden, die dann chromatographisch aufgetrennt und separat strukturell untersucht werden könnten. Eine derartige Analyse würde hingegen keine weiteren Informationen über die exakte Struktur des Arabinans erlauben. Enzyme, die spezifisch α -(1 \rightarrow 3)-Bindungen zwischen Arabinose-Resten spalten, würden vollständige Arabinan-Seitenketten mit Mannose-Cap-Strukturen hervorrufen. Diese könnten ebenfalls getrennt und separat strukturell untersucht werden. Massenspektrometrische und/oder NMR-spektroskopische Analysen könnten dazu führen, einzelne Seitenketten vollständig zu charakterisieren. Durch eine enzymatische Degradation ist die Strukturanalyse des Arabinans mit Informationen über die Länge der Seitenketten oder Struktur der Arabinan-Hauptkette jedoch nur begrenzt möglich.

Die biologische Aktivität der Arabinomannane soll in Zukunft näher charakterisiert werden. Dabei sind neben weiteren *in vitro*- auch *in vivo*-Experimente im Maus-Modell nötig.

Die Infektionsbiologie der Mykobakterien ist nach wie vor unvollständig verstanden. Wichtig für die Infektion ist in den ersten Schritten die Adhärenz von Mykobakterien an Makrophagen als ihre Zielzellen. U. a. ist dabei der Makrophagen-Mannose-Rezeptor von Bedeutung [292]. Ist sowohl der Rezeptor als auch der Ligand im natürlichen System bekannt, die in ihrer Wechselwirkung zur Penetration von Mykobakterien in Makrophagen führen, so könnten kompetitive Rezeptor-Inhibitoren, wie die sogenannten Glycomimetika [408] entwickelt und getestet werden. Dabei wird angestrebt, künstliche Liganden für die natürlichen Rezeptoren zu synthetisieren mit ähnlicher oder sogar verbesserter Wirksamkeit, um den Rezeptor zu blockieren und damit den Eintritt des Bakteriums in die Wirtszelle zu verhindern. Die Synthese solcher Verbindungen ist relativ problemlos durchzuführen, und kann leicht variiert werden. Bei dem Aufbau dieser Oligo- oder Polysaccharid-Strukturen, ist es wichtiger, die für die Erkennung essentiellen Strukturelemente zu platzieren, als dem natürlichen Liganden oder Antigen als Muster zu folgen. Es ist dabei nicht zwingend erforderlich, das das Gerüstmolekül

selbst ein Kohlenhydrat ist [409;410]. Derart synthetisierte Glycomimetika können mit den natürlichen Strukturen, wie den Bakterien und ihren Zielzellen, in Zellkultursystemen koinkubiert werden, um so *in vitro* eine eventuelle Blockierung des Rezeptors zu messen.

Generell können für alle bekannten Rezeptoren auf der Oberfläche von Mykobakterien, die für den Eintritt in ihre Zielzellen verantwortlich sind, Inhibitoren auf diese Weise synthetisiert werden, um so eine Infektion möglicherweise zu unterbinden. Sollten im Laufe der weiteren Erforschung des Genoms von *M. avium* die Gene für die an der Biosynthese beteiligten Enzyme von Zellwand- und Kapsel-Polysacchariden zugeordnet werden können, so könnte dies neue Möglichkeiten zur Herstellung dementsprechender Inhibitoren bieten.

Hinsichtlich der Entwicklung neuer antimykobakterieller Chemotherapeutika, die zweifelsohne aufgrund der steigenden Zahl multiresistenter Stämme notwendig sind [5] (siehe 1.1.1.1), bietet somit die Glycomimetika-Forschung äußerst viel versprechende Möglichkeiten.

Die nachgewiesenen aber nicht aufgeklärten Mechanismen der anti-neoplastischen Eigenschaft des *M. bovis* Stammes BCG können möglicherweise neue Wege der Tumor-Therapie einleiten [110;249]. Derzeit stellt dieser Stamm eine Standardtherapie in der Behandlung des Urothelkarzinoms dar [109]. Sollten die molekularen Prinzipien verstanden werden, und ließen sich möglicherweise einzelne wirksame Strukturen aus diesem Stamm isolieren, so könnte eine derartige Therapie durch geringere Nebenwirkungen verbessert werden. Denn als Lebend-Vakzine appliziert, gehen mit dieser Therapie zum Teil erhebliche Komplikation einher [249]. Eventuell könnte die Wirksamkeit auch auf andere Tumoren übertragbar sein, die bislang nicht oder nur unzureichend therapierbar sind.

Die Rezeptor-Bindung an der Oberfläche von Makrophagen sowie die Phagozytose von Mykobakterien initiieren im Makrophagen eine nur teilweise aufgeklärte Signalkaskade. Bekannt ist, dass als Oberflächenmoleküle CD14 [411] und Toll-like-Rezeptoren [412;413] sowie MAP-Kinasen [414] und Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen. Zur Aufklärung der initialen Signaltransduktion ist es notwendig, spezifische Rezeptor-Antikörper sowie gendefiziente Versuchstiere einzusetzen, um zum Beispiel

Informationen über frühe Zytokinfreisetzen zu erhalten und damit die ersten Schritte intrazellulärer Mechanismen der mykobakteriellen Infektion zu verstehen.

Die zellulären und molekularen Mechanismen, die zur Granulombildung bei Tuberkulosen führen, sind ebenso nur unvollständig verstanden.

Desweiteren ist bislang nicht geklärt, warum nur weniger als 10% aller mit *M. tuberculosis* infizierten Personen eine aktive Tuberkulose entwickeln. Klar ist lediglich, dass eine genetische Prädisposition darin begründet ist [415;416]. Auf diesem Gebiet wird auf der Grundlage der Genomforschung gearbeitet, um den genetischen Mechanismus zu verstehen, der dazu führt, dass ein großer Teil der Bevölkerung resistent, ein kleiner Teil hingegen suszeptibel für diese Infektion ist.

Ein Großteil der Grundlagenforschung hinsichtlich der Infektiologie von *M. tuberculosis* wird zunächst an der eng verwandten aber minder pathogenen Spezies *M. avium* durchgeführt. So wurden auch in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen an *M. avium* angestellt.

Zum Verständnis der Funktion mykobakterieller Kapselpolysaccharide ist es neben vollständiger Strukturaufklärung notwendig, Antikörper gegen diese Strukturen zu generieren. Durch Immunisierung geeigneter Tiere, wie Kaninchen, mit diesen isolierten Polysacchariden u. U. unter Verwendung von Adjuvantien, könnten monoklonale Antikörper erhalten werden. Damit lassen sich Untersuchungen zur Antigenproduktion anstellen. Einerseits könnten die Polysaccharide auf der Zelloberfläche durch markierte Antigen-Antikörper-Komplexe elektronenmikroskopisch lokalisiert werden. Andererseits kann die Bildung des Antigens *in vitro* und *in vivo* verfolgt werden. So könnte untersucht werden, ob sich die Biosynthese dieser Strukturen unter gewissen Bedingungen ändert, wie zum Beispiel während der einzelnen Wachstumsphasen, vor und nach Phagozytose von Makrophagen. Ebenso könnte mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gezeigt werden, ob auch andere *M. avium*-Stämme oder sogar weitere Spezies dieser Gattung diese oder ähnliche Strukturen synthetisieren.

Möglicherweise könnte die Bindung zahlreicher Antikörper auf der Bakterien-Oberfläche eine gezielte Phagozytose durch Makrophagen verhindern, was damit eine herabgesetzte Virulenz zur Folge hätte.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, aus *Mycobacterium avium*, Stamm 2151 Kapselmaterial zu extrahieren. Dabei wurde zwei verschiedene Koloniemorphotypen, die sich hinsichtlich ihrer Pathogenität im Maus-Modell unterscheiden, verglichen. Polysaccharide wurden aus dem Gemisch isoliert, anschließend aufgereinigt, charakterisiert auf mögliche biologische Aktivität hin getestet.

Aus der Kapsel beider untersuchter Morphotypen wurde jeweils ein Arabinomannan und ein Lipid-haltiges Arabinomannan isoliert, von denen ersteres aufgereinigt wurde. Dazu wurde eine teilweise etablierte Methode optimiert. Die neutralen nicht-acylierten Arabinomannane wurden strukturell untersucht. Chemische Analysen in Verbindung mit massenspektrometrischen Untersuchungen und Kernresonanz-Spektroskopie führten zu Strukturvorschlägen. Dabei wurden deutliche Strukturunterschiede zwischen den Arabinomannanen ersichtlich. Das Polysaccharid aus dem virulenten Morphotyp weist ein deutlich größeres Mannan und ein verkürztes Arabinan auf. Das Arabinomannan aus dem avirulenten Kolonietyp besitzt ein größeres Arabinan als Mannan.

Biologische Aktivität der isolierten Polysaccharide wurde *in vitro* getestet. Nach Stimulation humaner sowie muriner Zellen mit diesen Polysacchariden wurde die Zytokin-Produktion hinsichtlich TNF- α , IL-10, IL-12 und INF- γ gemessen. Es zeigten sich eindeutige Unterschiede zwischen den Arabinomannanen mit und ohne Lipidanteil. Die mit Lipid stellen starke Induktoren für Zytokin-Produktionen dar. Die Arabinomannane ohne Lipidanteil induzieren nur äußerst schwach eine Zytokin-Antwort.

In vitro wurde eine immunmodulatorische Eigenschaft für alle Arabinomannane nachgewiesen. Dabei führt die Stimulation humaner Immunzellen mit diesen Arabinomannanen zu einer Zytotoxizität gegen humane Tumor-Zellen. Es wurden keine Unterschiede zwischen Lipid-haltigen und Lipid-freien Arabinomannanen beobachtet. Hingegen wurden Morphotyp-spezifische Unterschiede festgestellt, wobei das Arabinomannan aus dem virulenten Typ hinsichtlich der Immunmodulation potenter erscheint.

7. SUMMARY

The aim of the current work was to extract capsular material from *Mycobacterium avium* strain 2151. Two different colony morphotypes, which show different pathogenicity in mouse model, were chosen for comparison. Polysaccharides had to be isolated from a mixture of capsular material, subsequently purified, characterised and tested for biological activity.

Out of the capsule of both investigated colony morphotypes an arabinomannan and a lipid-containing arabinomannan were isolated and the former further purified. For this purpose a partially established method was optimised. The neutral non-acylated arabinomannans were structurally characterised. Chemical analyses in combination with mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy were in accordance with the proposed structures. Clear differences were obvious. The polysaccharide from the virulente morphotype contained a bigger mannan and a truncated arabinan, while the arabinomannan from the non-virulent colony morphotype showed a bigger arabinan than mannan.

Biological activity of the isolated polysaccharides was tested *in vitro*. After stimulation of both human and murine cells with these polysaccharides cytokine production concerning TNF- α , IL-10, IL-12 and INF- γ was measured. There were significant differences between acylated and non-acylated arabinomannans. Those containing lipid are potent inducers for cytokine production. Non-acylated arabinomannans induce only weakly cytokine response.

In vitro immunmodulation was shown for all arabinomannans. Stimulation of human cells with these arabinomannans led to cytotoxicity against human tumor cells. No significant differences between lipid-containing and lipid-free arabinomannans were observed. However, morphotype specific differences were indicated. The arabinomannan from the virulent colony morphotype seemed to be more potent concerning immunmodulation.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 WHO (2004). Internet-Dokument. Abrufdatum: 23.1.2004 (URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/who104/en/>).
- 2 Dye C, Williams BG, Espinal MA, Raviglione MC. Erasing the world's slow strain: Strategies to beat multidrug-resistant tuberculosis. *Science*. 2002;295:2042-2046.
- 3 Kaufmann SHE. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Rev Immunol*. 2001;1:20-30.
- 4 Kaufmann SHE. Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nat Med*. 2000;6:955-960.
- 5 WHO (2004). Internet-Dokument; Abrufdatum: 20.6.2004 (URL: http://www.who.int/gtb/publications/drugresistance/2004/drs_report_exec.pdf).
- 6 Dedié K, Bockemühl J, Kühn H, Volkmer KJ, Weinke T (Hrsg.). In: Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart. 1993:335-362.
- 7 Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, Dye C. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med*. 2003;163:1009-1021.
- 8 WHO (2004). Internet-Dokument; Abrufdatum: 25.2.2004 (URL: http://www.who.int/ith/chapter05_m11_tuberculo.htm).
- 9 Connolly M, Nunn P. Women and tuberculosis. *World Health Stat Q*. 1996;49:115-119.
- 10 Ganapati R, Revankar CR. Clinical aspects of leprosy. In: Ratledge C, Stanford JL (Hrsg.). *The Biology of Mycobacteria*, Bd. 2. Academic Press, London. 1983:327-358.
- 11 Grange JM. Mycobacterial disease in the world: yesterday, today and tomorrow. In: Ratledge C, Stanford JL, Grange JM (Hrsg.). *The Biology of Mycobacteria*, Bd. 3. Academic Press, London. 1989:3-36.
- 12 WHO (2004). Internet-Dokument. Abrufdatum: 23.1.2004 (URL: <http://www.who.int/lep/GlobalAlliance/gael.htm>).
- 13 Ellner JJ, Goldberger MJ, Parenti DM. *Mycobacterium avium* infection and AIDS: A therapeutic dilemma in rapid evolution. *J Infect Dis*. 1991;163:1326-1335.
- 14 Horsburgh CR Jr. The pathophysiology of disseminated *Mycobacterium avium* complex disease in AIDS. *J Infect Dis*. 1999;179 Suppl 3:461-465.
- 15 Horsburgh CR Jr. *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*. 1991;324:1332-1338.
- 16 Hawthorne VM, Lauder IM. Tuberculosis in man, dog, and cat. *Am Rev Respir Dis*. 1962;85:858-869. B.
- 17 Thorel MF, Huchzermeyer H, Weiss R, Fontaine JJ. *Mycobacterium avium* infections in animals. *Vet Res*. 1997;28:439-447.
- 18 Schulze-Röbbeke R. Mykobakterien in der Umwelt. *Immun Infekt*. 1993;21:126-131. B.
- 19 Rastogi N, Legrand E, Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech*. 2001;20:21-54.

- 20 DMSZ (2004). Internet-Dokument. Abrufdatum: 29.3.2004 (URL: www.dsmz.de/bact-nom/nam1932.htm).
- 21 Brennan PJ. *Mycobacterium* and other actinomycetes. In: Ratledge C, Wilkinson SG (Hrsg.). *Microbial Lipids*, Bd. 1. Academic Press, London. 1988:203-205.
- 22 Olsen I, Sigurgardottir G, Dijonne B. Paratuberculosis with special reference to cattle. A review. *Vet Q*. 2002;24:12-28.
- 23 Harris NB, Bortella RG. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14:489-512.
- 24 Hermon-Taylor J, Bull TJ, Sheridan JM, Cheng J, Stellakis MI, Sumar N. Causation of Crohn's disease by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Can J Gastroenterol*. 2000;14:521-539.
- 25 Hoffner SE. Pulmonary infections caused by less frequently encountered slow-growing environmental mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1994;13:937-941.
- 26 Runyon EH. Ten mycobacterial pathogens. *Tubercle*. 1974;55:235-240.
- 27 Wayne LG. Mycobacterial speciation. In: Kubica GP, Wayne LG (Hrsg.). *The Mycobacteria: a source-book*, Part A. Marcel Dekker, New York. 1984:25-65.
- 28 Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:716-746.
- 29 Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Böttger EC. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol*. 1996;34:296-303.
- 30 Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16:319-354.
- 31 Böttger EC. Einsatz der PCR für die Erkennung und Identifizierung von Mykobakterien. *Lab Med*. 1991;15:414-419.
- 32 Böttger EC. Systematik, Differenzierung und Nachweis von bakteriellen Infektionserregern - die Familie der *Mycobacteriaceae*. *Immun Infekt*. 1991;19:143-152. B.
- 33 Goodfellow M, Wayne LG. Taxonomy and nomenclature. In: Ratledge C, Stanford JL (Hrsg.). *The Biology of Mycobacteria*, Bd. 1. Academic Press, London. 1982:471-521.
- 34 Draper P. The anatomy of mycobacteria. In: Ratledge C, Stanford JL (Hrsg.). *The Biology of Mycobacteria*, Bd. 1. Academic Press, London. 1982:9-52.
- 35 Ratledge C. Nutrition, growth and metabolism. In: Ratledge C, Stanford JL (Hrsg.). *The Biology of Mycobacteria*, Bd. 1. Academic Press, London. 1982:185-271.
- 36 Middlebrook G, Dubos RJ, Pierce G. Virulence and morphological characteristics of mammalian tubercle bacilli. *J Exp Med*. 1947;86:175-183.
- 37 Bloch H. Studies on the virulence of tubercle bacilli. Isolation and biological properties of a constituent of virulent organisms. *J Exp Med*. 1950;91:197-218.
- 38 Otte HJ. *Leitfaden der Medizinischen Mikrobiologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 1967:31.
- 39 Otte HJ. *Leitfaden der Medizinischen Mikrobiologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 1967:161.
- 40 Daffé M, Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol*. 1998;39:131-203.

- 41 Weiszfeiler JG. Die Biologie und Variabilität des Tuberkelbakteriums und die Atypischen Mykobakterien. Verlag der Ungarischen Wissenschaften, Budapest. 1969:44-45.
- 42 Frehel C, De Chastellier C, Offredo C, Berche P. Intramacrophage growth of *Mycobacterium avium* during infection of mice. *Infect Immun*. 1991;59:2207-2214.
- 43 Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol*. 1990;144:2771-2780.
- 44 Abou-Zeid C, Ratliff TL, Wiker AG, Habre M, Bennedsen JR, Rook GAW. Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun*. 1988;56:3046-3051.
- 45 Schlesinger LS. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol*. 1993;150:2920-2930. B.
- 46 Rao SP, Ogata K, Cantanzaro A. *Mycobacterium avium-M. intracellulare* binds to the integrin receptor $\alpha_v\beta_3$ on human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect Immun*. 1993;61:663-670.
- 47 Peterson PK, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Anderson WR, Ulevitch RJ, Tobias PS, Gustafson KV, Molitor TW, Chao CC. CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized *Mycobacterium tuberculosis* by human microglia. *Infect Immun* 1995;63:1598-1602.
- 48 Bermudez LE, Young LS, Enkel H. Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human macrophages: roles of membrane receptors and serum proteins. *Infect Immun*. 1991;59:1697-1702.
- 49 Ernst JD. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1998;66:1277-1281.
- 50 Ehlers MR, Daffé M. Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cells: are sugars the key? *Trends Microbiol*. 1998;6:38-335.
- 51 El-Etr SH, Cirillo JD. Entry of mycobacteria. *Front Biosci*. 2001;6:d737-747.
- 52 Van Kooyk Y, Geijtenbeek TBH. DC-SIGN: escape mechanisms for pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:697-709.
- 53 Maeda N, Nigou J, Herrmann JL, Jackson M, Amara A, Lagrange PH, Puzo G, Gicquel B, Neyrolles O. The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between *Mycobacterium* species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *J Biol Chem*. 2003;5513-5516.
- 54 Finlay RB, Cossart P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science*. 1997;276:718-725.
- 55 Clemens DL. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Trends Microbiol*. 1996;4:113-118.
- 56 Clemens DL, Horwitz MA. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med*. 1995;181:257-270.
- 57 Meissner G. Virulence of chemo-resistant tubercle bacteria. I. A case of double resistance to streptomycin and isoniazid. *Beitr Klin Tuberk*. 1953;110:219-226.
- 58 Steenken W Jr, Wolinsky E. Virulence of tubercle bacilli recovered from patients treated with isoniazid. *Am Rev Tuberc*. 1953;68:548-556.
- 59 Rastogi N, David H. Mechanisms of pathogenicity in mycobacteria. *Biochimie*. 1988;70:1101-1120.

- 60 Clark HF, Shepard CC. Effect of environmental temperatures on infection with *Mycobacterium marinum* (*balnei*) of mice and a number of poikilothermic species. J Bacteriol. 1963;86:1057-1069.
- 61 Leven KH. Die Geschichte der Infektionskrankheiten - Von der Antike bis ins 20. Jahrhundert. Fortschritte in Präventiv- und Arbeitsmedizin, 6. ecomed, Landsberg/Lech. 1997:113-115.
- 62 Schatz A, Bugie E, Waksman SA. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. Proc. Soc. Exp. Biol. 1944;55:66-69.
- 63 Lehmann J. Para-aminosalicylic acid in the treatment of tuberculosis. Lancet. 1946;i:15-16.
- 64 Fox HH. The chemical approach to the control of tuberculosis. Science. 1952;115:129-134.
- 65 Yeager RL, Munroe WG, Dessau FI. Pyrazinamide (aldinamide) in the treatment of pulmonary tuberculosis. Am Rev Tuberc. 1952;65:523-546.
- 66 Thomas JP, Baughn CO, Wilkinson RG, Shepherd RG. A new synthetic compound with anti-tuberculous activity in mice: ethambutol (dextro-2,2'-(ethylenediimino)-di-1-butanol). Am Rev Respir Dis. 1961;83:891-893.
- 67 Hahn H, Kaufmann SHE, Rodloff AC. Mykobakterien. In: Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U. (Hrsg.). Medizinische Mikrobiologie. Springer Verlag, Berlin, 1999:377-391.
- 68 Shanmugasundaram TK. Tuberculosis of spine. Ind J Tub. 1982;29:213-221.
- 69 Daniel TM. Tuberkulose. In: Schmailzl KJG (Hrsg.). Harrisons Innere Medizin,1. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin. 1995:848-858.
- 70 Hartmann P, Becker R, Franzen C, Schell-Frederick E, Römer J, Jacobs M, Fätkenheuer G, Plum G. Phagocytosis and killing of *Mycobacterium avium* complex by human neutrophils. J Leukocyte Biol. 2001;69:397-404.
- 71 Kaufmann SHE. Immunität gegen intrazelluläre Bakterien. Die gelben Hefte. 1997;37:97-113.
- 72 Elsbach P, Weiss J. A reevaluation of the roles of the O₂-dependent and O₂-independent microbicidal systems of phagocytes. Rev Infect Dis. 1983;5:843-853.
- 73 MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol. 1997;15:323-350.
- 74 Benham A, Tulp A, Neefjes J. Synthesis and assembly of MHC-peptide complexes. Immunol Today. 1995;16:359-362.
- 75 Murray HW. Interferon-gamma and host antimicrobial defense: current and future clinical applications. Am J Med. 1994;97:459-467.
- 76 Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. Annu Rev Immunol. 1997;15:675-705.
- 77 Dinarello CA. Role of interleukin-1 in infectious diseases. Immunol Rev. 1992;127:119-146.
- 78 Taga T, Kishimoto T. Gp 130 and the interleukin-6 family of cytokines. Annu Rev Immunol. 1997;15:797-819.
- 79 Tracey KJ, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor and other cytokines in infectious disease. Curr Opin Immunol. 1989;1:454-461.
- 80 Flynn JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. Tuberculosis. 2004;84:93-101.

-
- 81 Kaufmann SHE. Immunologie der Tuberkulose. Pneumologie. 1995;49:643-648.
- 82 Toossi Z, Ellner JJ. The role of TGF beta in the pathogenesis of human tuberculosis. Clin Immunol Immunopathol. 1988;87:107-114.
- 83 Toossi Z, Ellner JJ. Mechanisms of anergy in tuberculosis. Curr Top Microbiol Immunol. 1996;215:221-238.
- 84 Flynn JL, Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation. Infect Immun: 2001;69:4195-4201.
- 85 Perez RL, Rivers-Marrero CA, Roman J. Pulmonary granulomatous inflammation: from sarcoidosis to tuberculosis. Semin Respir Infect. 2003;18:23-32.
- 86 Janeway CA, Travers P. Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 1994;281.
- 87 Weber I, Fritz C, Ruttkowski S, Kreft A, Bange FC. Anaerobic nitrate reductase (narGHJI) activity of *Mycobacterium bovis* BCG *in vitro* and its contribution to virulence in immunodeficient mice. Mol Microbiol. 2000;35:1017-1025.
- 88 Patel AM, Abrahams EW. Pulmonary tuberculosis. In: Ratledge C, Stanford JL, Grange JM (Hrsg.). The Biology of Mycobacteria, Bd. 3. Academic Press, London. 1989:179-244.
- 89 Kennedy DH. Extrapulmonary tuberculosis. In: Ratledge C, Stanford JL, Grange JM (Hrsg.). The Biology of Mycobacteria, Bd. 3. Academic Press, London. 1989:245-284.
- 90 Zangger E, Gehri M, Krähenbühl JD, Zellweger JP. Epidemiological and economical impact of tuberculosis in an adolescent girl in Lausanne (Switzerland). Swiss Med Wkly. 2001;131:418-421.
- 91 Raviglione MC, O'Brien RJ. Tuberculosis. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL. In: Harrison's Principles of Internal Medicine. McGraw-Hill, New York. 1998:1004-1014.
- 92 Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz). Bundesgesetzblatt 2000. Teil I, Nr.33.
- 93 Jenkins PA, Pattyn SR, Portaels F. Diagnostic bacteriology. In: Ratledge C, Stanford JL (Hrsg.). The Biology of Mycobacteria, Bd 1. Academic Press, London. 1982:441-470.
- 94 Landi S. Production and standardization of tuberculin. In: Kubica GP, Wayne LG (Hrsg.). The Mycobacteria: a sourcebook, Part A. Marcel Dekker, New York. 1984:505-535.
- 95 Janeway CA, Travers P. Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 1994;454.
- 96 Stanford JL. Immunologically important constituents of mycobacteria: antigens. In: Ratledge C, Stanford JL (Hrsg.). The Biology of Mycobacteria, Bd. 2. Academic Press, London. 1983:85-127.
- 97 Calmette A, Boquet A, Nègre L. Contribution à l'étude du bacille tuberculeux bilité. Ann Inst Pasteur. 1921;35:561-570.
- 98 Weill-Hallé B, Turpin R. Premiers essais de vaccination antituberculeuse de l'enfant par le bacille Calmette-Guérin (BCG). Bull Mem Soc Med Hop Paris. 1925;49:1589-1601.
- 99 Keja K, Chan C, Hayden G, Henderson RH. Expanded programme on immunization. World Health Stat Q. 1990;41:59-63.
- 100 Hashimoto T. BCG vaccines for the prevention of tuberculosis in the world. Kekkaku. 1997;72:629-637.
- 101 Kaufmann SHE. Novel Vaccination Strategies against tuberculosis. In: Kaufmann SHE (Hrsg.). Novel Vaccination Strategies. Wiley-VCH, Weinheim. 2004:463-477.

102 Young DB. Disease states and vaccines: selected cases - H. Tuberculosis. In: Bloom BR, Lambert PH (Hrsg.). The Vaccine Book. Academic Press, London. 2003:279-289.

103 Lamm DL, Steg A, Boccon-Gibod L, Morales A, Hanna MG Jr, Pagano F, Alftan O, Brosman S, Fisher HA, Jakse G, Chisholm GD, van der Meijden APM, Debruyne FMJ. Complications of bacillus Calmette-Guérin immunotherapy: review of 2602 patients and comparison of chemotherapy complications. *Prog Clin Biol Res.* 1989;310:335-355.

104 O'Brien KL, Ruff AJ, Louis MA, Desormeaux J, Joseph DJ, McBrien M, Coberly J, Boulous R, Halsey NA. Bacillus Calmette-Guérin complications in children born to HIV-1-infected women with a review of the literature. *Pediatrics.* 1995;95:414-418.

105 World Health Organization. BCG in immunization programmes. *Wkly Epidem Rec.* 2001;76:33-39.

106 Trnka L, Dankova D, Zitova J, Cimprichova L, Migliori GB, Clancy L, Zellweger JP. Survey of BCG vaccination policy in Europe: 1994-1996. *Bull World Health Organ.* 1998;76:85-91.

107 Citron KM. BCG-vaccination against tuberculosis: international perspectives. Vaccinate the newborn in developing countries and those at risk in developed countries. *Br Med J.* 1993;306:222-223.

108 McKinney JD, Jacobs JR, Bloom BR. Persisting problems in tuberculosis. In: Krause RM, Gallin JI, Fauci AS (Hrsg.). *Emerging Infections.* Academic Press, London. 1998:51-146.

109 Nseyo UO, Lamm DL. Immunotherapy of bladder cancer. *Semin Surg Oncol.* 1997;13:342-349.

110 Böhle A, Brandau S. Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guérin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol.* 2003;170:964-969.

111 Havlik JA, Horsburgh CR, Metchok B, Williams PP, Fann SA, Thomson SE. Disseminated *Mycobacterium avium* complex infection: clinical infection and epidemiologic trends. *J Infect Dis.* 1992;165:577-580.

112 De Beenhouwer H, Liang Z, De Rijk P, Van Eekeren C, Portaels F. Detection and identification of mycobacteria by DNA amplification and oligonucleotide-specific capture plate hybridization. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2994-2998.

113 Evans SA, Colville A, Evans AJ, Crisp AJ, Johnston ID. Pulmonary *Mycobacterium kansasii* infection: comparison of the clinical features, treatment and outcome with pulmonary tuberculosis. *Thorax.* 1996;51:1248-1252.

114 Knuf M, Habermehl P, Zepp F, Schmidtke P, Mannhardt-Laakmann W, Huppertz HI, Rüscher-Gerdes S, Erdnüb F, Schmitt HJ. Lymphadenitis Colli due to non-tuberculous mycobacteria (NTM): a case-series and review of the literature. *Klin Pädiatr.* 2003;215:9-15.

115 Wittram C, Weisbrod GL. *Mycobacterium avium* complex lung disease in immunocompetent patients: radiography-CT correlation. *Br J Radiol.* 2002;75:340-344.

116 Koh WJ, Kwon OJ, Lee KS. Nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases in immunocompetent patients. *Korean J Radiol.* 2002;3:145-157.

117 Junger H, Witzani R. „Swimming-pool-granuloma“- an infection of skin with *Mycobacterium marinum*. *Z Hautkr.* 1981;56:16-18.

118 Van der Werf TS, van der Graaf WT, Tappero JW, Asiedu K. *Mycobacterium ulcerans* infection. *Lancet.* 1999;354:1013-1018.

119 Covert TC, Rodgers MR, Reyes AI, Stelma GN Jr. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:2492-2496.

- 120 Chemlal K, Portaels F. Molecular diagnosis of nontuberculous mycobacteria. *Curr Opin Infect Dis.* 2003;16:77-83.
- 121 Schäfer WB. Incidence of the serotypes of *Mycobacterium avium* and atypical mycobacteria in human and animal diseases. *Am Rev Respir Dis.* 1968;97:18-23. B.
- 122 Horsburgh CR Jr. Epidemiology of *Mycobacterium avium* complex. In: Korvick JA, Benson CA (Hrsg.). *Mycobacterium avium-Complex Infection - Progress in Research and Treatment.* Marcel Dekker, New York. 1996:1-22.
- 123 Falkinham JO. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 1996;6:177-215.
- 124 Du Moulin GC, Stottmeier KD, Pelletier PA, Tsang AY, Hedley-Whyte J. Concentration of *Mycobacterium avium* by hospital hot water systems. *JAMA.* 1988;260:1599-1601.
- 125 Von Reyn CF, Wadell RD, Eaton T. Isolation of *Mycobacterium avium* complex from water in the United States, Finland, Zaire, and Kenya. *J Clin Microbiol.* 1993;31:3227-3230.
- 126 Meissner G, Anz W. Sources of *Mycobacterium avium* complex infection resulting in human diseases. *Am Rev Respir Dis.* 1977;116:1057-1064.
- 127 Reznikov M, Leggo JH. Examination of soil in the brisbane area for organisms of the *Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum* complex. *Pathology.* 1974;6:269-273.
- 128 Chapman JS, Bernard JS, Speight M. Isolation of mycobacteria from raw milk. *Am Rev Respir Dis.* 1965;91:351-355.
- 129 Edwards LB, Palmer CE. Isolation of "atypical" mycobacteria from healthy persons. *Am Rev Respir Dis.* 1959;80:747-749.
- 130 Mills CC. Occurrence of *Mycobacterium* other than *Mycobacterium tuberculosis* in the oral cavity and in sputum. *Appl Microbiol.* 1972;24:307-310.
- 131 Graham DY, Markesich DC, Yoshimura HH. Mycobacteria and inflammatory bowel disease. Results of culture. *Gastroenterology.* 1987;92:436-442.
- 132 Portaels F, Larsson L, Smeets P. Isolation of mycobacteria from healthy persons' stools. *Int J Lepr.* 1988;56:468-471.
- 133 Wolinsky E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am Rev Respir Dis.* 1979;119:107-159.
- 134 Schröder KH, Naumann L. Avian mycobacteria. *Immun Infect.* 1994;22:131-136.
- 135 Lucas SB. Mycobacteria and the tissues of man. In: Ratledge C, Stanford JL (Hrsg.). *The Biology of Mycobacteria*, Bd. 2. Academic Press, London. 1983:107-176.
- 136 O'Brien RJ, Geiter LJ, Snider DE. The epidemiology of nontuberculous mycobacterial diseases in the United States. Results from a national survey. *Am Rev Respir Dis.* 1987;135:1007-1014.
- 137 Schaad UB, Votteler TP, McCracken GH, Nelson JD. Management of atypical mycobacterial lymphadenitis in childhood: a review based on 380 cases. *J Pediatr.* 1979;95:356-360.
- 138 Tsukamura M, Kita N, Shimoide H, Arakawa H, Kuze A. Studies on the epidemiology of nontuberculous mycobacteriosis in Japan. *Am Rev Respir Dis.* 1988;137:1280-1284.
- 139 Good RC, Snider DE. Isolation of nontuberculous mycobacteria in the United States. *J Infect Dis.* 1982;146:829-833.

- 140 Debrunner M, Salfinger M, Brandli O, von Graevenitz A. Epidemiology and clinical significance of nontuberculous mycobacteria in patients negative for human immunodeficiency virus in Switzerland. *Clin Infect Dis*. 1992;15:330-345.
- 141 Contreras MA, Cheung OT, Sanders DE, Goldstein RS. Pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Am Rev Respir Dis*. 1988;137:149-152.
- 142 Guthertz LS, Damsker B, Bottone EJ, Janda JM. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infections in patients with and without AIDS. *J Infect Dis*. 1989;160:1037-1041.
- 143 Yakrus MA, Good RC. Geographic distribution, frequency, and specimen source of *M. avium* complex serotypes isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol*. 1990;28:926-929.
- 144 Nightingale SD, Byrd LT, Southern PM, Jockusch JD, Cal SX, Wynne BA. Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *J Infect Dis*. 1992;165:1082-1085.
- 145 Fang FC, Freedman SD. *Mycobacterium-avium-* und andere nichttuberkulöse Infektionen durch Mykobakterien. In: Schmailzl KJG (Hrsg.). *Harrisons Innere Medizin*, 1. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin. 1995:864.
- 146 Havlik JA Jr, Horsburgh CR Jr, Metchock B, Williams PP, Fann SA, Thompson SE 3rd. Disseminated *Mycobacterium avium* complex infection: clinical identification and epidemiologic trends. *J Infect Dis*. 1992;165:577-580.
- 147 Janeway CA, Travers P. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 1994:426.
- 148 Ghassemi M, Asadi FK, Andersen BR, Novak RM. *Mycobacterium avium* induces HIV upregulation through mechanisms independent of cytokine induction. *Aids Research and Human Retroviruses*. 2000;16:435-440.
- 149 Burman WJ, Cohn DL. Clinical disease in human immunodeficiency virus-infected persons. In: Korvick JA, Benson CA (Hrsg.). *Mycobacterium avium-Complex Infection - Progress in Research and Treatment*. Marcel Dekker, New York. 1996:79-108.
- 150 Fang FC, Freedman SD. *Mycobacterium-avium* und andere nichttuberkulöse Infektionen durch Mykobakterien. In: Schmailzl KJG (Hrsg.). *Harrisons Innere Medizin*, 1. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin. 1995:865.
- 151 Mutschler E. In: Mutschler E (Hrsg.). *Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart. 1997:699-705.
- 152 Benson CA, Williams PL, Currier JS, Holland F, Mahon LF, MacGregor RR, Inderlied CB, Flexner C, Neidig J, Chaisson R, Notario GF, Hafner R. A prospective, randomized trial examining the efficacy and safety of clarithromycin in combination with ethambutol, rifabutin, or both for the treatment of disseminated *Mycobacterium avium* complex disease in persons with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis*. 2003;37:1234-1243.
- 153 Hirschel B. Infections due to nontuberculous mycobacteria. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill, New York. 1998:1020-1021.
- 154 Rastogi N, Frehel C, Ryter A, Ohayon H, Lesourd M, David HL. Multiple drug resistance in *Mycobacterium avium*: Is the cell wall architecture responsible for the exclusion of antimicrobial agents? *Antimicrob Agents Chemother*. 1981;20:666-677.
- 155 Denner JC, Tsang AJ, Chatterjee D, Brennan PJ. Comprehensive approach to identification of serovars of *Mycobacterium avium* complex. *J Clin Microbiol*. 1992;30:473-478.

-
- 156 Rivoire B, Ranchoff BJ, Chatterjee D, Gaylord H, Tsang AY, Kolk AH, Aspinall GO, Brennan PJ. Generation of monoclonal antibodies to the specific epitopes of *Mycobacterium avium* complex serovars. *Infect Immun*. 1989;57:3147-3158.
- 157 Inglis N, McFadden J. Strain typing of the *Mycobacterium avium* complex. *J Infect*. 1999;38:151-156.
- 158 Saito H, Tomioka H, Sato K, Tasaka H, Dawson DJ. Identification of various serovar strains of *Mycobacterium avium* complex by using DNA probes specific for *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *J Clin Microbiol*. 1990;28:1694-1697.
- 159 Belisle JT, Brennan PJ. Molecular basis of colony morphology in *Mycobacterium avium*. *Res Microbiol*. 1994;145:237-242.
- 160 Inderlied CB, Nash KA. Microbiology and *in vitro* susceptibility testing. In: Korvick JA, Benson CA (Hrsg.). *Mycobacterium avium*-Complex Infection - Progress in Research and Treatment. Marcel Dekker, New York. 1996:114.
- 161 Saito H, Tomioka H. Susceptibilities of transparent, opaque, and rough colonial variants of *Mycobacterium avium* complex to various fatty acids. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988;32:400-402.
- 162 Schaefer WB, Davis CL, Cohn ML. Pathogenicity of transparent, opaque and rough variants of *Mycobacterium avium* in chickens and mice. *Amer Rev Respir Dis*. 1970;102:499-506.
- 163 Kuze F, Uchihira F. Various colony-formers of *Mycobacterium avium-intracellulare*. *Eur J Respir Dis*. 1984;65:402-410.
- 164 Thorel MF, David HL. Specific surface antigens of SmT variants of *Mycobacterium avium*. *Infect Immun* 1984;43:438-439.
- 165 David HL. Response of mycobacteria to ultraviolet light radiation. *Am Rev Respir Dis*. 1973;108:1175-1185.
- 166 Woodley CL, David HL. Effect on temperature on the rate of the transparent to opaque colony type transition in *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1976;9:113-119.
- 167 McCarthy C, Ashbaugh P. Factors that effect the cell cycle of *Mycobacterium avium*. *Rev Infect Dis*. 1981;3:914-925.
- 168 McCarthy C. Synthesis and release of sulfolipid by *Mycobacterium avium* during growth and cell division. *Infect Immun*. 1976;14:1241-1252.
- 169 Kazda JF. Principles of the ecology of mycobacteria. In: Ratledge C, Stanford JL (Hrsg.). *The Biology of Mycobacteria*, Bd. 2. Academic Press, London. 1983:323-341.
- 170 Bodmer T, Miltner E, Bermudez LE. *Mycobacterium avium* resists exposure to the acidic conditions of the stomach. *FEMS Microbiol Letters*. 2000;182:45-49.
- 171 Chatterjee D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action: *Curr Opin Chem Biol*. 1997;1:579-588.
- 172 Seltmann G, Holst O. *The Bacterial Cell Wall*. Springer Verlag, Berlin. 2002:9-102.
- 173 Fu LM, Fu-Liu CS. Is *Mycobacterium tuberculosis* a closer relative to gram-positive or gram-negative bacterial pathogens? *Tuberculosis (Edin)*. 2002;82:85-90.
- 174 Draper P. The outer parts of the mycobacterial cell envelope as permeability barriers. *Front Biosci*. 1998;3:D1253-1261.

175 Minnikin DE. Lipids: Complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. In: Ratledge C, Stanford JL (Hrsg.). *The Biology of Mycobacteria*, Bd. 1. Academic Press, London. 1982:95-184.

176 Okuyama H, Kankura T, Nojima S. Positional distribution of fatty acids in phospholipids from mycobacteria. *J Biochem (Tokyo)*. 1967;61:732-737.

177 Leopold K, Fischer W. Molecular analysis of the lipoglycans of *Mycobacterium tuberculosis*. *Anal Biochem*. 1993;208:57-64.

178 Brooks BR, Daneshvar MI, Fast DM, Good RC. Selective procedures for detecting femtomole quantities of tuberculostearic acid in serum and cerebrospinal fluid by frequency-pulsed electron capture gas-liquid chromatography. *J Clin Microbiol*. 1987;25:1201-1206.

179 Brennan PJ, Draper P. Ultrastructure of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Bloom BR (Hrsg.). *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. American Society for Microbiology, Washington DC. 1994:271.

180 Lowary TL. Mycobacterial Cell Wall Components. In: Fraser-Reid B, Tatsuta K, Thiem J (Hrsg.). *Glycosciences - Chemistry and Chemical Biology*. Springer Verlag, Berlin. 2001:2007-2080.

181 Kölbel HK. Electron microscopy. In: Kubica GP, Wayne LG (Hrsg.). *The Mycobacteria: a sourcebook*, Part A. Marcel Dekker, New York. 1984:249-300.

182 Ghuysen JM. Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriol Rev*. 1968;32:425-464.

183 Dmitriev BA, Ehlers S, Rietschel ET. Layered murein revisited: a fundamentally new concept of bacterial cell wall structure, biogenesis and function. *Med Microbiol Immun (Berl)*. 1999;187:173-181.

184 Dmitriev BA, Ehlers S, Rietschel ET, Brennan PJ. Molecular mechanics of the mycobacterial cell wall: from horizontal layers to vertical scaffolds. *Int J Med*. 2000;290:251-258.

185 Dmitriev BA, Toukach FV, Schaper KJ, Holst O, Rietschel ET, Ehlers S. Tertiary structure of bacterial murein: the scaffold model. *J Bacteriol*. 2003;185:3458-3468.

186 Vollmer W, Höltje JV. The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer(s)? *J Bacteriol*. 2004;186:5978-5987.

187 Petit JF, Lederer E. The structure of the mycobacterial cell wall. In: Kubica GP, Wayne LG (Hrsg.). *The Mycobacteria: a sourcebook*, Part A. Marcel Dekker, New York. 1984:301.

188 Voiland A, Michel G. Structural studies of the cell wall polysaccharide of *Nocardia asteroides* R 399. *Can J Microbiol*. 1985;31:1011-1018.

189 McNeil M, Daffé M, Brennan PJ. Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and the peptidoglycan of mycobacterial cell walls. *J Biol Chem*. 1990;265:18200-18206.

190 Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:29-63. B.

191 McNeil MR, Daffé M, Brennan PJ. Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria. *J Biol Chem*. 1991;266:13217-13233.

192 Wong MY, Steck PA, Gray GR. The major mycolic acids of *Mycobacterium smegmatis*. Characterization of their homologous series. *J Biol Chem*. 1979;254:5734-5740.

193 Minnikin DE, Goodfellow M. Lipid Composition in the classification and identification of acid-fast bacteria. In: Goodfellow M, Board RF (Hrsg.). *Microbiological classification and identification*. Academic Press, London. 1980:189.

- 194 Draper P, Khoo KH, Chatterjee D, Dell A, Morris HR. Galactosamine in walls of slow-growing mycobacteria. *Biochem J.* 1997;327:519-525.
- 195 Belanger AE, Besra GS, Ford ME, Mikusova K, Belisle JT, Brennan PJ, Inamine JM. The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93:11919-11924.
- 196 Takayama K, Armstrong EL, Kunugi KA, Kilburn JO. Inhibition by Ethambutol of mycolic acids transfer into the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979;16:240-242.
- 197 Takayama K, Kilburn JO. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by Ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33:1493-1499.
- 198 Deng L, Mikusova K, Robuck KG, Scherman M, Brennan PJ, McNeil MR. Recognition of multiple effects of Ethambutol on metabolism of mycobacterial cell envelope. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:694-701.
- 199 Silve G, Valero-Guillen P, Quemard A, Dupont MA, Daffé M, Lanele G. Ethambutol inhibition of glucose metabolism in mycobacteria: a possible target of the drug. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37:1536-1538.
- 200 Chatterjee D, Bozic CM, McNeil M, Brennan PJ. Structural features of the arabinan component of the lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* 1991;266:9652-9660.
- 201 Chatterjee D, Khoo KH. Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. *Glycobiology.* 1998;8:113-120.
- 202 Hunter SW, Gaylord H, Brennan PJ. Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharides from the leprosy and the tubercle bacilli. *J Biol Chem.* 1986;261:12345-12351.
- 203 Chatterjee D, Lowell K, Rivoire B, McNeil M, Brennan PJ. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis* capping with mannosyl residues in some strains. *J Biol Chem.* 1992;267:6234-6239.
- 204 Chatterjee D, Khoo KH, McNeil MR, Dell A, Morris HR, Brennan PJ. Structural definition of the non-reducing termini of mannose-capped LAM from *Mycobacterium tuberculosis* through selective enzymatic degradation and fast atom bombardment-mass spectrometry. *Glycobiology.* 1993;3:497-506.
- 205 Khoo KH, Dell A, Morris HR, Brennan PJ, Chatterjee D. Inositol phosphate capping of the non-reducing termini of lipoarabinomannan from rapidly growing strains of *Mycobacterium*. *J Biol Chem.* 1995;270:12380-12389.
- 206 Gilleron M, Himoudi N, Adam O, Constant P, Venisse A, Rivière M, Puzo G. *Mycobacterium smegmatis* phosphoinositol-glyceroarabinomannans: structure and localization of alkali-labile and alkali-stable phosphoinositides. *J Biol Chem.* 1997;272:117-124.
- 207 Rastogi N. Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope: elaboration of a model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug-resistance. *Res Microbiol.* 1991;142:464-476.
- 208 Gilleron M, Bala L, Brando T, Vercellone A, Puzo G. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv parietal and cellular lipoarabinomannans. *J Biol Chem.* 2000;275:677-684.
- 209 Brennan PJ. Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev Infect Dis.* 1989;11 Suppl 2:420-430.
- 210 Aspinall GO, Chatterjee D, Brennan PJ. The variable glycolipids of mycobacteria: structures, synthesis of epitopes, and biological properties. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 1995;51:169-242.

- 211 Reed MB, Domenech P, Manca C, Su H, Barczak AK, Kreiswirth BN, Kaplan G, Barry CE. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature*. 2004;431:84-87.
- 212 Camphausen RT, McNeil M, Jardine I, Brennan PJ. Location of acyl groups of trehalose-containing lipooligosaccharides of mycobacteria. *J Bacteriol*. 1987;169:5473-5480.
- 213 Sarda P, Gastambide-Odier M. Structure chimique de l'aglycone du mycoside G de *Mycobacterium marinum*. *Chem Phys Lipids*. 1967;1:434-444.
- 214 Lederer E. Chemistry of mycobacterial cord factor and related natural synthetic trehalose esters. In: Kubica GP, Wayne LG (Hrsg.). *The Mycobacteria: a sourcebook, Part A*. Marcel Dekker, New York. 1994:361.
- 215 Goren MB, Brokl O, Das BC. Sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*: the structure of the principal sulfatide (SL-I). *Biochemistry*. 1976;15:2728-2735.
- 216 Besra GS, Bolton RC, McNeil MR, Ridell M, Simpson KE, Glushka J, van Hahlbeek H, Brennan PJ, Minnikin DE. Structural elucidation of a novel family of acyltrehaloses from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*. 1992;31:9832-9837.
- 217 Goren MB, Brennan PJ. Mycobacterial lipids: chemistry and biological activities. In: Youmans GP (Hrsg.). *Tuberculosis*. Saunders, Philadelphia. 1979:63.
- 218 Goren MB, Brennan PJ. Mycobacterial lipids: chemistry and biological activities. In: Youmans GP (Hrsg.). *Tuberculosis*. Saunders, Philadelphia. 1979:63-193.
- 219 Rastogi N, Ley-Frebault V, Blom-Potar MC, David HL. Ability of smooth and rough variants of *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* to multiply and survive intracellularly: roles of C-Mycosides. *Zbl Bakt Hyg*. 1989;270:345-360.
- 220 Seltmann G, Holst O. *The Bacterial Cell Wall*. Springer Verlag, Berlin. 2002:171-173.
- 221 Burkhardt F. *Mikrobiologische Diagnostik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 1992:571.
- 222 Jann K, Jann B. Capsular polysaccharides. In: Sussman M (Hrsg.). *Molecular Medical Microbiology*, Bd. 1. Academic Press, London. 2001:47-78.
- 223 Ortalo-Magné A, Andersen AB, Daffé M. The outermost capsular arabinomannans and other mannoconjugates of virulent and avirulent tubercle bacilli. *Microbiology*. 1996;142:927-935.
- 224 Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharids. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbohydr Chem*. 1965;5:83-91.
- 225 Whittaker DV, Parolis LAS, Parolis H. Structural elucidation of the capsular polysaccharide expressed by *Escherichia coli* O20:K83:H26 by high resolution NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res*. 1994;253:247-256.
- 226 Chapman GB, Hanks JH, Wallace JH. An electron microscope study of the disposition and fine structure of *Mycobacterium lepraemurium* in mouse spleen. *J Bacteriol*. 1959;77:205-211.
- 227 Lemassu A, Ortalo-Magné A, Bardou F, Silve G, Laneelle MA, Daffé M. Extracellular and surface-exposed polysaccharides of non-tuberculous mycobacteria. *Microbiology*. 1996;142:1513-1520.
- 228 Hanks JH. Significance of capsular components of *Mycobacterium leprae* and other mycobacteria. *Int J Lepr*. 1961;29:74-83.
- 229 Draper P, Rees RJ. Electron-transparent zone of mycobacteria may be a defence mechanism. *Nature*. 1970;228:860-861.

- 230 Ortalo-Magné A, Dupont MA, Lemassu A, Andersen AB, Gounon P, Daffé M. Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology*. 1995;141:1609-1620.
- 231 Rastogi N, Frehel C, David HL. Triple-layered structure of mycobacterial cell wall: evidence for the existence of a polysaccharide-rich outer layer in 18 mycobacterial species. *Curr Microbiol*. 1986;13:237-242.
- 232 Seltmann G, Holst O. *The Bacterial Cell Wall*. Springer Verlag, Berlin. 2002:171.
- 233 Yeremeev VV, Lyadova IV, Nikonenko BV, Apt AS, Abou-Zeid C, Inwald J, Young DB. The 19-kD antigen and protective immunity in a murine model of tuberculosis. *Clin Exp Immunol*. 2000;120:274-279.
- 234 Chang Z, Choudhary A, Lathigra R, Quiocho FA. The immunodominant 38-kDa lipoprotein antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a phosphate-binding protein. *J Biol Chem*. 1994;269:1956-1958.
- 235 Young DB, Garbe TR. Lipoprotein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol*. 1991;142:55-65.
- 236 Da Fonseca DPAJ, Joosten D, Van der Zee R, Jue DL, Singh M, Vordermeier HM, Snippe H, Verheul AFM. Identification of new cytotoxic T-cell epitopes on the 38-kilodalton lipoglycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* by using lipopeptides. *Infect Immun*. 1998;66:3190-3197.
- 237 Armoa GRG, Rouse DA, Nair J, Mackall C, Morris SL. A highly immunogenic putative *Mycobacterium kansasii* lipoprotein. *Microbiology*. 1995;141:2705-2712.
- 238 Nair J, Rouse DA, Morris SL. Nucleotide sequence analysis and serologic characterization of a 27-kilodalton *Mycobacterium intracellulare* lipoprotein. *Infect Immun*. 1993;61:1074-1081.
- 239 Mayer BK, Falkinham JO. Superoxide dismutase activity of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, and *M. scrofulaceum*. *Infect Immun*. 1986;53:631-635.
- 240 Benz I, Schmidt A. Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria. *Mol Microbiol*. 2002;45:267-276.
- 241 Dobos KM, Swiderek K, Khoo KH, Brennan PJ, Belisle JT. Evidence for glycosylation sites on the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1995;63:2846-2853.
- 242 Dobos KM, Khoo KH, Swiderek KM, Brennan PJ, Belisle JT. Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*. 1996;178:2498-2506.
- 243 Michell SL, Whelan AO, Wheeler PR, Panico M, Easton RL, Etienne AT, Haslam SM, Dell A, Morris HR, Reason AJ, Herrmann JL, Young DB, Hewinson RG. The MPB83 antigen from *Mycobacterium bovis* containing O-linked mannose and (1→3) mannobiose residues. *J Biol Chem*. 2003;278:16423-16432.
- 244 Daniel TM. Soluble mycobacterial antigens. In: Kubica GP, Wayne LG (Hrsg.). *The Mycobacteria: a sourcebook*, Part A. Marcel Dekker, New York. 1984:417-465.
- 245 Seibert FB. The isolation of three different proteins and two polysaccharides from tuberculin by alcohol fractionation. Their chemical and biological properties. *Am Rev Tuberc*. 1949;59:86-101.
- 246 Seibert FB, Pedersen KO, Tiselius A. Molecular weight, electrochemical and biological properties of tuberculin protein and polysaccharide molecules. *Am Rev Tuberc*. 1938;38:399-405.
- 247 Seibert FB, Watson DW. Isolation of the polysaccharides and nucleic acid of tuberculin by electrophoresis. *J Biol Chem*. 1941;140:55-69.

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

249 Zlotta AR, Van Vooren JP, Denis O, Drowart A, Daffé M, Lefevre P, Schandene L, De Cock M, De Bruyn J, Vandebussche P, Jurion F, Palfliet K, Simon J, Schulman CC, Content J, Huygen K. What are the immunologically active components of bacille Calmette-Guérin in therapy of the superficial bladder cancer? *Int J Cancer*. 2000;87:844-852.

250 Huang TC. Management of complications of bacillus Calmette-Guérin immunotherapy in the treatment of bladder cancer. *Ann Pharmacother* 2000;34:529-532.

251 Lamm DL, Stogdill VD, Stogdill BJ, Crispin RG. Complications of bacillus Calmette-Guérin immunotherapy in 1278 patients with bladder cancer. *J Urol*. 1986;135:272-274.

252 Sängler C, Busche A, Bentin G, Spallek R, Jonas F, Böhle A, Singh M, Brandau S. Immunodominant PstS1 antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a potent biological response modifier for the treatment of bladder cancer. *BMC Cancer*. 2004;4:86.

253 Dinadayala P, Lemassu A, Granovski P, Cératola S, Winter N, Daffé M. Revisiting the structure of the anti-neoplastic glucans of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin. *J Biol Chem*. 279;12369-12378.

254 Teitelbaum R, Glatman-Freedman B, Chen B, Robbins J, Unanue E, Casadevall A, Bloom BR. A monoclonal antibody recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:15688-15693.

255 Glatman-Freedman B, Mednick AJ, Lendvai N, Casadevall A. Monoclonal antibodies to surface antigens of *Mycobacterium tuberculosis* and their use in a modified enzyme-linked immunosorbent spot assay for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 1996;34:2795-2802.

256 Schwebach JR, Casadevall A, Schneerson R, Dai Z, Wang X, Robbins JB, Glatman-Freedman A. Expression of a *Mycobacterium tuberculosis* arabinomannan antigen *in vitro* and *in vivo*. *Infect Immun*. 2001;69:5671-5678.

257 Weber PL, Gray GR. Structural and immunochemical characterization of the acidic arabinomannan of *Mycobacterium smegmatis*. *Carbohydr. Res*. 1979;74:259-278.

258 Lemassu A, Daffé M. Structural features of the exopolysaccharides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J*. 1994;297:351-357.

259 Daffé M, Brennan PJ, McNeil M. Predominant structural features of the cell wall arabinogalactan of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosyl alditol fragments by gas chromatography/mass spectrometry and by ¹H-NMR and ¹³C-NMR analyses. *J Biol Chem*. 1990;265:6734-6743.

260 Daffé M, Brennan PJ, McNeil M. Major structural features of the cell wall arabinogalactans of *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, and *Nocardia* spp. *Carbohydr Res*. 1993;249:383-398.

261 Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Curcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaiia F, Badcock K, Besham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Kroghs A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osbourne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers JR, Sutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complex genome sequence. *Nature*. 1998;393:537-544.

262 Rosenkrands I, King A, Weldingh K, Moniatte M, Moertz E, Andersen P. Towards the proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Electrophoresis*. 2000;21:3740-3756.

- 263 Crick DC, Mahapatra S, Brennan PJ. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology*. 2001;11:107R-118R.
- 264 Brennan PJ, Besra GS. Structure, function and biogenesis of the mycobacterial cell wall. *Biochem Soc Trans*. 1997;25:188-194.
- 265 Baddiley J. Teichoic acids in cell walls and membranes of bacteria. *Essays Biochem*. 1972;8:35-77.
- 266 Crick DC, Schulbach MC, Zink EE, Macchia M, Barontini S, Besra GS, Brennan PJ. Polyprenyl phosphate biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*. 2000;182:5771-5778.
- 267 Mikusova K, Mikus M, Besra GS, Hancock I, Brennan PJ. Biosynthesis of the linker region of the mycobacterial cell wall. *J Biol Chem*. 1996;271:7820-7828.
- 268 Ma Y, Stern RJ, Scherman MS, Vissa VD, Yan W, Jones VC, Zhang F, Franzblau SG, Lewis WH, McNeil MR. Drug Targeting *Mycobacterium tuberculosis* cell wall synthesis: genetics of dTDP-rhamnose synthetic enzymes and development of a microtiter plate-based screen for inhibitors of conversion of dTDP-glucose to dTDP-rhamnose. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1407-1416.
- 269 Mikusova K, Yagi T, Stern R, McNeil MR, Besra GS, Crick DC, Brennan PJ. Biosynthesis of the Galactan component of the mycobacterial cell wall. *J Biol Chem*. 2000;275:33890-33897.
- 270 Fenton MJ, Vermeulen MW. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun*. 1996;64:683-690.
- 271 Schlesinger LS. Entry of *Mycobacterium tuberculosis* into mononuclear phagocytes. *Curr Topics Microbiol*. 1996;215:71-96.
- 272 Connell ND, Nikaido H. Membrane permeability and transport in *Mycobacterium tuberculosis*. In: Bloom BR (Hrsg.). *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*. American Society for Microbiology, Washington DC. 1994:333.
- 273 Peloquin CA. *Mycobacterium avium* complex infection. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations that may improve clinical outcomes. *Clin Pharmacokinet*. 1997;32:132-144.
- 274 Winder FG. Mode of action of the antimycobacterial agents and associated aspects of the molecular biology of the mycobacteria. In: Ratledge C, Stanford JL (Hrsg.). *The Biology of Mycobacteria*, Bd. 1. Academic Press, London. 1982:354-438.
- 275 Liu J, Barry CE 3rd, Besra GS, Nikaido H. Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J Biol Chem*. 1996;271:29545-29551.
- 276 Segal W. Growth dynamics of *in vivo* and *in vitro* grown mycobacterial pathogens. In: Kubica GP, Wayne LG (Hrsg.). *The Mycobacteria: a sourcebook*, part A. Marcel Dekker, New York. 1984:547.
- 277 Trias J, Jarlier V, Benz R. Porins in the cell wall of mycobacteria. *Science*. 1992;258:1479-1481.
- 278 Jarlier V, Nikaido H. Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *J Bacteriol*. 1990;172:1418-1423.
- 279 Liu J, Barry CE 3rd, Besra GS, Nikaido H. Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J Biol Chem*. 1996;271:29545-29551.
- 280 Wehrli W, Staehelin M. Actions of the rifamycins. *Bacteriol Rev*. 1971;35:290-309.
- 281 Rastogi N, Goh KS, Labrousse V. Activity of clarithromycin compared with those of other drugs against *Mycobacterium paratuberculosis* and further enhancement of its extracellular and intracellular activities by ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36:2843-2846.

- 282 Rastogi N, Goh KS, David HL. Enhancement of drug susceptibility of *Mycobacterium avium* by inhibitors of cell envelope synthesis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34:759-764.
- 283 Quemard A, Sacchattini JC, Dessen A, Vilcheze C, Bittmann R, Jacobs WR Jr, Blanchard JS. Enzymatic characterization of the target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry.* 1995;34:8235-8241.
- 284 Sibley LD, Hunter SW, Brennan PJ, Krahenbuhl JL. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma-interferon-mediated activation of macrophages. *Infect Immun.* 1988;56:1232-1236.
- 285 Roach TI, Barton CH, Chatterjee D, Blackwell JM. Macrophage activation: lipoarabinomannan from avirulent and virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially induces the early genes C-fs, KC, JE and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol.* 1993;150:1886-1896.
- 286 Yoshida A, Koide Y. Arabinofuranosyl-terminated and mannosylated lipoarabinomannans from *Mycobacterium tuberculosis* induce different levels of interleukin-12 expression in murine macrophages. *Infect Immun.* 1997;65:1953-1955.
- 287 Zhang Y, Broser M, Cohen H, Bodkin M, Law K, Reibmann J, Rom WN. Enhanced interleukin-8 release and gene expression in macrophages after exposure to *Mycobacterium tuberculosis* and its components. *J Clin Invest.* 1995;95:586-592.
- 288 Chan J, Fan X, Hunter SW, Brennan PJ, Bloom BR. Lipoarabinomannan as a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect Immun.* 1991;59:1755-1761.
- 289 Knutson KL, Hmama Z, Herrera-Velitz P, Rochford R, Reiner NE. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis* promotes protein tyrosine dephosphorylation and inhibition of mitogen-activated protein kinase in human mononuclear phagocytes. *J Biol Chem.* 1998;273:645-652.
- 290 Chang JC, Wysocki A, Tchou-Wong KM, Moskowitz N, Zhang Y, Rom WN. Effect of *Mycobacterium tuberculosis* and its components on macrophages and the release of matrix metalloproteinases. *Thorax.* 1996;51:306-311.
- 291 Barnes PF, Chatterjee D, Abrams JS, Lu S, Wang E, Yamamura M, Brennan PJ, Modlin RL. Cytokine production induced by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan: relationship to chemical structure. *J Immunol.* 1992;149:541-547.
- 292 Kang BK, Schlesinger LS. Characterization of mannose receptor-dependent phagocytosis mediated by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. *Infect Immun.* 1998;66:2769-2777.
- 293 Venisse A, Berjeaud JM, Chaurand P, Gilleron M, Puzo G. Structural features of lipoarabinomannan from *Mycobacterium bovis* BCG. *J Biol Chem.* 1993;268:12401-12411.
- 294 Astarie-Dequeker C, N'Diaye EN, Le CV, Rittig MG, Prandi J, Maridonneau-Parini I. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infect Immun.* 1999;76:469-477.
- 295 Hof H, Müller RL, Dörries R. *Mikrobiologie.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2000:249-250.
- 296 Stokes RW, Norris-Jones R, Brooks DE, Beveridge TJ, Doxsee D, Thorson LM. The glycan-rich outer layer of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages. *Infect Immun.* 2004;72:5676-5686.
- 297 Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science.* 1994;263:678-681.
- 298 De Chastellier C, Thilo L. Modulation of phagosome processing as a key strategy for *Mycobacterium avium* survival within macrophages. *Res Immunol.* 1998;149:699-702.

- 299 Daffé M, Etienne G. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tuber Lung Dis.* 1999;79:153-169.
- 300 Frehel C, Ryter A, Rastogi N, David H. The electron-transparent zone in phagocytized *Mycobacterium avium* and other mycobacteria: formation, persistence and role in bacterial survival. *Ann Inst Pasteur/Microbiol.* 1986;137:239-257.
- 301 Hayashi Y, Ebina T, Suzuki F, Ishida N. Interferon-inducing activity of an immunotherapeutic anti-cancer agent. *Microbiol Immunol.* 1981;25:305-316.
- 302 Navoa JAD, Laal S, Pirofski LA, McLean GR, Dai Z, Robbins JB, Schnerson R, Casadevall A, Glatman-Freedman A. Specificity and diversity of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* arabinomannan. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10:88-94.
- 303 Hamasur B, Haile M, Pawlowski A, Schröder U, Williams A, Hatch G, Hall G, Marsh P, Källenius G, Svenson SB. *Mycobacterium tuberculosis* arabinomannan-protein conjugates protect against tuberculosis. *Vaccine.* 2003;21:4081-4093.
- 304 Kobayashi M, Pollard RB, Suzuki F. Inhibition of pulmonary metastasis by Z-100, an immunomodulatory lipid-arabinomannan extracted from *Mycobacterium tuberculosis*, in mice inoculated with B16 melanoma. *Anticancer Drugs.* 1997;8:156-163.
- 305 Oka H, Emori Y, Sasaki H, Shiraishi Y, Yoshinaga K, Kurimoto T. Anti-tumor mechanism of Z-100, an immunomodulatory arabinomannan extracted from *Mycobacterium tuberculosis* strain Aoyama B, on pulmonary metastases of B16F10 melanoma. *Microbiol Immunol.* 2002;46:343-351.
- 306 Hayashi Y, Sasaki H, Emori Y, Nomoto K. The effect of combination therapy of radiation and Z-100, an arabinomannan on tumor growth in mice. *Biotherapy.* 1990;7:63-69.
- 307 Kawamura I, Mitsuyama M, Numoto K. Enhanced protection of cyclophosphamide-treated mice against infection with *Pseudomonas aeruginosa* after treatment with Z-100. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1990;12:331-343.
- 308 Kobayashi M, Herndon DN, Pollard RB, Suzuki F. Z-100, a lipid-arabinomannan extracted from *Mycobacterium tuberculosis*, improves the resistance of thermally injured mice to herpes virus infections. *Immunol Lett.* 1994;40:199-205.
- 309 Hayashi Y, Yamaguchi I, Kobayashi M, Shimizu T, Matsuda K, Yoshida M, Kumakura M, Hirashima K. Effects of Z-100 on mice exposed to gamma-irradiation: a preliminary report. *J Radiat Res.* 1990;31:375-388.
- 310 Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: A laboratory manual*, Bd. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.
- 311 Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current protocols in molecular biology*, Bd. 3. John Wiley & Sons, New York. 1996.
- 312 DeBoer TD, Backer HJ. Diazomethane. *Org Synth.* 1956;36:14-16.
- 313 Belisle JT, McNeil MR, Chatterjee D, Inamine JM, Brennan PJ. Expression of the core lipopeptide of the glycopeptidolipid surface antigens in rough mutants of *Mycobacterium avium*. *J Biol Chem.* 1993;268:10510-10516.
- 314 Middlebrook G, Cohn ML, Dye WE, Russell WF, Levy D. Microbiologic procedures of value in tuberculosis. *Acta Tuberc Scand.* 1960;38:66-81.
- 315 Bordier C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem.* 1981;256:1604-1607.
- 316 Englard S, Seifter S. Precipitation techniques. *Methods Enzymol.* 1990;182:285-300.

- 317 Naumer H, Heller W. Untersuchungsmethoden in der Chemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 1997:25.
- 318 Burkhardt F. Mikrobiologische Diagnostik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 1992:683.
- 319 Lämmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680-685.
- 320 Cooper TG. Biochemische Arbeitsmethoden. Walter de Gruyter, Berlin. 1980:157-172.
- 321 Walker JM. Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In: Walker JM (Hrsg.). The protein protocol handbook. Humana Press, Totowa. 2002:58.
- 322 Tsai CM, Frasch CE. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. Anal Biochem. 1982;119:115-119.
- 323 Hitchcock PJ, Brown TM. Morphological heterogeneity among Salmonella lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. J Bacteriol. 1983;154:269-277.
- 324 Carlsson SR. Isolation and characterisation of glycoproteins. In: Fakuda M, Kobata A (Hrsg.). Glycobiology, A Practical Approach. Oxford University Press. 1993:1-26.
- 325 Janeway CA, Travers P. Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 1994;53.
- 326 Packer NH, Ball MS, Devine PL, Patton WF. Detection of glycoproteins in gels and blots. In: Walker JM (Hrsg.). The protein protocols handbook. Humana Press, Totowa. 2002:761-778.
- 327 Reeke GN Jr, Becker JW, Cunningham BA, Gunther GR, Wang JL, Edelman GM. Relationships between the structure and activities of concanavalin A. Ann N Y Acad Sci. 1974;234:369-382.
- 328 Smith PK, Krohn RI, Hermann GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 1985;150:76-85.
- 329 Wiechelmann KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for colour formation. Anal Biochem. 1988;175:231-237.
- 330 Kawahara K, Moll H, Knirel YA, Seydel U, Zähringer U. Structural analysis of two glycosphingolipids from the lipopolysaccharide-lacking bacterium *Sphingomonas capsulata*. Eur J Biochem. 2000;267:1837-1846.
- 331 Sawardeker JS, Sloneker JH, Jeanes A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography. Anal Chem. 1967;37:1602-1604.
- 332 Whitehouse CM, Dryer RN, Yamashita M, Fenn JB. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. Anal Chem. 1985;57:675-679.
- 333 Ciucanu I, Kerek F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. Carbohydr Res. 1984;131:209-217.
- 334 Ishizuka I, Inomata M, Ueno K, Yamakawa T. Sulfated glyceroglycolipids in rat brain. J Biol Chem. 1979;253:898-907.
- 335 Gerwig GJ, Kamerling JP, Vliegenhart JFG. Determination of the absolute configuration of monosaccharides in complex carbohydrates by capillary G.L.C. Carbohydr Res. 1979;77:10-17.
- 336 Lowry OH, Roberts NR, Leiner KL, Wu ML, Farr AL. The quantitative histochemistry of the brain. I. Chemical methods. J Biol Chem. 1954;207:1-17.

- 337 Brandenburg K, Jürgens G, Andrä J, Lindner B, Koch MHJ, Blume A, Garidel P. Biophysical characterization of the interaction of high-density lipoprotein (HDL) with endotoxins. *Eur J Biochem.* 2002;269:5972-5981.
- 338 Feigel F. Spot tests. Elsevier Publishing Company, Amsterdam. 1954:349.
- 339 Stahl B, Steup M, Karas M, Hillenkamp F. Analysis of neutral oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 1991;63:1463-1466.
- 340 Lindner B. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of lipopolysaccharides. In: Holst O (Hrsg.). *Bacterial Toxins Methods and Protocols.* Humana Press. Totowa. 2000:311-325.
- 341 Strupat K, Karas M, Hillenkamp F. 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom Processes.* 1991;111:89-102.
- 342 Papac DI, Wong A, Jones AJ. Analysis of acidic oligosaccharides and glycopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem.* 1996;68:3215-3223.
- 343 Nakamura S, Morita T, Iwanaga S, Niwa M, Tabahashi K. A sensitive substrate for the clotting enzyme in horseshoe crab hemocytes. *J Biochem.* 1977;81:1567-1569.
- 344 Iwanaga S, Morita T, Harada T, Nakamura S, Niwa M, Takada K, Kimura T, Sakakibara S. Chromogenic substrates for horseshoe crab clotting enzymes. Its application for the assay of bacterial endotoxins. *Haemostasis.* 1978;7:183-188.
- 345 Warner RC. Egg proteins. In: Neurath H, Bailey K (Hrsg). *The Proteins, Bd. IIA.* Academic Press, New York. 1954:435.
- 346 Jolles P. Lysozymes: A chapter of molecular biology. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1969;8:227-239.
- 347 Pharmacia Biotech. Gel filtration. Theory and practice. Pharmacia Fine Chemicals. 6th edition.
- 348 De Hoffmann E, Stroobant V. *Mass Spectrometry- Principles and Applications.* John Wiley & Sons, New York. 2002;33-44.
- 349 De Hoffmann E, Stroobant V. *Mass Spectrometry- Principles and Applications.* John Wiley & Sons, New York. 2002;293.
- 350 Gilleron M, Garton NJ, N, Puzo G, Sutcliff IC. Characterization of a truncated lipoarabinomannan from the Actinomycete *Turicella otitidis*. *J Bacteriol.* 2005;187:854-861.
- 351 Nigou J, Gilleron M, Brando T, Vercellone A, Puzo G. Structural definition of arabinomannans from *Mycobacterium bovis BCG*. *Glycocon J.* 1999;16:257-264.
- 352 Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature.* 2000;406:782-787.
- 353 Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med.* 2000;343:338-344.
- 354 Janeway CA, Travers P. *Immunologie.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 1994;11-12.
- 355 Hancock LW, Gilmore MS. The capsular polysaccharide of *Enterococcus faecalis* and its relationship to other polysaccharides in the cell wall. *Microbiology.* 2002;99:1574-1579.
- 356 Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 1994;7:462-478.
- 357 Jędrzejak MJ. Pneumococcal virulence: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001;65:187-207.

- 358 Briles DE, Crain MJ, Gray BM, Forman C, Yother J. Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 1992;60:111-116.
- 359 Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 2000:905.
- 360 Sullivan GW, Mandell GL. Role of neutrophil degranulation in streptococcal leukotoxicity. *Infect Immun*. 1981;33:267-274.
- 361 Gilson VM, Donahue JA. Leukocytotoxic activity from the 80/81 strain of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 1968;95:2409-2412.
- 362 Dahl TA, Midden WR, Hartman PE. Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *J Bacteriol*. 1989;171:2188-2194.
- 363 Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 2000:96.
- 364 Hanby WE, Rydon HN. The capsular substance of *Bacillus anthracis*. *Biochem J*. 1946;40:297-309.
- 365 Stryer L. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 1995:488.
- 366 Lindhorst TK. *Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry*. Wiley-VCH, Weinheim. 2000:175-177.
- 367 Lehmann J. *Kohlenhydrate*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 1996:234-235.
- 368 Thaler CD, Cardullo RA. The initial molecular interaction between mouse sperm and the zona pellucida is a complex binding event. *J Biol Chem*. 1996;271:23289-23297.
- 369 Lasky LA. Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:113-139.
- 370 Aminoff D. The role of sialoglycoconjugates in the aging and sequestration of red cells from circulation. *Blood Cells*. 1988;14:229-257.
- 371 Lehmann J. *Kohlenhydrate*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 1996:247-248.
- 372 Lis H, Sharon N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem Rev*. 1998;98:637-674.
- 373 Cywes C, Hoppe HC, Daffé M, Ehlers MR. Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependant. *Infect Immun*. 1997;65:4258-4266.
- 374 Belisle JT, Klaczkiwicz A, Brennan PJ, Jacobs WR Jr, Inamine JM. Rough morphological variants of *Mycobacterium avium*. *J Biol Chem*. 1993;268:10517-10523.
- 375 Appelberg R, Orne IM. Effector mechanisms involved in cytokine-mediated bacteriostasis of *Mycobacterium avium* infections in murine macrophages. *Immunology*. 1995;80:352-359.
- 376 Appelberg R, Sarmiento A, Castro AG. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in the host resistance to mycobacteria of distinct virulence. *Clin Exp Immunol*. 1995;101:308-313.
- 377 Woods GL, Washington JA. *Mycobacteria other than Mycobacterium tuberculosis*: review of microbiologic and clinical aspects. *Rev Infect Dis*. 1987;9:275-294.
- 378 Persönliche Mitteilung von Dr. Ulrike Krallmann-Wenzel, Forschungszentrum Borstel.

- 379 Butler WR, Kilburn JO. Improved method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. J Clin Microbiol. 1982;16:1106-1109.
- 380 Milner HW, Lawrence NS, French CS. Colloidal dispersion of chloroplast material. Science. 1950;6:633-634.
- 381 Hughes DE, Wimpenny JWT, Lloyd D. The disintegration of microorganisms. In: Norris JR, Ribbons DW (Hrsg.). Methods of microbiology, Bd. 5B. Academic Press, London. 1971:1-54.
- 382 Schütte H, Kula MR. Einsatz von Rührwerkskugeln und Hochdruckhomogenisatoren für den technischen Zellaufschluß. BTF Biotech-Forum 3. 1986:68-79.
- 383 Nossal PM. A mechanical cell disintegrator. Aust J Exp Biol Med Sci. 1953;31:583-589.
- 384 James CJ, Coakley WT, Hughes DE. Kinetics of protein release from yeast sonicated in batch and flow systems at 20 kHz. Biotech Bioeng. 1972;14:33-42.
- 385 Büschelberger HG. Untersuchungen zum mechanischen Aufschluss von Mikroorganismen in Hochdruckhomogenisatoren. Dissertartion. Technische Universität Karlsruhe. 1987.
- 386 Edebo L. Disintegration of cells. In: Perlman D (Hrsg.). Fermentation advances. Academic Press, London. 1969:249-267.
- 387 Kuo CC, Takahashi N, Swanson AF, Ozeki Y, Hakomori SI. An *N*-linked high-mannose type oligosaccharide, expressed at the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*, mediates attachment and infectivity of the microorganism to HeLa cells. J Clin Invest. 1996;98:2813-2818.
- 388 Espitia C, Mancilla R. Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigens. Clin Exp Immunol. 1989;77:378-383.
- 389 Dobos KM, Khoo KH, Swiderek KM, Brennan PJ, Belisle JT. Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol. 1996;178:2498-2506.
- 390 Horn C, Namane A, Pescher P, Rivière P, Romain Félix, Puzo G, Barzu O, Marchal G. Decreased capacity of recombinant 45/47-kDa molecules (Apa) of *Mycobacterium tuberculosis* to stimulate T lymphocyte responses related to changes in their mannosylation pattern. J Biol Chem. 1999;274:32023-32030.
- 391 Kenne L, Lindberg B. Bacterial polysaccharides. In: Aspinall GO (Hrsg.). The Polysaccharides, Bd. 2. Academic Press, London. 1983:287-363.
- 392 Fransson LA. Mammalian glycosaminoglycans. In: Aspinall GO (Hrsg.). The Polysaccharides, Bd. 3. Academic Press, London. 1983:337-415.
- 393 Painter TJ. Algal polysaccharides. In: Aspinall GO (Hrsg.). The Polysaccharides, Bd. 2. Academic Press, London. 1983:195-285.
- 394 Aitken A, Learmonth MP. Protein determination by UV absorption. In: Walker JM (Hrsg.). The protein protocols handbook. Humana Press, Totowa. 2002:3.
- 395 Robyt JF. General principles - General occurrence of carbohydrates. In: Fraser-Reid B, Tatsuta K, Thiem J (Hrsg.). Glycosciences - Chemistry and Chemical Biology. Springer Verlag, Berlin. 2001:75-114.
- 396 Moreau M, Richards JC, Fournier JM, Byrd RA, Karakawa WW, Vann WF. Structure of the type 5 capsular polysaccharide of *Staphylococcus aureus*. Carbohydr Res. 1990;201:285-297.
- 397 Jann B, Jann K. Structure and biosynthesis of the capsular antigens of *Escherichia coli*. Curr Top Microbiol Immunol. 1990;150:19-43.

- 398 Kenne L, Lindberg B. The structure of capsular polysaccharide of the Pneumococcus type II. Carbohydr Res. 1975;40:69-75.
- 399 Branefors-Helander P. The structure of the capsular antigen from *Haemophilus influenzae* type A. Carbohydr Res. 1977;56:117-122.
- 400 Sprenger H, Gemsa D. Angeborene Mechanismen der Infektabwehr. In: Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg.). Immunsystem und Infektiologie - Handbuch der Molekularen Medizin. Springer Verlag, Berlin. 1999:317-340.
- 401 Shurin MR, Esche C, Peron JM, Lotze MT. Antitumor activities of IL-12 and mechanisms of action. Chem Immunol. 1997;68:153-174.
- 402 Flesch IE, Hess JH, Huang S, Aguet M, Rothe J, Bluethmann H, Kaufmann SH. Early interleukin 12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon gamma and tumor necrosis factor alpha. J Exp Med. 1995;181:1615-1621.
- 403 Brandau S, Böhle A, Thanhauser A, Ernst M, Mattern T, Ullmer AJ, Flad HD. *In vitro* generation of bacillus Calmette-Guérin-activated killer cells. Clin Infect Dis. 2000;31 Suppl 3: 94-100.
- 404 Persönliche Mitteilung von Jessica Mittelstädt, Laborgruppe Immuntherapie, Forschungszentrum Borstel.
- 405 Persönliche Mitteilung von Gabriele Bentien, Laborgruppe Immuntherapie, Forschungszentrum Borstel.
- 406 Brandau S, Böhle A. Activation of natural killer cells by Bacillus Calmette Guérin. Eur Urol. 2001;39:518-524.
- 407 Gilleron M, Himoudi N, Adam O, Constant P, Venisse A, Rivière M, Puzo G. *Mycobacterium smegmatis* phosphoinositols-glyceroarabinomannans. J Biol Chem. 1997;372:117-124.
- 408 Bach P, Bols M, Damsgard A, Hansen SU, Lohse A. Glycomimetics. In: Fraser-Reid B, Tatsuta K, Thiem J (Hrsg.). Glycosciences - Chemistry and Chemical Biology. Springer Verlag, Berlin. 2001:2533-2540.
- 409 Gruner SAW, Locardi E, Lohof E, Kessler H. Carbohydrate-based mimetics in drug-design: sugar amino acids and carbohydrate scaffolds. Chem Rev. 2002;102:491-514.
- 410 Röckendorf N, Lindhorst TK. Glycodendrimers. Topics Curr Chem. 2001;217:201-238.
- 411 Reiling N, Klug K, Krallmann-Wenzel U, Laves R, Goyert S, Taylor ME, Lindhorst TK, Ehlers S. Complex encounters at the macrophage-mycobacterium interface: studies on the role of the mannose receptor and CD14 in experimental infection models with *Mycobacterium avium*. Immunobiology. 2001;204:558-571.
- 412 Heine H, Lien E. Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. Int Arch Allergy Immunol. 2003;130:180-192.
- 413 Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol. 1999;163:3920-3927.
- 414 Blumenthal A, Ehlers S, Ernst M, Flad HD, Reiling N. Control of mycobacterial replication in human macrophages: roles of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. Infect Immun. 2002;70:4961-4967.
- 415 Horstmann RD. Genetics of susceptibility and resistance to tuberculosis. Internist (Berl). 2003;44:1385-1393.

416 Lipsitch M, Sousa AO. Historical intensity of natural selection for resistance to tuberculosis. *Genetics*. 2002;161:1599-1607.

LEBENS LAUF

Name: Manon Wittkowski
Geburtsort: Hamburg
Geburtsdatum: 18. Dezember 1975

Wohnort: Hauptstrasse 47a
23845 Seth

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung:

September 1982 – August 1986 Grundschule Seth, Kreis Segeberg

September 1986 – Juni 1996 Gymnasium Dahlmansschule, Bad Segeberg,
mit Abschluss Abitur

Hochschulstudium:

Oktober 1996 - Oktober 2000 Studium der Humanbiologie an der Ernst-Moritz-Arndt-
Universität Greifswald
(Hauptfach: Pharmakologie, 1. Nebenfach: Virologie,
2. Nebenfach: Funktionelle Morphologie)

November 2000 - Juli 2001 Diplomarbeit extern am Forschungszentrum Borstel in
der Arbeitsgruppe Analytische Biochemie unter der
Leitung von Prof. Dr. Otto Holst; Thema: „Isolierung
und Untersuchungen zur Struktur von Polysacchariden
aus der Zellwand von *Mycobacterium avium*“; mit
Abschluss Diplom

August 2001 – März 2005 Promotionsarbeit am Forschungszentrum Borstel in der
Laborgruppe Strukturbiochemie von Prof. Dr. Otto Holst