

Aus dem Nationalen Referenzzentrum für Mykobakterien
des Forschungszentrums Borstel
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Abteilung Klinische Medizin
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Zabel

Die Bedeutung von Mutationen im *embCAB* Operon für die Entwicklung
von Ethambutol-Resistenz in *Mycobacterium tuberculosis*

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

Vorgelegt von
Claudia Plinke
aus Neustadt a. Rbg.
Lübeck, November 2008

Abgabedatum:	19. November 2008
1. Gutachter:	Prof. Dr. Ulrich Schaible
2. Gutachter:	PD Dr. Stefan Niemann
Mündliche Prüfung:	26. Februar 2009

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Tuberkulose	3
2.1.1	Tuberkulose aus historischer Sicht	3
2.1.2	Aktuelle Epidemiologie der Tuberkulose	4
2.1.3	Die Erreger der Tuberkulose: <i>M. tuberculosis</i> -Komplex	6
2.1.4	Therapie der Tuberkulose.....	10
2.1.5	Resistenztestung von Tuberkulosebakterien.....	11
2.2	Resistenzmechanismen bei <i>M. tuberculosis</i>	13
2.2.1	Natürliche und transiente Resistenz	13
2.2.2	Erworbene Resistenz durch chromosomale Mutationen	14
2.3	Ethambutol	15
2.3.1	Antimykobakterielle Wirkung von EMB und die Funktionen der Proteine EmbA, EmbB und EmbC.....	16
2.3.2	Bisherige Erkenntnisse zur Entwicklung von EMB-Resistenz	19
2.4	Fragestellung	22
2.5	Publikationen	23
3	MATERIAL UND METHODEN	24
3.1	Material.....	24
3.1.1	Bakterienstämme	24
3.1.2	Mausstämme	25
3.1.3	Vektoren und Plasmide.....	25
3.1.4	Primer	26
3.1.5	Nährmedien und Zusätze	28
3.1.6	Lösungen und Puffer für <i>Southern Blot</i>	30
3.1.7	Weitere Lösungen und Puffer für molekularbiologische Methoden	31
3.2	Methoden.....	33
3.2.1	Mikrobiologische Methoden	33
3.2.2	Molekularbiologische Methoden	36

3.2.3 Zusammenfassung der einzelnen Klonierungsschritte zur Generierung einer <i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>embB306</i> Mutante.....	51
3.2.4 Tierexperimentelle Arbeiten.....	53
3.2.5 Statistik.....	55
4 ERGEBNISSE	56
4.1 Mutationen im <i>embCAB</i> Operon von EMB resistenten klinischen <i>M. tuberculosis</i> Isolaten aus Deutschland.....	56
4.1.1 Vorkommen von <i>embB306</i> Mutationen	56
4.1.2 Mutationen im gesamten <i>embCAB</i> Operon.....	57
4.2 Mutationen im <i>embCAB</i> Operon von EMB resistenten klinischen <i>M. tuberculosis</i> Isolaten aus Usbekistan.....	62
4.2.1 Vorkommen von <i>embB306</i> Mutationen	62
4.2.2 Charakterisierung der klinischen <i>M. tuberculosis</i> Isolate mit diskrepanten Ergebnissen	63
4.2.3 Mutationen im gesamten <i>embCAB</i> Operon.....	68
4.3 <i>In vitro</i> Selektion EMB resistenter <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Klone	71
4.4 Transfer von <i>embB306</i> Mutationen in <i>M. tuberculosis</i> H37Rv und anschließende phänotypische Charakterisierung.....	74
4.4.1 Generierung der <i>embB306</i> Mutanten in <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	74
4.4.2 Charakterisierung der <i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>embB306</i> Mutanten <i>in vitro</i>	81
4.4.3 Auswirkung einer <i>embB306</i> Mutation in <i>M. tuberculosis</i> H37Rv auf die Resistenz gegenüber EMB <i>in vivo</i>	82
5 DISKUSSION	84
5.1 Mutationen im <i>embCAB</i> Operon bei Ethambutol resistenten klinischen <i>M. tuberculosis</i> Isolaten	84
5.1.1 Die Rolle von Mutationen in <i>embB306</i>	84
5.1.2 Weitere <i>Hot Spots</i> in <i>embB</i> und die Bedeutung von Mutationen in <i>embA</i> und <i>embC</i> für die Entwicklung von EMB-Resistenz.....	86
5.1.3 Diskrepante Ergebnisse bei der konventionellen Resistenztestung von EMB ...	89

5.2	Mutationen im <i>embCAB</i> Operon bei <i>in vitro</i> selektierten EMB resistenten <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Klonen.....	90
5.3	Einfluss von <i>embB306</i> Mutationen auf die Entwicklung von EMB-Resistenz <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	92
5.3.1	Erhöhung der MHK durch <i>embB306</i> Mutationen.....	92
5.3.2	Rolle von <i>embB306</i> Mutationen für EMB-Resistenz <i>in vivo</i>	93
5.4	Ausblick	94
	LITERATURVERZEICHNIS.....	96
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	110
	TABELLENVERZEICHNIS	112
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	114
	ANHANG.....	117
	A PCR-Programme	117
	B Materialien	122
	C Abkürzungen Aminosäuren	130
	DANKSAGUNG	131
	LEBENS LAUF	132
	ERKLÄRUNG	133

1 Zusammenfassung

Tuberkulose (Tbc) ist die weltweit am häufigsten zum Tode führende bakterielle Infektionskrankheit. Zwar stehen heute Antituberkulotika für eine erfolgreiche Therapie zur Verfügung, jedoch wird die Behandlung durch das Auftreten resistenter *Mycobacterium tuberculosis* Stämme deutlich erschwert. Die Aufklärung der Resistenzmechanismen von *M. tuberculosis* ist daher für die Entwicklung neuer Medikamente und besserer Methoden zur Resistenztestung unerlässlich.

Die Mechanismen, die zur Resistenzentwicklung gegenüber dem Erstrangmedikament Ethambutol (EMB) beitragen, wurden in den letzten Jahren sehr kontrovers diskutiert. In früheren Studien mit *M. smegmatis* wurden Mutationen in Bereichen des *embCAB* Operons identifiziert, welche mit einer EMB-Resistenz assoziiert sind. In ungefähr zwei Drittel der EMB resistenten klinischen *M. tuberculosis* Isolate ist eine *embB306* Mutation nachweisbar. Aus diesem Grund wurden Mutationen in *embB306* als molekulare Marker für EMB-Resistenz vorgeschlagen. In den letzten Jahren wurden jedoch vermehrt *embB306* Mutationen in EMB sensiblen multiresistenten (MDR-) Stämmen detektiert. Diese Beobachtungen führten zu der Schlussfolgerung, dass eher eine Assoziation zwischen *embB306* Mutationen und dem MDR-Phänotyp als mit einer EMB-Resistenz besteht.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher geklärt werden, welche Bedeutung Mutationen in dem *embCAB* Operon (insbesondere in *embB306*) tatsächlich für die Entstehung von EMB-Resistenz haben.

Hierzu wurde in einem ersten Schritt die Assoziation zwischen dem Vorliegen einer *embB306* Mutation und phänotypischer EMB-Resistenz bei klinischen *M. tuberculosis* Isolaten aus Deutschland analysiert. Insgesamt hatten 69% der untersuchten EMB resistenten Stämme eine Mutation in *embB306*, wogegen eine Assoziation zwischen *embB306* Mutationen und dem MDR-Phänotyp nicht festgestellt werden konnte.

Ein vergleichbares Ergebnis ergab die Analyse von *M. tuberculosis* Isolaten aus einer populationsbasierten Studie in Usbekistan, einem Land mit hoher Tbc-Inzidenz. Etwa 80% der EMB resistenten Stämme waren durch den Nachweis einer *embB306* Mutation detektierbar. Die Spezifität von *embB306* Mutationen als molekulare Marker für EMB-Resistenz betrug 100%.

Die weiterführende Analyse des gesamten *embCAB* Operons von Stämmen ohne Veränderung in *embB306* ergab, dass nahezu jeder dieser Stämme wenigstens eine andere Mutation hatte. Diese traten überwiegend in *embB* auf, wobei sich die Codons *embB406* und *embB497* als zwei weitere *Hot Spots* neben *embB306* herausstellten.

Diese Ergebnisse konnten auch bei *in vitro* generierten EMB resistenten Spontanmutanten des Laborstammes H37Rv bestätigt werden, da diese wie die klinischen Isolate überwiegend Mutationen in *embB* aufwiesen.

Um den direkten Effekt von *embB306* Mutationen auf die EMB-Resistenz zu überprüfen, wurden in einem nächsten Schritt *embB306* Varianten mittels homologer Rekombination in den sensiblen Laborstamm *M. tuberculosis* H37Rv transferiert. Hierdurch konnte sichergestellt werden, dass ein auftretender Effekt ausschließlich auf die Mutation in *embB306* zurückzuführen ist.

Die Charakterisierung der generierten Mutanten *in vitro* zeigte, dass jede Mutation eine erhöhte minimale Hemmkonzentration (MHK) für EMB im Vergleich zum Wildtyp bewirkt. Die Mutation *embB306* ATC vermittelte eine Verdoppelung der MHK und die Mutationen *embB306* ATA und *embB306* GTG resultierten in einer vierfachen MHK-Erhöhung. Somit wurde ein eindeutiger Beweis erbracht, dass *embB306* Mutationen einen EMB resistenten Phänotyp vermitteln. Diese Befunde konnten durch erste Ergebnisse in einem Therapiemodell der mykobakteriellen Infektion in der Maus bestätigt werden. Während sich mit dem Wildtyp H37Rv infizierte Mäuse durch EMB therapieren ließen, wies eine *embB306* GTG Mutante *in vivo* eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum auf.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eindeutig die Bedeutung von Mutationen im *embCAB* Operon für die Entwicklung von EMB-Resistenz bei klinischen *M. tuberculosis* Komplex Stämmen und widerlegen einen Zusammenhang mit der Ausbildung eines MDR-Phänotyps. Die Analyse eines kurzen Bereichs in *embB* ist ausreichend, um einen großen Prozentsatz der EMB resistenten Stämme zu erfassen. Dies ermöglicht die Etablierung einfacher molekularbiologischer Nachweisverfahren, deren Anwendung die Ergebnisse der EMB-Resistenztestung in der Routinediagnostik deutlich verbessern könnte.

2 Einleitung

2.1 Tuberkulose

2.1.1 Tuberkulose aus historischer Sicht

Das Auftreten der Tuberkulose lässt sich anhand von Skelettfunden, die charakteristische Deformierungen der Wirbelsäule aufwiesen, bis in die neolithische Periode zurückverfolgen (Bartels, 1907; Pfaff, 1904). Untersuchungen ägyptischer und kolumbianischer Mumien lieferten ebenfalls Beweise für die Existenz tuberkulöser Erkrankungsformen bei Menschen, die zu prähistorischen Zeiten lebten (Nerlich *et al.*, 1997; Salo *et al.*, 1994).

In der Antike wurden erstmals detailliert Symptome und unterschiedliche Verlaufsformen der Tuberkulose von *Hippokrates* (460-370 v. Chr.) beschrieben (Pagel, 1927). Der griechische Philosoph und Arzt prägte auch den heute noch verwendeten Begriff *Phthisis* (Schwindsucht). Im Gegensatz zu Hippokrates, der Tuberkulose als vererbare Erkrankung ansah, ging *Aristoteles* (384-322 v. Chr.) von einer Infektionskrankheit aus.

Grundlegende Fortschritte zum Verständnis der Entstehung der Tuberkulose wurden jedoch erst im 17. Jahrhundert durch anatomische Untersuchungen innerer Organe ermöglicht. So vermutete *Sylvius de la Boë* im Jahre 1679 erstmals einen Zusammenhang zwischen der Knotenbildung (Tuberkel) und der Tuberkuloseerkrankung (Löffler, 1958). Zehn Jahre später erklärte der englische Arzt *Richard Morton* die Bildung von Tuberkeln als eine Vorstufe der Lungentuberkulose (Daniel *et al.*, 2006). In der nachfolgenden Zeit wurde die Ätiologie und Infektiosität der Tuberkulose sehr kontrovers diskutiert.

Erst im 19. Jahrhundert, als die Tuberkulose im Zuge der Urbanisierung, während der industriellen Revolution, die häufigste Todesursache in Europa darstellte, wurde diese kontroverse Diskussion durch neue Erkenntnisse beendet. Im Jahre 1865 konnte *Jeanne Antoine Villemin* anhand von tierexperimentellen Arbeiten die Übertragbarkeit der Tuberkulose demonstrieren (Villemin, 1865). Den endgültigen Beweis jedoch lieferte erst 1882 der deutsche Arzt *Robert Koch*, der den Tuberkuloseerreger *Mycobacterium tuberculosis* entdeckte (Koch, 1882). Robert Koch extrahierte auch das Tuberkulin aus Mykobakterien, um es für therapeutische Zwecke einzusetzen (Koch, 1890). Im Jahr 1908 wurde die intrakutane Injektion des Tuberkulins als diagnostischer Nachweis verwendet (Mendel, 1908). Nur wenige Jahre später, im Jahre 1921, setzten *Albert Calmette* und *Camille Guérin* erstmals den BCG-Impfstamm, der durch 230 *in vitro* Passagen aus *Mycobacterium bovis* generiert wurde, bei einem Neugeborenen ein.

Im 20. Jahrhundert wurde in den Industrienationen ein Rückgang der Infektionskrankheit beobachtet. Die Einführung gesundheitspolitischer Maßnahmen und die Entwicklung neuer

diagnostischer Methoden sowie chirurgischer und chemotherapeutischer Behandlungsformen unterstützten diese rückläufige Entwicklung. Anfangs nahm die Zahl der Tuberkulosefälle etwa um die Hälfte pro Jahrzehnt ab (Hauer und Loddenkemper, 1999). Doch dieser abnehmende Trend verlangsamte sich zunehmend bis in den 80er Jahren in den USA erstmals wieder ein Anstieg der Tuberkuloseerkrankungen festgestellt wurde (Brudney und Dobkin, 1991; McGray *et al.*, 1997; Raviglione *et al.*, 1994; Raviglione *et al.*, 1995). Im Jahre 1993 wurde von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sogar der globale Notstand ausgerufen (WHO, 1993). Diese Bekanntgabe der WHO macht deutlich, dass Tuberkulose weltweit betrachtet noch immer eine große Bedrohung für die Menschheit darstellt.

2.1.2 Aktuelle Epidemiologie der Tuberkulose

Die Tuberkulose (Tbc) ist auch heute noch die weltweit häufigste zum Tode führende bakterielle Infektionskrankheit und somit sowohl aus medizinisch-klinischer als auch aus gesundheitspolitischer Sicht höchst relevant (DZK zur Bekämpfung der Tuberkulose, 2008). Schätzungsweise ein Drittel der Weltbevölkerung ist mit dem Tbc-Erreger infiziert. Nach dem WHO-Report 2008 „Global Tuberculosis Control“ verstarben 2006 weltweit 1,7 Mio. Menschen an Tbc und es wurden 9,2 Mio. Neuerkrankungen registriert (WHO, 2008). Das entspricht einer globalen Inzidenz von 139/100.000. In Bezug auf die Inzidenz nehmen Indien, China, Indonesien, Südafrika und Nigeria die ersten fünf Plätze ein. Die Zahl der Tbc-Fälle in Südostasien und dem westpazifischen Raum entspricht 55% der weltweit verzeichneten Fälle. Afrika stellt ebenfalls eine Problemregion dar und der Anteil der dort registrierten Tbc-Fälle macht 31% der globalen Tbc-Fälle aus. Abbildung 2-1 gibt eine Übersicht über die Tbc-Inzidenz weltweit im Jahr 2005.

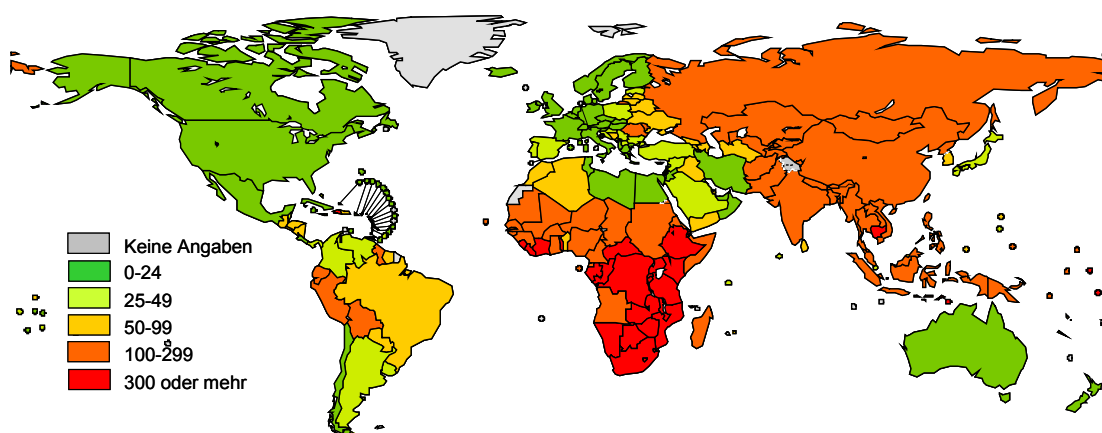


Abb. 2-1. Geschätzte Tbc-Inzidenz (Fälle je 100.000) weltweit für das Jahr 2005

(Quelle: WHO, 2006)

In Deutschland ist in den letzten Jahren eine rückläufige Entwicklung der Zahl der Tbc-Fälle zu beobachten. So wurden 2006 insgesamt 5402 neue Tbc-Fälle gemeldet im Vergleich zu 6020 im Vorjahr (RKI-Bericht, 2008). Im Jahr 2006 lag die Inzidenz in Deutschland somit bei 6,6 Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner. Darunter waren insgesamt 201 Todesfälle zu verzeichnen. Das entsprach einer Mortalität von 0,2/100.000 Einwohner. Der rückläufige Trend in Deutschland spiegelt sich auch in der Zahl der resistenten Erreger wider. Insgesamt wurden 2006 447 (12,8%) resistente Tbc-Fälle registriert, bei denen der Erreger gegen mindestens eines der fünf Erstrangmedikamente resistent war. Im Vorjahr waren es noch 523 Fälle (13,5%). Der Anteil multiresistenter Stämme sank von 2,7% (105 Fälle) im Jahr 2005 auf 2,2% (78 Fälle) im Jahr 2006.

Trotz dieser positiven Entwicklung stellt die Tbc ein nicht zu unterschätzendes Problem in Deutschland dar und die Infektionsrate kann sich z. B. durch Migrationsbewegungen wieder erhöhen.

2.1.3 Die Erreger der Tuberkulose: *M. tuberculosis* Komplex

Die Tuberkuloseerreger gehören der Gattung *Mycobacterium* an. Die Gattung umfasst rund 131 Arten mit rund 11 Subspezies und gehört zu der Familie der *Mycobacteriaceae* (Euzéby, 2008). Wie auch andere Vertreter der Ordnung *Actinomycetales* zeichnen sich Mykobakterien durch einen hohen GC-Gehalt in ihrem Genom aus (Goodfellow und Minnikin, 1981; Mordarski *et al.*, 1981). Trotz schlechter Anfärbung werden Mykobakterien zu den grampositiven Bakterien gezählt.

Allgemein lassen sich Mykobakterien als aerobe, schlanke, gerade bis leicht gekrümmte Stäbchenbakterien beschreiben, die unbeweglich sind und keine Sporen bilden (Kayser *et al.*, 2001; Madigan *et al.*, 2000). Die Zellen sind etwa 1 bis 4 µm lang und 0,3 bis 0,6 µm breit (Runyon *et al.*, 1974).

In der Gattung *Mycobacterium* sind sowohl obligat und fakultativ pathogene als auch apathogene Arten vertreten (Böttger, 2001). Fakultativ pathogene und apathogene Mykobakterien sind ubiquitär auftretende Umweltkeime, die wahrscheinlich größtenteils saprophytär leben (Fischeder *et al.*, 1991; Schulze-Röbbbecke, 1993; Szewzyk *et al.*, 2000). Einige der fakultativ pathogenen Spezies haben in den letzten Jahren bei immunsupprimierten HIV-Patienten zunehmend an Bedeutung gewonnen (Corti und Palmero, 2008; Khatter *et al.*, 2008). Häufig wird die aus dem englischen Schrifttum stammende Abkürzung MOTT (*mycobacteria other than tuberculosis*) verwendet, um apathogene und fakultativ pathogene Mykobakterien den Tuberkulosebakterien gegenüber zu stellen.

Die Tuberkulosebakterien zählen zusammen mit dem Erreger der Lepra *M. leprae* zu den obligat pathogenen Mykobakterien. Alle Tuberkuloseerreger und der Impfstamm *M. bovis* BCG werden unter dem *M. tuberculosis* Komplex (MTBK) zusammengefasst: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. microti* und *M. pinnipedii* (Aranaz *et al.*, 2003; Cousins *et al.*, 2003; van Soolingen *et al.*, 1997). Die Genomsequenzen der dem MTBK zugehörigen Arten sind zu 99,9% identisch (Brosch *et al.*, 2002; Gutacker *et al.*, 2002). Neben den sieben Spezies des MTBK lassen sich für *M. tuberculosis* und *M. africanum* verschiedene Genotypen bzw. phylogenetische Linien bestimmen. Benannt nach dem Isolierungsort werden bei *M. tuberculosis* u. a. die Genotypen Beijing, Cameroon, Central-Asien-Delhi, East-African-Indian, Ghana, Haarlem, Latin-American-Mediterranean und Uganda unterschieden (Agerton *et al.*, 1999; Anh *et al.*, 2000; Bifani *et al.*, 1996; Brudey *et al.*, 2006; Wirth *et al.*, 2008). Bei *M. africanum* lassen sich die zwei Genotypen West-African I und West-African II voneinander abgrenzen (Niemann *et al.*, 2004).

Im Gegensatz zu der hohen Übereinstimmung auf der genomischen Ebene gibt es große Unterschiede bei den MTBK zugehörigen Spezies im Phänotyp und der Epidemiologie. So ist für *M. tuberculosis* und *M. africanum* der Mensch der primäre Wirt. Weltweit betrachtet ist *M. tuberculosis* der Haupterreger der Tbc, wohingegen *M. africanum* dem Namen entsprechend vor allem in (West-) Afrika einen großen Teil der Tbc-Fälle ausmacht (Homolka *et al.*, 2008; Niemann *et al.*, 2004). Die übrigen zum MTBK gehörenden Spezies sind überwiegend Tierpathogene (Cousins *et al.*, 2003; Niemann *et al.*, 2000; O'Reilly und Daborn, 1995).

Ein besonderes Merkmal von Mykobakterien ist ihre Säurefestigkeit, die mit einer Ziehl-Neelsen-Färbung nachgewiesen werden kann (modifiziert nach Ziehl, 1882). Bei dieser Färbemethode werden Zellen mit dem Farbstoff Karbolfuchsin rot angefärbt und anschließend mit einer Säure-Behandlung wieder entfärbt. Nach einer Gegenfärbung mit Methyleneblau erscheinen Mykobakterien rot und alle anderen Bakterien sind blau gefärbt. In Abbildung 2-3 ist ein Präparat mit nach Ziehl-Neelsen angefärbten Mykobakterien zu sehen. Die Säurefestigkeit von Mykobakterien ist auf den besonderen Aufbau der Zellwand zurückzuführen.

Die Zellhülle von Mykobakterien besteht zu einem großen Teil aus Lipiden, die bis zu 60% des Trockengewichts ausmachen können. Die Zelle eines Mykobakteriums ist von einer Plasmamembran umgeben, die vergleichbar mit der anderer grampositiver Bakterien ist (Brennan, 1988). Die Plasmamembran wird von einem Komplex aus kovalent miteinander verbundenem Peptidoglykan, Arabinogalaktan und Mykolsäuren umgeben (Crick *et al.*, 2001). Eine hauptsächlich aus Proteinen und Polysacchariden bestehende kapselähnliche Struktur bildet die äußerste Schicht der Zellhülle (Daffé und Etienne, 1999; Lemassu und Daffé, 1994; Ortalo-Magné *et al.*, 1995).

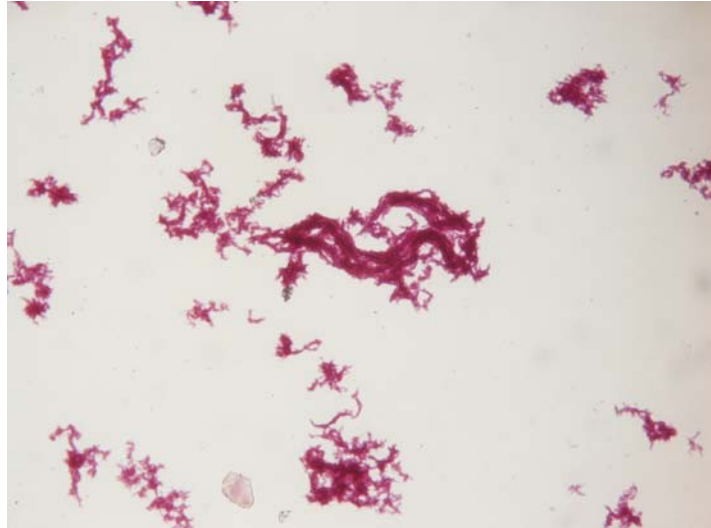


Abb. 2-3. Ziehl-Neelsen-Färbung eines Präparats aus einer Reinkultur von *M. tuberculosis*

(Quelle: eigenes Präparat)

In Abbildung 2-4 ist die Zellwand von Mykobakterien dargestellt. Das Peptidoglykan (auch Murein) der Mykobakterien ist ähnlich wie das anderer Bakterien aufgebaut und unterscheidet sich lediglich in der Zusammensetzung der einen Glykankette der alternierenden Zuckerderivate (Lederer *et al.*, 1975; Schleifer und Kandler, 1972). Des Weiteren ist der hohe Anteil an Peptidquervernetzung von 70-80% zu nennen, der beispielsweise bei *Escherichia coli* (*E. coli*) nur 20-30% beträgt (Matsushashi, 1966).

Eine weitere Besonderheit der mykobakteriellen Zellwand ist das Arabinogalaktan (AG), das über das Disaccharid α -L-Rhamno-Pyranose kovalent an Peptidoglykan gebunden ist (McNeil *et al.*, 1990). Arabinogalaktan ist ein Heteropolysaccharid, zusammengesetzt aus einer linearen Kette von ca. 30 Untereinheiten Galaktofuranose und zwei bis drei stark verzweigten Ketten Arabinofuranose (Daffé *et al.*, 1990; McNeil *et al.*, 1987). An den nichtreduzierenden Enden der Arabinanketten befinden sich charakteristische Hexaarabinosylmotive, die über Esterbindungen mit Mykolsäuren kovalent verbunden sind (McNeil *et al.*, 1991). Je Hexaarabinosylmotiv ist ein Cluster von vier Mykolsäuren angehängt (Besra und Brennan, 1997).

Die Mykolsäuren sind α -alkyl- β -hydroxyl-Fettsäuren, die aus 60-90 C-Atomen bestehen (Daffé *et al.*, 1991). Mykolsäuren dieser Länge sind einzigartig in der Natur und bilden eine Permeabilitätsbarriere, die für eine Reihe mykobakterieller Besonderheiten verantwortlich ist (Nikaido und Jarlier, 1991). So bietet diese Barriere zum einen der mykobakteriellen Zelle Schutz vor äußeren Stressfaktoren (z.B. Sauerstoffradikalen, einfachen Desinfektionsmitteln, Säuren, Laugen oder Austrocknung) und zum anderen verleiht sie ihr eine natürliche

Resistenz gegenüber hydrophilen Antibiotika (Brennan und Nikaido, 1995; Daffé und Draper, 1998; Jarlier und Nikaido, 1994; Jarlier *et al.*, 1991).

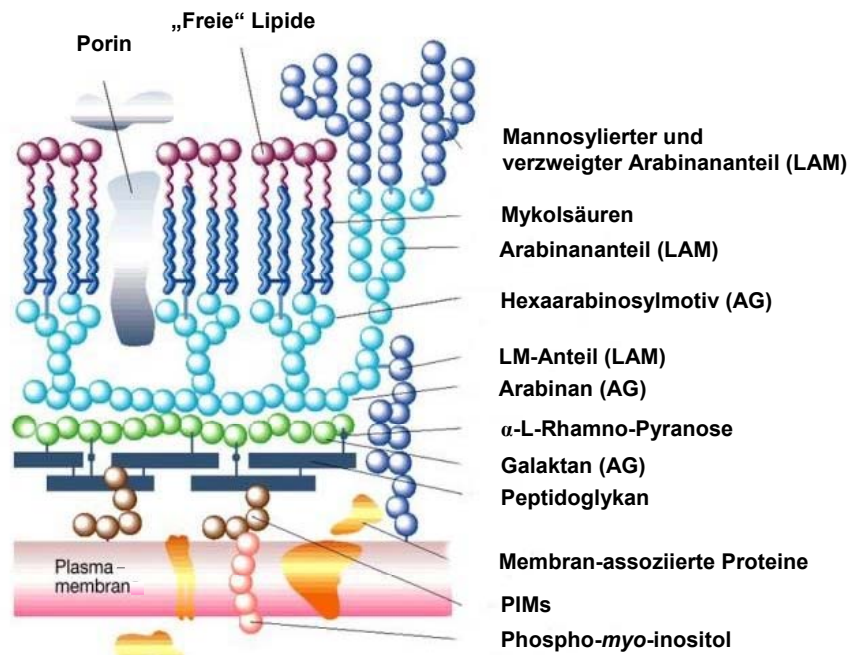


Abb. 2-4. Schematische Darstellung der mykobakteriellen Plasmamembran und Zellwand

Abkürzungen: AG, Arabinogalaktan; LAM, Lipoarabinomannan; PIMs, Phosphatidylinositol-Mannosid.

(Quelle: Park und Bendelac, 2000)

Mykolsäuren treten auch als „freie“ Lipide in der Zellwand auf. Sie liegen dann in glykosylierter Form vor (Besra *et al.*, 1994). Das wohl bekannteste Mykolat ist der Cord-Faktor (Trehalose-6,6'-Dimykolat), der die Zusammenlagerung von Mykobakterien zu zopfartigen Strängen verursacht. Es wurde vielfach gezeigt, dass der Cord-Faktor sowohl toxische als auch immunmodulatorische Effekte in Wirtszellen ausüben kann (Bekierkunst *et al.*, 1968; Kato, 1970; Ozeki *et al.*, 1997; Ryll *et al.*, 2001; Yamagami *et al.*, 2001).

Weitere bedeutende Glykolipide mit biologischer Aktivität sind Phosphatidylinositol-Mannosid (PIM), Lipomannan (LM) und Lipoarabinomannan (LAM), die alle über Phospho-myoinositol in der Plasmamembran verankert sind (Briken *et al.*, 2004; Gilleron *et al.*, 2001; Nigou *et al.*, 1997).

LAM geht aus einer Glykolyse von LM mit Arabinan hervor (Besra *et al.*, 1997; Nigou *et al.*, 2003). An den nichtreduzierenden Enden des Arabinans befindet sich jeweils ein lineares Tetraarabinosyl- und ein verzweigtes Hexaarabinosylmotiv (Kremer und Besra, 2005). Das Hexaarabinosylmotiv kann je nach Spezies durch ein bis drei Mannosylgruppen

oder durch Inositolphosphat modifiziert sein (Chatterjee *et al.*, 1992; Khoo *et al.*, 1995). Eine Mannosylierung spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenität (Chan *et al.*, 1991; Nigou *et al.*, 2002; Vercellone *et al.*, 1998).

2.1.4 Therapie der Tuberkulose

Die Tbc zählt heute zu den behandelbaren Krankheiten und die Patienten haben eine gute Aussicht auf Genesung (Kropp und Siemon, 1999).

Zur Vorbeugung einer Resistenzentwicklung wird Tbc immer mit einer Kombination aus mehreren Antituberkulotika behandelt (Niemann und Rüscher-Gerdes, 2003). Die langsame Wachstumsgeschwindigkeit von *M. tuberculosis* erfordert außerdem eine lange Therapiezeit, um Rezidive zu vermeiden. Nach den Richtlinien der WHO soll eine Standardtherapie folgendermaßen durchgeführt werden (WHO, 2003):

- eine initiale Intensivphase von zwei Monaten mit vier Antituberkulotika
- eine Stabilisierungsphase von vier Monaten mit zwei Antituberkulotika

Die wirksamsten und daher Antituberkulotika erster Wahl sind Isoniazid (INH) und Rifampicin (RMP), die möglichst sowohl in der Intensivphase als auch in der Stabilisierungsphase eingesetzt werden sollten. Pyrazinamid (PZA), Ethambutol (EMB) und/oder Streptomycin (SM) sind weitere Erstrangmedikamente in der Intensivphase. In bestimmten Fällen – z. B. bei Unverträglichkeit eines Chemotherapeutikums oder Vorliegen einer Resistenz – wird die Therapie verlängert und/oder auf Reservemedikamente zurückgegriffen. Hierzu zählen u. a. die Aminoglykoside Amikacin (AM), Capreomycin (CM), Kanamycin (KN) und Viomycin (VM), die Fluorchinolone (FQ) Ciprofloxacin (CIP), Ofloxacin (OFX) und Levofloxacin (LFX) und außerdem Protionamid (PTH), Rifabutin (RBT), p-Aminosalicylsäure (PAS), Cycloserin (CS) und Tetracycline (TC) (Magdorf und Stoll, 2004).

Die Wirkmechanismen der Antituberkulotika sind verschieden. Grundsätzlich wird, wie bei anderen Antibiotika auch, zwischen einer bakteriziden (irreversible Hemmung) und einer bakteriostatischen (reversible Hemmung) Wirkung unterschieden. Zusätzlich gibt es noch Antituberkulotika wie PZA mit sterilisierender Funktion, die auf persistierende Bakterien wirken (Kropp und Siemon, 1999). Tabelle 2-1 gibt eine kurze Übersicht über die Wirkmechanismen wichtiger Antituberkulotika.

Das Auftreten von resistenten Stämmen hat die Tbc-Behandlung in den letzten Jahren zunehmend erschwert. Gründe für die Entwicklung von Resistenzen sind einerseits Therapiefehler und andererseits mangelnde Kompliance des Patienten. Die zum Teil starken Nebenwirkungen der meisten Antituberkulotika und die Dauer der Therapie verleiten den

Patienten dazu, die Medikamente frühzeitig abzusetzen (Magdorf und Stoll, 2004). Daher wurden Therapieprogramme wie DOTS (*directly observed treatment short course*) eingeführt. Das DOTS-Konzept soll durch Observierung der Patienten bei der Einnahme von Medikamenten Heilungschancen verbessern sowie die Entwicklung von Resistenzen vermeiden (Mac *et al.*, 1999; Maher *et al.*, 2000).

Tab. 2-1. Wirkmechanismen von Antituberkulotika anhand ausgewählter Beispiele

Antituberkulotikum (Entdeckungsjahr)	Wirkung
INH (1952)	bakterizid; u. a. Inhibierung der Synthese von Mykolsäuren
RMP ^a (1966)	bakterizid und sterilisierend; Inhibierung der Transkription; intra- u. extrazellulär
PZA (1952)	bakterizid und sterilisierend; Ansäuerung des Cytoplasmas, verringert Energiegewinnung über protonenmotorische Kraft; in saurem Milieu wirksam
EMB (1961)	bakteriostatisch; Inhibierung der Arabinansynthese
SM ^a (1944)	bakterizid; Inhibierung der Proteinsynthese
AM / KN ^a (1957)	bakterizid; Inhibierung der Proteinsynthese
FQ ^a (1963)	bakterizid; Inhibierung der DNA-Gyrase

^a RMP, SM, AM/Kanamycin und FQ sind Breitbandantibiotika, deren Wirkmechanismus in *M. tuberculosis* derselbe wie in anderen Bakterien ist.

(Quelle: modifiziert nach Magdorf und Stoll, 2004; Zhang und Telenti, 2000)

2.1.5 Resistenztestung von Tuberkulosebakterien

Im Folgenden wird eine kurze Übersicht über die Möglichkeiten der Resistenztestung gegeben. Dabei wird insbesondere auf die konventionellen Methoden eingegangen.

Die Resistenztestung kann sowohl durch Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) erfolgen als auch durch Überprüfung des Wachstums auf einem Nährboden, der die kritische Konzentration eines Antituberkulotikums enthält.

Die MHK ist definiert als die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums, bei der kein Wachstum eines Stammes mehr festzustellen ist (DZK zur Bekämpfung der Tuberkulose, 1992). Die MHK wird zur Bestimmung des Resistenz-Verhältnisses (*resistance ratio*) eingesetzt (Canetti *et al.*, 1963; Canetti *et al.*, 1969; Jensen, 1985). Das Resistenz-Verhältnis ist definiert als das Verhältnis der MHK des zu testenden Stammes zu der MHK des

Laborreferenzstammes H37Rv. Aufgrund des hohen Materialaufwands und der damit verbundenen Kosten wird diese Methode eher selten angewendet.

Die Resistenztestung unter Verwendung der kritischen Konzentration hingegen kommt oft zum Einsatz. Die kritische Konzentration ist definiert als die niedrigste Konzentration eines Chemotherapeutikums, bei der das Wachstum eines Stammes ein Hinweis auf klinisch relevante Resistenz sein kann (DZK zur Bekämpfung der Tuberkulose, 1992). Die kritische Konzentration kann entweder bei der Resistenztestung nach der Proportionsmethode oder bei der Bestimmung der absoluten Konzentration verwendet werden (Canetti *et al.*, 1963; Canetti *et al.*, 1969).

Bei den konventionellen Methoden wird zwischen der Resistenztestung auf Festnährmedien und der Resistenzbestimmung in Flüssigmedien unterschieden.

Die Resistenzbestimmung auf festen Nährböden kann entweder auf Löwenstein-Jensen, 7H10- oder 7H11-Medium erfolgen (Heifets, 1991). In Abhängigkeit von dem verwendeten Nährboden variieren die Werte für die kritische Konzentration (z. B. für EMB 2 µg/ml in Löwenstein-Jensen, 5 µg/ml in 7H10 und 7,5 µg/ml in 7H11). Insgesamt werden die Kulturen sechs Wochen bei 37°C inkubiert. Nach drei bis vier Wochen werden die Kulturen erstmalig abgelesen.

Die Verwendung von Flüssigmedium verkürzt die Dauer der Resistenztestung. Bei dem Bactec™ 460TB-System wird eine modifizierte Form des 7H9-Mediums (7H12) verwendet, in dem sich eine ¹⁴C radioaktiv markierte Palmitinsäure als Kohlenstoffquelle befindet (Laszlo und Michaud, 1984; Middlebrook *et al.*, 1977). Durch die Verstoffwechslung der Palmitinsäure entsteht radioaktiv markiertes Kohlendioxid, das von dem Gerät detektiert wird. Die Messung dauert vier bis zwölf Tage. Die kritische Konzentration für EMB im Bactec™ 460TB-System ist 3,75 µg/ml. Diese auf Radioaktivität basierende Methode wird jedoch mittlerweile eher selten verwendet und zunehmend durch das Bactec™ MGIT™ 960-System ersetzt.

Das Bactec™ MGIT™ 960-System ist eine fluoreszenzbasierte Methode (Hanna *et al.*, 1999). In den MGIT-Indikatorröhren befindet sich am Boden eine in Silikon eingebettete fluoreszierende Verbindung, die als Sauerstoffsensor dient. Zu Beginn der Messung wird die Fluoreszenz durch den im Medium befindlichen Sauerstoff (*Quencher*) absorbiert und ist kaum nachweisbar. Ein im Verlauf der Resistenztestung zu beobachtender Anstieg der Fluoreszenzintensität deutet auf eine Abnahme des Sauerstoffs hin, die wiederum mit dem Wachstum der Mykobakterien korreliert. Die Messung dauert vier bis 13 Tage. Die kritische Konzentration für EMB im Bactec™ MGIT™ 960 beträgt 5 µg/ml.

Molekularbiologische Methoden haben auch Einzug in die Resistenztestung gehalten. Ihr Vorteil ist die Erzielung eines noch schnelleren Ergebnisses. Resistenzverleihende Mutationen können als molekulare Marker verwendet werden, um eine Resistenz

festzustellen. Der Nachweis von Mutationen in den Codons *katG315* oder *rpoB531* ist ein Beispiel für die Verwendung von molekularen Markern. DNA-Fragmente, die von Resistenzverleihenden Genen stammen und eine Mutation tragen, können als Sonde auf Teststreifen eingesetzt werden (Aragón *et al.*, 2006; Hillemann *et al.*, 2005; Saribas *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005).

2.2 Resistenzmechanismen bei *M. tuberculosis*

2.2.1 Natürliche und transiente Resistenz

Mykobakterien weisen aufgrund ihrer morphologischen Beschaffenheit und biochemischen Fähigkeiten eine natürliche Resistenz gegenüber Antibiotika auf. Der besondere Aufbau der mykobakteriellen Zellwand ist ein Beispiel für natürliche Resistenz. Wie bereits in Kapitel 2.1.3 erwähnt, stellt die Zellwand eine effektive Permeabilitätsbarriere dar und bietet Mykobakterien Schutz vor verschiedenen äußeren Einflüssen, u. a. auch vor hydrophilen Antibiotika (David, 1981; Jarlier und Nikaido, 1990). Mykobakterien produzieren außerdem Hydrolasen und bestimmte Enzyme, die ein Chemotherapeutikum so modifizieren, dass es nicht mehr toxisch für den Keim ist. Beispiele hierfür sind β -Lactamasen oder Aminoglykosid-Acetyltransferasen (Cole *et al.*, 1998; Kwon *et al.*, 1995). Des Weiteren wurden ABC-Transporter beschrieben, die als Efflux-System ebenfalls eine Resistenz verleihen können (Cole *et al.*, 1998).

Mykobakterien können aber auch zeitweilig einen resistenten Phänotyp annehmen, wenn sie in bestimmte physiologische oder metabolische Phasen eintreten. Bakterien, die sich in der stationären Wachstumsphase befinden, sind vorübergehend resistent gegenüber gewissen Antibiotika (Zhang und Telenti, 2000). Ebenso können persistierende Mykobakterien, die im Granulom als Reaktion auf die Immunabwehr des Wirts in einen dormanten Zustand übergehen, einen resistenten Phänotyp zeigen (Wayne und Sohaskey, 2001; Zhang *et al.*, 2005). Die Mykobakterien sind wieder sensibel, sobald sie aktiv wachsen.

Eine intrinsische Resistenz kann auch vorliegen, wenn Spezies-spezifische Polymorphismen in einem für ein *Target* codierenden Gen vorhanden sind. *M. bovis* weist beispielsweise eine natürliche Resistenz gegen PZA auf, die auf einer Punktmutation in dem *pncA* Gen beruht (Konno *et al.*, 1967; Scorpio und Zhang, 1996). Dieses Gen codiert für die Pyrazinamidase, die für die Umwandlung von PZA in seine aktive Form verantwortlich ist und dadurch erst die Wirksamkeit von PZA ermöglicht (Scorpio *et al.*, 1997).

2.2.2 Erworbene Resistenz durch chromosomale Mutationen

In *M. tuberculosis* wurden keine resistenzverleihenden Plasmide oder Transposons identifiziert (Martin *et al.*, 1990a; Martin *et al.*, 1990b). Erworbene (sekundäre) Resistenzen basieren ausschließlich auf chromosomalen Mutationen (Heym *et al.*, 1994).

In den letzten Jahren wurde ein erheblicher Fortschritt im Verständnis der molekularen Resistenzmechanismen von *M. tuberculosis* erzielt. Für alle fünf Erstrangmedikamente und zum Teil auch für einige Zweitstrangmedikamente konnten Resistenz-assoziierte Gene bestimmt werden. Tabelle 2-2 gibt eine kurze Übersicht über bisherige Erkenntnisse anhand ausgewählter Beispiele.

Tab. 2-2. Resistenzmechanismen bei *M. tuberculosis*

Antibiotikum	Resistenz-assoziiertes Gen (Genprodukt)	Funktion/Bedeutung	Häufigkeit (%) der Mutationen
INH	<i>katG</i> (Katalase-Peroxidase)	Umwandlung des inaktiven INH in reaktive Radikale	20-80
	<i>inhA</i> (Enoyl-ACP-Reduktase)	Target	15-43
	<i>ahpC</i> (Alkyl-Hydroperoxidase)	Resistenzmarker	10-15
RMP	<i>rpoB</i> (RNA-Polymerase)	Target	96
PZA	<i>pncA</i> (Pyrazinamidase)	Umwandlung des inaktiven PZA in reaktive azide Form	72-97
EMB	<i>embCAB</i> (Arabinosyltransferasen)	Target	47-65
SM	<i>rpsL</i> (ribosomales Protein S12)	Target	52-59
	<i>rrs</i> (16 S rRNA)	Target	8-21
AM/KM	<i>rrs</i> (16 S rRNA)	Target	76
FQ	<i>gyrA</i> (DNA-Gyrase Untereinheit A)	Target	75-94
	<i>gyrB</i> (DNA-Gyrase Untereinheit B)	Involviert in Bindung der FQ?	nicht bekannt

(Quelle: Zhang *et al.*, 2005)

Die Mutationen treten spontan, aufgrund der natürlichen Fehlerrate der DNA-Polymerase während der DNA-Replikation, auf (Riska *et al.*, 2000). Die Mutationsrate für INH beträgt 10^{-5} bis 10^{-7} und für RMP 10^{-9} . Resistenzverleihende Mutationen für SM, EMB, KN und PAS treten ungefähr genauso häufig auf wie für INH. Für Ethionamid, CM, CS und Thiacetazon wird eine Mutationsrate von 10^{-3} angegeben (Musser, 1995; Warren *et al.*, 1997). So können in einer Population aus 10^8 bis 10^9 Zellen, wie sie beispielsweise in Kavernen durchaus erreicht wird, resistente Subpopulationen entstehen (Canetti, 1955; Winder, 1982). Durch eine angemessene Kombinationstherapie werden diese jedoch für gewöhnlich zusammen mit den sensiblen Erregern eliminiert. Bei einer fehlerhaften Therapie oder mangelnder Kompliance des Patienten hingegen werden die resistenten Subpopulationen selektiert, die dann weitere resistenzverleihende Mutationen erwerben können. Der MDR-Phänotyp entsteht ebenfalls durch eine Akkumulation von Mutationen in verschiedenen Genen, die in unterschiedliche Resistenzmechanismen involviert sind (Zhang und Telenti, 2000).

Die Bedeutung von Mutationen in *katG* und *inhA* für die Entwicklung von INH-Resistenz, in *rpoB* für RMP-Resistenz und *pncA* für PZA-Resistenz ist heute unumstritten. Die Rolle von *embCAB* Mutationen in der Resistenzentwicklung gegen EMB war dagegen zu Beginn der vorliegenden Arbeit zweifelhaft und war daher Gegenstand der Untersuchung. Aus diesem Grund wird im Weiteren näher auf die Wirkungsweise von EMB und den bisherigen Kenntnisstand zum Resistenzmechanismus eingegangen.

2.3 Ethambutol

EMB (siehe Abb. 2-5) ist ein spezifisch gegen Mykobakterien wirksames Antibiotikum, das in der Therapie von Tbc eingesetzt wird (Winder, 1982). Mit dem Auftreten von MDR-Stämmen hat das bakteriostatische EMB zunehmend an Bedeutung als Erstrangmedikament gewonnen. Auch in der Kombinationstherapie von atypischen Mykobakterieninfektionen spielt EMB eine wichtige Rolle aufgrund des synergistischen Effekts mit anderen Antituberkulotika (Gevaudan, 1993; Heifets 1982; Heifets 1986; Hoffner 1987; Iseman, 1988; Kallenius, 1989; Rastogi, 1990; Zimmer, 1982).

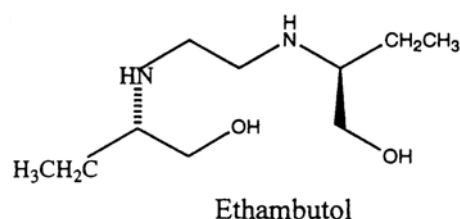


Abb. 2-5. Strukturformel von EMB

(Quelle: Zhang und Telenti, 2000)

2.3.1 Antimykobakterielle Wirkung von EMB und die Funktionen der Proteine EmbA, EmbB und EmbC

Die antimykobakterielle Wirkung von EMB wurde erstmals im Jahre 1961 beschrieben (Karlson, 1961; Thomas *et al.*, 1961; Wilkinson, 1961). Nach weiteren tierexperimentellen Untersuchungen wurde EMB zwei Jahre später bei der Behandlung einer pulmonalen Tbc beim Menschen eingesetzt (Karlson und Carr, 1961; Bobrowitz, 1963).

Forbes *et al.* haben bereits im Jahr 1962 gezeigt, dass EMB nur auf proliferierende Zellen eine inhibierende Wirkung hat (Forbes *et al.*, 1962). In den darauffolgenden Jahren wurden für EMB aufgrund der beobachteten pleomorphen Effekte verschiedene Wirkmechanismen beschrieben: Hemmung der Pentosenukleinsäuresynthese (Gale und McLain, 1963), Inhibierung des Nukleinsäurestoffwechsels (Forbes, 1965) und der Spermidinbiosynthese (Beggs, 1971; Beggs, 1973; Forbes, 1965; Paulin, 1985; Pösö, 1983). Diese für EMB postulierten Wirkmechanismen stellten sich jedoch später als unspezifisch oder als sekundäre Effekte heraus.

Ende der 70er Jahre haben Kilburn und Greenberg bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen beobachtet, dass EMB eine Verformung der Zellen bewirkt (Kilburn und Greenberg, 1977). Die Zellen sahen kürzer und gedrungenener aus im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Außerdem wurde durch Zugabe von EMB ein Auseinanderfallen der Zellaggregate hervorgerufen.

Durch diese Beobachtungen wurde in den anschließenden Jahren die Suche nach dem *Target* von EMB in Richtung Zellwand gelenkt. Bei entsprechenden Analysen wurden folgende Wirkungen von EMB beschrieben: Inhibierung des Transfers von neu gebildeten Mykolsäuren (Takayama *et al.*, 1979) und später dann stattdessen eine Blockade beim Einbau von Mykolsäuren in die Zellwand (Kilburn und Takayama, 1981), Inhibierung des Phospholipidmetabolismus (Kilburn *et al.*, 1981) und inhibierende Wirkung auf den Einbau von Arabinose in Arabinogalaktan (Takayama und Kilburn, 1989). Aufgrund der Feststellung, dass die Zugabe von Arabinose in das Medium einer *M. smegmatis* Kultur die inhibitorische Wirkung von EMB aufhob, vertraten Silve *et al.* die Ansicht, EMB verhindere die Umwandlung von Glukose in Arabinose (Silve *et al.*, 1993). Ein Jahr später wurde diese These jedoch von Wolucka *et al.* widerlegt (Wolucka *et al.*, 1994). Des Weiteren konnten Wolucka *et al.* ein Zwischenprodukt in der Arabinanbiosynthese identifizieren und vermuteten, dass EMB entweder den Transfer von Arabinosylgruppen von diesem Zwischenprodukt auf einen unbekanntem Akzeptor inhibiert oder aber die Synthese dieses Akzeptors selbst.

Deng *et al.* demonstrierten, dass sowohl die Synthese von Arabinan aus Arabinogalaktan als auch aus LAM durch EMB gehemmt wird (Deng *et al.*, 1995). Jedoch war die Hemmung bei der Arabinansynthese aus LAM nicht so stark ausgeprägt wie die bei der von Arabinan aus

Arabinogalaktan. Daher wurde vermutet, dass die Synthese der beiden Arabinantypen entweder zwei voneinander unabhängigen Stoffwechselwegen entspricht und/oder es sind mehrere Enzyme mit unterschiedlicher Sensibilität gegenüber EMB in die Arabinansynthese involviert. Diese Theorie wurde in weiteren experimentellen Untersuchungen bestätigt und der Wirkmechanismus von EMB auf den Polymerisierungsschritt von Arabinose zu Arabinan eingegrenzt (Khoo *et al.*, 1996; Mikušová *et al.*, 1995).

Noch bevor die Genomsequenz von *M. tuberculosis* veröffentlicht wurde, konnten Belanger *et al.* die Gene identifizieren, die wahrscheinlich für das *Target* von EMB codieren (Belanger *et al.*, 1996; Cole *et al.*, 1998). Der experimentelle Nachweis erfolgte jedoch mit genomischer DNA aus einem resistenten *M. avium* Stamm. Die Resistenzverleihende Region konnte auf drei offene Leseraster (ORFs) eingegrenzt werden. Diese wurden als *embR*, *embA* und *embB* bezeichnet.

Das Gen *embR* (384 aa) ist durch eine Promotorregion von den beiden anderen Genen getrennt und die entsprechende Aminosäuresequenz ist bis zu ~33% homolog zu Transkriptionsfaktoren aus *Streptomyces*. Bei den abgeleiteten Aminosäuren der Gene *embA* (1108 aa) und *embB* (1065 aa) wurden in der Datenbank keine übereinstimmenden Sequenzen zu Proteinen aus anderen Bakterien gefunden. EmbA und EmbB sind spezifisch für Mykobakterien und die Homologie zwischen den beiden Proteinen ist dagegen recht hoch. Die Aminosäuresequenzen sind zu 44% identisch und sogar zu 63% ähnlich.

Telenti *et al.* zeigten, dass in *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* und *M. leprae* anstelle von *embR* ein drittes Gen (*embC*) mit hoher Übereinstimmung zu *embAB* vorzufinden ist (Telenti *et al.*, 1997). Die drei Gene sind in einem Operon organisiert, in dem ein 85 bp langer Bereich intercistronischer DNA *embC* von *embA* trennt (siehe Abb.2-6).



Abb. 2-6. Anordnung der Gene im *embCAB* Operon von *M. tuberculosis*

In Abhängigkeit von dem verwendeten Algorithmus der eingesetzten Software lassen sich 10 bis 14 membrandurchspannende Domänen für die EMB-Proteine voraussagen (Berg *et al.*, 2005; Seidel *et al.*, 2007). Der aus ~400 Aminosäuren bestehende globuläre Carboxyl-Terminus befindet sich im Periplasma und der Amino-Terminus liegt im Cytoplasma (siehe Abb. 2-7). Hochkonservierte Sequenzmotive sind hauptsächlich auf der periplasmatischen Seite lokalisiert. So wurde beispielsweise ein Prolin-reiches Motiv in der periplasmatischen

Schleife zwischen der 11. und 12. Transmembrandomäne detektiert, das auch in anderen bakteriellen Polysaccharid-Polymerasen enthalten ist (Becker und Pühler, 1998; Daniels und Morona, 1999; Bastin *et al.*, 1993). In dem Sequenzabschnitt zwischen der dritten und vierten Transmembrandomäne wurde ein für Glykosyltransferasen hochkonserviertes Motiv mit zwei Aspartatresten festgestellt (Liu und Mushegian, 2003; Oriol *et al.*, 2002).

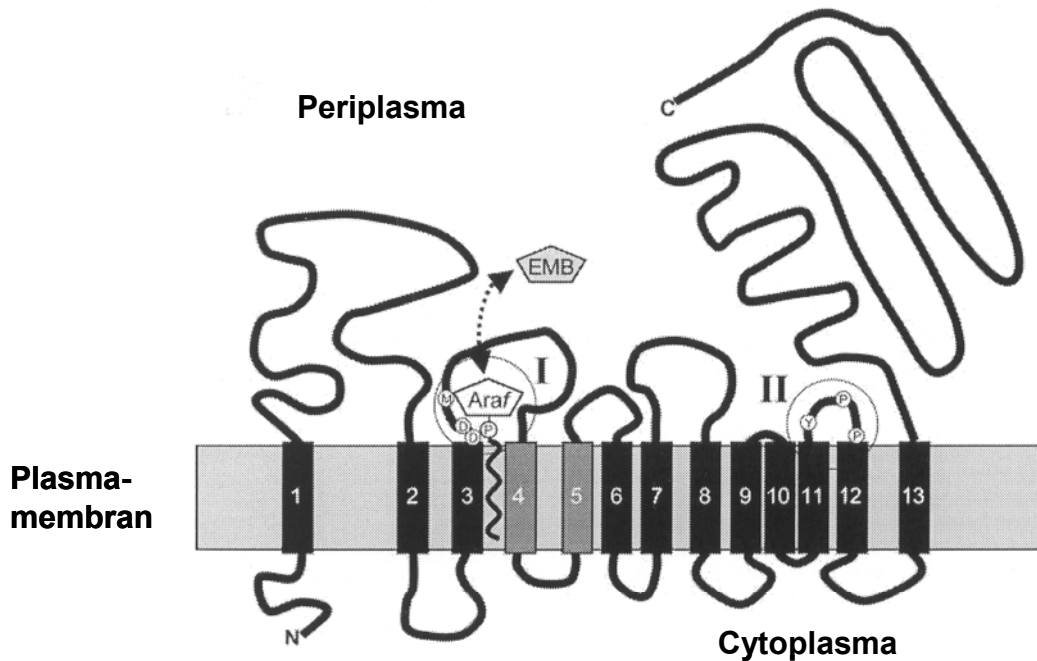


Abb. 2-7. Schematische Darstellung der Proteinstruktur von EmbB (*M. tuberculosis*)

Abgebildet ist die Anordnung der Transmembrandomänen (1-13) sowie des Amino- (N-) und des Carboxyl- (C-) Terminus. Der Angriffspunkt von EMB ist ebenfalls gekennzeichnet. Außerdem sind das in Glykosyltransferasen konservierte GT-C-Motiv (I) mit zwei Aspartatresten und das in Polysaccharid-Polymerasen konservierte Prolin-Motiv (II) markiert.

(Quelle: Berg *et al.*, 2005)

Der N-Terminus der Arabinosyltransferase bindet das zu arabinosylierende Substrat (LM im Fall von LAM und Galaktofuran im Fall von Arabinogalaktan) und der C-Terminus katalysiert die Arabinosylierungsreaktion (Zhang *et al.*, 2003). EmbA und EmbB sind in die Synthese des Hexaarabinosylmotivs von Arabinogalaktan involviert (Escuyer *et al.*, 2001). EmbC hingegen ist für die Arabinansynthese von LAM zuständig (Shi *et al.*, 2006). Bisher wurde nur für EmbA in *M. tuberculosis* eine essentielle Funktion nachgewiesen (Amin *et al.*, 2008). *M. smegmatis* hingegen ist auch mit nicht-funktionstüchtigen *embA*, *embB* oder *embC* zum Wachstum fähig (Escuyer *et al.*, 2001).

2.3.2 Bisherige Erkenntnisse zur Entwicklung von EMB-Resistenz

Die Entdeckung des *embCAB* Operons beruhte auf der Identifizierung des kleinsten noch resistenzverleihenden Fragments, das aus einem Cosmidbank-Klon isoliert wurde. Bei Belanger *et al.* stammte die genomische DNA der Cosmidbank aus einem resistenten *M. avium* Stamm (Belanger *et al.*, 1996). Die Transformation der Gene *embAB* in einen sensiblen *M. smegmatis* Stamm, mit Hilfe eines replizierenden Vektors, bewirkte eine Erhöhung der MHK um das 10-fache. Diese Erhöhung korrelierte in etwa mit der zu erwartenden Kopienzahl des Vektors. Als die Gene hingegen mit einem integrativen Vektor in das Genom eingeführt wurden, resultierte dies in einer Verdoppelung der MHK. Telenti *et al.* verwendeten für ihre Klonierungsexperimente eine genomische Bibliothek mit DNA aus einem *in vitro* selektierten hochresistenten (MHK >256 µg/ml EMB) *M. smegmatis* Klon (Telenti *et al.*, 1997). Die Analyse der DNA-Sequenz ergab, dass sich eine Mutation in dem Codon 303 des *embB* Gens befand. Die Transformation der mutierten DNA in einen sensiblen *M. smegmatis* Stamm mittels eines *multi-copy*-Vektors führte zu einem Anstieg der MHK um das 500-fache. Eine Transformation des *embB* Gens aus dem Wildtyp hatte eine MHK von 20 µg/ml EMB zur Folge, was auf die vielfache Kopienzahl zurückzuführen ist. Dagegen bewirkte das *embB* Gen aus *M. tuberculosis* nur eine Verdoppelung der MHK von 0,5 µg/ml auf 1 µg/ml EMB.

Da für die Generierung des hochresistenten Klons mehrere Passagen auf EMB-haltigem Nährboden notwendig waren, postulierten Telenti *et al.*, die Entwicklung von *high-level* Resistenz sei ein mehrere Schritte (Mutationen) umfassender Prozess. Im ersten Schritt wird durch eine Mutation (beispielsweise im Promotorbereich oder in einem Regulator) eine Erhöhung der Expression der *emb* Gene erreicht, die zu einem geringem Anstieg in der MHK (*low-level* Resistenz) führt. Durch eine weitere Mutation wird im nächsten Schritt entweder die Expression nochmals erhöht oder eine Veränderung der Proteinstruktur erreicht. Dadurch wird der Keim resistenter (*intermediate-level* Resistenz). Bei einem hochresistenten Stamm tritt eine Akkumulation von Mutationen auf.

Die Ergebnisse der Klonierungsexperimente von Telenti *et al.* wurden größtenteils von Lety *et al.* bestätigt (Lety *et al.*, 1997). Des Weiteren wurde beobachtet, dass sich bei seriellen Patientenisolaten mit dem Auftreten einer Mutation in dem *emb* Operon die MHK erhöht (Telenti *et al.*, 1997). Ein weiterer Hinweis darauf, dass Mutationen in *embB* eine Rolle in der Resistenzentwicklung spielen, ist die Detektion von Sequenzunterschieden in den Wildtypen verschiedener mykobakterieller Spezies. So unterscheidet sich beispielweise *M. leprae* in den Codons *embB*303-305 von *M. tuberculosis* (Alcaide *et al.*, 1997). Die abweichenden Sequenzabschnitte sind der Grund für die intrinsische EMB-Resistenz von *M. leprae*.

In den letzten 10 Jahren gab es viele Studien, in denen die Assoziation zwischen resistentem Phänotyp und dem Auftreten von Mutationen im *embCAB* Operon untersucht

wurde. Vermutlich basierend auf den von Telenti *et al.* und von Lety *et al.* veröffentlichten Studien wurde meistens nur das *embB* Gen und da insbesondere die *embB306* Region analysiert. Es wurde gezeigt, dass ungefähr 65% der EMB resistenten klinischen *M. tuberculosis* Isolate eine Mutation in *embB* tragen (Lee *et al.*, 2004; Ramaswamy *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2007; Sreevatsan *et al.*, 1997; Srivistava *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2005). Am häufigsten treten Mutationen in *embB306* auf, die daher auch als molekulare Marker für die Resistenztestung vorgeschlagen wurden (Lee *et al.*, 2002; Mokrousov *et al.*, 2002a; Rinder *et al.*, 2001; van Rie *et al.*, 2001). Dadurch kann innerhalb von ein bis zwei Tagen eine Resistenz nachgewiesen werden, im Vergleich zu ein bis vier Wochen bei den konventionellen Resistenztestungen.

Für das Wildtypcodon *embB306* ATG sind verschiedene Polymorphismen beschrieben worden, die einen Austausch der Aminosäure Methionin zur Folge haben. Methionin wird meistens durch die Aminosäuren Valin (GTG), Isoleucin (ATA, ATC, ATT) oder Leucin (CTG, TTG) ausgetauscht (Ahmad *et al.*, 2007; Isola *et al.*, 2005; Parsons *et al.*, 2005; Tracevska *et al.*, 2004). Ein Austausch von Methionin durch Threonin (ACG) wurde ebenfalls bereits nachgewiesen (Lee *et al.*, 2002).

Weitere häufig von Mutationen betreffende Codons sind das für Glycin codierende *embB406* und das für Glutamin codierende *embB497* (Lee *et al.*, 2004; Ramaswamy *et al.*, 2000; Sekiguchi *et al.*, 2007). Aber auch in den Genen *embA* und *embC* sind Mutationen in resistenten Stämmen gefunden worden (Ramaswamy *et al.*, 2000).

In einigen Publikationen wurde eine Erhöhung der MHK in Abhängigkeit von der auftretenden Mutation festgestellt (Alcaide *et al.*, 1997). Ein Austausch von Methionin zu Valin erhöht die MHK auf ~40 µg/ml EMB und bei einem Austausch durch Leucin oder Isoleucin steigt die MHK auf ~20 µg/ml EMB (Sreevatsan *et al.*, 1997). Diese Korrelation konnte jedoch nicht immer bestätigt werden (Lee *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2007).

Im Gegensatz dazu wurde in den letzten Jahren immer wieder von EMB sensiblen *M. tuberculosis* Stämmen berichtet, bei denen eine Mutation in *embB* detektiert wurde (Mokrousov *et al.*, 2002b; Hazbón *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004; Sekiguchi *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2007). Die beschriebenen EMB sensiblen Stämme, in denen Mutationen in *embB* nachgewiesen wurden, waren alle gegen mindestens eines der Antituberkulotika resistent. Meistens wurden die *embB* Mutationen in EMB sensiblen MDR-Stämmen gefunden. Diese Beobachtungen haben Zweifel an der Bedeutung von *embB306* Mutationen für die Entwicklung von EMB-Resistenz hervorgerufen. Folglich wurde auch die Verwendung von *embB306* Mutationen als molekulare Marker für EMB-Resistenz in Frage gestellt. Bei statistischen Analysen konnte keine Korrelation zwischen *embB306* Mutationen und EMB-Resistenz festgestellt werden (Hazbón *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2007). Das Auftreten von *embB306* Mutationen konnte auch mit keiner anderen spezifischen Monoresistenz in

Verbindung gebracht werden. Stattdessen wurden *embB306* Mutationen mit der Entwicklung einer Mehrfachresistenz assoziiert (Hazbón *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2007). Shen *et al.* schlugen *embB306* Mutationen sogar als Marker für MDR-Tbc vor (Shen *et al.*, 2007). Des Weiteren deuteten Analysen aus der Studie von Hazbón *et al.* daraufhin, dass *embB306* Mutationen einen Marker für die Übertragbarkeit der Tbc-Krankheit darstellen (Hazbón *et al.*, 2005).

Die in bisherigen Studien beschriebene Assoziation zwischen EMB resistentem Phänotyp und *embB306* Mutationen wurde durch die Verwendung nicht angemessener Kontrollgruppen erklärt. In den meisten Studien setzte sich die Kontrollgruppe aus Stämmen zusammen, die gar keine Resistenz aufwiesen. Zusätzlich wäre jedoch noch eine weitere Kontrollgruppe von resistenten (MDR-) Stämmen notwendig gewesen, die einem EMB sensiblen Phänotyp entsprechen.

Die Rolle von *embB306* Mutationen als phylogenetischer Marker wurde ebenfalls diskutiert (Hazbón *et al.*, 2005). Diese Funktion konnte jedoch nicht bestätigt werden.

Somit ist unklar, welche Bedeutung Mutationen im *embCAB* Operon und insbesondere in dem Codon *embB306* tatsächlich für die Entwicklung von EMB-Resistenz haben.

2.4 Fragestellung

Wie bereits unter Kapitel 2.3.2 erläutert, wurde die Rolle von Mutationen in *embCAB* für die Entwicklung von EMB-Resistenz in den letzten Jahren sehr kontrovers diskutiert.

Die Veröffentlichung von Studien, in denen EMB sensible MDR-Stämme mit Mutation in *embB306* beschrieben wurden, wirft ebenso Fragen auf, wie die Beobachtung, dass ungefähr ein Drittel der EMB resistenten klinischen *M. tuberculosis* Isolate keine Mutation in *embB306* besitzen.

Daher ergab sich für die vorliegende Arbeit die zentrale Fragestellung:

- Welche Bedeutung haben Mutationen in *embCAB* für die Entwicklung von EMB-Resistenz in *M. tuberculosis*?

Diese Fragestellung sollte in mehreren Teilprojekten der vorliegenden Arbeit umfassend untersucht werden:

- 1.) DNA-Analyse klinischer *M. tuberculosis* Isolate in der *embB306* Region und ggf. in dem gesamten *embCAB* Operon
 - a) Durchführung einer retrospektiven Studie zur Überprüfung der Assoziation zwischen *embB306* Mutationen und EMB-Resistenz unter Verwendung angemessener Kontrollgruppen (Stämme aus Deutschland)
 - b) Durchführung einer populationsbasierten Studie zur Untersuchung der Spezifität bzw. Sensitivität von *embB306* Mutationen als molekulare Marker für EMB-Resistenz (Stämme aus Usbekistan)
- 2.) Generierung von EMB resistenten Spontanmutanten des Laborstammes *M. tuberculosis* H37Rv durch *in vitro* Selektion (ungerichtete Mutagenese) und anschließende DNA-Analyse des *embCAB* Operons
- 3.) Generierung von *M. tuberculosis* H37Rv Mutanten durch den Transfer einer *embB306* Mutation (gezielte Mutagenese) aus einem EMB resistenten klinischen Isolat
 - a) Untersuchung der EMB-Resistenz *in vitro* mittels MHK-Bestimmung
 - b) Untersuchung *in vivo* unter Verwendung eines Therapiemodells in der Maus

2.5 Publikationen

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

- **Plinke, C., S. Rüscher-Gerdes, and S. Niemann.** 2006. Significance of mutations in *embB* codon 306 for prediction of ethambutol resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1900-1902.
- **Plinke, C., H. Cox, S. Kalon, D. Doshetov, S. Rüscher-Gerdes, Y. Kebede, and S. Niemann.** Significant association between mutations in *embB306* and phenotypic ethambutol resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a high-incidence setting. (Manuskript eingereicht).
- **Plinke, C., K. Walter, S. Ehlers, and S. Niemann.** Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis embB306* confers resistance to Ethambutol *in vitro* and *in vivo*. (Manuskript in Vorbereitung).

Des Weiteren wurden Inhalte dieser Arbeit auf folgenden Tagungen vorgestellt:

- **ESM 2006, 27. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Mykobakteriologie, 9. bis 12. Juli 2006, London.** Can mutations in *embB* codon 306 be used as a marker for prediction for ethambutol resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates? (Vortrag).
- **DGHM 2006, 58. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 1. bis 4. Oktober 2006, Würzburg.** Molecular basis of ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. (Poster).
- **ESM 2008, 29. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Mykobakteriologie, 6. bis 9. Juli 2008, Plovdiv.** Ethambutol resistance *in-vitro* and *in-vivo* conferred by transfer of an *embB306* point mutation in *Mycobacterium tuberculosis*. (Vortrag).
- **DGHM 2008, 60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 21. bis 24. September 2008, Dresden.** Transfer of *embB306* point mutations into *M. tuberculosis* H37Rv confers resistance to Ethambutol *in vitro* and *in vivo*. (Poster).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

Alle *M. tuberculosis* Stämme, die in den Studien zur Untersuchung der Assoziation zwischen Mutationen in der *embB306* Region und phänotypischer Resistenz einbezogen wurden, sind klinische Isolate und werden im Ergebnisteil (4.1 und 4.2) näher beschrieben.

Alle Mykobakterienstämme, die für die Generierung von *M. tuberculosis* H37Rv *embB306* Mutanten verwendet wurden oder daraus hervorgingen, sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 3-1. Für Klonierungsarbeiten verwendete *M. tuberculosis* Stämme und daraus generierte *embB306* Mutanten

Bakterienstamm	Herkunft
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	Referenzstamm
2863/01 (<i>M. tuberculosis</i>)	klinisches Patientenisolat aus Deutschland
7008/01 (<i>M. tuberculosis</i>)	klinisches Patientenisolat aus Deutschland
10225/01 (<i>M. tuberculosis</i>)	klinisches Patientenisolat aus Deutschland
CP10-1-1 (<i>embB306</i> ATA in <i>M. tuberculosis</i>) CP10-1-2 (<i>embB306</i> ATA in <i>M. tuberculosis</i>) CP10-1-3 (<i>embB306</i> ATA in <i>M. tuberculosis</i>) CP10-1-4 (<i>embB306</i> ATA in <i>M. tuberculosis</i>) CP10-1-5 (<i>embB306</i> ATA in <i>M. tuberculosis</i>)	in dieser Arbeit erstellt
CP11-2-1 (<i>embB306</i> GTG in <i>M. tuberculosis</i>) CP11-2-2 (<i>embB306</i> GTG in <i>M. tuberculosis</i>) CP11-2-3 (<i>embB306</i> GTG in <i>M. tuberculosis</i>) CP11-2-4 (<i>embB306</i> GTG in <i>M. tuberculosis</i>)	in dieser Arbeit erstellt
CP12-1-1 (<i>embB306</i> ATC in <i>M. tuberculosis</i>)	in dieser Arbeit erstellt

In der nachfolgenden Tabelle sind alle *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tab. 3-2. Verwendete *E. coli* Stämme und deren Genotyp

Bakterienstamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> HB101	(F ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>hsdS20</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻), <i>supE44</i> , <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> (<i>str</i> ^r), <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i>)	Promega
<i>E. coli</i> XL10-Gold Kan ^R	Tet ^f $\Delta(mcrA)183$ $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ <i>endA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac Hte</i> [F' <i>proAB</i> <i>lac</i> ^f Z Δ M15 Tn10 (Tet ^f) Tn5 Kan ^r Amy]	Stratagene

3.1.2 Mäusestämme

Für das Experiment *in vivo* wurden C57Bl/6-Mäuse weiblichen Geschlechts eingesetzt, die bei Charles River Laboratories (Sülfeld, Deutschland) angefordert wurden. Die Versuchstiere wurden vor Infektion in der Tierhaltung des Forschungszentrums Borstel unter spezifisch-Pathogen-freien Bedingungen und nach Infektion in separat belüfteten mit speziellen Luftfiltern versehenen Käfigen (IVC-Käfige der Firma Ebeco, Castrop-Rauxel, Deutschland) im Labor der Sicherheitsstufe 3 gehalten. Alle Tiere waren frei von bakteriellen, viralen und parasitären Erkrankungen.

Das Tierexperiment wurde vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein unter der Tierversuchsvorhaben-Nummer V742-72241.123-3 (45-6/04) genehmigt.

3.1.3 Vektoren und Plasmide

Alle verwendeten Vektoren und Plasmide sind in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt.

Tab. 3-3. Verwendete Vektoren

Vektor	<i>oriE</i>	<i>oriM</i>	Selektionsmarker	Herkunft
pPCR-Script Amp SK(+)	+	-	Ampicillin	Stratagene
pYUB657	+	-	Ampicillin, Hygromycin, <i>sacB</i>	W. R. Jacobs, Albert Einstein College of Medicine, NY, USA
pMV261.hyg	+	+	Hygromycin	W. R. Jacobs, Albert Einstein College of Medicine, NY, USA

Tab. 3-4. Verwendete Plasmide

Plasmid	<i>oriE</i>	<i>oriM</i>	Selektions- marker	Herkunft
pCP5	+	-	Ampicillin	in dieser Arbeit erstellt
pCP6	+	-	Ampicillin	in dieser Arbeit erstellt
pCP8	+	-	Ampicillin	in dieser Arbeit erstellt
pCP9	+	-	Ampicillin	in dieser Arbeit erstellt
pCP10	+	-	Ampicillin, Hygromycin, <i>sacB</i>	in dieser Arbeit erstellt
pCP11	+	-	Ampicillin, Hygromycin, <i>sacB</i>	in dieser Arbeit erstellt
pCP12	+	-	Ampicillin, Hygromycin, <i>sacB</i>	in dieser Arbeit erstellt

3.1.4 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden mit Hilfe der Software PrimerSelect (Lasergene v.5.07, DNASTar) entworfen und bei Eurogentec bzw. Operon Biotechnologies bestellt.

Tab. 3-5. Verwendete Primer

Primer	T _M °C	Sequenz	Hersteller
embCP1 ^a	55,21	5'-ATA <u>TTA ATT AAT</u> GGG GAT CGG TGG AGC AGT-3'	Eurogentec
embCP2 ^a	55,21	5'-ATA <u>TTA ATT AAC</u> CGC GGT GAA CAG GCA TAG-3'	
embF545	42,24	5'-CGT TCC GGC CTG CAT-3'	Eurogentec
embR887	43,34	5'-ACC TCA CGC GAC AGC A-3'	
embF neu	66,64	5'-TGG ACG GGC GGG GCT CAA T-3'	Operon
embR neu	66,55	5'-GGC AGG CGC ATC CAC AGA CT-3'	
Hyg neu 1	64,52	5'-AGG AAG GTG AAG GCG AGC AGT-3'	Operon
Hyg neu 2	66,47	5'-TGG CCC TAC CTG GTG ATG AGC-3'	
Rv3795anewF	66,47	5'-CTG GGG ATC GGT GGA GCA GTA-3'	Operon
Rv3795anewR	66,64	5'-GCG TCG GTC AGG GTG AAG G-3'	
Rv3795bF	66,64	5'-TGG ACG GGC GGG GCT CAA T-3'	Operon
Rv3795bcR	58,00	5'-GCA AAC AGG GCG AAA AAG A-3'	
Rv3795cF	60,16	5'-TCC TGG CGG CGT TAT TCT T-3'	Operon
Rv3795cS1 ^b	64,50	5'-TGG ACG GCG ATT CGG GTT CT-3'	
Rv3795cS2 ^b	66,64	5'-GGA CTG GGC GGT CGG TTT G-3'	
Rv3795cR	64,48	5'-CAA CCG GGG TGA TGA TGG C-3'	
embIR-F	64,50	5'-CTG GTG GTC GCG GTG ATC AT-3'	Operon
embIR-newR	68,26	5'-ACG GTC GCT GGC AGG GGA AGT T-3'	
embIR-newF	66,47	5'-CGC CTA TGA CCC GAA CCT GAG-3'	Operon
embIR-R	57,62	5'-AAT TGG CGT CCT TGC CTT-3'	
embA1-F ^c	68,60	5'-GTG ACT CGC AGC GGG CTG TG-3'	Operon
embA1-R ^c	68,60	5'-CGG TGA ACA CAG CGA CCC GG-3'	
embA2-F ^c	68,80	5'-TGG ACC GGC TCA GCA GGG G-3'	Operon
embA2-R ^c	66,55	5'-TCA GGT TGG CCT TGG CGG TG-3'	
embC1-F ^c	62,32	5'-CCC AAC CAG CCC AAT GTT C-3'	Operon
embC1-R ^c	64,46	5'-GGC GGT GTC CAG GAT GTG-3'	
embC2-F ^c	62,18	5'-GCT GCA CAT CCT GGA CAC-3'	Operon
embC2-R ^c	60,16	5'-ACG ACA TTG CCA CCG ATA C-3'	
embC3-F ^c	60,16	5'-GTA TCG GTG GCA ATG TCG T-3'	Operon
embC3-R ^c	66,64	5'-CGG GAT GGC GGA CAG TGG T-3'	
embC4-F ^c	66,64	5'-ACC ACT GTC CGC CAT CCC G-3'	Operon
embC4-R ^c	68,60	5'-GAC GAC GGC TGC TAG GCG TG-3'	
embC1-F2	71,99	5'-GAA GCC GCC CCA CCC CGT ATC G-3'	Operon
embC1-R2	71,40	5'-AGC CCA CAG CGC CAG CAG GTC GTA-3'	
embC2-F2	69,69	5'-GCG GGC ATG TTT CTG GCT GTC TGG-3'	Operon
embC2-R2	67,98	5'-CAC GCC GGG TAC TGG GAA ATC ATC-3'	
embC3-F2	72,33	5'-CGC GCC CGG CTG CCC TAC AAC-3'	Operon
embC3-R2	71,99	5'-GCC AGC CCC ACC AGC CAG TCC A-3'	

^a die unterstrichenen Basen entsprechen einer *PacI*-Schnittstelle, ^b nur Sequenzprimer, ^c siehe Ramaswamy *et al.*, 2000

3.1.5 Nährmedien und Zusätze

BBL™ BHI-Medium (1000 ml):

Für einen Liter wurden 38 g BBL™ BHI in Aqua dest. gelöst und autoklaviert.

Difco LB Agar (1000 ml):

Es wurden 35 g Difco LB Agar in 1000 ml Aqua dest. gelöst und autoklaviert.

Difco LB Bouillon (1000 ml):

20 g LB Bouillon-Basis wurden in 1000 ml Aqua dest. gelöst und autoklaviert. (Die LB Bouillon-Basis setzt sich zusammen aus 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl)

Löwenstein-Jensen (1600 ml):

38,5 g Löwenstein-Jensen-Basis wurden erst in 600 ml Aqua dest. gelöst und dann mit 12 ml 87%igen Glycerin verrührt. Die Lösung wurde autoklaviert. Danach wurden 1000 ml Eier (Volleier) dazu gegeben und vermischt. Die Lösung wurde in Glasröhrchen abgefüllt (je 5 ml) und in Schräglage 45 min bei 86°C koaguliert.

Middlebrook 7H10 Agar (1000 ml):

Zunächst wurden 19 g Middlebrook 7H10 Agar in 890 ml Aqua dest. gelöst und autoklaviert. Nachdem der Agar auf ca. 50°C abgekühlt war, wurden 10 ml 50%iges Glycerin (0,5 %) und 100 ml OADC (10%) steril hinzu gegeben und durch Rühren vermischt. Anschließend wurde der Agar in Petrischalen gegossen.

Middlebrook 7H9 Medium (1000 ml):

Es wurden 4,7 g Middlebrook 7H9 in 890 ml Aqua dest. gelöst und anschließend 10 ml 50%iges Glycerin (0,5%) und 2,5 ml 20%iges Tween 80 (0,05%) hinzugefügt. Nachdem alle Bestandteile durch Rühren vermischt wurden, wurde das Medium autoklaviert. Vor Gebrauch wurden entweder OADC oder ADS in einer Endkonzentration von 10% frisch hinzugefügt.

ADS (1000 ml):

Zuerst wurden 8,1 g NaCl und 20 g D-Glukose in 950 ml Aqua dest. gelöst. Danach wurden 50 g Rinderalbumin portionsweise unter Rühren hinzugegeben. Nachdem alle Bestandteile gelöst waren, wurde die Lösung sterilfiltriert.

Antibiotikakonzentrationen:

Die verwendeten Antibiotika und ihre Konzentration in den Stammlösungen sowie die eingesetzten Endkonzentrationen im Medium sind in der nachfolgenden Tabelle angegeben.

Tab. 3-6. Verwendete Antibiotika und deren eingesetzte Konzentrationen

Antibiotikum	Konzentration Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration im Medium [µg/ml]
Ampicillin	100	100,0
Ethambutol	0,150	3,75 (Bactec™ 460TB) 5,0 (Bactec™ MGIT™ 960) 1,0 bzw. 2,0 (Löwenstein-Jensen)
Hygromycin	405	50,0
Isoniazid	0,100	0,25 bzw. 1,0 (Löwenstein-Jensen)

50%ige Glycerin-Lösung (500 ml):

250 ml 100%iges Glycerin wurden mit 250 ml Aqua dest. gemischt und sterilfiltriert.

OADC-Lösung:

Der ergänzende Zusatz für Mykobakterienmedien wurde gebrauchsfertig bei Becton Dickinson (BD) bestellt. Die Zusammensetzung der OADC-Lösung ist in der nachfolgenden Tabelle angegeben.

Tab. 3-7. In OADC enthaltene Substanzen und deren Funktion

Substanz	Menge in g/l	Funktion
Ölsäure	0,1	Stoffwechselfsubstrat
Rinderalbumin	50,0	bindet freie Fettsäuren, die für Mykobakterien toxisch sein können
Dextrose	20,0	Energiequelle
Katalase	0,03	zerstört im Medium potentiell vorkommende toxische Peroxide

20%ige Tween 80 Lösung (50 ml):

10 ml 100%ige Tween 80 Lösung wurden mit 40 ml Aqua dest. unter gleichmäßigem Schwenken oder leichtem Erwärmen gemischt und sterilfiltriert. Die fertige Lösung wurde lichtgeschützt gelagert.

3.1.6 Lösungen und Puffer für *Southern Blot*

0,25 M HCl zum *Blotten* (1000 ml):

Eine 1 M HCl-Stammlösung wurde 1:4 mit Aqua dest. verdünnt.

Waschpuffer 1 zum *Blotten* (2000 ml):

Für 2000 ml Waschpuffer 1 wurden 40 g NaOH-Plätzchen (0,5 M) und 175,31 g NaCl (1,5 M) in Aqua dest. gelöst und auf 2000 ml aufgefüllt.

Waschpuffer 2 zum *Blotten* (2000 ml):

61 g Tris-HCl (0,5 M) und 350,6 g NaCl (3 M) wurden in Aqua dest. gelöst und auf 2000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert betrug 7,5.

20× SSC zum *Blotten* (2000 ml):

Es wurden 350,6 g NaCl (3 M) und 176,4 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (0,3 M) in Aqua dest. gelöst und auf 2000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert war 7,0.

2× SSC zum *Blotten* (2000 ml):

Die 2× SSC-Lösung wurde durch eine 1:10 Verdünnung der 20× SSC-Lösung mit Aqua dest. gewonnen.

Hybridisierungspuffer zum Hybridisieren:

Der Hybridisierungspuffer wurde gebrauchsfertig bei Roche bestellt (DIG Easy Hyb, siehe Anhang).

2× SSC/0,1% SDS für *Blot*-Entwicklung (1000 ml):

100 ml 20× SSC und 10 ml 10% SDS-Lösung wurden miteinander vermischt und mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

0,5× SSC/0,1% SDS für *Blot*-Entwicklung (1000 ml):

25 ml 20× SSC und 10 ml 10% SDS-Lösung wurden miteinander vermischt und mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

Waschpuffer 1 für *Blot*-Entwicklung:

Der Waschpuffer 1 wurde gebrauchsfertig bei Roche bestellt (DIG Wash und Block Buffer Set, Reagent 1, siehe Anhang).

Blocking Solution für *Blot*-Entwicklung:

Für einen Blot wurden 25 ml Maleinsäure-Puffer (Reagent 2) mit 5 ml 10× Blocking Solution (Reagent 3) vermischt. Beide Lösungen wurden gebrauchsfertig bei Roche bestellt (DIG Wash und Block Buffer Set, siehe Anhang).

20× Sekundärer Waschpuffer für *Blot*-Entwicklung (2000 ml):

Die 20-fache Stammlösung wurde aus 242 g Tris-Base (1 M) und 224 g NaCl (2 M) durch Auffüllen mit Aqua dest. auf 2000 ml hergestellt. Der pH-Wert betrug 10. Der sekundäre Waschpuffer wurde in einer 1:20 Verdünnung (Aqua dest.) verwendet.

3.1.7 Weitere Lösungen und Puffer für molekularbiologische Methoden

CTAB-Lösung für genomische DNA-Isolierung aus Mykobakterien (100 ml):

Es wurden 4,1 g NaCl in 90 ml Aqua dest. gelöst. Unter Rühren wurden 10 g Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) hinzugefügt und zur besseren Lösung auf 65°C erwärmt. Nachdem alle Bestandteile gelöst waren, wurde die Lösung auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde nicht autoklaviert oder sterilfiltriert.

0,5 M EDTA-Lösung (1000 ml):

186,12 g EDTA-Na₂-Dihydrat wurden in Aqua dest. gelöst und auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde mit NaOH auf pH 8 eingestellt.

10%ige Glycerin-Lösung für Transformation in langsamwachsende Mykobakterien (300 ml):

30 ml 100%iges Glycerin wurden mit 270 ml Aqua dest. verrührt und autoklaviert.

1 M HCl-Lösung (1000 ml):

Eine 1 M HCl-Stammlösung wurde aus 85,5 ml 37%ige HCl verdünnt mit 914,5 ml Aqua dest. hergestellt.

0,5% HCl/Ethanol-Lösung zum Entfärben bei der Ziehl-Neelsen-Färbung (1000 ml)

13,88 ml einer 36%igen rauchenden HCl-Lösung wurden mit 70%igen Ethanol auf 1000 ml aufgefüllt.

5 M NaCl-Lösung (100 ml):

29,22 g NaCl wurden in 100 ml Aqua dest. gelöst und autoklaviert.

Schwerepuffer zum Beschweren von DNA beim Auftragen auf ein Agarosegel:

Der Schwerepuffer setzte sich aus 50% (v/v) Glycerin, 0,05% (w/v) Bromphenolblau und 1 mM EDTA zusammen.

10%ige SDS-Lösung (1000 ml):

Für eine 10%ige SDS-Lösung wurden 100 g SDS in Aqua dest. gelöst und auf 1000 ml aufgefüllt.

50× TAE-Puffer für Agarosegelelektrophorese (2000 ml):

Zu 484 g Tris-Base (40 mM) wurden 80 ml 0,5 M EDTA-Lösung (2 mM) und 1500 ml Aqua dest. hinzugefügt und miteinander verrührt. Mit ca. 114 ml Essigsäure wurde der pH auf 7,5 eingestellt. Anschließend wurde der Puffer auf 2000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

10× TE-Puffer für die Lösung von DNA (1000 ml):

Es wurden 10 ml einer 1 M Tris-HCl-Lösung (pH 7,5; Endkonzentration 10 mM) und 2 ml einer 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0; Endkonzentration 1 mM) mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Für die Lösung von DNA wurde der Puffer 1:10 verdünnt.

Alle weiteren Materialien (Enzyme, Chemikalien, Kits, Verbrauchsmaterialien und Geräte) sowie deren Hersteller und Bestellnummer sind im Anhang aufgeführt.

3.2 Methoden

3.2.1 Mikrobiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Die *E. coli* Stämme wurden je nach Art der weiteren Verwendung in 4-5 ml LB-Medium kultiviert. Die Kultur wurde entweder mit 50 µl einer bei -80°C gelagerten Stammkultur oder einer gepickten Kolonie angeimpft. Bei Bakterienstämmen, die über Plasmide mit Resistenzgenen verfügten, wurde das entsprechende Antibiotikum dem Medium hinzugefügt. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C auf einem Schüttelinkubator bei 180-220 rpm bebrütet.

3.2.1.2 Kultivierung von *M. tuberculosis*

Die Kultivierung von *M. tuberculosis* Stämmen erfolgte in 7H9-Medium, dem OADC oder ADS als Kohlenstoffquelle zugefügt wurde. Kulturen bis zu einem Volumen von 15 ml wurden mit 50 µl einer bei -80°C gelagerten Stammkultur oder einer gepickten Kolonie angeimpft und in Nährmedienflaschen (von Nalgene®) stehend bei 37°C inkubiert. Größere Volumina an Kulturen wurden aus einer Vorkultur oder mit 100-200 µl einer Stammkultur beimpft und in Rollflaschen (von Corning®) bei 37°C gerollert. Die Inkubationszeit betrug je nach gewünschter optischer Dichte ungefähr sieben Tage oder länger.

3.2.1.3 Konservierung und Lagerung von *E. coli* Kulturen

Von allen generierten *E. coli* Stämmen wurde zur Konservierung eine Stammkultur bei -80°C eingefroren. Die Stammkultur wurde aus einer Flüssigkultur, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befand, gewonnen. Die Bakterienzellen wurden für 1 min bei 11000 × g abzentrifugiert und das Pellet anschließend in 1 ml LB-Medium mit einem Zusatz von 15% Glycerol resuspendiert.

3.2.1.4 Konservierung und Lagerung von *M. tuberculosis* Kulturen

Alle gentechnisch veränderten *M. tuberculosis* Stämme wurden als Stammkultur bei -80°C aufbewahrt. Dazu wurde eine Flüssigkultur, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befand, für 1 min bei 11000 × g abzentrifugiert und anschließend in 1 ml 7H9 Medium mit einem Zusatz von 15% Glycerol aufgenommen.

Die klinischen Isolate wurden in 0,85% Kochsalzlösung mit einem Zusatz von 15% Glycerin und bei -20°C gelagert.

3.2.1.5 Bestimmung der Lebendkeimzahl von *M. tuberculosis*

Von jedem Stamm, dessen Lebendkeimzahl bestimmt werden sollte, wurden zwei Verdünnungsreihen angelegt und ausplattiert.

Bevor die Flüssigkultur eines Stammes verdünnt wurde, wurden die Bakterienzellen durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit einer 1 ml-Spritze durch eine 26G-Kanüle (braun) vereinzelt. Anschließend wurde mit je 4,5 ml Braunwasser (versetzt mit 0,05% Tween 80) und je 0,5 ml Suspension eine Verdünnungsreihe in Zehnerschritten bis 10^{-7} hergestellt. Sowohl von der unverdünnten Kultur als auch von den einzelnen Verdünnungsstufen wurden je 100 µl auf 7H10-Platten mit einem Zusatz von 10% Rinderserum ausgestrichen. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Platten in Plastikfolie eingepackt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für drei Wochen. Danach wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt und die Lebendkeimzahl ermittelt (Kolonienzahl \times Verdünnungsfaktor \times 10).

3.2.1.6 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von *M. tuberculosis*

Für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) wurde von jedem zu untersuchenden Stamm sowie von dem Referenzstamm H37Rv eine Suspension als Ausgangsmaterial hergestellt. Dafür wurde Koloniematerial einer ca. drei Wochen alten LJ-Kultur in ein Reagenzglas überführt und zunächst mit einem runden Glasstab an der Wand verrieben. Durch tropfenweise Zugabe einer 0,9%igen Kochsalzlösung mit Zusatz von 0,1% Tween 80 wurde die Suspension auf eine Trübung von McFarland 1 (0,1 ml 1%ige BaCl_2 + 9,9 ml 1%ige H_2SO_4) eingestellt. Die eingestellte Suspension wurde dann mit NaCl-Tween 80-Lösung in Zehnerschritten bis 10^{-4} verdünnt.

Als Wachstumskontrollen dienten antibiotikafreie LJ-Schrägagar-Röhrchen, die mit 0,1 ml einer 10^{-2} - (100% Wachstum) bzw. einer 10^{-4} -Verdünnung (1% Wachstum) beimpft wurden. Von den Nährböden, die EMB bzw. INH einer bestimmten Konzentration enthielten, wurden je zwei Röhrchen mit 0,1 ml der Verdünnungsstufe 10^{-2} beimpft.

Die Kulturen wurden für drei Wochen bei 37°C bebrütet. Danach wurden das Wachstum beurteilt (siehe Tabelle 3-8) und die MHK abgelesen. Die MHK wurde definiert als die Konzentration, bei der das Wachstum zu 100% gehemmt ist.

Tab. 3-8. Bewertung des Wachstums von *M. tuberculosis* Stämmen auf LJ-Röhrchen für die Bestimmung der MHK

Bewertung	Entsprechendes Wachstum
4+	Nährbodenfläche dicht bewachsen
3+	Aufgelockerter Bakterienrasen je nach Dichte
2+	
+	Mehr als 100 Kolonien
(+)	50 bis 100 Kolonien
±	Weniger als 50 Kolonien

(Quelle: DZK zur Bekämpfung der Tuberkulose, 1992)

3.2.1.7 Sterilitätskontrollen von *M. tuberculosis* Kulturen

Von jedem Stamm wurden Sterilitätskontrollen durchgeführt, bevor er als Stammkultur eingefroren oder in einem Experiment verwendet wurde.

Für die Sterilitätskontrollen wurden je 0,1 ml des jeweiligen Stammes für die Beimpfung von LB- und BHI-Medium sowie von Blutagar verwendet. Die Inkubation der Kontrollen bei 37°C betrug mindestens drei Tage. Zusätzlich wurde ein Ziehl-Neelsen Präparat angefertigt (siehe 3.2.1.8).

3.2.1.8 Ziehl-Neelsen-Färbung

Die Anfertigung eines Ziehl-Neelsen Präparates diene sowohl zum Nachweis von Mykobakterien als auch zur Kontrolle, ob eine Kontamination in der Kultur vorhanden war.

Das Präparat wurde aus ca. 30 µl einer Flüssigkultur angefertigt, die auf einem Objektträger ausgestrichen wurden. Der Objektträger mit der ausgestrichenen Kultur wurde unter der Werkbank zum Trocknen liegen gelassen. Danach wurde die eingetrocknete Kultur hitzefixiert, indem der Objektträger mehrmals durch eine Bunsenbrennerflamme gezogen wurde.

Die Färbung des Präparates erfolgte außerhalb des S3-Labores. Zunächst wurde das Präparat mit Karbolfuchsin (filtriert) bedeckt und erhitzt. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Nach ca. zehn Minuten wurde das Karbolfuchsin von dem abgekühlten Präparat abgossen. Es folgte ein Waschschrift in Aqua dest. und anschließend eine Entfärbung in einer 0,5% HCl/Ethanol-Lösung. Danach wurde das Präparat mit Methyleneblau (1:10) für ca.

eine Minute gegengefärbt. Als letztes wurde ein erneuter Waschschrift in Aqua dest. durchgeführt.

3.2.1.9 *In vitro* Selektion von EMB resistenten Spontanmutanten des Referenzstammes *M. tuberculosis* H37Rv

Für die Generierung von EMB resistenten *M. tuberculosis* H37Rv Klonen *in vitro* wurden Flüssigkulturen in 7H9/OADC mit Zellen aus dem Gefrierstock angeimpft. Im ersten Experiment wurden bei einer OD₅₉₅ von 0,871 je 4 × 200 µl und 1 × 500 µl der Flüssigkultur auf 7H10/OADC mit 2,5 µg/ml und 10 µg/ml EMB überführt. Im zweiten Experiment wurden zwei Flüssigkulturen angeimpft, die bei einer OD₅₉₅ von 0,895 bzw. 0,845 auf 7H10/OADC-Medium mit 2,5 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml EMB überführt wurden. Je EMB-Konzentration wurden fünf Nährböden mit $1,62 \times 10^7$ KBE der einen Kultur und fünf Nährböden mit $1,43 \times 10^7$ KBE der anderen Kultur beimpft. Nach vier Wochen Inkubation bei 37°C wurde die Zahl der auf EMB gewachsenen Kolonien bestimmt.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die angewandte Methode basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse und die so gewonnene Plasmid-DNA wurde für die Untersuchung von Klonen eingesetzt (Birnboim *et al.*, 1979). Die Plasmid-DNA wurde aus 2 × 1,5 ml einer 5 ml Übernachtskultur von *E. coli* isoliert.

Die Zellen wurden für 5 min bei 11000 × g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 150 µl Puffer 1 (QIAGEN®) resuspendiert. Durch Zugabe von 150 µl Puffer 2 (QIAGEN®) wurden die Zellen lysiert. Nach mehrmaligem Schwenken folgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur, in der sowohl die hochmolekulare chromosomale DNA als auch die niedermolekulare Plasmid-DNA denaturiert wurden. Nach Zugabe von 150 µl neutralisierendem Puffer 3 (QIAGEN®) wurde die niedermolekulare Plasmid-DNA renaturiert. Im Anschluss an eine Inkubationszeit von 5 min auf Eis wurden Zelltrümmer und Proteinverunreinigungen für 5 min bei 11000 × g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml absoluten Ethanol vermischt. Die Plasmid-DNA wurde für 15 min bei Raumtemperatur gefällt und anschließend 10 min bei 11000 × g abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und 5 min bei

11000 × g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde getrocknet und in 50 µl Aqua dest. gelöst.

3.2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit NucleoSpin®-Kit

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus bestätigten Klonen, die für weitere Klonierungsschritte bzw. Transformationen verwendet wurde und daher möglichst frei von Verunreinigungen sein sollte, erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin®-Kits (Macherey Nagel). Als Ausgangsmaterial diente eine 5 ml Übernachtskultur von *E. coli*. Die Plasmid-DNA wurde ebenfalls mittels alkalischer Lyse aus den Zellen freigesetzt. Nach Abtrennung von genomischer DNA, Zelltrümmern und Proteinen durch einen Zentrifugationsschritt von 10 min bei 11000 × g wurde der Überstand mit der Plasmid-DNA auf eine Anionenaustauscher-Säule überführt. Die an die Silikatmembran gebundene DNA wurde durch zwei Waschschriffe von unerwünschten Bestandteilen (z. B. Salze) befreit. Anschließend wurden Ethanolreste durch kurze Zentrifugation aus der Säule entfernt. Danach konnte die saubere Plasmid-DNA eluiert werden.

Die genaue Anleitung zur Plasmid-Präparation wurde dem Herstellerprotokoll entnommen.

3.2.2.3 Präparation von genomischer DNA aus *M. tuberculosis*

Genomische DNA aus *M. tuberculosis* Stämmen wurde für *Southern Blot* oder Sequenzanalysen eingesetzt. Die Isolierung genomischer DNA erfolgte aus Zellen, die durch Zentrifugieren einer 5 ml Flüssigkultur oder alternativ durch Überführen mit einer Impföse von einer Festkultur gewonnen wurden.

Die Zellen wurden in 400 µl TE-Puffer aufgenommen. Zur Abtötung wurde die Suspension 20 min bei 80°C inkubiert. Die abgetötete Zellsuspension wurde mit 50 µl Lysozym (10 mg/ml) vermischt und über Nacht bei 37°C inkubiert, um die Zellwand abzubauen. Am nächsten Tag wurde dem Lysat ein Mix aus 70 µl 10% SDS und 5 µl Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) hinzugefügt und nach kurzem Vortexen für 10 min bei 65°C inkubiert. In diesem Inkubationsschritt wurde die DNA von Zellproteinen befreit. Im Anschluss wurden zuerst 100 µl 5 M NaCl und dann 100 µl CTAB-Lösung (vorgewärmt auf 65°C) dem Ansatz zugefügt und vermischt. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 10 min bei 65°C, bei dem Polysaccharide durch das CTAB komplexiert wurden. Durch Zugabe von 750 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) und kurzem Vortexen wurde die DNA extrahiert. Die Phasentrennung erfolgte mittels Zentrifugation für 5 min bei 12000 × g. Die obere wässrige Phase mit der DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 0,6

Volumen (~450 µl) Isopropanol und vorsichtigem Schwenken wurde die DNA für 30 min bei -20°C gefällt. Die gefällte DNA wurde 15 min bei 12000 × g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde die DNA mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und für 5 min bei 12000 × g abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und dann in 80 µl TE-Puffer gelöst.

3.2.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

In der Regel war die Bestimmung der DNA-Konzentration anhand eines Agarosegelbildes ausreichend. Bei DNA, die in Restriktions- oder Ligationsansätzen eingesetzt werden sollte, wurde zusätzlich zu dem Größenstandard noch 5 µl eines Mengenstandards (*Low Molecular Weight DNA Ladder*) auf das Agarosegel aufgetragen.

DNA, die für Transformation in *M. tuberculosis* oder für Genomsequenzierung verwendet werden sollte, musste zusätzlich auf Reinheit überprüft werden. Dazu wurde die DNA mit TE-Puffer 1:40 verdünnt und nach gutem Durchmischen in einem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf) gemessen. Die Messung erfolgte in einer Quarzküvette (Schichtdicke 1 cm) und je DNA wurden drei parallele Messungen durchgeführt. Es wurde die Extinktion bei 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA), bei 280 nm (Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren) und bei 320 nm gemessen. Die DNA-Konzentration c berechnet sich nach folgender Formel:

$$c [\mu\text{g/ml}] = E_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor.}$$

Der Quotient aus E_{260}/E_{280} und die Extinktion bei 320 nm geben Auskunft über die Reinheit der DNA und sollten bestenfalls 1,8 bzw. 0 betragen.

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

Die PCR wurde zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten verwendet, die anschließend sequenziert werden sollte (Saiki *et al.*, 1988). In manchen Fällen diente die PCR auch als Nachweisreaktion für das Vorhandensein von spezifischer DNA.

Der PCR-Ansatz wurde unter einer DNA-freien Werkbank zusammenpipettiert. Die DNA wurde außerhalb der Werkbank dem PCR-Ansatz hinzugefügt. Je nach Konzentration der DNA wurden 1-5 µl eingesetzt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 3-9) gezeigt.

Tab. 3-9. Zusammensetzung eines 25 µl PCR-Ansatzes

Reagenz	Volumen in µl
10× PCR-Puffer (Qiagen)	2,50
25 mM MgCl ₂ (Qiagen)	0,75
20 µM <i>forward</i> Primer	1,25
20 µM <i>reverse</i> Primer	1,25
10 mM dNTP-Mix (Invitrogen)	0,50
[DMSO (Merck)]	1,25]
HotStarTaq [®] DNA-Polymerase (Qiagen)	0,125
H ₂ O (Merck)	X
DNA	1-5

Da alle PCRs mit der HotStarTaq[®] DNA-Polymerase (Qiagen) durchgeführt wurden, war zu Beginn jeden PCR-Programms ein Inkubationsschritt von 15 min bei 95°C zur Aktivierung des Enzyms notwendig (Chou *et al.*, 1992). Die einzelnen PCR-Programme sind im Anhang aufgeführt.

3.2.2.6 PCR mit Platinum[®] Pfx DNA-Polymerase

Die Platinum[®] Pfx DNA-Polymerase (Invitrogen) verfügt über eine 3'→5'-Exonuclease-Aktivität. Diese Korrekturlesefunktion (*proofreading*) führt dazu, dass die Fehlerrate verglichen zu einer herkömmlichen DNA-Polymerase um Faktor 10 geringer ist (Lundberg *et al.*, 1991). Aus diesem Grund wurde dieses Enzym zur Vervielfältigung von DNA verwendet, die für die Klonierung eingesetzt wurde.

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 3-10) ist die Zusammensetzung eines 50 µl Ansatzes angegeben.

Tab. 3-10. Zusammensetzung eines 50 µl PCR-Ansatzes mit Platinum® Pfx DNA-Polymerase (Invitrogen)

Reagenz	Volumen in µl
10× PCR-Puffer (Invitrogen)	5,0
50 mM MgSO ₄ (Invitrogen)	1,0
10 µM <i>forward</i> Primer	1,5
10 µM <i>reverse</i> Primer	1,5
10 mM dNTP-Mix (Invitrogen)	1,5
Platinum® Pfx DNA-Polymerase (Invitrogen)	0,4
H ₂ O (Merck)	34,1
DNA (1:50 verdünnt)	5,0

Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

Aktivierung	94°C	2 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	94°C	15 s	
Annealing	64°C	30 s	
Elongation	68°C	2 min	
Elongation	68°C	10 min	

3.2.2.7 Agarosegelelektrophorese

Alle PCR-Produkte und DNA-Isolierungen wurden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Anhand eines Fotos von einem Agarosegel konnten die Größe und Menge von DNA-Fragmenten bestimmt und Verunreinigungen abgeschätzt werden.

Die Agarosegelelektrophorese wurde für gewöhnlich mit einem 1%igen Agarosegel durchgeführt. Für ein 1%iges Agarosegel wurden 1 g UltraPure™ Agarose (Invitrogen) in 100 ml 1× TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Unter einem Abzug wurden 10 µl einer 1%igen Ethidiumbromid-Lösung (Merck) der gelösten Agarose unter Rühren hinzugefügt. Anschließend wurde die gelöste Agarose in eine Gelgießvorrichtung (Biorad) gegossen. Nach einigen Minuten Abkühlung wurde das feste Agarosegel in eine Elektrophoresekammer (Biorad) überführt und die mit Schwerepuffer gemischten DNA-Proben konnten aufgetragen werden. Es wurde immer ein Größenstandard mitgeführt. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 1× TAE-Puffer genommen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von ~120 V für 30-45 min durchgeführt. Danach wurden die angefärbten DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

3.2.2.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten mit dem NucleoSpin® Extract II Kit

Bei präparativen Restriktionsansätzen oder unspezifischen PCRs wurde das gewünschte DNA-Fragment aus dem Agarosegel ausgeschnitten und für die weitere Verwendung mit dem NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey Nagel) aufgereinigt. Auch die Aufreinigung von linearisierten Vektoren oder spezifischen PCR-Produkten erfolgte mit diesem Kit, um störende Salze und Puffer für nachfolgende Arbeitsschritte zu entfernen.

Nach Auftrennung mittels Gelelektrophorese wurde das gewünschte DNA-Fragment mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Gewicht des ausgeschnittenen Gelstücks ermittelt und je 100 mg Agarosegel wurden 200 µl NT-Puffer hinzugefügt. Bei einer Inkubation von 5-10 min bei 50°C wurde die Agarose gelöst. Die Lösung wurde dann auf eine Säule mit einer Silikatmembran transferiert und für 1 min bei 11000 × g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. In einem Waschschrift wurden 600 µl NT3-Puffer auf die Säule gegeben und erneut für 1 min bei 11000 × g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen. Um Pufferreste zu entfernen, wurde die Säule erneut für 2 min bei 11000 × g zentrifugiert. Für die Elution der DNA wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß gestellt und mit 15-50 µl NE-Puffer für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die DNA bei einem Zentrifugationsschritt von 1 min bei 11000 × g eluiert.

Bei einer Aufreinigung ohne Ausschneiden aus einem Agarosegel wurde der PCR-Ansatz mit NT-Puffer auf 100 µl aufgefüllt und miteinander vermischt. Die Lösung wurde auf die Säule gegeben und für 1 min bei 11000 × g zentrifugiert. Die darauffolgenden Schritte waren analog zu der Aufreinigung aus einem Gel.

3.2.2.9 Klonierung mit dem PCR-Script™ Amp Cloning Kit

Mit dem PCR-Script™ Amp Cloning Kit (Stratagene) wird eine schnelle und einfache Durchführung eines Klonierungsschritts ermöglicht, bei dem ein PCR-Produkt effizient in einen Vektor eingebaut wird. Die hohe Ausbeute an gewünschten Ligationsprodukten beruht auf dem Vorhandensein des Restriktionsenzym *Srf I* im Ligationsansatz. Religierte Vektormoleküle werden durch das Enzym *Srf I* geschnitten und stehen somit wieder für die Ligation mit dem PCR-Produkt zur Verfügung. Durch den Einbau des PCR-Produktes in den Vektor und somit Verlust der *Srf I*-Schnittstelle verschiebt sich das Gleichgewicht der Reaktionen immer mehr in Richtung Ligation.

Die mitgelieferten XL10-Gold® ultrakompetenten Zellen garantieren eine hohe Transformationseffizienz und anschließende Blau-Weiß-Selektion erleichtert das Auffinden des Klons mit dem gewünschten Ligationsprodukt.

Die Aufreinigung des zu klonierenden PCR-Produktes erfolgte nicht mit dem mitgelieferten StrataPrep[®] PCR Aufreinigungskit, sondern mit dem NucleoSpin[®] Extract II Kit (siehe 3.2.2.8). Da das PCR-Produkt für die Klonierung mit einer Platinum[®] Pfx DNA-Polymerase (von Invitrogen, siehe 3.2.2.6) generiert wurde, war die Bearbeitung der Enden des PCR-Fragments mit der mitgelieferten Pfu DNA-Polymerase nicht notwendig.

Die Ligation wurde nach Protokoll des Herstellers angesetzt:

pPCR Script Amp SK(+) Klonierungsvektor (10 ng/μl)	1 μl
PCR-Script 10× Reaktionspuffer	1 μl
10 mM rATP	0,5 μl
PCR-Produkt	2-4 μl
Restriktionsenzym Srf I (5 u/μl)	1 μl
T4 DNA-Ligase (4 u/μl)	1 μl
Aqua dest.	auffüllen auf 10 μl

Der Ligationsansatz wurde vorsichtig gemischt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Enzyme hitzeinaktiviert (10 min 65°C). Der Ansatz wurde bis zur Transformation auf Eis aufbewahrt.

Die XL10-Gold[®] ultrakompetenten Zellen wurden für die Transformation auf Eis aufgetaut. Durch Schwenken wurden die Zellen durchmischt und für jede Transformation wurden je 40 μl in ein vorgekühltes 15 ml Röhrchen mit rundem Boden (Greiner bio-one) überführt. Zu jedem Röhrchen wurden 1,6 μl β-Mercaptoethanol (Stratagene) hinzugefügt und mit den Zellen vermischt. Die Zellen wurden dann für 10 min auf Eis inkubiert und alle 2 min geschwenkt. Danach wurden je 2 μl je Ligationsansatz bzw. 1 μl 1:10 verdünnte pUC18 Plasmid-DNA (Positivkontrolle) zu den Zellen gegeben. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt auf Eis für 30 min. Anschließend wurde die DNA mittels Hitzeschock in die Zellen transformiert. Dafür wurden die Röhrchen mit den Zellen für 30 s in ein 42°C warmes Wasserbad gehalten. Nach einer Abkühlung von 2 min auf Eis wurden die Zellen in neue Röhrchen mit 450 μl vorgewärmtes LB-Medium überführt und für 1 h bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. In dieser Zeit wurden die LB-Platten (mit 100 μg/ml Ampicillin) mit je 100 μl 2%igen X-Gal und 100 μl 10 mM IPTG präpariert und getrocknet. Je Ligation wurden 100 μl und 200 μl ausplattiert. Für die Positivkontrolle wurden 100 μl LB-Medium auf einer Platte vorgelegt, in die dann 5 μl des transformierten pUC18 Plasmids pipettiert wurden. Als Negativkontrolle dienten Zellen, denen keine DNA für die Hitzeschock-Transformation zugeführt wurde. Von der Negativkontrolle wurden 100 μl ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Für bessere Blau-Weiß-Selektion wurden die Platten anschließend für 2 h bei 4°C aufbewahrt.

3.2.2.10 Restriktion von DNA mit Endonucleasen

Die Restriktion von Plasmid-DNA wurde zur Identifizierung von *E. coli* Klonen angewendet. Auch bei der Überprüfung von *M. tuberculosis* Klonen war eine Spaltung von genomischer DNA notwendig, bevor diese mittels *Southern Blot* analysiert werden konnte. Außerdem wurde für Umklonierungen DNA mittels Restriktion aus einem Vektor ausgeschnitten bzw. Vektor-DNA aufgeschnitten.

In einem Kontroll-Restriktionsansatz wurden 3-5 µl DNA mit 1 u Restriktionsenzym (NEB oder Roche) gespalten. In dem Ansatz befanden sich außerdem 2 µl des entsprechenden 10× Puffers und je nach Enzym noch 2 µl 10× BSA. Der Ansatz wurde mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt und für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert.

3.2.2.11 Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA

Die Dephosphorylierung von linearisierter Vektor-DNA sollte eine Religation des Vektors ohne Integration der einzuführenden Fremd-DNA (*insert*) verhindern. Eine Phosphatase spaltet bei dieser Reaktion am 5'-Ende der DNA eine Phosphatgruppe von der Desoxyribose ab.

Ein Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Aufgereinigte DNA	50 µl
Antarctic Phosphatase von NEB (1 u/µl)	1 µl
10× Antarctic Phosphatase Puffer	6 µl
Aqua dest.	3 µl

Die Inkubation erfolgte für 15 min bei 37°C. Nach einer weiteren Zugabe von 1 µl Enzym zu dem Reaktionsansatz wurde erneut für 15 min bei 37°C inkubiert.

3.2.2.12 Ligation

Bei einer Ligation wurde DNA, die in einem präparativen Restriktionsansatz gewonnen wurde, in linearisierte Vektor-DNA eingebaut. Um die Ausbeute an gewünschtem Ligationsprodukt zu erhöhen, sollten Vektor und einzuführende DNA in einem bestimmten molaren Verhältnis zueinander stehen. Da die Ligation über kohäsive Enden erfolgte, wurden Vektor und einzubauende DNA im Verhältnis 1:3 eingesetzt.

Mit der nachfolgenden Formel wurde berechnet, welche Menge an Fremd-DNA (*insert*) benötigt wurde, wenn von einer bestimmten Menge Vektor ausgegangen wird:

$$\text{Insertmenge [ng]} = \frac{\text{Vektormenge [ng]}}{\text{Faktor}} \times 3 \quad \text{wobei der Faktor} = \frac{\text{Vektorgröße [kb]}}{\text{Insertgröße [kb]}}$$

Die Ligation wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 µl angesetzt und enthielt folgende Komponenten:

T4 DNA-Ligase von NEB (400 u/µl)	1 µl
10× T4 DNA-Ligase Puffer	2 µl
Fremd-DNA (<i>insert</i>)	X µl
Vektor-DNA	Y µl
Aqua dest.	auffüllen auf 20 µl

Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert.

3.2.2.13 Glykogenfällung

Die Glykogenfällung diente zur Aufreinigung und Ankonzentration von ligierter DNA, bevor diese in *E. coli* transformiert wurde (Hengen, 1996).

Der Ligationsansatz wurde kurz abzentrifugiert und dann mit 80 µl Aqua dest. und 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol versetzt. Nach guter Durchmischung wurde der Ansatz für 5 min bei 11000 × g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die untere Phenolphase wurde mit 65 µl Aqua dest. vermischt und erneut für 5 min bei 11000 × g zentrifugiert. Die obere Phase wurde wieder abgenommen und mit dem bereits überführten Überstand vereinigt. Durch Zugabe von 15 µl 5 M NaCl, 2 µl Glykogen (20 mg/ml) und 540 µl absolutem Ethanol wurde die DNA gefällt. Die gefällte DNA wurde 15 min bei 4°C und 11000 × g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 800 µl 70%igen Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 11000 × g wurde der Überstand wieder verworfen. Das Pellet wurde getrocknet und anschließend in 6 µl Aqua dest. gelöst.

3.2.2.14 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden 450 ml LB-Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* HB101 angeimpft und bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde die OD₆₀₀ gemessen. Sobald die Kultur eine OD₆₀₀ von ~0,5 erreicht hat, wurde sie für 15 min auf Eis gestellt. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden

ebenfalls auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen für 20 min bei 4°C und 3000 × g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in eiskaltem Aqua dest. resuspendiert und erneut 20 min bei 4°C und 3000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und der Waschschrift wiederholt. Im dritten Waschschrift wurde eiskaltes 10%iges Glycerol anstelle von Aqua dest. verwendet. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in 3 ml eiskaltem 10%igen Glycerol aufgenommen und in 200 µl Aliquots aufgeteilt. Die Zellen wurden direkt ohne schockfrozen bei -80°C eingefroren.

3.2.2.15 Transformation von DNA mittels Elektroporation in *E. coli*

Die Elektroporation wurde dazu genutzt, die relativ großen pYUB657-Konstrukte in *E. coli* HB101 Zellen einzubringen (Dower *et al.*, 1988).

Die elektrokompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Die Elektroporationsküvetten (Bio-Rad) wurden ebenfalls auf Eis gestellt, um sie vorzukühlen. In einem Reaktionsgefäß wurden je 50 µl Zellen mit der zu transformierenden DNA gemischt. Als Positivkontrolle wurde 1 µl des Ausgangsvektor ohne *Insert* (in diesem Fall pYUB657) verwendet. Von dem Ligationsprodukt, das durch Glykogenfällung aufgereinigt wurde, wurden 2 µl eingesetzt. Zur Überprüfung der Zahl an Religanten dienten 2 µl eines Ligationsansatzes von dephosphorylierter Vektor-DNA ohne *Insert*. Für die Negativkontrolle wurde 1 µl Aqua dest. anstelle von DNA verwendet. Das Gemisch aus DNA und Zellen wurde luftblasenfrei in eine Küvette überführt. Die Elektroporation wurde bei 2,5 kV, 25 µF und 400 Ω durchgeführt. Nach der Transformation wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium überführt und für 1 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Zellen auf LB-Nährböden mit Zusatz des entsprechenden Antibiotikums ausgestrichen. Es wurden je 100 µl der Negativkontrolle, der Religationskontrolle und des Ligationsansatzes ausplattiert. Von dem Ligationsprodukt wurden zusätzlich weitere 200 µl ausgestrichen. Mit LB-Medium wurden von der Positivkontrolle eine 10⁻²-, 10⁻⁴- und 10⁻⁶-Verdünnung hergestellt und davon ebenfalls je 100 µl ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

3.2.2.16 Herstellung elektrokompetenter *M. tuberculosis* Kulturen

In einer Rollflasche wurden 50 ml 7H9/OADC-Medium mit 5 ml einer Vorkultur von *M. tuberculosis* H37Rv angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei 37°C für mehrere Tage gerollert und in regelmäßigen Abständen wurde die OD₅₉₅ gemessen. Bei einer OD₅₉₅ von ~0,5 wurde die Kultur dann auf 100 ml aufgestockt. Wenn die aufgestockte Hauptkultur eine OD₅₉₅ von 0,8-1,0 erreicht hatte, wurden die Zellen 10 min bei 3000 × g abzentrifugiert. Der

Zentrifugationsschritt sowie alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde zunächst in 10 ml 10%igen Glycerol möglichst luftblasenfrei resuspendiert und dann auf 50 ml aufgefüllt. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 1/10 Volumen der Ausgangskultur aufgenommen. Die elektrokompenten Zellen wurden direkt für die Transformation eingesetzt.

3.2.2.17 Transformation von DNA mittels Elektroporation in *M. tuberculosis*

Die Transformation von DNA in *M. tuberculosis* wurde nach einem modifizierten Protokoll von Balasubramanian *et al.* (1996) durchgeführt.

Für eine Transformation wurden in einem Reaktionsgefäß je 400 µl der frisch hergestellten kompetenten Zellen mit 1 µg DNA gemischt. Die mit DNA vermischten Zellen wurden dann in eine Elektroporationsküvette (Bio-Rad) überführt, die zuvor für 5-10 min in einem Wasserbad auf 50°C erwärmt wurde. Die befüllte Küvette wurde erneut für 1 min bei 50°C inkubiert. Unmittelbar danach erfolgte die Elektroporation bei 2,5 kV, 25 µF und 1000 Ω. Die transformierten Zellen wurden anschließend in 3 ml 7H9/OADC-Medium überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kulturen für 10 min und 3000 × g abzentrifugiert. Es wurden 200 µl vom Überstand abgenommen und der Rest verworfen. Das Zellpellet wurde in diesen 200 µl Überstand resuspendiert und komplett auf 7H10/OADC-Nährboden mit Zusatz von 50 µg/ml Hygromycin ausgestrichen. Die Platten wurden zum Schutz vor Austrocknen in Plastiktüten eingepackt und für vier bis sechs Wochen bei 37°C inkubiert.

Als Positivkontrolle diente der pMV261-Vektor (Stover *et al.*, 1991). Der Ausgangsvektor pYUB657 wurde ebenfalls zur Kontrolle transformiert. Für die Negativkontrolle wurde Aqua dest. anstelle von DNA für die Transformation verwendet.

3.2.2.18 Selektion und Überprüfung von primären und sekundären *M. tuberculosis* Rekombinanten

Aufgrund der geringen Transformationseffizienz von *M. tuberculosis* erfolgte der Austausch des Wildtypallels durch das mutierte Allel in zwei Schritten (Pavelka und Jacobs, 1999).

Die Selektion von primären Rekombinanten erfolgte auf Hygromycin (50 µg/ml) enthaltendem Nährboden. Nach einer Inkubationszeit von vier bis sechs Wochen bei 37°C wurden Hygromycin resistente Kolonien in Flüssigmedium überführt und mittels PCR und *Southern Blot* überprüft. Bestätigte Klone wurden in 7H9/OADC ohne Selektionsdruck bis zur stationären Phase kultiviert. Sekundäre Rekombinanten wurden auf 7H10/OADC mit Zusatz

von 2% Saccharose selektiert. Dazu wurde von jedem Klon eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-7} erstellt. Je 100 μl der Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-4} wurden auf Saccharosehaltigen Nährboden ausplattiert. Zur Bestimmung des Titers wurden jeweils 100 μl der Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-7} auf 7H10/OADC ohne Zusatz ausgestrichen. Nach erneuter Inkubation für vier bis sechs Wochen bei 37°C wurden Saccharose resistente Klone zur Überprüfung einmal auf Nährboden mit und einmal ohne Hygromycin überführt. Hygromycin sensitive Klone wurden dann durch PCR, *Southern Blot* und Sequenzierung bestätigt.

3.2.2.19 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde mit einem ABI PRISM™ 3130xl Genetic Analyzer nach einer modifizierten, fluoreszenzbasierten Form des Kettenabbruchverfahrens durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Bei dieser Methode werden der Sequenz-PCR zusätzlich zu den dNTPs in geringen Mengen 2',3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphate zugefügt, die unterschiedlich fluoreszenzmarkiert sind. Sobald ein 2',3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphat in den DNA-Strang eingebaut wird, bricht die Strangsynthese aufgrund der fehlenden Hydroxyl-Gruppe am C3-Atom der Desoxyribose ab. So entstehen verschieden große DNA-Stränge, die sich in ihrer Länge jeweils um nur eine Base unterscheiden. Die Reaktionsprodukte werden mittels der Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Anhand der Fluoreszenzmarkierung, die durch einen Laser detektiert wird, und mit Hilfe der Software 3130xl Genetic Analyzer Data Collection v.3.0 lässt sich die Reihenfolge der Basen bestimmen.

Die zu sequenzierende DNA wurde zunächst mittels Standard-PCR vervielfältigt (siehe 3.2.2.5). Die PCR-Produkte wurden durch Inkubation mit Exonuklease I und alkalischer Phosphatase (ExoSAP-Methode) aufgereinigt.

Aufreinigung von PCR-Produkten mittels ExoSAP

Die enzymatische Aktivität der beiden Enzyme, Exonuklease I aus *E. coli* und Alkalische Phosphatase aus Shrimps, wird sich bei der Aufreinigung von PCR-Ansätzen zunutze gemacht. Exonuklease I greift am 3'-Ende einzelsträngiger DNA an und baut diese ab (Lehmann *et al.*, 1964). Alkalische Phosphatase entfernt Phosphat-Gruppen am 5'-Ende (Sambrook *et al.*, 1989).

Von der Exonuklease I (20 u/ μl) wurde eine 1:20-Verdünnung hergestellt, bevor diese für die Aufreinigung eingesetzt wurde. Für die Verdünnung wurden 5 μl Exonuklease I mit 85 μl TE-Puffer (pH 7.5) und 10 μl Glycerin (ca. 87%) vermischt.

Ein Aufreinigungsansatz setzte sich zusammen aus:

PCR-Produkt	5 μ l
Exonuklease I aus <i>E. coli</i> (1 u/ μ l)	1 μ l
Alkalische Phosphatase aus Shrimps (1 u/ μ l)	1 μ l

Der Ansatz wurde zur Aufreinigung für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend zur Inaktivierung der Enzyme für 15 min auf 80°C erhitzt. Das PCR-Produkt konnte dann für die Sequenz-PCR als *Template* verwendet werden.

Sequenz-PCR

Für die Sequenz-PCR wurden das ABI Prism® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit und der entsprechende Puffer verwendet. Ein Standardansatz enthielt folgende Komponenten:

Aqua dest.	14,0 μ l
Sequenzierungspuffer (ABI)	3,5 μ l
Primer (10 μ M)	0,5 μ l
BigDye® (ABI)	1,0 μ l
DNA	1,0 μ l

Das Programm für die Sequenz-PCR setzte sich aus folgenden Schritten zusammen:

Denaturierung	96°C	15 s	} 25 Zyklen
Annealing/Elongation	60°C	90 s	

Plasmid-DNA, die mit einem Kit über Säulen (siehe 3.2.2.2) isoliert wurde, konnte direkt ohne weitere Aufreinigung als *Template* für die Sequenz-PCR eingesetzt werden. Zur besseren Denaturierung der Plasmid-DNA wurde dem Standardansatz DMSO zugefügt und für 5 min bei 96°C ohne BigDye® vorinkubiert. Nach Zugabe des BigDye® folgte die Sequenz-PCR, die sich aus 25 Zyklen eines Denaturierungsschritts für 30 s bei 96°C und eines Annealing-/Elongationsschritts für 4 min bei 60°C zusammensetzte.

Aufreinigung von Sequenz-PCRs mittels Sephadex

Zur Aufreinigung der Sequenz-PCR wurde die Filtrationsplatte MultiScreen®-HV von Millipore verwendet, die mit Matrices aus illustra™ Sephadex™ G-50 beladen wurde.

Mit Hilfe einer Dosierplatte wurde die benötigte Menge an Sephadex abgemessen und in eine Filtrationsplatte überführt. Zu jedem mit Sephadex befüllten *Well* wurden 300 μ l Aqua

dest. gegeben. Die Platte wurde ca. 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen, um das Sephadex aufquellen zu lassen. Danach wurde die Filtrationsplatte mit einem Fixierahmen auf eine Auffangplatte (96 well plate) gelegt und für 5 min bei 910 RCF zentrifugiert. Die Auffangplatte mit dem abzentrifugierten Aqua dest. wurde verworfen und durch eine neue ersetzt. Die Sequenz-PCRs wurden dann auf das Sephadex überführt und ebenfalls für 5 min bei 910 RCF zentrifugiert.

Für die automatische Kapillarelektrophorese wurden 4 µl der aufgereinigten Sequenz-PCR vermischt mit 15 µl Formamid eingesetzt.

3.2.2.20 Southern Blot

Mit *Southern Blot* Experimenten wurden primäre und sekundäre Rekombinanten (Cointegranen und Mutanten) von *M. tuberculosis* analysiert. Bei dieser Methode wird DNA, die zuvor mit einem Restriktionsenzym gespalten wurde, aus einem Agarosegel auf eine Membran transferiert (Southern, 1974). Nachdem die DNA auf der Membran immobilisiert wurde, kann sie durch Hybridisierung mit einer Sonde untersucht werden.

Herstellung und Markierung einer Hybridisierungssonde

Für die Herstellung der Sonde wurde ein enzymatisches nicht-radioaktives Markierungsverfahren gewählt. Während der Markierungsreaktion wird das an dUTP gebundene Digoxigenin (DIG) durch das Klenow-Enzym eingebaut. Bei der späteren *Blot*-Entwicklung wird die markierte Sonde durch Chemilumineszenz detektierbar gemacht.

Die Sonde wurde aus einem 334 bp großem PCR-Produkt hergestellt, das mit den Primern embF und embR generiert wurde. Nach Abschätzung der DNA-Konzentration anhand eines Agarosegels wurden 4 µl PCR-Produkt mit 12 µl Aqua dest. gemischt. Die DNA wurde für 10 min bei 99°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Für die Markierungsreaktion wurden 4 µl High Prime (Roche) der denaturierten DNA zugefügt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Klenow-Enzyms wurde der Ansatz für 10 min auf 65°C erhitzt. Die fertige Sonde wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Restriktion und Agarosegelelektrophorese

Die zu untersuchende genomische DNA wurde über Nacht bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *PvuII* gespalten (siehe auch 3.2.2.10). Am nächsten Tag wurden die entstandenen DNA-Fragmente auf ein großes Agarosegel (20 cm × 15 cm) aufgetragen und mittels Gelelektrophorese über Nacht bei 30 V aufgetrennt (siehe auch 3.2.2.7). Vor dem

Transfer der DNA auf eine Nylonmembran wurde das Agarosegel zur Kontrolle unter UV-Licht fotografiert.

Transfer von DNA aus einem Agarosegel auf eine Membran (*Blotten*)

Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines Vakuum-*Blotters* (Biometra) auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N +, Amersham Biosciences) transferiert.

Für den *Blot* wurde ein Stück Whatmann-Papier in Größe des Agarosegels zurecht geschnitten, mit Aqua dest. befeuchtet und auf die Blotkammer gelegt. Eine Membran in der gleichen Größe wurde auf dem Whatmann-Papier platziert und ebenfalls befeuchtet. Um die Membran wurde ein Rahmen aus einer undurchlässigen Gummimatte gelegt. Nach einer Inkubation von 4 min unter UV-Licht wurde das Agarosegel möglichst luftblasenfrei auf die Membran überführt. Unter der Membran wurde in der Blotkammer ein Vakuum durch Anlegen eines Unterdrucks (~100 mbar) erzeugt. Der Blotvorgang dauerte insgesamt ca. 2½ h. Während des *Blottens* wurde das Gel mit verschiedenen Lösungen und Puffern nacheinander behandelt.

Zunächst erfolgte eine Behandlung des Gels mit verdünnter Salzsäure (0,25 M HCl) für ca. 30 min. Bei dieser Vorbehandlung wurde die DNA depuriniert und somit die Transfereffizienz erhöht. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von Waschpuffer 1 für ca. 30 min denaturiert. Im nächsten Schritt wurde das Gel zur Neutralisierung mit Waschpuffer 2 überschichtet und erneut für ca. 30 min inkubiert. Zuletzt wurde ca. 1 h mit 20× SSC-Puffer geblottet. Danach wurde die Membran 5 min in 2× SSC-Puffer bei Raumtemperatur geschüttelt. Zur weiteren Immobilisierung der DNA wurde die Membran zwischen zwei Whatmann-Papiere gelegt und für 30 min bei 100°C gebacken. Nach erneuter Inkubation in 2× SSC-Puffer für 5 min wurde die Membran in eine Hybridisierungsröhre überführt.

Hybridisierung

Die Membran wurde zunächst mit 10-15 ml des Hybridisierungspuffers DIG Easy Hyb (Roche) ohne Sonde vorhybridisiert. Die Prähybridisierung wurde bei 42°C für 2½ h durchgeführt. Dieser Schritt diente zur Absättigung freier Bindungsstellen auf der Membran, um unspezifische Bindungen der Sonde zu vermeiden. Für die Hybridisierung wurden 5 µl der DIG-markierten Sonde in 15 ml Hybridisierungspuffer gegeben und für 15 min in einem Wasserbad aufgeköcht. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C.

Blot-Entwicklung und Detektion markierter DNA

Für die *Blot*-Entwicklung wurde das DIG Wash und Block Buffer Set von Roche verwendet. Das Nachweissystem beruht auf Chemilumineszenz. Während der *Blot*-Entwicklung wird ein DIG-spezifischer Antikörper zu der hybridisierten DIG-markierten Sonde gegeben. An dem Antikörper ist das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gebunden. Unter alkalischen Reaktionsbedingungen ist das Enzym AP katalytisch aktiv und setzt ein zugefügtes Substrat zu einem instabilen Zwischenprodukt um. Das Zwischenprodukt zerfällt dann unter Lichtemission zu einem stabilen Endprodukt. Das emittierte Licht kann auf einem Röntgenfilm detektiert werden.

Zur Entfernung nicht gebundener Sonden-DNA wurde der *Blot* nach der Hybridisierung in mehreren Schritten gewaschen. Die Waschschriffe wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur in einer Hybridisierungsröhre durchgeführt. Zuerst wurde der *Blot* zweimal 10 min mit 2× SSC/0,1% SDS gewaschen. Anschließend folgten zwei Waschschriffe für je 20 min bei 70°C in vorgewärmten 0,5× SSC/0,1% SDS. Nach einer 5-minütigen Inkubation in Waschpuffer 1 (mit Aqua dest. 1:10 verdünnte Lösung 1, Roche) wurde der *Blot* für 1 h in *Blocking Solution* (25 ml Lösung 1 + 5 ml Lösung 2, Roche) inkubiert. Dann folgte eine Inkubation für 30 min in *Blocking Solution* versetzt mit 4 µl Anti-DIG-AP (Roche). Danach wurde der *Blot* erneut mit Waschpuffer 1 für zweimal 15 min gewaschen. Zuletzt wurde der *Blot* für 5 min in einer Schale mit sekundären Waschpuffer (pH 10) geschüttelt, um optimale Reaktionsbedingungen für die AP zu schaffen. Als nächstes wurde der *Blot* auf eine Klarsichthülle überführt und von überschüssiger Flüssigkeit befreit. Durch tropfenweise Zugabe von 2,5 ml der Substratlösung CDPstar™ (GE Healthcare) wurde die enzymatische Reaktion gestartet. Nach 2 min Inkubation wurde der *Blot* in einer neuen Folie eingeschweißt. Im Dunkeln wurde ein Röntgenfilm auf den *Blot* gelegt, der bis zur Entwicklung des Films in einer Filmkassette aufbewahrt wurde. Die Expositionszeit richtete sich nach der Signalstärke der Sonde. Die Filmentwicklung wurde automatisch durchgeführt.

3.2.3 Zusammenfassung der einzelnen Klonierungsschriffe zur Generierung einer *M. tuberculosis* H37Rv *embB306* Mutante

Als Ausgangsmaterial diente chromosomale DNA aus EMB resistenten *M. tuberculosis* Stämmen, in denen eine Punktmutation in *embB306* nachgewiesen wurde. Es handelte sich dabei um die Stämme 2863/01 (*embB306* ATC), 7008/01 (*embB306* ATA) und 10225/01 (*embB306* GTG), die 2001 aus in Deutschland lebenden Patienten isoliert wurden.

Um eine möglichst geringe Fehlerrate bei der Vervielfältigung der *embB306* Region zu gewährleisten, wurde die Platinum® *Pfx* DNA-Polymerase für die PCR eingesetzt (siehe

3.2.2.6). Die verwendeten Primer embCP1 und embCP2 binden 122 bp bis 104 bp vor bzw. 1660 bp bis 1642 bp nach dem Startcodon des *embB* Gens und ergeben ein 1782 bp großes PCR-Produkt. Die Position der Primer wurde so ausgewählt, damit die flankierenden Sequenzen über eine ausreichende Länge für eine homologe Rekombination verfügten. Beiden Primern ist am 5'-Ende eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *PacI* angehängt. Das spezifische PCR-Produkt wurde mit Hilfe des NucleoSpin® Extract II Kits (siehe 3.2.2.8) aufgereinigt.

Im nächsten Schritt wurden die jeweiligen PCR-Fragmente in den Vektor pPCR Script Amp SK(+) eingefügt. Ligation und Transformation der DNA in ultrakompetente *E. coli* XL10-Gold® mittels Hitzeschock wurden mit dem PCR-Script™ Amp Cloning Kit nach einem modifizierten Protokoll durchgeführt (siehe 3.2.2.9). Durch die Ligation wurden die 4765 bp großen Konstrukte pCP6 (*embB306* ATC), pCP8 (*embB306* ATA) und pCP9 (*embB306* GTG) generiert (siehe exemplarisch pCP Abb. 3-1, A).

Als nächstes erfolgte eine Umklonierung in den 9917 bp großen pYUB657-Vektor. Für diesen Schritt wurden sowohl der Vektor pYUB657 als auch die Plasmide pCP6, pCP8 und pCP9 mit *PacI* geschnitten (siehe 3.2.2.10). Die 1790 bp großen Fragmente aus den jeweiligen Plasmiden, die dem ursprünglichen PCR-Produkt der *embB306* Region entsprachen, wurden aus einem Agarosegel aufgereinigt und mit dem aufgereinigten, dephosphorylierten 9891 bp großen Vektorfragment ligiert (siehe 3.2.2.11 und 3.2.2.12). Die Ligationsprodukte hatten eine Größe von 11681 bp und wurden pCP10 (*embB306* ATA), pCP11 (*embB306* GTG) und pCP12 (*embB306* ATC) genannt (siehe Abb. 3-1, B). Diese pYUB657-Konstrukte wurden für die Transformation in *M. tuberculosis* H37Rv eingesetzt (siehe 3.2.2.17).

Der pYUB657-Vektor hat keinen mykobakterienspezifischen Replikationsursprung (*oriM*). Ohne Integration ins Genom durch Rekombination würde der Vektor bei der nächsten Zellteilung verloren gehen (*suicidal plasmid*). Der pYUB657-Vektor verfügt aber u. a. über einen positiven und einen negativen Selektionsmarker (Pavelka und Jacobs, 1999). Der positive Selektionsmarker ist eine Hygromycinresistenz-Kassette, die ein *Screening* nach Klonen mit integriertem Vektor auf Hygromycin ermöglicht. Als negativer Selektionsmarker dient das aus *Bacillus subtilis* isolierte *sacB* Gen. Dieses Gen codiert für die Lävansaccharase, die das Disaccharid Saccharose in seine monomeren Bestandteile spaltet. Aus den Spaltprodukten werden dann u. a. Polymere gebildet (sogenannte Lävane), die für Mykobakterien toxisch sind (Pelicic *et al.*, 1996). So lassen sich auf Saccharosehaltigen Nährboden Klone selektieren, die in einem zweiten Rekombinationsschritt den Vektor aus dem Genom wieder verloren haben.

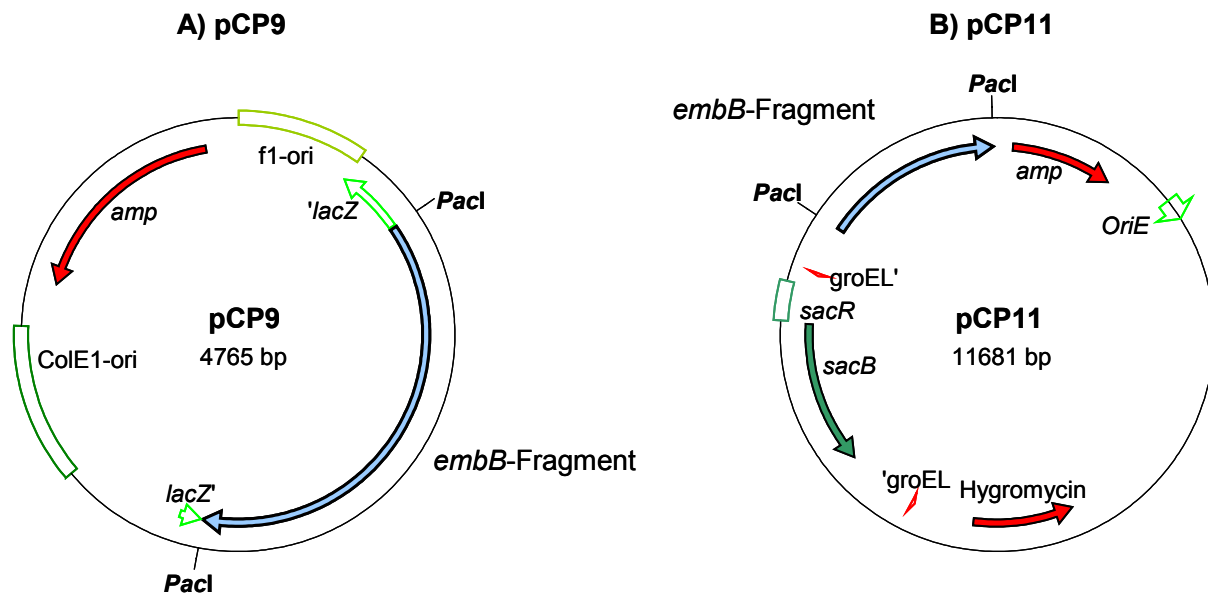


Abb. 3-1. Vektorkarten von Konstrukten, die bei der Klonierung zur Herstellung einer *embB306* H37Rv Mutante verwendet wurden

Abgebildet sind pCP9 als Beispiel für ein pPCR-Script Amp SK(+)-Konstrukt (A) und pCP11 als Beispiel für ein pYUB657-Konstrukt (B).

3.2.4 Tierexperimentelle Arbeiten

Für die Experimente *in vivo* wurden der Wildtyp *M. tuberculosis* H37Rv und die Mutante CP11-2-4 (GTG) in je 50 ml 7H9/OADC bis zu einer OD_{595} von $\sim 0,5$ bei 37°C angezogen. Bei Erreichen der gewünschten OD_{595} wurden die Kulturen in 1 ml Portionen abgefüllt und bei -80°C eingefroren. Nach einer Woche wurden von jedem Stamm zwei Aliquots aufgetaut und die KBE/ml bestimmt.

3.2.4.1 Intravenöse Infektion

Die Versuchstiere wurden mit 200 μ l einer auf 1×10^5 KBE eingestellten Bakteriensuspension infiziert, die in die Schwanzvene injiziert wurde. Die Bakteriensuspension wurde aus der entsprechenden Stammkultur (siehe 3.2.4) durch Verdünnen mit PBS hergestellt. Vor der Verdünnung wurden die Zellen der Stammkultur durch 10-faches Aufziehen und wieder Entlassen durch eine 26G-Kanüle vereinzelt.

Neben den zu untersuchenden Versuchstieren wurden je Keim zusätzlich drei weitere Mäuse infiziert. Ein Tag nach Infektion wurden deren Organe (Lunge und Milz) entnommen, um die Keimlast zur Kontrolle der tatsächlichen Infektionsdosis zu bestimmen.

Die Injektion wurde von Silvia Maaß (FZB, Borstel) durchgeführt.

3.2.4.2 Therapie mit EMB

Zur Therapie der Mäuse wurde das Ethambutol-Dihydrochlorid von Sigma verwendet. Die Dosis des Antibiotikums wurde so kalkuliert, dass jede Maus mit ~25 mg EMB/kg Körpergewicht pro Tag therapiert wurde (Furney *et al.*, 1990). Die Therapie begann einen Tag nach der Infektion und wurde bis zur Beendigung des Experiments (42 Tage) fortgesetzt. Die Verabreichung des EMB erfolgte oral über das Trinkwasser. Dazu wurde das EMB in sterilfiltriertem Wasser gelöst und in 27 bzw. 37 ml Portionen bei -20°C gelagert. Alle 48-72 h wurde das Trinkwasser durch frisches ausgetauscht, um zu gewährleisten, dass das EMB wirksam ist. Die Kontrollgruppen bekamen das gleiche Wasser ohne EMB. Der Trinkwasserverbrauch wurde täglich überprüft.

3.2.4.3 Entnahme und Homogenisierung von Organen aus infizierten Mäusen

Zur Bestimmung der Keimzahl wurde den infizierten Mäusen Lunge und Milz entnommen. Die Organentnahme erfolgte an Tag 1 (siehe 3.2.4.1) und an Tag 42 nach Infektion. Die Mäuse wurden durch Begasung mit Kohlendioxid getötet. Vor der Entnahme wurde das Gewicht der Tiere bestimmt. Unter möglichst sterilen Bedingungen wurde dann die Bauchdecke geöffnet und das Brustbein zur Freilegung der Lunge durchtrennt. Aus der *Vena cava inferior* wurde Blut entnommen, das in Serumseparationsröhrchen von BD überführt und für 10 min bei 6000 × g zentrifugiert wurde. Das Serum wurde bei -80°C für weitere Analysen aufbewahrt. Die zu untersuchenden Organe wurden vollständig entnommen und deren Gesamtgewicht jeweils bestimmt. Ungefähr ein Drittel der Milz wurde für eventuelle spätere histologische Untersuchungen abgetrennt. Das Organstück wurde in Histogrids (Simport) überführt und in 4%igem Formalin fixiert. Mit den Lappen des linken Lungenflügels wurde ebenso verfahren nachdem diese mit 4%igem Formalin aufgespritzt wurden. Das restliche Stück Milz sowie die rechten Lungenflügel wurden gewogen (Bestimmung des Teilgewichts) und anschließend separat in Potterröhrchen gegeben. Die Homogenisierung der Organe wurde mit Hilfe des Homogenisators PotterS (Braun) und sterilen, gekühlten Pistillen (Rettberg) durchgeführt. Die Lunge wurde in einem Volumen von 3 ml und die Milz in 10 ml Aqua B. Braun/0,05% Tween 80 (v/v) homogenisiert.

3.2.4.4 Bestimmung der Keimlast in den Organen infizierter Mäuse

Die Keimzahl in den einzelnen Organen wurde ermittelt, indem 0,5 ml des jeweiligen Homogenats in einer seriellen Verdünnungsreihe (1:10) in Aqua B. Braun/0,05% Tween 80 (v/v) verdünnt und jeweils 100 µl auf 7H10/10% Rinderserum ausplattiert wurden. Nach drei

Wochen Inkubation bei 37°C wurden die KBE ausgezählt. Die Keimlast pro Organ wurde bestimmt, indem die KBE des Teilgewichts auf das Gesamtgewicht bezogen wurde.

3.2.5 Statistik

Die KBE-Werte je Organ (aus den Mausexperimenten) wurden als Zehnerlogarithmus dargestellt. Für die quantifizierbaren Daten wurde mit Hilfe des Computerprogramms GraphPad Prism 4.0 der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung bestimmt. Die statistische Signifikanz beobachteter Unterschiede wurde anhand des Mann-Whitney U-Test (einseitig, Konfidenzintervall 95%) beurteilt. Signifikante Unterschiede wurden durch Sterne gekennzeichnet: * p-Wert < 0,05.

4 Ergebnisse

4.1 Mutationen im *embCAB* Operon von EMB resistenten klinischen *M. tuberculosis* Isolaten aus Deutschland

4.1.1 Vorkommen von *embB306* Mutationen

Die Assoziation zwischen EMB resistentem Phänotyp und dem Auftreten von *embB306* Mutationen wurde in den letzten Jahren sehr kontrovers diskutiert. In einem ersten Schritt dieser Arbeit wurde daher eine Stammkollektion von EMB resistenten *M. tuberculosis* Stämmen auf das Vorhandensein von *embB306* Mutationen überprüft. Bei dieser retrospektiven Studie wurde besonderen Wert auf die Verwendung valider Kontrollgruppen gelegt. Es wurden alle aus dem Jahre 2001 verfügbaren (insgesamt 101) EMB resistenten *M. tuberculosis* Stämme untersucht, die aus in Deutschland lebenden Patienten isoliert und an das Nationale Referenzzentrum für Mykobakterien eingeschickt wurden. Das Resistenzmuster der einzelnen Isolate ist in Tabelle 4-1 erläutert. Als Kontrollgruppen wurden sowohl sensible Stämme (insgesamt 25) als auch EMB sensible MDR-Stämme (insgesamt 33) analysiert. Letztere wurden in früheren Studien meist nicht berücksichtigt, was als Grund für die fragwürdige Assoziation zwischen *embB306* Mutationen und EMB-Resistenz in einigen Publikationen der letzten Jahre genannt wurde.

Von allen Stämmen wurde die chromosomale DNA isoliert und ein 343 bp großes *embB*-DNA-Fragment (Codon 255-369) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend sequenziert.

Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Tabelle 4-1 zusammenfassend dargestellt. Insgesamt hatten 70 (69,3%) von 101 EMB resistenten Stämmen eine Mutation in *embB306*. In sieben (6,9%) weiteren EMB resistenten Isolaten konnten Mutationen detektiert werden, die sich außerhalb des *embB306* Codons befanden. Diese Mutationen waren in den Codons *embB297* (TCG→TTG; n = 1), *embB319* (TAT→TCT; n = 1), *embB328* (GAT→GTG; n = 3), *embB332* (TGG→CTG; n = 1) und *embB334* (TAC→CAC; n = 1) lokalisiert. Die restlichen 24 EMB resistenten Stämme entsprachen in ihrer Sequenz dem Wildtyp. In keinem der 33 EMB sensiblen MDR-Stämme wurde eine Mutation nachgewiesen. Auch die 25 vollständig sensiblen Isolate entsprachen der Wildtypsequenz.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass das Auftreten einer *embB306* Mutation mit einem EMB resistentem Phänotyp assoziiert ist. Eine Assoziation zwischen *embB306* Mutationen und einem MDR-Phänotyp konnte jedoch im Gegensatz zu Ergebnissen jüngster Publikationen nicht festgestellt werden.

Tab. 4-1. Mutationen in der *embB306* Region bei *M. tuberculosis* Stämmen aus Deutschland

Phänotypische Resistenz	Anzahl Stämme insgesamt	WT ATG	Mutationen in <i>embB306</i>					Weitere Mutationen ^a
			GTG	ATA	ATC	ATT	gesamt	
EMB, INH	28	7	14	6		1	21	
EMB, INH, RMP	72	17	29	12	5	2	48	7
EMB	1					1	1	
EMB gesamt	101	24	43	18	5	4	70	7
INH, RMP	33	33						
sensibel	25	25						

^a Mutationen, die sich außerhalb von *embB306* befanden: *embB297* (TCG→TTG; n = 1), *embB319* (TAT→TCT; n = 1), *embB328* (GAT→GTG; n = 3), *embB332* (TGG→CTG; n = 1) und *embB334* (TAC→CAC; n = 1)

4.1.2 Mutationen im gesamten *embCAB* Operon

Die Untersuchung der *embB306* Region ergab, dass 24 der 101 EMB resistenten Stämme keine Mutation in diesem Bereich besaßen. Zur Überprüfung, ob andere bisher nicht detektierte Mutationen in diesen Stämmen vorhanden waren, wurde das gesamte ~10 kb große *embCAB* Operon sequenziert. Ebenso wurde das *embCAB* Operon von je drei EMB sensiblen Beijing- und non-Beijing-Stämmen (Haarlem) untersucht, um zu überprüfen, ob es sich bei detektierten Mutationen tatsächlich um Resistenz-assoziierte Mutationen handelt.

Bei jedem Stamm wurde eine stille Mutation (C→T) an Position 2781 bp in *embC* detektiert. Aus einer Genomsequenzierung des Referenzstammes H37Rv sowie von zwei Beijing-Stämmen ist bekannt, dass an dieser Position ein Fehler in der Referenzsequenz vorliegt (Daten unveröffentlicht). Diese Mutation wird im Folgenden nicht weiter berücksichtigt.

Insgesamt hatten 13 der 24 EMB resistenten Stämme eine stille Mutation (C→T) an Position 228 bp in *embA*. Die drei EMB sensiblen Beijing-Stämme besaßen ebenfalls diesen Einzelbasenpaaraustausch (*single nucleotide polymorphism*, SNP). Unter Zuhilfenahme von IS6110-Fingerprint- und Spoligo-Daten konnte gezeigt werden, dass dieser SNP einen **phylogenetischen Marker** für den Beijing-Genotyp darstellt (siehe Abb. 4-1). Von den 13 resistenten Stämmen hatten sechs zusätzlich eine stille Mutation (A→G) an Position 114 bp in *embA*. In Abbildung 4-1 ist anhand der Fingerprint-Daten zu sehen, dass diese Stämme eine Untergruppe des Beijing-Genotyps bilden.

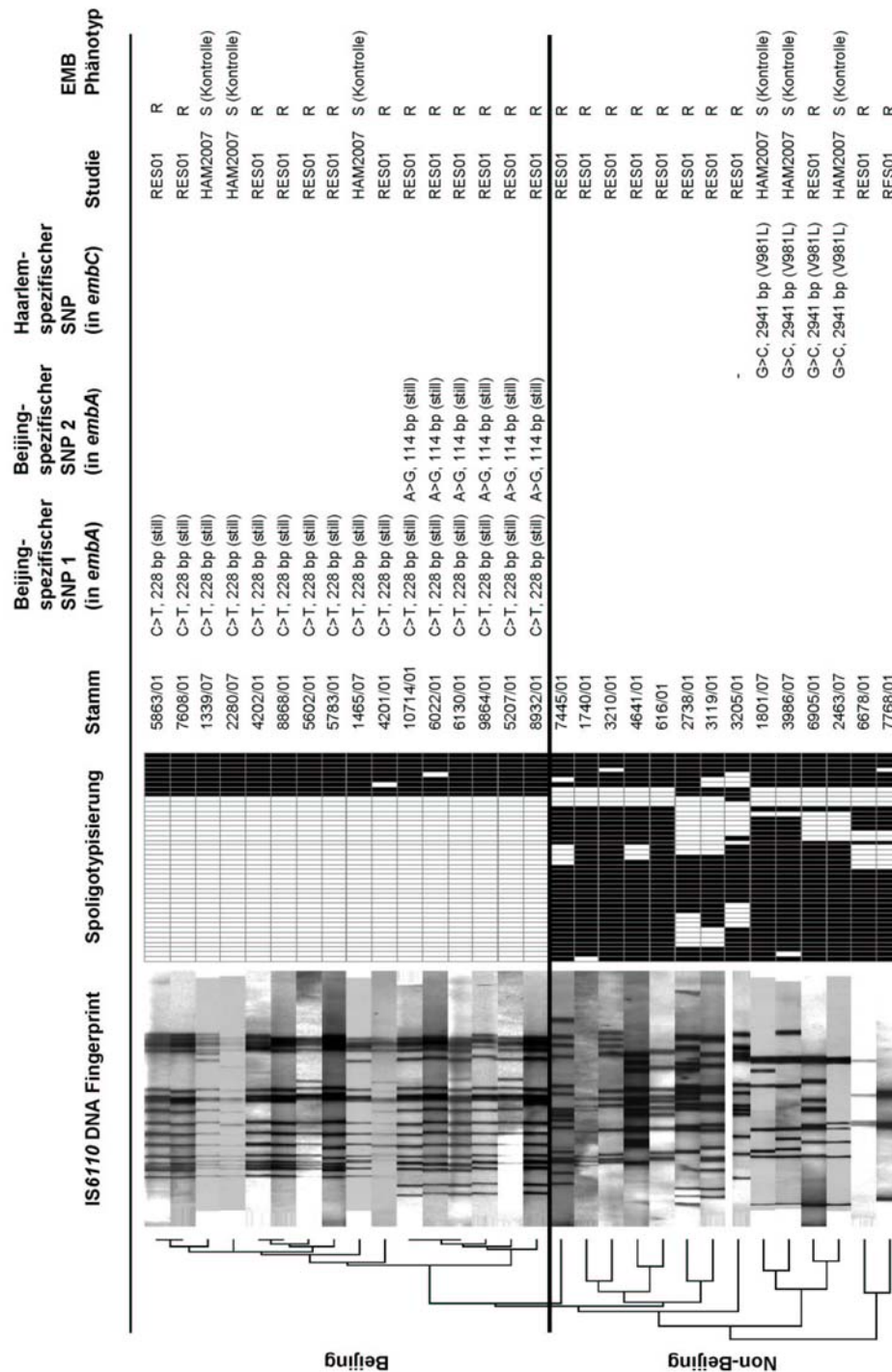


Abb. 4-1. IS6110-DNA-Fingerprint- und Spoligotypisierungsmuster der 24 EMB resistenten und sechs EMB sensiblen *M. tuberculosis* Stämme aus Deutschland, die im gesamten *embCAB* Operon untersucht wurden

Die Stämme sind in einem Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeit der IS6110-Bandenmuster angeordnet. Jeder Stamm, der dem Beijing-Genotyp zugeordnet wurde, besaß eine stille Mutation in *embA* (C→T, 228 bp). Eine aus sechs Stämmen bestehende Untergruppe des Beijing-Genotyps trug eine zusätzliche stille Mutation in *embA* (A→G, 114 bp). In einer Gruppe von vier Stämmen, die dem Haarlem-Genotyp zugeordnet wurde, war eine Mutation in *embC* nachweisbar (G→C, 2941 bp, V981L).

Abkürzungen: RES01 = Stämme aus der Resistenztestung 2001, HAM2007 = Stämme aus der Hamburg-Studie 2007, R = EMB resistent, S = EMB sensibel

In *embC* wurde zusätzlich ein SNP (G→C an Position 2941 bp; Val981Leu) identifiziert, der für Stämme des Haarlem-Genotyps spezifisch ist. Der SNP wurde sowohl in einem EMB resistenten als auch in den drei EMB sensiblen Haarlem-Stämmen nachgewiesen.

Alle weiteren detektierten Mutationen sind ohne Berücksichtigung der als phylogenetische Marker identifizierten SNPs zusammengefasst in der Abbildung 4-2 dargestellt.

Potentiell **Resistenz-assoziierte Mutationen** traten am häufigsten in dem Gen *embB* auf. In 21 von 24 EMB resistenten Isolaten wurde wenigstens eine Mutation gefunden, die in einen Aminosäureaustausch resultiert. Insgesamt wurden 17 verschiedene *missense* Mutationen festgestellt.

Neben *embB306* Mutationen kamen am zweithäufigsten SNPs in *embB497* vor. Bei acht Stämmen wurde der SNP A→G an Position 1490 bp in *embB* detektiert (siehe Abb. 4-2, A; *Hot Spot* 3). Dieser Basenaustausch führt dazu, dass bei der Translation des Codons *embB497* Arginin statt Glutamin gebildet wird. Ein weiterer Stamm hatte in dem Codon *embB497* eine Mutation, die sich jedoch an Position 1489 bp (C→A, Gln497Lys) befand.

Das Codon *embB406* war am dritthäufigsten von *missense* Mutationen betroffen (siehe Abb. 4-2, A; *Hot Spot* 2): drei Stämme mit dem SNP G→A (Position 1217 bp, Gly406Asp), zwei Stämme mit G→C (Position 1217 bp, Gly406Ala) und ein Stamm mit G→A (Position 1216 bp, Gly406Ser).

Des Weiteren wurden noch Mutationen an Position 221 bp (T→G, Leu74Arg), 1133 bp (A→C, Glu378Ala), 1204 bp (C→G, Leu402Val), 1210 bp (C→T, Pro404Ser), 1350 bp (C→G, Ile450Met) und 1360 bp (G→A, Ala454Thr) detektiert. Bei zwei Stämmen wurden in *embB* stille Mutationen nachgewiesen (Position 1995 bp, G→A und Position 2982 bp, C→T). Diese Stämme hatten aber zusätzlich ein bzw. vier weitere Mutationen, die zum Austausch einer Aminosäure führten. In den EMB sensiblen Kontrollstämmen waren keine Mutationen in dem Gen *embB* nachweisbar.

In *embC* wurden bei insgesamt vier von 24 resistenten Stämmen *missense* Mutationen gefunden (siehe Abb. 4-2, B). Bei einem Isolat befand sich der SNP an Position 809 bp (C→T, Thr270Ile). In einem anderen Stamm wurde eine Adeninbase gegen eine Guaninbase an Position 1216 bp des *embC* Gens ausgetauscht, wodurch Valin statt Isoleucin in Codon 406 codiert wird. Zwei weitere Stämme besaßen den SNP G→A an Position 2213 bp (Arg738Gln). Ein Stamm, in dem der für den Haarlem-Genotyp spezifische SNP an Position 2941 bp (G→C, Val981Leu) nachgewiesen wurde, trug zusätzlich noch eine stille Mutation (1239 bp, G→A). Bis auf den für den Haarlem-Genotyp spezifischen SNP wurden keine weiteren Mutationen in den EMB sensiblen Kontrollstämmen festgestellt.

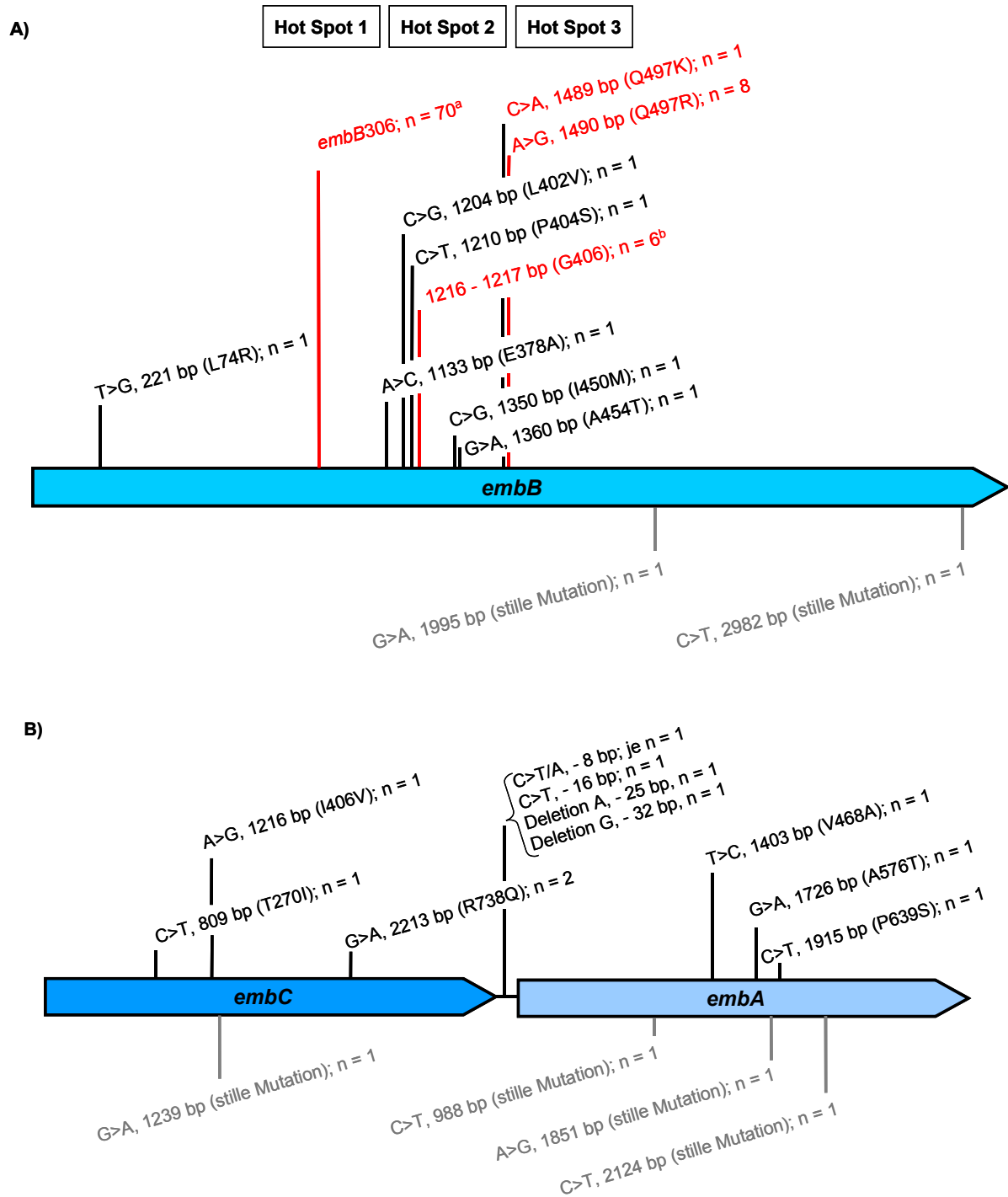


Abb. 4-2. Detektierte Mutationen im *embCAB* Operon bei EMB resistenten Stämmen aus Deutschland

Angegeben sind der Basenaustausch, die Position des SNP und der Aminosäureaustausch (schwarz bzw. rot) bzw. stille Mutationen (grau). Die Anzahl der Stämme, bei denen die jeweilige Mutation nachgewiesen wurde, ist ebenfalls angegeben. Mutationen, die mehrfach auftraten, sind rot markiert und als Hot Spot 1-3 bezeichnet.

^a Die 70 Stämme mit *embB306* Mutationen wurden zusammengefasst als *embB306* in die Abbildung miteinbezogen (siehe Kapitel 4.1.1).

^b an Position 1217 bp G>A (Gly406Asp), n = 3 und G>C (Gly406Ala), n = 2; an Position 1216 bp G>A (Gly406Ser), n = 1.

Insgesamt wurden drei *missense* Mutationen in ***embA*** bei zwei von 24 EMB resistenten Stämmen detektiert (siehe Abb. 4-2, B). Ein Stamm trug den SNP G→A an Position 1726 bp (Ala576Thr). Die beiden anderen *missense* Mutationen traten in einem anderen Isolat auf. Es handelte sich dabei um einen Einzelbasenpaaraustausch an Position 1403 bp (T→C, Val468Ala) und 1915 bp (C→T, Pro639Ser). Dieser Stamm besaß zusätzlich noch eine stille Mutation in *embA* (988 bp, C→T). In zwei weiteren Stämmen wurden ebenfalls stille Mutationen nachgewiesen: an Position 1851 bp (A→G, n = 1) und an Position 2124 bp (C→T, n = 1). Die EMB sensiblen Kontrollstämmen wiesen neben den Beijing-Genotyp spezifischen SNPs keine weiteren Mutationen auf.

In der **intergenischen Region**, die sich zwischen *embC* und *embA* befindet, wurden bei fünf Stämmen Mutationen festgestellt (siehe Abb. 4-2, B). Einer der fünf Stämme besaß keine weitere Mutation. Die Mutation (C→A) befand sich 8 bp vor dem Startcodon des Gens *embA*. Ein weiterer Stamm trug an der gleichen Position eine C→T Mutation. In einem anderen Stamm wurde an Position -16 bp ebenfalls eine C→T Mutation detektiert. Bei zwei Stämmen wurde eine Deletion (Deletion A, -25 bp; Deletion G, -32 bp) in der intergenischen Region nachgewiesen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass 87,5% der EMB resistenten Stämme ohne SNP in *embB306* eine Mutation an einer anderen Stelle in *embCAB* aufwiesen. Am häufigsten wurden Mutationen in *embB* festgestellt, wobei sich die Codons *embB406* und *embB497* als zwei weitere *Hot Spots* neben *embB306* herausstellten. Mutationen in *embC* und *embA* sowie in der dazwischen befindlichen intergenischen Region traten meist nur in Kombination mit Polymorphismen in *embB* auf. Insgesamt gab es nur zwei Stämme, bei denen im gesamten *embCAB* Operon keine Mutation nachweisbar war.

Diese Ergebnisse bestärken die Annahme, dass Mutationen in *embB* in der Entwicklung von EMB-Resistenz involviert sind.

4.2 Mutationen im *embCAB* Operon von EMB resistenten klinischen *M. tuberculosis* Isolaten aus Usbekistan

4.2.1 Vorkommen von *embB306* Mutationen

In einer populationsbasierten Studie wurden klinische *M. tuberculosis* Isolate in der *embB306* Region untersucht, um die Spezifität und Sensitivität von *embB306* Mutationen als molekulare Marker für den Nachweis von EMB-Resistenz zu bestimmen. Es wurden alle verfügbaren Stämme unabhängig von ihrem Resistenzprofil, das zunächst noch unbekannt war, in die Studie einbezogen (siehe auch Cox *et al.*, 2004). Insgesamt wurden 197 klinische *M. tuberculosis* Isolate in der *embB306* Region analysiert. Die Stämme wurden von Patienten aus Usbekistan 2001/2002 isoliert. Usbekistan ist im Gegensatz zu Deutschland ein Land mit hoher Tbc-Inzidenz und hoher Prävalenz resistenter Erreger (Cox *et al.*, 2004; RKI-Bericht, 2003; WHO, 2003).

Für die Analyse wurde die chromosomale DNA isoliert und ein 334 bp großes *embB*-DNA-Fragment amplifiziert (Codon 242-353) Anschließend wurde das PCR-Produkt sequenziert. In der Tabelle 4-2 sind die Ergebnisse der Sequenzierung und die Zuordnung der phänotypischen Resistenz zusammenfassend aufgeführt.

Tab. 4-2. Mutationen in der *embB306* Region bei *M. tuberculosis* Stämmen aus Usbekistan

<i>embB306</i> Locus	EMB resistent	EMB sensibel	Gesamt
ATG (Wildtyp)	10	147	157
<i>embB306</i> Mutationen gesamt	32	8	40
ATA	8	3	11
ATC	4	4	8
CTG	1	–	1
GTG	19	1	20
Gesamt	42	155	197

Unter den insgesamt 197 untersuchten Stämmen zeigten 42 (21,3%) einen EMB resistenten Phänotyp. Von den 42 EMB resistenten Stämmen hatten 32 (76,2%) eine Mutation in *embB306* und zehn entsprachen in dem Codon der Wildtypsequenz ATG. Am häufigsten trat die Mutation A→G in der ersten Base des Codons auf (*embB306* GTG, n = 19). Die Mutationen G→A und G→C in der dritten Base des Codons kamen am zweit- bzw.

dritthäufigsten vor (*embB306* ATA, n = 8; *embB306* ATC, n = 4). Ein Stamm besaß die Mutation *embB306* CTG.

Unter den 155 Isolaten mit EMB sensiblen Phänotyp gab es acht (5,2%) mit einer *embB306* Mutation. Einer dieser diskrepanten Stämme trug eine Mutation in der ersten Base des *embB306* Codons (GTG). Bei den übrigen sieben Stämmen befand sich die Mutation in der dritten Base des Codons (ATA, n = 3 und ATC, n = 4). Von diesen acht phänotypisch EMB sensiblen Stämmen mit *embB306* Mutation waren sechs wenigstens resistent gegen INH und RMP (ATC, n = 2; ATA, n = 3 und GTG, n = 1) und ein Stamm (ATC) wies einen INH, PZA und SM resistenten Phänotyp auf. Ein Stamm mit *embB306* ATA war sensibel.

Mit der Detektion einer *embB306* Mutation in 32 von 42 EMB resistenten Stämmen wurde eine Sensitivität von 76,2% erreicht. Die Spezifität betrug immerhin 95,5%, obwohl auch in acht EMB sensiblen Stämmen eine *embB306* Mutation detektiert wurde.

4.2.2 Charakterisierung der klinischen *M. tuberculosis* Isolate mit diskrepanten Ergebnissen

Bei den acht EMB sensiblen *M. tuberculosis* Isolaten, die eine *embB306* Mutation besaßen, wurde sowohl die phänotypische Resistenztestung für EMB als auch die Sequenzierung der *embB306* Region wiederholt. Zur weiteren Absicherung der Ergebnisse wurde zusätzlich zu der Resistenztestung nach der Proportionsmethode auf Löwenstein-Jensen die Resistenz gegenüber EMB im Bactec™ MGIT™ 960 System überprüft.

Der sensible Phänotyp des einen Stammes (5839/01) wurde in der Wiederholung der Resistenztestung sowohl auf Festnährboden (Löwenstein-Jensen) als auch bei der zusätzlichen Messung im Flüssigmedium (Bactec™ MGIT™ 960) bestätigt. Bei der zweiten Sequenzierung entsprach dieser Stamm jedoch dem Wildtypcodon *embB306* ATG.

Bei den MDR-Stämmen (5573/01, 6519/01, 7426/01, 8092/01, 9546/01, 10564/01) und dem Isolat mit polyresistentem Phänotyp (6072/01) wurden die Mutationen in *embB306* bestätigt. Anders als bei der ersten phänotypischen Resistenzbestimmung wurden diese Stämme nun bei der zweiten Untersuchung als EMB resistent getestet (siehe Tab. 4-3).

Jedoch waren bei drei von diesen Stämmen die Ergebnisse in der konventionellen Resistenzbestimmung nicht eindeutig. Alle drei Stämme wuchsen auf Löwenstein-Jensen mit einer Konzentration von 1 µg/ml EMB. Aber bei der kritischen Konzentration von 2 µg/ml EMB war kein (5573/01 und 10564/01) bzw. geringeres (6072/01) Wachstum im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen feststellbar. Somit wären diese drei Stämme als EMB sensibel eingestuft worden. In der Resistenztestung im Bactec™ MGIT™ 960 System hingegen wurden alle drei Stämme eindeutig als EMB resistent gemessen, wenn auch der

Wachstumsindex (*growth index*, GI) niedriger war als bei den Kontrollen und den anderen EMB resistenten Stämmen.

Die Ergebnisse der zweiten phänotypischen Resistenzbestimmung und der wiederholten DNA-Analyse der *embB306* Region sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst.

Tab. 4-3. Ergebnisse aus der wiederholten Resistenztestung und DNA-Analyse*

Stamm	LJ EMB [1 µg/ml]	LJ EMB [2 µg/ml]	GI im MGIT™ 960 EMB [5 µg/ml]; Ko=400	<i>embB306</i> Codon	Resistenz- muster	Endergebnis EMB
5573/01	Wachstum	0	296	ATC	I, R, S	resistent
5839/01	0	0	0	ATG	–	sensibel
6072/01	Wachstum	schwaches Wachstum	294	ATC	I, P, S	resistent
6519/01	Wachstum	Wachstum	400	ATA	I, R, S	resistent
7426/01	Wachstum	Wachstum	400	ATC	I, P, R, S	resistent
8092/01	Wachstum	Wachstum	400	GTG	I, R, S	resistent
9546/01	Wachstum	Wachstum	383	ATA	I, R, S	resistent
10564/01	Wachstum	0	167	ATA	I, R, S	resistent

* Angegeben sind das Wachstum auf Löwenstein-Jensen mit 1 bzw. 2 µg/ml EMB, der Wachstumsindex GI im MGIT™ 960 (getestet bei einer kritischen EMB Konzentration von 5 µg/ml; die Kontrollen entsprachen alle einem GI von 400), die Sequenz in *embB306*, das allgemeine Resistenzprofil sowie die letztendliche Einstufung bezüglich der EMB Resistenz.

Abkürzungen und Symbole: LJ = Löwenstein-Jensen, 0 = kein Wachstum, GI = Wachstumsindex (*growth index*), Ko = Kontrolle, I = Isoniazid, R = Rifampicin, S = Streptomycin, – = keine Resistenz, P = Pyrazinamid.

Für das Gesamtergebnis ergibt sich somit nach der Wiederholung der phänotypischen Resistenzbestimmung und der DNA-Analyse von den acht Stämmen mit diskrepanten Ergebnissen folgendes Bild: Insgesamt waren von den 197 untersuchten Stämmen 49 phänotypisch EMB resistent. Von diesen 49 EMB resistenten Stämmen trugen 39 eine Mutation in *embB306* (GTG, n = 20; ATA, n = 11; ATC, n = 7 und CTG, n = 1). Unter den EMB sensiblen Stämmen gab es keinen mit *embB306* Mutation. Daraus ergibt sich eine Sensitivität von 79,6% und eine Spezifität von 100%. Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Abbildung 4-3 dargestellt.

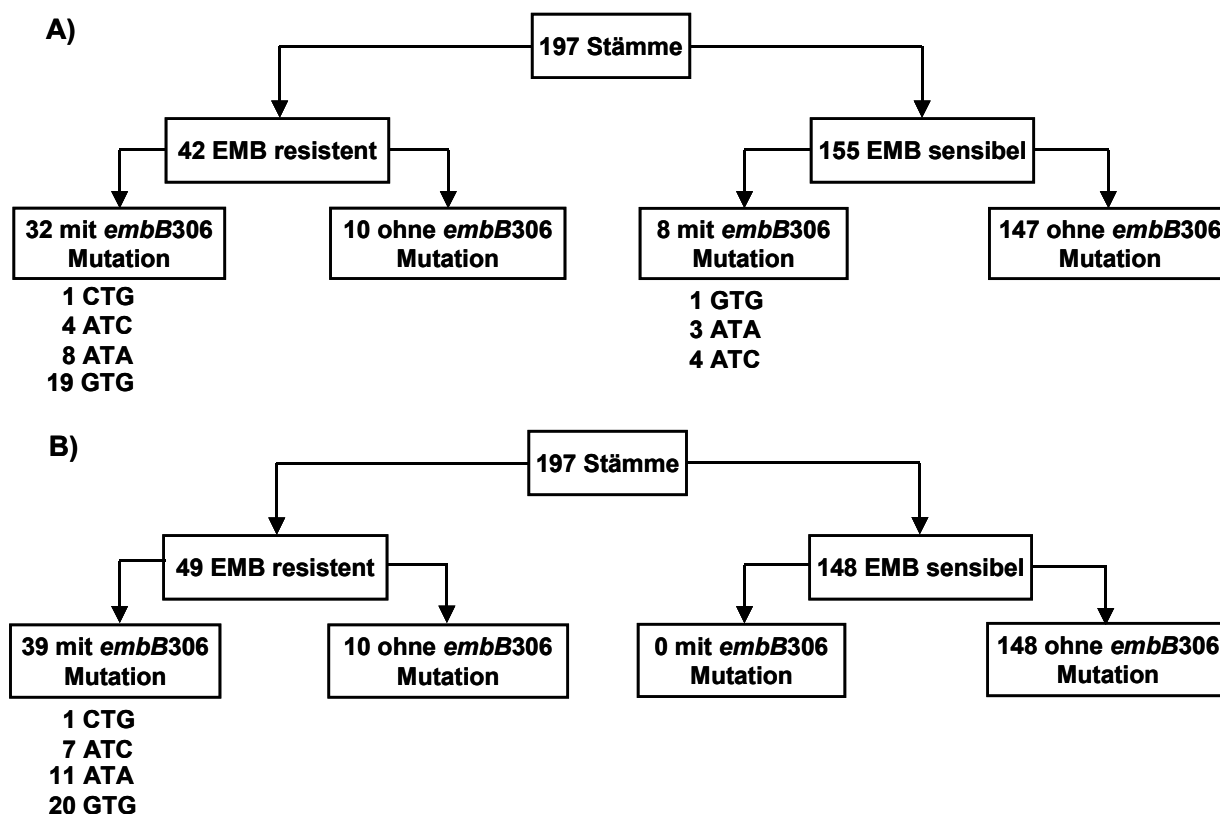


Abb. 4-3. Übersicht über die Ergebnisse der phänotypischen EMB Resistenztestung sowie der DNA-Analyse der *embB306* Region der Stämme aus Usbekistan

A) Ergebnisse aus der ersten Untersuchung und B) Ergebnisse aus der zweiten Untersuchung.

Um eine Erklärung für die diskrepanten Ergebnisse zu finden, wurden die acht ursprünglich als EMB sensibel eingestuft Stämme mit *embB306* Mutation näher charakterisiert. Zum einen wurde die MHK auf Löwenstein-Jensen bestimmt. Zum anderen wurde von jedem dieser Stämme ein Einzelkoloniausstrich angefertigt und aus den erhaltenen Kolonien anschließend DNA isoliert, um die *embB306* Region zu sequenzieren.

Die Bestimmung der MHK erfolgte auf Löwenstein-Jensen (siehe auch 3.2.1.6). Zur Kontrolle wurde die MHK für EMB von einem EMB sensiblen Stamm (10094/01) ohne *embB306* Mutation und von einem EMB resistenten Stamm (1062/01) mit *embB306* Mutation (GTG) bestimmt. Zusätzlich wurde der Laborreferenzstamm H37Rv als Kontrolle mitgeführt.

Der Laborreferenzstamm H37Rv hatte von allen getesteten Stämmen mit 0,5 µg/ml EMB den niedrigsten MHK-Wert (siehe Tab. 4-4). Der EMB sensible Kontrollstamm (10094/01) hatte mit 1 µg/ml EMB die zweitniedrigste MHK. Der Stamm zur Kontrolle für EMB Resistenz (1062/01) zeigte auf allen EMB Konzentrationen Wachstum.

Die klinischen Isolate, die nach der zweiten phänotypischen Resistenztestung als EMB resistent eingestuft wurden, wuchsen alle auf einer höheren EMB-Konzentration als der EMB

sensible Kontrollstamm und H37Rv. Der MDR-Stamm (8092/01) mit der *embB306* GTG Mutation wuchs wie der resistente Kontrollstamm auf allen EMB-Konzentrationen und hatte somit eine MHK von ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ EMB. Wie auch schon in der phänotypischen Resistenzbestimmung zeigte der polyresistente Stamm (6072/01) nur schwaches Wachstum und zwei der MDR-Stämme (5573/01 und 10564/01) gar kein Wachstum auf 2 $\mu\text{g/ml}$ EMB. Bei allen anderen EMB resistenten MDR-Stämmen war deutliches Wachstum auf 2 $\mu\text{g/ml}$ EMB zu verzeichnen.

Der sensible Stamm (5839/01), der bei der Wiederholung der *embB306* Sequenzierung dem Wildtyp entsprach, hatte eine MHK von 1 $\mu\text{g/ml}$ EMB und zeigte auf 0,5 $\mu\text{g/ml}$ EMB deutlich schwächeres Wachstum als der sensible Kontrollstamm (10094/01).

Tab. 4-4. MHK-Bestimmung von *M. tuberculosis* Stämmen mit diskrepanten Ergebnissen*

Stamm	<i>embB306</i>	EMB-Konzentrationen [$\mu\text{g/ml}$]						Ko 10^{-3}	Ko 10^{-5}
		0,125	0,25	0,5	1	2	4		
5573/01	ATC	4+ / 4+	4+ / 4+	4+ / 4+	4+ / 4+	0 / 0	0 / 0	4+ / 4+	+ / +
5839/01	ATG	4+ / 4+	4+ / 4+	\pm / \pm	0 / 0	0 / 0	0 / 0	3+ / 3+	(+) / (+)
6072/01	ATC	3+ / 3+	3+ / 3+	3+ / 3+	3+ / 3+	+ / +	0 / 0	3+ / 3+	(+) / (+)
6519/01	ATA	4+ / 4+	4+ / 4+	4+ / 4+	4+ / 4+	3+ / 3+	0 / 0	4+ / 4+	+ / +
7426/01	ATC	3+ / 3+	3+ / 3+	3+ / 3+	3+ / 3+	3+ / 3+	0 / 0	3+ / 3+	\pm / \pm
8092/01	GTG	3+ / 3+	3+ / 3+	3+ / 3+	3+ / 3+	3+ / 3+	2+ / 2+	3+ / 3+	+ / +
9546/01	ATA	4+ / 4+	4+ / 4+	4+ / 4+	4+ / 4+	3+ / 3+	0 / 0	4+ / 4+	+ / +
10564/01	ATA	3+ / 3+	3+ / 3+	3+ / 3+	2+ / 2+	0 / 0	0 / 0	3+ / 3+	+ / +
H37Rv	ATG	4+ / 4+	3+ / 3+	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	4+ / 4+	\pm / \pm
10094/01 EMB sensibel	ATG	4+ / 4+	4+ / 4+	3+ / 3+	0 / 0	0 / 0	0 / 0	4+ / 4+	2+ / 2+
1062/02 EMB resistent	GTG	2+ / 2+	2+ / 2+	+ / +	+ / +	(+) / (+)	± 1 / ± 1	2+ / 2+	+ / \pm

* Angegeben sind die *embB306* Sequenz (aus der Wiederholung), das Wachstum auf Löwenstein-Jensen mit EMB und das Wachstum auf den Kontrollnährböden ohne EMB [0 = kein Wachstum, \pm = weniger als 50 Kolonien, (+) = 50 bis 100 Kolonien, + = mehr als 100 Kolonien, 2+ und 3+ = aufgelockerter Bakterienrasen je nach Dichte, 4+ = dicht bewachsen].

Abkürzungen: Ko = Kontrolle.

Das Vorliegen einer Mischpopulation aus Zellen mit und ohne *embB306* Mutation könnte ebenfalls zu diskrepanten Ergebnissen bei der Resistenzbestimmung und der DNA-Analyse führen. Je nachdem, welche Subpopulation und zu welchen Anteilen überimpft wird, kann es

bei der Resistenztestung zu einem sensiblen oder resistenten Phänotyp kommen und auch bei der Sequenzierung eine Mutation detektiert oder der Wildtyp nachgewiesen werden.

Um zu überprüfen, ob die ursprünglich diskrepanten Ergebnisse auf Mischpopulationen beruhten, wurden von jedem dieser Stämme Einzelkolonieausstriche angefertigt. Nach Möglichkeit wurde je Stamm aus 50 Kolonien die DNA isoliert. Ein 334 bp großes *embB*-DNA-Fragment (Codon 242-353) wurde amplifiziert und anschließend sequenziert.

Tabelle 4-5 gibt eine Übersicht über das Verhältnis von Wildtypcodon ATG zu mutiertem Codon im *embB306* Locus, das bei den jeweiligen Einzelkolonien der Stämme vorgefunden wurde.

Bei vier von acht untersuchten Stämmen konnte eine Mischpopulation durch die DNA-Analyse der Einzelkolonie-Klone nachgewiesen werden. Es ist auffällig, dass sich darunter zwei Stämme befanden, bei deren Resistenztestung auf Löwenstein-Jensen im Vergleich zu dem Bactec™ MGIT™ 960 System widersprüchliche Ergebnisse festgestellt wurden. Einer dieser beiden Stämme (10564/01) wies eine eindeutige Mischung auf, die sich aus 32% Wildtyp und 68% der Mutante ATA zusammensetzte. Bei dem anderen Stamm (6072/01) wurde immerhin noch bei 6% der untersuchten Klone der Wildtyp anstelle der Mutante ATC vorgefunden.

Tab. 4-5. Verhältnis von Wildtypcodon zu mutiertem Codon im *embB306* Locus bei isolierten Einzelkolonie-Klonen*

Stamm (<i>embB306</i>)	Kolonien insgesamt	<i>embB306</i>		
		Wildtyp ATG	Mutation	Mischung
5573/01 (ATC)	50	–	49	1
5839/01 (ATG)	50	45	3	2 ^a
6072/01 (ATC)	50	3	47	–
6519/01 (ATA)	49	–	48	1 ^b
7426/01 (ATC)	51	2	49	–
8092/01 (GTG)	15	–	15	–
9546/01 (ATA)	50	–	50	–
10564/01 (ATA)	50	16	34	–

* Angegeben sind die Gesamtzahl der analysierten Einzelkolonien, die Anzahl an Kolonien bei denen die Wildtypsequenz *embB306* ATG gefunden wurde, die Anzahl an Kolonien bei denen eine Mutation im *embB306* Locus nachgewiesen wurde und die Anzahl an Kolonien bei denen eine Mischung vorlag. Für die einzelnen Stämme sind in Klammern die *embB306* Sequenzen aufgeführt, die bei der zweiten DNA-Analyse bestimmt wurden.

^a Mischung *embB306* ATG/ATA, ^b Mischung *embB306* ATA/ATC. Die untersuchte DNA wurde nicht aus einer Einzelkolonie, sondern aus mehreren Klonen isoliert.

Die Untersuchung des phänotypisch sensiblen Stammes (5839/01) zeigte, dass tatsächlich bei 6% der Klone eine Mutation von ATG zu ATA vorlag. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die in der ersten DNA-Analyse detektierte ATA Mutation kein Sequenzierfehler war.

4.2.3 Mutationen im gesamten *embCAB* Operon

Bei zehn von 49 EMB resistenten klinischen *M. tuberculosis* Isolaten aus Usbekistan wurde keine Mutation in *embB306* festgestellt. Um zu überprüfen, ob andere Mutationen in den *embCAB* Genen vorkamen, wurde auch hier das gesamte Operon sequenziert. Zusätzlich wurden wieder sechs EMB sensible Stämme (drei Beijing, drei non-Beijing) zur Kontrolle, ob detektierte Mutationen tatsächlich Resistenz-assoziiert sind, mitgeführt.

In jedem der untersuchten Beijing-Stämme, sowohl in den neun EMB resistenten als auch in den drei EMB sensiblen, konnte der bereits unter 4.1.2 beschriebene als **phylogenetische Marker** verwendbare SNP (C→T) an Position 228 bp in *embA* nachgewiesen werden. Auch hier wurde wieder eine Untergruppe des Beijing-Genotyps identifiziert, bei der in den jeweiligen Stämmen ein zusätzlicher SNP an Position 114 bp (A→G) detektiert wurde (siehe Abb. 4-4).

Mutationen, die einen Aminosäureaustausch bewirken und somit vermutlich zur Resistenzentwicklung beitragen, wurden nur in *embB* festgestellt (siehe Abb. 4-5). Insgesamt wurden sechs dieser Mutationen detektiert, wobei ein Stamm eine Doppelmutation aufwies. Bei diesen beiden Mutationen handelte es sich um den Einzelbasenpaaraustausch T→G an Position 221 bp (Leu74Arg) und A→G an Position 983 bp (Asp328Gly). Des Weiteren wurde die Mutation G→A an Position 1217 bp (Gly406Asp) in zwei Stämmen vorgefunden und in einem weiteren Stamm wurde die Mutation A→G an Position 1490 bp (Gln497Arg) nachgewiesen. Ein Stamm besaß eine *missense* Mutation (G→A, Asp354Asn) an Position 1060 bp sowie zusätzlich eine stille Mutation (G→A) an Position 3081 bp. In Abbildung 4-5 (A) sind die in *embB* nachgewiesenen Mutationen noch einmal zusammengefasst.

Bei einem Stamm wurde eine stille Mutation (C→T) in *embA* an Position 1995 bp festgestellt.

In der **intergenischen Region** *embC-embA* wurde bei vier Stämmen der SNP C→T 12 bp vor dem Startcodon von *embA* detektiert.

Mit Ausnahme eines Stammes wurden in den EMB sensiblen Kontrollstämmen neben den als phylogenetische Marker identifizierten SNPs keine weiteren Mutationen vorgefunden. Ein EMB sensibler non-Beijing-Stamm trug jedoch eine *missense* Mutation in *embC* an Position 306 bp (Lys102Asn).

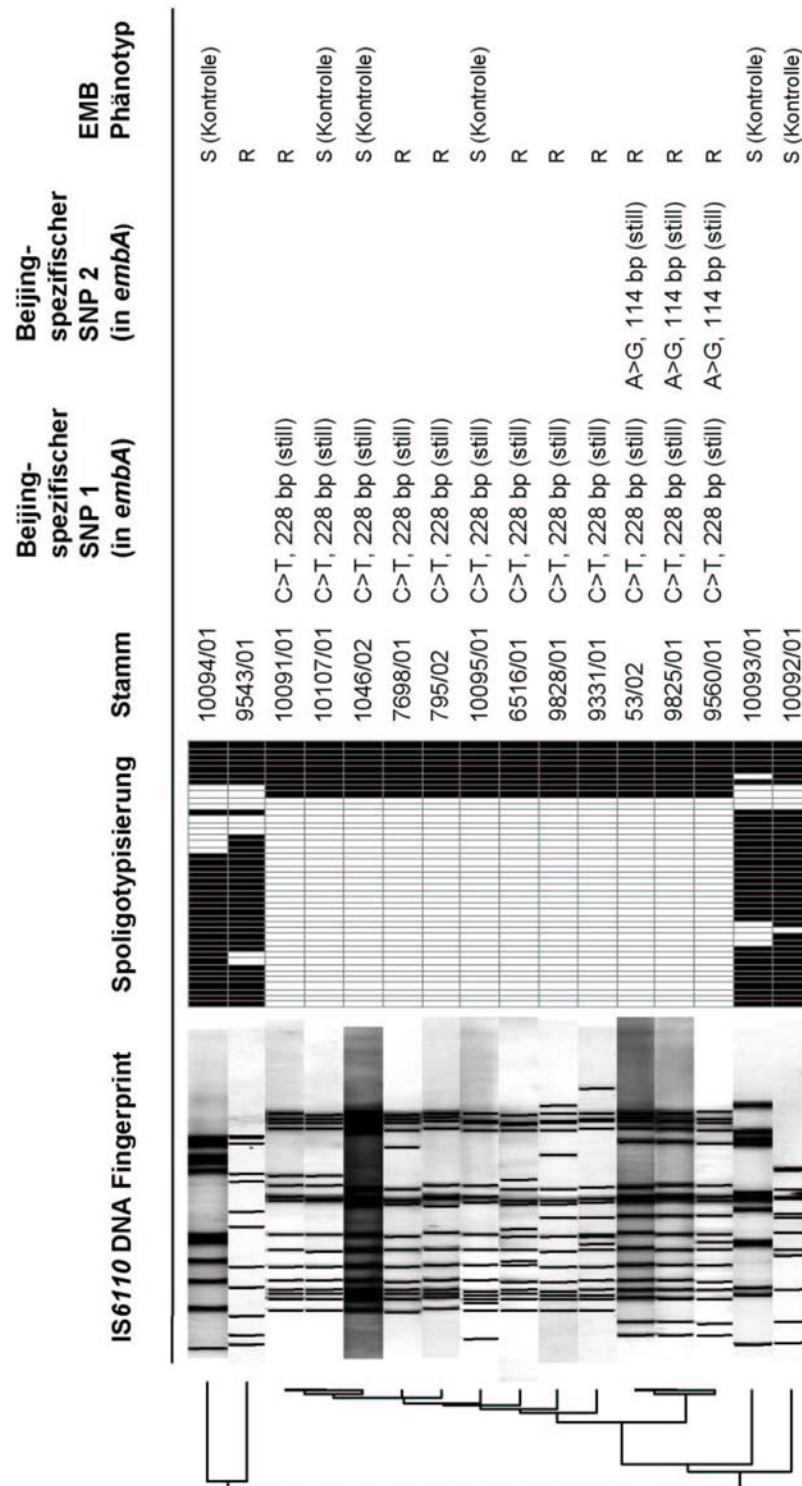


Abb. 4-4. IS6110-DNA-Fingerprint- und Spoligotypisierungsmuster der 10 EMB resistenten und sechs EMB sensiblen *M. tuberculosis* Stämme aus Usbekistan, die im gesamten *embCAB* Operon untersucht wurden

Die einzelnen Stämme sind in einem Dendrogramm basierend auf der Ähnlichkeit der IS6110-Bandenmuster angeordnet. Jeder Stamm, der dem Beijing-Genotyp zugeordnet wurde, besaß eine stille Mutation in *embA* (C→T, 228 bp). Eine aus drei Stämmen bestehende Untergruppe des Beijing-Genotyps trug eine zusätzliche stille Mutation in *embA* (A→G, 114 bp).

Abkürzungen: S = EMB sensibel, R = EMB resistent.

Ähnlich wie bei der Untersuchung der aus Deutschland stammenden klinischen Isolate wurden auch bei den EMB resistenten Stämmen aus Usbekistan die meisten Mutationen in *embB* nachgewiesen. Erneut traten am häufigsten Mutationen in dem *Hot Spot embB306* auf (siehe Abb. 4-5, A). In den beiden anderen *Hot Spots*, *embB406* und *embB497*, wurden ebenfalls Mutationen detektiert. Ein Stamm hatte im gesamten *embCAB* Operon keine Mutation.

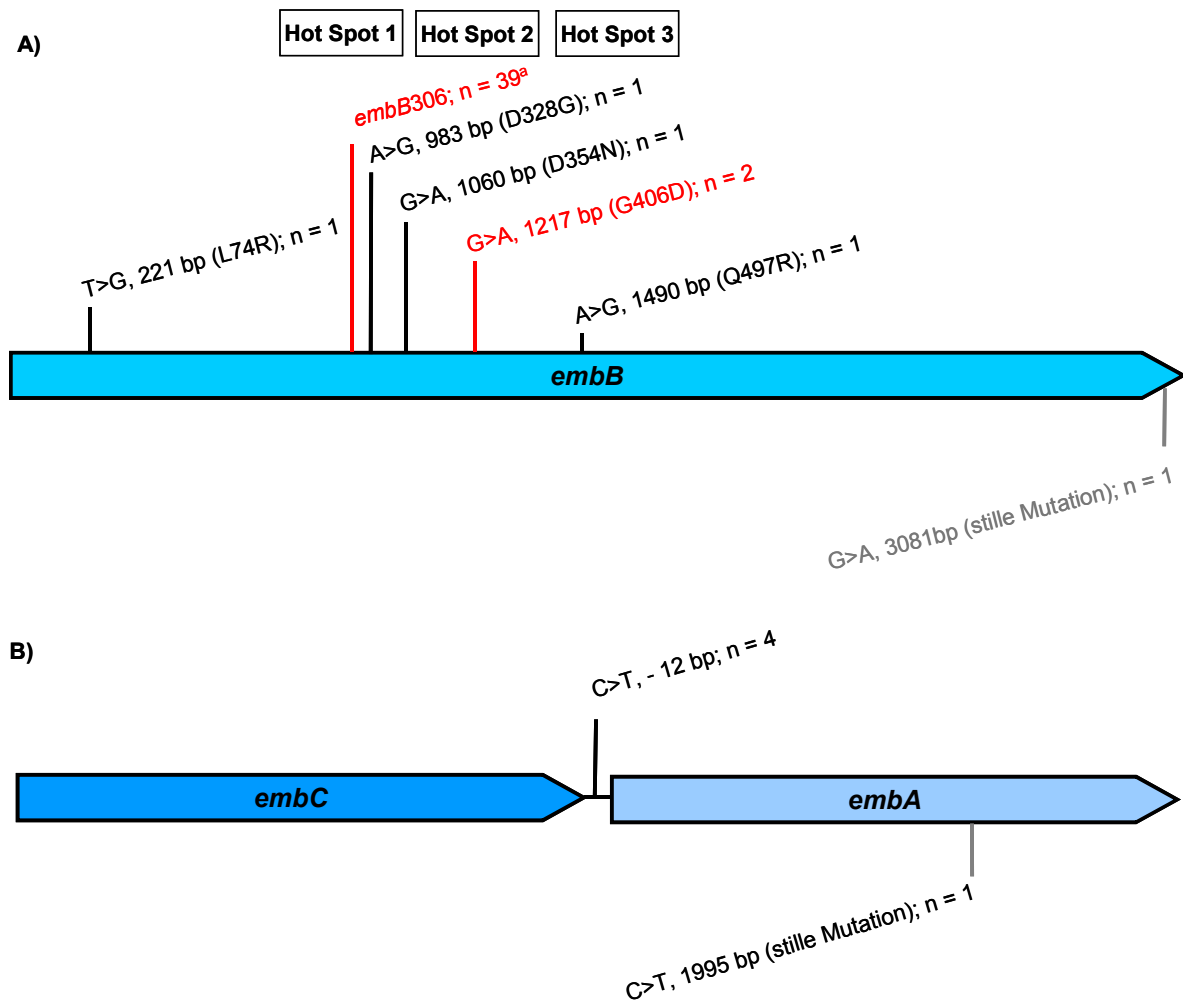


Abb. 4-5. Detektierte Mutationen im *embCAB* Operon bei EMB resistenten Stämmen aus Usbekistan ohne *embB306* Mutation

Angegeben sind der Basenaustausch, die Position des SNP und der Aminosäureaustausch (schwarz bzw. rot) bzw. stille Mutationen (grau). Außerdem ist die Anzahl der Stämme, bei denen die Mutationen nachgewiesen wurden, angegeben. Mutationen, die mehrfach auftraten, sind rot gekennzeichnet.

^a Die 39 Stämme mit *embB306* Mutationen wurden zusammengefasst als *embB306* in die Abbildung miteinbezogen (siehe Kapitel 4.2.1).

4.3 *In vitro* Selektion EMB resistenter *M. tuberculosis* H37Rv Klone

In 69,3% bzw. 79,6% der EMB resistenten klinischen *M. tuberculosis* Isolate wurden Mutationen in dem Codon *embB306* detektiert. Aber auch in anderen Regionen des *embB* Gens treten gehäuft Mutationen auf. Wenn diese Mutationen funktionell sind, wäre zu erwarten, dass sie ebenso bei einer EMB resistenten Spontanmutante eines ursprünglich EMB sensiblen Laborstammes auftreten.

Um dies zu überprüfen, wurden EMB resistente *M. tuberculosis* H37Rv Klone durch *in vitro* Selektion generiert, indem eine Flüssigkultur von *M. tuberculosis* H37Rv auf 7H10/OADC mit verschiedenen EMB-Konzentrationen überführt wurde (siehe 3.2.1.9). Anschließend wurde der resistente Phänotyp durch konventionelle Resistenztestung bestätigt und die DNA auf Mutationen in *embCAB* untersucht.

Im ersten Experiment schwankte die Zahl der gewachsenen Kolonien auf der niedrigsten EMB-Konzentration (2,5 µg/ml) zwischen 5 und 53. Auf der höheren Konzentration von 10 µg/ml EMB konnten nach einer verlängerten Inkubation von zehn Wochen zwei Kolonien isoliert werden. Zur Bestätigung des resistenten Phänotyps wurden insgesamt 24 Klone auf Löwenstein Jensen (2 µg/ml EMB) und in das Bactec™ MGIT™ 960 überführt. Letztendlich wurden zehn Klone als resistent bestätigt (siehe Tab. 4-6).

Bei einem zweiten Experiment lag die Zahl der gewachsenen Kolonien auf der niedrigsten EMB-Konzentration (2,5 µg/ml) zwischen 14 und 48. Das entsprach einer Mutationsrate von $1,67 \times 10^{-6}$ bis $9,79 \times 10^{-7}$. Auf den beiden höheren EMB-Konzentrationen (5 µg/ml und 10 µg/ml) sind auch nach verlängerter Inkubationszeit keine Kolonien gewachsen.

Insgesamt wurden bei dem zweiten Experiment 60 Kolonien ausgewählt und zur Bestätigung des EMB resistenten Phänotyps auf Löwenstein-Jensen mit 1 µg/ml und 2 µg/ml EMB überführt. Von den 60 getesteten Klonen zeigten 48 Wachstum auf 1 µg/ml EMB. Auf 2 µg/ml EMB sind hingegen nur noch 24 Klone gewachsen und zwei davon zeigten nur geringes Wachstum im Vergleich zu den anderen. Bis auf diese zwei Klone wurden alle anderen, die auf 2 µg/ml EMB gewachsen sind, zusätzlich im Bactec™ MGIT™ 960 gemessen. Bei dieser Messung zeigten nur noch sieben von 22 getesteten Klonen einem EMB resistenten Phänotyp (siehe Tab. 4-6).

Die DNA-Analyse der *embB306* Region ergab, dass von den insgesamt 17 EMB resistenten untersuchten Klonen (zehn aus dem ersten Experiment und sieben aus dem zweiten) zwei eine Mutation in dem Codon *embB306* besaßen. Einer der beiden Klone (PIV.1) wies einen Austausch in der dritten Base des Codons von Guanin zu Adenin (ATG→ATA, Met306Ile) auf. Der zweite Klon (PVI.2) trug einen T→C SNP in der zweiten Base des *embB306* Codons (ATG→ACG, Met306Thr). Die beiden Klone mit *embB306* Mutation entsprachen den Kolonien, die auf 10 µg/ml EMB isoliert wurden. Von den restlichen 15 Klonen ohne

embB306 Mutation wurde die DNA des gesamten *embCAB* Operons untersucht. Die Ergebnisse der DNA-Analyse sind in Tabelle 4-6 zusammengefasst.

Tab. 4-6. Mutationen im *embCAB* Operon von *in vitro* selektierten EMB resistenten *M. tuberculosis* H37Rv Klonen*

Klon	GI im MGIT™ 960 EMB [5 µg/ml], Ko = 400	Mutationen im <i>embCAB</i> Operon
1.) PI.6	resistent	<i>embC</i> : T→C, 1328 bp, (Ile443Thr)
2.) PII.4	resistent	<i>embA</i> : C→T, 1995 bp (stille Mutation)
3.) PI.10	resistent	<i>embB</i> : A→G, 899 bp, (Asp300Gly)
4.) PIII.1	resistent	<i>embB</i> : A→G, 899 bp, (Asp300Gly)
5.) PIV.2	resistent	<i>embB</i> : A→G, 899 bp, (Asp300Gly)
6.) H37RvCE 7.4	resistent	<i>embB</i> : A→G, 899 bp, (Asp300Gly)
7.) PVI.2	resistent	<i>embB</i> : T→C, 917 bp, (Met306Thr)
8.) PIV.1	resistent	<i>embB</i> : G→A, 918 bp (Met306Ile)
9.) PV.4	resistent	<i>embB</i> : T→G, 1205 bp, (Leu402Arg)
10.) H37RvCE 5.3	resistent	<i>embB</i> : A→G, 1490 bp (Gln497Arg)
11.) H37RvCE 5.4	resistent	<i>embB</i> : A→G, 1490 bp (Gln497Arg)
12.) H37RvCE 7.6	resistent	<i>embB</i> : A→G, 1490 bp (Gln497Arg)
13.) H37RvCE 8.2	resistent	<i>embB</i> : A→G, 1490 bp (Gln497Arg)
14.) H37RvCE 9.3	resistent	<i>embB</i> : A→G, 1490 bp (Gln497Arg)
15.) H37RvCE 10.6	resistent	<i>embB</i> : A→G, 1490 bp (Gln497Arg)
16.) PIV.4	resistent	Keine Mutation
17.) PV.1	resistent	Keine Mutation

* Angegeben sind der Wachstumsindex GI im Bactec™ MGIT™ 960 (getestet bei einer kritischen Konzentration von 5 µg/ml EMB; die Kontrollen hatten alle einen GI von 400) sowie das Gen, in dem eine Mutation detektiert wurde (Basenaustausch, Position in bp, Aminosäureaustausch). Die Klone 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 16 und 17 stammen aus dem ersten Selektionsexperiment. Die Klone 6, 10, 11, 12, 13, 14 und 15 wurden im zweiten Selektionsexperiment isoliert.

Abkürzungen: GI = Wachstumsindex, Ko = Kontrolle.

Erneut traten am häufigsten Mutationen in **embB** auf. Der SNP A→G an Position 1490 bp (Gln497Arg) kam bei sechs Klonen vor. Die zweithäufigste Mutation befand sich an Position 899 bp (A→G, Asp300Gly), die bei vier Klonen nachgewiesen wurde. Ein Klon hatte die Mutation T→G an Position 1205 bp (Leu402Arg).

Jeweils eine Mutation wurde in **embC** und in **embA** detektiert. Die Mutation im *embC* Gen hatte einen Aminosäureaustausch zur Folge (T→C, 1328 bp; Ile443Thr). Bei der Mutation in *embA* handelte es sich um eine stille Mutation (C→T) an Position 1995 bp.

Unter den insgesamt 17 untersuchten Klonen gab es zwei (PIV.4 und PV.1), die gar keine Mutationen im *embCAB* Operon besaßen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse dieser Untersuchung die Befunde aus den Studien mit den klinischen Isolaten widerspiegeln. Wie schon bei den klinischen Isolaten wurden auch bei den *in vitro* selektierten Spontanmutanten Mutationen in *embCAB* vorgefunden, die ebenfalls überwiegend in *embB* auftraten. Diese Ergebnisse liefern einen weiteren Hinweis dafür, dass Mutationen in *embB* mit einem EMB resistenten Phänotyp assoziiert sind.

4.4 Transfer von *embB306* Mutationen in *M. tuberculosis* H37Rv und anschließende phänotypische Charakterisierung

Ein Ziel dieser Arbeit war, einen eindeutigen Beweis zu erbringen, ob *embB306* Mutationen zur Entwicklung von EMB-Resistenz führen oder nicht. Dafür wurden *embB306* Mutanten in *M. tuberculosis* H37Rv hergestellt und diese im Anschluss phänotypisch charakterisiert.

4.4.1 Generierung der *embB306* Mutanten in *M. tuberculosis* H37Rv

Für die Generierung der H37Rv *embB306* Mutanten wurden EMB resistente klinische *M. tuberculosis* Stämme verwendet, bei denen im Vorfeld eine Punktmutation in dem Codon 306 nachgewiesen wurde (siehe Kap. 3.2.3). Die Ausgangsstämme 2863/01 (*embB306* ATC), 7008/01 (*embB306* ATA) und 10225/01 (*embB306* GTG) wurden zunächst auf weitere Mutationen in der *embB306* Region, die mittels homologer Rekombination transferiert werden sollte, überprüft. Jeder Stamm hatte die erwartete Mutation in *embB306* und entsprach in der übrigen Sequenz dem Wildtyp H37Rv.

Die *embB306* Region wurde jeweils amplifiziert und das generierte PCR-Produkt anschließend mit dem Vektor pPCR Script Amp SK (+) ligiert, so dass die Konstrukte pCP6 (ATC), pCP8 (ATA) und pCP9 (GTG) erhalten wurden. Der zu transferierende Bereich in den in *E. coli* generierten Konstrukten wurde erneut auf Mutationen untersucht. In dem Konstrukt pCP9 wurde neben der zu erwartenden GTG Mutation eine weitere Mutation (C→T) detektiert. Die Mutation würde sich in dem Gen *embB* an Position 1390 bp befinden und in einem Aminosäureaustausch (Arg464Trp) resultieren. Das Konstrukt wurde dennoch für die nächsten Klonierungsschritte verwendet. Alle anderen Konstrukte hatten keine weitere Mutation.

Im nächsten Schritt wurde der zu transferierende Bereich in den pYUB657-Vektor umkloniert, so dass die Konstrukte pCP10 (ATA), pCP11 (GTG) und pCP12 (ATC) entstanden.

Nach der Überprüfung der Sequenzen wurden die pYUB657-Konstrukte in *M. tuberculosis* H37Rv transformiert. Die Transformanten wurden auf 7H10/OADC Medium mit einem Zusatz von 50 µg/ml Hygromycin selektiert. Als Positivkontrolle wurde der Vektor pMV261 verwendet. Die Transformationseffizienz betrug 8×10^5 Klone/ 0,5 µg DNA. Auf dem Nährboden, auf dem die Zellen der Negativkontrolle ausplattiert wurden, sind keine Kolonien gewachsen. Auch die Kontrolle, auf der die mit dem pYUB657-Vektor ohne *embB306* Sequenz transformierten Zellen ausplattiert wurden, war negativ. Die Zahl der Klone, die bei

der Transformation der Konstrukte pCP10, pCP11 und pCP12 erhalten wurde, ist in Tabelle 4-7 angegeben. Jedes Konstrukt wurde fünfmal transformiert.

Tab. 4-7. Anzahl Hygromycin resistenter Klone nach Transformation in *M. tuberculosis* H37Rv*

Transformierte DNA	Anzahl gewachsener Kolonien auf 7H10/OADC + 50 µg/ml Hygromycin				
	Transformation 1	Transformation 2	Transformation 3	Transformation 4	Transformation 5
pCP10 (ATA)	10	8	4	14	10
pCP11 (GTG)	5	15	4	7	5
pCP12 (ATC)	0	1	2	2	1
pMV261	8 ^a				
pYUB657	0				
Negativkontrolle	0				

* Angegeben sind die Anzahl gewachsener Kolonien auf 7H10/OADC + 50 µg/ml Hygromycin je Transformation für jedes der pYUB657-Konstrukte und der Kontrollen. Insgesamt wurden fünf Transformationen je Konstrukt durchgeführt. Die Kontrollen wurden jeweils einmal transformiert.

^a 100 µl einer 10⁻⁴ Verdünnung ausplattiert.

Insgesamt wurden 14 Klone ausgewählt und in 7H9/ADC-Medium überführt. Darunter waren zwei Klone aus den Transformationen mit dem pCP12-Konstrukt (*embB306* ATC) und je sechs Klone aus den Transformationen mit dem pCP10- (*embB306* ATA) bzw. pCP11-Konstrukt (*embB306* GTG).

4.4.1.1 Nachweis von H37Rv Mutanten, die das pYUB657-Konstrukt über homologe Rekombination in ihr Genom integriert haben

Die Fähigkeit auf Hygromycin-haltigen Nährboden zu wachsen, kann auch das Resultat einer spontanen Mutation sein. Daher wurden alle Klone mittels PCR auf das Vorhandensein des pYUB657-Konstrukts überprüft. Die verwendeten PCR-Primer wurden so ausgewählt, dass sie im Hygromycinresistenz-verleihenden Gen des pYUB657-Vektors binden. Die zu erwartende Fragmentgröße betrug 548 bp. Als Positivkontrollen wurden der pYUB657-Vektor und pCP11 (exemplarisch für alle anderen pYUB657-Konstrukte) verwendet. Das pPCR Script Amp SK (+)-Konstrukt pCP9 und ein PCR-Ansatz, dem Aqua dest. statt DNA zugefügt wurde, dienten als Negativkontrollen. Um falsch-positive Ergebnisse aufgrund unspezifischer Bindungen der Primer auszuschließen, wurde zusätzlich noch ein Ansatz mit chromosomaler

DNA des Wildtyps H37Rv mitgeführt. Die Ergebnisse der PCR sind in Abbildung 4-6 zu sehen.

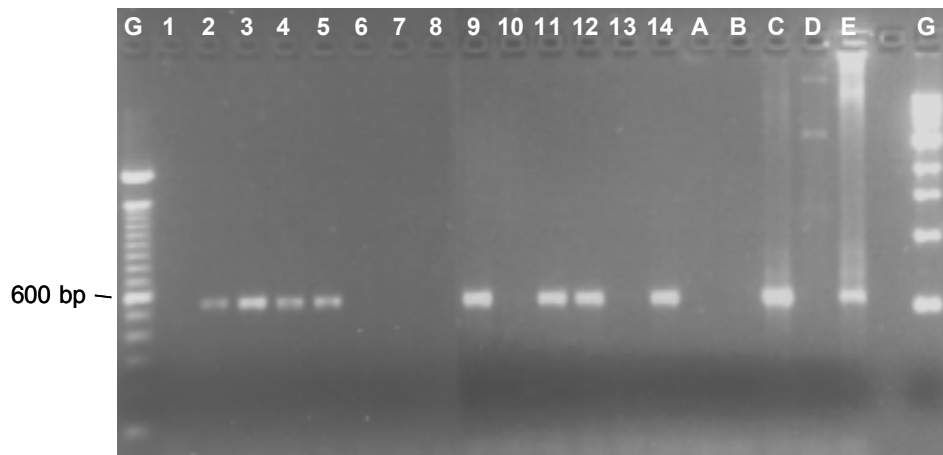


Abb. 4-6. PCR von Hygromycin resistenten Klonen zur Überprüfung auf das Vorhandensein des pYUB657-Konstrukts nach dem ersten Rekombinationsschritt

Die PCR-Primer binden in der Hygromycinresistenz-verleihenden Kasette des Vektors. Das zu erwartende Fragment entspricht 548 bp. Spur 1-2: Klone aus Transformation mit pCP12 (ATC), Spur 3-8: Klone aus Transformation mit pCP10 (ATA), Spur 9-14: Klone aus Transformation mit pCP11 (GTG), Spur A: Negativkontrolle (Aqua dest.), Spur B: H37Rv, Spur C: Positivkontrolle (pYUB657), Spur D: pCP9, Spur E: pCP11, Spur G: Größenstandard 100 bp.

Insgesamt waren acht Klone in der PCR positiv: ein CP12-Klon (ATC), drei CP10-Klone (ATA) und vier CP11-Klone (GTG).

Die acht Klone, die in der PCR positiv waren, wurden zusätzlich mit *Southern Blot* untersucht. Mit dieser Methode wurde sichergestellt, dass der pYUB657-Vektor mit dem mutierten *embB306*-Fragment über homologe Rekombination in das Genom integriert wurde. Die chromosomale DNA der Klone wurde dazu mit dem Restriktionsenzym *PvuII* gespalten und anschließend wurden die entstandenen DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Der Nachweis der Fragmente mit *embB306* Region erfolgte durch ein markiertes 334 bp großes *embB* Fragment, das aus chromosomaler DNA des Wildtyps H37Rv generiert wurde. Für den Wildtyp war ein 4914 bp großes Fragment zu erwarten (siehe Abb. 4-7, A). Bei den Transformanten, die aus homologer Rekombination hervorgingen, würde die *PvuII*-Spaltung ein etwa 4300 bp großes Fragment für das *embB* Gen mit der *embB306* Wildtypsequenz und ein zusätzliches Fragment von etwa 11000 bp für den pYUB657-Vektor mit der mutierten *embB306* Region ergeben (siehe Abb. 4-7, C). Transformanten, die hingegen durch illegitime Rekombination entstanden sind, würden eine unveränderte Wildtypbande von 4914 bp und eine weitere Bande unbekannter Größe für den integrierten Vektor mit der mutierten *embB306* Region zeigen.

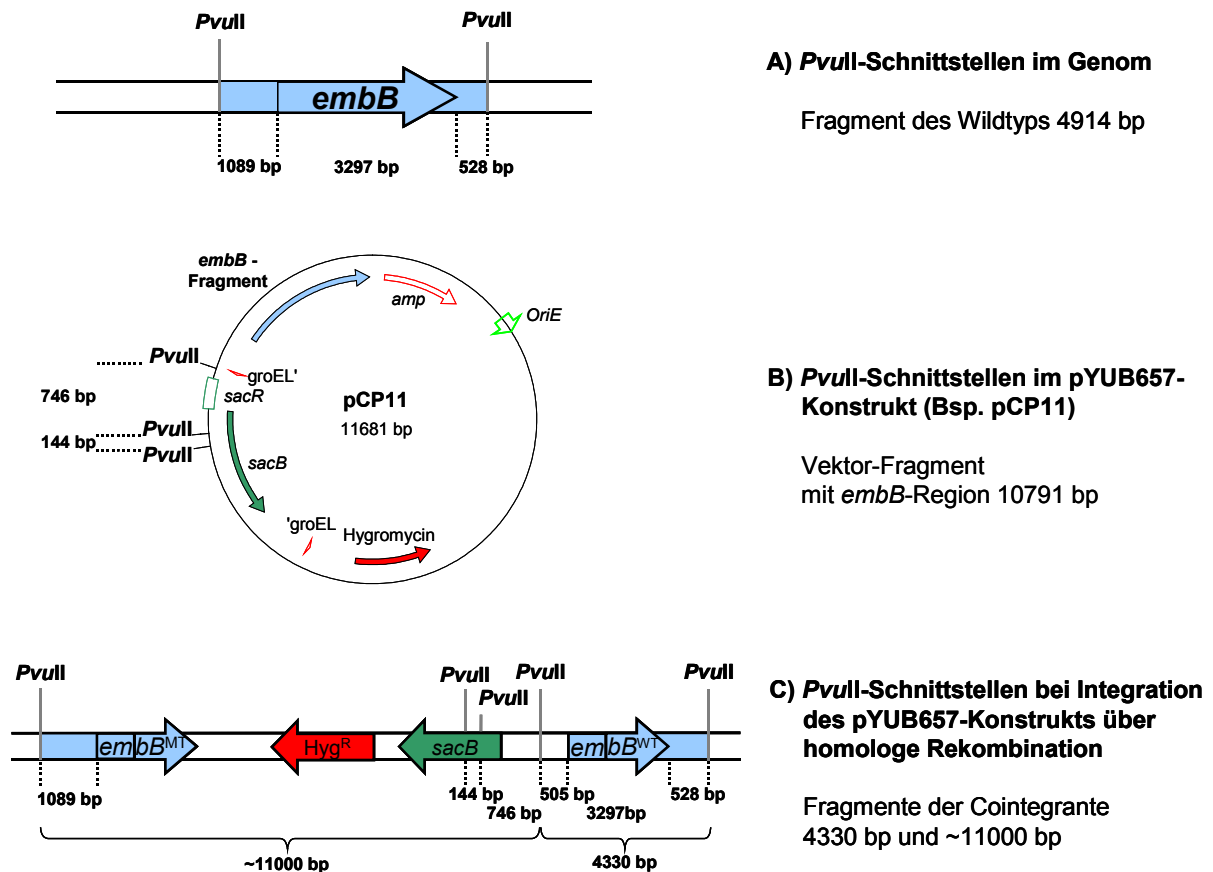


Abb. 4-7. Zu erwartende Fragmentgrößen bei *Southern Blot*-Hybridisierung mit einem 334 bp großen *embB* Fragment gegen *PvuII* gesplante genomische Wildtyp-DNA, pYUB657-Vektor-DNA und genomische DNA mit integrierter Vektor-DNA

Es sind die *PvuII*-Schnittstellen in dem Genom von *M. tuberculosis* (A), die *PvuII*-Schnittstellen in dem pYUB657-Konstrukt mit integrierter *embB306* Region (B) und die *PvuII*-Schnittstellen bei einer Integration des Vektors in das Genom über homologe Rekombination (C) dargestellt.

Der *Southern Blot* zeigte, dass bei sieben von acht untersuchten Klonen der pYUB657-Vektor mit der mutierten *embB306* Region über homologe Rekombination in das Genom integriert wurde. Bei allen sieben primären Rekombinanten wurde das etwa 4300 bp große Fragment für das Gen *embB* mit der *embB306* Wildtypsequenz sowie ein etwa 11000 bp großes Fragment für den Vektor mit der mutierten *embB306* Region detektiert (Abb. 4-8, Spur 1-7). Es handelt sich dabei um die Cointegrante CP12-1 (*embB306* ATC), Cointegrante CP10-1 bis CP10-3 (*embB306* ATA) und Cointegrante CP11-1 bis CP11-3 (*embB306* GTG). Für den vierten CP11-Klon (*embB306* GTG) hingegen wurde ein in der Größe dem Wildtyp entsprechendes Fragment von 4914 bp sowie ein weiteres Fragment, das sich in seiner Größe von dem Vektorfragment der anderen Klone unterschied, nachgewiesen (Abb. 4-8, Spur 8). In diesem Klon fand eine illegitime Rekombination statt. Dieser Klon wurde für die nachfolgenden Schritte nicht weiter berücksichtigt.

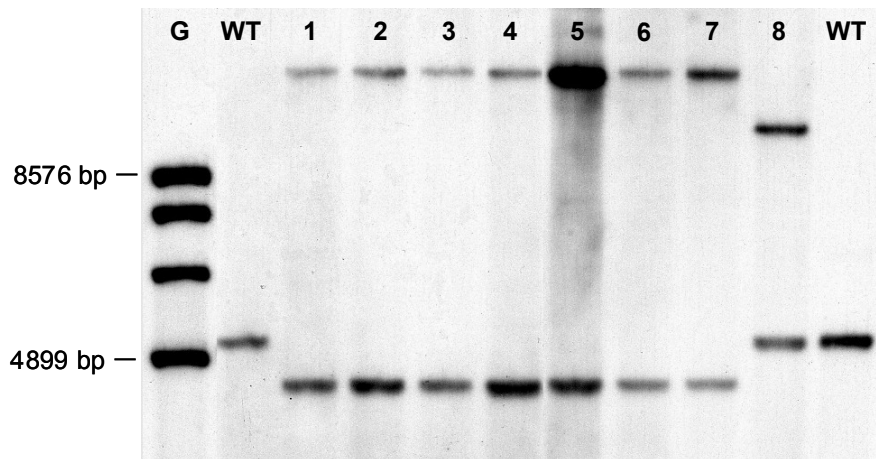


Abb. 4-8. Southern Blot-Hybridisierung eines 334 bp großen *embB* Fragments gegen *PvuII* gespaltene genomische DNA PCR-positiver Klone zur Bestätigung einer Integration des Vektors über homologe Rekombination

Die zu erwartende Fragmentgröße des Wildtyps entspricht 4914 bp, für Klone mit integriertem Vektor über homologe Rekombination 4330 bp und ~ 11000 bp, für Klone mit integriertem Vektor über illegitime Rekombination unverändertes Wildtypfragment von 4914 bp und weiteres Fragment unbekannter Größe. Spur 1-7 Cointegranen; Spur 1: CP12 (ATC), Spur 2: CP10-1 (ATA), Spur 3: CP10-2 (ATA), Spur 4: CP10-3 (ATA), Spur 5: CP11-1 (GTG), Spur 6: CP11-2 (GTG), Spur 7: CP11-3 (GTG), Spur 8: Transformant CP11 (GTG), Spur G: Größenstandard, Spur WT: Wildtyp H37Rv.

4.4.1.2 Selektion von Saccharose resistenten Klonen

Im nächsten Schritt wurden ausgewählte Cointegranen ohne Selektionsdruck kultiviert, um einen Verlust des Vektorfragments durch intramolekulare Rekombination hervorzurufen. Dazu wurden die Klone CP12-1 (*embB306* ATC), CP10-1 und CP10-3 (*embB306* ATA) sowie CP11-1, CP11-2 und CP11-3 (*embB306* GTG) in 7H9/OADC-Medium überführt und bis zu Beginn der stationären Phase bei 37°C inkubiert. Die Selektion von Klonen, die das Vektorfragment über intramolekulare Rekombination aus ihrem Genom verloren haben, erfolgte auf 7H10/OADC-Nährboden mit einem Zusatz von 2% Saccharose. Zusätzlich wurde von jedem Klon der Titer auf 7H10/OADC bestimmt. In Tabelle 4-8 sind die ermittelten KBE/ml der jeweiligen Klone aufgeführt. Die KBE/ml auf dem Nährboden mit Zusatz von Saccharose sollte drei Zehnerpotenzen niedriger sein als die KBE/ml auf dem Kontrollnährboden ohne Saccharose. Bis auf einen Klon (CP11-1) trifft dies auch für alle anderen zu.

Tab. 4-8. Selektion von Saccharose resistenten Klonen und Bestimmung des Titers

Klon (<i>embB306</i>)	KBE/ml auf 7H10/OADC + 2% Saccharose	KBE/ml auf 7H10/OADC ohne Zusatz
CP12-1 (ATC)	$2,2 \times 10^4$	$2,0 \times 10^7$
CP10-1 (ATA)	$2,5 \times 10^4$	$4,0 \times 10^7$
CP10-3 (ATA)	$2,0 \times 10^4$	$1,8 \times 10^7$
CP11-1 (GTG)	$8,0 \times 10^2$	$1,2 \times 10^7$
CP11-2 (GTG)	$1,2 \times 10^4$	$1,4 \times 10^7$
CP11-3 (GTG)	$1,2 \times 10^4$	$1,0 \times 10^7$

4.4.1.3 Nachweis von H37Rv *embB306* Mutanten

Da das Wachstum auf Saccharose-haltigem Nährboden auch auf eine spontane Mutation im *sacB* Gen des pYUB657-Vektors zurückzuführen sein könnte, wurde für eine Auswahl von Klonen die Fähigkeit zum Wachstum auf Hygromycin-haltigem Nährboden überprüft. Nach Möglichkeit wurden je 25 Saccharose resistente Kolonien, die von CP12-1, CP10-1, CP10-3, CP11-2 und CP11-3 abstammten, auf 7H10/OADC mit Zusatz von 50 µg/ml Hygromycin überführt. Die von Cointegrante CP12-1, CP11-1, CP11-2 und CP11-3 abstammenden Kolonien waren alle Hygromycin sensitiv. Bei den von Cointegrante CP10-1 hervorgegangenen Kolonien war ein Hygromycin resistenter Klon dabei und bei den von Cointegrante CP10-3 abstammenden Kolonien waren zwei Hygromycin resistent.

Die Sensitivität gegenüber Hygromycin war nur ein indirekter Nachweis dafür, dass der pYUB657-Vektor mit den Selektionsmarkern *sacB* und der Hygromycinresistenz-Kassette über intramolekulare Rekombination aus dem Genom verloren ging. Daher wurde von je fünf der Saccharose resistenten und Hygromycin sensitiven Klone erneut eine PCR durchgeführt. Jeder der überprüften Klone war in der PCR negativ (Daten nicht gezeigt).

Da der mutierte *embB306* Locus genauso wie der Wildtyplokus während des zweiten Rekombinationsschritts mit dem pYUB657-Vektor aus dem Genom ausgeschleust werden konnte und eine Unterscheidung zwischen Wildtyp und Mutante mit *Southern Blot* nicht möglich war, erfolgte der Nachweis einer Mutante durch Sequenzierung der *embB306* Region.

Insgesamt wurden eine *embB306* ATC Mutante (CP12-1-1), vier *embB306* GTG Mutanten (CP11-2-1, CP11-2-2, CP11-2-3, CP11-2-4) und fünf *embB306* ATA Mutanten (CP10-1-1,

CP10-1-2, CP10-1-3, CP10-1-4, CP10-1-5) bestätigt. Von allen bestätigten Mutanten wurde das gesamte *embB* Gen sequenziert. Für die Mutanten C11-2-1, CP11-2-3 und CP11-2-4 wurden neben der eingeführten *embB306* GTG Mutation eine weitere Punktmutation an Position 1390 bp von Cytosin zu Thymin (Arg464Trp) detektiert, die bereits in den Konstrukten nachgewiesen wurde. Die Mutante CP11-2-2 hat diesen SNP nicht. Alle anderen Mutanten hatten neben der transferierten *embB306* Mutation keine weiteren Polymorphismen in dem Gen *embB*.

Die mittels Sequenzierung bestätigten Mutanten wurden dennoch mit *Southern Blot* untersucht, um zu zeigen, dass tatsächlich nur noch eine Kopie der *embB306* Region in dem Genom vorhanden war. Unabhängig davon, ob der mutierte *embB306* Locus oder der Wildtyploкус während des zweiten Rekombinationsvorgangs mit dem Vektor verloren ging, wäre in jedem Fall eine einzelne Bande zu erwarten gewesen. Diese Bande sollte in der Größe der des Wildtyps entsprechen, da Mutante und Wildtyp sich in nur einer Punktmutation unterscheiden (bei Mutante C11-2-1, CP11-2-3 und CP11-2-4 sind es zwei Punktmutationen). In Abbildung 4-9 ist zu sehen, dass bei jeder Mutante sowie bei dem Wildtyp H37Rv ein Fragment von 4914 bp detektiert wurde.

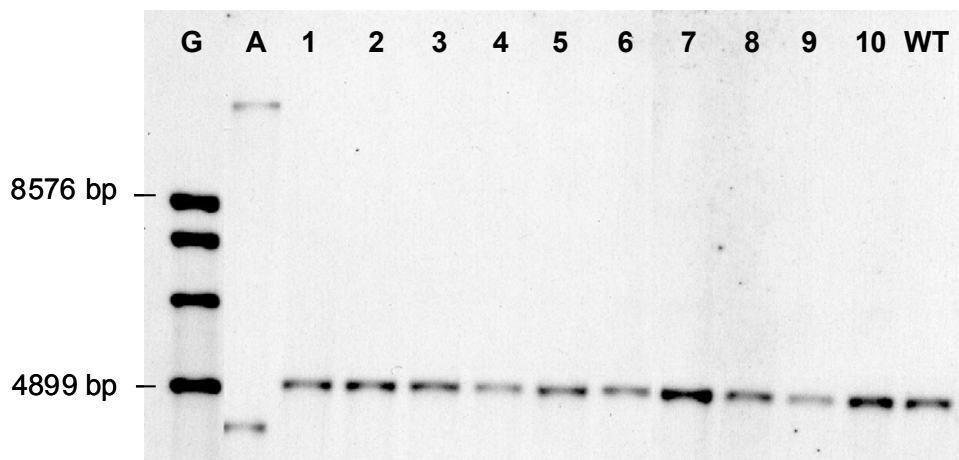


Abb. 4-9. Southern Blot-Hybridisierung eines 334 bp großen *embB* Fragments gegen *PvuII* gespaltene genomische DNA bestätigter *embB306* Mutanten

Die zu erwartende Fragmentgröße entspricht dem Wildtyp von 4914 bp. Spur G: Größenstandard, Spur A: Cointegrante CP11-2 (GTG), Spur 1-10 Mutanten: Spur 1: CP12-1-1 (ATC), Spur 2: CP10-1-1 (ATA), Spur 3: CP10-1-2 (ATA), Spur 4: CP10-1-3 (ATA), Spur 5: CP10-1-4 (ATA), Spur 6: CP10-1-5 (ATA), Spur 7: CP11-2-1 (GTG), Spur 8: CP11-2-2 (GTG), Spur 9: CP11-2-3 (GTG), Spur 10: CP11-2-4 (GTG), Spur WT: Wildtyp H37Rv.

4.4.2 Charakterisierung der *M. tuberculosis* H37Rv *embB306* Mutanten *in vitro*

Um zu überprüfen, ob die in *embB306* eingeführte Punktmutation einen Effekt auf den Level der EMB-Resistenz hat, wurde von jeder generierten *M. tuberculosis* H37Rv Mutante und dem Wildtyp die MHK bestimmt (siehe auch 3.2.1.6). Die MHK-Bestimmung erfolgte auf Löwenstein-Jensen mit folgenden EMB-Konzentrationen: 0,125 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml und 4 µg/ml. Da nach Hazbón *et al.* Mutationen in *embB306* eher eine Rolle in der Entwicklung von MDR spielen, wurde zusätzlich die MHK für INH bestimmt. Für INH wurden folgende Konzentrationen getestet: 0,008 µg/ml, 0,031 µg/ml, 0,063 µg/ml, 0,25 µg/ml, 1 µg/ml und 2 µg/ml.

In Tabelle 4-9 sind die ermittelten MHK-Werte für EMB und INH für jeden der untersuchten Stämme gezeigt.

Tab. 4-9. MHK-Bestimmung auf EMB und INH für die generierten *M. tuberculosis* H37Rv *embB306* Mutanten

Stamm (<i>embB306</i> , Aminosäure)	MHK EMB [µg/ml]	MHK INH [µg/ml]
Wildtyp H37Rv (ATG, Met)	1	0,063
CP12-1-1 (ATC, Ile)	2	0,063
CP10-1-1 (ATA, Ile)	4	0,063
CP10-1-2 (ATA, Ile)	4	0,063
CP10-1-3 (ATA, Ile)	4	0,063
CP10-1-4 (ATA, Ile)	4	0,063
CP10-1-5 (ATA, Ile)	4	0,063
CP11-2-1 (GTG, Val)	4	0,063
CP11-2-2 (GTG, Val)	4	0,063
CP11-2-3 (GTG, Val)	4	0,063
CP11-2-4 (GTG, Val)	4	0,063

Der Wildtyp H37Rv hatte auf EMB eine MHK von 1 µg/ml. Bei jeder *embB306* Mutante wurde eine Erhöhung in der MHK auf EMB im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Die Einführung der GTG-Mutation resultierte in einer vierfachen Erhöhung der MHK. Die Mutanten C11-2-1, CP11-2-3 und CP11-2-4, die neben der eingeführten Mutation in *embB306* einen weiteren SNP in Codon 464 haben, unterschieden sich nicht von der Mutante CP11-2-2. Auch für die fünf Mutanten mit eingeführter ATA-Mutation wurde ein vierfach erhöhter MHK-Wert festgestellt. Jedoch zeigten die ATA-Mutanten allgemein schwächeres Wachstum auf 3 µg/ml EMB im Vergleich zu den GTG-Mutanten. Für die Mutante CP12-1-1, die in *embB306*

einen Austausch von ATG zu ATC hat, lag die MHK bei 2 µg/ml EMB. Bei der MHK-Bestimmung für INH wurde kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutanten beobachtet. Die MHK auf INH war für alle Stämme 0,063 µg/ml.

4.4.3 Auswirkung einer *embB306* Mutation in *M. tuberculosis* H37Rv auf die Resistenz gegenüber EMB *in vivo*

Der Transfer von *embB306* Mutationen resultierte in einer Erhöhung der MHK für EMB *in vitro* um das zwei- bis vierfache im Vergleich zum Wildtyp. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob eine Mutation in *embB306* dem Erreger *in vivo* Resistenz gegenüber EMB verleiht und somit möglicherweise von klinischer Bedeutung ist. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde ein EMB-Therapiemodell in der Maus verwendet.

Für diese Untersuchung wurde jeweils eine Gruppe von zehn Mäusen (C57Bl/6) mit dem Wildtyp *M. tuberculosis* H37Rv bzw. der Mutante CP11-2-4 (*embB306* GTG) über die Schwanzvene infiziert. Die jeweiligen Gruppen wurden anschließend unterteilt in eine therapierte Gruppe und eine Kontrollgruppe. Die therapierte Gruppe bekam ab dem ersten Tag nach Infektion EMB *ad libitum* über das Trinkwasser verabreicht. Die EMB-Dosis wurde auf 25 mg/kg Körpergewicht/Tag eingestellt (Furney *et al.*, 1990). Die Therapie wurde bis zum Ende des Experiments (Tag 42) fortgesetzt. Die Kontrollgruppen erhielten das gleiche Trinkwasser ohne Zusatz von EMB. Ein Tag nach Infektion und am letzten Versuchstag wurde die Keimlast in Lunge und Milz bestimmt.

Das Wachstum des Wildtyps H37Rv war in den therapierten Mäusen signifikant niedriger als in den unbehandelten Kontrollmäusen (siehe Abb. 4-10, A und B). Die Reduktion der KBE war sowohl in der Lunge (4.89 vs. 4.37, log₁₀; Abb. 4-10, A) als auch in der Milz (4.83 vs. 4.30, log₁₀; Abb. 4-10, B) zu beobachten. In der Milz war die Zahl der KBE (4.30, log₁₀) sogar niedriger als an Tag 1 (4.41, log₁₀), bevor die Therapie begonnen wurde. Das entsprach einer Abnahme der Keimlast von 70% in der Lunge und von 71% in der Milz (siehe Abb. 4-10, C und D). Bei der Mutante CP11-2-4 war dagegen zwischen behandelten und unbehandelten Mäusen kein signifikanter Unterschied im Wachstum zu beobachten (Abb. 4-10, C und D). Weder in der Lunge (4.25 vs. 4.19, log₁₀; Abb. 4-10, A und C) noch in der Milz (4.90 vs. 4.98, log₁₀; Abb. 4-10, B und D) war eine signifikante Einschränkung durch EMB in der KBE feststellbar.

Das unbeeinträchtigte Wachstum der Mutante *in vivo* unter EMB-Therapie deutet darauf hin, dass eine *embB306* Mutation einen EMB resistenten Phänotyp von klinischer Relevanz verleiht.

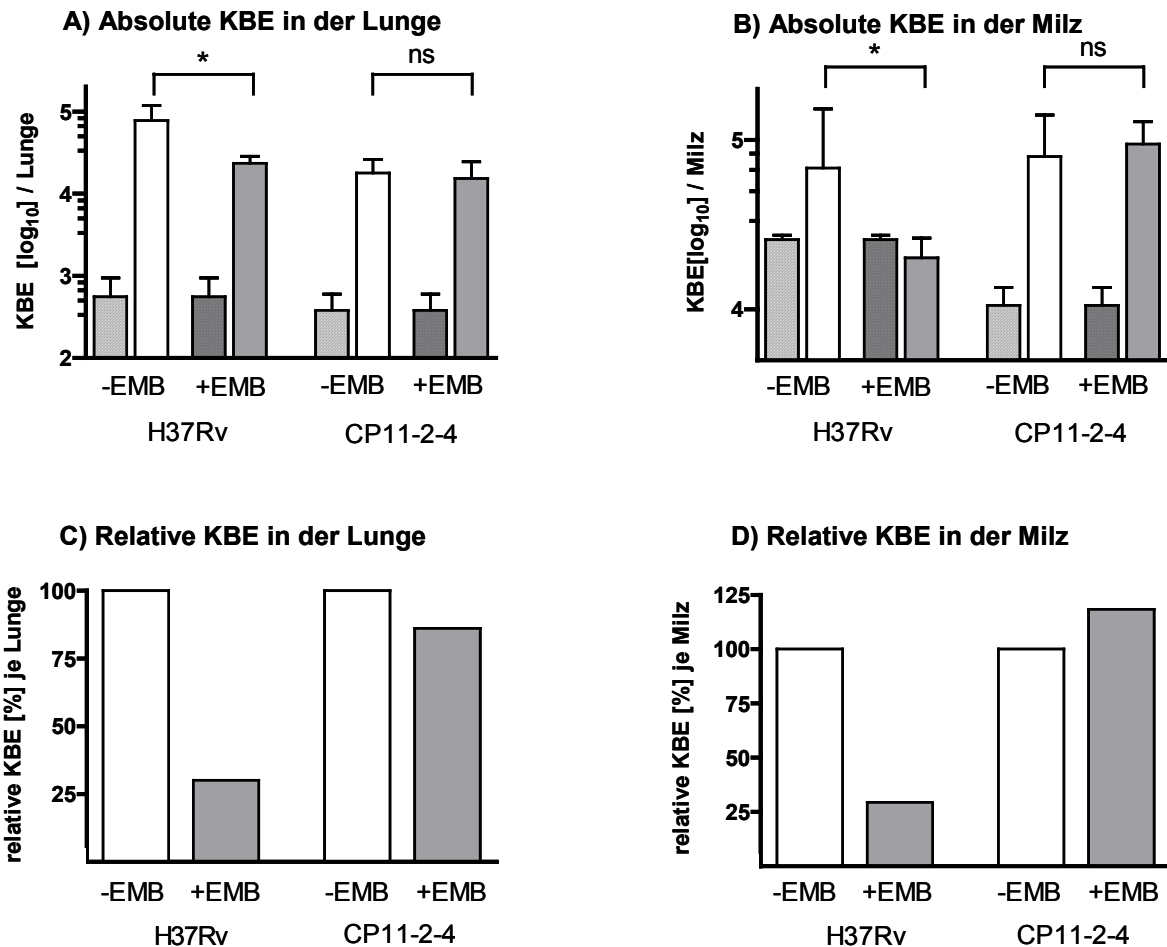


Abb. 4-10. Murines Tbc-Modell zur Untersuchung der Keimlast unter EMB-Therapie nach intravenöser Infektion mit dem Wildtyp H37Rv im Vergleich zur Infektion mit der *embB306* Mutante CP11-2-4 (GTG)

Die Infektion der C57BL/6-Mäuse erfolgte intravenös mit 10^5 KBE. Die EMB-Therapie (+ EMB, graue Balken) wurde über das Trinkwasser *ad libitum* mit einer kalkulierten EMB-Dosis von 25 mg/kg/Tag verabreicht. Mit der Behandlung wurde ein Tag nach der Infektion begonnen und bis zum Ende des Experiments (Tag 42) fortgesetzt. Die Kontrollgruppen (-EMB, weiße Balken) bekamen Trinkwasser ohne Zusatz von EMB.

(A) und (B) Absolute KBE in der Lunge und Milz: Ein Tag nach Infektion wurde die Infektionsdosis in Lunge und Milz bestimmt (schraffierte Balken, $n = 3$), die bei den mit dem Wildtyp H37Rv infizierten Mäusen 2.66 bzw. 4.41 KBE (Mittelwert, \log_{10}) und bei den mit der Mutante infizierten Mäusen 2.53 bzw. 4.01 KBE (Mittelwert, \log_{10}) betrug. Nach sechs Wochen wurde die Keimlast erneut bestimmt (Balken ohne Schraffur, $n = 5$, Mittelwert der KBE und Standardabweichung)

(C) und (D) Relative KBE in der Lunge und Milz: Die relative KBE wurde bestimmt, indem der Wert für die absolute KBE je Organ der unbehandelten Mäuse auf 100% festgelegt wurde.

Abkürzungen und Symbole: * $p < 0,05$; ns = nicht signifikant.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass Mutationen in dem *embCAB* Operon (insbesondere in *embB306*) zur Resistenzentwicklung gegenüber EMB beitragen.

Die komplementären Ergebnisse der DNA-Analyse von zwei Stammkollektionen und von *in vitro* selektierten H37Rv Spontanmutanten demonstrierten, dass Mutationen in *embCAB* mit einem EMB resistentem Phänotyp assoziiert sind. Ein Zusammenhang zwischen *embB306* Mutationen und MDR wurde dagegen nicht beobachtet.

Darüber hinaus konnte mit der Einführung von *embB306* Mutationen in den Laborstamm H37Rv und der anschließenden MHK-Bestimmung der direkte Beweis erbracht werden, dass Mutationen in diesem Codon zur Entwicklung von EMB-Resistenz führen.

Des Weiteren wurden Mutationen in *embC* und *embA* als phylogenetische Marker für Stämme des Haarlem- bzw. Beijing-Genotyps identifiziert.

5.1 Mutationen im *embCAB* Operon bei Ethambutol resistenten klinischen *M. tuberculosis* Isolaten

5.1.1 Die Rolle von Mutationen in *embB306*

In einer Reihe von Publikationen, aus dem Jahr 1997, wurde ein Modell zur Wirkungsweise von EMB vorgeschlagen (Alcaide *et al.*, 1997; Sreevatsan *et al.*, 1997; Telenti *et al.*, 1997). Nach diesem Modell interagiert EMB mit der Arabinosyltransferase EmbB, die dadurch keine Bindung mit ihrem Substrat Arabinose eingehen kann. Das Enzym ist durch die Interaktion mit EMB in seiner Funktion blockiert und es kommt somit zur Inhibierung der Arabinanbiosynthese. Mutationen in *embB*, die in einem Aminosäureaustausch resultieren, können die Proteinstruktur so verändern, dass die Bindung von EMB an EmbB gestört wird. Dadurch erwirbt *M. tuberculosis* einen EMB resistenten Phänotyp. Da Mutationen in *embB306* gehäuft auftreten und sich in der Nähe dieses *Hot Spots* ein in Glykosyltransferasen konserviertes Motiv befindet, wird davon ausgegangen, dass diese Region an der Interaktion mit EMB maßgeblich beteiligt ist.

Die DNA-Analyse der klinischen *M. tuberculosis* Isolate in dieser Arbeit zeigte, dass über zwei Drittel der Stämme mit EMB resistentem Phänotyp eine Mutation in dem Codon *embB306* tragen. Dieses Ergebnis wurde sowohl unabhängig von der Herkunft der Stämme als auch unabhängig von der Gestaltung der Studie erhalten. Bei der retrospektiven Studie, mit aus Deutschland stammenden Isolaten, hatten insgesamt 70 (69,3%) von 101 EMB resistenten Stämmen eine Mutation in *embB306*. Die populationsbasierte Studie ergab, dass 39 (79,6%) von 49 EMB resistenten Stämmen, die in Usbekistan isoliert wurden, eine

Mutation in *embB306* besitzen. Ähnliche Resultate wurden bereits in früheren Studien beschrieben (Parsons *et al.*, 2005; Sreevatsan *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2005).

Bei beiden Studien wurden unterschiedliche Polymorphismen in *embB306* nachgewiesen. In den Stämmen aus Deutschland wurden neben dem Wildtypcodon ATG (Met) die mutierten Codons ATA (Ile), ATC (Ile), ATT (Ile) und GTG (Val) in *embB306* detektiert. Bei den Isolaten, die aus Usbekistan stammen, wurden ebenfalls die mutierten Codons ATA, ATC und GTG vorgefunden. Die Mutation ATT wurde in dieser Stammkollektion jedoch nicht nachgewiesen. Stattdessen wurde bei einem Isolat die Mutation CTG (Leu) gefunden. Der Nachweis unterschiedlicher Polymorphismen in dem Codon *embB306*, das sich in einer sonst hoch konservierten Region befindet, sprechen für eine natürliche positive Selektion (Alcaide *et al.*, 1997; Sreevatsan *et al.*, 1997). Eine ähnlich hohe Variabilität innerhalb eines Codons wurde auch bei DNA-Analysen anderer Resistenz-assoziiierter Gene beobachtet. Beispiele hierfür sind die mit INH-Resistenz assoziierten Mutationen in *katG315* oder die mit RMP-Resistenz assoziierten SNPs in *rpoB531* (Zhang und Telenti, 2000).

Der prozentuale Anteil der *embB306* Mutationen unter den EMB resistenten Isolaten war in den beiden Stammkollektionen ungefähr gleich verteilt. Am häufigsten war die Mutation GTG vertreten (~61% bzw. ~51%), gefolgt von ATA (~26%) und ATC (~7% bzw. ~21%). Die Mutationen ATT (~6%) und CTG (~3%) kamen am seltensten vor. Da die Häufigkeit des mutierten Codons GTG in beiden Stammkollektionen ungefähr doppelt bis dreifach so hoch war wie die der anderen mutierten Codons, ist anzunehmen, dass der Erwerb dieser für Valin codierenden Mutation einen höheren Selektionsvorteil gegenüber den für Isoleucin bzw. Leucin codierenden Mutationen bietet. Wahrscheinlich erschwert das Vorhandensein von Valin die Interaktion mit EMB mehr als die Aminosäuren Isoleucin oder Leucin. Dies wäre übereinstimmend mit der Korrelation zwischen *embB306* Mutationen und MHK-Werten. Es wurde mehrfach beschrieben, dass *M. tuberculosis* Stämme mit einer GTG Mutation eine MHK von ~40 µg/ml EMB aufweisen wohingegen ATA oder ATC nur eine MHK von ~20 µg/ml EMB bewirken (Ramaswamy *et al.*, 2000; Sreevatsan *et al.*, 1997).

Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Mutationen in *embB306*, die für Valin (GTG), Isoleucin (ATA, ATC, ATT) oder Leucin (CTG) codieren, wurden auch in vorherigen Studien gefunden. Zusätzlich wurde eine für Threonin codierende Mutation (ACG) in der Literatur beschrieben (Lee *et al.*, 2002). Offenbar werden in *embB306* nur Mutationen toleriert, die für eine der vier genannten Aminosäuren codieren. Polymorphismen, die einen Austausch zu einer anderen Aminosäure zur Folge haben, sind anscheinend letal für *M. tuberculosis* (Zhang und Telenti, 2000). Diese Beobachtung ist ein Hinweis dafür, wie wichtig die von *embB306* codierte Aminosäure für die Funktion des Proteins oder auch für die Interaktion mit EMB ist.

Im Gegensatz zu den veröffentlichten Studien der letzten Jahre wurde bei der retrospektiven DNA-Analyse der aus Deutschland stammenden Isolate kein diskrepantes Ergebnis festgestellt. Weder in der Kontrollgruppe aus sensiblen Stämmen noch in der Kontrollgruppe aus EMB sensiblen MDR-Stämmen wurde eine Mutation in *embB306* detektiert. Bei der populationsbasierten Studie, in der klinische *M. tuberculosis* Isolate aus Usbekistan untersucht wurden, gab es zunächst bei acht von 197 Stämmen widersprüchliche Ergebnisse. Nach Wiederholung der konventionellen Resistenztestung und der DNA-Analyse in der *embB306* Region gab es keinen Stamm mehr, bei dem diskrepante Beobachtungen gemacht wurden. Auf diese Ergebnisse wird unter Kapitel 5.1.3 näher eingegangen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Mutationen in *embB306* einen verlässlichen Marker für den Nachweis von EMB-Resistenz darstellen. Eine Assoziation zwischen *embB306* Mutationen und MDR-Phänotyp wurde nicht festgestellt. Es gab keine falsch-positiven Ergebnisse. Dies zeigt, wie spezifisch (100%) *embB306* Mutationen als molekulare Marker für EMB-Resistenz sind. Die Detektion von *embB306* Mutationen in über zwei Drittel der untersuchten EMB resistenten Stämme demonstriert die ebenfalls relativ hohe Sensitivität (79,6%) dieser Marker. Die Sensitivität ließe sich erhöhen, wenn weitere *Hot Spots* in *embB* als Marker hinzugezogen werden würden.

5.1.2 Weitere *Hot Spots* in *embB* und die Bedeutung von Mutationen in *embA* und *embC* für die Entwicklung von EMB-Resistenz

In ungefähr einem Drittel der EMB resistenten klinischen *M. tuberculosis* Isolate wurde keine Mutation in *embB306* detektiert. Bei der Stammkollektion aus Deutschland waren 24 (23,8%) von 101 EMB resistenten Stämmen ohne Mutation in der *embB306* Region. In der Stammkollektion aus Usbekistan gab es 10 (20,4%) EMB resistente Isolate ohne *embB306* Mutation. Von jedem dieser Stämme wurde das gesamte ~10 kb große *embCAB* Operon untersucht.

Abgesehen von den SNPs, die als phylogenetische Marker identifiziert wurden, gab es insgesamt relativ wenig stille Mutationen im *embCAB* Operon. Eine stille Mutation befand sich in *embC* ($n = 1$), drei in *embB* (je $n = 1$) und vier in *embA* (je $n = 1$). Diese geringe Variabilität ist übereinstimmend mit der Beobachtung, dass die Gene des *embCAB* Operons hoch konserviert sind (Ramaswamy *et al.*, 2000; Telenti *et al.*, 1997).

Wie bereits erwähnt, wurden bei der Untersuchung des *embCAB* Operons SNPs gefunden, die sich als phylogenetische Marker herausstellten. Dabei handelte es sich um zwei in *embA* detektierte Polymorphismen, die für Stämme des Beijing-Genotyps bzw. eine Untergruppe des Beijing-Genotyps spezifisch sind. Der SNP C→T an Position 228 bp wurde in jedem der Beijing-Stämme nachgewiesen. Der zweite SNP (A→G) befand sich an Position 114 bp und

wurde in nur 9 von 28 untersuchten Beijing-Stämmen (einschließlich der EMB sensiblen Beijing-Kontrollstämmen) vorgefunden, die sich durch ein abweichendes Fingerprint-Muster auszeichneten. Diese phylogenetischen Marker sind bisher noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Ein weiterer SNP (G→C), der mit dem Haarlem-Genotyp assoziiert wird, wurde in dem *embC* Gen (Position 2941 bp) festgestellt. Die Rolle dieser SNPs als phylogenetische Marker muß jedoch in zukünftigen Studien erst noch validiert werden.

Neben den stillen Mutationen und den als phylogenetische Marker identifizierten SNPs wurde eine Reihe von Mutationen detektiert, die mit dem EMB resistenten Phänotyp assoziiert wurden. Es wurden insgesamt 19 verschiedene *missense* Mutationen im *embCAB* Operon nachgewiesen, die in 16 verschiedenen Codons (je drei in *embC* und *embA*, 10 in *embB*) einen Austausch einer Aminosäure zur Folge hatten. Einige der Mutationen wurden in mehreren Stämmen detektiert.

Die meisten Mutationen wurden in dem Gen *embB* vorgefunden. Am häufigsten waren die Codons *embB497* (n = 10) und *embB406* (n = 8) betroffen, die somit neben *embB306* zwei weitere *Hot Spots* für Mutationen bilden. Diese Beobachtungen wurden bereits in vorherigen Studien beschrieben (Lee *et al.*, 2004; Isola *et al.*, 2005; Parsons *et al.*, 2005; Ramaswamy *et al.*, 2000). Es wurden fünf weitere Mutationen detektiert, die in der Nähe der beiden *Hot Spots* *embB306* und *embB406* lokalisiert waren und die sich alle innerhalb einer Schleife im Extrazellulärraum befanden. Bei dem Austausch der Aminosäuren handelte es sich um Asp328Gly, Asp354Asn, Glu378Ala, Leu402Val und Pro404Ser. Bisher sind nur die Mutationen in Codon *embB328* und *embB378* in der Literatur beschrieben worden (Ramaswamy *et al.*, 2000; Sekiguchi *et al.*, 2007; Srivastava *et al.*, 2006). Eine Mutation in Codon *embB354* wurde bereits zuvor beschrieben (Isola *et al.*, 2005; Sekiguchi *et al.*, 2007). Jedoch handelte es sich dabei um einen Austausch von Asparaginsäure durch Alanin. Außerdem wurden noch fünf weitere Mutationen (Leu74Arg, Leu402Val, Pro404Ser, Ile450Met und Ala454Thr) in *embB* nachgewiesen, die noch nicht publiziert wurden.

In dem Gen *embC* wurden drei verschiedene Mutationen detektiert, die in Thr270Ile (n = 1), Ile406Val (n = 1) und Arg738Gln (n = 2) resultieren. Die beiden letzt genannten Polymorphismen wurden in zwei Stämmen nachgewiesen, in denen keine weiteren *missense* Mutationen auftraten. Daher kann davon ausgegangen werden, dass diese Mutationen einen EMB resistenten Phänotyp verleihen. Der Austausch von Threonin durch Isoleucin in Codon *embC270* wurde in einem Stamm vorgefunden, der vier weitere *missense* Mutationen und noch zwei zusätzliche stille Mutationen besaß. Aus diesem Grund kann nicht gesagt werden, ob dieser Polymorphismus mit EMB-Resistenz assoziiert ist. Sowohl der Austausch Thr270Ile als auch Arg738Gln wurden bereits in vorherigen Studien beschrieben.

Die Mutationen, die im *embA* Gen detektiert wurden, kamen nur in Kombination mit anderen Mutationen vor. Aus diesem Grund ist auch hier unklar, ob es sich um Resistenz-assoziierte

Mutationen handelt. Der Stamm, in dem die Mutation in *embC270* gefunden wurde, hatte u. a. auch zwei Mutationen in *embA* (Val468Ala und Pro639Ser). In einem anderen Stamm wurde der Polymorphismus Ala576Thr detektiert. Die Mutationen in *embA* wurden bisher noch nicht in der Literatur beschrieben.

Die ungleiche Verteilung der Mutationen im *embCAB* Operon deutet darauf hin, dass die Polymorphismen in *embC* und *embA* eine untergeordnete Rolle in der Resistenzentwicklung spielen. Offenbar sind die Arabinosyltransferasen EmbC und EmbA im Vergleich zu EmbB weniger empfindlich gegenüber der Wirkung von EMB. Die geringere Sensitivität von EmbA und EmbC könnte darin begründet sein, dass diese Enzyme vielleicht auf andere Art und Weise mit EMB interagieren als EmbB (Deng *et al.*, 1995; Goude *et al.*, 2008; Khoo *et al.*, 1996; Mikušová *et al.*, 1995). Diese Theorie wäre passend zu der Beobachtung, dass EmbC in der Synthese von Arabinan aus LAM und EmbA und EmbB in der Arabinansynthese aus AG involviert sind (Escuyer *et al.*, 2001). Eine unterschiedlich ausgeprägte Expression der einzelnen Enzyme könnte ebenfalls zu einer unterschiedlichen Sensitivität führen.

Mutationen, die sich innerhalb der intergenischen Region *embC-embA* befinden, könnten eine erhöhte Expression der Enzyme EmbA und EmbB bewirken. Bei insgesamt neun Stämmen wurden in dieser Region SNPs festgestellt. Darunter waren vier Stämme, in denen keine weiteren Mutationen im gesamten *embCAB* Operon nachweisbar waren. Daher ist anzunehmen, dass Mutationen in der Promotorregion von *embAB* mit EMB-Resistenz assoziiert sind. Am häufigsten waren die Mutationen C→T, die sich 12 bp bzw. 8 bp vor dem Startcodon von *embA* befanden. In dieser Region ist ein TATA-Box-Motiv lokalisiert. Durch die Mutationen in der TATA-Box könnte eine vermehrte oder stärkere Bindung der RNA-Polymerase ermöglicht worden sein, die folglich zu einer gesteigerten Transkription der Arabinosyltransferasen führt.

Die Untersuchung des *embCAB* Operons zeigte, dass die meisten der 34 analysierten Stämme ohne Mutation in *embB306* andere Polymorphismen besitzen. Insgesamt gab es nur acht Stämme, bei denen keine *missense* Mutation im gesamten *embCAB* Operon nachgewiesen wurde. Dies spricht dafür, dass weitere Gene in den Resistenzmechanismus von EMB involviert sind (Colangeli *et al.*, 2005; Ramaswamy *et al.*, 2000). Der Nachweis von Mutationen im *embCAB* Operon bei insgesamt 147 von 150 untersuchten klinischen *M. tuberculosis* Isolaten zeigt jedoch eindeutig, wie wichtig diese Polymorphismen für die Entwicklung von EMB-Resistenz sind.

Durch die Detektion von Mutationen im Codon *embB306* können über zwei Drittel der EMB-resistenten Stämme identifiziert werden. Die Sensitivität dieser molekular basierten Nachweismethode könnte durch die Verwendung weiterer molekularer Marker – wie z. B. *embB406* und *embB497* – erhöht werden.

Bei der Untersuchung der beiden Stammkollektionen zeigte sich, dass die Detektion von *embB306* Mutationen sehr spezifische molekulare Marker zum Nachweis von EMB-Resistenz darstellen. Im Gegensatz zu den jüngst beschriebenen Diskrepanzen zwischen Phänotyp und Genotyp wurden in der vorliegenden Arbeit eher widersprüchliche Ergebnisse zwischen den verschiedenen Methoden der konventionellen Resistenztestung festgestellt.

5.1.3 Diskrepante Ergebnisse bei der konventionellen Resistenztestung von EMB

Bei der populationsbasierten Studie mit der Stammkollektion aus Usbekistan wurde zunächst für acht klinische Isolate ein diskrepantes Ergebnis zwischen konventioneller (EMB sensibel) und molekularer (Vorliegen einer *embB306* Mutation) Resistenztestung erzielt. Dabei handelte es sich um ein sensibles und ein polyresistentes Isolat sowie sechs MDR-Stämme. Eine im Folgenden durchgeführte Re-Analyse bestätigte bei sieben Stämmen die Mutation in *embB306*, diese waren alle auch in der zweiten Resistenztestung EMB resistent. Allerdings waren die Ergebnisse für einen polyresistenten Stamm (6072/01) und zwei MDR-Stämme (5573/01, 10564/01) nicht eindeutig. Nach den Ergebnissen der konventionellen Resistenztestung auf Löwenstein-Jensen wären diese Stämme als EMB sensibel einzustufen gewesen. Die Resistenztestung im Bactec™ MGIT™ 960 ergab jedoch einen EMB resistenten Phänotyp.

Ein als EMB sensibel bestätigter Stamm (5839/01) entsprach bei der zweiten DNA-Analyse dem Wildtypcodon *embB306* ATG. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass es sich bei dem Ergebnis aus der ersten DNA-Analyse um eine Kreuzkontamination in einer der beiden PCRs oder um einen Sequenzierfehler handelt. Die Ergebnisse aus weiterführenden Untersuchungen sprechen jedoch dagegen. Bei der DNA-Analyse von 50 Einzelkolonien wurde bei drei Klonen wieder die Mutation ATA detektiert und bei zwei weiteren Klonen wurde eine Mischung aus Wildtypcodon ATG und der Mutation ATA nachgewiesen.

Von allen anderen ursprünglich diskrepanten Stämmen wurden ebenfalls möglichst 50 Einzelkolonien isoliert und anschließend die DNA der Klone in der *embB306* Region untersucht. Dabei wurde insbesondere bei den Klonen der Stämme, die in der Resistenztestung diskrepante Ergebnisse aufwiesen, eine Mischung aus Wildtyp und Mutante festgestellt. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass es sich bei den klinischen *M. tuberculosis* Isolaten um eine Mischpopulation handelt.

Eine Mischpopulation, die sich aus Zellen des Wildtyps und aus Zellen mit *embB306* Mutation zusammensetzt, wäre eine Erklärung für die Diskrepanz der Ergebnisse aus der ersten Resistenztestung und der ersten DNA-Analyse. Je nachdem, welche Subpopulation und zu welchen Anteilen überimpft wird, kann bei der Resistenztestung ein sensibler oder

resistenter Phänotyp bestimmt werden. Ebenso kann bei der DNA-Analyse entweder der Wildtyp oder eine Mutation detektiert werden.

In einem Land mit hoher Tbc-Inzidenz, wie es beispielsweise für Usbekistan der Fall ist, können Patienten außerdem mit verschiedenen Stämmen infiziert sein. Bei Stämmen, die sich in ihrem Resistenzprofil unterscheiden, könnte dies ebenfalls zu diskrepanten Ergebnissen bei der Resistenzbestimmung und der DNA-Analyse führen.

Die Resistenztestung von EMB wird zudem durch den geringen Unterschied zwischen der MHK und der kritischen Konzentration zusätzlich erschwert (Heifets *et al.*, 1986).

Die MHK-Bestimmung der Stämme mit ursprünglich diskrepanten Befunden bestätigte die Ergebnisse aus der Resistenztestung. Die Stämme, die sich nach der zweiten Resistenztestung als resistent herausgestellt haben, wuchsen auf Nährböden mit einer Konzentration von bis zu 2 µg/ml EMB. Ein Stamm, in dem eine GTG Mutation bestätigt wurde, hatte eine höhere MHK (≥ 4 µg/ml EMB) im Vergleich zu den anderen resistenten Stämmen.

Es ist auffällig, dass sechs von sieben der im Nachhinein als EMB resistent bestimmten Isolate eine Mutation in der dritten Base (ATA, ATC) des *embB306* Codons haben und nur ein Stamm eine Mutation in der ersten Base (GTG). Eine Erklärung hierfür ist vermutlich die bereits unter 5.1.1 beschriebene Korrelation zwischen bestimmten *embB306* Mutationen und den daraus resultierenden MHK-Werten. Da eine GTG Mutation offenbar mit einer höheren MHK assoziiert ist, werden bei Stämmen mit diesem SNP weniger diskrepante Ergebnisse in der Resistenztestung erhalten.

Letztendlich lässt sich nach den Untersuchungen der beiden Kollektionen klinischer *M. tuberculosis* Isolate sagen, dass Mutationen in *embB306* einen verlässlichen molekularen Marker für EMB-Resistenz darstellen. Diskrepanzen traten eher bei der konventionellen Resistenztestung auf. Die Ergebnisse ließen sich zum Teil nicht reproduzieren und ein Vergleich der Resistenztestung mit festen Nährmedien zu der mit flüssigen Nährmedien zeigte teils widersprüchliche Ergebnisse. Durch Einführung molekularbiologischer Methoden kann eine höhere Reproduzierbarkeit und präzisere Ergebnisse der EMB Resistenztestung von klinischen Isolaten erzielt werden.

5.2 Mutationen im *embCAB* Operon bei *in vitro* selektierten EMB resistenten *M. tuberculosis* H37Rv Klonen

Über zwei Drittel der untersuchten EMB resistenten klinischen *M. tuberculosis* Isolate trugen eine Mutation in *embB306*. Daher war zu erwarten, dass ein durch *in vitro* Selektion EMB

resistent gewordener Laborstamm ebenfalls eine Mutation in diesem Codon erwerben würde.

In der Literatur sind bereits aus *in vitro* Selektion hervorgegangene EMB resistente Spontanmutanten von *M. smegmatis* beschrieben, bei denen eine Mutation im *embB* Gen nachgewiesen wurde (Lety *et al.*, 1997). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit gab es jedoch noch keine Beschreibung von *in vitro* selektierten EMB resistenten *M. tuberculosis* Klonen, die sich im *embB* Gen vom Wildtyp unterscheiden ließen. In einer Studie wurden zwar Kolonien von *M. tuberculosis* H37Rv auf EMB isoliert (Hazbón *et al.*, 2005). Bei nachfolgenden Untersuchungen stellte sich aber heraus, dass keiner der Klone eine Mutation in *embB306* besaß. Ein möglicher Grund für diese Befunde könnte sein, dass zu wenig Zellen für die *in vitro* Selektion eingesetzt oder die falschen EMB-Konzentrationen verwendet wurden.

In dieser Arbeit (siehe Kapitel 4.3) konnte demonstriert werden, dass tatsächlich *embB306* Mutationen in *M. tuberculosis* H37Rv Spontanmutanten auftreten. Die Zahl der Mutanten war mit zwei Klonen jedoch sehr gering.

Zum einen wurde die häufig vorkommende Mutation ATA (ATG306Ile) und zum anderen die eher seltene Mutation ACG (Met306Thr) nachgewiesen. Bei der Resistenztestung fiel auf, dass der Klon mit ATA Mutation einen geringeren Wachstumsindex (197) im Vergleich zu dem mit ACG Mutation hatte. Dieses Ergebnis ist wieder übereinstimmend mit der bereits beschriebenen Beobachtung, dass Mutationen in der dritten Base des *embB306* Codons offenbar eine geringere Resistenz verleihen als Mutationen in der ersten Base. Aufgrund des hohen Wachstumsindex (400) des Klons mit ACG Mutation ist anzunehmen, dass Mutationen in der zweiten Base wie Mutationen in der ersten Base mit einer höheren Resistenz assoziiert sind. Dies müsste jedoch mit MHK-Bestimmungen erst bestätigt werden.

Interessanterweise wurden die Klone mit *embB306* Mutation beide auf 10 µg/ml EMB isoliert. Auf den niedrigeren EMB-Konzentrationen wurde kein Klon mit *embB306* Mutation gewonnen. Ähnliche Ergebnisse wurden in einer Studie von Hazbón *et al.* beschrieben (Hazbón *et al.*, 2008).

Die als EMB resistent bestätigten Klone ohne *embB306* Mutation wurden im gesamten *embCAB* Operon auf Mutationen überprüft. Dabei zeigte sich, dass 13 von 15 Klone eine Mutation in einem der Gene des Operons besitzen. Am häufigsten wurden Mutationen im *embB* Gen nachgewiesen. Die Mutationen waren alle in einem der bereits beschriebenen *Hot Spots* lokalisiert. Bei sechs Klonen befand sich die Mutation in *embB497*, bei vier Klonen in *embB300* und bei einem Klon in *embB402*. Ein Klon hatte eine *missense* Mutation in *embC* und ein weiterer Klon trug eine stille Mutation in *embA*. Es gab zwei Klone, bei denen gar keine Mutationen im gesamten Operon nachweisbar waren. Dies deutet erneut

daraufhin, dass es neben den Mutationen im *embCAB* Operon weitere noch unbekannte Resistenzmechanismen geben muss.

Insgesamt betrachtet bestätigen die Ergebnisse aus der Untersuchung der Spontanmutanten die Befunde aus den Studien mit den klinischen Isolaten. Sowohl bei den EMB resistenten klinischen Isolaten als auch bei den *in vitro* selektierten EMB resistenten H37Rv Klonen wurden nahezu bei jedem untersuchten Stamm wenigstens eine Mutation in *embCAB* festgestellt. Diese Mutationen befanden sich überwiegend in *embB* (insbesondere in *embB306*). Bei den klinischen Isolaten konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sich neben den in *embCAB* detektierten Mutationen weitere Polymorphismen in deren Genom befanden. Daher konnte auch nicht mit absoluter Sicherheit gesagt werden, dass die Mutationen in *embCAB* tatsächlich für den EMB resistenten Phänotyp verantwortlich waren. Da Mutationen in *embCAB* jedoch auch bei Spontanmutanten des Laborstammes H37Rv auftraten, kann davon ausgegangen werden, dass diese Polymorphismen tatsächlich zur Entwicklung von EMB-Resistenz führen. Ein eindeutiger Beweis wurde aber erst durch die gezielte Mutagenese mittels Allelaustausch über homologe Rekombination erbracht.

5.3 Einfluss von *embB306* Mutationen auf die Entwicklung von EMB-Resistenz *in vitro* und *in vivo*

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit lag noch keine Studie vor, in der eine *embB306* Mutation in einen EMB sensiblen *M. tuberculosis* Stamm transferiert wurde. Entsprechend waren bisher keine Daten über die Auswirkung einer *embB306* Mutation in *M. tuberculosis* auf den Phänotyp in Bezug auf EMB-Resistenz verfügbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher das Wildtypallel *embB306* ATG in *M. tuberculosis* H37Rv durch die mutierten Allele *embB306* ATA, ATC und GTG ausgetauscht. Im Anschluss wurde von den generierten Mutanten die MHK für EMB bestimmt und die Resistenz *in vivo* untersucht.

Inzwischen wurde jedoch eine Studie publiziert, in der eine Punktmutation in *embB306* bei dem klinischen Stamm 210 eingeführt wurde (Safi *et al.*, 2008). Die Ergebnisse dieser Studie sind vergleichbar mit denen, die im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurden.

5.3.1 Erhöhung der MHK durch *embB306* Mutationen

Der Transfer einer *embB306* Mutation bewirkte bei jeder der generierten Mutanten eine Erhöhung der MHK für EMB. Dies ist ein eindeutiger Beweis dafür, dass *embB306* Mutationen eine Rolle in der Entwicklung von EMB-Resistenz bei *M. tuberculosis* spielen.

Auch in dieser Studie wurde beobachtet, dass eine Mutation in der ersten Base (GTG) eine höhere Resistenz verleiht als eine Mutation in der dritten Base (ATA, ATC). Es wurde zwar sowohl für die GTG-Mutanten als auch für die ATA-Mutanten eine MHK von 4 µg/ml EMB bestimmt. Aber die ATA-Mutanten zeigten deutlich schwächeres Wachstum auf 3 µg/ml EMB im Vergleich zu den GTG-Mutanten. Die Mutante, bei der eine ATC-Mutation eingeführt wurde, hatte eine MHK von 2 µg/ml EMB.

Ein ähnlich hoher Anstieg in der MHK wurde bei Studien mit *M. smegmatis* festgestellt (Belanger *et al.*, 1996; Telenti *et al.*, 1997). Auch bei der weiteren Charakterisierung der diskrepanten klinischen *M. tuberculosis* Isolate wurden entsprechende Ergebnisse in der MHK-Bestimmung erhalten (siehe Kap. 4.2.3.1). Ebenso wurden vergleichbare MHK-Werte bei einer Studie mit dem klinischen *M. tuberculosis* Stamm 210 beobachtet (Safi *et al.*, 2008). Diese Beobachtungen zeigen, dass *embB306* Mutationen entscheidend zur Entwicklung von EMB-Resistenz beitragen.

Eine *high-level* Resistenz, wie sie für einige klinische Stämme beschrieben wurde, ist durch eine *embB306* Mutation allein jedoch nicht erklärbar. Anscheinend ist die Entwicklung von *high-level* Resistenz ein mehrere Schritte umfassender Prozess (Telenti *et al.*, 1997). Dabei kommt es zur Akkumulation verschiedener Mutationen, die sowohl das Expressionsniveau der Emb-Proteine beeinflussen als auch zu strukturellen Veränderungen führen. Es können auch bislang unbekannte Gene an der Entstehung von *high-level* Resistenz beteiligt sein. Da Mutationen in *embB306* nur eine geringe Erhöhung der MHK bewirken, treten sie vermutlich in einem der ersten Schritte zur Entwicklung von *high-level* Resistenz auf.

Bei der Bestimmung der MHK für INH war kein Unterschied zwischen dem Wildtyp H37Rv und den generierten *embB306* Mutanten feststellbar. Somit gibt es keinen Hinweis darauf, dass *embB306* Mutationen mit MDR assoziiert sind (Hazbón *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2007).

5.3.2 Rolle von *embB306* Mutationen für EMB-Resistenz *in vivo*

Anhand eines EMB-Therapiemodells in der Maus wurde überprüft, ob die nachgewiesene Erhöhung der MHK durch *embB306* Mutationen von klinischer Relevanz ist.

Die Infektion erfolgte intravenös mit einer Bakteriensuspension des Wildtyps H37Rv bzw. der Mutante CP11-2-4 (GTG). Das Wachstum der Mutante war im Vergleich zum Wildtyp unter EMB-Therapie nicht beeinträchtigt. Die Mutante zeigte sowohl in den EMB behandelten als auch in den unbehandelten Mäusen uneingeschränktes Wachstum. Somit war die EMB-Therapie offenbar bei den mit der Mutante infizierten Mäusen im Gegensatz zu denen, die mit dem Wildtyp infiziert wurden, nicht wirksam. Diese Befunde führen zu der

Schlussfolgerung, dass *embB306* Mutationen auch *in vivo* einen EMB resistenten Phänotyp verleihen und somit von klinischer Relevanz sind.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass es sich bei den Tierversuchen in dieser Arbeit um vorläufige Daten handelt. Die Ergebnisse müssen durch weitere Studien erst noch bestätigt werden. Für weitere Studien wäre in Zukunft auch eine Aerosolininfektion, um den natürlichen Infektionsweg nachzuahmen, in Betracht zu ziehen.

Des Weiteren ist zu bedenken, dass es sich bei dem verwendeten *in vivo* Therapiemodell um eine EMB-Monotherapie handelt. In der Klinik wird jedoch für die Behandlung von Tbc immer eine Kombinationstherapie angewendet. Aus diesem Grund sollten für zukünftige Planungen Therapiemodelle mit einbezogen werden, bei denen mit einer Kombinationstherapie behandelt wird. Dennoch ist der Befund, dass eine *embB306* Mutation *in vivo* unter EMB-Therapie einen EMB resistenten Phänotyp verleiht, für die Klinik von Bedeutung. Mit diesem Wissen kann in der Routinediagnostik die Therapieempfehlung, bei einer Infektion mit einem EMB sensibel getesteten Stamm mit *embB306* Mutation, optimiert werden.

Zusammengefasst demonstrieren die Ergebnisse dieser Arbeit eindeutig die Bedeutung von Mutationen im *embCAB* Operon für die Entstehung von EMB-Resistenz bei klinischen *M. tuberculosis* Komplex Stämmen und widerlegen eine Korrelation mit der Ausbildung eines MDR-Phänotyps. Die Analyse eines kurzen Bereichs in *embB* ist ausreichend, um die Mehrzahl der EMB resistenten Stämme zu erfassen. Dies ermöglicht die Einführung einfacher molekularbiologischer Nachweisverfahren, deren Anwendung die Ergebnisse der EMB Resistenztestung in der Routinediagnostik deutlich verbessern könnte.

5.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mutationen in dem *embCAB* Operon (insbesondere in *embB*) mit EMB-Resistenz assoziiert sind. Die Mehrzahl der untersuchten EMB resistenten klinischen *M. tuberculosis* Isolate und der *in vitro* selektierten H37Rv Spontanmutanten besaß eine Mutation in *embCAB*. Es gab aber sowohl unter den klinischen Isolaten als auch unter den Spontanmutanten Stämme, bei denen keine Mutation im gesamten Operon nachweisbar war, obwohl ein EMB resistenter Phänotyp vorlag. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass weitere Mutationen in bisher unbekannt Genen zur Entwicklung von EMB-Resistenz beitragen. Um heraus zu finden, in welchen Genen sich diese bislang unbekannt Resistenz-assoziierten Mutationen befinden, sind Genomsequenzierungen von EMB resistenten Stämmen ohne Mutation in *embCAB* geplant. Die Identifizierung weiterer Resistenz-assoziierten Mutationen könnte neue *Targets* für die

Entwicklung von Antituberkulotika liefern oder zur Verbesserung von Methoden zur Resistenztestung beitragen.

In vorherigen Studien wurden bereits Gene vorgeschlagen, in denen Mutationen zur Entstehung von EMB-Resistenz beitragen könnten. Bei den Genen handelt es sich um *embR*, *Rv3124*, *rmlD* und *rmlA2* sowie die Gene des *ini* Operons (Alderwick *et al.*, 2006; Colangeli *et al.*, 2005; Ramaswamy *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2006a; Sharma *et al.*, 2006b). Eine Assoziation zwischen Mutationen in den gerade genannten Genen und einem EMB resistenten Phänotyp muss jedoch erst in weiteren Studien bestätigt werden.

Des Weiteren stellt sich die Frage, welche Konsequenzen die in der vorliegenden Arbeit und auch in anderen Studien beschriebenen Beobachtungen für die Resistenztestung in der Routinediagnostik nach sich ziehen werden. Eine Erniedrigung der kritischen Konzentration für EMB wäre in Betracht zu ziehen. Dadurch würden Stämme mit *embB306* Mutation als EMB resistent eingestuft werden, auch wenn sie nur über eine gering erhöhte MHK verfügen. In zukünftigen Studien muss untersucht werden, welche der zur Verfügung stehenden Methoden die genaueste zur Resistenztestung von EMB ist. Weiterhin muss die Frage geklärt werden, welche Behandlung ein Patient bekommen soll, der mit einem Stamm infiziert ist, in dem eine *embB306* Mutation nachgewiesen wurde.

Literaturverzeichnis

- Agerton, T. B., S. E. Valway, R. J. Blinkhorn, K. L. Shilkret, R. Revers, W. Schluter et al.** 1999. Spread of strain W, a highly drug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*, across the United States. *Clin. Infect. Dis.* **29**: 85-92.
- Ahmad, S., A. A. Jaber, und E. Mokaddas.** 2007. Frequency of *embB* codon 306 mutations in ethambutol-susceptible and -resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Kuwait. *Tuberc.* **87**: 123-129.
- Alcaide, F., G. E. Pfyffer, und A. Telenti.** 1997. Role of *embB* in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 2270-2273.
- Alderwick, L. J., V. Mole, L. Kremer, A. J. Cozzone, T. R. Dafforn, G. S. Besral, und K. Fütterer.** 2006a. Molecular structure of EmbR, a response element of Ser/Thr kinase signaling in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**: 2558-2563.
- Amin, A. G., R. Goude, L. Shi, J. Zhang, D. Chatterjee, und T. Parish.** 2008. EmbA is an essential arabinosyltransferase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol.* **154**: 240-248.
- Anh, D. D., M. W. Borgdorff, L. N. Van, N. T. N. Lan, T. van Gorkom, K. Kremer, und D. van Soolingen.** 2000. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype emerging in Vietnam. *Emerg. Infect.* **6**: 302-305.
- Aragón, L. M., F. Navarro, V. Heiser, M. Garrigó, M. Español, und P. Coll.** 2006. Rapid detection of specific gene mutations associated with isoniazid or rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using non-fluorescent low-density DNA microarrays. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**: 825-31.
- Aranaz, A., D. Cousins, A. Mateos, und L. Dominguez.** 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1785-1789.
- Balasubramanian, V., M.S. Pavelka, JR., S. S. Bardarov, J. Martin, T. R. Weisbrod, R. A. McAdam, B. R. Bloom, und W. R. Jacobs, JR.** 1996. Allelic exchange in *Mycobacterium tuberculosis* with long linear recombination substrates. *J. Bacteriol.* **178**: 273-279.
- Bartels, P.** 1907. Tuberkulose (Wirbelkaries) in der jüngeren Steinzeit. *Arch. Anthropol.* **6**: 243-250.
- Bastin, D. A., G. Stevenson, P. K. Brown, A. Haase, und P. R. Reeves.** 1993. Repeat unit polysaccharides of bacteria: a model for polymerization resembling that of ribosomes and fatty acid synthetase, with a novel mechanism for determining chain length. *Mol. Microbiol.* **7**: 725-734.
- Becker, A. und A. Pühler.** 1998. Specific amino acid substitutions in the proline-rich motif of the *Rhizobium meliloti* ExoP protein result in enhanced production of low-molecular-weight succinoglycan at the expense of high-molecular-weight succinoglycan. *J. Bacteriol.* **180**: 395-399.
- Beggs, W. H., und F. A. Andrews.** 1973. Nonspecific ionic inhibition of ethambutol binding by *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **4**: 115-119.
- Beggs, W. H., und N. E. Williams.** 1971. Protection of *Mycobacterium smegmatis* from ethambutol and streptomycin inhibition by MgSO₄ and polyamines. *Infect. Immun.* **3**: 496-

497.

Bekierkunst, A. 1968. Acute granulomatous response produced in mice by trehalose-6,6'-dimycolate. *J. Bacteriol.* **96**: 958-961.

Belanger, A. E., G. S. Besra, M. E. Ford, K. Mikušová, J. T. Belisle, P. J. Brennan, and J. M. Inamine. 1996. The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for antimycobacterial drug ethambutol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 11919-11924.

Berg, S., J. Starbuck, J. B. Torrelles, V. D. Vissa, D. C. Crick, D. Chatterjee, und P. J. Brennan. 2005. Roles of conserved proline and glycosyltransferase motifs of EmbC in biosynthesis of lipoarabinomannan. *J. Biol. Chem.* **280**: 5651-5663.

Besra, G. S., C. M. Morehouse, C. M. Rittner, C. J. Wächter, und P. J. Brennan. 1997. Biosynthesis of mycobacterial lipoarabinomannan. *J. Biol. Chem.* **272**: 18460-18466.

Besra, G. S., T. Sievert, R. E. Lee, R. A. Slayden, P. J. Brennan, und K. Takayama. 1994. Identification of the apparent carrier in mycolic acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 12735-12739.

Besra, G. S., und P. J. Brennan. 1997. The mycobacterial cell wall: biosynthesis of arabinogalactan and lipoarabinomannan. *Biochem. Soc. Trans.* **25**: 845-850.

Bifani, P. J., B. B. Plikaytis, V. Kapur, K. Stockbauer, X. Pan, M. L. Lutfey, et al. 1996. Origin and interstate spread of a New York City multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. *JAMA.* **275**: 452-457.

Birnboim, H.C., J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523.

Bobrowitz, I. D., M. Garber, und Y. Suku-Malchantra. 1963. The use of ethambutol in pulmonary tuberculosis. *Trans. Res. Conf. Pulmonary Diseases.* 22nd, Washington, DC, 254-261.

Böttger, E. C. 2001. Die Familie der *Mycobacteriaceae*. In: W. Köhler, H. J. Eggers, B. Fleischer, R. Marre, und G. Pulverer (Hrsg.): *Medizinische Mikrobiologie*. 8. Aufl., Urban Fischer, München, Jena, 407-434.

Brennan, P. J. 1988. *Mycobacterium* and other Actinomycetes. In: C. Ratledge und S. G. Wilkinson (Hrsg.): *Microbial Lipids*. Academic Press, Ltd., London, 203-298.

Brennan, P. J., und H. Nikaido. 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 29-63.

Briken, V., S. A. Porcelli, G. S. Besra, und L. Kremer. 2004. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol. Microbiol.* **53**: 391-403.

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

Brudey, K., J. R. Driscoll, L. Rigouts, W. M. Prodinger, A. Gori, S.A. Al-Hajoj, C. Allix, L. Aristimuño, J. Arora, V. Baumanis, L. Binder, P. Cafrune, A. Cataldi, S. Cheong, R. Diel, C. Ellermeier, J. T. Evans, M. Fauville-Dufaux, S. Ferdinand, D. Garcia de Viedma, C. Garzelli, L. Gazzola, H. M. Gomes, M. C. Gutierrez, P. M. Hawkey, P. D. van Helden, G. V. Kadiwal, B. N. Kreiswirth, K. Kremer, M. Kubin, S. P. Kulkarni, B. Liens, T.

- Lillebaek, M. L. Ho, C. Martin, C. Martin, I. Mokrousov, O. Narvskaja, Y. F. Ngeow, L. Naumann, S. Niemann, I. Parwati, Z. Rahim, V. Rasolofo-Razanamparany, T. Rasolonavalona, M. L. Rossetti, S. Rüsck-Gerdes, A. Sajduda, S. Samper, I. G. Shemyakin, U. B. Singh, A. Somoskovi, R. A. Skuce, D. van Soolingen, E. M. Streicher, P. N. Suffys, E. Tortoli, T. Tracevska, V. Vincent, T. C. Victor, R. M. Warren, S. F. Yap, K. Zaman, F. Portaels, N. Rastogi, C. Sola. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.* **6**: 23.
- Brudney, K., und J. Dobkin. 1991. Resurgent tuberculosis in New York city. *Am. Rev. Respir. Dis.* **144**: 745-749.
- Canetti, G. 1955. The tubercle bacillus in the pulmonary lesion of man. Springer, New York.
- Canetti, G, W. Fox, A. Khomenko, H. T. Mahler, N. K. Menon, D. A. Mitchison, N. Rist, und N. A. Smelev. 1969. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis programmes. *Bull. WHO* **41**: 21.
- Canetti, G., S. Froman, J. Grosset, P. Hauduroy, M. Langerova, H. T. Mahler, G. Meissner, D. A. Mitchison, und L. Sula. 1963. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull. WHO* **29**: 565
- Chan, J., X. D. Fan, S. W. Hunster, P. J. Brennan, und B. R. Bloom. 1991. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect. Immun.* **59**: 1755-1761.
- Chatterjee, D., K. Lowell, B. Rivoire, M. R. McNeil, und P. J. Brennan. 1992. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **267**: 6234-6239.
- Chou, Q., M. Russel, D. E. Birch, J. Raymond, und W. Bloch. 1992. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res.* **20**: 1717-1723.
- Colangeli, R., D. Helb, S. Sridharan, J. Sun, M. Varma-Basil, M. Hazbón, R. Harbacheuski, N. J. Megjugorac, W. R. Jacobs JR, A. Holzenburg, J. C. Sacchettini, und D. Alland. 2005. The *Mycobacterium tuberculosis iniA* gene is essential for activity of an efflux pump that confers drug tolerance to both isoniazid and ethambutol. *Mol. Microbiol.* **55**: 1829-1840.
- Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, F. Tekai, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, T. S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, B. G. Barrell. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. **393**: 537-544. Erratum in: *Nature* **396**:190.
- Corti, M., und D. Palmero. 2008. *Mycobacterium avium* complex infection in HIV/AIDS patients. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* **6**:351-363.
- Cousins, D. V., R. Bastida, A. Cataldi, V. Quse, S. Redrobe, S. Dow, P. Duignan, A. Murray, C. Dupont, N. Ahmed, D. M. Collins, W. R. Butler, D. Dawson, D. Rodriguez, J. Loureiro, M. I. Romano, A. Alito, M. Zumarraga, und A. Bernardelli. 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1305-1314.
- Cox, H. S., T. Kubica, D. Doshetov, Y. Kebede, S. Rüsck-Gerdes, und S. Niemann.

2005. The Beijing genotype and drug resistant tuberculosis in the Aral Sea region of Central Asia. *Respir. Res.* **6**:134.

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

Daffé, M., M. A. Lanéelle, und C. Lacave. 1991. Structure and stereochemistry of mycolic acids of *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium ulcerans*. *Res. Microbiol.* **142**: 397-403.

Daffé, M., P. J. Brennan, und M. McNeil. 1990. Predominant structural features of the cell wall arabinogalactan of *Mycobacterium tuberculosis* revealed through characterization of oligoglycosyl alditol fragments by gas chromatography/ mass spectrometry and by ¹H und ¹³C NMR analyses. *J. Biol. Chem.* **265**: 6734-6743.

Daffé, M., und G. Etienne. 1999. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tubercle Lung Dis.* **79**: 153-169.

Daffé, M., und P. Draper. 1998. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Advances in Microbial Physiology.* **39**: 131-203.

Daniel, T. 2006. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine* **100**: 1862-1870.

David, H. L. 1981. Basis for lack of drug susceptibility of atypical mycobacteria. *Rev. Infect. Dis.* **3**: 878-884.

Daniels, C., und R. Morona. 1999. Analysis of *Shigella flexneri* wzz (Rol) function by mutagenesis and cross-linking: wzz is able to oligomerize. *Mol. Microbiol.* **34**: 181-194.

Deng, L., K. Mikušová, K. G. Robuck, M. Scherman, P. J. Brennan, und M. R. McNeil. 1995. Recognition of multiple effects of ethambutol on metabolism of mycobacterial cell envelope. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 694-701.

Deutsches Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose. 1992. Die Bakteriologie der Tuberkulose. Revidierter Nachdruck aus Pneumologie **45** (1991): 753-774, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 39-47.

Deutsches Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose. 2008. 31. Informationsbericht.

Dower, W.J., J.F. Miller, und C.W. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16**: 6127-6145.

Escuyer, V. E., M.-A. Lety, J. B. Torrelles, K.-H. Khoo, J.-B. Tang, C. D. Rithner, C. Frehel, M. R. McNeil, P. J. Brennan, und D. Chatterjee. 2001. The role of the *embA* and *embB* gene products in the biosynthesis of the terminal hexaarabinofuranosyl motif of *Mycobacterium smegmatis* Arabinogalactan. *J. Biol. Chem.* **276**: 48854-48862.

Euzéby, J. P. 2008. List of prokaryotic names with standing in nomenclature – genus *Mycobacterium*. <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>

Fischeder, R., R. Schulze-Röbbecke, und A. Weber. 1991. Occurrence of ycobacteria in drinking water samples. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* **192**: 154-158.

Forbes, M., N. A. Kuck, und E. A. Peets. 1965. Effects of ethambutol on nucleic acid metabolism in *Mycobacterium smegmatis* and ist reversal by polyamines and divalent cations. *J. Bacteriol.* **89**: 1299-1305.

Forbes, M., N. A. Kuck, und E. A. Peets. 1962. Mode of action of ethambutol.

Experimental Therapeutics Research. **84**: 1099-1103.

Furney, S. K., A. D. Roberts, und I. M. Orme. 1990. Effect of rifabutin on disseminated *Mycobacterium avium* infections in thymectomized, CD4 t-cell-deficient mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 1629-1632.

Gale, G. R., und H. H. McLain. 1963. Effect of ethambutol on cytology of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **86**: 749-756.

Gevaudan, M. J., C. Bollet, M. N. Mallet, und P. de Micco. 1993. In-vitro evaluation of clarithromycin, temafloxacin, and ethambutol in combination against *Mycobacterium avium* complex. *J. Antimicrob. Chemother.* **31**: 725-730.

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

Goodfellow, M., und D. E. Minnikin. 1981. Classification of nocardioform bacteria. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. 1. Abteilung, Originale, Supplement* **11**: 7-16.

Goude, R., A. G. Amin, D. Chatterjee, und T. Parish. 2008. The critical role of *embC* in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **190**: 4335-4341.

Gandhi, N. R., A. Moll, A. W. Sturm, R. Pawinski, T. Govender, U. Lalloo, K. Zeller, J. Andrews, und G. Friedland. 2006. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *The Lancet*. **368**: 1575-80.

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

Hanna, B. A., A. Ebrahimzadeh, L. B. Elliott, M. A. Morgan, S. M. Novak, S. Rusch-Gerdes, M. Acio, D. F. Dunbar, T. M. Holmes, C. H. Rexer, C. Savthyakumar, und A. M. Vannier. 1999. Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 748-52.

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

Hazbón, M. H., M. Bobadilla del Valle, M. I. Guerrero, M. Varma-Basil, I. Filliol, M. Cavatore, R. Colangeli, H. Safi, H. Billman-Jacobe, C. Lavender, J. Fyfe, L. García-García, A. Davidow, M. Brimacombe, C. I. León, T. Porras, M. Bose, F. Chaves, K. D. Eisenach, J. Sifuentes-Osornio, A. Ponce der León, M. D. Cave, und D. Alland. 2005. Role of *embB* codon 306 mutations in *Mycobacterium tuberculosis* revisited: a novel association with broad drug resistance and IS6110 clustering rather than ethambutol resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 3794-3802.

Heifets, L. B. 1982. Synergistic effects of rifampicin, streptomycin, ethionamide, and ethambutol on *Mycobacterium intracellulare*. *Am. Rev. Respir. Dis.* **125**: 43-48.

Heifets, L. B., M. D. Iseman, und P. J. Lindholm-Levy. 1986. Ethambutol MICs and MBCs for *Mycobacterium avium*-complex and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents*

Chemother. **30**: 927-932.

Heifets, L. B. 1991. Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Hengen, P. 1996. Carriers for precipitating nucleic acids. *Trends in Biochemical Sciences* **21**: 224-225.

Heym, B., N. Honoré, C. Truffot-Pernot, A. Banerjee, C. Schurra, W. R. Jacobs JR, J. D. A. van Embden, J. H. Grosset, und S. T. Cole. 1994. Implications of multidrug resistance for the future of short course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. *Lancet.* **344**: 293-298.

Hillemann, D., M. Weizenegger, T. Kubica, E. Richter, und S. Niemann. 2005. Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 3699-3703.

Hoffner, S., S. B. Svenson, und G. Källenius. 1987. Synergistic effect of antimycobacterial drug combinations on *Mycobacterium avium* complex determined radiometrically in liquid medium. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **6** : 530-535.

Homolka, S., E. Post, B. Oberhauser, A. Garawani George, L. Westman, F. Dafaie, S. Rüsç-Gerdes, und S. Niemann. 2008. High genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from Sierra Leone. *BMC Microbiol.* **8**: 103.

Iseman, M. D. 1988. Synergism: the rosetta stone for *Mycobacterium avium* complex chemotherapy? *Am. Rev. Respir. Dis.* **138**: 767-768.

Isola, D., M. Pardini, F. Varaine, S. Niemann, S. Rüsç-Gerdes, L. Fattorini, G. Orefici, F. Meacci, C. Trappetti, M. Rinaldo Oggioni, the LUNG-DRUG study group, Germano Orrù. 2005. A pyrosequencing assay for rapid recognition of SNPs in *Mycobacterium tuberculosis* embB306 region. *J. Microbiol. Met.* **62**: 113-120.

Jarlier, V. und H. Nikaido. 1994. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol. Letters.* **123**: 11-18.

Jarlier, V., und H. Nikaido. 1990. Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *J. Bacteriol.* **172**: 1418-1423.

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

Jensen, K. A. 1985. Second report of the sub committee of laboratory methods of the International Union Against Tuberculosis. *Bull. Intern. Union Tuberc.* **25**, 89.

Källenius, G., S. B. Svenson, und S. E. Hoffner. 1989. Ethambutol: a key for *Mycobacterium avium* complex chemotherapy? *Am. Rev. Respir. Dis.* **140**: 264.

Karlson, A. G. 1961. The in vitro activity of ethambutol (dextro-2,2'-(ethylene-diimino) di-1-butanol) against tubercle bacilli and other microorganisms. *Am. Rev. Respir. Dis.* **84**: 905-906.

Karlson, A. G., und D. T. Carr. 1961. Effect of cortisone plus antituberculous pneumonia in guinea pigs. *Proc. Staff Meet. Mayo. Clin.* **36**: 394-401.

Kato, M. 1970. Site II-specific inhibition of mitochondria oxidative phosphorylation by trehalose-6,6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **140**: 379-390.

- Khatter, S., U. B. Singh, J. Arora, T. Rana, und P. Seth.** 2008. Mycobacterial infections in human immuno-deficiency virus seropositive patients: role of non-tuberculous mycobacteria. *Indian J. Tuberc.* 55:28-33.
- Khoo, K. H., A. Dell, H. R. Morris, P. J. Brennan, und D. Chatterjee.** 1995. Inositol phosphate capping of the nonreducing termini of lipoarabinomannan from rapidly growing strains of *Mycobacterium*. *J. Biol. Chem.* 270: 12380-12389.
- Kayser, F. H., K. A. Bienz, J. Eckert, und R. M. Zinkernagel.** 2001. Medizinische Mikrobiologie, Kap. 4.8, 273-282.
- Khoo, K. H., E. Douglas, P. Azadi, J. M. Inamine, G. S. Besra, K. Mikušová, P. J. Brennan, und D. Chatterjee.** 1996. Truncated structural variants of lipoarabinomannan in ethambutol drug-resistant strains of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biol. Chem.* 271: 28682-28690.
- Kilburn, J. O., K. Takayama, E. L. Armstrong, und J. Greenberg.** 1981. Effects of ethambutol on phospholipid-metabolism in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19: 346-348.
- Kilburn, J. O., und J. Greenberg.** 1977. Effect of ethambutol on viable cell count in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11: 534-540.
- Kilburn, J. O., und K. Takayama.** 1981. Effects of ethambutol on accumulation and secretion of trehalose mycolates and free mycolic acids in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20: 401-404.
- Koch, R.** 1882. Die Aetiologie der Tuberculose. Berliner klinische Wochenschrift.
- Koch, R.** 1890. Weitere Mitteilungen über ein Heilmittel gegen Tuberkulose. *Dt. Med. Wschr.* 16: 1029-1032.
- Konno, K., F. M. Feldman, und W. McDermont.** 1967. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of the tubercle bacilli. *Am. Rev. Respir. Dis.* 95: 461-469.
- Kremer, L., und G. S. Besra.** 2005. A waxy tale, by *Mycobacterium tuberculosis*. In: S. T. Cole, K. Davis Eisenach, D. N. McMurray, und W. R. Jacobs, JR (Hrsg.): *Tuberculosis und the tubercle bacillus*. ASM Press, Washington DC, 287-309.
- Kropp, R., und G. Siemon.** 1999. Therapie der Tuberkulose. In: N. Konietzko und R. Loddenkemper (Hrsg.): *Tuberkulose*, Georg Thieme, Stuttgart, New York, Kap. 7, 106-146.
- Kwon, H. H., H. Tomioka, und H. Saito.** 1995. Distribution and characterization of β -lactamases of mycobacteria and related organisms. *Tuberc. Lung. Dis.* 76: 141-148.
- Laszlo, A. und R. Michaud.** 1984. Primary isolation, preliminary identification and drug susceptibility testing of mycobacteria (*M. tuberculosis* complex) by rapid radiometric method. *Bull. Int. Union Tuberc.* 59: 185.
- Lederer, E., A. Adam, R. Ciorbaru, J. F. Petit, und J. Wietzerbin.** 1975. Cell walls of mycobacteria and related organisms; chemistry und immunostimulant properties. *Mol. Cell. Biochem.* 7: 87-104.
- Lee, A. S. G., S. N. K. Othman, Y. Min ho, und S. Yew Wong.** 2004. Novel mutations within the *embB* gene in ethambutol-susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 4447-4449.
- Lee, H., H.-J. Myoung, H.-E. Bang, G.-H. Bai, S.-J. Kim, J.-D. Kim, und S.-N. Cho.** 2002. Mutations in the *embB* locus among Korean clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*

resistant to ethambutol. *Yonsei Medical Journal*. **43**: 59-64.

Lehmann, I. R., und A. L. Nussbaum. 1964. The desoxyribonucleases of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **239**: 2628-2636.

Lemassu, A., und M. Daffé. 1994. Structural features of the exocellular polysaccharides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.* **297**: 351-357.

Lety, M. A., S. Nair, P. Berche, und V. Escuyer. 1997. A single point mutation in the *embB* gene is responsible for resistance to ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 2629-2633.

Liu, J., und A. Mushegian. 2003. Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases. *Prot. Sci.* **12**: 1418-1431.

Löffler, W. 1958. Geschichte der Tuberkulose. In: J. Hein, H. Kleinschmidt, und E. Uehlinger (Hrsg.): Handbuch der Tuberkulose. Band 1, Georg Thieme, Stuttgart, New York.

Lundberg, K. S., D. D. Shoemaker, M. W. Adams, J. M. Short, J. A. Sorge, und E. J. Marthur. 1991. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene.* **108**: 1-6.

Mac, J. T., A. Doordan, C. A. Carr. 1999. Evaluation of the effectiveness of a directly observed therapy program with Vietnamese tuberculosis patients. *Public Health Nurs.* **16**: 426-431.

Madigan, M. T., J. M. Martinko, und J. Parker. 2001. Grampositive Bakterien mit hohem GC-Gehalt: *Mycobacterium*. In W. Goebel (Hrsg.): Brock – Mikrobiologie. Spektrum, Heidelberg, Berlin, 575-577.

Magdorf, K., und M. Stoll. 2004. Tuberkulose. In: D. Adam, H. W. Doerr, H. Link, und H. Lode (Hrsg.): *Die Infektiologie*. Springer, Berlin u. a.O., 696-731.

Maher, D., R. Gupta, M. Uplekar, C. Dye, und M. Raviglione. 2000. Directly observed therapy and treatment adherence. *Lancet.* **356**: 1031-1032.

Martin, C., J. Timm, J. Rauzier, R. Gomez-Lus, J. Davies, und B. Gicquel. 1990a. Transposition of an antibiotic resistant element in mycobacteria. *Nature.* **345**: 739-743.

Martin, C., M. Ranes, und B. Gicquel. 1990b. Plasmids, antibiotic resistance, and mobile elements in mycobacteria. In J. McFadden (Hrsg.): Molecular biology of the mycobacteria. Surrey University Press, Guilford, Surrey, United Kingdom, 121-138.

Matsushashi, M. 1966. Biosynthesis in the bacterial cell wall. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* **11**: 875-886.

McGray, E., C. M. Weinbaum, C. R. Bradden, und I. Onorato. 1997. The epidemiology of tuberculosis in the United States. In M. D. Iseman (Hrsg.): Clinics in chest medicine. W. B. Saunders Company, 99-113.

McNeil, M., M. Daffé, und P. J. Brennan. 1990. Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls. *J. Biol. Chem.* **265**: 18200-18206.

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

McNeil, M., S. J. Wallner, S. W. Hunter, und P. J. Brennan. 1987. Demonstration that the galactosyl and arabinosyl residues in the cell wall arabinogalactan of *Mycobacterium leprae*

und *Mycobacterium tuberculosis* are furanoid. *Carbohydr. Res.* **166**: 299-308.

Mendel, F. 1908. Die von Pirquetsche Hautreaktion und intravenöse Tuberkulinbehandlung. *Medizinische Klinik* **4**: 402.

Middlebrook, G., Z. Reggiardo, und W. D. Tigertt. 1977. Automatable radiometric detection of growth of *Mycobacterium tuberculosis* in selective media. *Am. Rev. Respir. Dis.* **115**: 1067.

Mikušová, K., R. A. Slayden, G. S. Besral, und P. J. Breannan. 1995. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 2484-2489.

Mokrousov, I., O. Narvskaya, E. Limeschenko, T. Otten, und B. Vyshnevskiy. 2002a. Detection of ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by multiplex allele-specific PCR assay targeting *embB306* mutations. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 1617-1720.

Mokrousov, I., T. Otten, B. Vyshnevskiy, und O. Narvskaya. 2002b. Detection of *embB306* mutations in ethambutol-susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from northwestern Russia: Implications for genotypic resistance testing. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 3810-3813.

Mordarski, M., I. Kaszen, A. Tkacz, M. Goodfellow, G. Alderson, K. P. Schaal, und G. Pulverer. 1981. Deoxyribonucleic acid pairing in the classification of the genus *Rhodococcus*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. 1. Abteilung, Originale, Supplement* **11**: 25-31.

Morgenroth, K., und R. Schnabel. 1999. Pathogenese und Pathomorphologie der Tuberkulose. In N. Konietzko und R. Loddenkemper (Hrsg): Tuberkulose, Thieme, Stuttgart, New York, 79-88.

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

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

Niemann, S., E. Richter, H. Dalügge-Tamm, H. Schlesinger, D. Graupner, B. Königstein, G. Gurath, U. Greinert, und S. Rüscher-Gerdes. 2000. Two cases of *Mycobacterium microti*-derived tuberculosis in HIV-negative, non-immunosuppressed patients. *Emerg. Infect. Dis.* **6**: 539-542.

Niemann, S., und S. Rüscher-Gerdes. 2003. Mycobacteria und TB – therapy and drug resistance. In: S. H. E. Kaufmann, und H. Hahn (Hrsg.): *Mycobacteria und TB*. Karger, Basel u. a.O., 84-96.

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

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

Nigou, J., M. Gilleron, M. Rojas, L. F. Garcia, M. Thurnher, und G. Puzo. 2002. Mycobacterial lipoarabinomannans: modulators of dendritic cell function and the apoptotic

response. *Microbes Infect.* **4**: 945-953.

Nigou, J., M. Gilleron, und G. Puzo. 2003. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie* **85**: 153-166.

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

O'Reilly, L. M., und C. J. Daborn. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuberc. Lung Dis.* **76**: 1-46.

Oriol, R., I. Martinez-Duncker, I. Chantret, R. Mollicone, und P. Codogno. 2002. Common origin and evolution of glycosyltransferases using Dol-P-monosaccharides as donor substrate. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 1451-1463.

Ortalo-Magné, A., M. A. Dupont, A. Lemassu, Å. B. Undersen, P. Gaunon, und M. Daffé. 1995. Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology.* **141**: 1609-1620.

Ozeki, Y., K. Kaneda, N. Fujiwara, M. Morimoto, S. Oka, und I. Yano. 1997. In vivo induction of apoptosis in the thymus by administration of mycobacterial cord factor (trehalose-6,6'-dimycolate). *Infect. Immun.* **65**: 1793-1799.

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

Park, S.-H., und A. Bendelac. 2000. CD1-restricted T-cell responses und microbial infection. *Nature.* **406**: 788-792.

Parsons, L. M., M. Salfinger, A. Clobridge, J. Dormandy, L. Mirabello, V. L. Polletta, A. Sanic, O. Sinyavskiy, S. C. Larsen, J. Driscoll, G. Zickas, und H. W. Taber. 2005. Phenotypic and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to both isoniazid and ethambutol. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 2218-2225.

Paulin, L. G., E. E. Brander, und H. J. Pösö. 1985. Specific inhibition of spermidine synthesis in *Mycobacteria* spp. by the dextro isomer of ethambutol. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**: 157-159.

Pavelka, M. S., und W. R. Jacobs, JR. 1999. Comparison of the construction of unmarked deletion mutations in *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin, und *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv by allelic exchange. *J. Bacteriol.* **181**: 4780-4789.

Pelicic, V., J. M. Reyrat, und B. Gicquel. 1996. Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J. Bacteriol.* **178**: 1197-1199.

Pfaff, K. 1904. Bericht über städtische Ausgrabungen 1901-1904. *Korrespondenzbl. Der Westdeutschen Zeitschrift*, 3-8.

Pösö, H., L. Paulin, und E. Brander. 1983. Specific inhibition of spermidine synthase from mycobacteria by ethambutol. *Lancet.* **ii**: 1418.

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

Rastogi, N., K. S. Goh, und H. L. David. 1990. Enhancement of drug susceptibility of *Mycobacterium avium* by inhibitors of the cell envelope synthesis. *Antimicrob. Agents*

Chemother. 34: 759-764.

Raviglione, M. C., H. L. Rieder, K. Styblo, A. G. Khomenko, K. Esteves, und A. Kochi. 1994. Tuberculosis trend in Eastern Europe and the former USSR. *Tuberc. Lung Dis.* **75**: 400-416.

Raviglione, M. C., D. E. Snider, und A. Kochi. 1995. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* **273**: 220-226.

Rinder, H., K. T. Mieskes, E. Tortoli, E. Richter, M. Casal, M. Vaquero, E. Cambau, K. Feldmann, und T. Loscher. 2001. Detection of *embB* codon 306 mutations in ethambutol resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum samples: a low-cost, rapid approach. *Moll. Cell. Probes.* **15**: 37-42.

Riska, P. F., W. R. Jacobs JR, und D. Alland. 2000. Molecular determinants of drug resistance. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **4**: S4-S10.

RKI-Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland 2001. 2003.

RKI-Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland 2006. 2008.

Runyon, E. H., L. G. Wayne, und G. P. Kubica. 1974. *Actinomycetes* and related organisms. In: R. E. Buchanan und N. E. Gibbons (Hrsg.): *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins Co., Baltimore, 681-701.

Ryll, R., K. Watanabe, N. Fujiwara, H. Takimoto, R. Hasunuma, Y. Kumazawa, M. Okada, und I. Yano. 2001. Mycobacterial cord factor, but not sulfolipid, causes depletion of NKT cells and upregulation of CD1d1 on murine macrophages. *Microbes Infect.* **3**: 611-619.

Safi, H., B. Sayers, M. H. Hazbón, und D. Alland. 2008. Transfer of *embB306* mutations into clinical *Mycobacterium tuberculosis* alters susceptibility to ethambutol, isoniazid and rifampin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 2027-2034.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239**: 487-491.

Salo, W. L., A. C. Aufderheide, J. Buikstra, und T. A. Holcomb. 1994. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2091-2098.

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

Sanger, F., S. Nicklen, und A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

Saribas, Z., P. Yurdakul, A. Alp, und A. Gunalp. 2005. Use of fluorescence resonance energy transfer for rapid detection of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **9**: 181-187.

Schleifer, K. H., und O. Kandler. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls und their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**: 407-477.

Schulze-Röbbecke, R. 1993. Mycobacteria in the environment. *Immun. Infekt.* **21**: 126-131.

Scorpio, A. und Y. Zhang. 1996. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat. Med.* **2**: 662-667.

- Scorpio, A., D. Collins, D. Whipple, D. Cave, J. Bates, und Y. Zhang.** 1997. Rapid differentiation of bovine and human tubercle bacilli based on characteristic mutation in the bovine pyrazinamidase gene. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 106-110.
- Seidel, M., L. J. Alderwick, H. Sahm, G. S. Besral, und L. Eggeling.** 2007. Topology and mutational analysis of the single Emb arabinosyltransferase of *Corynebacterium glutamicum* as a model of Emb proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology.* **17**: 210-219.
- Sekiguchi, J., T. Miyoshi-Akiyama, E. Augustynowicz-Kopec, Z. Zwolska, F. Kirikae, E. Toyota, I. Kobayashi, K. Morita, K. Kudo, S. Kato, T. Kuratsuji, T. Mori, und T. Kirikae.** 2007. Detection of multi-drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 179-192.
- Sharma, K., M. Gupta, A. Krupa, N. Srinivasan, und Y. Singh.** 2006a. EmbR, a regulatory protein with ATPase activity, is a substrate of multiple serine/threonine kinases and phosphatases in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Journal.* **273**: 2711-2721.
- Sharma, K., M. Gupta, M. Pathak, N. Gupta, A. Koul, S. Sarangi, R. Baweja, und Y. Singh.** 2006b. Transcriptional control of the mycobacterial *embCAB* operon by PknH through a regulatory protein, EmbR, in vitro. *J. Bacteriol.* **188**: 2936-2944.
- Shen, X., G. Shen, J. Wu, X. Gui, X. Li, J. Mei, K. DeRiemer, und Q. Gao.** 2007. Association between *embB* codon 306 mutations and drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 2618-2620.
- Shi, L., S. Berg, A. Lee, J. S. Spencer, J. Zhang, V. Vissa, M. R. McNeil, K.-H. Khoo, und D. Chatterjee.** 2006. The carboxyl terminus of EmbC from *Mycobacterium smegmatis* mediates chain length extension of the arabinan in lipoarabinomannan. *J. Biol. Chem.* **281**: 19512-19526.
- Shi, R., J. Zhang, K. Otomoto, G. Zhang, und I. Sugawara.** 2007. Lack of correlation between *embB* mutation and ethambutol MIC in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 4515-4517.
- Silve, G. S., P. Valero-Guillen, A. Quemard, M.-A. Dupont, M. Daffé, und G. Laneelle.** 1993. Ethambutol inhibition of glucose metabolism in mycobacteria: a possible target of the drug. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 1536-1538.
- Southern, E. M.** 1974. An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose. *Analyt. Biochem.* **62**: 317-318.
- Sreevatsan, S., K. E. Stockbauer, X. Pan, B. N. Kreiswirth, S. L. Moghazeh, W. R. Jacobs JR, A. Telenti, und J. M. Musser.** 1997. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 1677-1681.
- Srivastava, S., A. Garg, A. Ayyagari, K. K. Nyati, T. N. Dhole, und S. K. Dwivedi.** 2006. Nucleotide polymorphism associated with ethambutol resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Microbiol.* **53**: 401-405.
- Stover, C. K., V. F. de la Cruz, T. R. Fuerst, J. E. Buerlein, L. A. Benson, L. T. Bennett, G. P. Bansal, J. F. Young, M. H. Lee, G. F. Hatfull, S. B. Snapper, R. G. Barletta, W. R. Jacobs JR, und B. R. Bloom.** 1991. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature.* **351**: 456-460.
- Szewzyk, U., R. Szwezyk, W. Manz, und K.H. Schleifer.** 2000. Mycobacterial safety of drinking water. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 80-127.
- Takayama, K., E. L. Armstrong, K. A. Kunugi, und J. O. Kilburn.** 1979. Inhibition by ethambutol of mycolic acid transfer into the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*.

Antimicrob. Agents Chemother. **16**: 240-242.

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

Telenti, A., W. J. Philipp, S. Sreevatsan, C. Bernasconi, K. E. Stockbauer, B. Wieles, J. M. Musser, und W. R. Jacobs JR. 1997. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat. Med.* **3**: 567-570.

Thomas, J., C. Baughn, R. Wilkonson, und R. Shepherd. 1961. A new synthetic compound with antituberculous activity in mice: ethambutol (dextro-2,2'-(ethylenediimino)-di-butanol. *Am. Rev. Res. Dis.* **83**: 891-893.

Tracevska, T., I. Jansone, A. Nodieva, O. Marga, G. Skenders, und V. Baumanis. 2004. Characterisation of *rpsL*, *rrs* and *embB* mutations associated with streptomycin and ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Res. Microbiol.* **155**: 830-834.

Van Rie, R. Warren, I. Mshanga, A. M. Jordan, G. D. van der Spuy, M. Richardson, J. Simpson, R. P. Gie, D. A. Enarson, N. Beyers, P. D. van Helden, und T. C. Victor. 2001. Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in a high-incidence community. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 636-641.

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

Vercellone, A., J. Nigou, und G. Puzo. 1998. Relationships between the structure and the roles of lipoarabinomannans and related glycoconjugates in tuberculosis pathogenesis. *Front. Biosci.* **3**: e149-e163.

Villemin, J. A. 1865. Cause et nature de la tuberculose. Paris, Zit. Nach M. Oury : Geschichte der Tuberculose. In R. Töllner (Hrsg.): Illustrierte Geschichte der Medizin, Band 5, Salzburg 1986.

Warren, R. M., S. S. Shah, und D. Alland. 1997. Multiple drug resistance: a world-widethreat. In A. Malin, und K. P. W. J. McAdam (Hrsg.): Baillière's clinical infectious diseases, international practice and research. Mycobacterial diseases part I: clinical frontiers. London: Baillière Tindall, **4**: 77-96.

Wayne, L. G., und C. D. Sohaskey. 2001. Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 139-163.

WHO. 1993. Tuberculosis: a global emergency. *World Health Forum.* **14**: 438. www.who.int

WHO. 2003. Treatment of tuberculosis: guidelines for national programmes. The World Health Organization, Genf. www.who.int

WHO. 2003. Report 2003: Global tuberculosis control – surveillance, planning, financing. www.who.int

WHO. 2006. www.who.int

WHO. 2008. Global tuberculosis control 2008 – surveillance, planning, financing. www.who.int

WHO. 2008. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report Nr. 4. www.who.int

Wilkinson, R. G., R. Shepard, J. Thomas, und C. Baughn. 1961. Stereospecificity in a new

type of synthetic antituberculous agent. *J. Am. Chem. Soc.* **83**: 2212-2213.

Winder, F. 1982. Mode of action of the antimycobacterial agents and associated aspects of the molecular biology of mycobacteria. In: C. Ratledge, und J. Stanford (Hrsg.): *The biology of mycobacteria*. Academic Press, New York, 354-438.

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

Wolucka, B. A., M. R. McNeil, E. de Hoffmann, T. Chojnacki, und P. J. Brennan. 1994. Recognition of the lipid intermediate for arabinogalactan/arabinomannan biosynthesis and its relation to the mode of action of ethambutol on mycobacteria. *J Biol. Chem.* **269**: 23328-23335.

Wu, X., J. Liang, J. Zhang, Y. Lu, H. Li, G. Zhang, G. Yan, und B. Ding. 2005. Detection and evaluation of the mutations of *embB* gene in ethambutol-susceptible and resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *Chinese Med. J.* **118**: 1739-1741.

Yamagami, H., T. Matsumoto, N. Fujiwara, T. Arakawa, K. Kaneda, I. Yano, und K. Kobayashi. 2001. Trehalose-6,6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign-body and hypersensitivity-type granulomas in mice. *Infect. Immun.* **69**: 810-815.

Zhang, N., J. B. Torrelles, M. R. McNeil, V. Escuyer, K.-H. Khoo, P. J. Brennan, und D. Chatterjee. 2003. The Emb proteins of mycobacteria direct arabinosylation of lipoarabinomannan and arabinogalactan via N-terminal recognition region and C-terminal synthetic region. *Mol. Microbiol.* **50**: 69-76.

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

Zhang, Y., C. Vilchèze, und W. R. Jacobs, JR. 2005. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: S. T. Cole, K. Davis Eisenach, D. N. McMurray, und W. R. Jacobs JR (Hrsg.): *Tuberculosis and the tubercle bacillus*. ASM Press, Washington, DC. 115- 140.

Zhao, J. R., Y. J. Bai, Y. Wang, Q. H. Zhang, M. Luo, X. J. Yan. 2005. Development of a pyrosequencing approach for rapid screening of rifampin, isoniazid and ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **9**: 328-332.

Ziehl, F. H. 1882. Zur Färbung des Tuberkelbacillus. *Dt. Med. Wschr.* **8**: 451.

Zimmer, B. L., D. R. DeYoung, und G. D. Roberts. 1982. In vitro synergistic activity of ethambutol, isoniazid, kanamycin, rifampin, and streptomycin against *Mycobacterium avium-intracellulare* complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**: 148-150.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1. Geschätzte Tbc-Inzidenz (Fälle je 100.000) weltweit für das Jahr 2005	4
Abb. 2-2. Prävalenz von MDR-Tbc (in %) unter neu gemeldeten Tbc-Fällen von 1997 bis 2007 ...	5
Abb. 2-3. Ziehl-Neelsen-Färbung eines Präparats aus einer Reinkultur von <i>M. tuberculosis</i>	8
Abb. 2-4. Schematische Darstellung der mykobakteriellen Plasmamembran und Zellwand	9
Abb. 2-6. Anordnung der Gene im <i>embCAB</i> Operon von <i>M. tuberculosis</i>	17
Abb. 2-7. Schematische Darstellung der Proteinstruktur von EmbB (<i>M. tuberculosis</i>)	18
Abb. 3-1. Vektorkarten von Konstrukten, die bei der Klonierung zur Herstellung einer <i>embB306</i> H37Rv Mutante verwendet wurden	53
Abb. 4-1. IS6110-DNA-Fingerprint- und Spoligotypisierungsmuster der 24 EMB resistenten und sechs EMB sensiblen <i>M. tuberculosis</i> Stämme aus Deutschland, die im gesamten <i>embCAB</i> Operon untersucht wurden	58
Abb. 4-2. Detektierte Mutationen im <i>embCAB</i> Operon bei EMB resistenten Stämmen aus Deutschland	60
Abb. 4-3. Übersicht über die Ergebnisse der phänotypischen EMB Resistenztestung sowie der DNA-Analyse der <i>embB306</i> Region der Stämme aus Usbekistan	65
Abb. 4-4. IS6110-DNA-Fingerprint- und Spoligotypisierungsmuster der 10 EMB resistenten und sechs EMB sensiblen <i>M. tuberculosis</i> Stämme aus Usbekistan, die im gesamten <i>embCAB</i> Operon untersucht wurden	69
Abb. 4-5. Detektierte Mutationen in <i>embB</i> (A) und in der intergenischen Region <i>embC-embA</i> (B) bei EMB resistenten Stämmen aus Usbekistan ohne <i>embB306</i> Mutation	70
Abb. 4-6. PCR von Hygromycin resistenten Klonen zur Überprüfung auf das Vorhandensein des pYUB657-Konstrukts nach dem ersten Rekombinationsschritt	76
Abb. 4-7. Zu erwartende Fragmentgrößen bei <i>Southern Blot</i> -Hybridisierung mit einem 334 bp großen <i>embB</i> Fragment gegen <i>PvuII</i> gespaltene genomische Wildtyp-DNA, pYUB657-Vektor-DNA und genomische DNA mit integrierter Vektor-DNA	77
Abb. 4-8. <i>Southern Blot</i> -Hybridisierung eines 334 bp großen <i>embB</i> Fragments gegen <i>PvuII</i> gespaltene genomische DNA PCR-positiver Klone zur Bestätigung einer Integration des Vektors über homologe Rekombination	78

Abb. 4-9. Southern Blot-Hybridisierung eines 334 bp großen <i>embB</i> Fragments gegen <i>PvuII</i> gespaltene genomische DNA bestätigter <i>embB306</i> Mutanten	80
Abb. 4-10. Murines Tbc-Modell zur Untersuchung der Keimlast unter EMB-Therapie nach intravenöser Infektion mit dem Wildtyp H37Rv im Vergleich zur Infektion mit der <i>embB306</i> Mutante CP11-2-4 (GTG)	83

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1. Wirkmechanismen von Antituberkulotika anhand ausgewählter Beispiele	11
Tab. 2-2. Resistenzmechanismen bei <i>M. tuberculosis</i>	14
Tab. 3-1. Für Klonierungsarbeiten verwendete <i>M. tuberculosis</i> Stämme und daraus generierte <i>embB306</i> Mutanten	24
Tab. 3-2. Verwendete <i>E. coli</i> Stämme und deren Genotyp	25
Tab. 3-3. Verwendete Vektoren	25
Tab. 3-4. Verwendete Plasmide	26
Tab. 3-5. Verwendete Primer	27
Tab. 3-6. Verwendete Antibiotika und deren eingesetzte Konzentrationen	29
Tab. 3-7. In OADC enthaltene Substanzen und deren Funktion	29
Tab. 3-8. Bewertung des Wachstums von <i>M. tuberculosis</i> Stämmen auf LJ-Röhrchen für die Bestimmung der MHK	35
Tab. 3-9. Zusammensetzung eines 25 µl PCR-Ansatzes	39
Tab. 3-10. Zusammensetzung eines 50 µl PCR-Ansatzes mit Platinum® Pfx DNA-Polymerase (Invitrogen)	40
Tab. 4-1. Mutationen in der <i>embB306</i> Region bei <i>M. tuberculosis</i> Stämmen aus Deutschland .	57
Tab. 4-2. Mutationen in der <i>embB306</i> Region bei <i>M. tuberculosis</i> Stämmen aus Usbekistan....	62
Tab. 4-3. Ergebnisse aus der wiederholten Resistenztestung und DNA-Analyse*	64
Tab. 4-4. MHK-Bestimmung von <i>M. tuberculosis</i> Stämmen mit diskrepanten Ergebnissen*	66
Tab. 4-5. Verhältnis von Wildtypcodon zu mutiertem Codon im <i>embB306</i> Locus bei isolierten Einzelkolonie-Klonen*	67
Tab. 4-6. Mutationen im <i>embCAB</i> Operon von <i>in vitro</i> selektierten EMB resistenten <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Klonen*	72
Tab. 4-7. Anzahl Hygromycin resistenter Klone nach Transformation in <i>M. tuberculosis</i> H37Rv*	75

Tab. 4-8. Selektion von Saccharose resistenten Klonen und Bestimmung des Titers	79
Tab. 4-9. MHK-Bestimmung auf EMB und INH für die generierten <i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>embB306</i> Mutanten	81
Tab. B-1: Agar/Medium/Zusätze.....	122
Tab. B-2: Reagenzien für PCR	122
Tab. B-3: Reagenzien für Sequenzierung.....	123
Tab. B-4: Weitere Enzyme für die Molekularbiologie.....	123
Tab. B-5: Reagenzien für <i>Southern Blot</i>.....	124
Tab. B-6: Kits	124
Tab. B-7: Chemikalien	124
Tab. B-8: Verbrauchsmaterialien	126
Tab. B-9: Geräte	128
Tab. B-10: Software	129

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin (bei DNA) oder Alanin (bei Aminosäuren)
aa	Aminosäuren (<i>amino acids</i>)
ADS	Albumin Dextrose Salz
AG	Arabinogalaktan
AIDS	Erworbenes Immunschwächesyndrom (<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
AM	Amikacin
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	destilliertes Wasser (lat.: <i>aqua destillata</i>)
BCG	Bacille Calmette Guérin
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
bp	Basenpaare (<i>base pairs</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Cytosin (bei DNA) und Cystein (bei Aminosäuren)
c	(Stoffmengen-) Konzentration
C-	Carboxyl-
CIP	Ciprofloxacin
CM	Capreomycin
CS	Cycloserin
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat (umfasst dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
DOTS	Direkt observierte Therapie (<i>directly observed therapy short course</i>)
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
DZK	Deutsches Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMB	Ethambutol
EtOH	Ethanol
FQ	Fluorchinolon (<i>fluoroquinolone</i>)

FZB	Forschungszentrum Borstel
G	Guanin (bei DNA) oder Glycin (bei Aminosäuren)
g	Erdbeschleunigung (<i>gravity</i>) oder Gramm
GI	Wachstumsindex (<i>growth index</i>)
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
INH	Isoniazid
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galaktosid
IS6110	Insertionselement 6110
kb	Kilobasenpaare
KBE	Koloniebildende Einheit(en)
KN	Kanamycin
Ko	Kontrolle
LAM	Lipoarabinomannan
LB	Luria Bertani
LFX	Levofloxacin
LJ	Löwenstein-Jensen
LM	Lipomannan
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDR	Multi-Resistenz (<i>multi drug resistance</i>)
MGIT	<i>Mycobacterial growth indicator tube</i>
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MOTT	<i>Mycobacteria other than tuberculosis</i>
MTBK	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Komplex
N-	Amino-
OADC	Ölsäure (<i>oleic acid</i>), Rinderalbumin (<i>bovine albumin</i>), Dextrose (<i>dextrose</i>), Katalase (<i>catalase</i>); Zusatz für Mykobakterienmedien
OD	Optische Dichte
OFX	Ofloxacin
ORF	Offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
<i>oriE</i>	Replikationsursprung in <i>Escherichia coli</i> (<i>origin of replication</i>)
<i>oriM</i>	Replikationsursprung in Mykobakterien
PAS	<i>para</i> -Aminosalicylsäure
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PIM	Phosphatidylinositol-Mannosid
PTH	Protionamid
PZA	Pyrazinamid

RBT	Rifabutin
RCF	relative Zentrifugalbeschleunigung (<i>relative centrifugal force</i>)
RKI	Robert Koch Institut
RMP	Rifampicin
RNA-Polymerase	Ribonukleinsäure-Polymerase
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
S	Svedberg-Einheit (Sedimentationskoeffizient)
SDS	Natriumdodekylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SM	Streptomycin
SNP	Einzelbasenpaaraustausch (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
Spoligotypisierung	„ <i>Spacer oligonucleotide</i> “ -Typisierung
SSC	Natriumcitrat (<i>sodium salt citrate</i>)
T	Thymin (bei DNA) oder Threonin (bei Aminosäuren)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tbc	Tuberkulose
TC	Tetracyclin
TE	Tris-EDTA
T _M	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
u	Einheit (<i>unit</i>)
UV	ultraviolett
V	Volt
VM	Viomycin
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
WT	Wildtyp
XDR	<i>extensively drug resistance</i>
Δ	Differenz

Anhang

A PCR-Programme

- 1.) Sequenzierung der *embB306* Region (Stämme aus Deutschland). Primerpaar **embF545** (764-778 bp) und **embR887** (1106-1091 bp) binden in *embB*. PCR-Produkt 343 bp.

Schritt	Temperatur	Zeit [min]	Anzahl Zyklen
1. Aktivierung	95°C	15:00	1
2. Denaturierung	94°C	0:30	40
3. Annealing	64°C	0:30	
4. Elongation	72°C	0:45	
5. Elongation	72°C	10:00	1
6. Kühlung	4°C	∞	1

- 2.) Sequenzierung der *embB306* Region (Stämme aus Usbekistan) und Herstellung der Sonde für *Southern Blot*. Primerpaar **embFneu** (725-743 bp) und **embRneu** (1058-1039 bp) binden in *embB*. PCR-Produkt 334 bp.

Schritt	Temperatur	Zeit [min]	Anzahl Zyklen
1. Aktivierung	95°C	15:00	1
2. Denaturierung	94°C	0:30	40
3. Annealing	64°C	0:30	
4. Elongation	72°C	0:45	
5. Elongation	72°C	10:00	1
6. Kühlung	4°C	∞	1

- 3.) Sequenzierung des gesamten *embB* (Rv3795) Gens. Primerpaare **Rv3795a_newF** (3159-3179 bp in *embA*) und **Rv3795a_newR** (842-824 bp in *embB*), **Rv3795bF** (725-743 bp) und **Rv3795bcR** (2030-2012 bp), **Rv3795cF** (1883-1901 bp) und **Rv3795cR** (235-214 bp 3'-wärts von *embB*). PCR-Produkte 969 bp bzw. 1306 bp bzw. 1652 bp.

Schritt	Temperatur	Zeit [min]	Anzahl Zyklen
1. Aktivierung	95°C	15:00	1
2. Denaturierung	94°C	1:00	35
3. Annealing	65°C	1:00	
4. Elongation	72°C	1:30	
5. Elongation	72°C	10:00	1
6. Kühlung	4°C	∞	1

- 4.) Sequenzierung des gesamten *embA* (Rv3794) Gens.

- 4.a) Primerpaar **embA1-F** (3238-3257 bp in *embC*) und **embA1-R** (1090-1071 bp in *embA*). PCR-Produkt 1223 bp.

Schritt	Temperatur	Zeit [min]	Anzahl Zyklen
1. Aktivierung	95°C	15:00	1
2. Denaturierung	94°C	0:30	35
3. Annealing	68°C	0:30	
4. Elongation	72°C	1:30	
5. Elongation	72°C	5:00	1
6. Kühlung	4°C	∞	1

- 4.b) Primerpaar **embA2-F** (671-689 bp) und **embA2-R** (2170-2151 bp). PCR-Produkt 1500 bp.

Schritt	Temperatur	Zeit [min]	Anzahl Zyklen
1. Aktivierung	95°C	15:00	1
2. Denaturierung	94°C	0:30	35
3. Annealing	67°C	0:30	
4. Elongation	72°C	1:30	
5. Elongation	72°C	5:00	1
6. Kühlung	4°C	∞	1

5.) Sequenzierung Promotorregion von *embB* (Rv3795).

5.a) Primerpaar **embIR-F** (2071-2090 bp) und **embIR-newR** (2977-2956 bp). PCR-Produkt 907 bp.

Schritt	Temperatur	Zeit [min]	Anzahl Zyklen
1. Aktivierung	95°C	15:00	1
2. Denaturierung	94°C	0:30	30
3. Annealing	64°C	0:45	
4. Elongation	72°C	1:00	
5. Elongation	72°C	5:00	1
6. Kühlung	4°C	∞	1

5.b) Primerpaar **embIR-newF** (2826-2846 bp in *embA*) und **embIR-R** (331-314 bp in *embB*). PCR-Produkt 787 bp.

Schritt	Temperatur	Zeit [min]	Anzahl Zyklen
1. Aktivierung	95°C	15:00	1
2. Denaturierung	94°C	0:30	35
3. Annealing	65°C	0:45	
4. Elongation	72°C	1:00	
5. Elongation	72°C	5:00	1
6. Kühlung	4°C	∞	1

6.) Sequenzierung des gesamten *embC* (Rv3793) Gens.

6.a) Primerpaar **embC1-F** (-128 bis -109 5'-wärts von *embC*) und **embC1-R**. PCR-Produkt 890 bp.

Schritt	Temperatur	Zeit [min]	Anzahl Zyklen
1. Aktivierung	95°C	15:00	1
2. Denaturierung	94°C	0:40	35
3. Annealing	64,5°C	0:30	
4. Elongation	72°C	1:00	
5. Elongation	72°C	5:00	1
6. Kühlung	4°C	∞	1

6.b) Primerpaare **embC2-F** (741-758 bp) und **embC2-R** (1654-1636 bp) bzw. **embC3-F** (1636-1654 bp) und **embC3-R** (2811-2793 bp). PCR-Produkt 914 bp bzw. 1176 bp.

Schritt	Temperatur	Zeit [min]	Anzahl Zyklen
1. Aktivierung	95°C	15:00	1
2. Denaturierung	94°C	0:40	35
3. Annealing	60°C	0:30	
4. Elongation	72°C	1:00	
5. Elongation	72°C	5:00	1
6. Kühlung	4°C	∞	1

6.c) Primerpaar **embC4-F** (2793-2811 bp) und **embC4-R** (57-38 bp in *embA*). PCR-Produkt 635 bp.

Schritt	Temperatur	Zeit [min]	Anzahl Zyklen
1. Aktivierung	95°C	15:00	1
2. Denaturierung	94°C	0:30	35
3. Annealing	67°C	0:30	
4. Elongation	72°C	1:30	
5. Elongation	72°C	5:00	1
6. Kühlung	4°C	∞	1

7.) Amplifizierung der mutierten *embB306* Region für Klonierung. Primerpaar **embCP1** (3160-3178 bp in *embA*) und **embCP2** (1660 bis 1642 bp in *embB*). PCR-Produkt 1782 bp.

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
1. Aktivierung	94°C	2:00	1
2. Denaturierung	94°C	0:15	35
3. Annealing	64°C	0:30	
4. Elongation	68°C	2:00	
5. Elongation	68°C	10:00	1
6. Kühlung	4°C	∞	1

- 8.) Nachweis der Hygromycinresistenz-Kassette des pYUB657-Konstrukts. Primerpaar **Hyg_neu 1** und **Hyg_neu 2**. PCR-Produkt 548 bp.

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
1. Aktivierung	95	15:00	1
2. Denaturierung	94	0:30	40
3. Elongation	72	0:45	
4. Elongation	72	10:00	1
5. Kühlung	4	∞	1

B Materialien

Tab. B-1: Agar/Medium/Zusätze

Agar/Medium	Best.-Nr.	Hersteller	Standort
BD Bacto™ Agar	214010	geliefert Otto Nordwald	Hamburg
BD BBL™ Brain Heart Infusion Broth	299070	geliefert Otto Nordwald	Hamburg
BD Difco™ LB-Agar, Lennox	240110	Becton Dickinson	Heidelberg
BD Middlebrook 7H10 Agar	262710	geliefert Otto Nordwald	Hamburg
BD Middlebrook 7H9 Bouillon	271310	geliefert Otto Nordwald	Hamburg
BD Middlebrook OADC Anreicherung	211886	geliefert Otto Nordwald	Hamburg
Fötales Rinderserum	S1820	Biowest	Nuaille, Frankreich
LB-Medium (Lennox)	X964.2	Carl Roth	Karlsruhe
TB Medium nach Löwenstein-Jensen (Basis)	1.05400.0500	Merck	Darmstadt

Tab. B-2: Reagenzien für PCR

Produkt	Best.-Nr.	Hersteller	Standort
1 kb DNA Ladder	N3232S	New England Biolabs	Frankfurt am Main
100 bp DNA Ladder	15628-019	Invitrogen	Karlsruhe
100 mM dNTP Set	10297-018	Invitrogen	Karlsruhe
HotStarTaq DNA Polymerase	203205	Qiagen	Hilden
Low Molecular Weight DNA Ladder	N3233S	New England Biolabs	Frankfurt am Main
Platinum Pfx DNA-Polymerase	11708-013	Invitrogen	Karlsruhe

Tab. B-3: Reagenzien für Sequenzierung

Produkt	Best.-Nr.	Hersteller	Standort
10x Genetic Analysis Buffer with EDTA	402824	Applied Biosystems	Darmstadt
3130 POP-7™ Performance Optimized Polymer	4352759	Applied Biosystems	Darmstadt
BigDye® Terminator v1.1/v3.1 5x Sequencing Buffer	4336697	Applied Biosystems	Darmstadt
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	4337456	Applied Biosystems	Darmstadt
Hi-Di™ Formamide	4311320	Applied Biosystems	Darmstadt

Tab. B-4: Weitere Enzyme für die Molekularbiologie

Enzym	Best.-Nr.	Hersteller	Standort
Antarctic Phosphatase	M0289S	New England Biolabs	Frankfurt am Main
Exonuclease I	M0293S	New England Biolabs	Frankfurt am Main
Lysozym	10837059001	Roche	Mannheim
<i>PacI</i>	R0547S	New England Biolabs	Frankfurt am Main
Proteinase K	03115801001	Roche	Mannheim
<i>PvuII</i>	R0151L	New England Biolabs	Frankfurt am Main
Shrimp Alkaline Phosphatase	E70092X	USB Amersham	Otelfingen
T4 DNA Ligase	M0202L	New England Biolabs	Frankfurt am Main

Tab. B-5: Reagenzien für Southern Blot

Produkt	Best.-Nr.	Hersteller	Standort
Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments	11093274910	Roche	Mannheim
CDP-Star™ Detection Reagent	RPN3682	GE Healthcare	Freiburg
DIG Easy Hyb	11603558001	Roche	Mannheim
DIG Wash und Block Buffer Set	11585762001	Roche	Mannheim
DIG-High Prime	11585606910	Roche	Mannheim
DNA Molecular weight marker VII, DIG-labeled	11669940910	Roche	Mannheim
Lambda <i>Hind</i> III Marker	N3012S	New England Biolabs	Frankfurt am Main

Tab. B-6: Kits

Kit-Name	Best.-Nr.	Hersteller	Standort
NucleoSpin® Extract II	740609.50	Macherey Nagel	Düren
NucleoSpin® Plasmid	740588.50	Macherey Nagel	Düren
PCR-Script™ Amp Cloning Kit	211190	Stratagene	Waldbronn
Qiagen Resuspensionspuffer P1	19051	Qiagen	Hilden
Qiagen Lysispuffer P2	19052	Qiagen	Hilden
Qiagen Neutralisierungspuffer P3	19053	Qiagen	Hilden

Tab. B-7: Chemikalien

Artikel	Best.-Nr.	Hersteller	Standort
2-Propanol zur Analyse	1.09634.1000	Merck	Darmstadt
2-β-Mercaptoethanol, min. 98%	M3148-100ML	Sigma-Aldrich	Steinheim
Albumin Fraktion V (pH 7,0)	A1391.250	AppliChem	Darmstadt
Ampicillin	A9518	Sigma-Aldrich	Steinheim
Bromphenolblau	108122	Merck	Darmstadt

Fortsetzung Tab. B-7

Artikel	Best.-Nr.	Hersteller	Standort
Cetyltrimethylammoniumbromid	A0805, 0100	AppliChem	Darmstadt
Chloroform, zur Analyse	1.02445.1000	Merck	Darmstadt
D-(+)-Glucose, wasserfrei	X997.2	Carl Roth	Karlsruhe
Dimethylsulfoxid, zur Analyse	1.02952.1000	Merck	Darmstadt
Essigsäure, ≥ 99% (Eisessig)	193830	MP Biomedicals	Eschwege
Ethambutol Dihydrochlorid	E4630-25G	Sigma-Aldrich	Steinheim
Ethanol absolut, zur Analyse	1.00983.1000	Merck	Darmstadt
Ethidiumbromid (1%ige Lösung in Wasser) für die Elektrophorese	1.11608.0030	Merck	Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat-Na ₂ -Dihydrat	152522	MP Biomedicals	Eschwege
Glycogen (20 mg/ml)	10901393001	Roche	Mannheim
Glyzerin wasserfrei reinst	1.04093.1000	Merck	Darmstadt
Glyzerin 87%, zur Analyse	1.04094.2500	Merck	Darmstadt
Hygromycin B	1037400002	Merck	Darmstadt
Illustra™ Sephadex™ G-50 Fine DNA Grade	17-0573-02	GE Healthcare	Freiburg
Isoamylalkohol (isomerengemisch)	1.00978.1000	Merck	Darmstadt
Isoniazid	? (geschenkt)	Fatol Arzneimittel	Schiffweiler
Karbofuchsin-Lösung	1.09215.2500	Merck	Hohenbrunn
LiChrosolv® Wasser für die Chromatographie	1.15333.2500	Merck	Darmstadt
Löfflers Methylenblau	1.01287.2500	Merck	Hohenbrunn
Natriumchlorid, ≥ 99,5%	3957.2	Carl Roth	Karlsruhe
Natriumhydroxid-Plätzchen, reinst	1.06482.1000	Merck	Hohenbrunn
N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid	1.02342.1000	Merck	Darmstadt
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	A1562	Carl Roth	Karlsruhe

Fortsetzung Tab. B-7

Artikel	Best.-Nr.	Hersteller	Standort
Salzsäure, rauchend 37%	1.00317.2500	Merck	Hohenbrunn
Sodium Dodecyl Sulfate	SDS00250	Q-BIOgene	Heidelberg
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	1.06448.1000	Merck	Hohenbrunn
Tris Base, Molecular biology grade	819623	MP Biomedicals	Eschwege
Tris-Hydrochlorid ultra pure	816100	MP Biomedicals	Eschwege
Tween® 80 zur Synthese	8.22187.0500	Merck	Hohenbrunn
UltraPure™ Agarose	15510-027	Invitrogen	Karlsruhe
Wasser für die Molekularbiologie DEPC-behandelt, steril	A2864,1000	AppliChem	Darmstadt

Tab. B-8: Verbrauchsmaterialien

Artikel	Best.-Nr.	Hersteller	Standort
1,0 ml Transferpipette aus LD-PE	86.1180	Sarstedt	Nürnbrecht
30 ml Nalgene® Nährmedienflaschen	2156700H	VWR	Darmstadt
96-V-Mikrotiterplatte	710880	Biozym	Hess. Oldendorf
Amersham Hyperfilm™ ECL High Performance Chemiluminescence Film	28906837	GE Healthcare	über Amersham
Biosphere® Filter tips 10 µl type Gilson/Eppendorf	70.1115.210	Sarstedt	Nürnbrecht
Biosphere® Filter tips 100 µl type Eppendorf/Gilson	70.760.212	Sarstedt	Nürnbrecht
Biosphere® Filter tips 200 µl type Biohit/Labsystems	70.760.211	Sarstedt	Nürnbrecht
Cellstar® 10 ml Pipette	607180	Greiner Bio-one	Solingen
Cellstar® 15 ml PP-Test tubes	188271	Greiner Bio-one	Solingen
Cellstar® 25 ml Pipette	760180	Greiner Bio-one	Solingen
Cellstar® 5 ml Pipette	606180	Greiner Bio-one	Solingen

Fortsetzung Tab. B-8

Artikel	Best.-Nr.	Hersteller	Standort
Corning® Rollerflaschen 490 cm ²	5380149	Omnilab	Hamburg
Cuvettes, 10x4x45 mm	67.742	Sarstedt	Nürnbergrecht
Einweg-Impföse, 1 µl farblos	254410	Nunc	Langenselbold
Einweg-Impföse, 10 µl blau	251586	Nunc	Langenselbold
Filterspitzen 100-1000 µl	750288	Greiner Bio-one	Solingen
Filtrationseinheit 500 ml	430517	Corning Star	New York, USA
Gene Pulser® Cuvettes, 0,2 cm	1652086	Bio-Rad	München
Hybond-N (+) Nylonmembran	RPN 203 N	Amersham Bioscience	Braunschweig
MicroAmp™ Optical 96-well reaction plate	N801-0560	Applied Biosystems	Darmstadt
Microlance™ 3, 26G $\frac{3}{8}$, 0,45x10mm (braune Kanüle)	300300	Becton Dickinson	Heidelberg
Mikroröhre 1,5 ml mit Verschuß	72.692	Sarstedt	Nürnbergrecht
Multiply®-Pro Gefäß 0,5 ml, PP	72.735.002	Sarstedt	Nürnbergrecht
MultiScreen®-HV	MAHVN4510	Millipore	Schwalbach
Nunclon™ Δ Surface TC mirkowell 96 F (ELISA-Platten)	167008	Nunc	Langenselbold
Pipettenspitze, 10 µl farblos	70.1115	Sarstedt	Nürnbergrecht
Pipettenspitze, 1000 µl blau	70.762	Sarstedt	Nürnbergrecht
Pipettenspitze, 200 µl gelb	70.760.002	Sarstedt	Nürnbergrecht
Pipettierreservoir, PS, weiß	675002	Biozym	Hess. Oldendorf
Plastipak™ (1 ml Spritze)	300013	Becton Dickinson	Heidelberg
Plate Septa 96-well	4315933	Applied Biosystems	Darmstadt
Reagiergefäß 1,5 ml	72.690.001	Sarstedt	Nürnbergrecht
Röhre 50 ml 114x28 mm, PP	62.547.254	Sarstedt	Nürnbergrecht
Sterilfilter	SLGV R25 LS	Millipore	Schwalbach

Tab. B-9: Geräte

Gerät	Hersteller	Standort
ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems	Darmstadt
Aufbereitungssystem Elga PURElab ultra	Elga labwater	Celle
Centrifuge 5415c	Eppendorf	Hamburg
Centrifuge 5417c	Eppendorf	Hamburg
DNA Engine	Bio-Rad	München
Gene Pulser X cell™ Electroporation System	Bio-Rad	München
ELISA	Tecan	Carlsheim
Geldokumentationssystem	Bio-Rad	München
Gelkammer mini sub cell® GT	Bio-Rad	München
Gelkammer sub cell® GT	Bio-Rad	München
Gelkammer wide mini sub cell® GT	Bio-Rad	München
Hettich Zentrifuge Universal 32R	Über Armin Baack-Laborbedarf	Schwerin
Hybridisierungssofen OV1	Biometra	Göttingen
Hybridisierungsröhre	Biometra	Göttingen
MJ Research PTC200 Peltier Thermal Cycler	Über Biozym	Hess. Oldendorf
Rolleinheit Wheaton Roller Apparatus	Wheaton Science	Millville, New Jersey, USA
Rotanta 460R	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen
Spannungsgerät PowerPac™ 300	Bio-Rad	München
Vakuum Blotter	Biometra	Göttingen

Tab. B-10: Software

Software	Firma, Standort
Clone Manager Ver. 6.0	Scientific & Educational Software, Cary, North Carolina, USA
GraphPad Prism v4.0	GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA
Lasergene v.5.07	DNASTar, Madison, Wisconsin, USA
SeqScape v2.6	ABI, Darmstadt, Deutschland

C Abkürzungen Aminosäuren

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

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Stefan Niemann für die Vergabe des interessanten Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können, bedanken. Herr PD Dr. Stefan Niemann hat als „Doktorvater“ durch viele hilfreiche Ratschläge sowie seiner steten Bereitschaft für wissenschaftliche Diskussionen zum Fortgang der Projekte und letztendlich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Frau Dr. Sabine Rüscher-Gerdes danke ich für die freundliche Aufnahme an ihrem Institut sowie für die Beantwortung diverser Fragen in Bezug auf Resistenztestung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ulrich Schaible für die Übernahme des Erstgutachtens sowie meinem Zweitbetreuer, Herrn PD Dr. Frank Petersen, der mir durch seine konstruktive Kritik hilfreich zur Seite stand.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Mykobakteriologie für die vielfältige Unterstützung bedanken. Hierbei sind insbesondere Tanja Ubben, Lisa Dost, Petra Vock und Ilse Radzio für ihre Hilfe bei der experimentellen Durchführung zu nennen sowie Susanne Homolka und Silke Feuerriegel, die für fachliche Fragen stets zur Verfügung standen. Susanne Homolka und Tanja Ubben möchte ich außerdem auch für ihre emotionale Unterstützung danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Infektionsbiologie für die Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima bedanken. Ganz besonders danke ich Prof. Dr. Stefan Ehlers und Dr. Kerstin Walter für die Hilfe bei der Planung und Auswertung der Mausexperimente sowie Silvia Maaß und Stefanie Pfau für die experimentelle Unterstützung.

Der Hain Lifescience GmbH danke ich für die finanzielle Unterstützung, die mir die Teilnahme an Kongressen ermöglichte.

Zuletzt möchte ich meiner gesamten Familie, vor allem meinen Eltern, sowie Meikel Peters danken, die immer für mich da sind.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Claudia Plinke
Geburtsdaten: 30.07.1979 in Neustadt a. Rbg.
Familienstand: ledig

Schulbildung

1986 – 1990 Grundschule Schloß Ricklingen
1990 – 1992 Orientierungsstufe Garbsen
1992 – 1997 Johannes-Kepler-Gymnasium Garbsen
1997 – 1999 Höltz-Gymnasium Wunstorf

Studium

10/99 – 03/05 Biologie an der Universität Hannover
Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfächer: Genetik, Immunologie
Diplomarbeit zum Thema: Untersuchungen des Nitratstoffwechsels in *Mycobacterium smegmatis*
Abschluss: Diplom-Biologin

Praktika

10/03 – 11/03 Praktikum bei der Bayer Healthcare AG, Animal Health, Parasiticides (in Monheim)
Tätigkeitsinhalte u. a.:
Infektion von Mäusen und Ratten mit Trichinenlarven
Isolierung von Nematoden aus Muskeln und Dünndarm
in-vitro Screening von Anthelminthika

Beruflicher Werdegang

03/05 – 10/05 Friedrich Loeffler Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Greifswald.
Promotionsstipendium für das Forschungsvorhaben „Molekulare Analyse virulenz-attenuierter Mutanten von *Burkholderia pseudomallei*“ (Förderung durch BMBF)

11/05 – z.Z. Molekulare Mykobakteriologie, Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien,
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften,
Forschungszentrum Borstel

Erklärung

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

Borstel, den

Vorname Nachname