

# **Glycokonjugat-Transporter in Mycobakterien**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Milena Hänisch, geb. Wozniczka**  
aus Moers

Düsseldorf, Oktober 2015

aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Klaus Pfeffer

Korreferent: Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung:

*Nicht Kunst und Wissenschaft allein,  
Geduld will bei dem Werke sein.  
(Goethe)*

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
1. Zusammenfassung .....	1
2. Einleitung .....	6
2.1 Bedeutung und Pathogenese der Tuberkulose .....	6
2.2 Tuberkulose-Therapie: Vakzine und Antibiotika.....	8
2.3 Zellwand der Mycobakterien .....	10
2.3.1 Die mycobakterielle Zellwand: der mAGP-Komplex.....	12
2.3.2 Die mycobakterielle Zellwand: Phosphoinositolmannoside (PIMs), Lipoarabinomannan (LAM) und Lipomannan (LM) .....	13
2.3.3 Die mycobakterielle Zellwand: Zucker-Donoren .....	15
2.3.3.1 Arabinose und Mannose in Mycobakterien .....	15
2.4 Aufnahme von Kohlenstoffquellen und anderen Substanzen .....	16
2.5 ABC-Transporter .....	17
2.5.1 ABC-Transporter: Zuckerimporter .....	18
2.5.2 ABC-Transporter: Kohlenhydratexporter.....	20

2.5.2.1 Zellwandsynthese-involvierte Kohlenhydratexporter: Rv1457c-Rv1458c .....	21
2.5.2.2 Zellwandsynthese-involvierte Kohlenhydratexporter: Rv3781-Rv3783 und Msmeg_6366-Msmeg_6369 .....	23
2.5.2.3 Zellwandsynthese-involvierte Kohlenhydratexporter: Msmeg_1817 .....	25
2.6 Genetische Manipulation von Mycobakterien .....	29
2.7 Zielsetzung der Arbeit.....	30
3. Material und Methoden .....	32
3.1 Abkürzungsverzeichnis.....	32
3.2 Oligonukleotidprimer.....	34
3.3 Geräte, Kits und Verbrauchsmaterialien .....	38
3.3.1 Geräte .....	38
3.3.2 Kits .....	39
3.3.3 Verbrauchsmaterialien .....	40
3.4 Kultivierung der Bakterien: Mycobakterien und <i>Escherichia coli</i> .....	41
3.4.1 Kultivierung von Mycobakterien.....	41
3.4.1.1 7H9-Flüssigmedium .....	41
3.4.1.2 7H10 Agar .....	42

3.4.1.3 Minimalmedium.....	42
3.4.2 Kultivierung von <i>E.coli</i> .....	43
3.4.3 Ernte und Waschen von Bakterien .....	43
3.4.4 Herstellen von Glycerinstocks von Mycobakterien und <i>E. coli</i> .....	44
3.4.5 Antibiotikazusätze.....	44
3.5 Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	44
3.6 Verwendete und erzeugte prokaryotische Organismen.....	45
3.7 Plasmidisolaton .....	51
3.8 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	52
3.9 Agarose-Gelelektrophorese .....	53
3.10 Extraktion von DNA aus Agarosegelen .....	54
3.11 Sequenzierung .....	54
3.12 Restriktion von DNA.....	55
3.13 Ligation.....	57
3.14 Generierung von ortsspezifischen <i>knock-in</i> -Mutanten und Gendeletions-Mutanten durch Allelaustauschsubstrate .....	57
3.14.1 Strategie zur Erzeugung von Gendeletionsmutanten ( <i>knock-out</i> ) .....	58

3.14.2 Strategie zur Erzeugung von konditionalen Mutanten ( <i>knock-in</i> ).....	60
3.14.2.1 Konstruktion von Phasmiden.....	64
3.14.2.2 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> HB101.....	65
3.14.2.3 Elektroporation von Phasmiden .....	65
3.14.2.4 Herstellung von Hochtiterphagenlysaten .....	66
3.14.2.5 Transduktion .....	67
3.14.2.6 Erzeugung von komplementierten Mutanten .....	67
3.15 Bestimmung des Wachstums der konditionalen Mutanten in Abhängigkeit von Atc.....	69
3.16 Isolierung genomischer DNA .....	70
3.17 Southern Blot .....	71
3.18 Transformation von <i>E. coli</i> mittels Hitzeschock.....	72
3.19 Transformation von Mycobakterien .....	72
3.20 Phänotypische Microarrays .....	73
3.21 Resazurin-Assay .....	73
3.22 Gentamycin-Protektionsassay .....	73
3.23 Herstellung von Zelllysaten und Proteinquantifizierung .....	74
3.24 SDS-PAGE .....	74

3.25 Western Blot/Immunoblot .....	75
3.26 Humaner Zytokin-Array .....	76
3.27 Extraktion von polaren Lipiden .....	77
3.28 Extraktion von Lipoglycanen .....	77
3.29 Extraktion von AG und LM/LAM und Nachweis über GC/MS.....	78
3.30 Analyse der zellfreien Kulturüberstände .....	78
3.31 Mausinfektionen .....	78
4. Ergebnisse .....	80
4.1 Kohlenhydratimporter: UgpAEBC .....	80
4.2 Kohlenhydratimporter: Rv2041c-Rv2040c-Rv2039c-Rv2038c.....	87
4.3 Zellwandsynthese-involvierte Exporter: Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c .....	94
4.4 Zellwandsynthese-involvierte Exporter: Rv3781-Rv3783 und MsmeG_6366-MsmeG_6369	100
4.5 Zellwandsynthese-involvierte Exporter: MsmeG_1817 und Rv3277 .....	112
5. Diskussion .....	127
5.1 Zuckerimporter: UgpAEBC .....	127
5.2 Zuckerimporter: Rv2041c-Rv2040c-Rv2039c-Rv2038c.....	130
5.3 Zellwandsynthese-involvierte Kohlenhydratexporter: Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c .....	132

5.4 Zellwandsynthese-involvierte Kohlenhydratexporter: Rv3781c-Rv3783c und Rv3782 und dessen Homolog in <i>M. smegmatis</i> MsmeG_6366 .....	135
5.5 Zellwandsynthese-involvierte Kohlenhydratexporter: MsmeG_1817 und Rv3277 .....	138
6. Ausblick .....	141
7. Literatur .....	146

## 1. Zusammenfassung

Obwohl das Tuberkulose verursachende Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* seit mehr als 130 Jahren bekannt ist, sind noch viele Aspekte von Virulenz und Pathogenese ungeklärt. Beispielsweise ist unsicher, welche Nährstoffe dem Bakterium im Wirt während der verschiedenen Infektionsphasen zur Verfügung stehen und welche Kohlenstoffquellen es im Phagosom der Makrophagen nutzt. Importer vom Typ der ATP-Bindekassetten-(ABC)-Transporter sind eine wichtige Klasse von Permeasen, die den Import von Substanzen in bakterielle Zellen vermittelt. Von einigen ABC-Exportern wird vermutet, dass sie in den Export von Zellwandbestandteilen involviert sind oder möglicherweise dem Efflux von Antibiotika dienen. Neben den ABC-Transportern gibt es auch Flippasen, die unabhängig von der Hydrolyse von ATP-Molekülen über die Cytoplasmamembran transportieren können. Hierzu zählen beispielsweise Flippasen vom Glucosyltransferase-A-(GtrA)-Typ, die lipidgebundene Zucker über die Cytoplasmamembran translozieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung von fünf Permeasen: zwei Importern und zwei Exportern des ABC-Typs sowie einer ATP-unabhängigen, GtrA-ähnlichen Flippase. Die Aufklärung der genauen Funktion der Translokasen sollte helfen, ihre Potentiale als Antibiotikawirkorte einzuschätzen. Hierzu wurden umfangreiche molekulargenetische Manipulationen an Mycobakterien vorgenommen. Insgesamt wurden drei Transporterdeletionsmutanten und vier konditionale Mutanten in *M. tuberculosis* sowie zwei konditionale Mutanten in *Mycobacterium smegmatis* erzeugt und in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Für den ABC-Importer UgpAEBC war Glycerin-3-phosphat (G3P) als Substrat postuliert worden. Diese Vermutung kann auf der Basis der nun vorliegenden Daten ausgeschlossen werden. Weder die im Rahmen der Doktorarbeit etablierte Transporterdeletionsmutante  $\Delta ugpAEBC$ , die ohne Wachstumsdefekt *in vitro* blieb, noch der Wildtyp von *M. tuberculosis* konnten G3P gut als singuläre Kohlenstoffquelle verwerten. Das später als mögliches Substrat postulierte Glycerophosphocholin war noch weniger als Kohlenstoffquelle geeignet.

Für den ABC-Importer Rv2041c-Rv2040c-Rv2039c-Rv2038c konnte ebenfalls eine Transporterdeletionsmutante in *M. tuberculosis* ohne Wachstumsdefekt erzeugt werden. Das durch diesen Importer transportierte Substrat konnte in phänotypischen Microarrays nicht identifiziert werden. Da keine Akkumulation von Zuckermolekülen oder Glykokonjugaten in zellfreien Kulturüberständen nachgewiesen werden konnte, ist eine eventuelle Recycling-Funktion des Transporters für

freigesetzte Zucker bakteriellen Ursprungs unwahrscheinlich.  $\Delta Rv2041c-Rv2040c-Rv2039c-Rv2038c$  zeigte in Niedrig-Dosis-Mausinfektionen keinen attenuierten Phänotyp. Es gibt jedoch erste Hinweise auf eine möglicherweise starke Attenuierung im nicht-humanen Primatenmodell.

Für den ABC-Exporter  $Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c$  wurden aufgrund der postulierten Essentialität zunächst konditionale Mutanten im TetON-TetOFF-System erzeugt. In konditionalen Mutanten wird ein synthetischer Promotor mit vier Operatoren vor dem Gen von Interesse inseriert. Die Transkription des Gens kann nun mithilfe eines reversibel in Abhängigkeit von Anhydrotetracyclin (Atc) bindenden Repressors reguliert werden. Da die konditionalen Mutanten kein apparent Atc-abhängiges Wachstum zeigten, wurde eine Deletion der Transporterkomponenten  $Rv1457c-Rv1458c$  in *M. tuberculosis* vorgenommen, die ohne Wachstumsdefekt *in vitro* möglich war. Der Phänotyp von  $\Delta Rv1457c-Rv1458c$  wurde mittels Immunoblotting auf Lipoarabinomannan (LAM) überprüft. Das später postulierte Substrat LAM konnte über diesen Nachweis ausgeschlossen werden, da die Signalstärken zwischen Wildtyp und Deletionsmutante unverändert blieben. Darüber hinaus konnte für  $\Delta Rv1457c-Rv1458c$  ein attenuierter Phänotyp in der Infektion von THP-1-Makrophagen mit einhergehendem veränderten Zytokinprofil nachgewiesen werden. Nach Infektion mit der Deletionsmutante wurden deutlich abgeschwächte Signale für MCP-1 und IL-8 gefunden.

Im Fall des ABC-Exporters  $Rv3781-Rv3783$  und des Homologs  $Msmeg\_6366-Msmeg\_6369$  ist es gelungen, konditionale Mutanten in *M. tuberculosis* und *Mycobacterium bovis* BCG bzw. *M. smegmatis* zu erzeugen, deren Wachstum strikt Atc-abhängig verlief. Die Essentialität der Gene  $Rv3781-Rv3783$  und  $Msmeg\_6366$  wurde damit sicher nachgewiesen. Mithilfe der konditionalen Mutanten wurde im Immunoblotting indirekt gezeigt, dass der Transporter möglicherweise den Export von Arabinogalactan (AG) vermittelt. In den Mutanten verstärkte sich mit zunehmendem Silencing der LAM-Anteil. Es ist denkbar, dass LAM als Arabinoseshunt fungiert, indem es Arabinosemoleküle übernimmt, die zur Synthese von AG nicht verwendet werden.

Für die ATP-unabhängige Flippase  $Msmeg\_1817$  in *M. smegmatis* und ihr Homolog  $Rv3277$  in *M. tuberculosis* konnte die Essentialität durch die Generierung konditionaler, Atc-abhängig wachsender Mutanten nachgewiesen werden. Die untersuchten konditionalen Mutanten in *M. smegmatis* und *M. tuberculosis* zeigten mit zunehmendem Silencing auch verringerte Anteile bzw. veränderte Kompositionen der Decaprenolphosphoarabinose (DPA)- und Decaprenolphosphomannose (DPM)-abhängigen Zellwandbestandteile. In Immunoblots konnte gezeigt werden, dass die mutmaßlich

*downstream* des Flippings gelegenen Produkte wie LAM und Phosphatidyl-*myo*-inositolmannoside abnehmen, je stärker die Mutante gesilencet wird. Komplementationsversuche bestätigten die funktionelle Homologie der beiden Gene. Es handelt sich daher vermutlich sowohl bei Rv3277 als auch bei Msmeg\_1817 um eine Flippase, die lipidverknüpfte Zucker wie DPA und DPM von der cytoplasmatischen auf die periplasmatische Seite der Cytoplasmamembran transloziert. Durch ihren starken Einfluss auf wichtige Zellwandbestandteile der Mycobakterien könnte diese Translokase einen guten, neuartigen Antibiotikawirkort darstellen.

## Summary

The causative agent of tuberculosis, the *Mycobacterium tuberculosis* bacterium is known for more than 130 years. However, many aspects of its virulence and pathogenesis still remain to be elucidated. It is not known which nutrients are available during the different stages of infection and which of the available nutrients inside the phagosomes of macrophages are used by the bacterium. Importers of the ABC- (ATP-binding-cassette)-type are an important class of permeases, mediating the import of different substances into the bacterial cell. Some of the ABC-exporters are discussed to be either involved in the export of cell wall components or in the efflux of antibiotics. Besides ABC-transporters also flippases, which act independently from hydrolysis of ATP, are involved in translocation processes across the cytoplasmic membrane.

Flippases of the glycosyltransferase-A-(gtrA)-type are flipping lipid-bound sugars across the cytoplasmic membrane. Aim of this study was the characterization of five permeases: two importers and two exporters of the ABC-type as well as one GtrA-like flippase. Elucidating the function of these translocases should help to assess their features as drug-targets. Therefore, mycobacteria were comprehensively genetically manipulated, which resulted in the generation and characterization of three knock-out-mutants and four conditional mutants in *M. tuberculosis* as well as two conditional mutants in *Mycobacterium smegmatis*.

Glycerol-3-phosphate (G3P) was the postulated substrate of the ABC-importer UgpAEBC. Within this study it could be shown, that neither the wildtype of *M. tuberculosis* nor the knock-out-mutant  $\Delta$ ugpAEBC, which showed no apparent growth defect *in vitro*, was capable of using G3P as a sole carbon source. Therefore G3P could be ruled out as the potential substrate of this importer. The later postulated substrate glycerophosphocholine was even less utilizable as a sole carbon source for the bacterium.

A deletion mutant of the ABC-importer Rv2041c-Rv2040c-Rv2039c-Rv2038c was generated. but the transported substrate could not be defined in phenotypic microarrays. A potential recycling-function of this transporter seems unlikely, as no accumulation of sugars or glycoconjugates could be found in cell-free supernatants of liquid cultures. The  $\Delta$ Rv2041c-Rv2040c-Rv2039c-Rv2038c showed no attenuation in a low-dose aerosol mouse infection model. However, there are hints of a strong attenuation in a non-human primate model.

The postulated essentiality of the ABC-exporter Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c lead to the generation of conditional mutants in the TetON-TetOFF-system. In these conditional mutants a synthetic promotor with four operators is inserted immediately before the gene of interest. The transcription of this gene can now be silenced in presence or absence of an anhydrotetracyclin-(Atc)-dependent reversibly binding repressor. As the conditional mutants showed no Atc dependent growth, a deletion of Rv1457c-Rv1458c was carried out. The resulting  $\Delta$ Rv1457c-Rv1458c showed no growth defect *in vitro*. Via immunoblotting the phenotype was examined regarding the postulated substrate lipoarabinomannan (LAM). The signal for LAM showed no differences between  $\Delta$ Rv1457c-Rv1458c compared to the wildtype *M. tuberculosis*. In a THP-1-macrophage infection model the mutants showed an altered cytokine profile with weakened signals for MCP-1 and IL-8.

Conditional mutants of the ABC-exporter Rv3781-Rv3783 and its homologue MsmeG\_6366-MsmeG\_6369 were generated in this study in *M. tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG and in *M. smegmatis*, respectively. All mutants showed a strictly Atc-dependent growth behaviour, which proved the essentiality of these genes. Via immunoblotting it was shown, that this transporter might be involved in the export of arabinogalactan (AG). When silenced, the mutants showed an increasing signal for LAM. This leads to the conclusion, that LAM might be acting as a shunt mechanism for arabinose molecules, which are not used in the biosynthesis of AG.

The essentiality of the ATP-independent flippase MsmeG\_1817 in *M. smegmatis* and its homologue Rv3277 in *M. tuberculosis* could be proven via the generation of conditional mutants showing a strictly Atc-dependent growth. When silenced, the conditional mutants showed decreasing signals and altered compositions of cell wall components, that depended on decaprenolphosphoarabinose (DPA)- and decaprenolphosphomannose (DPM), such as LAM and phosphatidyl-*myo*-inositolmannosides. Complementation experiments corroborated the functional homology of MsmeG\_1817 and Rv3277. Presumably, MsmeG\_1817 and Rv3277 are coding for a flippase, that

translocates DPA and/or DPM from the cytoplasmic to the periplasmic side of the cytoplasmic membrane. With its strong effect on mycobacterial cell wall components this translocases could be suitable as a potential new drug target.

## 2. Einleitung

### 2.1 Bedeutung und Pathogenese der Tuberkulose

Am 24. März 1881 hielt Robert Koch (1843-1910) seinen berühmten Vortrag mit dem Titel „Die Ätiologie der Tuberkulose“ in Berlin. Mikroskopisch identifizierte er in tuberkulösem Gewebe stäbchenförmige Bakterien als ursächlich für die Erkrankung: *Mycobacterium tuberculosis*. Diese Bakterien werden trivial auch als Tuberkelbazillen bezeichnet. Später veröffentlichte er sein Konzept der Primär- und Sekundärinfektion in Meerschweinchen und entdeckte das Tuberkulin – ein Glycerinextrakt aus toten Tuberkelbazillen, das auch später noch im Tuberkulin-Hauttest verwendet wurde. Für seine Beiträge zur Infektionsforschung wurde Koch 1905 der Nobelpreis für Medizin verliehen.

Obwohl der Erreger der Tuberkulose nunmehr seit über 130 Jahren bekannt ist und seit rund 70 Jahren mit Antibiotika bekämpft wird, ist er noch lange nicht besiegt. Derzeit ist schätzungsweise rund ein Drittel der Weltbevölkerung latent mit *M. tuberculosis* infiziert. Der Immunabwehr gesunder Menschen gelingt es meist, die Infektion zu kontrollieren. Bei über 90% der Infizierten kann die Immunantwort eine primäre Infektion so eindämmen, dass sich keine klinischen Symptome manifestieren und die Infektion asymptomatisch verläuft. Eine Klärung der Infektion ist jedoch selten. Der Erreger wird meist nicht vollständig eliminiert, sondern überdauert in einem bislang nicht vollständig geklärten pauzibazillären Dormanzzustand und kann so Jahrzehnte latent im Körper überleben. Diese Latenzphase ist gekennzeichnet durch die Bildung sogenannter Granulome (Knötchen), die entzündungsbedingt durch die Neubildung von Gewebe entstehen. Sie bilden sich u. a. aus Makrophagen, die durch chronische Stimulation zu epitheloiden Zellen ausdifferenzieren und zu Riesenzellen fusionieren. Im Granulom wird das bakterielle Überleben und Absterben in Balance gehalten (Saunders and Britton 2007). Aus diesem latenten Zustand kann *M. tuberculosis* jedoch bei einer Schwächung des Immunsystems, beispielsweise in Folge von Immunseneszenz, Immunsuppression oder Co-Infektion mit anderen Pathogenen wie z.B. HIV reaktiviert werden (McDonough, Kress et al. 1993, Glickman and Jacobs 2001, O'Garra, Redford et al. 2013). Jährlich kommt es weltweit zu ca. 9 Millionen neuen Fällen aktiver Tuberkuloseerkrankungen, von denen vermutlich ein erheblicher Anteil aus einer Reaktivierung solcher latenter Infektionen resultiert. Infektionen mit *M. tuberculosis* führen nach Angaben der WHO jährlich weltweit zu rund 1,5 Millionen Todesfällen. Multiresistente (multi-drug-resistant, MDR) Stämme machen rund 3,5% der

jährlichen Neuinfektionen aus und breiten sich vor allem in Ländern mit schlechter medizinischer Versorgung massiv aus (WHO 2014).

Aufgrund seiner großen Bedeutung als Krankheitserreger gehörte *M. tuberculosis* zu den ersten vollständig sequenzierten Organismen. Das Genom des virulenten Laborstamms von *M. tuberculosis* H37Rv liegt seit 1998 sequenziert und annotiert vor (Cole, Brosch et al. 1998). Es umfasst rund 4,4 Mbp mit etwa 3900 *open reading frames* (ORFs) und weist einen hohen Guanosin-Cytosin-Anteil von 65,6% auf. Die Genome der Vertreter des *M. tuberculosis*-Komplex, *M. tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti* und *Mycobacterium bovis* haben eine sehr hohe Sequenzidentität von mehr als 99,9% auf DNA-Ebene. Die Existenz von *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) erlaubt die Unterscheidung zwischen den eng verwandten Arten. Das Genom des saprophytisch lebenden Bodenbakteriums *Mycobacterium smegmatis* liegt bei einer Größe von 6,9 Mbp. Das Genom von *M. leprae* gilt mit 3,2 Mbp als das kleinste Mycobakteriengenom (Vissa and Brennan 2001, Kapopoulou, Lew et al. 2011). *M. tuberculosis* gehört zu der Gruppe der langsam wachsenden Mycobakterien mit einer Generationszeit von rund 24 Stunden und wird aufgrund seines hohen humanpathogenen Potentials in die Risikogruppe 3 eingestuft. Für eine Tuberkuloseinfektion reichen schon wenige Bakterien aus, die leicht durch Aerosole übertragen werden, wie sie beim Husten, Niesen oder Sprechen auftreten können (Riley, Mills et al. 1995).

Auch aufgrund des aerosolen Übertragungswegs ist Tuberkulose im Wesentlichen eine Lungenerkrankung, obwohl *M. tuberculosis* im späteren Verlauf der Infektion auch andere Organe befallen kann. Die sessilen Alveolarmakrophagen in der Lunge sind das erste Ziel der Bakterien. Andere Bakterien versuchen meist, der Phagozytose zu entgehen. *M. tuberculosis* kann nach Phagozytose jedoch nicht nur im Inneren von Makrophagen überleben, sondern sogar intrazellulär replizieren. Das Bakterium besitzt eine Vielzahl von Mechanismen, mit denen es der Immunabwehr des Wirts entgeht. Einer dieser Prozesse ist die Arretierung der Phagosomenreifung. Das Bakterium verhindert die Phagosomen-Lysosomen-Fusionierung und überlebt so innerhalb des Phagosoms im Makrophagen (Armstrong and Hart 1975, Russell, Mwandumba et al. 2002, Vergne, Chua et al. 2004). Außerdem gelingt es dem Bakterium, alle für das Wachstum notwendigen Ressourcen aus dem Wirt zu aquirieren, wie beispielsweise Eisen, das über Mycobactine aufgenommen wird (Luo, Fadeev et al. 2005).

Außer dem Menschen besitzt *M. tuberculosis* kein natürlich vorkommendes Reservoir. Tiermodelle wie Mäuse, Meerschweinchen, Kaninchen und Zebrafische werden derzeit am häufigsten eingesetzt,

um die Pathogenese von *M. tuberculosis* zu untersuchen. Ein Nachteil all dieser Modelle ist jedoch, dass keines die Pathogenese im Menschen vollständig wiedergibt (Ordway and Orme 2011). Mäuse können zwar auch intravenös und intraperitoneal mit *M. tuberculosis* infiziert werden, der natürlichen Infektionsroute am ähnlichsten ist jedoch die Atemwegsinfektion. Hier werden Bakterien in definierter Zellzahl aerosolisiert von den Versuchstieren eingeatmet. Niedrig-dosierte Aerosolinfektionen implementieren etwa 10 - 50 Kolonie-bildende Einheiten (*colony forming units*, CFU) in der Lunge. Die akute Phase in der Maus umfasst die ersten drei bis vier Wochen nach Infektion. In dieser Zeit vermehren sich die Bakterien, bis die Bakterienlast in der Lunge mit etwa  $10^5$  -  $10^6$  CFU ihren Höhepunkt erreicht. Danach bleibt nach Einsetzen einer adaptiven Immunantwort die Bakterienlast über mehrere Monate in der Maus stabil, wobei jedoch durch sukzessive Immunpathologie das Lungengewebe zunehmend geschädigt wird. Infizierte Mäuse versterben stammabhängig nach ca. einem halben bis zwei Jahren an den Folgen der Infektion (Ordway and Orme 2011). Die chronische Infektionsphase in der Maus unterscheidet sich deutlich von der chronischen Phase im Menschen, wo eine *M. tuberculosis* Infektion in der Regel vom Immunsystem kontrolliert werden kann und pauzibazillär latent verläuft. Darüber hinaus unterscheidet sich die Architektur der Granulome deutlich voneinander. Humane Granulome sind scharf umgrenzt und bestehen im Inneren aus Makrophagen, die von einer äußeren Schicht von Lymphozyten umgeben sind. Granulome können im Menschen verschiedene Stadien bilden. Die für eine mycobakterielle Infektion typische Variante ist die verkäsende Nekrose. Humane Granulome sind heterogen: sie können fibrotisch, calcifizierend oder kavernös sein. Granulome in Mäusen sind weniger klar strukturiert, zeigen nicht die typische Nekrose, verkäsen nicht und bilden keine Kavernen (Cosma, Sherman et al. 2003, Flynn 2006, Modlin and Bloom 2013). Niedrig dosierte Aerosolinfektionen rufen in nicht-humanen Primatenmodellen Infektionen hervor, die der menschlichen am ähnlichsten ist (Scanga and Flynn 2014).

## 2.2 Tuberkulose-Therapie: Vakzine und Antibiotika

Albert Calmette (1863-1933) und Camille Guérin (1872-1961) entwickelten zu Beginn des 20. Jahrhunderts einen attenuierten Stamm von *M. bovis* als Lebendimpfstoff, den Bacille Calmette-Guérin (BCG) Stamm. Seit 1998 wird dieser Impfstoff jedoch nicht mehr von der ständigen Impfkommission in Deutschland empfohlen. Der Impfstoff schützt zwar vor meningitischer Tuberkulose und disseminierender Miliartuberkulose, die beide vor allem in infizierten Kindern auftreten, aber er zeigt nur eine schwache protektive Wirkung gegen die pulmonale Tuberkulose in

Erwachsenen. Die derzeitige Forschung verfolgt mehrere Wege: zum einen die Optimierung des BCG-Stamms mittels Antigenüberexpression und Eliminierung von Immunevasionsmechanismen, zum anderen die Generierung von stark attenuierten *M. tuberculosis*-Bakterien als Lebendimpfstoff und schließlich die Verwendung von Adjuvanzen, die die Immunreaktion gegen das Vakzin steigern.

Heute wird Tuberkulose vor allem chemotherapeutisch bekämpft. Selman Waksman (1888-1973) entdeckte 1944 das Antibiotikum Streptomycin und damit das erste Medikament zur Tuberkulosetherapie (Jones, Metzger et al. 1944). Kurz darauf begann der klinische Einsatz gegen Tuberkulose und diverse andere bakterielle Erkrankungen, wie auch Tularämie und Gonorrhöe. Der klinische Einsatz von Streptomycin gegen Tuberkulose wurde bereits 1947 evaluiert (Tuberculosis Trials Committee 1948) und gilt als die erste randomisierte klinische Studie (D'Arcy Hart 1999). Waksman erhielt für die Entdeckung des Streptomycins 1952 den Nobelpreis für Medizin. Auf die ersten therapeutischen Erfolge mit Streptomycin folgte jedoch bald das Auftreten der ersten resistent gewordenen Tuberkulosebakterien (Crofton and Mitchison 1948). Meist handelt es sich um Mutationen in den Genen *rrs*, das für die 16S rRNA kodiert, und *rpsL*, das für das ribosomale Stabilisierungsprotein S12 kodiert (Meier, Kirschner et al. 1994, Sreevatsan, Pan et al. 1996). Streptomycin wird heute trotzdem noch immer als Zweite-Linie-Antibiotikum gegen Tuberkuloseinfektionen eingesetzt. Das derzeit von der WHO empfohlene Regimen zur Behandlung von Lungentuberkulose ist üblicherweise sechsmonatig – beginnend mit einer Kombination aus Isoniazid (INH), Rifampizin (RIF), Pyrazinamid (PZA) und Ethambutol (EMB) für zwei Monate, die in der viermonatigen Folgetherapie mit INH und RIF fortgesetzt wird. Für meningitische Tuberkulosefälle wird Streptomycin anstelle von Ethambutol empfohlen (WHO 2010). Diese Behandlung hat nur bei suszeptiblen Erregern Erfolg. MDR-Stämme sind gegen INH und RIF resistent und müssen daher mit Antibiotika der zweiten Linie (Capreomycin, Kanamycin, Fluoroquinolone, Streptomycin und Amikacin) behandelt werden, die oft starke Nebenwirkungen haben, weniger effektiv sind und höhere Kosten verursachen. Die Behandlung von MDR-Infektionen dauert häufig 18-24 Monate. Ausgehend von MDR-Stämmen haben sich in den letzten Jahren Mutanten mit erweitertem Resistenzspektrum entwickelt, die sich weltweit rasch ausbreiten. Solche *extended drug-resistant* (XDR)-TB-Stämme sind nicht nur gegen INH und RIF resistent, sondern zusätzlich gegen ein Fluoroquinolon und eines der injizierbaren Zweite-Linie-Antibiotika (Amikacin, Kanamycin oder Capreomycin) resistent. Je mehr Resistenzen hinzukommen, desto schlechter sind die Therapieerfolge und desto langwieriger ist die Behandlungsdauer, die oft zwei Jahre überschreitet.

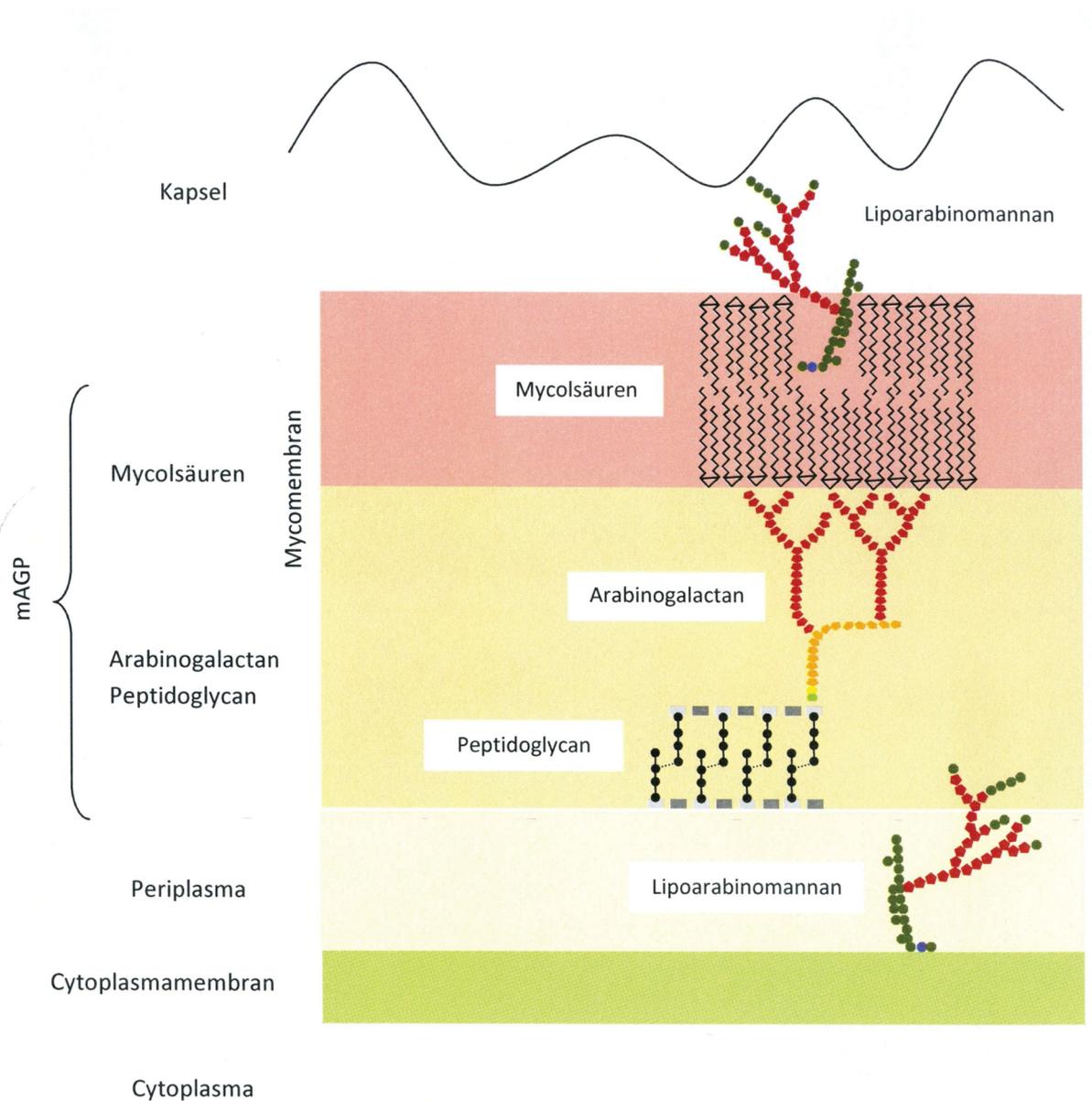
Folglich gibt es großen Bedarf für das Auffinden neuer Wirkorte für Antibiotika zur Tuberkulosechemotherapie (WHO 2014).

### 2.3 Zellwand der Mycobakterien

Mycobakterien weisen eine Besonderheit unter den Gram-positiven Bakterien auf: ihre außerordentlich lipidreiche Zellwand. Die mycobakterielle Zellwand besteht aus mehreren Schichten (vgl. Abb. 1). Von Außen nach Innen betrachtet liegt zuäußerst eine Art Kapsel, die vor allem aus extrahierbaren Polysacchariden sowie Lipiden, Peptiden und Proteinen besteht. Darunter befindet sich eine Schicht langkettiger  $\alpha$ -Alkyl-verzweigter  $\beta$ -Hydroxyfettsäuren, den Mykolsäuren, die zum Teil mit der darunter befindlichen Schicht des Arabinogalactan (AG) verestert sind. Unterhalb des AG liegt noch eine Peptidoglycan- (PG) bzw. Mureinschicht. Zuunterst liegt die Cytoplasmamembran (Lee, Brennan et al. 1996). Die Phospholipidkomposition der Plasmamembran von Mycobakterien umfasst Phosphatidylglycerin, Cardiolipin, Phosphatidylethanolamin sowie Phosphatidyl-*myo*-inositol und davon abgeleitete mannosylierte Glycolipide (Phosphatidyl-*myo*-inositolmannoside, PIMs) (Brennan and Crick 2007). Glycolipide sind Lipide, an die Kohlenhydrate angehängt sind, wie z.B. Trehalosemonomycolat (TMM) und Trehalosedimycolat (TDM). Lipoglycane sind Lipide, die noch höher glycosyliert sind und über lange Polysaccharidketten verfügen, wie Lipoarabinomannan (LAM) und Lipomannan (LM). Lipoglycane dienen oft als strukturgebende Polymere. Glycolipide und Lipoglycane besitzen zudem häufig immunmodulatorische Eigenschaften. Neben den genannten Molekülen sind verschiedene weitere Glycolipide, Glycoproteine und andere Faktoren wie z. B. Phthioceroldimycocerosate (PDIMs) im äußeren Teil der mycobakteriellen Zellwand zu finden.

Die mycobakterielle Zellwandstruktur ist einzigartig und stellt einen physikochemischen Schutz vor vielen äußeren Faktoren dar. Die beiden Permeabilitätsbarrieren, Cytoplasmamembran und Mycomembran, erschweren zudem die Aufnahme von Antibiotika und werden für die hohe intrinsische Resistenz der Mycobakterien gegen viele Antibiotika verantwortlich gemacht.

Das Lipoglycan LAM bildet zusammen mit dem mycolyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan-(mAGP)-Komplex die zwei Hauptbestandteile der mycobakteriellen Zellwand. Beide Komponenten spielen eine essentielle Rolle in der Viabilität und in der Virulenz des Pathogens (Briken, Porcelli et al. 2004, Jankute, Grover et al. 2014).



**Abb. 1: Schematischer Überblick über die Zellwand von Mycobakterien.** Oberhalb der Cytoplasmamembran befindet sich das Periplasma mit Lipo(arabino)mannan, gefolgt vom mycolyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan-(mAGP)-Komplex. Dieser quervernetzte Komplex setzt sich aus Mycolsäuren, Arabinogalactan und Peptidoglycan zusammen. Die Mycolsäuren bilden dabei eine Art äußere Schicht, die auch als Mycomembran bezeichnet wird. Auch in die Mycomembran können noch Lipo(arabino)mannan-Moleküle eingebettet sein. Aufgelagert auf diese Schicht befindet sich eine polysaccharidreiche kapselartige Struktur.

Zahlreiche Moleküle in der mycobakteriellen Zellwand wirken immunogen, so z.B. TMM und TDM (Indrigo, Hunter et al. 2002) sowie PDIM (Hotter, Wards et al. 2005) und Glycosylphenol-PDIM (Reed, Domenech et al. 2004). LAM und seine Vorstufen und die Phosphatidyl-*myo*-inositolmannoside (PIMs) spielen ebenfalls zentrale Rollen in der Immunologie und Pathogenese von *M. tuberculosis* (vgl. Kapitel 2.3.2). Die Struktur des LAM erinnert an die Lipoteichonsäuren der Gram-positiven Bakterien, die auch dort als Virulenzfaktoren bekannt sind. Einige Funktionen des LAM ähneln jedoch noch mehr denen der Lipopolysaccharide (LPS) aus Gram-negativen Bakterien. Unter anderem besitzt es eine starke immunogene Wirkung, die man sich im kompletten Freundschens Adjuvans zunutze macht, indem es eine proinflammatorische Immunantwort induziert (Briken, Porcelli et al. 2004, Yonekawa, Saijo et al. 2014).

### 2.3.1 Die mycobakterielle Zellwand: der mAGP-Komplex

Charakteristisches Kennzeichen der Mycobakterien ist die äußere Schicht der Mycolsäuren, die mit dem PG über AG verknüpft sind. Gemeinsam bilden sie den mAGP-Komplex. Der mAGP-Komplex ist das vorherrschende Makromolekül in der Zellwand der Mycobakterien.

Mycolsäuren sind hochmolekulare  $\alpha$ -Alkyl-verzweigte  $\beta$ -Hydroxyfettsäuremoleküle mit rund 60 bis 90 Kohlenstoffatomen. In den Hauptketten weisen sie zusätzliche funktionelle Gruppen wie Keto-, Methoxy- und Cyclopropyl-Modifikationen sowie Doppelbindungen auf (Collins, Goodfellow et al. 1982). Mycolsäuren sind meist verestert mit AG oder liegen verestert mit Trehalose als TDM vor, auch bekannt als Cord-Faktor. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigt sich die Mycolsäurehaltige Schicht als elektronendichte äußere Membran, eine etwa 7-8 nm dicke Lipiddoppelschicht, die auch als Mycomembran bezeichnet wird (Zuber, Chami et al. 2008). Neben ihrer strukturellen Schutzfunktion wirken die Mycolsäuren auch immunogen (McNeil and Brennan 1991).

AG besteht aus verzweigten Arabinofuranosyl (Araf)-Ketten und ist kovalent mit einer semi-linearen Galactofuranosyl (Gal<sub>f</sub>)-Kette verknüpft. Die terminalen Arabinosen des AG bilden auch den Anknüpfungspunkt für Mycolsäuren (McNeil, Daffe et al. 1991). Die Biosynthese des AG beginnt mit Polyprenol-Phosphat (Pol-P), einem universellen membranständigen Lipidcarrier, der in Mycobakterien üblicherweise als C<sub>50</sub>-Einheit vorliegt, dem Decaprenolphosphat (Dec-P). Diese Dec-P Einheit dient als Lipidanker in der Cytoplasmamembran. Auf diesen Carrier wird zunächst ein Molekül N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und darauffolgend ein Molekül Rhamnose angefügt. Diese Disaccharideinheit dient als Linkermolekül, über das später die kovalente Verknüpfung mit dem PG

erfolgen wird. In den nachfolgenden Schritten werden nun sukzessive ca. 30 Galf-Einheiten angefügt, die alternierend  $\beta(1\rightarrow5)$  und  $\beta(1\rightarrow6)$  glycosidisch verknüpft sind. Diese lineare Galactankette bildet das vollständige Galactanrückgrat des AG, das auf der periplasmatischen Seite durch verschiedene Arabinofuranosyltransferasen arabinosyliert wird. Die Araf-Einheiten liegen  $\alpha(1\rightarrow5)$ ,  $\alpha(1\rightarrow3)$  und  $\beta(1\rightarrow2)$  verknüpft im Molekül vor (Belanger, Besra et al. 1996, Mikusova, Yagi et al. 2000).

PG ist ebenfalls ein essentieller Bestandteil der mAGP-Komplex von *M. tuberculosis*. AG und PG sind über Phosphodiesterbrücken kovalent miteinander verknüpft. Das PG-Polymer besteht aus Zuckern und Aminosäuren, die eine homogene Schicht oberhalb der Plasmamembran bilden. Das Polymer besteht aus einer linearen Glycankette mit alternierenden  $\beta(1\rightarrow4)$  verknüpften Einheiten von GlcNAc und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc), die über Peptidbrücken quervernetzt sind (Petit, Adam et al. 1969, Schleifer and Kandler 1972, McNeil, Daffe et al. 1990, Crick, Mahapatra et al. 2001).

### **2.3.2 Die mycobakterielle Zellwand: Phosphoinositolmannoside (PIMs), Lipoarabinomannan (LAM) und Lipomannan (LM)**

Mycobakterien verfügen über eine große Vielzahl spezialisierter Glycolipide und Lipoglycane, die in die Modulation des Immunsystems und in die Pathogenese involviert sind – unter anderem PIMs, LM und LAM (Mishra, Driessen et al. 2011). Die wichtigsten Zuckerbestandteile der Lipoglycane und Glycolipide sind D-Araf und D-Mannopyranose (D-Manp). LAM gehört zu den hochmolekularen amphipathischen Lipoglycanen. Die Struktur ist dreiteilig: beginnend mit einem verankernden Phosphatidylinositol-Anteil, einer verzweigten Mannanregion sowie einer aufgelagerten, ebenfalls verzweigten Arabinanregion. LAM ist nicht-kovalent in der Plasmamembran und der Mykolsäureschicht verankert.

Mehrere Varianten des LAM sind bekannt, die sich in der Modifikation der terminalen Arabinosereste unterscheiden. Es kann beispielsweise unmodifiziert als Ara-LAM wie z.B. in der schnellwachsenden Spezies *Mycobacterium chelonae* vorliegen. Mannose-gecapptes, d.h. an den terminalen Arabinosen mannosyliertes LAM (Man-LAM) ist typischerweise in langsam wachsenden Bakterien wie *M. tuberculosis* zu finden, Phosphoinositol-gecapptes PI-LAM wird typischerweise in *M. smegmatis* gebildet. Jedes Man-LAM-Molekül besitzt in der Regel sieben Mannosidreste. Die Struktur der Kappe beeinflusst die Immunogenität des LAM (Mishra, Driessen et al. 2011).

Strukturell sind LM und LAM mit den PIMs verwandt. Phosphatidyl-*myo*-inositol dient als Startmolekül, aus dem durch unterschiedlich starke Mannosylierung PIMs gebildet werden. PIMs

können zwischen einem und sechs Mannoseresten und bis zu vier Acylketten besitzen (Guerin, Kordulakova et al. 2010). Werden PIMs noch höher als sechsfach mannosyliert, entsteht LM. Wird das Molekül noch um Arabinosylierungen ergänzt, wird es zum LAM (Mishra, Driessen et al. 2011). PIMs bilden den Grundbaustein der beiden Moleküle LM und LAM. Das Molekül PIM<sub>4</sub> gilt als das letzte gemeinsame Intermediat zwischen den höher mannosylierten PIMs und LM/LAM (Kovacevic, Anderson et al. 2006).

Der Mannananteil von LM und LAM setzt sich aus einer linearen  $\alpha(1\rightarrow6)$  verknüpften Kette zusammen sowie zusätzlichen  $\alpha(1\rightarrow2)$  Verzweigungen der linearen Kette. Der Kern der Moleküle besteht aus ungefähr 20-30 Man<sub>p</sub>-Resten insgesamt. Der Arabinananteil umfasst etwa 50-80 Araf-Reste. Die Arabinose-Einheiten liegen  $\alpha(1\rightarrow5)$  glycosidisch verknüpft mit einigen  $\alpha(1\rightarrow3)$ -Verzweigungen vor. Der Arabinananteil des LAM ist variabler als der Arabinananteil im AG (Chatterjee and Khoo 1998, Wolucka 2008). PIMs in Mycobakterien liegen hauptsächlich mono- und diacyliert vor: als AcPIM<sub>2</sub> oder Ac<sub>2</sub>PIM<sub>2</sub> oder AcPIM<sub>6</sub> und Ac<sub>2</sub>PIM<sub>6</sub>. Andere biosynthetische Intermediate der PIMs, wie PIM<sub>1</sub> und PIM<sub>3-5</sub> sind nur in geringen Anteilen in der Zellwand der Bakterien zu finden. PIMs können bis zu vierfach acyliert vorliegen (Jankute, Grover et al. 2014).

LAM ist wichtig für die Interaktion zwischen Tuberkulosebakterien und Makrophagen sowie dendritischen Zellen (DCs) (Tailleux, Schwartz et al. 2003). Man-LAM wurde in langsam wachsenden Mycobakterien, wie *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. bovis* sowie *M. bovis* BCG beschrieben. Man-LAM wirkt antiinflammatorisch und ist beteiligt an der Induktion von Phagozytose, der Verhinderung der Phagosomen-Lysosomen-Fusion sowie der Aktivierung der antituberkulären angeborenen, humoralen und erworbenen T-Zell-vermittelten Immunantwort (Armstrong and Hart 1975, McDonough, Kress et al. 1993, Chatterjee and Khoo 1998, Hayakawa, Tokumasu et al. 2007, Zhang, Reddy et al. 2013). Darüber hinaus verhindert Man-LAM die Aktivierung von Makrophagen, die Produktion der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-12 (IL-12) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF $\alpha$ ) sowie die Induktion von Apoptose (Nigou, Gilleron et al. 2003). Man-LAM und PIM<sub>6</sub> werden von C-Typ Lektinen, wie DC-SIGN, erkannt (Driessen, Ummels et al. 2009). Das nicht Mannose-gecappte PI-LAM wurde in schnell-wachsenden Mycobakterien wie *M. smegmatis* beschrieben und ist in der Lage, über die Aktivierung des TLR (*toll-like-receptor*)-2-Rezeptors die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zu induzieren (Means, Lien et al. 1999, Geijtenbeek, Van Vliet et al. 2003). Im Kontrast zur starken Wirkung vom LAM hat LM keinen Einfluss auf die Entwicklung des Phagolysosoms (Vergne, Chua et al. 2004).

Ara-LAM kommt in der Gruppe der schnellwachsenden-atypischen-avirulenten Mycobakterien vor (Gilleron, Himoudi et al. 1997). Es besitzt keine Kappe, d.h. keine Modifizierung der terminalen Arabinosereste. Ara-LAM induziert TNF $\alpha$  via TLR-2 in humanen (Means, Lien et al. 1999, Means, Wang et al. 1999) und murinen Makrophagen (Underhill, Ozinsky et al. 1999), was mit einer profunden Inflammation einhergeht und schließlich zur Klärung der Infektion in Mäusen führt (Wieland, Knapp et al. 2004).

### **2.3.3 Die mycobakterielle Zellwand: Zucker-Donoren**

Dec-P dient als Akzeptor für verschiedene Zucker, die es von Nukleotid-gebundenen Vorstufen übernimmt. Dec-P ist das Trägermolekül für aktivierte Zucker, welche als Donorsubstrate für die auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran ablaufenden Glycosylierungsreaktionen z. B. in der Synthese von PG, AG und anderen Zellwandkomponenten benötigt werden (Kaur, Brennan et al. 2004, Kaur, Guerin et al. 2009). Dec-P bildet darüber hinaus auch den Ankerpunkt auf der Cytoplasmamembran für die Assemblierung verschiedener Makromoleküle wie PG und AG (Brennan and Crick 2007).

#### **2.3.3.1 Arabinose und Mannose in Mycobakterien**

D-Arabinose kommt in der Natur selten vor. D-Arabinose ist eine Pentose, die als Furanose ausschließlich in Bakterien zu finden ist. Die einzige bekannte Quelle für D-Araf-Einheiten in Mycobakterien ist Decaprenolphosphoarabinose (DPA). Die Biosynthese startet ausgehend von Ribose-5-phosphat, das aus dem Pentosephosphat-Shunt stammt. Über mehrere Zwischenschritte entsteht daraus das Intermediat Decaprenolphosphoribose, welches zu DPA epimerisiert werden kann (Scherman, Weston et al. 1995, Wolucka 2008).

Mannose ist eine Hexose, die vorwiegend in ihrer Pyranoseform vorliegt. D-Man $\alpha$ -Einheiten stammen aus Glucose, die durch Phosphorylierung und Isomerisierung zu Mannose-1-phosphat umgewandelt wird. Mannose-1-phosphat steht dann für die Bildung der Nukleotid-aktivierten Vorstufe GDP-Mannose zur Verfügung und kann darüber auf eine Polyprenoleinheit übertragen werden, sodass Decaprenolphosphomannose (DPM) entsteht (Kaur, Brennan et al. 2004). Sowohl Arabinose als auch Mannose stehen so in Form der lipidgebundenen Zuckerdonoren DPA und DPM für die Übertragung auf Zellwandbestandteile zur Verfügung.

## 2.4 Aufnahme von Kohlenstoffquellen und anderen Substanzen

Bei der Aufnahme von Substanzen in die Bakterienzelle müssen in Mycobakterien grundsätzlich zwei Permeabilitätsbarrieren überwunden werden: die Mycomembran und die Cytoplasmamembran. Kleine, hydrophile Moleküle wie Zucker und Phosphate werden zunächst über Porine in der Mycomembran importiert (Stephan, Bender et al. 2005, Niederweis 2008). Solche Porine sind zwar in *M. smegmatis* charakterisiert worden, Homologe fehlen jedoch in den langsam-wachsenden Mycobakterien, so dass der Transport von hydrophilen Molekülen über die Mycomembran in *M. tuberculosis* kaum verstanden ist. Hydrophobe Substanzen passieren die Mycomembran dagegen vermutlich über Diffusion. Das im Labor als Standard-Kohlenstoffquelle für Mycobakterien eingesetzte Glycerin kann *in vitro* und *in vivo* direkt über Lipidmembranen diffundieren (Eze and McElhaneey 1981, Paula, Volkov et al. 1996). In der Zelle wird das Glycerin dann durch die Glycerinkinase GlpK zu Glycerin-3-phosphat phosphoryliert und gelangt so in den zentralen Kohlenstoffwechsel. Eine passive Diffusion über die Cytoplasmamembran ist für die allermeisten Moleküle jedoch nicht möglich, so dass dort spezielle Transportsysteme benötigt werden. Wie in anderen Bakterien auch, spielen ATP-Bindekassetten-(ABC)-Transporter in Mycobakterien eine wichtige Rolle für die Translokation diverser Substanzen über die Cytoplasmamembran. Die für diese Arbeit entscheidenden ABC-Transporter werden in Abschnitt 2.5 beschrieben.

Während der Infektion nutzt *M. tuberculosis* mutmaßlich vorwiegend Wirtslipide als Kohlenstoff- und Energiequelle, während Wirtszucker offenbar nicht in nennenswertem Umfang verwertet werden. Diese Annahme stützt sich hauptsächlich auf zwei experimentelle Befunde. Zum einen sind die Enzyme Isocitratlyase 1 und Isocitratlyase 2 in *M. tuberculosis* als essentiell sowohl für das *in vitro* Wachstum auf Fettsäuren als auch *in vivo* im Mausinfektionsmodell beschrieben worden (Munoz-Elias and McKinney 2005). Isocitratlyasen spielen eine Schlüsselrolle im Glyoxylatzyklus (Ashworth and Kornberg 1963, McKinney, Honer zu Bentrup et al. 2000, Munoz-Elias and McKinney 2005). Mit diesem anaplerotischen Stoffwechselweg kann das Bakterium das aus der  $\beta$ -Oxidation von geradzahigen Fettsäuren stammende Acetyl-CoA in Succinat umwandeln, welches anschließend für diverse anabole Stoffwechsellleistungen genutzt werden kann. Daneben kann das beim Abbau ungeradzahiger Fettsäuren entstehende Propionyl-CoA in den Methylcitratzyklus fließen und dort ebenfalls über die Isocitratlyasen, die auch Methylcitrat als Substrat nutzen können, weiter verstoffwechselt werden (McKinney, Honer zu Bentrup et al. 2000, Munoz-Elias and McKinney 2005, Eoh and Rhee 2014). Zum anderen wurde ein Schlüsselenzym der Gluconeogenese, die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK), als essentiell für das Wachstum auf Fettsäuren *in vitro*

und in der Mauseinfektion beschrieben (Marrero, Rhee et al. 2010). Diese Daten sind ein Indiz dafür, dass innerhalb des Phagosoms in Makrophagen kaum Zuckerquellen für *M. tuberculosis* zur Verfügung stehen. Die vermutete Hauptnahrungsquelle sind stattdessen Lipide, wie beispielsweise das Cholesterin aus der eukaryotischen Plasmamembran (Pandey and Sasseti 2008, Yam, D'Angelo et al. 2009).

Einige Komponenten von Kohlenhydrat-Importern wurden jedoch *in vitro* als essentiell beschrieben, so z.B. die Nukleotidbindedomäne UgpC des Transporters UgpAEBC (Sasseti, Boyd et al. 2003). In Analysen umfangreicher Transposonmutantenbibliotheken wurden auch *ugpB*, das Gen, das für das Substratbindeprotein des Importers UgpAEBC kodiert, sowie drei der vier Komponenten des Importers Rv2041-Rv2038c (Rv2038, Rv2039c und Rv2040c) als vermutlich *in vivo* essentiell an Tag 10 und Tag 45 nach Infektion im Mauseinfektionsmodell beschrieben (Sasseti, Boyd et al. 2003, Griffin, Gawronski et al. 2011). Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass dem Bakterium zumindest zu Beginn der Infektion auch bislang unbekannt Kohlenhydrate des Wirts zur Verfügung stehen.

## 2.5 ABC-Transporter

ABC-Transporter sind ubiquitär in Eukaryoten und Prokaryoten anzutreffen und vermitteln dort den gerichteten, aktiven Import oder Export von Molekülen durch Kopplung an die Hydrolyse von ATP. Einige von ihnen sind unter anderem in den Export von Zellwandbestandteilen involviert, andere in den Import von organischen und anorganischen Verbindungen für den bakteriellen Katabolismus. Üblicherweise bestehen die Transporter aus vier Domänen: zwei hydrophoben Membranspannenden Domänen (MSD) und zwei hydrophilen Nukleotid-bindenden Domänen (NBD). Die NBDs sind unabhängig von Herkunft und Substratspezifität zu etwa 30-40% sequenzkonserviert. Die Gene der einzelnen Transporterkomponenten liegen meist als Operon oder als Cluster vor. Die beiden MSDs bestehen in den meisten Fällen aus jeweils vier bis acht (meist sechs) Transmembranhelices, die gemeinsam eine Art Kanal durch die Cytoplasmamembran bzw. eine wässrige Kammer in der Cytoplasmamembran bilden. Die MSDs können als Homodimer oder Heterodimer vorliegen. Die NBD ist im Wesentlichen charakterisiert durch ein Walker A- und ein Walker B-Motiv, die gemeinsam eine Bindetasche für ATP bilden, sowie ein Signaturmotiv, den sogenannten C-Loop. Durch die Bindung von ATP an die NBDs ändert sich die Konformation des ganzen Transporters, so dass der Transport ermöglicht wird. Durch die Hydrolyse des ATP und die anschließende Freisetzung von ADP gelangt der Transporter dann wieder in den Ruhezustand. Gemeinsam bilden diese vier Komponenten (zwei NBDs, zwei MSDs) die Minimalversion eines ABC-Transporters (Ames, Mimura et al. 1990, Higgins

1992, Davidson and Chen 2004, Higgins and Linton 2004). Importer sind spezifisch für Prokaryoten und verfügen als Besonderheit über ein hochaffines Substratbindeprotein (SBD), das in Gram-positiven Bakterien über einen Lipidanteil in der Cytoplasmamembran verankert ist und in den periplasmatischen Raum ragt, um dort den direkten Kontakt zum Substrat herzustellen (Braibant, Gilot et al. 2000).

Das Genom von *M. tuberculosis* kodiert für 37 ABC-Transporter, die rund 2,5% des Genoms ausmachen (Braibant, Gilot et al. 2000). Es wurden 26 vollständige Transporter beschrieben, für die in bioinformatischen Analysen mindestens eine NBD und eine MSD gefunden wurden, sowie elf weitere, unvollständige ABC-Transporter. 16 dieser Transporter wurden als Importer beschrieben, 21 als Exporter. Von vielen der ABC-Exporteure wird angenommen, dass sie als Antibiotika-Effluxpumpen fungieren können. Die Anzahl der ABC-Importeure ist im Vergleich zu anderen Bakterien relativ klein und spiegelt vermutlich das eingeschränkte Nährstoffangebot innerhalb der okkupierten ökologischen Nische im infizierten Wirt sowie die Fähigkeit des Bakteriums wider, viele essentielle Komponenten *de novo* herzustellen und somit auch in Gegenwart weniger verwertbarer Nährstoffe zu wachsen (Braibant, Gilot et al. 2000).

### 2.5.1 ABC-Transporter: Zuckerimporter

Eine detaillierte Charakterisierung von Zuckerimportern ist besonders im Kontext der Identifizierung neuer Wirkorte für Antibiotika von Bedeutung. Innerhalb des Bakteriums gelegene Wirkorte sind in Mycobakterien nur schwer zu erreichen, da ihr spezieller Zellwandaufbau (vgl. Abb. 1) die Aufnahme von Antibiotika größtenteils verhindert. Da das SBD von Zuckerimportern jedoch zur periplasmatischen Seite gerichtet ist, ist es weniger stark abgeschirmt und für potentielle Inhibitoren prinzipiell leichter zugänglich.

Bislang ist unklar, welche Zucker dem Bakterium im Wirt überhaupt zur Verfügung stehen und welche davon verstoffwechselt werden. *M. tuberculosis* verfügt über nur fünf Kohlenhydratimporter. Vier davon gehören zur Klasse der ABC-Transporter (UgpAEBC, Rv2041c-Rv2038c, LpqY-SugABC und UspABC), einer zur Major-Facilitator-Superfamilie (SugI) (De Rossi, Arrigo et al. 2002, Niederweis 2008). Zucker scheinen daher als Kohlenstoffquelle für *M. tuberculosis* mengenmäßig eine untergeordnete Rolle zu spielen. Jedoch wurden, wie unter 2.4 beschrieben, die Komponenten einiger der genannten ABC-Importeure als essentiell sowohl für das Wachstum *in vitro* (Sasseti, Boyd et al. 2003, Griffin, Gawronski et al. 2011), als auch für das Wachstum *in vivo* beschrieben (Zhang,

Reddy et al. 2013). Angesichts des im Vergleich zu *M. smegmatis* (6,9 Mbp) eher reduzierten Genoms von *M. tuberculosis* (4,4 Mbp) wird es möglicherweise einen wichtigen physiologischen Grund für das Bakterium geben, dass diese Transporter weiterhin zur Verfügung stehen. Denkbar wäre, dass diese Transporter zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Infektion für das Bakterium von Bedeutung sind.

Das saprophytisch lebende Bodenbakterium *M. smegmatis* hingegen verfügt über 28 Kohlenhydratimporter, 19 davon sind vom ABC-Typ (Titgemeyer, Amon et al. 2007). Eine umfangreiche Ausstattung mit hochaffinen ABC-Importern reflektiert die Exposition gegenüber einer Vielzahl verfügbarer Substrate im natürlichen Habitat und könnte ein Vorteil gegenüber anderen mikrobiellen Nahrungskonkurrenten sein (Ren and Paulsen 2005, Niederweis 2008).

Der einzige der vier ABC-Kohlenhydratimporter, dessen Funktion bekannt ist, ist der Trehalose-Transporter LpqY-SugA-SugB-SugC (Kalscheuer, Weinrick et al. 2010). Der Importer setzt sich aus dem periplasmatischen Lipoprotein LpqY, der ATP-Hydrolysedomäne SugC, sowie SugA und SugB zusammen, die die heteromeren MSDs bilden. Der Importer zeigt eine hohe Affinität und Spezifität für das Disaccharid Trehalose. Deletionsmutanten der NBD und SBD in *M. tuberculosis* konnten keine Trehalose mehr aufnehmen und zeigten in Gegenwart von Trehalose als alleiniger Kohlenstoffquelle kein Wachstum mehr (Kalscheuer, Weinrick et al. 2010). Da Trehalose in Säugetieren nicht vorkommt, konnte jedoch eine Rolle des Transporters in der Aufnahme von Wirtszuckern ausgeschlossen werden. Trehalose dient neben weiteren biologischen Funktionen allerdings auch als Zuckerkomponente verschiedener Glycolipide wie TMM, TDM und von Sulfolipiden. Darüber hinaus akkumulierte in zellfreien Überständen der Deletionsmutante bei Wachstum auf Glycerin Trehalose in freier Form, die weder im Wildtyp noch in den komplementierten Mutanten nachweisbar war. Daher wurde vermutet, dass der Transporter stattdessen hilft, Trehalose als bakterielles Produkt zurückzugewinnen und so eine Art Recyclingfunktion wahrnimmt (Kalscheuer, Weinrick et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Trehalose als Trägermolekül für die auszuschleusenden Mycolsäuren dient. Trehalose und Mycolsäuren werden im Cytosol zu TMM gekoppelt und bilden so die Transportform der Mycolsäuren, die über den Transporter MmpL3 ausgeschleust wird (Grzegorzewicz, Pham et al. 2012). Im Periplasma wird der Mykolsäurerest von TMM von den Mycolyltransferasen des Antigen-85-Komplex (FbpABC) entweder auf AG übertragen, was zur Bildung von Arabinogalactanmycolat führt, oder auf ein zweites Molekül TMM, was zur Bildung von TDM führt. In beiden Fällen wird ein Molekül Trehalose freigesetzt. Die freigewordene Trehalose kann

dann über den ABC-Transporter LpqY-SugABC retrograd in das Cytoplasma zurücktransportiert werden, wo sie auf cytoplasmatischer Seite erneut als Carriermolekül für Mycolsäuren zur Verfügung steht (Kalscheuer, Weinrick et al. 2010). Während diese Recyclingfunktion für das Wachstum *in vitro* bei Überschuss einer Kohlenstoffquelle wie Glycerin oder Glucose nicht wichtig ist, spielt sie gleichwohl eine bedeutsame Rolle in der Virulenz von *M. tuberculosis*, wie sich in der starken Attenuierung von Deletionsmutanten der NBD und SBD nach Aerosolinfection von immunkompromittierten SCID (*severe combined immunodeficiency*)-Mäusen und von immunkompetenten BALB/c Mäusen zeigte (Kalscheuer, Weinrick et al. 2010).

### 2.5.2 ABC-Transporter: Kohlenhydratexporter

Verschiedene Moleküle müssen aus dem Zellinneren über die Cytoplasmamembran nach außen transportiert werden, beispielsweise um die Asymmetrie biologischer Membranen aufrecht zu erhalten. Dieser Schritt erfolgt nicht spontan, sondern durch Proteine, die diesen Schritt katalysieren, sogenannte Flippasen (siehe auch 2.5.2.3). Es gibt Flippasen, die ohne ATP-Verbrauch diese Translokationen vermitteln, und Flippasen, die für diesen Transport ATP hydrolysieren (Menon 1995). ABC-Transporter gehören zu den ATP-hydrolysierenden Flippasen.

Sowohl in Gram-negativen als auch in Gram-positiven Bakterien übernehmen ABC-Transporter den Export von Glycanen wie Teichonsäuren, Kapselpolysacchariden und beispielsweise auch den Export des O-Antigens des Lipopolysaccharids (LPS), dem Hauptvirulenzfaktor Gram-negativer Bakterien.

Ein bekanntes Beispiel ist der Export des polymannosylierten O-Antigens des LPS in den *E. coli* Serotypen O8 und O9a. Beide Antigene sind Mannanpolymere, die sich nur in der Anzahl ihrer Mannosemoleküle und ihrer Verknüpfung unterscheiden. Als Zuckerdonoren für die Bildung des Homopolymers dienen nukleotidaktivierte Zucker, die dann auf der cytoplasmatischen Seite auf Lipidcarrier übertragen werden. Das Polysaccharid wird durch die sequentielle Übertragung von Monomeren auf das nicht-reduzierende Ende des Moleküls elongiert und noch im Cytoplasma phosphoryliert und methyliert, bevor es exportiert wird. Der Transporter für dieses Polysaccharid besteht aus den beiden Komponenten Wzm (MSD) und Wzt (NBD). Wzm bildet das integrale Protein mit sechs potentiellen membranspannenden  $\alpha$ -Helices. Das Wzt-Protein besitzt zwei funktionelle Domänen: das N-terminale Ende dient der ATP-Hydrolyse, während das C-terminale Ende die Spezifität des Transporters für O8 oder O9a bestimmt. Wzt ist also ein bifunktionales Enzym, das sowohl als SBD als auch als NBD dient. Nach dem Wzm/Wzt vermittelten Transport vom Cytoplasma

in das Periplasma ligiert dann das Protein WaaL auf der periplasmatischen Seite das O-Antigen auf den Lipid-A-Kern des LPS, bevor es in die äußere Membran transportiert wird (Cuthbertson, Powers et al. 2005, Cuthbertson, Kimber et al. 2007, Cuthbertson, Kos et al. 2010).

### 2.5.2.1 Zellwandsynthese-involvierte Kohlenhydratexporter: Rv1457c-Rv1458c

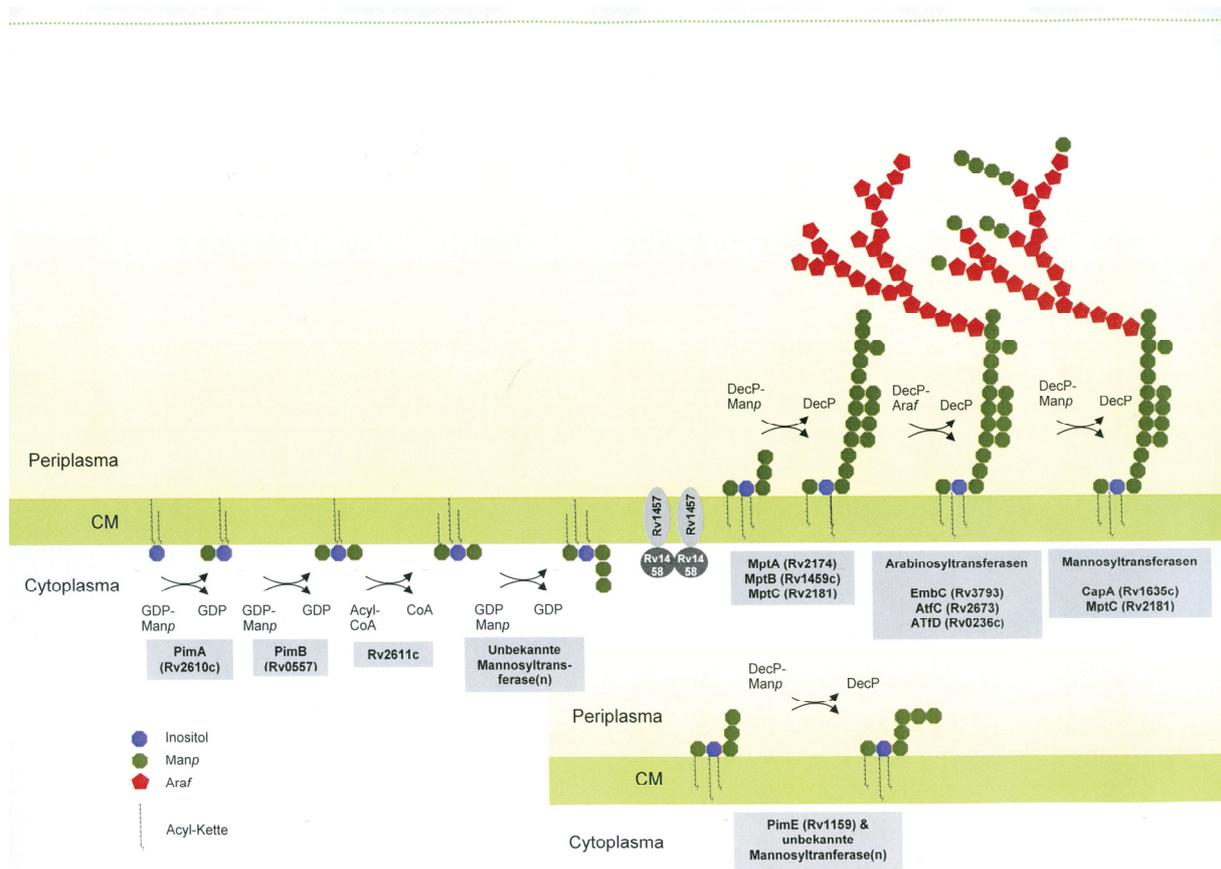
Die Biosynthese von PIMs, LM und LAM erfolgt räumlich prinzipiell zweigeteilt. Während die initialen Schritte zur Synthese des gemeinsamen Intermediats PIM<sub>4</sub> auf der cytosolischen Seite der Cytoplasmamembran stattfinden, erfolgen die weiteren Glycosylierungsschritte auf der periplasmatischen Seite (Guerin, Kordulakova et al. 2010). Diese Aufteilung erfordert, dass während der Synthese eine transmembranäre Umorientierung von PIM<sub>4</sub> stattfinden muss (vgl. Abb. 2). Der molekulare Mechanismus, der diesem Flipping von PIM<sub>4</sub> zugrunde liegt, konnte bislang nicht identifiziert werden.

Die für einen putativen ABC-Transporter kodierenden Gene Rv1457c und Rv1458c bilden zusammen mit Rv1459c ein Operon in *M. tuberculosis*. Für das Homolog zu Rv1459c, MptB (NCgl1505) in *Corynebacterium glutamicum*, konnte eine  $\alpha(1\rightarrow6)$ Mannopyranosyl-Transferase-Aktivität gezeigt werden (Mishra, Alderwick et al. 2008). Dieser Mannosyltransfer erfolgt vermutlich während der von PIM<sub>4</sub> ausgehenden Synthese von LM/LAM auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran (vgl. Abb. 2). Einer für diese Mannosyltransferase defizienten *knock-out*-Mutante in *C. glutamicum* fehlten auch die äquivalenten mannosylierten Zellwandbestandteile zum mycobakteriellen LM und LAM (Cg-LM-A und Cg-LM-B als Äquivalente zu LM, sowie Cg-LAM als Äquivalent zu LAM). Gleichzeitig akkumulierten intrazelluläre Vorstufen wie Ac<sub>1</sub>PIM<sub>2</sub> (Mishra, Alderwick et al. 2008). Diese Befunde lassen darauf schließen, dass es ein zu exportierendes Substrat gibt, das biosynthetisch zwischen Ac<sub>1</sub>PIM<sub>2</sub> und LM/LAM eingeordnet werden kann, und in den nachfolgenden periplasmatischen Schritten durch MptB mannosyliert wird.

In *M. smegmatis* wurde eine homologe  $\alpha(1\rightarrow6)$ -Mannopyranosyl-Transferase gefunden, Msmeg\_3120. Das Enzym ist funktional aktiv. In der  $\Delta$ Msmeg\_3120 Mutante von *M. smegmatis* akkumulierten jedoch weder Vorstufen, noch reduzierten sich die Endprodukte LAM oder LM. Es wird daher vermutet, dass eine funktionell redundante Mannosyltransferase in *M. smegmatis* existiert (Mishra, Alderwick et al. 2008).

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Hypothese zur Funktion des ABC-Transporters Rv1457c-Rv1458c ist in Abb. 2 dargestellt. Beginnend auf der cytoplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran werden

schrittweise vier Mannosylreste auf Phosphoinositol übertragen. Das so entstandene PIM<sub>4</sub> wird dann vermutlich durch den ABC-Transporter Rv1457c-Rv1458c auf die periplasmatische Seite der Cytoplasmamembran transportiert. PIM<sub>4</sub> steht dann für weitere Mannosylierung zur Verfügung, was in der Bildung von höher mannosylierten PIMs, LM oder LAM resultiert.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der hypothetischen Funktion des Transporters Rv1457c-Rv1458c im Export von Phosphatidylinositol-Tetramannosid (PIM<sub>4</sub>).** Die Synthese der PIMs beginnt auf der cytoplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran, wo Manp von GDP-Manp durch PimA auf Phosphatidylinositol übertragen wird (Kordulakova, Gilleron et al. 2002). In den nächsten Schritten werden drei zusätzliche Manp übertragen, katalysiert durch PimB (Schaeffer, Khoo et al. 1999), Rv2611c (Jankute, Grover et al. 2012) und eine oder mehrere bisher unbekannte Mannosyltransferasen. Das so entstandene PIM<sub>4</sub> wird dann vermutlich durch den ABC-Transporter Rv1457c-Rv1458c (grau dargestellt) auf die periplasmatische Seite der Cytoplasmamembran transportiert. PIM<sub>4</sub> wird dort zunächst weiter mannosyliert durch die Dec-P-Manp-(DPM)-abhängigen Transferasen MtpA (Mishra, Alderwick et al. 2007), MtpB (Mishra, Alderwick et al. 2008) und MtpC (Mishra, Driessen et al. 2011), wodurch Lipomannan (LM) gebildet wird. In den nachfolgenden Arabinosylierungsschritten wird DecP-Araf (DPA) durch verschiedene Arabinosyltransferasen (EmbC, AftC, AftD) übertragen (Birch, Alderwick et al. 2008, Goude, Amin et al. 2008, Skovierova, Larrouy-Maumus et al. 2009). Das Mannose-Capping wird schließlich von den Mannosyltransferasen Rv1635c, MptC und CapA übernommen (Kaur, Obregon-Henao et al. 2008, Driessen, Ummels et al. 2009, Mishra, Driessen et al. 2011). Auch hier dient Dec-P-Manp als Substrat. Abkürzungen: Acyl-CoA, Acyl-CoenzymA; Araf, Arabinofuranose; CM, Cytoplasmamembran; Dec-P, Decaprenolphosphat; GDP, Guanosindiphosphat; Manp, Mannopyranose.

### 2.5.2.2 Zellwandsynthese-involvierte Kohlenhydratexporter: Rv3781-Rv3783 und Msmeg\_6366-Msmeg\_6369

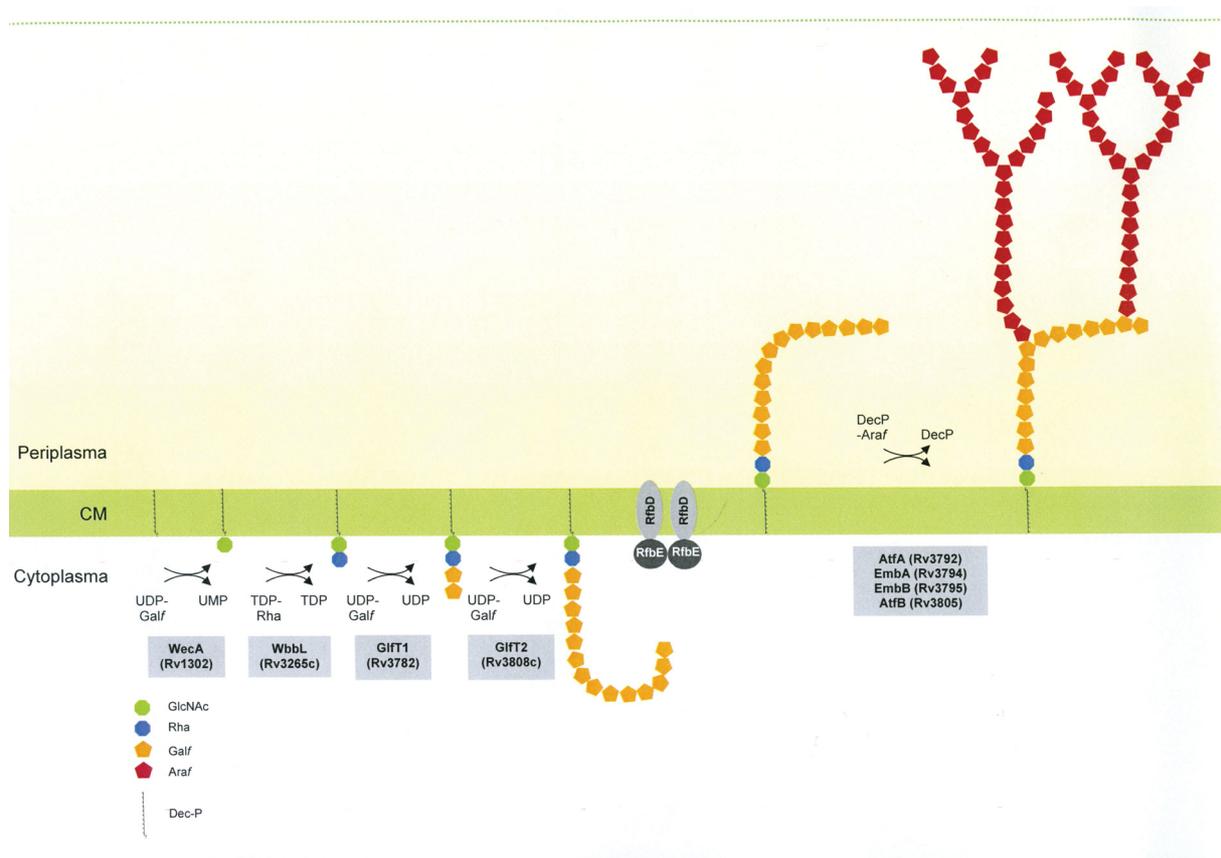
Die Biosynthese von AG erfolgt in räumlich getrennten Vorgängen. Die Synthese der Galactankette erfolgt intrazellulär auf der cytosolischen Seite der Cytoplasmamembran (Belanova, Dianiskova et al. 2008, Dianiskova, Kordulakova et al. 2011). Erst auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran erfolgt die Arabinosylierung der Galactankette zum AG. Damit die Galactankette die Cytoplasmamembran überqueren kann, muss eine Flippase das Molekül translozieren (vgl. Abb. 3). Der molekulare Mechanismus dieses Flippings konnte bislang nicht identifiziert werden. Es wird vermutet, dass ein ABC-Transporter dieses Flipping vermittelt (Dianiskova, Kordulakova et al. 2011).

Aufgrund von partiellen Sequenzidentitäten der Nukleotidbindedomäne RfbE/Wzt (Rv3781) zum N-Terminus des Proteins TagH von *Bacillus subtilis* (41% identische Aminosäuren (AS) über einen Bereich von 243 AS), das in den Export von Teichonsäuren beteiligt ist, sowie von Homologien zu RfbE in *Yersinia enterocolitica* (48% über 224 AS), zu Wzt in *Brucella melitensis* (42% über 244 AS) und zu Rfbl in *Vibrio cholerae* (41% über 99 AS), die am Export des O-Antigen von LPS beteiligt sind, wird vermutet, dass Rv3781/Rv3783 am Export von Zellwand-Polysacchariden zur Zelloberfläche beteiligt ist (Braibant, Gilot et al. 2000).

Die Gene der beiden Transporterkomponenten Rv3781 (NBD) und Rv3783 (MSD) sind zu Beginn eines Genclusters lokalisiert, welches zahlreiche an der Arabinogalactansynthese beteiligte Gene umfasst. Zudem flankieren die beiden Gene das Gen der Galactosyltransferase GltT1 (Rv3782), mit welchem sie wahrscheinlich als Transkriptionseinheit, als Operon, organisiert sind. GltT1 ist an den initialen Schritten der Biosynthese von AG beteiligt (vgl. Abb. 3). Daher ist es denkbar, dass der Transporter in den Export von AG involviert ist (Belanger, Besra et al. 1996).

In Abb. 3 wird ein schematischer Überblick über die dieser Arbeit zugrunde liegende Hypothese zur Funktion des ABC-Transporters Rv3781(RfbD)-Rv3783(RfbD) gegeben und die Beteiligung der GltT1 dargestellt. Die Synthese beginnt auf der cytoplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran. Hier wird GlcNAc auf ein Dec-P übertragen, gefolgt von einer Rhamnose und zunächst zwei Galactosemolekülen, katalysiert durch GltT1 (Rv3782). Die Polymerisation der weiteren Galactosemoleküle erfolgt durch GltT2 (Rv3808). Die lipidgebundene Galactankette muss nun über die Cytoplasmamembran geflippt werden. Dieser Schritt erfolgt mutmaßlich über den ABC-

Transporter RfbD/RfbE (Rv3781-Rv3783). Auf der periplasmatischen Seite erfolgen dann Arabinosylierungen durch verschiedene Arabinosyltransferasen.



**Abb. 3: Schematische Darstellung der hypothetischen Funktion des Transporters Rv3781(RfbE)-Rv3783(RfbD) im Export von Arabinogalactan (AG) in *M. tuberculosis*.** Die Synthese des AG beginnt auf der cytoplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran, wo zunächst UDP-GlcNAc durch WecA (Rv1302) auf ein Decaprenolmolekül übertragen wird. Im nächsten Schritt wird eine UDP-aktivierte Rhamnose durch WbbL (Rv3265c) übertragen (Mills, Motichka et al. 2004). Anschließend katalysiert die Galactosyltransferase Gift1 (Rv3782), deren Strukturgenen zwischen den Genen der beiden Komponenten des ABC-Transporters liegt, die Verknüpfung mit den ersten beiden Galactoseeinheiten (Mikusova, Belanova et al. 2006). Dieses Molekül wird dann durch die Galactosyltransferase Gift2 (Rv3808) weiter elongiert (Belanova, Dianiskova et al. 2008). Die entstandene lipidgebundene Galactankette wird dann möglicherweise durch den ABC-Transporter RfbD/RfbE (grau/schwarz dargestellt) auf die periplasmatische Seite der Cytoplasmamembran transportiert. Im Periplasma wird durch verschiedene Arabinosyltransferasen (AtfA, AtfB, EmbA, EmbB) (Belanger, Besra et al. 1996, Alderwick, Seidel et al. 2006, Seidel, Alderwick et al. 2007), die alle DecP-Araf (DPA) als Substrat nutzen, die Galactankette umfangreich arabinosyliert. Abkürzungen: Araf, Arabinofuranose; CM, Cytoplasmamembran; Dec-P, Decaprenolphosphat; UDP, Uracildiphosphat; TDP, Thymidindiphosphat; Rha, Rhamnose; Galf, Galactofuranose.

Innerhalb des Genclusters der AG-Synthese sind auch die Zielproteine des Antibiotikums Ethambutol kodiert: *embCAB*. Ethambutol inhibiert die Polymerisation des Arabinans, woraufhin DPA akkumuliert, weil die Arabinose nicht mehr auf das Zellwandakzeptormolekül übertragen werden kann. Resistenzen gegen Ethambutol beruhen in der Regel auf Überexpression der EMB-Proteine, Mutationen im *EmbB* oder beidem (Telenti, Philipp et al. 1997). Bis zu 4% der Klinikisolate von *M. tuberculosis* sind bereits gegen Ethambutol resistent (Bloch, Cauthen et al. 1994, Cohn, Bustreo et al. 1997). Ethambutol wird noch heute eingesetzt, weil es vor allem synergistisch wirkt. Indem es die AG-Synthese unterbricht, wird die makromolekulare Assemblierung des mAGP-Komplex zerstört (Belanger, Besra et al. 1996, Telenti, Philipp et al. 1997). Damit können Antibiotika mit intrazellulären Wirkorten wie Rifampicin leichter eindringen.

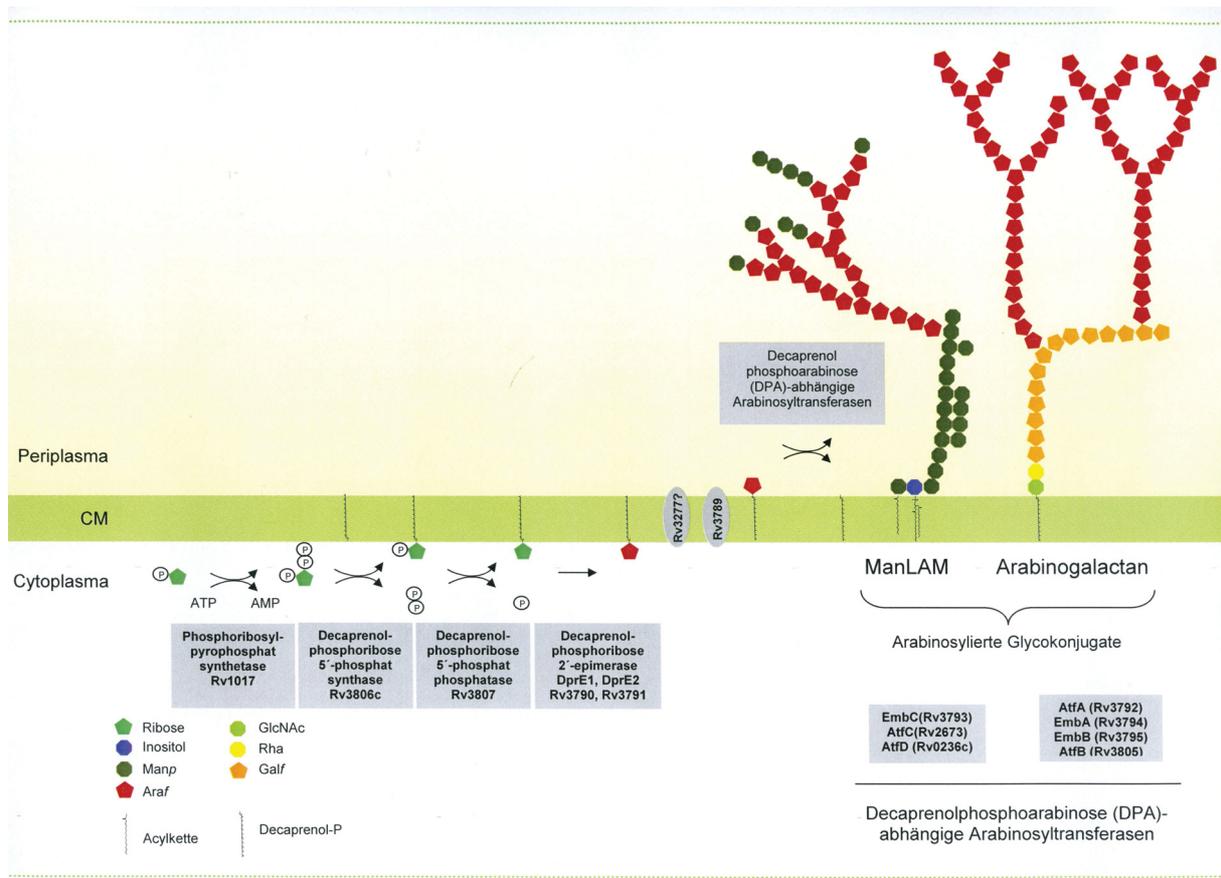
### 2.5.2.3 Zellwandsynthese-involvierte Kohlenhydratexporter: *Msmeg\_1817*

Neben ABC-Transportern (siehe 2.5.2) gibt es auch andere Typen von Flippasen. Flippasen dienen dazu, Lipide oder lipid-verknüpfte Moleküle von der cytoplasmatischen Seite auf die periplasmatische Seite zu translozieren – ein Prozess, der als Flipping bezeichnet wird (Raetz 1986, Ames, Mimura et al. 1990).

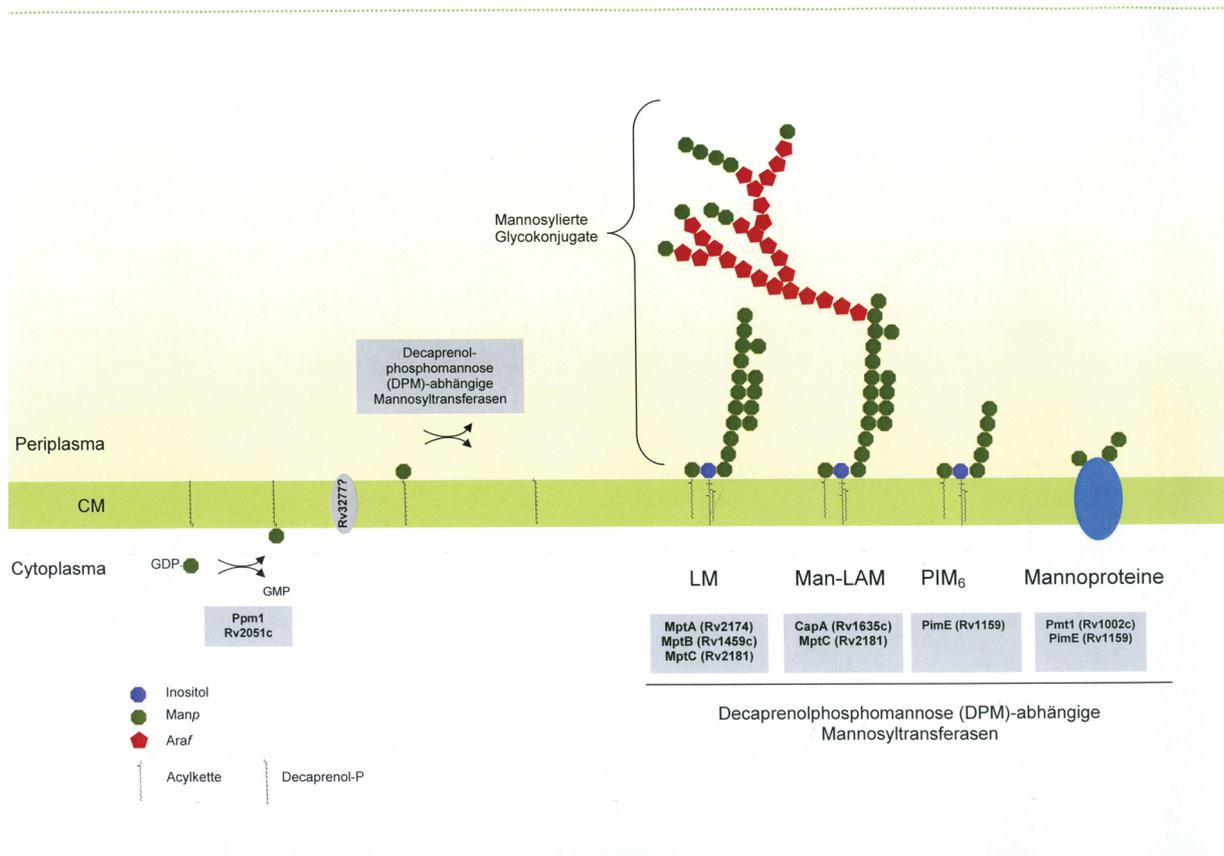
Auch bei lipidgebundenen Zuckern wie DPA und DPM ist die Biosynthese von der Nutzung als Substrat räumlich getrennt. Die Synthese der lipidverknüpften Zucker erfolgt intrazellulär über nukleotidaktivierte Vorstufen auf der cytosolischen Seite der Cytoplasmamembran (Daleke 2007). DPA und DPM werden jedoch auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran für Arabinosylierungen und Mannosylierungen von Zellwandbestandteilen benötigt. Dazu müssen DPA bzw. DPM über die Cytoplasmamembran geflippt werden (siehe Abb. 4 und 5). Der molekulare Mechanismus dieses Flippings konnte bislang nicht aufgeklärt werden.

In manchen Prokaryoten übernehmen Translokasen, die Ähnlichkeiten zu kleinen Multidrug-Resistenz-Transportern haben, diese Funktion (Higgins and Gottesman 1992). Eine bekannte Klasse dieser Flippasen sind die GtrA-ähnlichen Flippasen. Es handelt sich um kleine, sehr hydrophobe Enzyme von ~120 Aminosäuren. Das bekannteste Beispiel stammt aus *Shigella flexneri*, wo das Gencluster *gtrA*, *gtrB* und *gtrX* die Konversion des O-Antigens, dem distalen Anteil des LPS, durch Übertragung eines Glycosylrestes vermittelt (Guan, Bastin et al. 1999). GtrB katalysiert den Transfer der Glucose von einer nukleotidaktivierten Vorstufe zu einem Lipidträgermolekül. GtrA transloziert die lipidverknüpfte Glucose dann über die Cytoplasmamembran, wo GtrX schließlich den eigentlichen

Glycosyltransfer übernimmt (Guan, Bastin et al. 1999, Allison and Verma 2000, Korres, Mavris et al. 2005). In *M. tuberculosis* liegt eine GtrA-homologe Translokase, Rv3789, unmittelbar stromabwärts, also hinter dem 3'-Ende der Gene *drpE1* und *dprE2*, die für die Bildung von DPA verantwortlich sind (Kolly, Mukherjee et al. 2015). Die Deletion des Gens Rv3789 in *M. tuberculosis* führte zu keinem Wachstumsdefekt und resultierte in keiner signifikanten Änderung der Komposition des AG oder LAM (Larrouy-Maumus, Skovierova et al. 2012). Kürzlich zeigten Kolly und Mitarbeiter jedoch, dass Deletionsmutanten einen Wachstumsdefekt aufweisen, gepaart mit einer veränderten, rundlicheren Zellmorphologie. Die Deletion des homologen Gens in *M. smegmatis*, Msmeg\_6372, führte jedoch zu einer Reduktion des Arabinosegehalt von AG (ca. -15%) und von LAM (ca. -35%), während gleichzeitig DPA akkumulierte (Larrouy-Maumus, Skovierova et al. 2012). Kolly und Mitarbeiter konnten in einer Deletionsmutante sogar eine um 25% verringerte Ratio von Arabinose zu Galactose zeigen. Diese Beobachtungen legen nahe, dass Msmeg\_6372 entweder eine direkte DPA-spezifische Flippaseaktivität aufweist (Larrouy-Maumus, Skovierova et al. 2012) oder möglicherweise als Ankerprotein dient, dass Arabinosyltransferasen wie AftA rekrutiert (Kolly, Mukherjee et al. 2015). Da der Effekt hinsichtlich des AG und LAM nicht vollständig ist, wird das Vorhandensein einer redundanten Translokase vermutet, die ebenfalls DPA von der cytoplasmatischen Seite zum Periplasma umorientieren kann. In *M. tuberculosis* ist noch ein zweites GtrA-Homolog zusätzlich zu Rv3789 bekannt, das Gen Rv3277. Da die Gendeletion von Rv3789 ohne apparenten phänotypischen Effekt blieb, ist die Hypothese dieser Arbeit, dass es sich bei Rv3277 um die gesuchte redundante Flippase handelt. Rv3277 könnte ebenfalls DPA, möglicherweise aber auch andere lipidgebundene Zuckermoleküle in *M. tuberculosis* flippen. In *M. smegmatis* existiert ebenfalls ein Homolog zu Rv3277, Msmeg\_1817, das möglicherweise die redundante Funktion des DPA-Flippings übernimmt. In Abb. 4 und Abb. 5 sind die Arbeitshypothesen zur Funktion von Rv3277 dargestellt, die als Grundlage für die vorliegenden Forschungsarbeiten diente. DPM und DPA werden zunächst auf der cytoplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran synthetisiert (Jankute, Grover et al. 2012). Als Zuckerdonoren dienen phosphataktivierte (DPA) bzw. nukleotidaktivierte (DPM) Zucker. Um dann auf der periplasmatischen Seite für Arabinosyl- bzw. Mannosyltransferasen verfügbar zu sein, erfolgt das Flipping über die Cytoplasmamembran möglicherweise durch Rv3789 (DPA) und Rv3277 (DPA und DPM). Auf periplasmatischer Seite kann DPA dann für vielfältige Arabinosylierungen durch DPA-abhängige Arabinosyltransferasen, wie sie z.B. für die Synthese von AG und LAM notwendig sind, genutzt werden. Auch DPM steht nach dem Flipping auf der periplasmatischen Seite für verschiedenen Mannosylierungen durch DPM-abhängige Mannosyltransferasen zur Verfügung.



**Abb. 4: Schematische Darstellung der hypothetischen Funktion der Flippase Rv3277c im Export von Decaprenolphosphoarabinose (DPA) in *M. tuberculosis*.** Die Synthese von DPA beginnt auf der cytoplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran. Dort wird zunächst eine Phosphoribose zusätzlich phosphoryliert durch Rv1017 (Wolucka 2008). Phosphoribosylpyrophosphat wird nun mithilfe von Rv3806c auf ein Decaprenol-P-Kette übertragen und vermutlich durch Rv3807 dephosphoryliert (Wolucka 2008, Cai, Zhao et al. 2014). In den nachfolgenden Epimerisierungsschritten wird die Ribose in Arabinose umgewandelt und das resultierende DPA dann schließlich durch Rv3789 (Larrouy-Maumus, Skovierova et al. 2012) und möglicherweise auch Rv3277c (beide grau dargestellt) auf die periplasmatische Seite geflippt. Dort steht DPA nun für Arabinosylierungen von Glycokonjugaten wie Man-LAM und AG zur Verfügung (Larrouy-Maumus, Skovierova et al. 2012), die von verschiedenen DPA-abhängigen Transferasen wie EmbC, AtfC und AtfD (zur Arabinosylierung von Man-LAM) (Birch, Alderwick et al. 2008, Goude, Amin et al. 2008, Skovierova, Larrouy-Maumus et al. 2009) bzw. AtfA, AtfB, EmbA und EmbB (zur Arabinosylierung von AG) (Belanger, Besra et al. 1996, Alderwick, Seidel et al. 2006, Seidel, Alderwick et al. 2007), katalysiert werden. Abkürzungen: ADP, Adenosindiphosphat; Araf, Arabinofuranose; CM, Cytoplasmamembran; Dec-P, Decaprenolphosphat; Galf, Galactofuranose; GDP, Guanosindiphosphat; GlcNAc, N-Acetylglucosamin; Manp, Mannopyranose; Rha, Rhamnose.



**Abb. 5: Schematische Darstellung der hypothetischen Funktion der Transferase Rv3277c im Export von Decaprenolphosphomannose (DPM) in *M. tuberculosis*.** Die Synthese von DPM findet auf der cytoplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran statt. Dort wird eine GDP-aktivierte Mannose mithilfe von Ppm1 (Rv2051c) auf Dec-P übertragen, sodass DPM entsteht (Rana, Singh et al. 2012). DPM wird nun vermutlich durch Rv3277c (grau dargestellt) auf die periplasmatische Seite geflippt. Dort steht DPM dann für die Mannosylierungen von Glycokonjugaten wie LM, Man-LAM, PIM<sub>6</sub> und mannosylierten Proteinen zur Verfügung. Die DPM-abhängigen Mannosyltransferasen für die Synthese von LM sind MptABC (Mishra, Alderwick et al. 2007, Mishra, Alderwick et al. 2008, Mishra, Driessen et al. 2011), für die Synthese von Man-LAM CapA und MptC (Driessen, Ummels et al. 2009, Mishra, Driessen et al. 2011). Die Mannosylierung PIMs höherer Ordnung und einiger Mannoproteine wird katalysiert durch PimE (Morita, Sena et al. 2006), andere Mannoproteine werden an Serin- und Threoninresten zunächst durch Pmt1 mannosyliert (Liu, Tonini et al. 2013), während PimE die weitere(n) Mannosylierung(en) vermittelt (Driessen, Ummels et al. 2009). Abkürzungen: Araf, Arabinofuranose; CM, Cytoplasmamembran; Dec-P, Decaprenolphosphat; Galf, Galactofuranose; GDP, Guanosindiphosphat; Manp, Mannopyranose.

## 2.6 Genetische Manipulation von Mycobakterien

Für Mycobakterien stehen nur wenige, gut geeignete genetische Manipulationsmethoden zur Verfügung. Die Transformationseffizienz von Mycobakterien ist bei der Verwendung der für andere Bakterien üblichen Elektroporationsprotokollen relativ niedrig. Häufig werden Suizidplasmide oder linearisierte DNA verwendet, die ein inaktiviertes, markerhaltiges Allel tragen und dann durch homologe Rekombination zu selektionierbaren Klonen führen. Illegitime Rekombinationsereignisse kommen jedoch beim Allelaustausch häufig vor (Morsczeck 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Transduktion durch Phagen als Methode gewählt (siehe auch Material und Methoden, Kapitel 3.14). Phagen mit passenden Allelaustauschsubstraten führen durch homologe Rekombination zur Generierung von *Knock-out*-Mutanten für nicht-essentielle Gene bzw. *Knock-in*-Mutanten für essentielle Gene. Hier wird ortsspezifisch entweder der native Promotor durch ein durch das verwendete Allelaustauschsubstrat definierter DNA Bereich deletiert (*Knock-out*) oder eine regulierbare Promoterkassette vor dem Zielgen inseriert (*Knock-in*), sodass ein induzierbares Genexpressionssystem zur Verfügung steht.

Eine Genregulation über kurze aliphatische Moleküle wie Acetamid oder Butyramid war für Mycobakterien bereits etabliert, hat aber den Nachteil, dass es ein spezielles Medium benötigt und diese Induktormoleküle nicht für Experimente *in vivo* geeignet sind (Gomez and Bishai 2000, Roberts, Muttucumaru et al. 2003). Die Regulation von Genen über Tetracyclin-abhängige Genregulationssysteme ist für verschiedene Bakterien wie *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* und *Salmonella enterica* bereits beschrieben worden (Geissendorfer and Hillen 1990, Lutz and Bujard 1997, Qian and Pan 2002). Ein solches System, das über Tetracyclin als Induktor gesteuert wird, wurde für Mycobakterien adaptiert (Blokpoel, Murphy et al. 2005, Ehrt, Guo et al. 2005). Tetracyclin hat aufgrund seiner Membrangängigkeit den Vorteil, dass es auch während der Infektion in Tiermodellen eine kontrollierte Genexpression und damit die Analyse potentieller Antibiotikawirkorte erlaubt. In der AG Kalscheuer wurde in dieser Dissertation vorangegangenen Arbeiten dieses System weiter optimiert, so dass das ein gezieltes, effizientes Silencing von Genen in Mycobakterien sowohl im tetON- als auch im tetOFF-System möglich ist. Aufgrund seiner geringeren Toxizität und größeren Stabilität findet in diesem System anstelle von Tetracyclin Anhydrotetracyclin (Atc) als Induktor Einsatz. Im tetON-System werden Gene nur in Gegenwart von Atc voll exprimiert. Durch Verringerung des Atc im Medium kann ein graduelles Silencing erreicht werden, das für essentielle Gene in einer Wachstumsreduktion der Bakterien resultiert. Im tetOFF-System findet eine

volle Genexpression nur in Abwesenheit von Atc statt. Durch Zugabe von Atc kann auch hier ein schrittweises Silencing erreicht werden, das mit einer Reduktion des Wachstums einhergeht.

## 2.7 Zielsetzung der Arbeit

Die ungewöhnliche Zellwand der Mycobakterien, einschließlich des Humanpathogens *M. tuberculosis*, stellt eine außergewöhnliche Permeabilitätsbarriere dar. Daher müssen spezifische Transportsysteme die Translokation von Molekülen über die Cytoplasmamembran und die verschiedenen Zellwandschichten vermitteln, um einerseits Nährstoffe aufnehmen zu können und andererseits Zellwandmoleküle und Moleküle, die die Immunantwort des Wirts beeinflussen, ausschleusen zu können. Trotz ihrer großen Bedeutung für die Vitalität, Virulenz und Pathogen-Wirt-Interaktion ist nur wenig über diese Transportprozesse in *M. tuberculosis* bekannt. Insbesondere der Transport von Zuckern und Glycokonjugaten in Mycobakterien wurden bisher nur unzureichend untersucht. Das Genom von *M. tuberculosis* umfasst 37 ABC-Transporter. Sowohl die Funktion als auch die Substratspezifität der meisten dieser ABC-Transporter und ihre Rolle in der Virulenz sind unbekannt. Daher befasst sich die vorliegende Arbeit mit der funktionellen Charakterisierung von ABC-Transportern in *M. tuberculosis*. Der Fokus liegt auf putativen Zuckertransportern und Antibiotika-Exportern. Zwei putative ABC-Importer (Rv2038c-Rv2039c-Rv2040c-Rv2041c und UgpAEBC) und zwei putative ABC-Exportere (Rv3781-Rv3783 und Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c) sollen untersucht werden.

Der ABC-Importer UgpAEBC ist potentiell am Transport von Glycerin-3-phosphat beteiligt. Die Vermutung basiert auf geringen Proteinhomologien zu einer gut charakterisierten Permease in *E. coli* (Schweizer and Boos 1984, Brzoska, Rimmel et al. 1994). Der ABC-Importer Rv2038c-Rv2039c-Rv2040c-Rv2041c ist potentiell an der Aufnahme von Kohlenhydraten beteiligt. Diese Vermutung basiert auf Homologien zu bereits charakterisierten Zuckertransportern in anderen Bakterien (Braibant, Gilot et al. 2000). Da die Homologien in beiden Fällen jedoch sehr gering sind (~25%), kann keine zuverlässige Vorhersage über das transportierte Substrat getroffen werden. Beide ABC-Transporter sollen notwendig für die volle Virulenz von *M. tuberculosis* in Makrophagen- und/oder Mausinfektionsmodellen sein. Das bedeutet, dass beide Transporter wichtige Determinanten der Pathogenität darstellen.

Der putative ABC-Exporter Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c wurde unter speziellem Antibiotika-Stress als hochreguliert beschrieben (Hao, Shi-Liang et al. 2011). Deshalb wurde vermutet, dass es sich bei diesem Transporter um eine Antibiotika-Effluxpumpe handelt. Die vorhergesagte Essentialität dieses Genclusters lässt jedoch vermuten, dass der Antibiotika-Efflux nicht die Primärfunktion des Transporters ist, sondern seine Funktion aus anderen Gründen für die Viabilität der Bakterien notwendig ist. Die Gene Rv3781-Rv3783 (RfbD-RfbE) sind Teil des sogenannten Arabinogalactan-Biosyntheseclusters im Genom von *M. tuberculosis* (Dianiskova, Kordulakova et al. 2011). Daher wird vermutet, dass diese Permease eine Rolle im Export von Arabinogalactan spielt, ein Schritt der ebenfalls essentiell für die Viabilität von *M. tuberculosis* sein sollte.

Zusätzlich zu den ABC-Transportern sind auch andere Permeasen-Klassen am Transport von Glykokonjugaten in *M. tuberculosis* und anderen Mycobakterien beteiligt. GtrA-ähnliche Flippasen sind aus anderen Bakterien bekannt und vermitteln dort den Transport von Lipid-gekoppelten Glykokonjugaten über die Cytoplasmamembran. In der vorliegenden Arbeit soll daher ebenfalls die Funktion des GtrA-ähnlichen Proteins Msmeg\_1817 in *M. smegmatis* und seines Homologs Rv3277 in *M. tuberculosis* analysiert werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ABC	ATP Binding Cassette
ADS	Albumin Dextrose Salz
AG	Arabinogalactan
AK	Antikörper
Apra	Apramycin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Ara	Arabinose
ATc	Anhydrotetracyclin
ATP/ADP/AMP	Adenosin-(tri)-(di)-(mono)-phosphat
BCG	Bacille Calmette Guerin
BSA	Bovine Serum Albumin
C50-P	Decaprenylphosphat
CFU	Colony forming units
DAG	Diacylglycerin
DC	Dendritische Zelle
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPA	Decaprenolphospho-Arabinose
DPM	Decaprenolphospho-Mannose
EDTA	Ethylenediamintetraacetat
EMB	Ethambutol
<i>f</i>	Furanose
G3P	Glycerin-3-phosphat
Gal	Galactose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
Gluc	Glucose
Gm	Gentamycin
GTP/GDP/GMP	Guanosin-(tri)-(di)-(mono)-phosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Human immunodeficiency virus
Hyg	Hygromycin
Hz	Hertz
ICAM-3	Intercellular Adhesion Molecule 3
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Kan	Kanamycin
(K)bp	(Kilo)Basenpaare
(K)Da	(Kilo)Dalton
LAM	Lipoarabinomannan
LB	Luria Bertani
LM	Lipomannan

mAGP	Mycolyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan
MAME	Mycolsäuremethylester (Mycolic acid methyl ester)
Man	Mannose
Man-LAM	Mannosyliertes Lipoarabinomannan
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MOI	Multiplicity of Infection
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPI	<i>myo</i> -Phosphoinositol
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NADH+	Nicotinamidadenindinukleotid H+
OD	Optische Dichte
OM	Outer Membrane
ORF	Open Reading Frame
<i>p</i>	Pyranose
P	Phosphat
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PBS-T	Phosphatgepufferte Saline + 0,5% Tyloxapol
PCR	Polymerase chain reaction
PDIM	Phthioceroldimycozerosat
PFU	Plaque forming units
PI-LAM	Phosphoinositol-Lipoarabinomannan
PIM	Phosphatidyl- <i>myo</i> -inositolmannosid
PM	Plasmamembran
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PPM	Polyprenol-monophosphomannose
RANTES/CCL5	regulated-upon-activation normally T-cell-expressed and secreted
Rha	Rhamnose
Rib	Ribose
RNA	Ribonucleinsäure
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Saline
TBST	Tris-gepufferte Saline + 0,5% Tyloxapol
TEMED	Tetramethylethylendiamin
tetO	Tet-Operator
tetR	Tet-Repressor
TLC	Dünnschichtchromatografie
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tri(hydroxymethyl)aminomethan
UTP/UDP/UMP	Uracil-(Tri)-(Di)-(Mono)-Phosphat
UV	Ultraviolett

### 3.2 Oligonukleotidprimer

Die in dieser Arbeit für die Erzeugung von Mutanten in *M. tuberculosis* und *M. smegmatis* eingesetzten Oligonukleotidprimer sind in den nachstehenden Tabellen aufgeführt. Tab. 1 umfasst die Primer, die für die Generierung von Gendeletionsmutanten eingesetzt wurden, in Tab. 2 finden sich die Primer, die für die Generierung der *knock-in*-Mutanten als Basis für konditionale Mutanten verwendet wurden, und Tab. 3 gibt die Primer wider, mit denen Komplementationsplasmide kloniert wurden. Alle Primer wurden bei der Firma Metabion International AG bestellt. Primer, die zu Sequenzierungszwecken eingesetzt wurden, finden sich in Tab. 9.

**Tab. 1: Oligonukleotidprimer für die Herstellung von Allelaustauschsubstraten zur Generierung von Gendeletionsmutanten in *M. tuberculosis*.** Die Benennung der Primer erfolgte mit den jeweiligen Gennamen bzw. Rv-Nummern. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, die verwendeten Enzyme sind im Primernamen enthalten. Die Angabe der Basensequenz erfolgt von 5'- in 3'-Richtung.

rfbD-RR( <i>Bst</i> API)	TTTTT <u>G</u> CATCTTTT <u>G</u> CCGTCAAGTCGTTGCCTTCC
rfbD-RL( <i>Bst</i> API)	TTTTT <u>G</u> CATAGATT <u>G</u> CGTGCTGGTGTGACCGTCGT
rfbD-LL( <i>Van91I</i> )	TTTTT <u>C</u> CATAAATT <u>G</u> GGGGTACTGGCAACCCTGCTG
rfbD-LR( <i>Van91I</i> )	TTTTT <u>C</u> CATTTCTT <u>G</u> GTCGCGACTGTGTCTGGAAG
rfbE-RR( <i>Van91I</i> )	TTTTT <u>C</u> CATCTTTT <u>G</u> GAAACAGTGCGCCGTTGAACA
rfbE-RL( <i>Van91I</i> )	TTTTT <u>C</u> CATAGATT <u>G</u> GAGACCCAGGCCGACAGACAG
rfbE-LL( <i>Van91I</i> )	TTTTT <u>C</u> CATAAATT <u>G</u> GACTGCCGAGCAACACACTC
rfbE-LR( <i>Van91I</i> )	TTTTT <u>C</u> CATTCTT <u>G</u> GGCGTCTGGATATGGGGATGG
Rv2038c-RR( <i>Van91I</i> )	TTTTT <u>C</u> CATCTTTT <u>G</u> GACCCGAACAGGCTCGAACAC
Rv2038c-RL( <i>Van91I</i> )	TTTTT <u>C</u> CATAGATT <u>G</u> GACACCGGGACACCTGCACTT
Rv2041c-LL( <i>Van91I</i> )	TTTTT <u>C</u> CATAAATT <u>G</u> GTCGGCTGTGACGGTGTTTCAT
Rv2041c-LR( <i>Van91I</i> )	TTTTT <u>C</u> CATTTCTT <u>G</u> GCCAGCGAGGCCGAGTAAG
ugpC-RR( <i>Van91I</i> )	TTTTT <u>C</u> CATCTTTT <u>G</u> GCCGACTGGACCTCAAGGAG
ugpC-RL( <i>Van91I</i> )	TTTTT <u>C</u> CATAGATT <u>G</u> GAGGTGCGCCTCTTCAACAGC
ugpA-LL( <i>Van91I</i> )	TTTTT <u>C</u> CATAAATT <u>G</u> GTTGCGCTGGTCTTGATTTCG

ugpA-LR( <i>Van91I</i> )	TTTTT <u>CCATTTCTTGGCCGACCAACACGACGAACAG</u>
Rv1457c-RR( <i>BstAPI</i> )	TTTTT <u>GCATCTTTTGCGCGCAAGGTAGGTTACAG</u>
Rv1457c-RL( <i>BstAPI</i> )	TTTTT <u>GCATAGATTGCTGGTTCGGGATCCTCAGC</u>
Rv1457c-LL( <i>Van91I</i> )	TTTTT <u>CCATTTCTTGGGAGGTTGGAAACTGCGAC</u>
Rv1457c-LR( <i>Van91I</i> )	TTTTT <u>CCATAAATTGGGTGATGGTGTGCCGATGG</u>
Rv1458c-RR( <i>BstAPI</i> )	TTTTT <u>GCATCTTTTGCGCGCAAGGTAGGCAACCAACAG</u>
Rv1458c-RL( <i>BstAPI</i> )	TTTTT <u>GCATAGATTGCTGGTTCGGGATCGTCGTCCTAGC</u>
Rv1458c-LL( <i>Van91I</i> )	TTTTT <u>CCATAAATTGGGTGATGGTGTGCTGGCTGTTATTGG</u>
Rv1458c-LR( <i>Van91I</i> )	TTTTT <u>CCATTTCTTGGGAGGTTGGAAACGGCGGTTATTGAC</u>

**Tab. 2: Oligonukleotidprimer für die Herstellung von Allelaustauschsubstraten zur Generierung von *knock-in*-Mutanten in *M. tuberculosis* und *M. smegmatis*.** Die Benennung der Primer erfolgte mit den jeweiligen Gennamen bzw. Rv-Nummern. Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, die verwendeten Enzyme sind im Primernamen enthalten. Die Angabe der Basensequenz erfolgt von 5'- in 3'-Richtung.

c-Rv3781-RR- <i>Van91I</i>	TTTTT <u>CCATCTTTTGGGACGCCATGGTCAATCCATAT</u>
c-Rv3781-RL- <i>Van91I</i>	TTTTT <u>CCATAGATTGGATGTCGGATCCGCACCATCCC</u>
c-Rv3781-LL- <i>Van91I</i>	TTTTT <u>CCATAAATTGGCGGACGGACTAGTGTCTGTTAG</u>
c-Rv3781-LR- <i>Van91I</i>	TTTTT <u>CCATTTCTTGGGGCTTACAGGTATTGTCCGGT</u>
c-glfT1-RR- <i>Van91I</i>	TTTTT <u>CCATCTTTTGGGCCGGGTTGCGACAATACATA</u>
c-glfT1-RL- <i>Van91I</i>	TTTTT <u>CCATAGATTGGATGACTGAATCGGTCTTCGCC</u>
c-glfT1-LL- <i>Van91I</i>	TTTTT <u>CCATAAATTGGCGGCACCGGACAATACCTGTA</u>
c-glfT1-LR- <i>Van91I</i>	TTTTT <u>CCATTTCTTGGTCATCCCTGGACGTTCTGTCT</u>
c-Rv3783-RR- <i>Van91I</i>	TTTTT <u>CCATCTTTTGGGTGACACCCAAACGCAATTGA</u>
c-Rv3783-RL- <i>Van91I</i>	TTTTT <u>CCATAGATTGGATGACATTCATGGATGCTCAA</u>
c-Rv3783-LL- <i>Van91I</i>	TTTTT <u>CCATAAATTGGCACCGATGGTGTGCAACATAG</u>
c-Rv3783-LR- <i>Van91I</i>	TTTTT <u>CCATTTCTTGGTCATGCAGATCCTCCAGGCTT</u>

c-Rv1456c-RR- <i>Bst</i> API	TTTTTGCATCTTTTGCCTTCGCGCTATGCGTCCAGTC
c-Rv1456c-RL- <i>Bst</i> API	TTTTTGCATAGATTGCATGCCTTACGATCGGGCGGTG
c-Rv1456c-LL- <i>Van91I</i>	TTTTTCATAAATTGGGCACAGTTCAGCCTGGAATTG
c-Rv1456c-LR- <i>Van91I</i>	TTTTTCCATTTCTTGGCAAAAACACTACACGCTGTAGTA
c-Rv1457c-RR- <i>Van91I</i>	TTTTTCCATCTTTTGGTAACCCGAGCCACCCATTTGA
c-Rv1457c-RL- <i>Van91I</i>	TTTTTCCATAGATTGGATGACCCAAACCAATCGCCCC
c-Rv1457c-LL- <i>Van91I</i>	TTTTTCCATAAATTGGCGCACTGGCTACTGGACACCT
c-Rv1457c-LR- <i>Van91I</i>	TTTTTCCATTCTTGGTCACTGCCGCAACTTCTGCC
c-Rv1458c-RR- <i>Van91I</i>	TTTTTCCATCTTTTGGGTTCTCGGCCTCCTTGAGAT
c-Rv1458c-RL- <i>Van91I</i>	TTTTTCCATAGATTGGATGAACCGCGCCCCAGACAC
c-Rv1458c-LL- <i>Van91I</i>	TTTTTCCATAAATTGGGGCCGCTGTGATGGCGAGTCT
c-Rv1458c-LR- <i>Van91I</i>	TTTTTCCATTTCTTGGGACCCGTATCGTTACATACC
c-Rv1459c-RR- <i>Bst</i> API	TTTTTGCATCTTTTGGCGGACCAAATGCATGATCAG
c-Rv1459c-RL- <i>Bst</i> API	TTTTTGCATAGATTGCATGGCAGCCCGCCATACG
c-Rv1459c-LL- <i>Van91I</i>	TTTTTCCATAAATTGGTGCTGCTCGGTTTCGCACAAT
c-Rv1459c-LR- <i>Van91I</i>	TTTTTCCATTTCTTGGTGGTGCAGCCTAACGGCATGC
c-Rv3277-RR- <i>Van91I</i>	TTTTTCCATCTTTTGGGGTGCATGCGTTGCCATC
c-Rv3277-RL- <i>Van91I</i>	TTTTTCCATAGATTGGATGAACGAGGTGTCAGTG
c-Rv3277-LR- <i>Van91I</i>	TTTTTCCATTTCTTGGGGCTGGACCACCAGAGG
c-Rv3277-LL- <i>Van91I</i>	TTTTTCCATAAATTGGGAATTATGTGGCCGGAG
c-Rv3277-ASS-RR- <i>Van91I</i>	TTTTTCCATAGATTGGATGTCCTTTGCCGATGCCACCATC
c-Rv3277-ASS-RL- <i>Van91I</i>	TTTTTCCATCTTTTGGCCGCTCGAGTTCTACAACATTCC
c-Msmeg_6372-RR- <i>Van91I</i>	TTTTTCCATCTTTTGGGAAGAACACCTTCGCGGACATG
c-Msmeg_6372-RL- <i>Van91I</i>	TTTTTCCATAGATTGGTCTTCCGTTTGCCTAGAACC
c-Msmeg_6372-LR- <i>DraIII</i>	TTTTTCACTTCGTGACAGCCACCAGTCCACGATGAAC

c-Msmeg_6372-LL- <i>Drall</i> III	TTTTT <u>CACAAGTGC</u> GGGCTCTTCATCTTTTCGCGATG
c-Msmeg_1817-RR- <i>Van91</i> I	TTTTT <u>CCATCTTTT</u> GGGGCCAGGATCAACAGTGTGGA
c-Msmeg_1817-RL- <i>Van91</i> I	TTTTT <u>CCATAGATTGG</u> ATGTCCTTCGCTGATGCAACG
c-Msmeg_1817-LR- <i>Van91</i> I	TTTTT <u>CCATTTCTT</u> GGAGCTCATGGTGCCGTTTCGGCG
c-Msmeg_1817-LL- <i>Van91</i> I	TTTTT <u>CCATAAATTGG</u> TCAGATACTTCGCGGCCACCT
c-Msmeg_6366-RR- <i>Van91</i> I	TTTTT <u>CCATCTTTGGG</u> TCGATCCACATCGCGGTCTT
c-Msmeg_6366-RL- <i>Van91</i> I	TTTTT <u>CCATAGATTGG</u> ATGACATCCTCTTCTGCACCG
c-Msmeg_6366-LL- <i>Van91</i> I	TTTTT <u>CCATAAATTGG</u> ACGGCGTTTGCTGATCTTGCT
c-Msmeg_6366-LR- <i>Van91</i> I	TTTTT <u>CCATTTCTTGG</u> GCGCGTCTACAGGTAAGTCC

**Tab. 3: Oligonukleotidprimer für die Herstellung von Komplementationsplasmiden zur Generierung von komplementierten Mutanten in *M. tuberculosis* und *M. smegmatis*.** Für die Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, die verwendeten Enzyme sind im Primernamen enthalten. Die Angabe der Basensequenz erfolgt von 5'- in 3'-Richtung.

Msmeg_6367-3- <i>Hind</i> III	TTTTT <u>AAGCTT</u> TCATCGCTGGAACCTTTTCGCGT
Msmeg_6367-5- <i>Pac</i> I	TTTTTT <u>AATTAAT</u> GACGCACACTGAGGTCGTC
Msmeg_1817-3- <i>Hind</i> III	TTTTT <u>AAGCTT</u> CACGAAGTCTTCGACACCCTGG
Msmeg_1817-5- <i>Pac</i> I	TTTTT <u>AATTAAT</u> GTCTTCGCTGATGCAACGATC
c-Rv3277-3- <i>Hind</i> III	TTTTT <u>AAGCTT</u> CACGAGCTTTTCGACACCCTGG
c-Rv3277-5- <i>Pac</i> I	TTTTT <u>AATTAAT</u> GAACGAGGTGACCGCCGGGGTG
c-Rv3277-ASS- <i>Pac</i> I	TTTTT <u>AATTAAT</u> GTCTTTGCCGATGCCACCATC
Rv3781-5- <i>Pac</i> I	TTTTT <u>AATTAAG</u> TGTCGGATCCGCACCATCC
Rv3783-3- <i>Hind</i> III	TTTTT <u>AAGCTT</u> CTACACCCAGTAGGCACCCGC
Rv3782-3- <i>Hind</i> III	TTTTT <u>AAGCTT</u> CATGCAGATCCTCCAGGCTTGC
Rv3782-5- <i>Pac</i> I	TTTTTTT <u>AATTAAT</u> GACTGAATCGGTCTTCGCCGTTG
Rv3783-3- <i>Hind</i> III	TTTTTT <u>AAGCTT</u> CTACACCCAGTAGGCACCCGC

Rv3783-5- <i>PacI</i>	TTTTTT <u>TAATTAAT</u> GACATTCATGGATGCTCAAGC
Rv3859-3- <i>Clal</i>	TTTTT <u>ATGCATTCAG</u> CGGACCACGCCCCTGGCC
Rv3859-5- <i>HindIII</i>	TTTTT <u>AAGCTTA</u> AAGGAGCCACATGACGTCAGTG
Msmeg_6366-ext-5	ATCGGCACCATGATCAAGCAG
Msmeg_6369-ext-3	TCACGTTGATCAGACCCAGTAG
Msmeg_6366-5- <i>PacI</i>	TTTTTT <u>TAATTAAT</u> GACATCCTCTTCTGCACCG
Msmeg_6369-3- <i>HindIII</i>	TTTTT <u>AAGCTTC</u> AGACCCAGTAGGGCACGCGGC
Rv2038c-3- <i>HindIII</i>	TTTTT <u>AAGCTT</u> ACCGCTCCAACCAACCCTATCCC
Rv2041c-5- <i>PacI</i>	TTTTTTTAATTAATGGTCAATAAGCCGTTGAGCG
Rv1457c-3- <i>HindIII</i>	TTTTT <u>AAGCTTC</u> AGGTGAACCGGAACCAGCGC
Rv1458c-5- <i>PacI</i>	TTTTTT <u>TAATTAAT</u> GAACCGCGCCCCAGACACC

### 3.3 Geräte, Kits und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Kits und Verbrauchsmaterialien sind nachstehend mit dem jeweiligen Hersteller aufgelistet.

#### 3.3.1 Geräte

Elektroporator Gene Pulser Microbial System™ - BIO-RAD, München

Elisareader Infinite® 200 PRO, Sunrise - Tecan, Männedorf (CH)

Eismaschine SVN 225 - Nordcap, Ingelheim

Elektrophoresekammer - Hoefer, Amsterdam (NL)

Entwicklermaschine Cawomat 2000 IR - Cawo Photochemische Fabrik, Schrobenhausen

Feinwaage Cubis - Sartorius, Göttingen

Gel Doc™ XR + Imaging System - BIO-RAD, München

Heizblock - VWR International GmbH, Darmstadt

Heizrührer MR3001 - Heidolph, Schwabach

HYBAID Hybridisierungsöfen - Biometra, Göttingen

Inkubator (BBD 6220) - Thermo Fisher Scientific, Bonn

Mikrowelle - Bosch, Stuttgart  
Milliporeanlage Milli-Q® - Millipore, Schwabach  
Mini PROTEAN® Tetra Cell, Mini Trans-Blot® Cell, PowerPac™ HC - Bio-Rad, Göttingen  
NanoDrop 1000 - Thermo Fisher Scientific, Bonn  
Neubauer Zählkammer - LO-Laboroptik, Friedrichsdorf  
Orbitalschüttler, Kreisschüttler 3005 - GFL, Burgwedel  
Spectrophotometer Genesys 10 UV - Thermo Fisher Scientific, Bonn  
PCR-Cycler Mastercycler personal - Eppendorf, Hamburg  
pH-Meter - Hanna Instruments, Vöhringen  
Photometer - Thermo Fisher Scientific, Bonn  
TissueLyser LT - Qiagen, Hilden  
Ultraschallsonde Labsonic U und TG 1503 - Bandelin  
UV-Crosslinker CL1000 - Biometra, Göttingen  
Vortexer - VWR International, Darmstadt  
Waage - Sartorius, Göttingen  
Wasserbad - Kottermann, Uetze/Hensingen  
Zeiss Mikroskop - Carl Zeiss, Jena  
Zentrifugen - kühlbare Tischzentrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg; Biofuge fresco, Heraeus, Hanau

### 3.3.2 Kits

AlkPhos Direct Labelling Reagents – Amersham, Buckinghamshire (GB)  
BCA Assay kit – Pierce, Thermo Fisher Scientific, Bonn  
CDP- Star™ Detection Reagent – GE Healthcare, Dornstadt  
Human Cytokine Array Kit - R&D Systems, Tocris Bioscience, Chicago  
MaxPlax™ Lambda Packaging Extracts – Epicentre, Biozym, Hessisch Oldendorf  
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I – Peqlab, Biotechnologies GmbH, Erlangen  
QIAquick® Gel Extraction Kit – Qiagen, Hilden  
Turboblotter Rapid Downward Transfer System – Whatman  
ZeroBlunt® TOPO® PCR Cloning Kits – Invitrogen, Karlsruhe

### 3.3.3 Verbrauchsmaterialien

**AppliChem:** Formaldehyd, D(+)-Glucose, EDTA

**Becton Dickinson:** Middlebrook 7H9, Middlebrook 7H10, Agar Noble, OADC, Plastikpipetten, Zellkulturflaschen

**Biochrom:** RPMI 1640

**BIO-RAD:** SDS Lösung 20% (w/v), Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel, TGX-Laufpuffer

**Biozym Scientific:** Biozym LE Agarose, MaxPlax Packaging Extracts

**Carl Roth:** TRIS, Proteinase K, Aluminiumfolie

**Epicentre:** FailSafe™ PCR 2x Premix

**Eppendorf:** Safe-Lock Tubes (2.0 ml, 1.5 ml)

**GE Healthcare Lifescience:** Amersham Hybond-Nylonmembran

**Gibco:** FCS (hitzeinaktiviert)

**life technologies:** PBS, BenchMark™ Pre-Stained Protein Standard, PVDF-Membran

**Merck KG:** 3 mm Glaskugeln, Isoamylalkohol

**New England Biolabs:** NEB-5-alpha

**Roche:** Rinderserum Albumin Fraction V

**Sarstedt:** Küvetten, PP-Zentrifugationsröhrchen (15, 50 ml), Petrischalen

**Sigma Aldrich:** Ethidiumbromid, Resazurin (Natriumsalz), Tyloxapol, Lysozym, Calciumchlorid, Glaskugeln 106 µm, Anhydrotetracyclin, Cetrimid, Isopropanol, Kanamycinsulfat, Trypanblau, Elektroporationsküvetten, Apramycin, Hygromycin, Ethambutol, Gentamycin

**Thermo Scientific:** 6x DNA Ladepuffer, GeneRuler 1kb DNA Ladder

**VWR International:** Chloroform, Methanol, Ethanol, Glycerin, Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Impfösen, Spatel, Mikrotiterplatten, Viereckfläschchen, Reagenzreservoir, Sterilfilter, PCR-Reaktionsgefäße, Schraubdeckelröhrchen, Rollerflaschen

### 3.4 Kultivierung der Bakterien: Mycobakterien und *Escherichia coli*

Die Anzucht von Bakterien auf Festagarplatten und in Submerskulturen wurde wie untenstehend durchgeführt. Im Wesentlichen wurde dabei analog zu den von (Larsen, Biermann et al. 2007) gemachten Angaben vorgegangen.

#### 3.4.1 Kultivierung von Mycobakterien

Derivate von *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv oder *Mycobacterium bovis* BCG wurden in Fest- und Flüssigkultur angezogen. Als Selektionsmarker wurden Antibiotika gemäß der in unter 3.4.5 aufgeführten Konzentrationen hinzugegeben. Flüssigkulturen wurden 1%ig (v/v) aus Glycerin-Stocks inokuliert und in 30ml Viereckfläschchen (VWR) befüllt mit 10 ml Medium bei 80 rpm geschüttelt. Als Festmedium diente Middlebrook 7H10-Agar, angereichert mit 10% (v/v) OADC (Becton Dickinson Microbiology Systems) oder ADS (untenstehend) sowie 0,5% (v/v) Glycerin. Als Flüssigmedium diente Middlebrook-7H9-Flüssigmedium, angereichert mit 10% (v/v) OADC (Becton Dickinson Microbiology Systems) oder ADS (untenstehend) sowie 0,5% (v/v) Glycerin und 0,05% (v/v) Tyloxapol (Sigma Aldrich). Ausstriche auf Festmedien erfolgten mit Impfösen. Mycobakterien wurden aerob bei 37°C angezogen. *M. smegmatis* wurde für 3-5 Tage auf Festmedium und 24-48 h in Flüssigmedium, *M. tuberculosis* und *M. bovis* BCG für 21-28 Tage auf Festmedium und 6-14 Tage in Flüssigkultur kultiviert.

##### ADS (Albumin Dextrose Salz)

8,1 g NaCl

50 g Rinderserumalbumin (Fraktion V)

20 g Dextrose

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

Die Zutaten werden nacheinander gelöst und die fertige Lösung anschließend sterilfiltriert.

##### 3.4.1.1 7H9-Flüssigmedium

4,7 g Middlebrook 7H9 Fertigmedium (Becton Dickinson Microbiology Systems) wurden in 900ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst und sterilfiltriert und mit 100 ml sterilfiltriertem ADS (siehe 1.), 10 ml 50% (v/v) sterilfiltriertem Glycerin (VWR) und 2,5 ml 20% (v/v) sterilfiltriertem Tyloxapol (Sigma Aldrich) versetzt.

### 3.4.1.2 7H10 Agar

19 g Middlebrook 7H10 Fertigmedium (Becton Dickinson Microbiology Systems) wurden in 900ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert. Nach Zugabe von 100 ml sterilfiltriertem ADS (siehe 1.), sowie 10 ml 50% sterilfiltriertem Glycerin (VWR) wurde der auf 50°C abgekühlte Nährboden in Petrischalen gegossen.

### 3.4.1.3 Minimalmedium

Um das Wachstum auf einzelnen Kohlenstoffquellen zu untersuchen, wurde das folgende flüssige Minimalmedium (Capyk, Kalscheuer et al. 2009) verwendet:

1 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2,5 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,5 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
0,15 g	L-Asparagin
50 mg	Eisenammoniumcitrat (Eisengehalt ~18%)
0,5 g	MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O
0,5 g	CaCl <sub>2</sub>
0,1 mg	ZnSO <sub>4</sub>
0,05%(v/v)	Tyloxapol

mit ddH<sub>2</sub>O ad 1000 ml, mit HCl und NaOH auf pH 7,6 einstellen

Die zu untersuchenden Kohlenstoffquellen wurden als 1 M Stammlösungen hergestellt und in Konzentrationen zwischen 10 und 100 mM für die Tests zur Substratverwertung eingesetzt.

Um Substanzen auf ihre Eignung als Phosphatquelle zu untersuchen, wurde ein Minimalmedium entwickelt, das über TRIS anstelle von Phosphat gepuffert wurde.

4,6 g	TRIS
0,5 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
0,15 g	L-Asparagin
50 mg	Eisenammoniumcitrat (Eisengehalt ~18%)
0,5 g	MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O

0,5 g	CaCl <sub>2</sub>
0,1 mg	ZnSO <sub>4</sub>
0,05%(v/v)	Tyloxapol

mit ddH<sub>2</sub>O ad 1000 ml, mit HCl und NaOH auf pH 7,6 einstellen

### 3.4.2 Kultivierung von *E.coli*

Zellen von *E. coli* wurden auf LB-Festmedium oder in LB-Flüssigmedium (untenstehend) kultiviert. Als Selektionsmarker wurden Antibiotika gemäß der in in 3.4.5 aufgeführten Konzentrationen hinzugegeben. Flüssigkulturen wurden 1%ig (v/v) aus Glycerin-Stocks inokuliert und in Erlenmeyerkolben bei 225 rpm geschüttelt. Die Inokulation auf LB-Platten erfolgte mit Impfösen. Die Inkubation von *E. coli* erfolgte bei 37°C über Nacht. *E. coli* HB101 Zellen für die Phagentransduktion wurden nach den Anweisungen aus (Larsen, Biermann et al. 2007) angezogen (3.14.2.2).

#### LB-Medium (Luria Bertani)

10 g LB-Caseinhydrolysat
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
1000 ml dest H <sub>2</sub> O

Die Zutaten werden nacheinander gelöst und die fertige Lösung anschließend durch Autoklavieren (121°C/2 bar/20 min) sterilisiert. Das Festmedium entsteht durch Zugabe von 12 g Agar pro Liter vor dem Autoklavieren.

### 3.4.3 Ernte und Waschen von Bakterien

Bakterien wurden nach der Anzucht (in der Regel bis zur OD<sub>600</sub> von 0,8-1,0 für kompetente Zellen, zur Gewinnung von Biomasse auch darüber) durch Zentrifugation geerntet. Für Volumen ab 5-10 ml geschah das durch Zentrifugation für 10 Min bei 4000 rpm/Min, bei kleineren Volumina in der Tischzentrifuge für 5 Min bei 13000 rpm/Min. Zwei Waschschrte dienten dazu, das Pellet von Medienbestandteilen befreien. Das Waschen erfolgte mit PBS-T (für Verwendung in Western Blot Analysen) oder MP-Puffer (für Phagentransduktion) im gleichen Volumen wie dem geernteten Volumen. Das Pellet wurde anschließend im gleichen Volumen wie das Ausgangsvolumen aufgenommen. Wo Aufkonzentrierungen notwendig waren, wurde das Volumen zur

Resuspendierung auf 1/10 (Transformation kompetenter Zellen, 3.19) oder 1/25 (Zelllysate, 3.23) reduziert.

#### 3.4.4 Herstellen von Glycerinstocks von Mycobakterien und *E. coli*

Stocks von Mycobakterien wurden unter Zugabe von Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 16,6% (v/v) zu dicht gewachsenen Kulturen hergestellt. Stocks von *E. coli* wurden unter Zugabe von Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 25% (v/v) zu dicht gewachsenen Kulturen hergestellt. In Cryovials wurden diese Stocks dann bei -80°C gelagert. Das Auftauen der Stocks erfolgte auf Eis.

#### 3.4.5 Antibiotikazusätze

Antibiotika wurden als Selektionsmarker in den folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Antibiotikum	Mycobakterien	<i>E. coli</i>
Hygromycin/Hyg	50 µg/ml	150 µg/ml
Kanamycin/Km	20 µg/ml	40 µg/ml
Apramycin/Apra	5-10 µg/ml	40 µg/ml

### 3.5 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die folgende Zelllinie wurde in dieser Arbeit verwendet:

Bezeichnung	Zelltyp	Bezugsquelle
THP-1	monocytäre Zelllinie	ACC-Nr. 16 DSMZ

Die Zelllinie THP-1 (ACC-Nr. 16, DSMZ) wurde aus dem Blut eines an akuter monozytärer Leukämie erkrankten einjährigen Jungen isoliert. Sie weist Merkmale von Monozyten auf, wie zum Beispiel die Fähigkeit zur Phagozytose und die Produktion von Lysozymen. Die Zellen wachsen als Suspensionskultur und bilden zum Teil lockere, traubenförmige Anhäufungen. Durch Behandlung mit Phorbolestern (50 nM PMA) differenzieren sie zu Makrophagen und werden adhärent (Tsuchiya, Yamabe et al. 1980). THP-1 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (Biorad) supplementiert mit 10% hitzeinaktiviertem FCS angezogen. Die Zellen wurden zwischen  $1 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  Zellen/ml subkultiviert. Für Infektionsassays (3.22) wurden  $1 \times 10^7$  Zellen eingesetzt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde Trypanblau (Sigma Aldrich) im Verhältnis 1:1 zugesetzt. Nekrotische

Zellen werden dadurch angefärbt und werden so nicht irrtümlich in die Berechnung der Lebendzellzahl einbezogen. Das Auszählen erfolgte unter Verwendung einer Neubauer Zählkammer. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in behandelten Zellkulturflaschen oder 6, 12 oder 24-well-Platten unter sterilen Bedingungen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden regelmäßig passagiert, indem sie geerntet (1000 rpm, 5 Min) wurden, die Lebendzellzahl wie oben beschrieben bestimmt wurde und dann die passende Zellzahl mit frischem RPMI-1640 (Biorad) für die weitere Anzucht versetzt wurden.

### 3.6 Verwendete und erzeugte prokaryotische Organismen

Die folgenden Prokaryoten wurden in dieser Arbeit genutzt bzw. durch die Transformation von Plasmiden oder Phasmiden oder spezialisierte Phagentransduktion erzeugt und genutzt. Tab. 4 listet die verwendeten mycobakteriellen Wildtypen auf, Tab. 5 die zur Transformation und Transduktion verwendeten Stämme von *E. coli*. In Tab. 6 sind die verwendeten bzw. im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Plasmide aufgeführt, Tab. 7 zeigt die erzeugten Mutanten von Mycobakterien.

**Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Wildtypen von Mycobakterien.**

Organismus	Bezeichnung	Herkunft
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	Wildtyp	AG Kalscheuer
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG Pasteur	Wildtyp	AG Kalscheuer
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG Danish	Wildtyp	AG Kalscheuer
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	Wildtyp	AG Kalscheuer

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Stämme von *E. coli*.

Organismus	Relevante Charakteristika	Herkunft
<i>E. coli</i> NEB 5- $\alpha$ F' lq	F' proA+B+ lacIq $\Delta$ (lacZ)M15 zzf::Tn10 (TetR) / fhuA2 $\Delta$ (argF- lacZ)U169 phoA glnV44 $\Phi$ 80 $\Delta$ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 endA1 thi-1 hsdR17	AG Kalscheuer
<i>E. coli</i> HB101	F <sup>-</sup> , thi-1, hsdS20 (rB <sup>-</sup> , mB <sup>-</sup> ), supE44, recA13, ara-14, leuB6, proA2, lacY1, galk2, rpsL20 (strr), xyl-5, mtl-1	AG Kalscheuer

Tab. 6: Übersicht über die genutzten und erzeugten Plasmide und Phasmide. Plasmide wurden in *E. coli* NEB5 $\alpha$  transformiert, Phasmide in *E. coli* HB101.

Bezeichnung	Eigenschaften/Verwendung	Herkunft	Stammsammlungsnummer
phAE159	Temperatursensitives Shuttleplasmid; Derivat des Mycobacteriophagen TM4  Ap <sup>R</sup>	AG Kalscheuer	RKSC 8
p0004S	Hyg <sup>R</sup>	AG Kalscheuer	RKSC 9
pMV361	Apra <sup>R</sup>	AG Kalscheuer	RKSC 19
pMV261::tetR_RBS-Mut. D pMV261::tetR_RBS-Mut. E pMV261::tetR_RBS-Mut. F pMV261::tetR_RBS-Mut. G	Shuttle-Plasmide zur Generierung von konditionalen tetON-Mutanten  Abgestufte Translationsrate von <i>tetR</i> durch modifizierte Ribosomenbindestellen	AG Kalscheuer	RKSC 201 RKSC 202 RKSC 203 RKSC 204
pMV261::revtetR_RBS-Mut. D	Shuttle-Plasmide zur Generierung von	AG	RKSC 414

pMV261::revtetR_RBS-Mut. E	konditionalen tetOFF-Mutanten  Abgestufte Translationsrate von <i>revtetR</i> durch modifizierte Ribosomenbindestellen	Kalscheuer	RKSC 415
pMV261::revtetR_RBS-Mut. F			RKSC 416
pMV261::revtetR_RBS-Mut. G			RKSC 417
pcMsmeg_1817-4xtetO	Generierung einer <i>knock-in</i> -Mutante von Msmeg_1817	AG Kalscheuer	RKSC 441
phcMsmeg_1817-4xtetO	Generierung einer <i>knock-in</i> -Mutante von Msmeg_1817	AG Kalscheuer	RKSC 442
pcMsmeg_6366-4xtetO	Generierung einer <i>knock-in</i> -Mutante von Msmeg_6366	AG Kalscheuer	RKSC 443
phcMsmeg_6366-4xtetO	Generierung einer <i>knock-in</i> -Mutante von Msmeg_6366	AG Kalscheuer	RKSC 444
pcRv3277-4xtetO	Generierung einer <i>knock-in</i> -Mutante von Rv3277	diese Arbeit	RKSC 450
phcRv3277-4xtetO	Generierung einer <i>knock-in</i> -Mutante von Rv3277	diese Arbeit	RKSC 452
pMV361(Km)::Rv1457c-1458c	Komplementation	diese Arbeit	RKSC 397
pMV361(Apra)::Rv3782	Komplementation	diese Arbeit	RKSC 378
pMV361(Apra)::Rv3783	Komplementation	diese Arbeit	RKSC 379
pMV361(Kan)::Rv2038c-2041c	Komplementation	diese Arbeit	RKSC 375
pMV361(Apra)::Msmeg_1817	Komplementation	diese Arbeit	RKSC 438
pMV361(Apra)::Msmeg_6366-69	Komplementation	diese Arbeit	RKSC 439
pMV361(Apra)::Rv6367	Komplementation	diese Arbeit	RKSC 463
pMV361(Apra)::Rv6366	Komplementation	diese Arbeit	RKSC 464

pΔRv2041c-2038cS	Generierung einer Gendeletionsmutante von Rv2041c-Rv2040c-Rv2039c-Rv2038c	diese Arbeit	RKSC 290
phΔRv2041c-2038cS	Generierung einer Gendeletionsmutante von Rv2041c-Rv2040c-Rv2039c-Rv2038c	diese Arbeit	RKSC 291
pMV361(Apra)::Rv3277	Komplementation	diese Arbeit	RKSC 465
pMV361(Apra)::Rv3277 ASS	Komplementation	diese Arbeit	RKSC 466
pcRv3781-4xtetO	Generierung einer <i>knock-in</i> -Mutante von Rv3781	diese Arbeit	RKSC 297
phcRv3781-4xtetO	Generierung einer <i>knock-in</i> -Mutante von Rv3781	diese Arbeit	RKSC 298
pcRv3782-4xtetO	Generierung einer <i>knock-in</i> -Mutante von Rv3782	diese Arbeit	RKSC 299
phcRv3782-4xtetO	Generierung einer <i>knock-in</i> -Mutante von Rv3782	diese Arbeit	RKSC 300
pcRv3783-4xtetO	Generierung einer <i>knock-in</i> -Mutante von Rv3783	diese Arbeit	RKSC 301
phcRv3783-4xtetO	Generierung einer <i>knock-in</i> -Mutante von Rv3783	diese Arbeit	RKSC 302
pcRv1456c-4xtetO	Generierung einer <i>knock-in</i> -Mutante von Rv1456c	diese Arbeit	RKSC 303
phcRv1456c-4xtetO	Generierung einer <i>knock-in</i> -Mutante von Rv1456c	diese Arbeit	RKSC 304
pcRv1457c-4xtetO	Generierung einer <i>knock-in</i> -Mutante von	diese Arbeit	RKSC 305

	Rv1457c		
phcRv1457c-4xtetO	Generierung einer <i>knock-in</i> -Mutante von Rv1457c	diese Arbeit	RKSC 306
pcRv1458c-4xtetO	Generierung einer <i>knock-in</i> -Mutante von Rv1458c	diese Arbeit	RKSC 307
phcRv1458c-4xtetO	Generierung einer <i>knock-in</i> -Mutante von Rv1458c	diese Arbeit	RKSC 308
pcRv1459c-4xtetO	Generierung einer <i>knock-in</i> -Mutante von Rv1459c	diese Arbeit	RKSC 309
phcRv1459c-4xtetO	Generierung einer <i>knock-in</i> -Mutante von Rv1459c	diese Arbeit	RKSC 310

Tab. 7: Übersicht über die erzeugten Mutanten in *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* und *M. bovis* BCG.

Organismus	Enthaltenes Plasmid	Stammsammlungsnummer
<i>M. smegmatis</i> c-Msmeg_1817	-	RKSC 232
<i>M. smegmatis</i> c-Msmeg_1817-tetON	pMV261::tetON-E	RKSC 197
<i>M. smegmatis</i> c-Msmeg_1817-tetON	pMV261::tetON-E pMV361::Msmeg_1817	RKSC 199
<i>M. smegmatis</i> c-Msmeg_1817-tetON	pMV261::tetON-E pMV361::Rv3277	RKSC 214
<i>M. smegmatis</i> c-Msmeg_1817-tetON	pMV261::tetON-E pMV361	RKSC 200
<i>M. smegmatis</i> c-Msmeg_1817-tetON	pMV261::tetON-D-Msmeg_3859	RKSC 216
<i>M. smegmatis</i> c-Msmeg_6366	-	RKSC 233
<i>M. smegmatis</i> c-Msmeg_6366-tetON	pMV261::tetON-F	RKSC 201
<i>M. smegmatis</i> c-Msmeg_6366-tetON	pMV261::tetON-F pMV361::Msmeg_6366	RKSC 231
<i>M. smegmatis</i> c-Msmeg_6366-tetON	pMV261::tetON-F pMV361::Msmeg_6367	RKSC 211
<i>M. smegmatis</i> c-Msmeg_6366-tetON	pMV261::tetON-F pMV361::Msmeg_6366- Msmeg_6369	RKSC 203
<i>M. smegmatis</i> c-Msmeg_6366-tetON	pMV261::tetON-F pMV361	RKSC 204
<i>M. bovis</i> BCG Pasteur c-Rv3782	-	RKSC 273
<i>M. bovis</i> BCG Pasteur c-Rv3782-tetOFF	pMV261::tetOFF-D	RKSC 284
<i>M. bovis</i> BCG Pasteur c-Rv3782-tetOFF	pMV261::tetOFF-D pMV361::Rv3782	RKSC 285
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv c-Rv3781-tetON	pMV261::tetON-D	RKSC 130, 131
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv c-Rv3781-tetON	pMV261::tetON-D pMV361::Rv3782	RKSC 343

<i>M. tuberculosis</i> H37Rv c-Rv3781-tetON	pMV261::tetON-D pMV361	RKSC 342
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv c-Rv3783	-	RKSC 149
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv c-Rv3783-tetON	pMV261::tetON-D	RKSC 284, 285
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv c-Rv3783-tetON	pMV261::tetON-D pMV361::Rv3783	RKSC 345
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv c-Rv3783-tetON	pMV261::tetON-D pMV361	RKSC 344
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv c-Rv1459c	-	RKSC 144-148
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv c-Rv1459c-tetOFF	pMV261::tetOFF-G	RKSC 298-304
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv c-Rv1459c-tetOFF	pMV261	RKSC 295-297
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv $\Delta$ Rv1457c-Rv1458c	-	RKSC 360
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv $\Delta$ Rv2041c-2038c	-	RKSC 106, 107
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv $\Delta$ Rv2041c-2038c	pMV361:: Rv2041c-2038c	RKSC 346
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv $\Delta$ ugpAEBc	-	RKSC 108-111
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv c-Rv3277-tetOff	pMV261::tetOFF-E	RKSC 366
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv c-Rv3277-tetOff	pMV261	RKSC 367
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv c-Rv3277-tetOff	pMV361::Rv3277	RKSC 372
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv c-Rv3277-tetOff	pMV361	RKSC 373

### 3.7 Plasmid isolation

Für die Plasmidpräparation wurde *E. coli* über Nacht in 5 ml LB-Medium bei 37 °C angezogen. Im Anschluss erfolgte die Präparation nach Anweisung des Herstellers (Pqlab) mit dem Miniprep Kit. Mithilfe des Kits werden zunächst die Bakterien unter heftigem Vortexen alkalisch lysiert. In diesem Schritt lösen sich die Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den komplementären DNA-Strängen der chromosomalen DNA und der Plasmid-DNA. Nur die Plasmid-DNA ist aufgrund ihrer Konformation dazu in der Lage, vollständig zu renaturieren, wenn der pH-Wert durch Acetat wieder erhöht wird. Die chromosomale DNA, die auch durch die Scherkräfte während der Lyse bereits

teilweise zerstört wurde, kann nicht renaturieren und bildet stattdessen nur kurze komplementäre Bereiche in einem ansonsten ungeordneten einzelsträngigen DNA-Knäuel. Dieses Knäuel kann leicht zusammen mit dem durch die Neutralisation ausgefallenem NaOH, Proteinen und weiteren Zellwandbestandteilen abzentrifugiert werden und bildet ein weißes Pellet. Die Plasmid-DNA befindet sich nach der Zentrifugation im Überstand. Dieser Überstand wird über Säulchen aufgereinigt. Die Plasmid-DNA der Bakterien bindet selektiv an die Silikamatrix der Säulchen, wird gewaschen und danach im Elutionspuffer des Herstellers oder Wasser eluiert. Die Konzentration der gereinigten Plasmid-DNA wurde am NanoDrop (Thermo Fischer Scientific) photometrisch bestimmt.

### 3.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

DNA-Polymerasen können einzelsträngige DNA als Matrize für die Synthese eines komplementären DNA-Stranges verwenden. Diese Eigenschaft wird in der Polymerasekettenreaktion (PCR) dazu verwendet, Kopien einer spezifischen DNA-Sequenz herzustellen. Die doppelsträngige DNA wird zunächst durch Erhitzen denaturiert. Während die Probe wieder herunterkühlt wird, können spezifische Primer (vgl. Tab. 1, 2 und 3) an die 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen des zu amplifizierenden Fragments hybridisieren. Die thermostabile DNA-Polymerase *Phusion High Fidelity* (Fermentas) verfügt über eine DNA-Bindedomäne, die an eine *proofreading* Polymerase gekoppelt ist und synthetisiert bei 72°C den Komplementärstrang. Eine zyklische Wiederholung der Temperaturänderungen führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung des gewünschten Fragments. Die Amplifikation von DNA erfolgte im Eppendorf PCR Cycler mithilfe der Failsafe Premix (Epicenter), je 20 pmol spezifischen Primerpaaren (vgl. Tab. 1,2 und 3) und 20 U/ml der oben beschriebenen Phusion DNA-Polymerase. Nach einer initialen Denaturierungsphase finden mehrere Annealing und Elongationszyklen statt. Für die Amplifikation der variablen Fragmente, der Flanken der *knock-outs* und *knock-ins* wurde in der Regel eine *Touchdown-PCR* angewendet, in der die Annealingtemperatur schrittweise herabgesetzt wird.

**Tab. 8: Überblick über das verwendete PCR-Protokoll zur Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten.**

Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	98°C	5 Minuten
Annealing	65°C	30 Sekunden
	60°C	30 Sekunden
	55°C	30 Sekunden

	50°C	30 Sekunden	
	45°C	30 Sekunden	
Elongationsphase	72°C	~ 1min/kbp	
Denaturierung	98°C	30 Sekunden	5 Zyklen
Annealing	50°C	30 Sekunden	
Elongationsphase	72°C	~ 1min/kbp	
Denaturierung	98°C	30 Sekunden	5 Zyklen
Annealing	55°C	30 Sekunden	
Elongationsphase	72°C	~ 1min/kbp	
Denaturierung	98°C	30 Sekunden	25 Zyklen
Annealing	60°C	30 Sekunden	
Elongationsphase	72°C	~ 1min/kbp	

### 3.9 Agarose-Gelelektrophorese

In der Agarose-Gelelektrophorese wird DNA (DNA-Fragmente, wie verdaute genomische DNA, PCR-Produkte, Plasmide und Phasmide) nach ihrer Größe aufgetrennt, um ihre Größe durch Vergleich mit DNA-Leitern oder anderen Fragmenten bekannter Größe zu bestimmen. Die Agarose bildet eine Art Gel, in dem die langen Agarosepolymere vernetzt sind. Je höher die Agarose konzentriert ist, desto kleiner sind die Poren des Gels. Mithilfe einer konstanten elektrischen Spannung (100 V) wandern die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle durch die Gelmatrix zur positiv geladenen Kathode, wobei die kleineren Moleküle sich schneller durch das Gel bewegen können und somit eine Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe ermöglicht wird. In dieser Arbeit wurde DNA in 1%igen (w/v) Agarosegelen mit TAE-Puffer (untenstehend) aufgetrennt. Dazu wurde die Agaroselösung im Mikrowellenherd aufgeköcht, kurz abkühlen gelassen und Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml (w/v) zugegeben, gemischt und in die Gelkammer gegossen. Mithilfe eines Kamms auf einer Seite des Gels wurden Taschen gebildet, die vor dem Auftragen mit Puffer gespült werden, bevor die mit 6x Probenpuffer (Fermentas) versetzte DNA aufgetragen wurde. Der Probenpuffer enthält neben Glycerin zur Beschwerung der Probe, das ein Absinken in die Taschen erleichtert auch niedermolekulare Farbstoffe, die sich während der Elektrophorese auftrennen, und damit die Abschätzung der Laufweite ermöglichen.

**Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)**

242 g TRIS

100 ml 0,5M EDTA

57,1 ml 100%ige Essigsäure

ad 1000 ml mit dest H<sub>2</sub>O**3.10 Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

Nachdem die PCR-Produkte oder Restriktionen im Agarosegel (3.9) aufgetrennt wurden und ihre Größen kontrolliert wurden, wurden diese soweit erforderlich mit dem QIAquick® Gel Extraktion Kit nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel extrahiert. Die DNA-Banden werden zunächst unter UV-Licht mit einem Skalpell herausgeschnitten, das Gelstück gewogen und die Puffermenge des Kits entsprechend angepasst und bei 60°C die Agarose geschmolzen. Die noch heiße Lösung wird auf ein Säulchen gegeben, in dem die DNA reversibel abhängig von der Salzkonzentration an eine Silikamembran bindet und mit einem geeigneten Elutionspuffer in kleinen Volumen aufgenommen werden kann. In dieser Aufreinigung wurden Primer, Nukleotide, Enzyme, Agarose, Ethidiumbromid und andere störende Substanzen und Moleküle entfernt, sodass die DNA nach der Aufreinigung für alle weiteren Schritte wie Ligationen sauber und aufkonzentriert vorliegt.

**3.11 Sequenzierung**

Zur Sequenzierung wurde Plasmid-DNA (~1000ng) mit einem geeigneten Sequenzierprimer (5 pmol) eingesetzt. Es wurde jeweils ein Ansatz mit einem *Forward Primer* und ein Ansatz mit einem *Reverse Primer* hergestellt werden. Die Primer und die sequenzierten Plasmide sind untenstehend aufgeführt (Tab. 9). Die Sequenzierungen erfolgten mittels der Extended-Hotshot Methode (Seqlab, Göttingen), ggf. mit spezieller Behandlung für GC-reiche DNA. Nach Datenübermittlung wurden die Sequenzen mit der Clone Manager 9 Software überprüft.

**Tab. 9: Oligonukleotidprimer die für die Sequenzierungsreaktionen zur Überprüfung von Plasmiden eingesetzt wurden.** Die Angabe der Basensequenz erfolgt von 5'- in 3'-Richtung.

Primername	Basensequenz	Verwendung
LL	5'-GGCCCGATAATACGACTCAC-3'	<i>knock-in</i> und <i>knock-out</i> -Plasmide
RR	5'-AAACAAACCACCGCTGGTAG-3'	<i>knock-in</i> und <i>knock-out</i> -Plasmide
LR	5'-TCGACGACCCTAGAGTCCTG-3'	<i>knock-out</i> -Plasmide
RL	5'-AACTGGCGCAGTTCCTCTGG-3'	<i>knock-out</i> -Plasmide
LR cohyg	5'-AGGTGCCTCACTGATTAAGC-3'	<i>knock-in</i> -Plasmide
RL tet-seq	5'-AGGTGCCTCACTGATTAAGC-3'	<i>knock-in</i> -Plasmide
pMV261/361 Kan Fw	5'-CAGCGTAAGTAGCGGGGTTG-3'	Komplementationsplasmide mit Kan/Apra-Resistenz
pMV261/361 Kan Rev	5'-GCCTCGAGCAAGACGTTTCC-3'	Komplementationsplasmide mit Kan-Resistenz
pMV261/361 Apra Rev	5'-CTGATGGAGCTGCACATGAAC-3'	Komplementationsplasmide mit Apra-Resistenz

### 3.12 Restriktion von DNA

In dieser Arbeit wurde DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen des Typs II an spezifischen Erkennungsstellen geschnitten. Bei diesen Enzymen sind Erkennungs- und Schnittstelle identisch. Die DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen behandelt, die in Tab. 10 aufgeführt sind. Genomische DNA wurde über Nacht verdaut, Plasmide für Routinekontrollen für 4-6 Stunden. PCR-Produkte, Plasmide für Ligationen und Doppelverdaue wurden ebenfalls über Nacht inkubiert, um eine möglichst vollständige Restriktion zu erlauben. Als Ansatzgrößen wurden in der Regel 10 µl für Testverdaue und 50 µl für Restriktionen gewählt, die für weitere Klonierungsschritte eingesetzt werden sollten. Pro µg DNA wurden jeweils 10 U des jeweiligen Restriktionsenzym eingesetzt. Die Wahl des Restriktionspuffers für Einzel- und Doppelverdaus erfolgte nach Angaben des Herstellers.

**Tab. 10: Verwendete Restriktionsenzyme und ihre Erkennungssequenzen.** Pro  $\mu\text{g}$  DNA wurden jeweils 10 U Enzym verwendet. Die Inkubation erfolgte 4-6 h für einen Testverdau und über Nacht zu Klonierungszwecken.

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz und Schnittstelle
<i>Bam</i> HI	5'-G*GATCC-3'
<i>Bst</i> API (Inkubation bei 60°C)	5'-GCANNNN*NTGC-3'
<i>Dr</i> III	5'-CAC*NNGTG-3'
<i>Eco</i> NI	5'-CCTNNNNNAGG-3'
<i>Eco</i> RI	5'-GAA*TTC-3'
<i>Eco</i> RV	5'-GAT*ATC-3'
<i>Hind</i> III	5'-AAG*CTT-3'
<i>Kpn</i> I	5'-GGT*ACC-3'
<i>Mlu</i> I	5'-ACG*CGT-3'
<i>Pac</i> I	5'-TTAA*TTAA-3'
<i>Psp</i> OMI	5'-GGG*CCC-3'
<i>Pst</i> I	5'-CTG*CAG-3'
<i>Pvu</i> II	5'-CAG*CTG-3'
<i>Sac</i> I	5'-GAG*CTC-3'
<i>Sau</i> 3AI	5'-GA*TC-3'
<i>Sfo</i> I	5'-GGC*GCC-3'
<i>Sma</i> I	5'-CCC*GGG-3'
<i>Van</i> 91I	5'-CCAAN_NNN*NTGG-3'
<i>Xba</i> I	5'-TCT*AGA-3'
<i>Xho</i> I	5'-CTC*GAG-3'

### 3.13 Ligation

Während der Ligation werden die mit Endonuklasen behandelten DNA-Fragmente mit Hilfe der T4-Ligase in die ebenfalls geschnittenen Vektoren inseriert. Die optimale Insertion wurde durch ein Verhältnis Vektor zu Insert von 1:5 bis 1:7 ermöglicht. Der Ligationsansatz wurde nach Angaben des Herstellers (Fermentas) zusammengestellt und für mindestens zwei Stunden (Ligation von zwei Fragmenten) oder über Nacht (Ligation von zwei oder vier Fragmenten) bei RT inkubiert.

### 3.14 Generierung von ortsspezifischen *knock-in*-Mutanten und Gendeletions-Mutanten durch Allelaustauschsubstrate

Im Wesentlichen wurde analog zu den von (Larsen, Biermann et al. 2007) gemachten Angaben vorgegangen.

Um *knock-in*-Mutanten und Gendeletionsmutanten zu erzeugen, müssen Allelaustauschsubstrate kloniert werden, die Flanken besitzen, die homolog zum Genom des Mycobakteriums sind, sodass der Allelaustausch über homologe Rekombination stattfinden kann (vgl. Abb. 6 und Abb. 7). Die dafür notwendigen Primer sind in Tab. 1 und Tab. 2 aufgeführt, die erzeugten Plasmide finden sich in Tab. 6. Als Methode zur Erzeugung von Mutanten wurde in dieser Arbeit die spezialisierte Phagentransduktion gewählt. Dazu wurde zunächst ein Allelaustauschsubstrat (AES) kloniert. Dieses AES enthält einen Resistenzmarker (Hygromycin), einen *oriE* (Replikationsursprung für *E. coli*), eine  $\lambda$ -*cos*-Site zur Verpackung in  $\lambda$ -Phagen sowie eine *PacI*-Schnittstelle, über die es mit dem modifizierten, temperatursensitiven TM4 Mycobakteriophagengenom ligiert werden kann (vgl. Abb. 6 und Abb. 7).

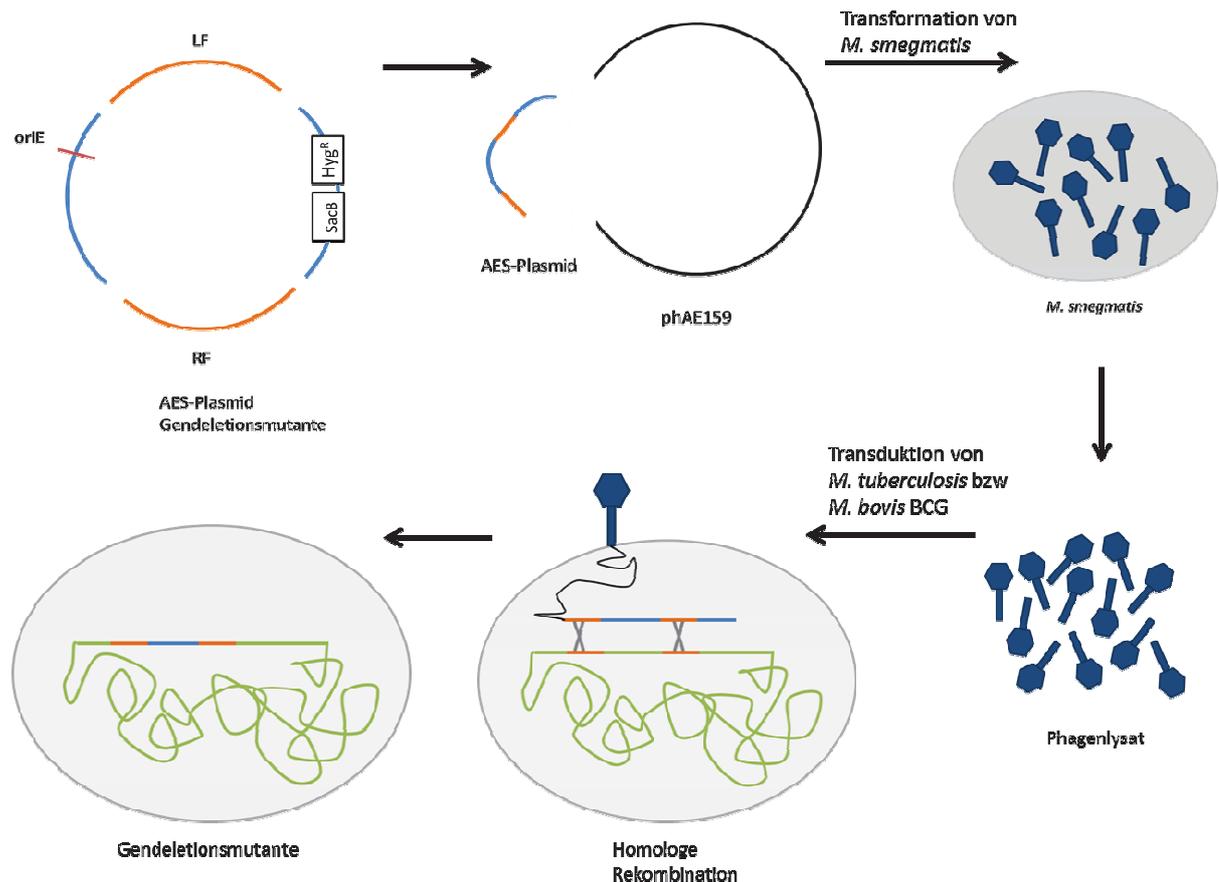
Damit der Austausch über homologe Rekombination erfolgen kann, wurden zunächst mittels PCR die stromaufwärts und stromabwärts gelegenen Regionen mit geeigneten Primern (vgl. Tab. 1) mittels PCR (3.8) amplifiziert. Die so entstandenen PCR-Fragmente konnten dann mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut (3.12) und im Falle von Gendeletionsmutanten mit Vektorfragmenten des *Van91I*-verdauten Vektor p0004S (Hsu und W.R. Jacobs, Jr., unveröffentlichte Ergebnisse) ligiert (3.13) werden. Im Falle von *knock-in*-Mutanten wurden die verdauten PCR-Fragmente mit Vektorfragmenten des *Van91I*-verdauten Plasmids pcRv1327c-4XtetO (Ates, Ummels et al. 2015) ligiert.

Die Plasmide wurden durch Sequenzierung (3.11) überprüft. Die so erhaltenen, verifizierten AES-Plasmide wurden über *PacI* linearisiert und das in den ebenfalls *PacI*-verdauten Phasmid phAE159,

welches ein modifiziertes Genom des temperatursensitiven Phagen TM4 beinhaltet (J. Kriakov und W.R. Jacobs, Jr., unveröffentlichte Ergebnisse), ligiert. Die auf diesem Weg erzeugten Hybridphasמידe wurden dann im *PacI*-Restriktionsverdau (3.12) überprüft und konnten für die Erzeugung von Hochtitersphagenlysaten (3.14.2.4) mit *M. smegmatis* verwendet werden. Das gewonnene Phagenlysate wurde anschließend für die Transduktion von Mycobakterien (3.19) eingesetzt.

#### **3.14.1 Strategie zur Erzeugung von Gendelektionsmutanten (*knock-out*)**

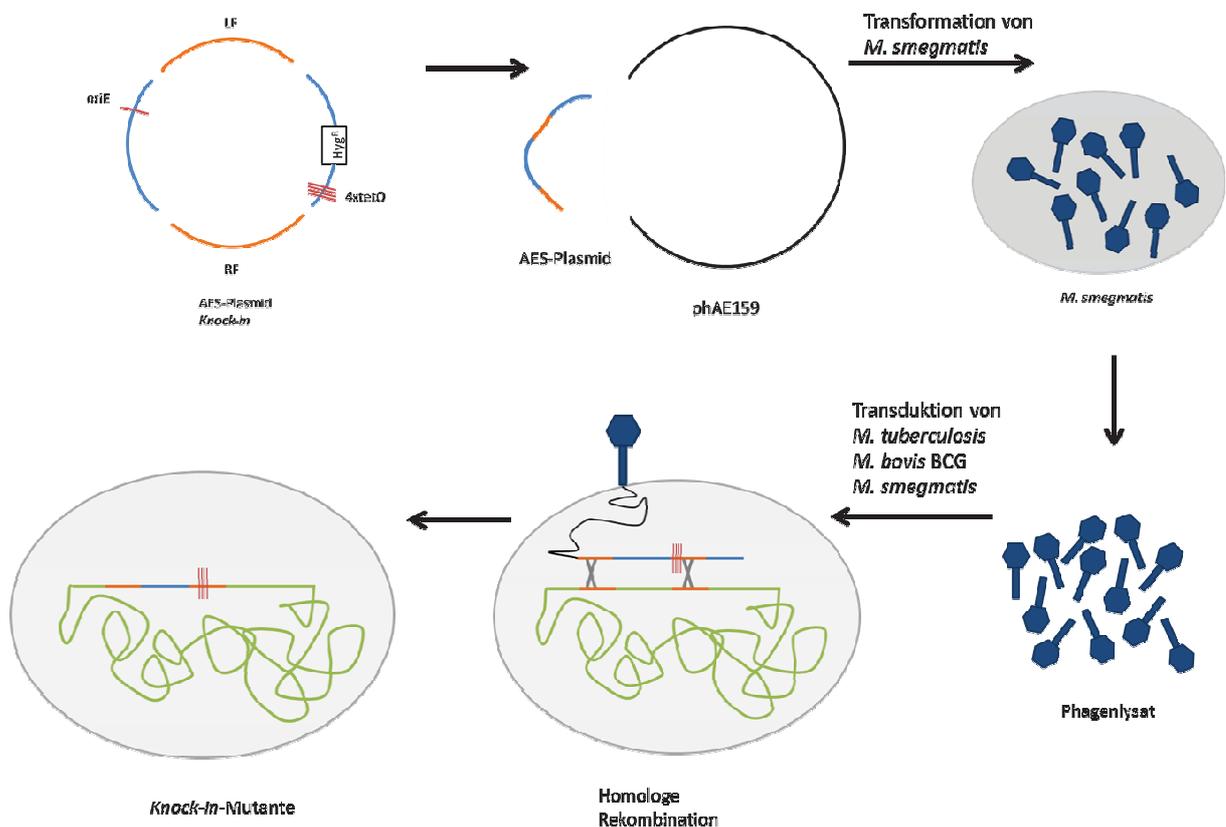
Gene, die für einen nicht-essentiellen ABC-Transporter kodieren, können im Wildtyp von Mycobakterien deletiert werden, sodass *knock-out* bzw. Gendelektionsmutanten erzeugt werden, denen alle Gene des Transporters fehlen. Diese Gendelektionsmutanten enthalten anstelle der Gene, die für den Transporter kodieren, eine Kassetten, bestehend aus einem Hygromycin-Resistenzgen zur Selektion sowie dem Saccharose-Sensitivitätsgen *SacB* (Levansucrase aus *Bacillus subtilis*) zur Gegenselektion zur eventuellen späteren Generierung von markerfreien Mutanten. Der Genaustausch erfolgt über homologe Rekombination unter Verwendung von ortsspezifischen Allelaustauschsubstraten (AES) (vgl. Abb. 6).



**Abb. 6: Schematische Darstellung der Erzeugung einer Gendelektionsmutante.** Zunächst wird ein AES-Plasmid kloniert. Diese Plasmid enthält neben der rechten und linken Flanke (RF bzw. LF, orange dargestellt), welche 500 – 1000 bp große flankierende DNA Bereiche des zu deletierenden Gens darstellen, zwei konstante Regionen, die aus dem Vektor p0004S stammen (hellblau dargestellt). Auf einem Fragment ist eine Hygromycin-Resistenz (HygR) sowie ein Saccharosesensitivitätsgen (SacB) (kastenförmig dargestellt) kodiert, das andere enthält ein *oriE* (dargestellt als roter Strich), eine  $\lambda$ -*cos*-Site zur Verpackung in  $\lambda$ -Phagen sowie eine *PacI*-Schnittstelle (nicht dargestellt). Über die *PacI*-Schnittstelle kann das Plasmid in den modifizierten, temperatursensitiven Mycobacteriophagen phAE159 (Derivat des Phagen TM4) ligiert werden. Das Phasmid wird zur Klonierung *in vitro* in Phagenköpfe verpackt und in *E. coli* HB101 transduziert (nicht dargestellt). Die DNA des resultierenden Hybridphasmids wird schließlich in *M. smegmatis* elektroporiert, wodurch sich bei der permissiven Temperatur von 30°C lytische rekombinante Mycobacteriophagen bilden. Aus *M. smegmatis* lässt sich hochtitriges Phagenlysat gewinnen, dass dann für die Transduktion von Mycobakterien verwendet werden kann. Bei der Transduktion bei der nicht-permissiven Temperatur von 37°C injiziert der Phage sein Genom in die Wirtszelle, wo die homologen Bereiche zwischen AES und Genom rekombiniert werden, sodass ein Austausch der ursprünglichen Genregion des Wildtyp durch die Resistenzkassette und das Saccharosesensitivitätsgen stattfindet. Durch die Kultivierung bei 37°C kann der Phage keine produktiven, lytischen Phagenpartikel mehr bilden und geht bei der Replikation verloren. Die erzeugten Gendelektionsmutanten mit der passenden Resistenzkassette anstelle der ursprünglichen Gene werden auf Selektivmedium als Kolonien sichtbar.

### 3.14.2 Strategie zur Erzeugung von konditionalen Mutanten (*knock-in*)

Essentielle Transporter können *per definitionem in vitro* nicht deletiert werden. Daher wurden für essentielle Gene konditionale Genexpressionsmutanten generiert. Dazu wurde über AES unmittelbar stromaufwärts der Einzelgene des Transporters eine synthetische Genkassette inseriert (hyg-Promotor-4XtetO), die neben einer Hygromycinresistenz auch einen synthetischen Promotor enthält, der vier Tet-Operatoren (*tetO*) beinhaltet. In der erzeugten *knock-in*-Mutante ist die Genexpression zunächst noch konstitutiv und nicht regulierbar. Erst nach heterologer Expression *in trans* eines plasmidkodiert vorliegende Repressorproteins TetR bzw. des reversen Repressorproteins revTetR, welche an die vier *tetO* Stellen binden können, lässt sich in der konditionalen Mutante die Expression des Zielgens regulieren (Ates, Ummels et al. 2015).

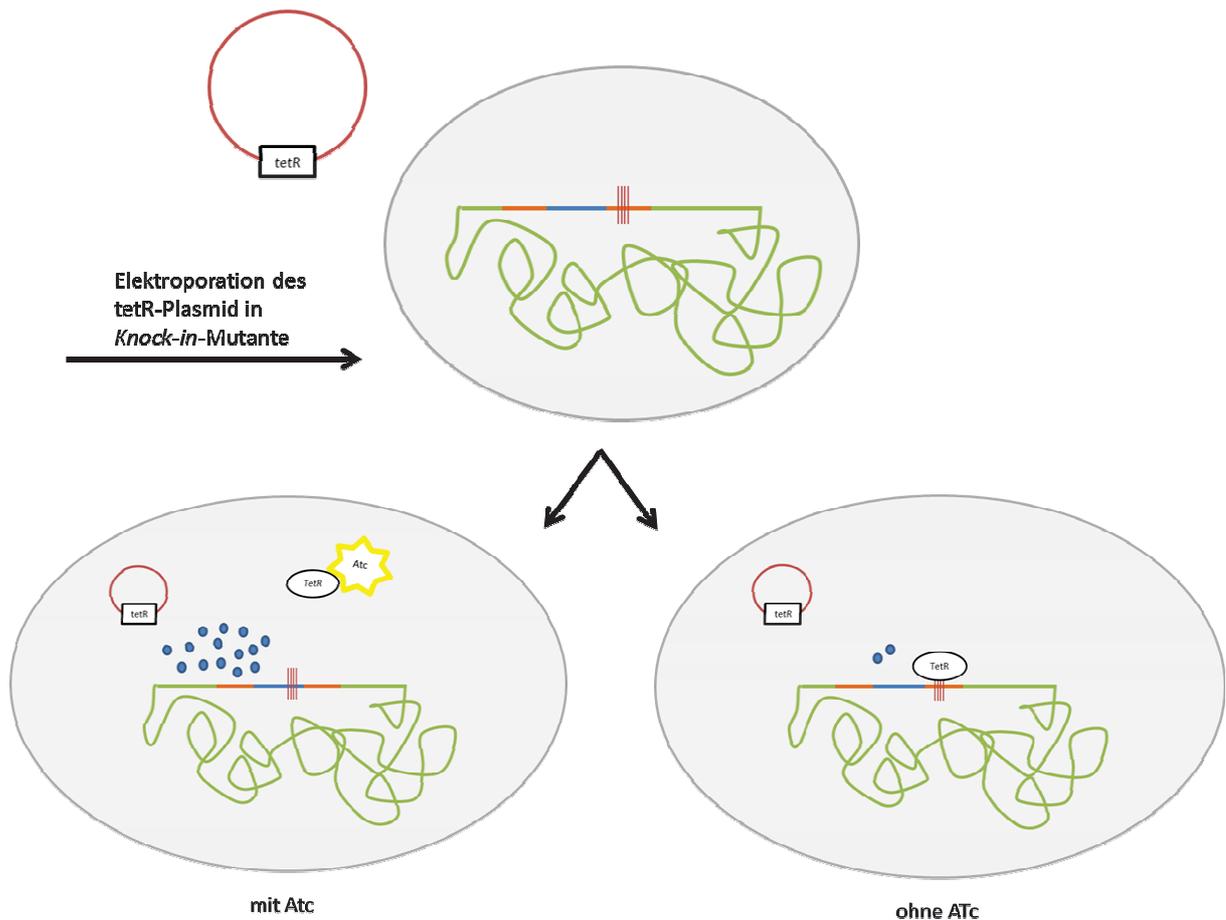


**Abb. 7: Schematische Darstellung der Erzeugung einer *Knock-in*-Mutante.** Zunächst wird ein AES-Plasmid kloniert. Diese Plasmid enthält neben der rechten und linken Flanke (RF bzw. LF, orange dargestellt) zwei konstante Regionen, die aus dem Vektor pcRv1327c-4XtetO stammen (hellblau dargestellt), auf denen eine Hygromycin-Resistenz (Hyg<sup>R</sup>) sowie ein vierfacher Tet-Operator (dargestellt durch vier rote Striche) kodiert ist und ein oriE (dargestellt als einzelner roter Strich), sowie eine  $\lambda$ -cos-Site zur Verpackung in  $\lambda$ -Phagen sowie eine *PacI*-Schnittstelle enthält (nicht dargestellt). Über die *PacI*-Schnittstelle kann das Plasmid in den modifizierten, temperatursensitiven Mycobakteriophagen phAE159 (Derivat des

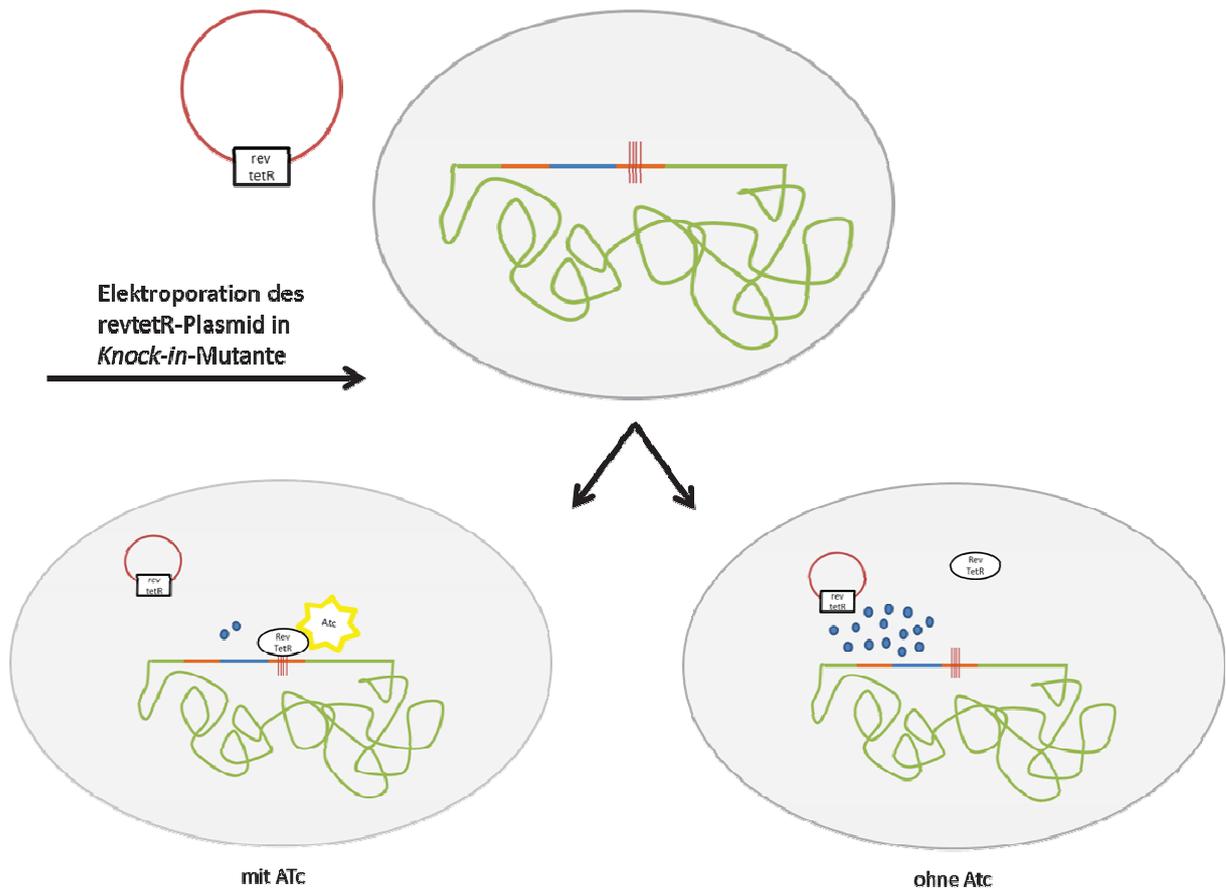
Phagen TM4) ligiert werden. Das Phasmid wird zur Klonierung *in vitro* in Phagenköpfe verpackt und in *E. coli* HB101 transduziert (nicht dargestellt). Die DNA des resultierenden Hybridphasמידs wird schließlich in *M. smegmatis* elektroporiert, wodurch sich bei der permissiven Temperatur von 30°C lytische rekombinante Mycobacteriophagen bilden. Aus *M. smegmatis* lässt sich hochtitriges Phagenlysat gewinnen, das dann für die Transduktion von Mycobakterien verwendet werden kann. Bei der Transduktion bei der nicht-permissiven Temperatur von 37°C injiziert der Phage sein Genom in die Wirtszelle, wo die homologen Bereiche zwischen AES und Genom rekombiniert werden, sodass ein Austausch der ursprünglichen Genregion des Wildtyp durch die Resistenzkassette und den synthetischen induzierbaren vierfachen Tet-Operator anstelle des nativen Promotors stattfindet. Durch die Kultivierung bei 37°C kann der Phage keine produktiven, lytischen Phagenpartikel mehr bilden und geht bei der Replikation verloren. Die erzeugten Gendeletionsmutanten mit der passenden Resistenzkassette anstelle der ursprünglichen Gene werden auf Selektivmedium als Kolonien sichtbar. In dieser Mutante findet eine noch vollständige Induktion des Gens von Interesse statt. Abkürzungen: AES, Allelaustauschsubstrat; tetO, tet-Operator.

Das Repressorprotein TetR bzw. revTetR wird erst über die Elektroporation (3.19) eines Plasmids in die *knock-in*-Mutante gebracht (vgl. Abb. 8). Durch sein Vorhandensein ändert sich die Expression des Zielgens in Abhängigkeit von der Bindung des Repressors an die künstlich inserierten tet-Operatoren. Mithilfe des tetR-Plasmids werden tetON-Mutanten erzeugt (Abb. 9), mithilfe des revtetR-Plasmids tetOFF-Mutanten (Abb. 10) (Ates, Ummels et al. 2015).

Das Gen *tetR* stammt aus dem Transposon Tn10 aus *E. coli* und bindet in Gegenwart von Tetracyclin nicht an die *tetO* Stellen, sodass eine maximale Genexpression möglich ist. Je weniger Tetracyclin im Medium vorhanden ist, desto besser bindet TetR an die *tetO* Stellen und reduziert damit die Genexpression. Das Zielgen wird im tetON-System so durch verringerte Zugabe von Tetracyclin gesilencet. Das *rev-tetR* Gen wurde durch synthetische Modifikationen aus *tetR* hergestellt, wodurch das kodierte Protein revTetR ein gegensätzliches Bindeverhalten zu den *tetO* Stellen zeigt. Solange kein Tetracyclin im Medium vorhanden ist, bindet der Repressor nicht an die *tetO* Stellen. Je mehr Tetracyclin zugegeben wird, desto besser bindet der Repressor und reduziert damit schrittweise die Genexpression. Das Gen wird so durch Zugabe von Tetracyclin gesilencet (Ates, Ummels et al. 2015).



**Abb. 8: Schematische Darstellung der Erzeugung einer tetON-Mutante basierend auf einer *Knock-in*-Mutante.** Die wie in Abb. 6 dargestellt erzeugte *knock-in*-Mutante wird durch die Elektroporation eines Plasmids, das ein reverses Tet-Repressor-Gen (*revtetR*) enthält regulierbar. Der reverse Tet-Repressor (*revTetR*) ist in der Lage, reversibel an den vierfachen Tet-Operator zu binden (dargestellt mit vier roten Strichen zu Beginn des Gens von Interesse). Im tetOFF-System liegt *revTetR* in Gegenwart von Anhydrotetracyclin (Atc) in einer Konformation vor, die eine starke Bindung an den Operator erlaubt (rechts). Die Genexpression ist unter Einfluss von Atc im tetOFF-System also stark beeinträchtigt, man spricht von Silencing-Bedingungen. Im tetOFF-System liegt der *revTetR* ohne Anwesenheit von Atc in einer Konformation vor, die keine Bindung an den Operator erlaubt. Die Genexpression (dargestellt durch blaue Kugeln) ist unbeeinträchtigt, man spricht von vollinduzierenden Bedingungen. Abkürzung: Atc, Anhydrotetracyclin, *revtetR*, Gen des reversen Tet-Repressors.



**Abb. 9: Schematische Darstellung der Erzeugung einer tetOFF-Mutante basierend auf einer *Knock-in*-Mutante.** Die wie in Abb. 6 dargestellt erzeugte *knock-in*-Mutante wird durch die Elektroporation eines Plasmids, das ein reverses tet-repressor-Gen (*revtetR*) enthält regulierbar. Der *revtetR*-Repressor (*RevTetR*) ist in der Lage, reversibel an den vierfachen Tet-Operator zu binden (dargestellt mit vier roten Strichen zu Beginn des Gens von Interesse). Im tetOFF-System liegt *revTetR* in Gegenwart von Anhydrotetracyclin (*Atc*) in einer Konformation vor, die eine starke Bindung an den Operator erlaubt (rechts). Die Genexpression ist unter Einfluss von *Atc* im tetOFF-System also stark beeinträchtigt, man spricht von partiellen Silencing-Bedingungen. Ein vollständiges Silencen des Gens ist in der Regel nicht möglich, sodass das Gen nur partiell gesilencet vorliegt. Im tetOFF-System liegt der *revTetR* ohne Anwesenheit von *Atc* in einer Konformation vor, die keine Bindung an den Operator erlaubt. Die Genexpression (dargestellt durch blaue Kugeln) ist unbeeinträchtigt, man spricht von vollinduzierenden Bedingungen. Abkürzung: *Atc*, Anhydrotetracyclin, *revtetR*, reverser tet-Repressor.

Die so erzeugten konditionalen Mutanten exprimieren das jeweilige Gen unter vollinduzierenden Bedingungen ähnlich stark wie der Wildtyp. Anstelle von Tetracyclin wurde in dieser Arbeit aufgrund seiner geringeren Toxizität Anhydrotetracyclin in Konzentrationen zwischen 0 und 10 µg/ml eingesetzt. Konzentrationen oberhalb von 10 µg/ml erwiesen sich im weiteren experimentellen Verlauf als zu stark. Für tetON Mutanten zeigte sich, dass eine Konzentration von 0,5 bis 1 µg/ml in der Regel schon für eine volle Geninduktion ausreicht. Für das Silencing von tetOFF-Mutanten waren Konzentrationen von bis zu 5 µg/ml genug, um die Mutanten zu silencen.

### 3.14.2.1 Konstruktion von Phasmiden

0,5 - 1,0 kb der stromaufwärts und stromabwärts vom Gen-von-Interesse gelegenen Regionen (*knock-out*) bzw. stromaufwärts und stromabwärts des Startcodons des Gen-von-Interesse wurden mittels PCR (3.8) amplifiziert. Die dazu verwendeten Primer tragen Restriktionsschnittstellen, die nicht innerhalb der amplifizierten Sequenz vorkommen dürfen. Üblicherweise ist das Enzym der Wahl *Van911*, alternativ wurden in dieser Arbeit *BstAPI* und *Dralll* verwendet. Die Verwendung von *Van911* erlaubt die gezielte Ligation von vier Fragmenten in einem Ligationsschritt, da es ein diskontinuierliches Palindrom erkennt (CCAN\_NNN<sup>^</sup>NTGG), in dem fünf Basen variieren können.

Nach der Restriktion wurden die aufgereinigten Fragmente (3.10) für *knock-out*-Mutanten mit dem *Van911*-verdauten Vektor p0004S (T. Hsu und W.R. Jacobs, Jr., unveröffentlichte Ergebnisse) ligiert (3.13) für *knock-in*-Mutanten mit dem *Van911*-verdauten Plasmid pcRv1327c-4XtetO (Ates, Ummels et al. 2015). Die Ligationen wurden in *E. coli* transformiert (3.18), Einzelklone gepickt und Plasmide isoliert (3.7). Plasmide, die im Testverdau ein passendes Restriktionsmuster zeigten, wurden schließlich zur Sequenzierung eingesetzt (3.11) und die erhaltenen Ergebnisse anhand von zuvor generierten Genkarten auf eventuelle Fehler überprüft. Verifizierte AES-Plasmide wurden über eine Restriktion mit *PacI* linearisiert und dann mit dem ebenfalls *PacI*-verdauten temperatursensitiven Phagen phAE159 (J. Kriakov und W.R. Jacobs, Jr., unveröffentlichte Ergebnisse) über Nacht bei Raumtemperatur ligiert. Am nächsten Tag wurde der Ligationsansatz in  $\lambda$ -Phagenköpfe verpackt. Dieser Schritt erfolgte mithilfe des MaxPlax *in vitro* Packaging Kit (Epicentre). Hierzu wurden 5  $\mu$ l des Ligationsansatz zu 50  $\mu$ l des Verpackungsextrakts gegeben und für maximal zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, bis die Reaktion mit MP-Puffer (untenstehend) abgestoppt wurde. Dieses Gemisch wurde zu Transduktions-kompetenten *E. coli* HB101 Zellen (3.14.2.2) gegeben, die dann für eine Stunde ruhig stehend inkubiert wurden. Nach der Inkubation erfolgte eine Ernte der Zellen (3.4.3) und eine Aufnahme in einem geringeren Aliquot um das Ausplattieren auf Hygromycin-haltigem Selektionsmedium zu erleichtern. Am nächsten Tag konnten 6-10 Einzelklone ausgewählt werden, die nach Kultivierung auf Festmedium oder in Flüssigmedium bei 37°C am nächsten Tag durch Restriktion mit *PacI* überprüft wurden. Phasmide mit korrektem Restriktionsmuster konnten dann zur Elektroporation (3.19) verwendet werden.

**Mycobakteriophagen-Puffer (MP-Puffer)**

150 mM NaCl  
50 mM Tris/HCl  
10 mM MgCl  
2 mM CaCl<sub>2</sub>  
1000 ml dest H<sub>2</sub>O

Die Zutaten werden nacheinander gelöst, auf pH 7,6 mit Salzsäure eingestellt und die fertige Lösung anschließend sterilfiltriert.

**3.14.2.2 Herstellung kompetenter *E. coli* HB101**

*E. coli* HB101 wurde 1%ig (v/v) aus Stocks angeimpft und als Vorkultur über Nacht bei 37°C in LB-Flüssigmedium mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,2% (w/v) Maltose angezogen. Am nächsten Morgen wurde als Hauptkultur 25 ml frisches LB-Flüssigmedium mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,2% (w/v) Maltose 0,05%ig (v/v) mit *E. coli* HB101 angeimpft. Das Wachstum der Bakterien wurde stündlich photometrisch überprüft, bis die OD<sub>600</sub> bei 0,8-1,0 lag und die Zellen sich damit im exponentiellen Wachstum befinden. Nach der Ernte (3.4.3) wurden die Bakterien in 12,5 ml auf 4°C vorgekühltem 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und entweder sofort für das *in vitro packaging* (3.14.2.1) genutzt oder bei 4°C gelagert.

**3.14.2.3 Elektroporation von Phasmiden**

Die wie unter 3.14.2.1 beschrieben erzeugten Phasmide wurden in kompetente *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 Zellen elektroporiert (3.19). Nach einer einstündigen Regenerationsphase bei 37°C wurden jeweils 400 µl der Zellen unverdünnt oder gemeinsam mit demselben Volumen frischer *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 Zellen mit 4 ml durch Erhitzen verflüssigtem und wieder auf etwa 60°C abgekühltem Middlebrook Top-Agar (Becton Dickinson Microbiology Systems) versetzt. Dieses Gemisch wurde auf bei 37°C vorgewärmte Agarplatten mit 7H10-Festmedium gegossen und erhärten gelassen, bevor die Inkubation bei 30°C für 3-4 Tage erfolgte. Da der Phage temperatursensitiv ist, bildet er nur bei 30°C die typischen Phagenplaques. 5-10 Einzelplaques wurden ausgestochen und in 200 µl MP-Puffer für mindestens vier Stunden bei Raumtemperatur durch Schütteln eluiert und für die Herstellung von hochtitrigem Phagenlysat (3.14.2.4) eingesetzt.

#### 3.14.2.4 Herstellung von Hochtiterphagenlysaten

*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 wurde bis zu einer OD von 0,8-1,0 angezogen, geerntet, in MP-Puffer (siehe 3.14.2.1) gewaschen und im selben Volumen aufgenommen. Das Phageneluat (3.14.2.3) wurde seriell verdünnt ( $10^{-1}$  bis  $10^{-5}$ ), zu jeweils 600 µl der gewaschenen *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 Suspension gegeben und für 30 bis 60 Minuten bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Dann wurden die mit dem verdünnten Phagenlysat inkubierten Bakterien mit 4 ml durch Erhitzen verflüssigtem und wieder auf etwa 60°C abgekühltem Middlebrook Top-Agar (Becton Dickinson Microbiology Systems) versetzt. Dieses Gemisch wurde auf bei 37°C vorgewärmte Agarplatten mit 7H10-Festmedium gegossen und erhärten gelassen, bevor die Inkubation bei 30°C für 3-4 Tage erfolgte. Platten, die etwa 500-1000 Plaques im Bakterienrasen aufweisen, wurden dann mit sterilem MP-Puffer abgeschwemmt. Dazu wurden 5 ml MP-Puffer auf die Agarplatten gegeben, die Platten sorgfältig mit Parafilm abgedichtet und für mindestens vier Stunden bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Das Lysat wurde dann doppelt filtriert: im ersten Schritt durch einen gröberen 5 µm Filter. Im zweiten Schritt wurde dieses Vorfiltrat durch einen feineren 0,22 µm Sterilfilter von Bakterien befreit und konnte entweder direkt für die Transduktion (3.14.2.5) eingesetzt werden oder im Kühlschrank für etwa drei Monate gelagert werden. Nach längeren Lagerfristen empfiehlt sich eine erneute Überprüfung des Phagentiters. Zur Überprüfung des Titers des Phagenlysats und der Thermosensitivität der Phagen wurden aus dem Filtrat Verdünnungsreihen von  $10^0$ - $10^{-8}$  hergestellt. Dazu wurden je 500-600 µl in MP-Puffer gewaschene Zellen von *M. smegmatis* mit 4 ml durch Erhitzen verflüssigtem und wieder auf etwa 60°C abgekühltem Middlebrook Top-Agar (Becton Dickinson Microbiology Systems, Rezeptur untenstehend) versetzt und das Gemisch auf Agarplatten mit 7H10-Festmedium gegossen und erhärten gelassen. Dann wurde jeweils 10 µl des Phagenlysats in allen Verdünnungsstufen auf zwei Topagar-Platten getropft und parallel eine Platte bei 30°C und eine Platte bei 37°C inkubiert. Bei 30°C bilden sich Plaques, so dass sich der Phagentiter bestimmen lässt. Hochtiterlysate sollten einen Titer von etwa  $1 \cdot 10^{10}$  *plaque forming units* (PFU)/ml aufweisen. Bei der Inkubation bei 37°C sollte der Phagentiter um mindestens den Faktor  $10^{-5}$  geringer sein, damit die Thermosensitivität gewährleistet ist.

##### Top-Agar 7H9

0,47 g 7H9 Middlebrook

0,75 g Agar Noble

100 ml dest H<sub>2</sub>O

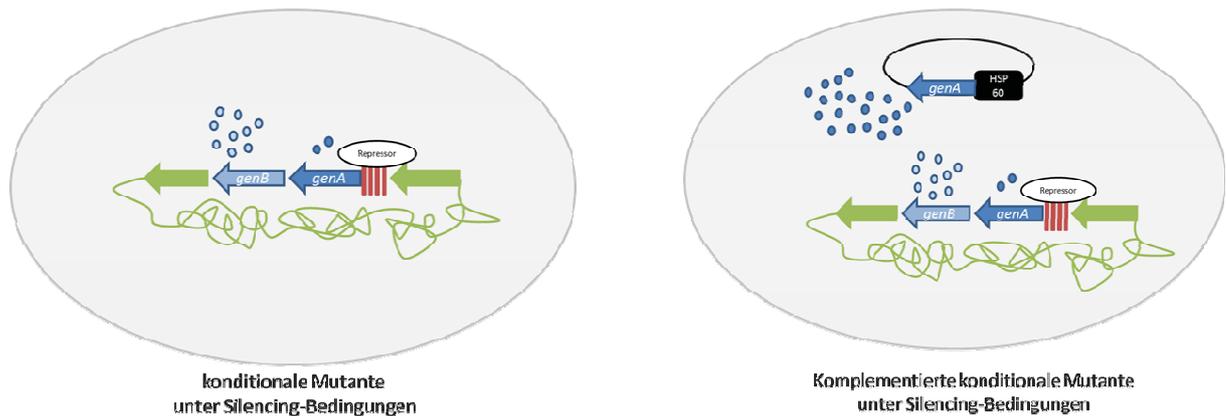
Die Zutaten werden nacheinander gelöst und die fertige Lösung anschließend autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wird 1 ml sterilfiltrierte 20% (w/v) Glucose zugegeben.

#### **3.14.2.5 Transduktion**

Mycobakterien wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und mit MP-Puffer gewaschen (3.4.3). Die Zellpellets wurden über Nacht bei 37°C mit 2 ml des Hochtiter-Phagenlysats (3.12.2.4) inkubiert und am nächsten Tag auf Selektionsmedium mit Hygromycin (50 µg/ml) und OADC anstelle von ADS ausplattiert. Die entstandenen Transduktanten wurden nach drei bis vier Tagen (*M. smegmatis*) bzw. 14-21 Tagen (*M. tuberculosis*, *M. bovis*) sichtbar und konnten in Flüssigkultur (Middlebrook 7H9) mit Hygromycin (50 µg/ml) überführt werden. Aliquots dieser Transduktanten wurden zur Isolierung genomischer DNA (3.16) verwendet. Für spätere Subkultivierungen nach der Verifizierung der Mutanten wurden Stocks (3.4.4) hergestellt.

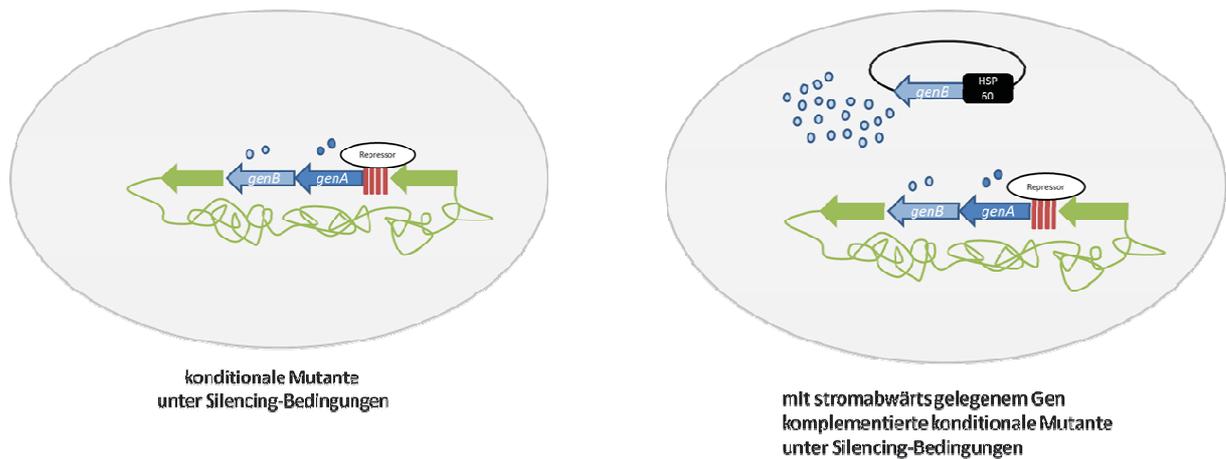
#### **3.14.2.6 Erzeugung von komplementierten Mutanten**

Um die durch Gendeletion bzw. konditionale Genexpression in den erzeugten Mutanten beobachteten Phänotypen sicher auf die genetische Veränderung zurückzuführen, wurden Komplementationsplasmide (vgl. Tab. 6) generiert. Die Plasmide wurden zunächst durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft und dann transformiert. Durch Transformation der Mycobakterien (3.19) mit dem jeweiligen Komplementationsplasmid sollten die phänotypischen Effekte in den Mutanten kompensiert werden, da hier zusätzlich zu den ausgeschalteten Genen bzw. dem gesilenceten Gen eine zweite Genkopie unter einem konstitutiv aktiven HSP60-Promotor, gemeinsam mit einem Selektionsmarker plasmidkodiert vorliegt (Abb. 10).



**Abb. 10: Schematische Darstellung der Komplementation einer gesilenceten konditionalen Mutante.** Die wie in Abb. 7 und 8 dargestellte konditionale Mutante exprimiert unter Silencing-Bedingungen nur ein geringes Level des Gens von Interesse (dargestellt durch blaue Kugeln), in diesem Fall *genA* eines Clusters aus *genA* und *genB*. GenB verfügt über einen eigenen Promotor und wird daher normal transkribiert (dargestellt durch hellblaue Kugeln). Um den Silencing-Effekt auf seine Reversibilität zu testen, wird ein Plasmid transformiert, das *genA* unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven HSP60-Promotors trägt. Der Effekt des Silencing wird durch diese konstitutive Genexpression aufgehoben und sollte in phänotypischen Analysen denen der vollinduzierten Mutante bzw. denen des Wildtyps ähneln. Das integrative Plasmid pMV361 wurde zugunsten der Übersichtlichkeit als episomal vorliegend dargestellt.

Für konditionale Mutanten, in denen ein Gen zu Beginn eines Operons gesilencet wurde, kann der Silencing-Effekt auch auf stromabwärts gelegene Gene ausgeübt werden, man spricht von sogenannten polaren Effekten. Um das Vorliegen solcher polarer Effekte vom eigentlichen Silencing trennen zu können, wurde ein Komplementationsplasmid mit dem stromabwärts gelegenen Gen transformiert. So wird das stromabwärts gelegene Gen voll exprimiert, während das Silencing des eigentlichen Gens von Interesse erhalten bleibt und der Effekt sauber unterschieden werden kann (Abb. 11).



**Abb. 11: Schematische Darstellung der Komplementation einer gesilenceten konditionalen Mutante mit dem stromabwärts gelegenen Gen.** Die wie in Abb. 8 und 9 dargestellte konditionale Mutante exprimiert unter Silencing-Bedingungen nur ein geringes Level des Gens von Interesse (dargestellt durch blaue Kugeln), in diesem Fall *genA* eines Operon aus den beiden Genen *genA* und *genB*. Das Silencing zeigt jedoch einen polaren Effekt und weitet das Silencing auf das nachfolgende *genB* aus (dargestellt durch hellblaue Kugeln). Um den Silencing-Effekt des eigentlichen Gens von Interesse, *genA*, vom polaren Effekt bereinigt betrachten zu können, wird ein Plasmid transformiert, das *genB* unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven HSP60-Promotors trägt. Der polare Effekt des Silencing wird durch diese konstitutive Genexpression aufgehoben, sodass der reine Effekt der Silencing von *genA* analysierbar wird. Das integrative Plasmid pMV361 wurde zugunsten der Übersichtlichkeit als episomal vorliegend dargestellt.

### 3.15 Bestimmung des Wachstums der konditionalen Mutanten in Abhängigkeit von Atc

Für konditionale Mutanten wurde die Abhängigkeit des Wachstums von einer Atc-Konzentration getestet. Für Mutanten, die sich durch Atc im Wachstum beeinflussen ließen, wurde auf diese Weise die benötigte Atc-Menge für eine volle Induktion (im Fall von tetON-Mutanten) bzw. möglichst starkes Silencing (im Fall von tetOFF-Mutanten) bestimmt. Die getesteten Atc-Konzentrationen lagen zwischen 10 µg/ml und 0,0005 µg/ml. Für tet-ON-Mutanten wird in der Regel eine volle Induktion bei 1 µg/ml erreicht, für tetOFF-Mutanten ist mit maximal 10 µg/ml ein starkes Silencing zu beobachten. Die Vorkulturen für diese Tests erfolgten unter vollinduzierenden Bedingungen im 10 ml Maßstab. Das Atc-abhängige Wachstum der Bakterien wurde dann auf Festmedium (Agarplatten) und in Flüssigmedium (3.4.1) im 96well-Mikrotiterplatten-Maßstab überprüft. Für tetON-Mutanten erwies sich eine Passagierung nach der Vorkultivierung als sinnvoll. Dazu wurde die Vorkultur geerntet und sorgfältig gewaschen und für die Inokulation einer 10 ml-Kultur eingesetzt, die dann unter partiell silencing-Bedingungen mit verringerten Atc-Konzentrationen (z.B. 0,125 µg/ml) für 5-7 Tage bei 37°C unter Schütteln inkubiert wurde. Dadurch konnte noch vorhandenes Genprodukt

während der Passagierung aufgebraucht werden und die Effekte des Atc auf das Wachstum der Bakterien wurden stärker sichtbar. Für tetOFF-Mutanten erwies sich eine Passagierung in der Regel als nicht notwendig. Als *readout* wurde der Resazurinassay (3.21) verwendet.

### 3.16 Isolierung genomischer DNA

Mithilfe der CTAB-Methode wurde DNA aus Mycobakterien isoliert. Durch Zugabe von 1% (w/v) Glycin in die aktiv wachsende Kultur und Inkubation bei 37°C über Nacht wurde die Zellwand der Bakterien zunächst geschwächt. Die Bakterien wurden am nächsten Tag ohne Waschschrift geerntet und das Pellet mit 500 µl in GTE-Puffer (untenstehend) mit Lysozym (10 mg/ml, untenstehend) bei 37°C über Nacht inkubiert, um die Zellen weiter aufzuschließen. Am nächsten Tag wurden 150 µl einer 10% (w/v) SDS-Lösung mit Proteinase K (10 mg/ml) (Rezeptur untenstehend) zugegeben und das Gemisch für 30 Minuten bei 55°C im Heizblock inkubiert, damit bakterielle Proteine degradiert werden. Im nächsten Schritt wurden zunächst 200 µl einer 5 M NaCl-Lösung zugegeben, das Ganze vorsichtig gemischt und 160 µl bereits vorgewärmte CTAB-Lösung (untenstehend) zugegeben und ebenfalls vorsichtig gemischt. Bei 65°C erfolgte ein 10minütiger Inkubationsschritt.

Die Extraktion der DNA aus diesem Gemisch erfolgte nun durch Zugabe von 1 ml einer Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (24:1, v/v). Nach Zugabe von Chloroform-Isoamylalkohol wurde vorsichtig, aber sorgfältig durchmischt. Während der anschließenden Zentrifugation (10 min, 4000 rpm) bildeten sich zwei Phasen, getrennt von einer Interphase, die die Proteine und weitere Zellbestandteile enthält. Die obere, wässrige Phase enthielt die DNA, wurde möglichst ohne Verluste abgenommen und erneut mit 1 ml Chloroform-Isoamylalkohol sorgfältig durchmischt. In der erneuten Zentrifugation bildete sich nur noch eine schwache Interphase. Auch hier wurde die obere Phase möglichst verlustfrei abgenommen, um dann der Fällung mit 0,7 Volumen Isopropanol unterzogen zu werden. Nach Zugabe von Isopropanol wurde das Gemisch vorsichtig mehrfach invertiert, um den Ausfall der DNA zu erleichtern. Zur Erhöhung der Ausbeute konnte das Gemisch für eine Viertelstunde im Gefrierschrank abgekühlt werden. Während der Zentrifugation (10 min, 13000 rpm) setzte sich die DNA als weißes Pellet am Gefäßboden ab. Diese Pellet wurde dann mit 1 ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen, das Ethanol sorgfältig abpipettiert und das Pellet im Heizblock bei 40°C für einige Minuten getrocknet. Das Pellet wurde dann in 50-100 µl TE-Puffer mit 1 µg/ml (w/v) RNase gelöst und die DNA bei -20°C gelagert.

**GTE-Puffer**

25 mM Tris/HCl

10 mM EDTA

50 mM Glucose

pH mit HCl auf 8.0 einstellen

**Lysozym-Lösung**

10 mg Lysozym

10 ml dest H<sub>2</sub>O

**Proteinase K-Lösung**

10 mg Proteinase K

10 ml dest H<sub>2</sub>O

**SDS-Lösung**

10 g Natriumdodecylsulfat

100 ml dest H<sub>2</sub>O

**CTAB-Lösung**

4,1 g NaCl

10 g Cetrimid (Cetyltrimethylammoniumbromid)

90 ml dest H<sub>2</sub>O

NaCl wird unter Rühren in Wasser gelöst. Dann wird Cetrimid zugegeben und auf einem Heizrührer bei 65°C in Lösung gebracht. Beim Abkühlen wird die Lösung zähflüssig.

**3.17 Southern Blot**

Um die Genotypen der putativen Mutanten zu prüfen, wurden Southern Blots mit verdauter genomischer DNA der Mutanten im Vergleich zu genomischer DNA des Wildtyps durchgeführt. Dazu wurde DNA isoliert (3.16), über Nacht mit einem geeigneten Restriktionsenzym verdaut (3.12) und der DNA-Gehalt der Restriktionsansätze zunächst in einem kleinen Aliquot getestet. Möglichst gleiche DNA-Mengen wurden dann in einer Agarose-Gelelektrophorese (3.9) langsam laufend (100 V)

aufgetrennt. Der Transfer mithilfe des Turboblotter Rapid Downward Transfer Systems auf eine Nylonmembran erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit UV-Strahlung von  $120 \text{ J/cm}^2$  auf der Nylonmembran quervernetzt. Mithilfe des Amersham™ AlkPhos Direct Labelling Detection Systems wurde die Blotmembran dann für mindestens eine Stunde prähybridisiert. Als Hybridisierungssonden dienten PCR-Produkte der linken bzw. rechten Flanken, die auch zur Herstellung des AES (3.14) eingesetzt wurden. Die Markierung der Sonden wurde nach Angaben des Herstellers vorgenommen und entweder frisch verwendet oder nach Mischung mit 50% (v/v) Glycerin bei  $-20^\circ\text{C}$  zur späteren Verwendung eingefroren. Die Hybridisierung der Sonden fand grundsätzlich nach Angaben des Herstellers statt, erfolgte jedoch für mind. 16 Stunden und bei  $65^\circ\text{C}$  um die Spezifität noch weiter zu erhöhen. Mithilfe des CDP-Star™ Detection Reagent wurden die Signale auf der Membran detektiert und auf Amersham Hyperfilm™ MP mithilfe der Entwicklermaschine Cawomat 2000 IR visualisiert.

Im Vergleich der verdauten DNA der Mutanten zu entsprechend verdauter DNA des jeweiligen Wildtypen ergaben sich veränderte Fragmentgrößen, mit denen die Sonde hybridisiert. Aufgrund der Insertion der Resistenzkassette (vgl. Abb. 6 und 7) zeigten die Mutanten in der Regel ein größeres Fragment als der Wildtyp. Die Fragmente wurden durch die Sondenhybridisierung und die Reaktion der alkalischen Phosphatase mit dem CDP-Star™ Detection Reagent ein Lumineszenzsignal detektierbar.

### **3.18 Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock**

Auf Eis aufgetaute kompetente *E. coli* NEB 5 alpha (NEB) wurden mit  $5 \mu\text{l}$  Ligationsansatz oder Plasmid-DNA vermischt und für eine halbe Stunde weiter auf Eis inkubiert, damit die DNA sich an den Bakterien anlagern kann. Der Hitzeschock, bei dem die DNA in die Bakterienzellen aufgenommen wird, erfolgte bei  $42^\circ\text{C}$  für 30 Sekunden im Wasserbad. Nach kurzem Abkühlen auf Eis erfolgte eine einstündige Regeneration in  $500 \mu\text{l}$  SOC-Medium (NEB), zur Ausprägung der plasmidkodierten Antibiotikaresistenz bevor Aliquots auf LB-Selektionsplatten (3.4.5) ausplattiert wurden. Die Platten wurden nach der Transformation über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und eine geeignete Anzahl (3-10) von Klonen für das weitere Screening ausgewählt und in Flüssigkultur über Nacht angezogen.

### **3.19 Transformation von Mycobakterien**

Zur Elektroporation wurden *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* und *M. smegmatis* zunächst bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  zwischen 0,5-0,8 angezogen. Nach der Ernte der Zellen wurde das Pellett zweimal mit einer

kalten Lösung von 10% (v/v) Glycerin mit 0,05% (v/v) Tyloxapol gewaschen und schließlich in 1/10 des ursprünglichen Kulturvolumens aufgenommen. Die Transformation erfolgte in Elektrotrationsküvetten mit 0,2 cm Spaltbreite bei 2500 V, 1000  $\Omega$  und 25  $\mu$ F. Um die Expression der Selektionsmarker zu ermöglichen, wurden die Zellen danach mit 1 ml Middlebrook 7H9 (für Phasmide: ohne Tyloxapol, für normale Plasmide: mit 0,05% (w/v) Tyloxapol) versetzt und für etwa 1-2 Stunden (schnellwachsende Mycobakterien) bzw. 18-20 Stunden (langsamwachsende Mycobakterien) bei 37°C inkubiert und danach auf Selektionsmedium ausplattiert.

### 3.20 Phänotypische Microarrays

Biolog-Mikrotiterplatten wurden nach Angaben des Herstellers verwendet. Sie wurden mit je 100  $\mu$ l Bakteriensuspension ( $1 \cdot 10^6$  CFU/ml) pro well in einer 96-well Mikrotiterplatte angeimpft und in der Regel für 6 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Für Platten, auf denen nur sehr schwaches Wachstum zu sehen war, wurde die Inkubationsdauer auf bis zu 12 Tage verlängert. Als Readout wurde der Resazurinassay (3.21) verwendet.

### 3.21 Resazurin-Assay

Aliquots der Bakterienkultur wurden über Nacht mit 1% (v/v) einer Resazurin-Lösung (1 mg/ml) inkubiert. Die Reduktion von Resazurin korreliert durch die Bildung von Reduktionsäquivalenten mit dem bakteriellen Wachstum. Mit dem bloßen Auge ist ein optischer Farbumschlag von blau (oxidiertes Resazurin) über schwach lila zu einem hellen pink (vollständig reduziertes Resazurin) sichtbar. Nach Abschluss der Inkubation (~12-16 h) wurde Formaldehyd-Lösung in einer Endkonzentration von 5% (v/v) in die Wells pipettiert und die Zellen für 30 Min fixiert. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt bei 590 nm (Exzitation von 540 nm) an einem TECAN Elisa Reader. Für die Analysen ist es wertvoll, jeweils Negativkontrollen mit Medium ohne Zellen mitzuführen, mithilfe derer die Autofluoreszenz des Resazurins bestimmt und die erhaltenen Werte von den Messergebnissen abgezogen werden kann.

### 3.22 Gentamycin-Protektionsassay

THP-1 Zellen (max. Passage 25) wurden mit 50 nM PMA stimuliert und  $1 \times 10^7$  Zellen in 24-well Platten ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen zweimal mit auf 37°C erwärmten PBS vorsichtig gewaschen, ohne die adhären gewordenen Zellen abzulösen. Nach der Zugabe von frischem RPMI ruhten die Zellen für mindestens 3 h. In der Zwischenzeit wurden Bakterien der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, zweimal mit PBS-T gewaschen, einer Ultraschallbehandlung (3x10 sec)

unterzogen und die  $OD_{600}$  im Photometer bestimmt. Infektionsassays von THP-1 mit Mycobakterien wurden mit einem Volumen von jeweils 20  $\mu$ l und einer MOI von 3 durchgeführt. Die Kalkulation der MOI basiert auf der Annahme, dass eine  $OD_{600} = 1$  einer Zellzahl von  $3 \times 10^8$  CFU/ml entspricht. Die Infektionen erfolgten für 3 h in RPMI Medium. Nach 3 h wurde das Medium durch RPMI mit Zusatz von Gentamycin (10  $\mu$ g/ml) ersetzt. Auf diese Weise wurden die extrazellulären Bakterien abgetötet, während die Bakterien im Inneren der Makrophagen überleben. Zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte die Lyse der Makrophagen durch 0,05% SDS für 5-10 Minuten und das Ausplattieren der Verdünnungsreihen zur Bestimmung der CFU/ml. Die maximale Dauer der Infektion betrug 7 Tage, über längere Phasen sind ausdifferenzierte THP-1 Zellen nicht kultivierbar. Nach der Zugabe des Gentamycin-haltigen Mediums erfolgte die erste Lyse, die den Zeitpunkt  $t_0$  darstellt.

### 3.23 Herstellung von Zelllysaten und Proteinquantifizierung

Dicht bewachsene Kulturen der Mycobakterien wurden geerntet (3.3.4) und nach zweifachem Waschen mit PBS + 0,05% (v/v) Tyloxapol in einem kleinen Volumen (1/25) aufgenommen. Die Probe wurde mit Glaskugeln (106  $\mu$ m und 3 mm Durchmesser) versetzt und dann einem Beadbeating (min. 4x1 min, max. 2x10 min, 50 Hz,) im Tissuelyser unterzogen. Das Lysat wurde über Spin-X-Säulchen zellfrei filtriert und der Proteingehalt des Filtrats mit einem BCA-Kit (Pierce) bestimmt. Die Proteinbestimmung der Lysate erfolgte anhand einer Standardkurve mit vorgegebenen BSA-Konzentrationen zwischen 1 mg/ml und 250  $\mu$ g/ml mithilfe des BCA-Kits im Mikrotiterverfahren. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C erfolgte das Auslesen bei 562 nm im Elisareader. Anhand der bekannten Konzentrationen konnte dann die Proteinmenge in den Zelllysaten bestimmt werden, sodass eine gleiche Auftragungsmenge für alle Proben sichergestellt ist.

### 3.24 SDS-PAGE

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*SDS polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) wird das Protein vor der Auftrennung im Gel durch Inkubation mit dem Detergens SDS denaturiert. Hier werden nicht-kovalente Proteinaggregate aufgelöst, sodass sich die Proteine im Gel annähernd proportional zu ihrer Größe bewegen. SDS bindet sehr effizient an Proteine, und da es negativ geladen ist, wird die Eigenladung des Proteins weitgehend vernachlässigbar. Durch den Vergleich mit einem Standard, das Proteine bekannter molekularer Massen enthält lässt sich die molekulare Masse unbekannter Proteine im Gel bestimmen. Um die Proben für das SDS-Gel aufzubereiten, wurden 10  $\mu$ g Protein mit dem entsprechenden Volumen 6x Lämmli-puffer versetzt und für 5 min auf 100°C erhitzt. Durch das Kochen der Proben in SDS-haltigem und die Reduktion der Disulfidbrücken durch

DTT (Dithiothreitol) wurden die Proteine denaturiert. Zur Kontrolle der Laufweite enthält der Probenpuffer Bromphenolblau, zur Beschwerung der Probe Glycerin. Die abgekühlten Proben konnten dann auf kontinuierliche 10%ige SDS-Gele (Biorad) aufgetragen werden. Da die Gele selbst kein SDS enthalten, ist das SDS im Laufpuffer (Biorad) enthalten, der zu Beginn frisch aus einer 10x Lösung hergestellt wird. Als Ladekontrolle für Immunoblots (3.25) diente die Färbung eines identisch beladenen SDS-Gels mit Coomassie. Die Färbung mit Coomassie erfolgte für mindestens 2 h oder über Nacht bei Raumtemperatur.

#### Lämmli-puffer (6x)

1,2 g	SDS
6 mg	Bromphenolblau
4,7 ml	Glycerin
1,2 ml	0,5 M Tris, pH6,8
0,93 g	DTT
mit ddH <sub>2</sub> O ad 10 ml	

#### Coomassie Färbelösung

2,5 g	Coomassie Brilliant Blue R250
100 ml	Eisessig
450 ml	MetOH
mit ddH <sub>2</sub> O ad 1000 ml	

### 3.25 Western Blot/Immunoblot

Zur spezifischen Detektion der Zellwandbestandteile durch Antikörper wurden diese mittels SDS-Gelelektrophorese (3.24) aufgetrennt und im Western Blot auf eine Träger-Membran übertragen. Für die Western Blot-Analyse wurde eine PVDF-Membran eingesetzt. Die Zellwandbestandteile und Proteine wurden für 1,5 h bei 100 V auf die Membran transferiert. Nach dem Blotting wurde die Membran mit Skim Milk oder BSA abgesättigt (10-12% für mind. 0,5 h), um unspezifisches Binden der Antikörper an die Membran zu verhindern. Die Inkubation mit dem spezifischen ersten Antikörper (Tab. 11) erfolgte dann in 1-5% Skim Milk oder BSA über Nacht bei 4°C. Nach Waschschritten mit TBST/TSM (Rezeptur untenstehend) erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1,5 h bei Raumtemperatur. Nach Waschschritten in TBS/TSM (mind. 3x10 min) und dest H<sub>2</sub>O (1x5 min) erfolgte die Detektion mit Lumiglo® (Cell Signalling). Die Lichtentwicklung wurde auf Amersham Hyperfilm™ MP mithilfe der

Entwicklermaschine Cawomat 2000 IR visualisiert und anschließend im Vergleich mit dem Größenstandard ausgewertet.

**TSM-Waschpuffer für  
Western Blots/Immunoblots**

Tris	20 mM
NaCl	150 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM

pH mit HCl auf 7,6 einstellen

**TSMT: TSM + 0,05% Tween 80**

**TBS-Waschpuffer für  
Western Blots/Immunoblots**

Tris	50 mM
NaCl	150 mM
pH mit HCl auf 7,6 einstellen	
<b>TBST: TBS + 0,05% Tween 80</b>	

**Tab.11: Überblick über die verwendeten primären Antikörper für Immunoblots**  
Angegeben sind die verwendeten Antikörper, die von ihnen erkannten Antigene sowie die für die Detektion notwendigen sekundären Antikörper.

Primärer Antikörper	Antigen	Sekundärer Antikörper	Referenz
MAb F30-5	LAM	Anti-Maus (in Skim Milk) HRP	(Kolk, Ho et al. 1984)
183-24	PIM <sub>6</sub>	Anti-Maus (in Skim Milk) HRP	(Kolk, Ho et al. 1984)

### 3.26 Humaner Zytokin-Array

Mithilfe des Human Cytokine Array Kit (R&D) wurde die Expression verschiedener Zytokine an Tag 5 nach Infektion von THP-1 Makrophagen bestimmt. Dazu wurde der Medienüberstand abgenommen und doppelt über Spin-X-Röhrchen sterilfiltriert, um den Überstand sicher von Mycobakterien zu befreien. Der Medienüberstand wurde mit biotinylierten spezifischen Antikörpern gemischt. Auf einer Nitrozellulosemembran lagen spezifische Antikörper punktförmig gebunden vor. Antigen/Antikörper-Komplexe werden von den spezifischen Antikörpern auf der Membran immobilisiert und können mit einer Streptavidin-gekoppelten Meerrettichperoxidase über eine Lichtreaktion detektiert werden. Die Signale wurden auf Amersham Hyperfilm™ MP mithilfe der Entwicklermaschine Cawomat 2000 IR visualisiert und dokumentiert. Die Intensität der Signale gibt einen Aufschluss über die relative Zytokinexpression.

### 3.27 Extraktion von polaren Lipiden

(in Kooperation durchgeführt von AG Besra, University of Birmingham)

Um die Effekte auf Lipide und Lipoglycane in der konditionalen Mutante von Msmeg\_1817 zu visualisieren, wurden die Stämme bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,8 angezogen und dann mit 10  $\mu\text{Ci/ml}$  radioaktiv markierter  $C^{14}$ -D-Glucose markiert und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Extraktion der polaren Lipide wurden 10 ml Kultur zweimal mit PBS gewaschen und dann mit 2 ml  $\text{CH}_3\text{OH}:0,3\% \text{ NaCl(aq)}$  (100:10, v/v) und 2 ml Petrolether für 30 min versetzt. Nach der Zentrifugation befanden sich die polaren Lipide im Pellet, die apolaren im Überstand. Das Pellet wurde mit 2,3 ml  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:0,3\% \text{ NaCl(aq)}$  (90:100:30, v/v/v) für eine Stunde gerührt und wieder zentrifugiert. Das verbleibende Pellet wurde mit 750  $\mu\text{l}$   $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:0,3\% \text{ NaCl(aq)}$  (50:100:40, v/v/v) für 30 min extrahiert, zentrifugiert und der Überstand mit der vorherigen Fraktion zusammengeführt. Nach der Wiederholung des Vorgangs wurden die zusammengeführten Überstände mit 1,3 ml  $\text{CHCl}_3$  und 1,3 ml 0,3%  $\text{NaCl(aq)}$  versetzt, zentrifugiert und die untere Phase isoliert und getrocknet. Der getrocknete Extrakt polarer Lipide wurde dann in  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  (2:1, v/v) aufgenommen, und der Einbau von Glucose D-[14C(U)] wurde über die Flüssigszintillation mit 5 % der Lipidfraktionen in 5 ml EcoScint A (National Diagnostics) quantifiziert. Gleiche Mengen der polaren Lipidextrakte (50 000 cpm) wurden auf Silica Gel 60 F254 (Merck) TLC-Platten mit Aluminiumrücken aufgetragen und im Laufmittelsystem E für polare Lipide getestet:  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (60:30:6, v/v/v) in der ersten Dimension und  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (40:25:3:6, v/v/v/v) in der zweiten Dimension. Die Visualisierung erfolgte dann autoradiographisch durch 48 h Exposition auf Röntgenfilmen.

### 3.28 Extraktion von Lipoglycanen

(in Kooperation durchgeführt von AG Besra, University of Birmingham)

Die Extraktion von Lipoglycanen erfolgte ausgehend von 10 ml Kulturvolumen, die mit 10  $\mu\text{Ci/ml}$  radioaktiv markierter  $C^{14}$ -Glucose angezogen wurden. Die Bakterien wurden geerntet, getrocknet und in Wasser resuspendiert. Fünfmal hintereinander erfolgte eine Extraktion mit einem gleichen Volumen von 50% (v/v) Ethanol in Wasser bei 85°C für 6 Stunden. Die Extrakte wurden dann zentrifugiert und der Überstand einer erneuten Extraktion unterzogen. Die Überstände wurden zusammengeführt, getrocknet und einer Phenol- $\text{H}_2\text{O}$  Behandlung bei 65°C unterzogen. Die wässrige Phase, die die kruden Lipoglycane enthält, wurde gegen Wasser dialysiert, getrocknet und die Inkorporation von  $C^{14}$ -Glucose durch flüssige Szintillation quantifiziert. Gleiche Mengen (50 000 cpm) wurden dann auf ein 15% SDS-PAGE Gel geladen und

elektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung der Lipoglycane erfolgte dann autoradiographisch durch 48 h Exposition auf Röntgenfilmen.

### 3.29 Extraktion von AG und LM/LAM und Nachweis über GC/MS

(in Kooperation durchgeführt von AG Besra, University of Birmingham)

Die Bakterien wurden angezogen, geerntet und bei -20°C eingefroren. Die aufgetauten Zellen wurden dann in PBS mit 2% Triton X-100 (pH 7,2) resuspendiert, sonifiziert und bei 27 000 *g* pelletiert. Das Pellet wurde zur Extraktion der Zellwand dreimal mit PBS mit 2% SDS bei 95°C für eine Stunde extrahiert, dann mit Wasser, mit 80% (v/v) Aceton in Wasser und Aceton gewaschen und schließlich lyophilisiert. Mit 2 M Trifluoracetat wurden die Zellen hydrolysiert, mit NaB<sub>2</sub>H<sub>4</sub> reduziert und die aus dieser Behandlung resultierenden Alditole *per*-O-acetyliert. Die *per*-O-Acetylierung erfolgte nach Aufnahme der Lipoglycane mit 0,5 ml DMSO mit 4,8 M Dimethylsulfinylcarbanion. Das Gemisch wurde dreimal für eine Stunde gerührt, mit 50 µl Iodomethan versetzt und erneut für eine Stunde gerührt. Das Gemisch wurde mit demselben Volumen Wasser verdünnt und gegen Wasser dialysiert und mit GC/MS für Alditolacetatzucker analysiert.

### 3.30 Analyse der zellfreien Kulturüberstände

(in Kooperation durchgeführt von AG Besra, University of Birmingham)

Nach doppelter Filtration über Spin-X Röhrchen wurden die zellfreien Kulturüberstände getrocknet und mit 250 µL Acetatanhydrid und 250 µL Pyridin (1:1 v/v) versetzt und für 2 h bei 80°C gerührt. Das Rühren erfolgte weiter über Nacht bei RT. Die Suspension wurde dann mit 2 ml Chloroform und 2 ml Wasser versetzt und zentrifugiert. Die Chloroformphase wurde entnommen, zweimal mit 1 M HCl und einmal mit Wasser gewaschen, anschließend getrocknet und die acetylierten Überstände in Chloroform wieder in Lösung gebracht. Die Analyse erfolgte dann über gekoppelte GC/MS.

### 3.31 Mausinfektionen

(in Kooperation durchgeführt von AG Jacobs, Albert Einstein College of Medicine, New York)

C57BL/6-Mäuse wurden einer Aerosolinfektion (niedrig dosiert) mit Wildtyp, Knockout-Mutanten und konditionalen Mutanten von *M. tuberculosis* unterzogen. Eine Suspension aus exponentiell wachsenden Bakterien wurde abzentrifugiert, in PBS-T gewaschen und nach Ultraschallbehandlung auf  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. 20 ml wurden dann für die

Aersolinfection eingesetzt. Je vier Mäuse wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion analysiert und die Bakterienlast in Lunge und Milz bestimmt, indem serielle Verdünnungen der Organhomogenate auf Middlebrook 7H10 Agar plattiert wurden.

## 4. Ergebnisse

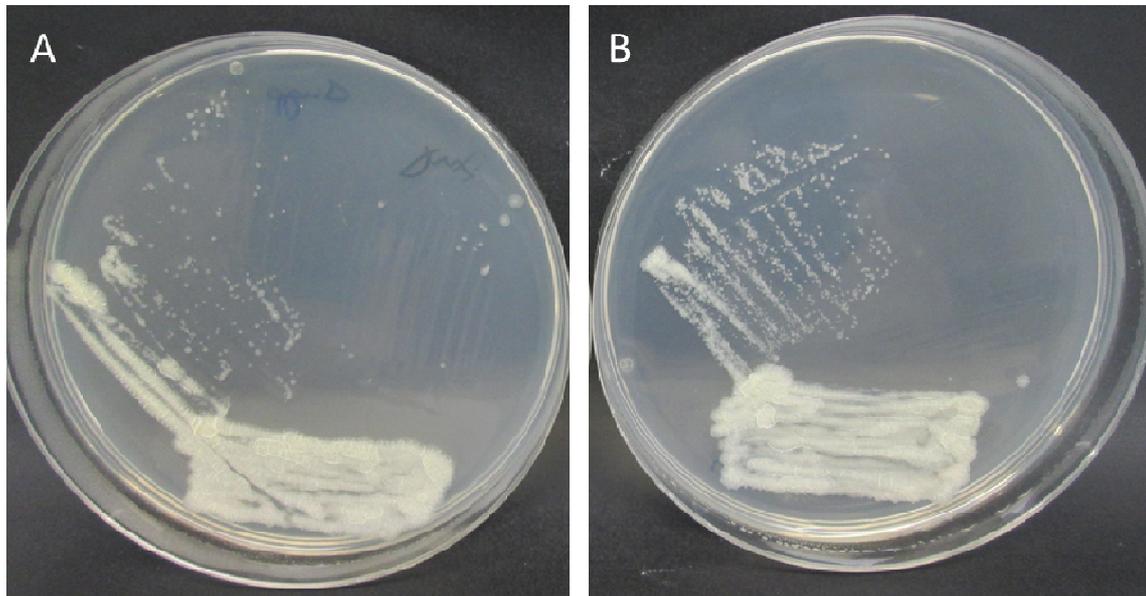
### 4.1 Kohlenhydratimporter: UgpAEBC

Der UgpAEBC-Importer (*uptake of glycerol phosphate*), kodiert von den Genen *ugpA*, *ugpE*, *ugpB* und *ugpC* (Rv2832c-Rv2835c), ist in *Mycobacterium tuberculosis* als funktionales Homolog zum UgpBAEC-Transporter in *Escherichia coli* annotiert worden (Braibant, Gilot et al. 2000). In beiden Organismen handelt es sich bei UgpB um das Substratbindeprotein, UgpA und UgpE bilden die Transmembrandomäne (TMD) während UgpC die ATP-Hydrolysedomäne darstellt. Die höchste Homologie zu *E. coli* hat mit 45% identischen Aminosäuren die ATP-Hydrolyse-Domäne UgpC. Die Substratbindedomäne UgpB weist nur eine Aminosäure-Sequenzidentität von 26% auf, die TMD UgpA 28% und UgpE 32%. In *E. coli* wird dieser Transporter nur unter Phosphatmangel aktiviert und bei Phosphatkonzentrationen von über 0,5 mM auf enzymatischer Ebene inhibiert (Brzoska, Rimmele et al. 1994). Glycerin-3-phosphat (G3P) kann in *E. coli* über diesen Importer aufgenommen werden und kann hier als alternative Phosphatquelle dienen, nicht jedoch als alleinige Kohlenstoffquelle verwertet werden (Brzoska, Rimmele et al. 1994). *E. coli* kann G3P nicht nur exogen aus dem Medium aufnehmen, es wird auch intrazellulär durch die Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat gebildet und steht dann für weitere Acylierungen für die Bildung von Triacylglyceriden und Phospholipiden zur Verfügung. Hypothese für diese Arbeit war zunächst, dass aufgrund der beschriebenen Homologien dieser Importer auch in *M. tuberculosis* die Aufnahme von G3P vermittelt.

Zur Generierung einer ortsspezifischen Gendeletionsmutante für die Gene *ugpAEBC* wurden zunächst DNA-Flanken mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotidprimerpaare *ugpA*-LL und *ugpA*-LR sowie *ugpC*-RL und *ugpC*-RR (siehe Tab. 1) amplifiziert und für die Herstellung von Allelaustauschsubstraten und hieraus resultierenden Mycobacteriophagen eingesetzt (siehe 3.14). Die nach der Transduktion auf Hygromycin-haltigem Selektionsmedium erhaltenen Klone wurden anschließend mittels Southern Blot Analysen (3.17) auf ihren korrekten Genotyp zur Verifizierung der ortsspezifischen Gendeletion überprüft (siehe Anhang, Abb. A).

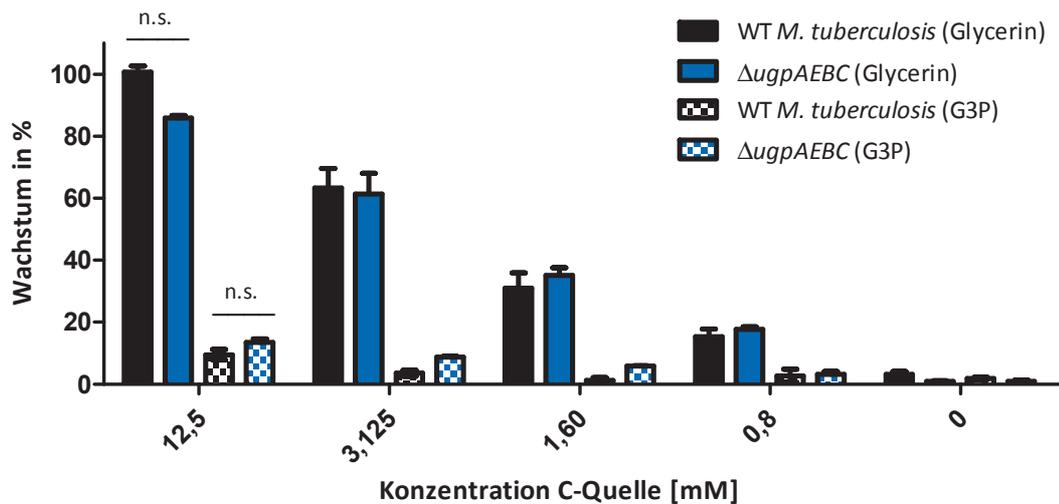
Um durch physiologische Untersuchungen einer Transporter-defizienten Mutante Hinweise auf die Funktion und Substratspezifität dieser Permease gewinnen zu können, wurde die Deletion der kodierenden Strukturgene des ABC-Transporters UgpAEBC in *M. tuberculosis* versucht. Obwohl das Gen für die ATP-Hydrolysedomäne *ugpC* als potentiell essentiell vorhergesagt worden ist (Griffin, Gawronski et al. 2011), war eine Deletion des ganzen Operons *ugpAEBC* in *M.*

*tuberculosis* möglich, ohne *in vitro* einen Wachstumsdefekt im Vergleich zum Wildtyp hervorzurufen (Abb. 11).



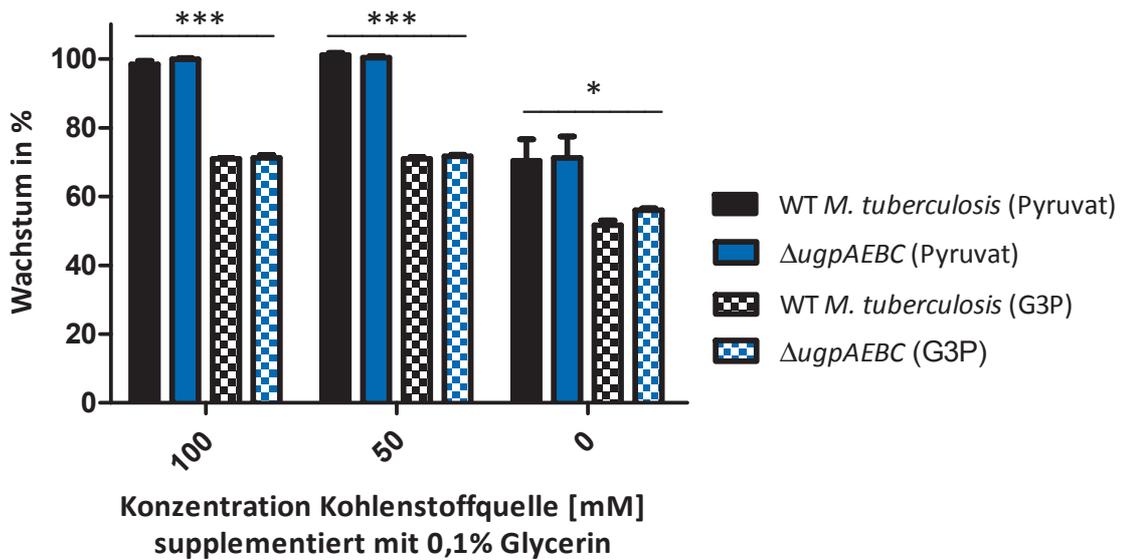
**Abb. 11: Wachstumsvergleich der  $\Delta$ ugpAEBC-Mutante (A) und des Wildtyps von *M. tuberculosis* (B).** Flüssigkulturen wurden bis zu einer  $OD_{600nm} \leq 1$  angezogen und dann je 10-15  $\mu$ l der Kultur für Ausstriche auf 7H10-Festmedium eingesetzt. Die fotografische Dokumentation erfolgte nach 14tägiger Inkubation der Agarplatten bei 37°C. Die Koloniegößen der Einzelkolonien unterscheiden sich nicht zwischen Wildtyp und Transporterdeletionsmutante.

Auf Basis der oben beschriebenen funktionellen Vorhersage wurde zunächst untersucht, ob G3P von *M. tuberculosis* als alleinige Kohlenstoffquelle verwertet werden kann. Dazu wurde ein phosphatgepuffertes Minimalmedium (3.4.3.1) verwendet, das zwar alle für Mycobakterien essentiellen Nährstoffe bietet, im Gegensatz zum weit verbreiteten Middlebrook 7H9 Medium (3.4.1.1) jedoch weitestgehend frei von verstoffwechselbaren Kohlenstoffquellen ist (Capyk, Kalscheuer et al. 2009). *M. tuberculosis* Wildtyp und die Deletionsmutante  $\Delta$ ugpAEBC wurden zunächst in 7H9-Medium angezogen und dicht gewachsene Kulturen zunächst 1%ig für eine Passage auf Minimalmedium mit 0,5% (v/v) Glycerin als Kohlenstoffquelle transferiert. Exponentiell wachsende Zellen dieser Kulturen wurden anschließend zur Inokulation einer zweiten Passage verwendet, um Glycerin und G3P auf ihre Eignung als Kohlenstoffquelle zu testen (vgl. Abb. 12).



**Abb. 12: Verwertung von Glycerin-3-phosphat als alleinige Kohlenstoffquelle durch *M. tuberculosis* Wildtyp und  $\Delta$ ugpA/EBC-Mutante im Vergleich zu Glycerin.** Das Wachstum erfolgte in Minimalmedium im 96-well-Mikrotiterplattenformat für 6 Tage. Die Bestimmung des Wachstums erfolgte durch einen Resazurin-Assay (2.21). Die prozentualen Berechnungen beziehen sich auf das Wachstum des Wildtyps mit 12,5 mM Glycerin als Kohlenstoffquelle (100%). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=3). Abkürzungen: C-Quelle, Kohlenstoffquelle; G3P, Glycerin-3-phosphat; n.s., nicht signifikant ( $p > 0,05$ ); WT, Wildtyp.

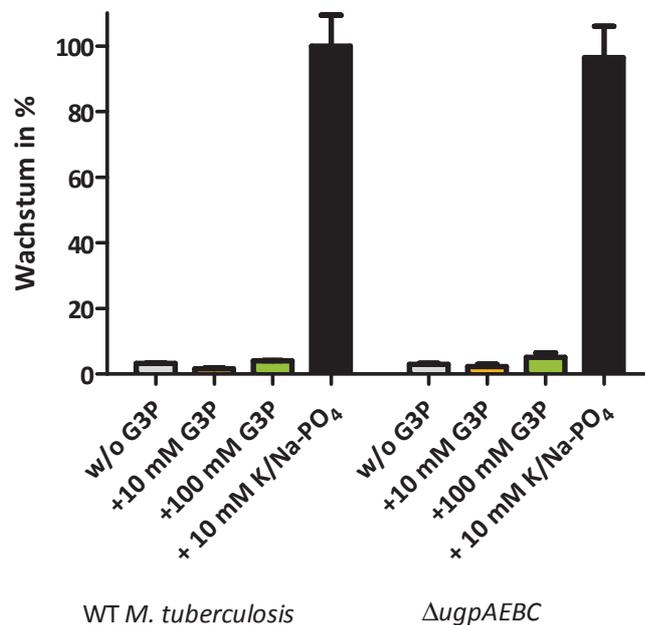
Im direkten Vergleich zwischen Glycerin und G3P zeigte sich, dass sowohl der Wildtyp als auch die  $\Delta$ ugpA/EBC Mutante G3P nur äußerst schwach als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen können, während gleiche Mengen Glycerin ein gutes Wachstum beider Stämme erlaubten. Ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante bezüglich der Verwertung von G3P war nicht zu erkennen (Abb. 12). Es wäre denkbar, dass G3P zwar durch die Bakterien aufgenommen wird, jedoch nicht vollständig metabolisiert werden kann. Dadurch könnte bei G3P als alleiniger Kohlenstoffquelle keine Biomasse gebildet werden und folglich kein Wachstum erfolgen. Bei Verwendung von G3P als Cosubstrat könnte jedoch durch zusätzliche Energiegewinnung aufgrund der partiellen Metabolisierung eventuell eine Verstärkung des Wachstums zu beobachten sein. Daher wurde der Wachstumstest erneut durchgeführt, jedoch mit einer 0,1%igen (v/v) Glycerinsupplementierung, die den Bakterien ein Basiswachstum erlauben sollte. Zusätzlich zur Glycerinsupplementierung wurden dann Pyruvat und G3P auf ihre Verwertbarkeit als Cosubstrate untersucht.



**Abb. 13: Test auf Verwertung von Glycerin-3-phosphat und Pyruvat als Cosubstrate in Kombination mit 0,1% (v/v) Glycerin.** Das Wachstum von *M. tuberculosis* Wildtyp und  $\Delta$ ugpAEBC Mutante erfolgte in Minimalmedium im 96-well-Mikrotiterplattenformat für 6 Tage. Die Bestimmung des Wachstums erfolgte durch einen Resazurin-Assay. Die prozentualen Berechnungen beziehen sich auf das Wachstum des Wildtyps mit 50 mM Pyruvat (100%). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=3). Abkürzungen: G3P, Glycerin-3-phosphat; WT, Wildtyp; \*\*\*p<0,0005; \* p <0,05.

Die Zugabe von G3P als Cosubstrat führte zu einer leichten Stimulation des Wachstums. Diese fiel im Vergleich zum Pyruvat jedoch deutlich geringer aus. In beiden Fällen führte die Inaktivierung des Transporters in der  $\Delta$ ugpAEBC Mutante zu keinem klaren Wachstumsunterschied im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 13).

Der UgpAEBC-Transporter ist in *E. coli* nur unter phosphatlimitierenden Bedingungen aktiv. Er vermittelt erst dann die Aufnahme von organischen Phosphatverbindungen wie G3P und G3P-Diester als alternative Phosphatquellen, wenn kein anorganisches Phosphat im Medium verfügbar ist (Brzoska, Rimmele et al. 1994). Daher wurde im folgenden G3P auf seine Eignung als Phosphatquelle in ansonsten phosphatfreiem Medium getestet. Dazu wurde zunächst ein phosphatfreies Medium entwickelt, das über TRIS anstelle von Phosphat auf pH 7,6 gepuffert ist (siehe 2.4.3.1). In diesem Medium wurde anschließend in *M. tuberculosis* die Verwertung von G3P als alleinige Phosphatquelle im Vergleich zu einer anorganischen Phosphatquelle als Positivkontrolle getestet (vgl. Abb. 14).

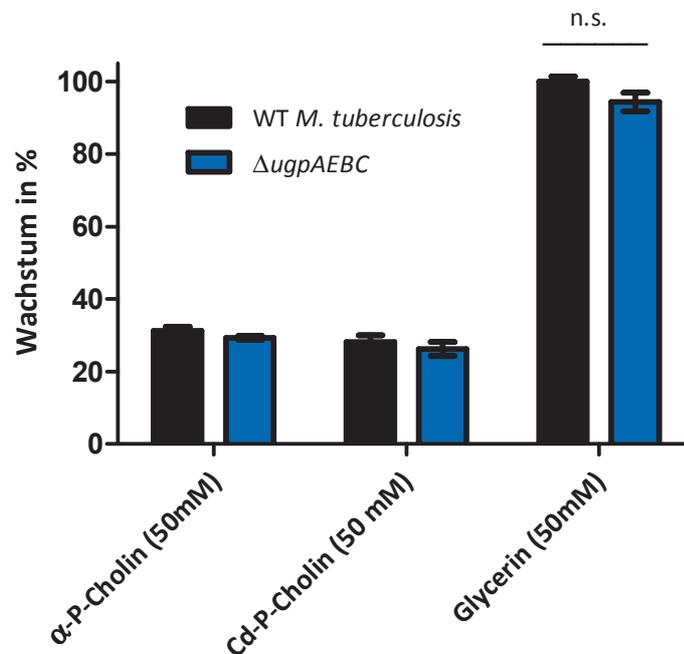


**Abb. 14: Verwertung von G3P als Phosphatquelle in *M. tuberculosis* Wildtyp und  $\Delta$ ugpAEBC-Mutante.** Das Wachstum erfolgte für 6 Tage in 10 ml phosphatfreiem TRIS-gepuffertem Flüssigmedium mit 0,5% (v/v) Glycerin als Kohlenstoffquelle. Die Bestimmung des Wachstums erfolgte durch Messung der OD<sub>600</sub>. Eine anorganische Phosphatquelle (K/Na-PO<sub>4</sub>) diente als Positivkontrolle. Die prozentualen Berechnungen beziehen sich auf das Wachstum des Wildtyps mit anorganischem Phosphat (100%). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (n=2). Abkürzungen: G3P, Glycerin-3-phosphat; K/Na-PO<sub>4</sub>, Kaliumdihydrogenphosphat-Natriumhydrogenphosphat (molares Mischungsverhältnis 1:2,5, pH=7).

Während die anorganische Phosphatquelle in einer pH-neutralen Mischung aus KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in einer Konzentration von 10 mM bereits ein gutes Wachstum erlaubte, zeigte sich für G3P in derselben Konzentration kein Wachstum. Auch eine Verzehnfachung der G3P-Konzentration auf 100 mM resultierte nicht in einem Wachstum über das Hintergrundwachstum hinaus (Abb. 14).

Da G3P offenbar durch *M. tuberculosis* weder als alleinige Kohlenstoffquelle oder Cosubstrat noch als Phosphatquelle verwertet werden kann, wurde das von (Jiang, Zhang et al. 2014) in molekularen *modellierung*-Studien im Vergleich zu G3P als höher affin zur Bindetasche des UgpB beschriebene Glycerophosphocholin auf seine Eignung als Kohlenstoff- und Phosphatquelle getestet. Zwei verschiedene Glycerophosphocholine wurden getestet: L- $\alpha$ -Glycerophosphocholin sowie das Cadmiumsalz dieser Verbindung. Wildtyp und  $\Delta$ ugpAEBC

Mutante wurden zunächst in Vorkultur in Minimalmedium mit 0,5% (v/v) Glycerin als Kohlenstoffquelle angezogen, während dann in einer zweiten Passage die Verwertung von 50 mM Glycerophosphocholin als alleinige Kohlenstoffquelle untersucht wurde (vgl. Abb. 15). Hierbei diente 50 mM Glycerin als Positivkontrolle.

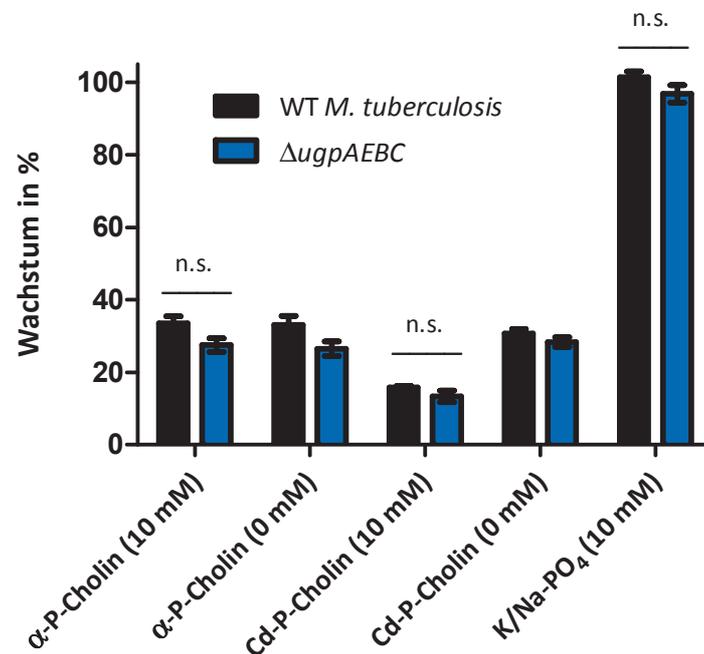


**Abb. 15: Wachstumsvergleich zwischen *M. tuberculosis* Wildtyp und  $\Delta$ ugpAEBC Mutante mit Glycerophosphocholin als alleinige Kohlenstoffquelle.** Das Wachstum erfolgte in Minimalmedium im 96-well-Mikrotiterplattenformat für 6 Tage. 50 mM Glycerin diente als Positivkontrolle. Die Bestimmung des Wachstums erfolgte durch einen Resazurin-Assay. Die prozentualen Berechnungen beziehen sich auf das Wachstum des Wildtyps mit 50 mM Glycerin als Kohlenstoffquelle (100%). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=6). Abkürzungen:  $\alpha$ -P-Cholin, alpha-Glycerophosphocholin; Cd-P-Cholin, Glycerophosphocholin-Cadmiumsals; n.s., nicht signifikant ( $p > 0,05$ ); WT, Wildtyp.

Beide getesteten Glycerophosphocholine resultierten als singuläre Kohlenstoffquelle in Minimalmedium im Vergleich zu Glycerin in gleicher Konzentration (50 mM) in keinem Wachstum über das Hintergrundwachstum hinaus (Abb. 15).

Daraufhin wurden beide Glycerophosphocholine auch auf ihre Eignung als Phosphatquelle untersucht. Der Wildtyp und die  $\Delta$ ugpAEBC Mutante wurden hier zunächst in phosphatfreiem Minimalmedium unter Zugabe von 2,5 mM Phosphat und 0,5% (v/v) Glycerin als Kohlenstoffquelle vorkultiviert und anschließend dem Wachstumstest unterzogen. Der Wachstumstest erfolgte in Gegenwart oder Abwesenheit von 10 mM Glycerophosphocholin in

völlig phosphatfreiem Medium. Als Positivkontrolle diente anorganisches Phosphat in einer Konzentration von 10 mM (vgl. Abb. 16).



**Abb. 16: Wachstumsvergleich zwischen *M. tuberculosis* Wildtyp und  $\Delta$ ugpAEBC Mutante mit Glycerophosphocholin als alleinige Phosphatquelle.** Das Wachstum erfolgte für 6 Tage im 96-well-Mikrotiterplattenformat in phosphatfreiem TRIS-gepufferten Flüssigmedium mit 0,5% (v/v) Glycerin als Kohlenstoffquelle. Eine anorganische Phosphatquelle (K/Na-PO<sub>4</sub>) diente als Positivkontrolle. Die Bestimmung des Wachstums erfolgte durch einen Resazurin-Assay. Die prozentualen Berechnungen beziehen sich auf das Wachstum des Wildtyps mit 10mM anorganischem Phosphat (100%). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=6). Abkürzungen:  $\alpha$ -P-Cholin, alpha-Glycerophosphocholin; Cd-P-Cholin, Glycerophosphocholin-Cadmiumsals; n.s., nicht signifikant ( $p > 0,05$ ); WT, Wildtyp.

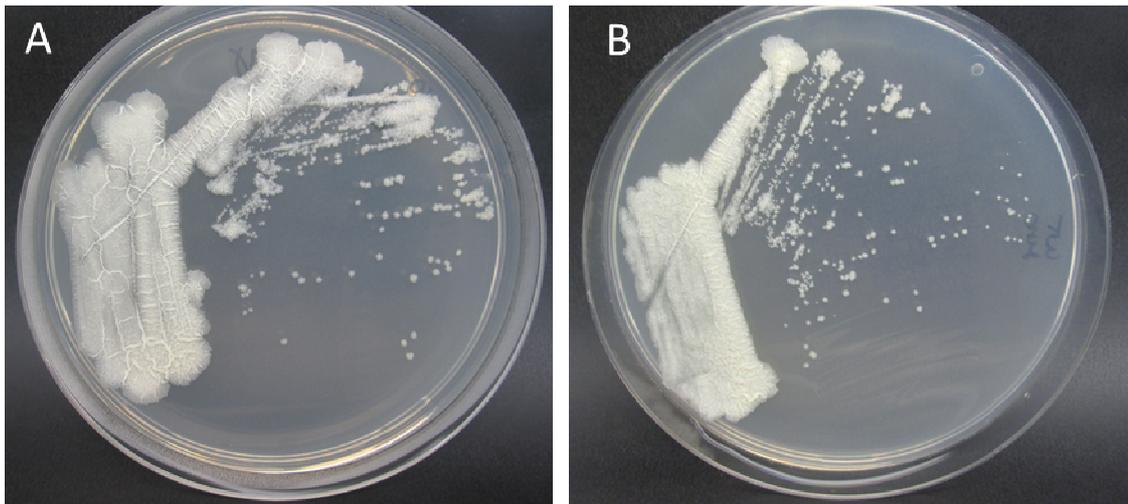
Die beiden getesteten Glycerophosphocholine führten als singuläre Phosphatquelle im Vergleich zu anorganischem Phosphat in gleicher Konzentration (10 mM) zu keinem Wachstum über das Hintergrundwachstum hinaus (Abb. 16). Glycerophosphocholin scheint daher für *M. tuberculosis* weder als Kohlenstoffquelle (Abb. 15) noch als Phosphatquelle (Abb. 16) verwertbar zu sein.

#### 4.2 Kohlenhydratimporter: Rv2041c-Rv2040c-Rv2039c-Rv2038c

Rv2041c ist das zuckerbindende Lipoprotein dieses ABC-Transporters, Rv2039c und Rv2040c bilden gemeinsam die TMD, Rv2038c dient der ATP-Hydrolyse. Es wurde vermutet, dass dieser Transporter am Import eines Kohlenhydrats wie Maltose/Maltodextrin, Laktose oder Cellobiose/Celotriose beteiligt sein könnte (Braibant, Gilot et al. 2000). Über die tatsächliche Substratspezifität des Importers Rv2041c-Rv2040c-Rv2039c-Rv2038c kann jedoch aufgrund mangelnder Homologien zu funktionell charakterisierten Zuckertransportern aus anderen Bakterien keine sichere Vorhersage getroffen werden.

Die ortsspezifische Gendelektionsmutante für die Gene Rv2041c-Rv2040c-Rv2039c-Rv2038c wurde generiert, indem zunächst DNA-Flanken mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotidprimerpaare Rv2041c-LL und Rv2041c-LR sowie Rv2038c-RL und Rv2038c-RR (siehe Tab. 1) amplifiziert und für die Herstellung von Allelaustauschsubstraten und hieraus resultierenden Mycobacteriophagen eingesetzt (siehe 3.14) wurden. Nach der Transduktion auf Hygromycin-haltigem Selektionsmedium wurden Klone ausgewählt, ihre DNA isoliert (3.16) und anschließend mittels Southern Blot Analysen (3.17) auf ihren korrekten Genotyp zur Verifizierung der ortsspezifischen Gendelektion überprüft (siehe Anhang, Abb. B).

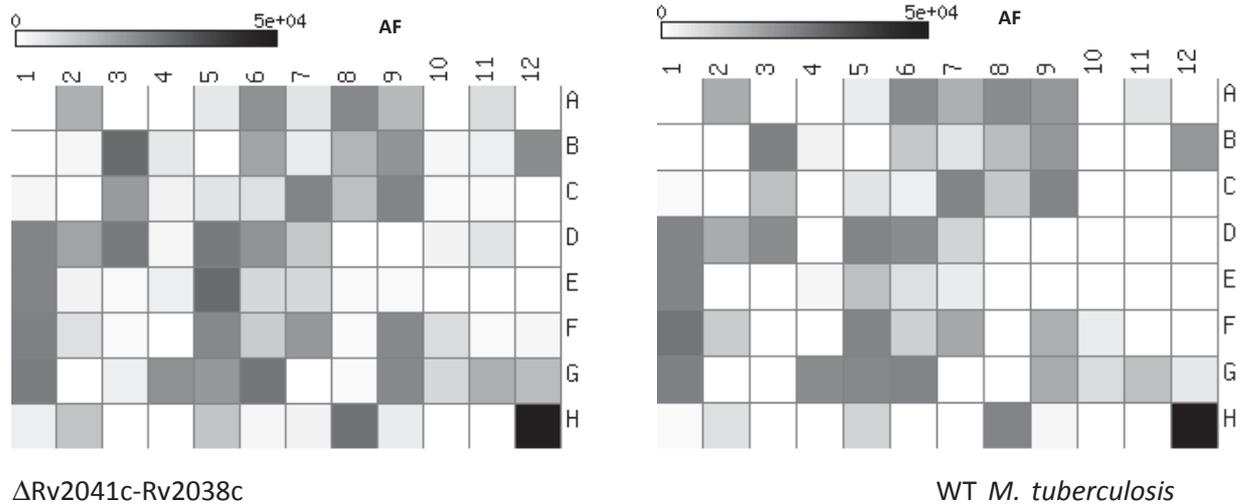
Die in *M. tuberculosis* als nicht-essentiell vorhergesagten Gene des Importers Rv2041c-Rv2038c (Griffin, Gawronski et al. 2011) konnten vollständig deletiert werden, so dass in der entsprechenden  $\Delta$ Rv2041c-Rv2038c-Mutante alle Komponenten des Transporters fehlen. Dieser Verlust führte *in vitro* zu keinem Wachstumsdefekt unter Standardkultivierungsbedingungen (Abb. 17).



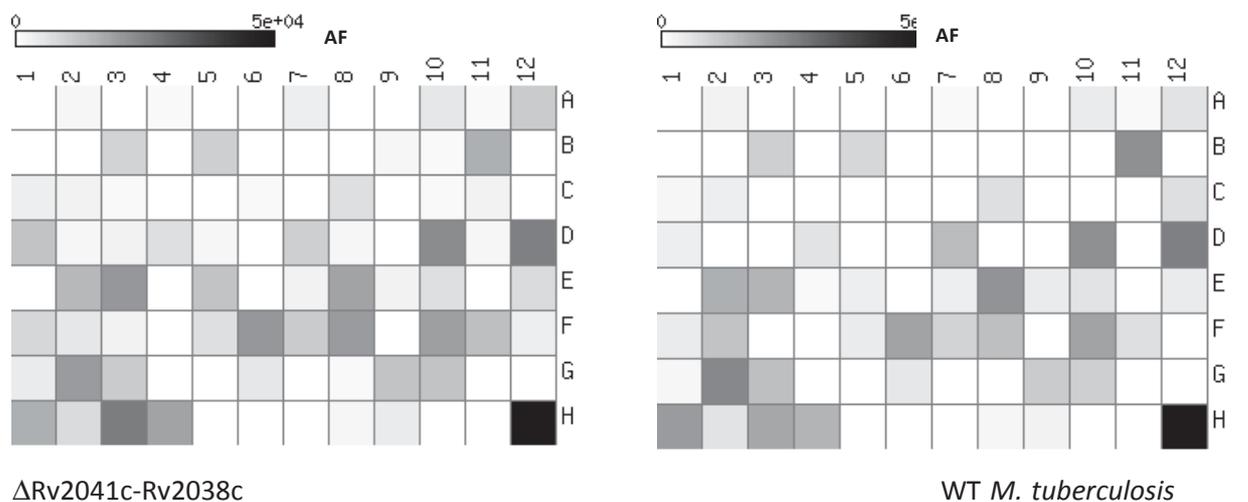
**Abb. 17: Wachstumsvergleich der  $\Delta$ Rv2041c-2038c-Mutante(A) und des Wildtyps von *M. tuberculosis* (B).** Flüssigkulturen wurden bis zu einer  $OD_{600nm} \leq 1$  angezogen und dann je 10-15  $\mu$ l der Kultur für Ausstriche auf Middlebrook 7H10-Festmedium eingesetzt. Die fotografische Dokumentation erfolgte nach 14tägiger Inkubation der Agarplatten bei 37°C. Die Größen der Einzelkolonien unterscheiden sich nicht zwischen Wildtyp und Transporterdeletionsmutante.

Um eventuell Hinweise auf das importierte Substrat des ABC-Transporters Rv2041c-Rv2038c zu erlangen, wurden komparative phänotypische Biolog-Microarrays (3.20) durchgeführt. *M. tuberculosis* Wildtyp und Deletionsmutante  $\Delta$ Rv2041c-Rv2038c wurden in Minimalmedium mit 0,5% (v/v) Glycerin als Kohlenstoffquelle vorkultiviert, gewaschen und in Minimalmedium ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle (3.4.3.1) zu den in 96-well-Mikrotiterplatten vorgelegten Kohlenstoffverbindungen gegeben. Die vorgelegten Substanzen konnten so auf ihre Eignung als Kohlenstoffquelle überprüft werden. Die Arraydaten sind nach 6-tägiger Inkubation mithilfe eines Resazurinassays (3.21) ausgelesen worden und in Abb. 18 (Biolog PM1 Array), Abb. 19 (Biolog PM2A Array) und Abb. 20 (Biolog PM4A Array) als *Heatmaps* dargestellt.

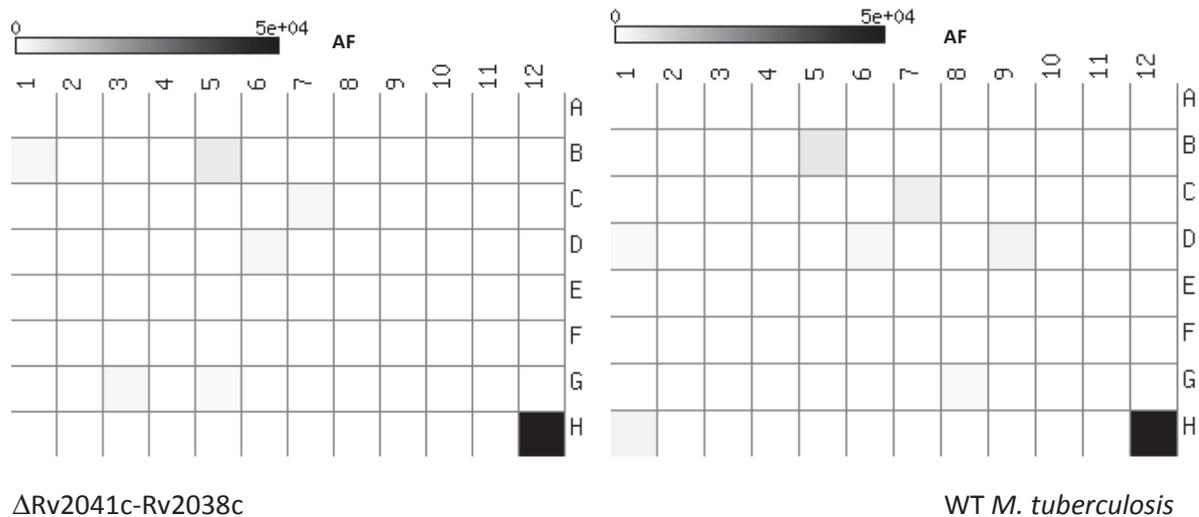
Wie durch die *Heatmap*-Darstellung schnell ersichtlich wurde, waren nur wenige der Substanzen als Kohlenstoffquellen für den Wildtyp *M. tuberculosis* überhaupt geeignet und zeigten sich als mittelgraue bis dunkelgraue Felder in Abb. 18, 19 und 20. Der weit überwiegende Teil der Substanzen führte im Test zu keinem messbaren Wachstum im als *Readout* dienenden Resazurinassay (3.21). Zwischen dem Wildtyp und der Transporterdeletionsmutante  $\Delta$ Rv2041c-Rv2038c zeigten sich hierbei keine reproduzierbaren signifikanten Unterschiede in der Metabolisierung der insgesamt 285 getesteten Substrate.



**Abb. 18:** Phänotypischer Microarray mit Biolog PM1 Platten zum Test auf Verwertung der vorgelegten Kohlenstoffquellen durch die Transporterdeletionsmutante  $\Delta$ Rv2041c-Rv2038c (links) und den Wildtyp von *M. tuberculosis* H37Rv (rechts). Bei A1 handelt es sich um die vom Hersteller vorgesehene Negativkontrolle (weiß). Aufgrund des Fehlens einer internen Positivkontrolle auf dem Array wurde zur Vereinheitlichung der Skalierung das *well* H12 mit 50.000 Fluoreszenzeinheiten arbiträr als Positivkontrolle (schwarz) gesetzt (100% Wachstum). Die Graustufen zeigen das im Resazurinassay gemessene Wachstum nach 6 Tagen Inkubation an. Abkürzungen: AF, arbiträre Fluoreszenzeinheiten; WT: Wildtyp. Die Zusammensetzung des Platte PM1 des Biolog-Arrays kann dem Anhang, Abb. C entnommen werden.



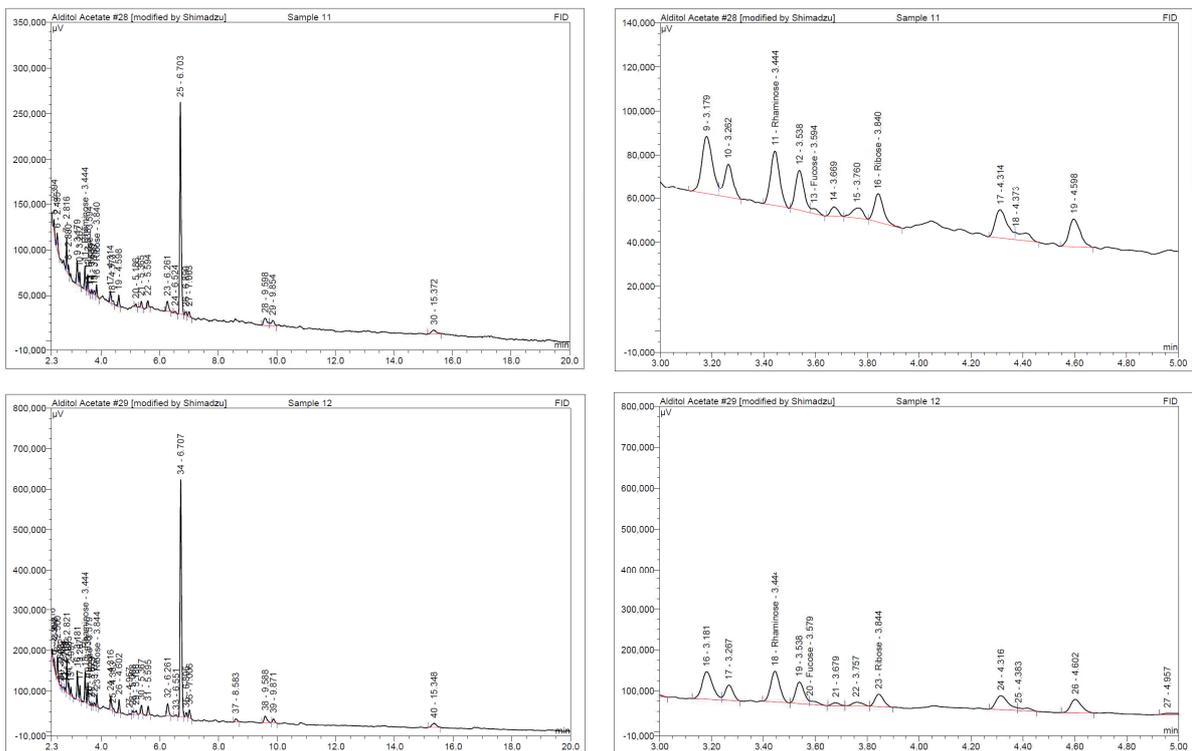
**Abb. 19:** Phänotypischer Microarray mit Biolog PM2A Platten zum Test auf Verwertung der vorgelegten Kohlenstoffquellen durch die Transporterdeletionsmutante  $\Delta$ Rv2041c-Rv2038c (links) und den Wildtyp von *M. tuberculosis* H37Rv (rechts). Bei A1 handelt es sich um die vom Hersteller vorgesehene Negativkontrolle (weiß). Aufgrund des Fehlens einer internen Positivkontrolle auf dem Array wurde zur Vereinheitlichung der Skalierung das *well* H12 mit 50.000 Fluoreszenzeinheiten arbiträr als Positivkontrolle (schwarz) gesetzt (100% Wachstum). Die Graustufen zeigen das im Resazurinassay gemessene Wachstum nach 6 Tagen Inkubation an. Abkürzungen: AF, arbiträre Fluoreszenzeinheiten; WT: Wildtyp. Die Zusammensetzung des Platte PM2A des Biolog-Arrays kann dem Anhang, Abb. D entnommen werden.



**Abb. 20: Phänotypischer Microarray mit Biolog PM4A Platten zum Test auf Verwertung der vorgelegten Kohlenstoffquellen durch die Transporterdeletionsmutante  $\Delta$ Rv2041c-Rv2038c (links) und den Wildtyp von *M. tuberculosis* H37Rv (rechts).** Bei A1 handelt es sich um die vom Hersteller vorgesehene Negativkontrolle (weiß). Aufgrund des Fehlens einer internen Positivkontrolle auf dem Array wurde zur Vereinheitlichung der Skalierung das *well* H12 mit 50.000 Fluoreszenzeinheiten arbiträr als Positivkontrolle (schwarz) gesetzt (100% Wachstum). Die Graustufungen zeigen das im Resazurinassay gemessene Wachstum nach 6 Tagen Inkubation an. Abkürzungen: AF, arbiträre Fluoreszenzeinheiten; WT: Wildtyp. Die Zusammensetzung des Platte PM4A des Biolog-Arrays kann dem Anhang, Abb. E entnommen werden.

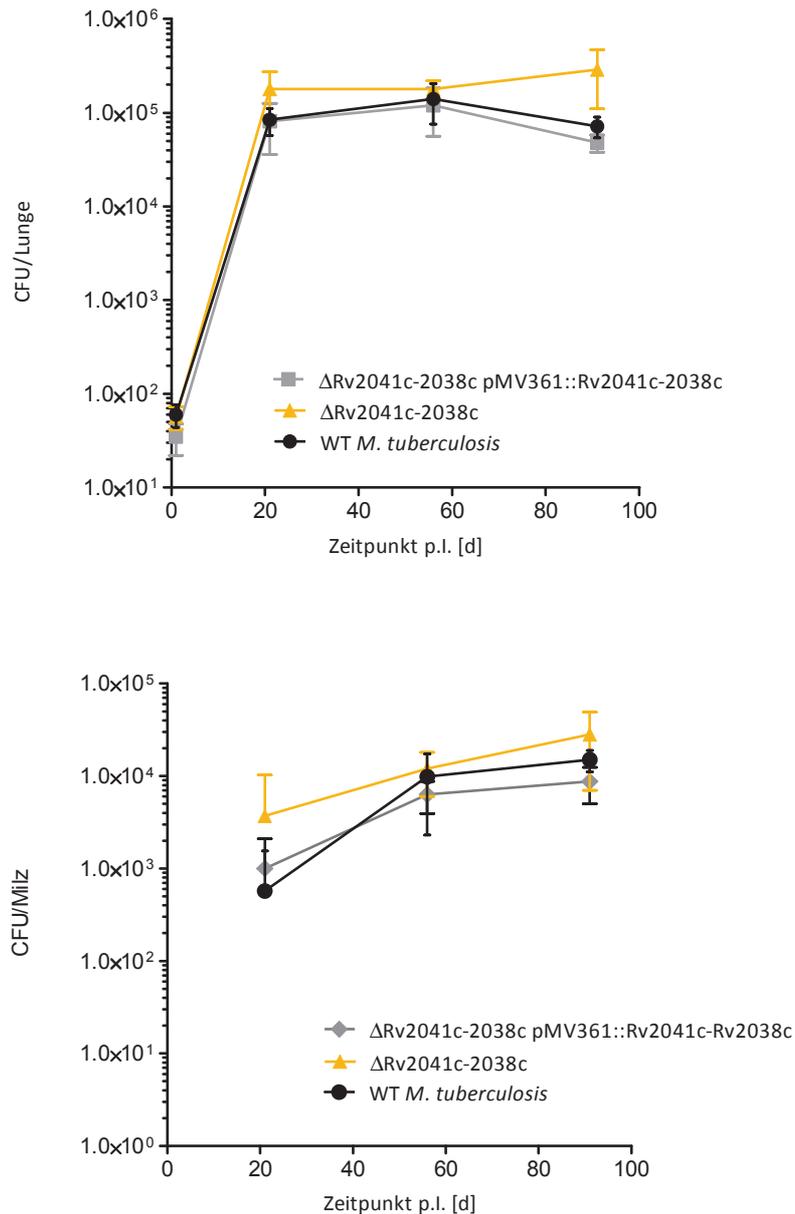
Es ist vorstellbar, dass der Importer nicht dem Import eines Wirtszuckers, sondern vielmehr dem Recycling eines bakteriellen Zuckers dient. Als Beispiel dient der beschriebene Transporter LpqY-SugABC (vgl. auch 2.5.1) für die Rückgewinnung von Trehalose. Eine Inaktivierung dieses ABC-Transporters und die damit verbundene Blockierung der Recyclingfunktion führt zur Sekretion substantieller Mengen an Trehalose (Kalscheuer, Weinrick et al. 2010). Daher wurden im nächsten Schritt gaschromatographische Analysen der doppelt sterilfiltrierten Kulturüberstände durchgeführt, um eine eventuelle Recycling-Funktion des Transporters durch eine Akkumulation einer Substanz im Überstand der  $\Delta$ Rv2041c-Rv2038c Mutante im Vergleich zum *M. tuberculosis* Wildtyp auszumachen (vgl. Abb. 21).

Die gaschromatographischen Analysen der Überstände zeigten jedoch keine deutlichen Unterschiede zwischen Wildtyp und Transporterdeletionsmutante und lieferten somit keinen Hinweis auf eine eventuelle differentielle Akkumulation eines mit den verwendeten Methoden nachweisbaren Metaboliten (Abb. 21).



**Abb.21: GC-Analyse des zellfreien Kulturüberstands von *M. tuberculosis* Wildtyp und der  $\Delta$ Rv2041c-Rv2038c-Mutante.** Die oberen Abbildungen (A und C) zeigen den Wildtyp von *M. tuberculosis* H37Rv, die unteren Abbildungen (B und D) die Transporterdeletionsmutante  $\Delta$ Rv2041c-Rv2038c. Gezeigt ist das Elutionsprofil von 2,3-20 Minuten (links, A und B) und ein Zoom von 3-5 Minuten (rechts, C und D). Die Zellen wurden für 10 Tage in Middlebrook 7H9 Medium kultiviert, durch Zentrifugation geerntet und die Überstände durch doppelte Sterilfiltration zellfrei gemacht. GC-Analysen wurden gemäß 3.30 durchgeführt.

Um die Bedeutung des Transporters in der Virulenz während der Mausinfektion zu untersuchen, wurde die  $\Delta$ Rv2041c-Rv2038c Mutante zunächst mit einer zusätzlichen Genkopie des Operons Rv2041c-Rv2038c genetisch komplementiert. Dazu wurde ein integratives Plasmid mit dem Operon unter Kontrolle des konstitutiven HSP60 Promoters generiert (siehe 2.14.2.6). Anschließend wurden Mutante und komplementierte Mutante zur Aerosolinfektion von C57BL/6 Mäusen verwendet. Als Kontrolle diente der Wildtyp des virulenten *M. tuberculosis* Stamms H37Rv.



**Abb. 22: Niedrig-Dosis-Aerosolinfektion in C57BL/6 Mäusen mit Wildtyp *M. tuberculosis* H37Rv, der Transporterdeletionsmutante  $\Delta$ Rv2041c-Rv2038c sowie der komplementierten Transporterdeletionsmutante  $\Delta$ Rv2041c-Rv2038c pMV361::Rv2041c-Rv2038c.** Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mit *M. tuberculosis* (●), der Transporterdeletionsmutante  $\Delta$ Rv2041c-Rv2038c (▲) sowie der komplementierten Transporterdeletionsmutante  $\Delta$ Rv2041c-Rv2038c pMV361::Rv2041c-Rv2038c (■) erfolgte eine Bestimmung der Bakterienlast in der Lunge (oben) und der Milz (unten). Die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (CFU) erfolgte durch Ausplattieren seriell verdünnter Organhomogenate auf Festmedium nach drei Wochen Inkubation. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung (n=3). Die Mausinfektion erfolgte wie unter 3.31 beschrieben.

Die Infektion zeigte einen für *M. tuberculosis* in der Mausinfektion typischen Verlauf. Während der ersten drei Wochen findet eine exponentielle Replikation der Bakterien in der Lunge statt,

auf die ein Plateau der Bakterienlast in der chronischen Infektionsphase sowie die typische Disseminierung in die Milz folgt. Im Verlauf der Infektion von C57BL/6 Mäusen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Bakterienlast der Lunge bzw. Milz zwischen Wildtyp und Transporterdeletionsmutante. Aufgrund des Fehlens einer erkennbaren Attenuierung scheint der Transporter daher keine Rolle für die Virulenz von *M. tuberculosis* im untersuchten Mausinfektionsmodell zu spielen.

### 4.3 Zellwandsynthese-involvierte Exporter: Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c

Mutmaßlich bilden die drei Gene Rv1458c-Rv1457c-Rv1456c ein Operon, in dem Rv1458c als Homomer die membranspannenden Domänen (MSD) des Transporters bildet und Rv1457c gemeinsam mit Rv1456c die nukleotidbindenden Domänen (NBD). Das hier als MSD identifizierte Protein, das von Rv1458c kodiert wird, hat jedoch keine Ähnlichkeit zu MSDs in bisher identifizierten Transportern. Der Transporter wurde zunächst der Gruppe der Antibiotika-Effluxpumpen zugeordnet (Braibant, Gilot et al. 2000).

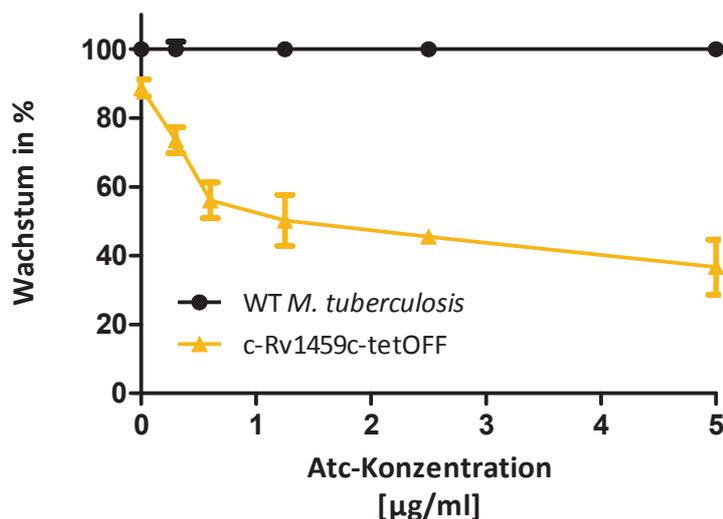
Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass in klinischen Isolaten von *M. tuberculosis*, die gegen mindestens eins der Antibiotika Rifampicin, Isoniazid, Streptomycin oder Ethambutol resistent sind, Rv1456c, Rv1457c und Rv1458c auf mRNA-Ebene hochreguliert sind und MDR- und XDR-Stämme von *M. tuberculosis* häufig eine Überexpression dieses Operons zeigen (Hao, Shi-Liang et al. 2011).

Der Vermutung steht entgegen, dass alle Gene des Genclusters Rv1459c-Rv1456c mit Ausnahme der MSD-Komponente Rv1458c als essentiell vorhergesagt wurden (Griffin, Gawronski et al. 2011). Diese Vorhersage lässt vermuten, dass Antibiotikaefflux nicht die primäre Funktion darstellt, sondern dass der Transporter stattdessen in den Export endogener, essentieller Moleküle involviert ist. Das Gen Rv1459c wird vermutlich nicht als Operon koordiniert mit Rv1458c-Rv1456c coexprimiert (Mishra, Alderwick et al. 2008). Es bildet mit den Transportergenen jedoch ein Gencluster, welches in allen bekannten Mycobakteriengenomen konserviert ist, was auf eine mögliche funktionale Verknüpfung der Genprodukte in einem gemeinsamen Stoffwechselprozess hinweisen könnte. Wie in 2.5.2.1 beschrieben, konnte für das Homolog zu Rv1459c in *Corynebacterium glutamicum*, NCgl1505, eine  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)Mannopyranosyl-Transferase-Aktivität mit Beteiligung an der Synthese von Lipomannan (LM) und Lipoarabinomannan (LAM) gezeigt werden (Mishra, Alderwick et al. 2008).

Zur Analyse der Funktion des putativen Transporters wurden zunächst konditionale Mutanten aller Gene des Clusters hergestellt (vgl. 3.14). Die konditionalen Mutanten tragen anstelle des nativen Promotors einen synthetischen Promotor mit 4facher-Tet-Operator-kassette. Durch Transformation mit einem Plasmid, auf dem ein Tet-Repressor bzw. ein reverser Tet-Repressor kodiert ist, wird die Genexpression abhängig von Anhydrotetracyclin (Atc) gesteuert. Im tetON-System findet die volle Genexpression unter Zugabe von Atc statt, während der Repressor unter geringeren Atc-Konzentrationen mit zunehmender Affinität an die Tet-Operatoren bindet. Im

umgekehrten System, dem tetOFF-System, ist die volle Genexpression in Abwesenheit von Atc zu beobachten. Unter Zugabe von Atc bindet der Repressor mit zunehmender Affinität an die Tet-Operatoren. In beiden Systemen wird durch die Bindung des Repressors die Transkription des Zielgens reprimiert.

Obwohl das Gencluster Rv1456c-Rv1457-Rv1458-Rv1459c bis auf Rv1458c als essentiell vorhergesagt wurde (Griffin, Gawronski et al. 2011), konnte in konditionalen Mutanten für die Gene Rv1456c, Rv1457c und Rv1458c keine reproduzierbare Regulierbarkeit des Wachstums in Abhängigkeit von Atc beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Nur für die stromaufwärts der eigentlichen ABC-Transporterkomponenten liegende Mannosyltransferase Rv1459c konnten konditionale Mutanten in *M. tuberculosis* erzeugt werden, in denen das Silencing des Gens einen apparenten Wachstumsdefekt hervorrief (vgl. Abb. 23).



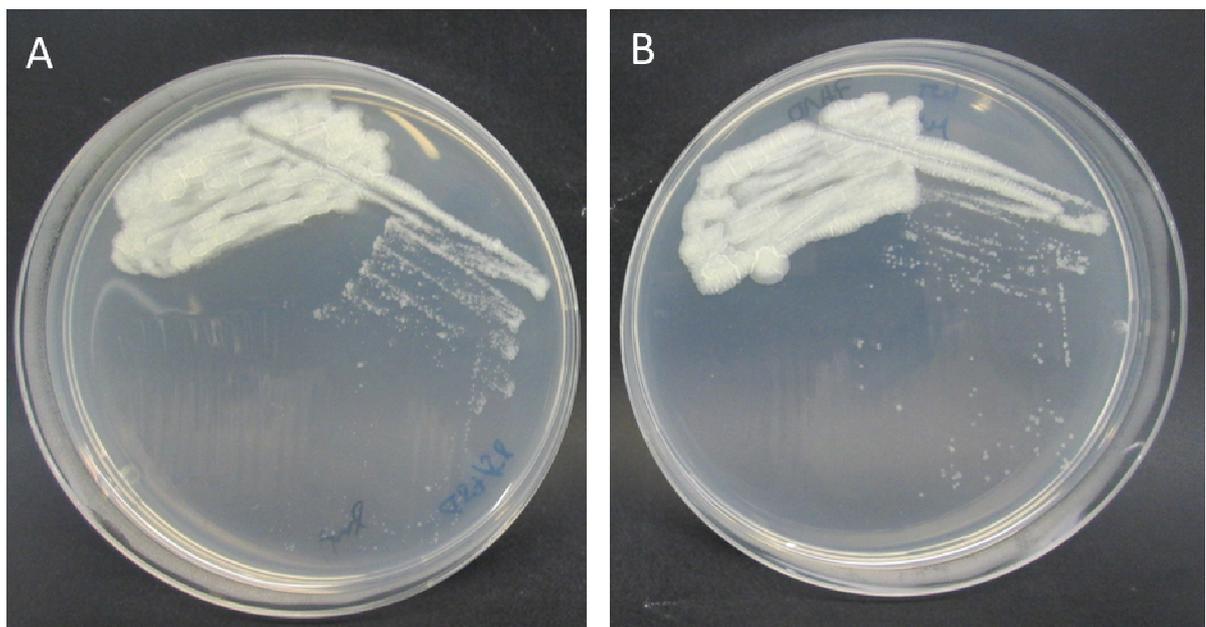
**Abb. 23: Messung des Atc-abhängigen Wachstums der *M. tuberculosis* c-Rv1459c-tetOFF-Mutante.** Das Gen der Mannosyltransferase Rv1459c bildet mit den Genen des putativen Transporters Rv1458c-Rv1456c ein in Mycobakterien konserviertes Gencluster. Das Wachstum von *M. tuberculosis* Wildtyp (●) und der c-Rv1459c-tetOFF-Mutante (▲) erfolgte in Middlebrook 7H9 Flüssigmedium mit unterschiedlichen Atc Konzentrationen im 96-well-Mikrotiterplattenformat. Die Bestimmung des Wachstums erfolgte nach 6 Tagen Inkubation durch einen Resazurin-Assay. Die prozentualen Berechnungen beziehen sich auf das Wachstum des Wildtyps bei 1 µg/ml Atc (100 %). Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichung (n=3).

Die konditionale c-Rv1459c-tetOFF-Mutante zeigte eine deutliche Atc-abhängige Wachstumsinhibierung. Ab einer Konzentration von etwa 1,25 µg/ml Atc im Flüssigmedium reduzierte sich ihr Wachstum im Vergleich zum Wildtyp auf etwa 50%. Durch eine Zugabe

höherer Atc-Konzentrationen ließ sich das Wachstum noch etwas weiter bis auf rund 35% des Wildtypwachstums reduzieren (Abb. 23).

Da für die beiden Transporterkomponenten Rv1457c und Rv1458c keine konditionalen Mutanten mit apparentem Wachstumsdefekt erzeugt werden konnten, wurde eine vollständige Deletion dieser beiden Komponenten des ABC-Exporters in *M. tuberculosis* versucht und erfolgreich durchgeführt.

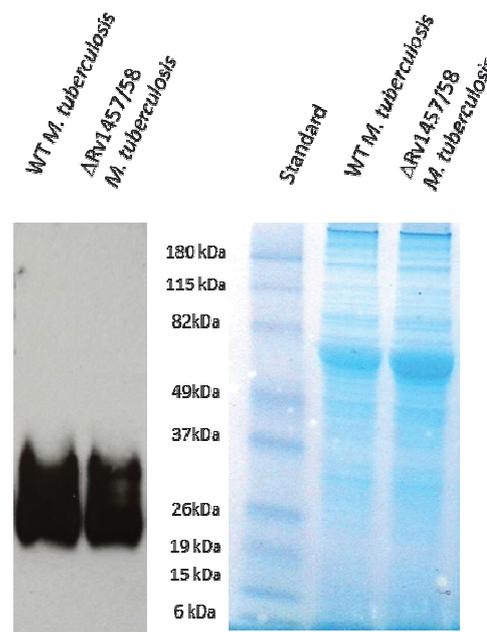
Zur Generierung dieser ortsspezifischen Gendeletionsmutante für die Gene Rv1457c-Rv1458c wurden zunächst DNA Flanken mittels PCR (3.8) unter Verwendung der Oligonukleotidprimerpaare Rv1458c-LL und Rv1458c-LR sowie Rv1457c-RL und Rv1457c-RR (siehe Tab. 1) amplifiziert und für die Herstellung von Allelaustauschsubstraten und hieraus resultierenden Mycobacteriophagen eingesetzt (siehe 3.14). Die nach der Transduktion auf Hygromycin-haltigem Selektionsmedium erhaltenen Klone wurden anschließend mittels Southern Blot Analysen (3.17) auf ihren korrekten Genotyp zur Verifizierung der ortsspezifischen Gendeletion überprüft (siehe Anhang, Abb. F).



**Abb. 24: Wachstumsvergleich von  $\Delta$ Rv1457-Rv1458c-Mutante (links) und Wildtyp *M. tuberculosis* (rechts).** Flüssigkulturen wurden bis zu einer  $OD_{600} \leq 1$  angezogen und dann je 10-15  $\mu$ l der Kultur für Ausstriche auf Middlebrook 7H10-Festmedium eingesetzt. Die fotografische Dokumentation erfolgte nach 14tägiger Inkubation der Agarplatten bei 37°C. Die Größen der Einzelkolonien unterscheiden sich nicht zwischen Wildtyp und Deletionsmutante.

Die  $\Delta$ Rv1457-Rv1458c-Mutante zeigte keine Beeinträchtigungen im Wachstum auf 7H10-Festmedium im Vergleich zum Wildtyp *M. tuberculosis* (vgl. Abb. 24). Dies beweist, dass der Transporter entgegen der Vorhersage (Griffin, Gawronski et al. 2011) tatsächlich keine essentielle Bedeutung für das Wachstum von *M. tuberculosis* unter Standardkultivierungsbedingungen hat.

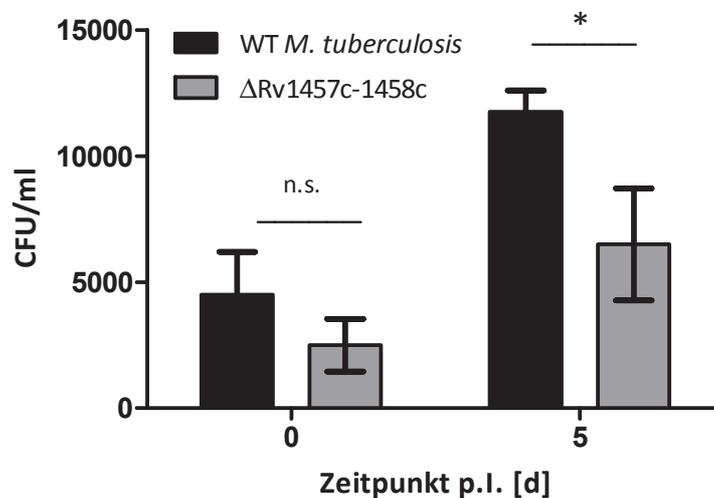
Die dieser Arbeit zugrundeliegende Hypothese war, dass dieser Transporter ein mannosyliertes Zellwandprodukt wie PIM<sub>4</sub> exportiert. Da PIM<sub>4</sub> den Grundbaustein für die Moleküle LM und LAM bildet, sollte eine Blockade des Transports die Bildung der biosynthetisch *downstream* liegende Produkte LM und LAM beeinträchtigen (vgl. Einleitung 2.5.2.1 und Abb. 2). Daher wurde der relative Gehalt an LAM der  $\Delta$ Rv1457c-Rv1458c-Mutante im Vergleich zum Wildtyp mittels Immunoblot untersucht. Dazu wurden Zelllysate der Gendelektionsmutante  $\Delta$ Rv1457c-Rv1458c und des Wildtyps hergestellt, in einem SDS-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und einem Antikörpernachweis für LAM unterzogen. Das Ergebnis dieses Nachweises ist in Abb. 25 dargestellt.



**Abb. 25: Immunoblot von Wildtyp *M. tuberculosis* und  $\Delta$ Rv1457c-Rv1458c-Mutante gegen LAM und Coomassie-gefärbtes SDS-Gel als Ladekontrolle (rechts).** Die Deletionsmutante  $\Delta$ Rv1457c-Rv1458c und der Wildtyp von *M. tuberculosis* wurden bis zu einer  $OD_{600nm} \leq 1$  angezogen und zur Herstellung von Zelllysaten eingesetzt. Je 10  $\mu$ g Protein wurden für das SDS-Gel eingesetzt und nach Transfer auf eine PVDF Membran einem Immunoblot unter Verwendung eines LAM-spezifischen monoklonalen Antikörpers gemäß 3.25 unterzogen.

Der Immunoblot gegen LAM zeigte keine Veränderung in der Signalstärke zwischen Wildtyp und Gendeletionsmutante. Dieser Befund indiziert, dass der untersuchte Transporter keine essentielle Funktion in der Biosynthese von LAM besitzt oder ein redundanter Exporter im Bakterium vorhanden ist, der die Deletion von Rv1457c-Rv1458c vollständig kompensieren kann (Abb. 25).

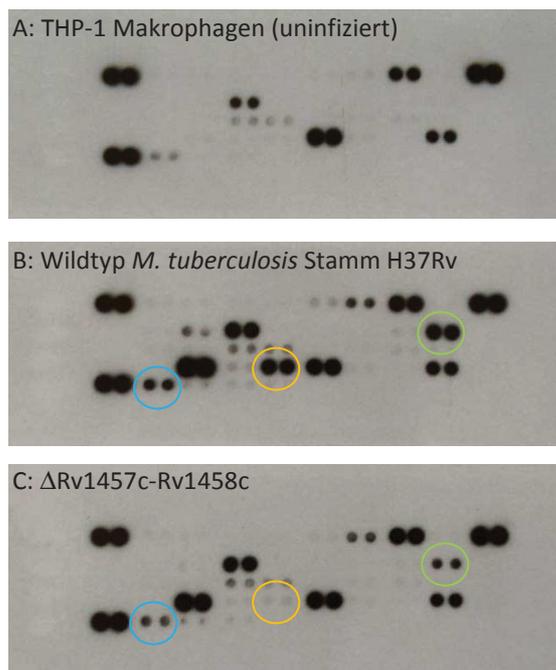
Sollte der Transporter zwar nicht am Export von LAM sondern stattdessen am Export anderer Zellwandbestandteile beteiligt sein, wäre es vorstellbar, dass die Mutante in ihrer Virulenz beeinträchtigt ist. Um die Virulenz der Deletionsmutante  $\Delta$ Rv1457c-Rv1458c zu überprüfen, wurde deshalb eine Infektion von THP-1-Zellen durchgeführt. Wildtyp und Deletionsmutante wurden während des exponentiellen Wachstums in Flüssigkultur geerntet, gewaschen, zur Herstellung von Einzelzellsuspension zur Bestimmung der benötigten Zellzahl ultraschallbehandelt und dann in einer MOI=3 für die Infektion eingesetzt. Die Ergebnisse der Bestimmung der CFU an Tag 0 und Tag 5 nach Infektion sind in Abb. 26 dargestellt.



**Abb. 26: Infektion von THP-1-Zellen mit Wildtyp und  $\Delta$ Rv1457c-1458c-Mutante.** Die Bestimmung der CFU/ml in Zelllysaten infizierter Makrophagen erfolgte an Tag 0 und Tag 5 nach Infektion. Werte repräsentieren Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung von PMA-stimulierten THP-1 Zellen (50 nM, 24h, vgl. 2.22) mit Wildtyp *M. tuberculosis* und Deletionsmutante  $\Delta$ Rv1457c-Rv1458c (MOI=3). Abkürzungen: PMA, Phorbol-12-myristat-13-acetat, WT, Wildtyp, n.s., nicht signifikant ( $p > 0,05$ ); \*  $p < 0,05$ .

Wie die Bestimmung der CFU zeigte, konnte nach Infektion von THP-1 Zellen für den *M. tuberculosis* Wildtyp eine intrazelluläre Replikation beobachtet werden. Ein geringer, aber dennoch signifikanter Unterschied in den CFU war an Tag 5 zu sehen. Hier zeigte die  $\Delta$ Rv1457c-Rv1458c Mutante gegenüber dem Wildtyp eine abgeschwächte Virulenz (Abb. 26).

Auf Basis dieser Daten wurden die doppelt sterilfiltrierten Überstände der mit Wildtyp und  $\Delta$ Rv1457c-Rv1458 Deletionsmutante infizierten THP-1-Zellen von Tag 5 nach Infektion zur Zytokinanalyse verwendet (vgl. Abb. 27). Als Kontrolle dienten uninfizierte Makrophagen.



**Abb. 27: Semiquantitative Analyse der Zytokine im Überstand infizierter THP-1 Zellen.** An Tag 5 nach Infektion wurden die Überstände der uninfizierten (A) bzw. mit Wildtyp *M. tuberculosis* (B) oder  $\Delta$ Rv1457c-Rv1458c Mutante (C) infizierten THP-1-Zellen einem Zytokinarray unterzogen (vgl. 2.24). Der Überstand wurde mit biotinylierten Antikörpern versetzt. Die kognaten Antikörper lagen membranimmobilisiert in Duplikaten vor. Der chemilumineszente Nachweis erlaubte eine semiquantitative Analyse. Markante Unterschiede in der Signalstärke zwischen Wildtyp und Mutante sind farblich markiert.

Im Vergleich der Cytokinprofile zeigte sich für die  $\Delta$ Rv1457c-Rv1458c Mutante eine starke Reduktion von MCP-1/CCL-2 (D9/10) und IL-8 (B17/18) sowie eine etwas schwächere Reduktion von RANTES (E2/3) im Vergleich zum mit dem *M. tuberculosis* Wildtyp infizierten Makrophagen. Die Kontrollsignale A1/2, A19/20 sowie E1/2 waren gleich intensiv (Abb. 27). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der untersuchte Transporter eine Rolle für die Virulenz von *M. tuberculosis* im untersuchten Makrophageninfektionsmodell zu spielen scheint. Ein Einfluss der LAM-Biosynthese an dieser Veränderung des Zytokinprofils kann ausgeschlossen werden.

#### 4.4 Zellwandsynthese-involvierte Exporter: Rv3781-Rv3783 und Msmeg\_6366-Msmeg\_6369

Die zu Beginn des in allen Mycobakterien konservierten Arabinogalactan (AG)-Biosynthese-Genclusters liegenden Gene des Transporters Rv3781-Rv3783 kodieren für zwei Komponenten, die NBD Rv3781 und die TMD Rv3783, zwischen denen das Gen für die Galactosyltransferase Rv3782 (GlfT1) positioniert ist (Dianiskova, Kordulakova et al. 2011).

Während beide Gene des Exporters, Rv3781 und Rv3783, in *M. tuberculosis* als essentiell gelten (Sasseti, Boyd et al. 2003, Griffin, Gawronski et al. 2011), ist das für die Homologe in *M. smegmatis* wie weiter unten geschildert nur teilweise der Fall. Dass die MSD Rv3783 wahrscheinlich nicht am Export von Glucanen, LAM oder LM beteiligt ist, wurde durch eine Gendeletions-Mutante des Homologs Msmeg\_6369 nachgewiesen, in der die Anteile der genannten Komponenten unverändert blieben. Geht man von einer homologen Funktion von Rv3783 aus, kann daher vermutet werden, dass dieser Transporter wahrscheinlich nicht am Export von Glucanen, LM oder LAM beteiligt ist (Pitarque, Larrouy-Maumus et al. 2008).

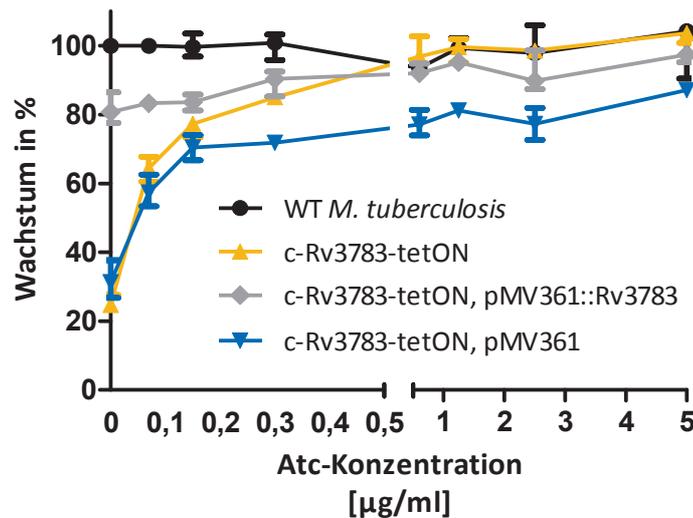
Durch die Positionierung der Gene der beiden Transporterkomponenten Rv3781 und Rv3783 zu Beginn eines AG-Biosynthese-Genclusters (vgl. auch 2.5.2.2) ist es denkbar, dass der Transporter in den Export von AG involviert ist. Diese Hypothese wird dadurch untermauert, dass zwischen den Genen der beiden Bestandteile des putativen ABC-Transporters eine Galactosyltransferase (Rv3782, GlfT1) kodiert liegt. Diese Transferase fügt die erste oder die ersten beiden Galactofuranosyl-Einheiten an das Intermediat Dec-P-P-GlcNAc-Rha an (Dianiskova, Kordulakova et al. 2011). Dieses Intermediat wird zunächst durch das Anfügen weiterer Galactosereste zum lipidgebundenen Galactan elongiert und anschließend durch Arabinosylierungen zum AG erweitert (siehe Abb. 3) (Mikusova, Belanova et al. 2006). Studien der Homologe in *M. smegmatis* konnten diese These noch weiter konsolidieren. Während Msmeg\_6366 (Homolog zu Rv3781) sich als essentiell erwies, war eine Deletion des nicht essentiellen Gens Msmeg\_6369 (Homolog zu Rv3783) ohne Wachstumsdefekt möglich. Jedoch wurde eine leichte Akkumulation von Galactan in der Gendeletions-Mutante beobachtet, was eine Beteiligung des Transporters am Export der Galactankette des AG umso wahrscheinlicher erscheinen lässt (Dianiskova, Kordulakova et al. 2011).

Für die Generierung von ortsspezifischen konditionalen Mutanten für die Gene Rv3781, Rv3782 und Rv3783 wurden zunächst DNA Flanken mittels PCR unter Verwendung der

Oligonukleotidprimerpaare c-Rv3781-LL und c-Rv3781-LR sowie c-Rv3781-RL und c-Rv3781-RR; c-glft1-LL und glft1-LR sowie glft1-RL glft1-RR; c-Rv3783-LL und c-Rv3783-LR sowie c-Rv3783-RL und c-Rv3783-RR (siehe Tab. 1) amplifiziert und für die Herstellung von Allelaustauschsubstraten und hieraus resultierenden Mycobacteriophagen eingesetzt (siehe 3.14). Die nach der Transduktion auf Hygromycin-haltigem Selektionsmedium erhaltenen Klone wurden anschließend mittels Southern Blot Analysen (3.17) auf ihren korrekten Genotyp zur Verifizierung der ortsspezifischen Genaustausch überprüft (siehe Anhang, Abb. G, H und I).

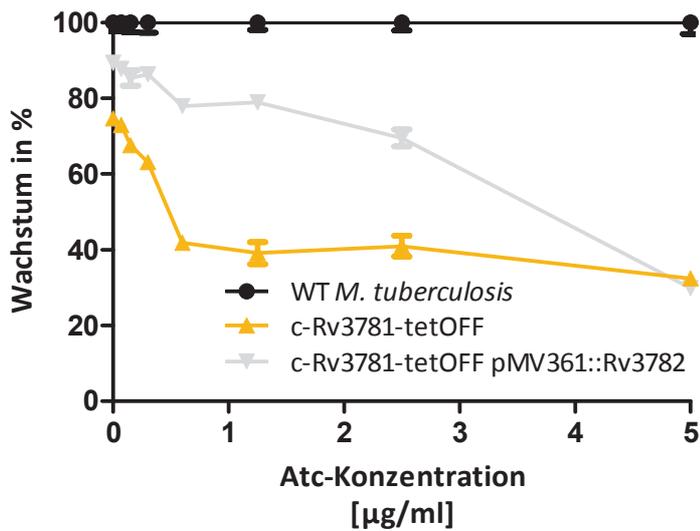
Für eine funktionelle Analyse des Transporters wurden konditionale *M. tuberculosis* Mutanten für die beiden wahrscheinlich essentiellen Gene Rv3781 und Rv3783 sowie der Galactosyltransferase GlfT1 (Rv3782) hergestellt. Die in dieser Arbeit generierten konditionalen Mutanten tragen anstelle des nativen Promotors einen synthetischen Promotor mit einer 4fachen-Tet-Operator-kassette, an die in Abhängigkeit von Anhydrotetracyclin (Atc) ein plasmidkodierter Tet-Repressor reversibel binden kann. Im tetON-system bindet der Tet-Repressors (TetR) in Abwesenheit von Atc und blockiert so die Transkription des nachfolgenden Gens. Erst durch Zugabe von Atc verliert TetR seine Bindungsfähigkeit und erlaubt die Transkription des Gens (vgl. Abb. 8). Umgekehrt bindet der reverse Tet-Repressor (revTetR) in Anwesenheit von Atc im Medium und blockiert dadurch die Transkription. Wird das Atc aus dem Medium entfernt, verliert der revTetR seine Bindungsfähigkeit zu den Operatoren und das Gen wird transkribiert (vgl. Abb. 9).

Es ist gelungen, konditionale Mutanten sowohl für beide Transporter-komponenten als auch für die Galactosyltransferase GlfT1 zu erzeugen, die stabil Atc-abhängiges Wachstum im tetON bzw. tetOFF-System aufwiesen (vgl. nachfolgende Abb. 28, 29 und 30).



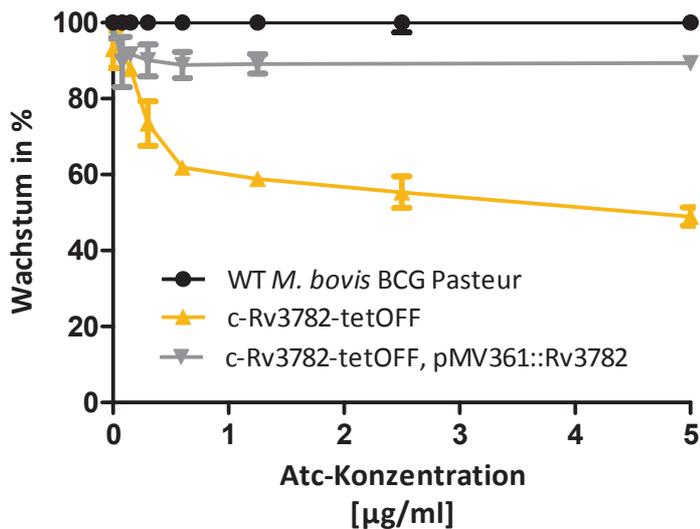
**Abb. 28: Messung des Atc-abhängigen Wachstums der konditionalen *M. tuberculosis* c-Rv3783-tetON-Mutante.** Die konditionale c-Rv3783-tetON-Mutante ( $\blacktriangle$ ) wurde zusammen mit dem *M. tuberculosis* Wildtyp( $\bullet$ ), der komplementierten Mutante c-Rv3783-tetON pMV361::Rv3783 ( $\blacklozenge$ ) sowie der Leervektor-tragenden Mutante c-Rv3783-tetON pMV361 ( $\blacktriangledown$ ) in Middlebrook 7H9 Flüssigmedium im 96-well-Mikrotiterplattenformat kultiviert. Die Bestimmung des Wachstums erfolgte nach 6 Tagen Inkubation durch einen Resazurin-Assay. Die prozentualen Berechnungen beziehen sich auf das Wachstum des Wildtyps *M. tuberculosis* bei 0  $\mu\text{g/ml}$  Atc (100%). Die Werte repräsentieren Mittelwerte ( $n=3$ ) und Standardabweichungen.

Für die TMD Rv3783 wurde eine tetON-Mutante in *M. tuberculosis* generiert, deren Wachstum Atc-abhängig war und sich ohne Zugabe von Atc auf etwa 25% im Vergleich zum Wildtyp reduzierte. Mithilfe des Plasmids pMV361::Rv3783 wurde eine komplementierte Mutante erzeugt, die neben dem regulierten Wildtyp-Allel eine zweite, konstitutiv exprimierte Genkopie von Rv3783 enthält (vgl. Abb. 10). In dieser komplementierten Mutante war der Wachstumsdefekt in Abwesenheit von Atc weitestgehend aufgehoben und verlief bei ungefähr 80% des Wildtypwachstums. Die Mutante, die anstelle des komplementierenden Plasmids den Leervektor pMV361 trägt, verhielt sich hingegen wie die konditionale Mutante c-Rv3783-tetON und offenbarte in Abwesenheit von Atc eine starke Wachstumsinhibition (vgl. Abb. 28).



**Abb. 29: Messung des Atc-abhängigen Wachstums der konditionalen *M. tuberculosis* c-Rv3781-tetOFF-Mutante.** Die konditionale c-Rv3781-tetOFF-Mutante ( $\blacktriangle$ ) wurde zusammen mit dem *M. tuberculosis* Wildtyp ( $\bullet$ ) sowie der mit dem stromabwärts gelegenen Gen Rv3782 komplementierten Mutante c-Rv3781-tetOFF pMV361::Rv3782 ( $\blacktriangledown$ ) in Middlebrook 7H9 Flüssigmedium im 96-well-Mikrotiterplattenformat kultiviert. Die Bestimmung des Wachstums erfolgte nach 6 Tagen Inkubation durch einen Resazurin-Assay. Die prozentualen Berechnungen beziehen sich auf das Wachstum des Wildtyps *M. tuberculosis* bei 0 µg/ml Atc (100%). Die Werte repräsentieren Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen.

Für die NBD Rv3781 wurde eine tetOFF-Mutante in *M. tuberculosis* erzeugt, deren Wachstum sich durch Zugabe von  $\leq 1$  µg/ml Atc auf etwa 40% des Wildtypwachstums reduzierte. Um eventuelle polare Effekte des Silencings des ersten Gens Rv3781 im Operon Rv3781-Rv3782-Rv3783 auf das nicht zum Transporter gehörende Gen Rv3782 zu erkennen, wurde die konditionale Mutante c-Rv3781-tetOFF mit dem stromabwärts gelegenen Gen Rv3782 komplementiert (vgl. Abb. 11). Die so komplementierte konditionale Mutante c-Rv3781-tetOFF pMV361::Rv3782 exprimiert die Galactosyltransferase Glt1 konstitutiv. Im Wachstumsverlauf zeigte diese Mutante bei zunehmender Atc-Konzentration einen weniger stark ausgeprägten Wachstumsdefekt im Vergleich zur nicht komplementierten konditionalen Mutante. Erst durch Zugabe von 5 µg/ml Atc wurde eine Reduktion auf 40% des Wildtypwachstums (Abb. 29) beobachtet.



**Abb. 30: Messung des Atc-abhängigen Wachstums der konditionalen *M. bovis* BCG *c-Rv3782-tetOFF*-Mutante.** Die konditionale *c-Rv3782-tetOFF*-Mutante (▲) wurde zusammen mit dem *M. bovis* BCG Wildtyp (●) sowie der komplementierten Mutante *c-Rv3782-tetOFF pMV361::Rv3782* (◆) in Middlebrook 7H9 Flüssigmedium im 96-well-Mikrotiterplattenformat kultiviert. Die Bestimmung des Wachstums erfolgte nach 6 Tagen Inkubation durch einen Resazurin-Assay. Die prozentualen Berechnungen beziehen sich auf das Wachstum des Wildtyps *M. bovis* BCG bei 0 µg/ml Atc (100%). Die Werte repräsentieren Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen.

Für die Galactosyltransferase Rv3782 wurde eine *tetOFF*-Mutante in *M. bovis* BCG Pasteur erfolgreich erzeugt. Das Wachstum der *c-Rv3782-tetOFF*-Mutante reduzierte sich durch Zugabe von  $\leq 1$  µg/ml Atc auf etwa 60% im Vergleich zum Wildtyp. Die komplementierte Mutante, die neben dem regulierten Wildtyp-Allel eine zweite, konstitutiv exprimierte Genkopie von Rv3782 plasmidkodiert trägt, wies hingegen selbst bei hohen Atc-Konzentrationen praktisch keine Wachstumsreduktion auf und erreichte ungefähr 90% des Wildtypwachstums (vgl. Abb. 30).

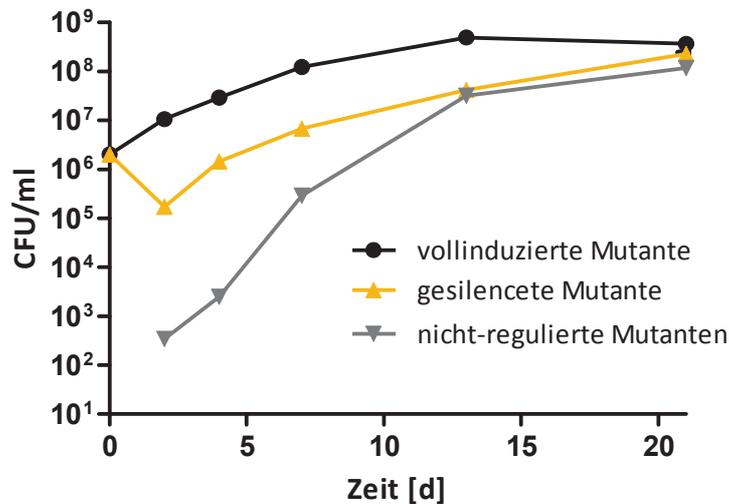
Alle drei Gene des Clusters Rv3781-Rv3782-Rv3783 können also als essentiell für das normale *in vitro*-Wachstum beurteilt werden. Jede der einzelnen konditionalen Mutanten zeigte einen apparenten Wachstumsdefekt, der klar dosisabhängig von der Zugabe bzw. Abnahme des Atc im Medium ist. Auch wenn ein zum Teil recht hohes Hintergrundwachstum zu beobachten war, ist die Essentialität der Gene *in vitro* damit belegt. Bei nicht-essentiellen Genen wäre kein dosisabhängiger Wachstumsdefekt zu beobachten.

Die Komplementation der konditionalen Mutanten für die Gene Rv3782 und Rv3783 mit einer jeweiligen plasmidkodierten konstitutiv exprimierten Genkopie zeigte eine vollständige Aufhebung des Atc-abhängigen Wachstumsdefekts, sodass die beobachteten phänotypischen Effekte sicher auf Repression der Transkription der Zielgene zurückgeführt werden können. Im

Fälle der konditionalen *M. tuberculosis* c-Rv3781-tetOFF-Mutante scheint das Silencing des Zielgens hingegen auch einen polaren Effekt auf das stromabwärts gelegene Gene Rv3782 zu verursachen, sodass die beobachteten phänotypischen Silencingeffekte partiell auf der Transkriptionshemmung von Rv3782 beruhen.

Um die Auswirkung der Reprimierung des Zielgens in der c-Rv3783-tetON-Mutante genauer zu untersuchen, wurde eine Abtötungskinetik in Flüssigkultur über einen Zeitraum von 21 Tagen durchgeführt. Für diese Abtötungskinetik wurde die c-Rv3783-tetON-Mutante durch eine Kultivierung für sechs Tage unter geringer Zugabe von Atc (0,125 µg/ml) in Flüssigmedium zunächst partiell gesilencet, um einer eventuellen Akkumulation von Atc und Genprodukt vorzubeugen. Die Kulturen wurden dann unter vollinduzierenden (1 µg/ml Atc) und vollständigen Silencing-Bedingungen (ohne Atc) weiter kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und auf Festmedium mit 1 µg/ml Atc und ohne Atc ausplattiert, um zum einen den bakteriziden Effekt des Silencings beurteilen zu können und zum anderen die Rate der spontan nicht mehr regulierten Mutanten zu bestimmen.

Das Silencen des Gens Rv3783 in der tetON-Mutante führte zunächst zu einer leichten Reduktion der Lebendzellzahl zu Beginn der Abtötungskinetik an Tag 2. Ab diesem Zeitpunkt nahm die Zellzahl der gesilenceten Kultur wieder zu, was mit einem Auswachsen von nicht-regulierten Mutanten, die trotz fehlender Zugabe von Atc wuchsen, korrelierte. Ab Tag 13 überwucherten die nicht-regulierten Mutanten die gesilencete Kultur vollständig (Abb. 31). Durch phänotypische Charakterisierung von partiell gesilenceten Zellen der konditionalen Mutanten in langsamwachsenden Mycobakterien sollten anschließend Hinweise auf Funktion und Substratspezifität des Transporters erzielt werden. Dazu wurden Lipidextraktionen und anschließende dünnschichtchromatographische Analysen unternommen (Daten nicht gezeigt), deren zuverlässige Interpretation durch den Mangel an geeigneten Standards für das hypothetische Substrat AG erschwert wurde und keine reproduzierbaren Ergebnisse zeigten.

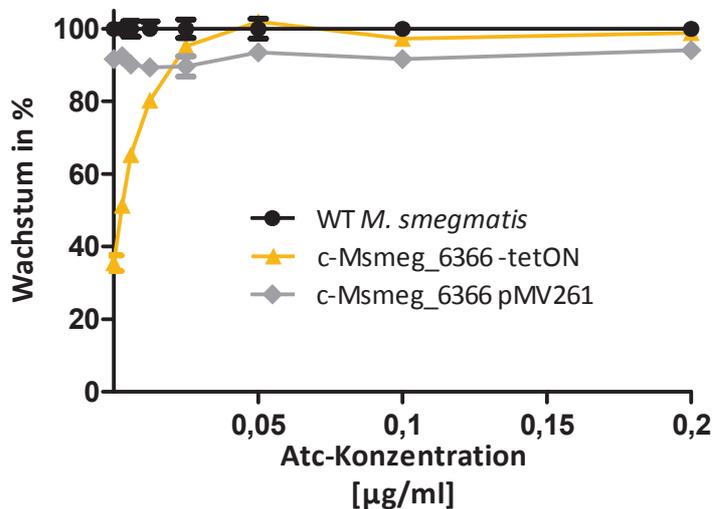


**Abb. 31: Abtötungskinetik der konditionalen *M. tuberculosis* Mutante c-Rv3783-tetON unter gesilenceten und vollinduzierenden Bedingungen.** Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden serielle Verdünnungen von Kulturaliquots auf Atc-haltigem Festmedium (1 µg/ml) zur Bestimmung der Lebendzellzahl (CFU) ausplattiert. Gleichzeitig erfolgte eine Bestimmung der Anzahl der spontan nicht-regulierten Mutanten in den gesilenceten Zellen (▼) durch CFU-Bestimmung auf Atc-freiem Festmedium. Die Vollinduktion erfolgte bei 1 µg/ml Atc (●), das Silencing ohne Zugabe von Atc (▲).

Um weniger zeitintensive phänotypische Analysen durchführen zu können, wurden zusätzlich zu den konditionalen Mutanten in *M. tuberculosis* und *M. bovis* BCG nun konditionale Mutanten für das zu Rv3781 homologe Gen Msmeg\_6366 in *M. smegmatis* hergestellt. Auch diese Mutante trägt anstelle des nativen Promotors einen synthetischen Promotor mit 4facher-Tet-Operator-kassette, an der in Abhängigkeit von Atc ein plasmidkodierter Tet-Repressor binden kann. Die c-Msmeg\_6366-tetON-Mutante wuchs ab einer Zugabe von 0,05 µg/ml Atc im Medium auf Wildtyp-Level. Ohne Atc reduzierte sich das Wachstum der Mutante auf etwa 30% des Wildtyp-Wachstums. Eine Mutante, die anstelle des Tet-Repressor-Plasmids den Leervektor pMV261 trägt, wuchs unabhängig von Atc auf Wildtyp-Level (vgl. Abb. 32).

Für die Generierung von ortsspezifischen konditionalen Mutanten für das Gen Msmeg\_6366 wurden zunächst DNA Flanken mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotidprimerpaare c-Msmeg\_6366-LL und c-Msmeg\_6366-LR sowie c-Msmeg\_6366-RL und c-Msmeg\_6366-RR (siehe Tab. 1) amplifiziert und für die Herstellung von Allelaustauschsubstraten und hieraus resultierenden Mycobacteriophagen eingesetzt (siehe 3.14). Die nach der Transduktion auf Hygromycin-haltigem Selektionsmedium erhaltenen Klone wurden anschließend mittels

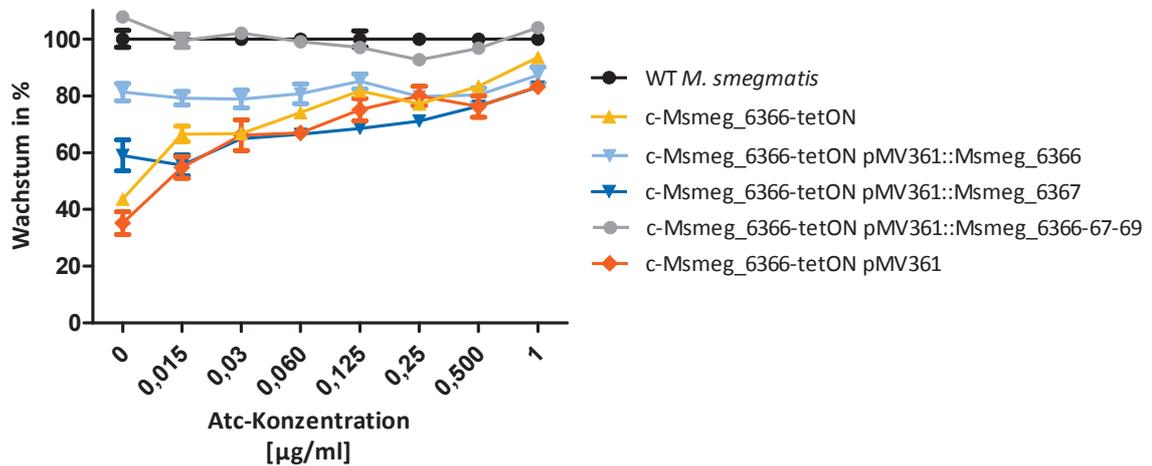
Southern Blot Analysen (3.17) auf ihren korrekten Genotyp zur Verifizierung des ortsspezifischen Genaustauschs überprüft.



**Abb. 32: Messung des Atc-abhängigen Wachstums der konditionalen *M. smegmatis* c-Msmeg\_6366-tetON-Mutante.** Die konditionale c-Msmeg\_6366-Mutante ( $\blacktriangle$ ) wurde zusammen mit dem *M. smegmatis* Wildtyp ( $\bullet$ ) sowie der den Leervektor tragenden *knock-in* Mutante c-Msmeg\_6366 pMV261 ( $\blacklozenge$ ) in Middlebrook 7H9 Flüssigmedium im 96-well-Mikrotiterplattenformat kultiviert. Die Bestimmung des Wachstums erfolgte nach 2 Tagen Inkubation durch einen Resazurin-Assay. Die prozentualen Berechnungen beziehen sich auf das Wachstum des Wildtyps *M. tuberculosis* bei 0 µg/ml Atc (100%). Die Werte repräsentieren Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen.

Im nächsten Schritt wurden genetische Komplementationen durchgeführt. Durch die genetische Komplementation sollte die Reversibilität des Phänotyps getestet und damit sicher auf die Genregulation von Msmeg\_6366 zurückgeführt werden. Dazu wurde die Mutante c-Msmeg\_6366-tetON mit dem Plasmid pMV361::Msmeg\_6366 versehen. Diese komplementierte tetON-Mutante verfügt neben dem regulierten Wildtypallel über eine zweite Kopie des Gens Msmeg\_6366, welches ausgehend von einem integrativen Plasmid konstitutiv exprimiert wird. Dieser Stamm zeigte eine weitestgehende, jedoch nicht vollständige Aufhebung des regulatorischen Effekts und wies in Abwesenheit von Atc noch einen leichten Wachstumsdefekt mit rund 80% des Wildtypwachstums auf (vgl. Abb. 33). Eine komplementierte Mutante, die die im Operon stromabwärts von Msmeg\_6366 angeordnete Galactosyltransferase Msmeg\_6367 ausgehend von einem integrativen Plasmid konstitutiv exprimiert, zeigte dagegen eine nur leicht schwächere Atc-abhängige Wachstumsinhibierung als die nicht komplementierte tetON-Mutante. Erst eine Komplementation mit dem vollständigen Operon Msmeg\_6366-

Msmeg\_6367-Msmeg\_6369 resultierte in einem völlig Atc-unabhängigen Wachstum wie der Wildtyp und einem vollständig komplementierten Phänotyp. Die tetON-Mutante, die lediglich den Leervektor pMV361 trägt, zeigte weiterhin dasselbe Silencing-Verhalten wie die konditionale Mutante c-Msmeg\_6366-tetON (vgl. Abb. 33).

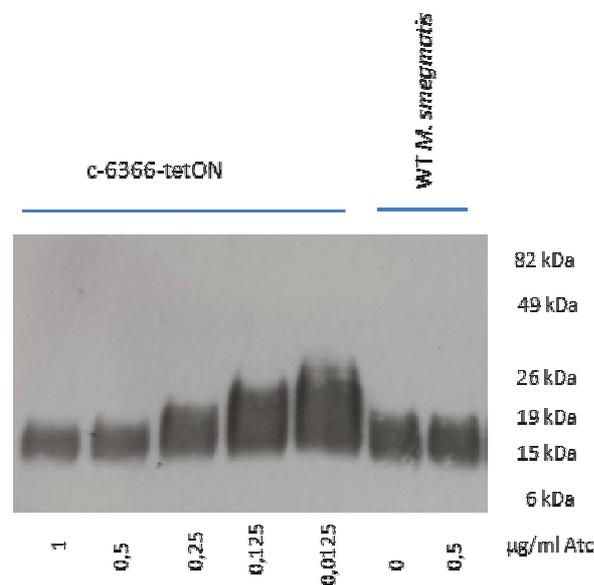


**Abb. 33: Messung des Atc-abhängigen Wachstums der konditionalen Mutante c-Msmeg\_6366-tetON-Mutante.** Die konditionale c-Msmeg\_6366-Mutante (▲) wurde zusammen mit dem *M. smegmatis* Wildtyp (●) sowie den komplementierten Mutanten in Middlebrook 7H9 Flüssigmedium im 96-well-Mikrotiterplattenformat kultiviert. Die komplementierten Varianten tragen eine zusätzliche Genkopie von Msmeg\_6366 (▼), dem im Operon nachfolgenden für eine Galactosyltransferase kodierende Gen Msmeg\_6367 (▽) bzw. das vollständige Operon Msmeg\_6366-Msmeg\_6367-Msmeg\_6369 (◐) unter der Kontrolle eines HSP60-Promotors. Als Kontrolle dient eine Mutante mit dem Leervektor pMV361 (◆). Die Bestimmung des Wachstums erfolgte nach 2 Tagen Inkubation durch einen Resazurin-Assay. Die prozentualen Berechnungen beziehen sich auf das Wachstum des Wildtyps *M. tuberculosis* bei 0 µg/ml Atc (100%). Die Werte repräsentieren Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen.

Eine vollständige genetische Komplementation und Reversion des Silencing-Effekts von c-Msmeg\_6366-tetON war durch das plasmidkodierte Wildtypallel pMV361::Msmeg\_6366 nicht möglich. Das lässt darauf schließen, dass in dieser Mutante ähnlich wie in der Mutante c-Rv3781-tetON ein polarer Effekt auf das im Operon nachfolgende Gen ausgeübt wird (vgl. Abb. 11). Die Komplementation der tetON-Mutante mit c-Msmeg\_6367 führt ebenfalls zu keiner vollständigen Reversion des Wachstums auf Wildtyplevel, sodass in der c-Msmeg\_6366-tetON-Mutante ein gemischter Phänotyp zu beobachten ist, in dem sich die Effekte der Transporterkomponente Msmeg\_6366 und der Galactosyltransferase Msmeg\_6367 addieren. In der Mutante c-Msmeg\_6366-tetON, die zur Komplementation mit dem Plasmid pMV361::Rv6367 transformiert worden ist, sollte der Silencingeffekt zu beobachten sein, der nur auf die Blockade der Transkription des Gens Msmeg\_6366 zurückzuführen ist. Eine vollständige Komplementation des

Wachstums konnte nur durch die konstitutive Expression des ganzen Operons Msmeg\_6366-Msmeg\_6367-Msmeg\_6369 erreicht werden (Abb. 33).

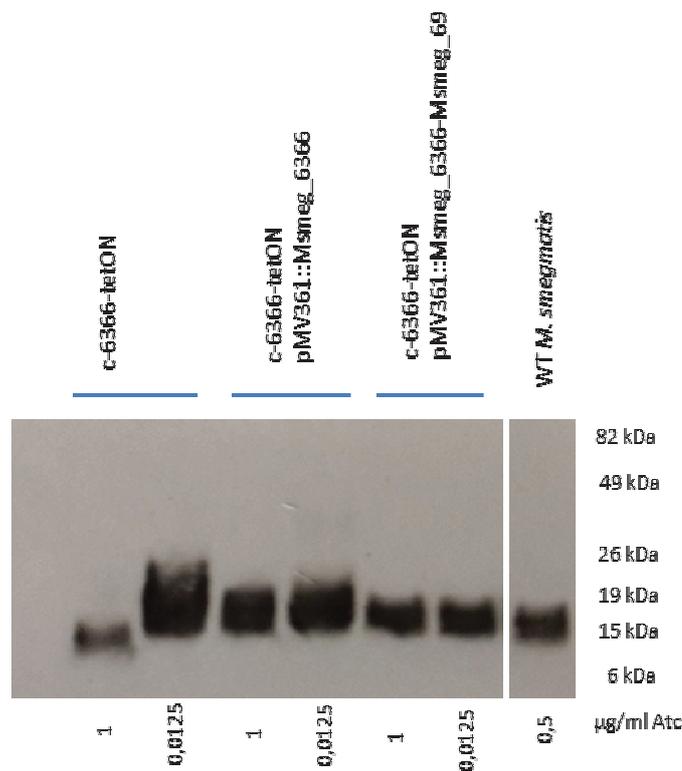
Um den Phänotyp der Mutante näher zu charakterisieren, wurde die konditionale c-Msmeg\_6366-tetON-Mutante nun vollinduziert und unter verschiedenen Atc-Konzentrationen für partielles Silencing angezogen. Es wurden Zellysate hergestellt und für einen Immunoblot gegen LAM verwendet (vgl. Abb. 34). Da für den ABC-Transporter Rv3781-Rv3783 LAM als Substrat vorgeschlagen wurde (Braibant, Gilot et al. 2000), wurde 2011 der LAM-Anteil in einer Gendeletionsmutante des Homologs zu Rv3783 (Msmeg\_6369) untersucht (Dianiskova, Kordulakova et al. 2011), das in *M. smegmatis* nicht essentiell ist. In dieser Deletionsmutante zeigten sich keine Veränderungen im LAM-Anteil. Um eventuelle Veränderungen im LAM-Anteil in der konditionalen Mutante des essentiellen Msmeg\_6366 zu untersuchen, wurde die c-Msmeg\_6366-tetON-Mutante unter verschieden starken Silencing-Bedingungen angezogen und ein Immunoblot gegen LAM durchgeführt (Abb. 34). Wildtypzellen von *M. smegmatis*, die ohne Atc bzw. in Gegenwart von 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Atc kultiviert wurden, dienten als Kontrolle.



**Abb. 34: LAM Immunoblot in der *M. smegmatis* c-Msmeg\_6366-tetON-Mutante.** Die c-Msmeg\_6366-tetON-Mutante und Wildtyp *M. smegmatis* wurden bis zu einer  $\text{OD}_{600\text{nm}} \leq 1$  angezogen und zur Herstellung von Zellysaten eingesetzt. Je 10  $\mu\text{g}$  Protein wurden für die SDS-PAGE (3.24) eingesetzt und nach Transfer auf eine PVDF Membran einem Immunoblot unter Verwendung eines LAM-spezifischen monoklonalen Antikörpers unterzogen (3.25)

In Abb. 34 ist ein schrittweiser Anstieg des Gehalts an LAM bei abnehmender Atc-Konzentration und dem damit verbundenen zunehmendem Silencing erkennbar. Die vollinduzierte Mutante und der Wildtyp zeigen gleich starke Signale für LAM. Die Signalstärke für LAM war für den Wildtyp identisch, unabhängig ob die Kultivierung in Gegenwart von Atc oder ohne Zugabe von Atc erfolgte (Abb. 34).

Im nächsten Schritt wurden die bereits in Abb. 33 auf ihr Wachstumsverhalten untersuchten, komplementierten Mutanten nun auch auf ihren Gehalt an LAM untersucht.



**Abb. 35: LAM Immunoblot in der *M. smegmatis* c-Msmeg\_6366-tetON-Mutante und komplementierten Varianten.** Die konditionale Mutante c-Msmeg\_6366-tetON, ihre genetisch mit den Plasmiden pMV361::Msmeg\_6366 oder pMV361::Msmeg\_6366-Msmeg\_6369 komplementierten Varianten sowie der Wildtyp *M. smegmatis* wurden bis zu einer  $OD_{600nm} \leq 1$  angezogen und zur Herstellung von Zelllysaten eingesetzt. Je 10 µg Protein wurden für die SDS-PAGE (3.24) eingesetzt und nach Transfer auf eine PVDF Membran einem Immunoblot unter Verwendung eines LAM-spezifischen monoklonalen Antikörpers unterzogen (3.25). Als Kontrolle dienten Zelllysate des in Gegenwart von 0,5 µg/ml Atc kultivierten Wildtyps, die zeitgleich angezogen und auf dieselbe Membran transferiert wurden.

Während die konditionale c-Msmeg\_6366-tetON-Mutante beim partiellen Silencing einen deutlichen Anstieg im LAM-Gehalt zeigt, war dieser Effekt in der Mutante, die das Plasmid pMV361::Msmeg\_6366-Msmeg\_6369 trägt, völlig aufgehoben. Die mit dem vollständigen Operon komplementierte Mutante zeigte einen LAM-Gehalt, der dem des Wildtyplevels

glich. Die Mutante, die zur genetischen Komplementation nur eine zusätzliche Kopie des Gens Msmeg\_6366 trägt, jedoch schon im Wachstumsverhalten nur eine eingeschränkte Komplementation aufwies, zeigte im Vergleich zu Wildtyp und vollinduzierter tetON-Mutante einen leicht angestiegenen LAM Level, der sich unter vollinduzierten und gesilenceten Bedingungen nicht veränderte (Abb. 35). Die Komplementation mit dem Gen Msmeg\_6366 blieb also unvollständig, sodass der Silencing-Effekt von Msmeg\_6366 sich offenbar auch auf stromabwärts gelegene Gene erstreckt und nicht nur auf der Regulation von Msmeg\_6366 beruht. Eine vollständige Komplementation ist mit dem gesamten Operon jedoch möglich, sodass unbeabsichtigte *off-target*-Effekte ausgeschlossen werden können.

#### 4.5 Zellwandsynthese-involvierte Exporter: Msmeg\_1817 und Rv3277

Neben den beschriebenen ABC-Transportern wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit auch eine Flippase untersucht, die zur Familie der GtrA-ähnlichen Flippasen gehört (vgl. 2.5.2.3). Arbeitshypothese für die vorliegende Arbeit war, dass die Flippase Msmeg\_1817 am Flipping lipidgebundener Zucker wie Decaprenolphosphoarabinose (DPA) und Decaprenolphosphomannose (DPM) beteiligt ist (vgl. Abb. 4 und 5).

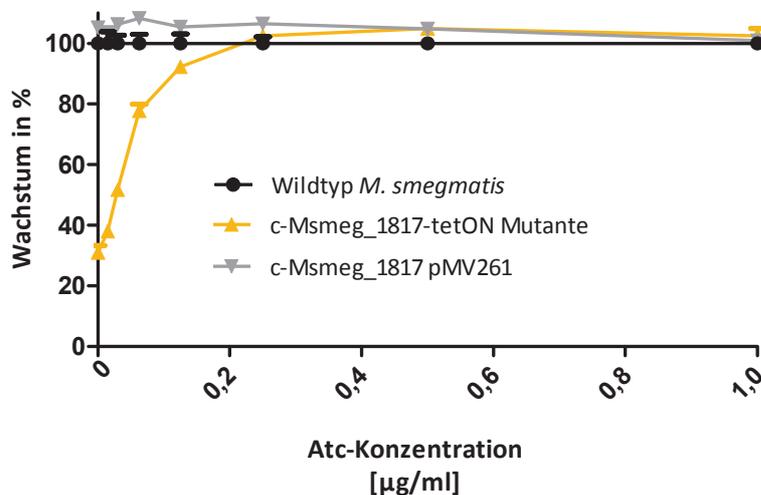
Aus *M. tuberculosis* ist eine Permease bekannt, Rv3789, die gewisse Homologien zur GtrA-Flippase aus *Shigella flexneri* aufweist und deren Strukturgen unmittelbar stromabwärts der in die DPA-Synthese involvierten Gene *drpE1* und *dprE2* liegt. Die Deletion von Rv3789 in *M. tuberculosis* führte jedoch weder zu einem Wachstumsdefekt noch in einer signifikanten Änderung der Komposition von AG oder LAM. Larrouy-Maumus und Mitarbeiter deletierten deshalb auch das zu Rv3789 homologe Gen in *M. smegmatis*, Msmeg\_6372, und konnten neben einer Reduktion im Arabinosegehalt von AG und LAM auch eine intrazelluläre Akkumulation von DPA beobachten (Larrouy-Maumus, Skovierova et al. 2012). Sie schlossen daher, dass Msmeg\_6372 eine DPA-spezifische Flippaseaktivität ausweist. Da der Effekt auf den Arabinoseanteil im AG und LAM jedoch nicht vollständig ist, wird das Vorhandensein einer zweiten, redundanten Translokase vermutet, die ebenfalls DPA von der cytoplasmatischen Seite zum Periplasma umorientieren kann. Da die Gendeletion von Rv3789 ohne apparenten phänotypischen Effekt blieb, könnte die zweite in *M. tuberculosis* vorkommende GtrA-homologe Permease Rv3277 die gesuchte redundante Flippaseaktivität aufweisen. Hypothese dieser Arbeit war demzufolge, dass Rv3277 in *M. tuberculosis* sowie das Homolog Msmeg\_1817 in *M. smegmatis* ebenfalls DPA sowie möglicherweise noch weitere lipidgebundene Zuckermoleküle transloziert.

Zur Analyse von Msmeg\_1817 wurde deshalb eine konditionale Mutante in *M. smegmatis* hergestellt, die dann für phänotypische Analysen eingesetzt werden konnte. Sie trägt, wie bereits für die vorausgegangenen geschilderten konditionalen Mutanten anstelle des nativen Promotors eine 4fache-Tet-Operator-kassette, an der in Abhängigkeit von Atc der plasmidkodierte Tet-Repressor binden kann.

Für die Generierung der ortsspezifischen konditionalen Mutanten für das Gen Msmeg\_1817 wurden zunächst DNA Flanken mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotidprimerpaare c-Msmeg\_1817-LL und c-Msmeg\_1817-LR sowie c-Msmeg\_1817-RL und c-Msmeg\_1817-RR (siehe Tab. 1) amplifiziert und für die Herstellung von Allelaustauschsubstraten und hieraus

resultierenden Mycobacteriophagen eingesetzt (siehe 3.14). Die nach der Transduktion auf Hygromycin-haltigem Selektionsmedium erhaltenen Klone wurden anschließend mittels Southern Blot Analysen (3.17) auf ihren korrekten Genotyp zur Verifizierung der ortsspezifischen Genaustausch überprüft.

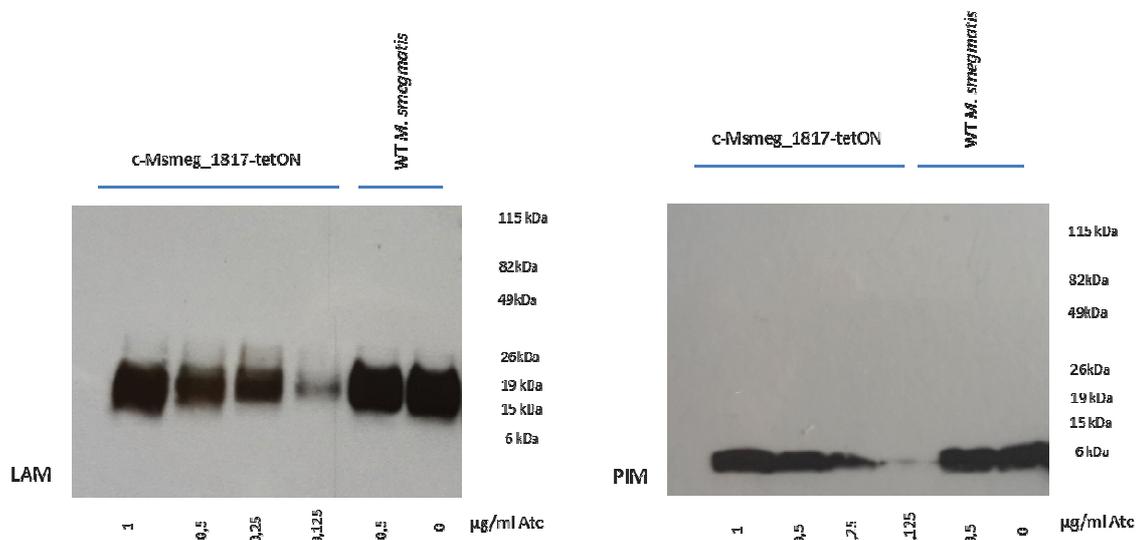
Die Tet-On Mutante c-Msmeg\_1817 wuchs unter Zugabe von  $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$  Atc im Medium auf Wildtyp-Level. Ohne Atc reduzierte sich das Wachstum der Mutante auf etwa 30% des Wildtyp-Wachstums. Eine Mutante, die anstelle des Tet-Repressor-Plasmids den Leervektor pMV361 trägt, wuchs unabhängig von Atc auf Wildtyp-Level (vgl. Abb 36).



**Abb. 36: Messung des Atc-abhängigen Wachstums der konditionalen *M. smegmatis* c-Msmeg\_1817-tetON Mutante.** Die konditionale c-Msmeg\_1817-tetON-Mutante ( $\blacktriangle$ ) wurde zusammen mit dem *M. smegmatis* Wildtyp ( $\bullet$ ) und der Leervektor-tragenden Mutante *knock-in* Mutante c-Msmeg\_1817 pMV261 ( $\blacklozenge$ ) in Middlebrook 7H9 Flüssigmedium im 96-well-Mikrotiterplattenformat kultiviert. Die Bestimmung des Wachstums erfolgte nach 2 Tagen Inkubation durch einen Resazurin-Assay. Die prozentualen Berechnungen beziehen sich auf das Wachstum des Wildtyps *M. tuberculosis* bei  $0 \mu\text{g/ml}$  Atc (100%). Die Werte repräsentieren Mittelwerte ( $n=3$  Mutante,  $n=6$  Wildtyp) und Standardabweichungen.

Aufgrund der Annahme, dass Msmeg\_1817 eine Flippase für lipidgebundene Zuckermoleküle ist, die möglicherweise das Flipping von DPM und DPA vermittelt, wurde ein Immunoblot der im Biosyntheseweg *downstream* angeordneten Produkte LAM und PIM durchgeführt (vgl. Hypothese in 2.5.2.3). Um die Auswirkungen der Regulation der Flippase analysieren zu können, wurden die Mutanten mit verschiedenen Atc-Konzentrationen angezogen, die die Expression der Flippase beeinflussen. Aus diesen Kulturen wurden Zellysate hergestellt, die dann in einem

Immunoblot mit Antikörpern zum spezifischen Nachweis von LAM bzw. PIM<sub>6</sub> eingesetzt wurden (vgl. Abb. 37).

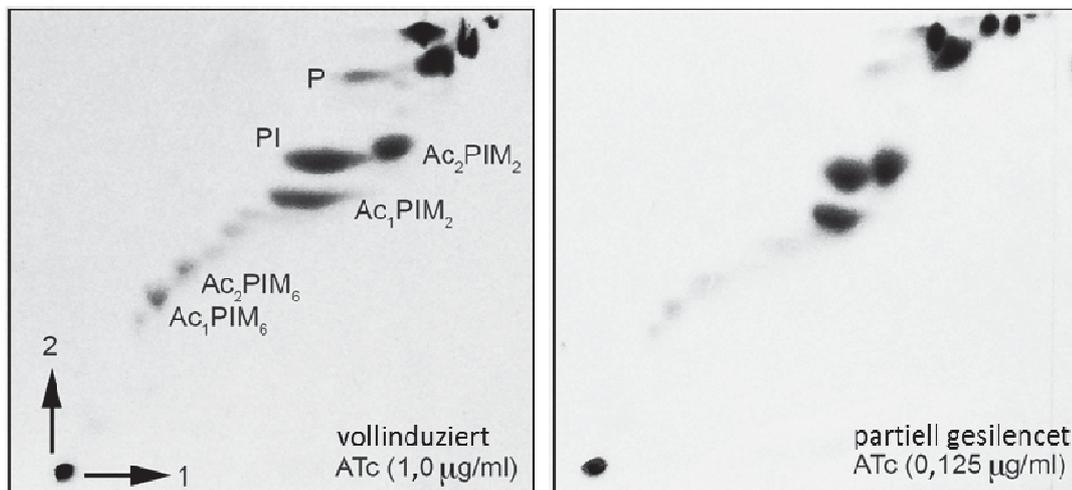


**Abb. 37: Immunoblot gegen LAM (links) und bzw. PIM<sub>6</sub> (rechts) in der *M. smegmatis* c-Msmeg\_1817tetON-Mutante.** Die c-Msmeg\_1817-tetON-Mutante und Wildtyp *M. smegmatis* wurden bis zu einer  $OD_{600nm} \leq 1$  angezogen und zur Herstellung von Zelllysaten eingesetzt. Je 5 µg Protein wurden für das SDS-Gel (3.24) eingesetzt und nach Transfer auf eine PVDF Membran einem Immunoblot unter Verwendung eines LAM-spezifischen bzw. PIM<sub>6</sub>-spezifischen monoklonalen Antikörpers unterzogen (vgl. 3.25).

Bei abnehmender Atc-Konzentration und daraus resultierendem zunehmendem Silencing der Msmeg\_1817tetON-Mutante reduziert sich sowohl der LAM-Anteil als auch der PIM<sub>6</sub>-Anteil in den Zelllysaten in graduelltem Maße. Die vollinduzierte Mutante bildete in Gegenwart von 1 µg/ml Atc beide Zellwandkomponenten auf Level des Wildtyps. Der Wildtyp *M. smegmatis* zeigte gleichbleibende Signalstärke bei LAM und PIM<sub>6</sub> unabhängig von der Anzucht ohne Atc bzw. mit 0,5 µg/ml Atc (Abb. 37).

Aufgrund dieser ersten Hinweise, dass Msmeg\_1817 tatsächlich gemäß der in Abb. 4 und 5 dargestellten Hypothese am Flipping lipidgebundener Zuckern beteiligt sein könnte, wurde nun in Kollaboration mit der AG Gurdyal Besra (University of Birmingham, UK) die Veränderung der Lipidkomposition in der c-Msmeg\_1817-tetON-Mutante weitergehend untersucht. Die Mutante wurde unter vollinduzierenden und partiell gesilenceten Bedingungen angezogen, mit radioaktiv markierter C<sup>14</sup>-Glucose inkubiert und die polaren Lipide extrahiert. Gleiche Mengen

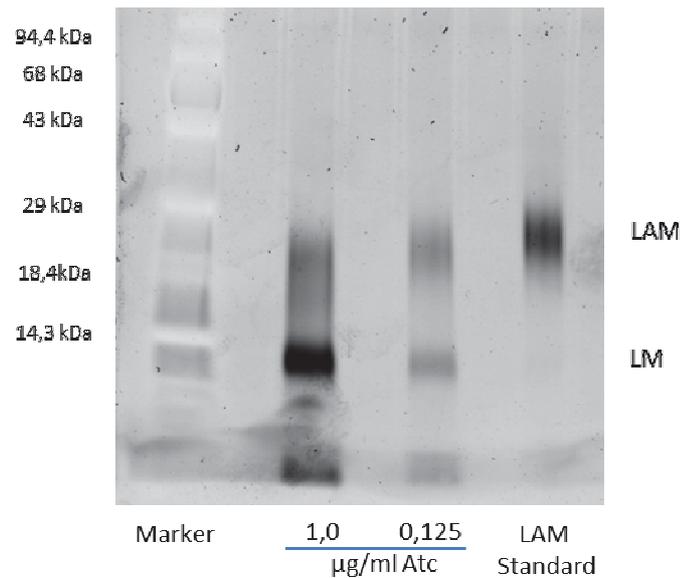
Radioaktivität wurden einer zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie unterzogen (vgl. Abb. 38).



**Abb. 38:** 2D-TLC Autoradiogramm nach Extraktion der polaren Lipide aus der vollinduzierten (links) und partiell gesilenceten (rechts) *c*-Msmeg\_1817-tetON Mutante. Die *c*-Msmeg\_1817tetON-Mutante wurde bis zu einer  $OD_{600nm} \leq 0,8$  angezogen und dann mit  $10 \mu\text{Ci/ml } C^{14}$ -Glucose markiert und die polaren Lipide extrahiert. 50000 cpm wurden auf Silica Gel F254-TLC-Platten mit Aluminiumrücken aufgetragen und im Laufmittelsystem E getestet. Die erste Laufrichtung (horizontal markiert) wurde mit  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (60:30:6, v/v/v) als Laufmittel, die zweite Laufrichtung mit  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (40:25:3:6, v/v/v/v) als Laufmittel durchgeführt. Die autoradiographische Dokumentation erfolgte über Nacht auf Kodak-Filmen. Abkürzungen:  $\text{Ac}_1\text{PIM}_6$ , Acyl-Hexamannosyl-Phosphatidylinositol;  $\text{Ac}_2\text{PIM}_6$ , Diacyl-Hexamannosyl-Phosphatidylinositol;  $\text{Ac}_1\text{PIM}_2$ , Acyl-Dimannosyl-Phosphatidylinositol;  $\text{Ac}_2\text{PIM}_2$ , Diacyl-Dimannosyl-Phosphatidylinositol; Atc, Anhydrotetracyclin; PI, Phosphatidylinositol; P, Phospholipide. Die Anzucht der Zellen, die Extraktion der polaren Lipide sowie die hier abgebildeten Analysen wurden in Kooperation von der AG Besra, University Birmingham, durchgeführt wie unter 3.27 beschrieben.

Der Anteil der höher mannosylierten  $\text{PIM}_6$  (einfach und zweifach acyliert) verringerte sich in der gesilenceten Mutante im Vergleich zur vollinduzierenden Mutante sichtbar, während  $\text{PIM}$  niedrigerer Ordnung ( $\text{PIM}_2$ , einfach und zweifach acyliert) sich geringfügig erhöhten (Abb. 38).

Des Weiteren wurden Lipoglycane der Mutante nach Anzucht mit radioaktiv markierter  $C^{14}$ -Glucose unter vollinduzierenden und partiell gesilenceten Bedingungen extrahiert und partiell aufgereinigt und einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (3.28) unterzogen. Anschließend wurde mit einem zuckerspezifischen Nachweis der Gehalt der Extrakte an LM und LAM überprüft (vgl. Abb. 39).



**Abb. 39: SDS-Gelelektrophorese zur semiquantitativen Bestimmung des Gehalts von Lipomannan (LM) und Lipoarabinomannan (LAM) in der konditionalen *M. smegmatis* c-Msmeg\_1817-tetON-Mutante unter vollinduzierten und partiell gesilenceten Bedingungen.** Die Extraktion von LM/LAM erfolgte ausgehend von 10 ml Kulturvolumen von  $C^{14}$ -Glucose markierten Zellen mit fünfmaliger Extraktion des getrockneten Zellpellets mit 50% (v/v)  $C_2H_5OH$ . Die vereinigten Überstände wurden getrocknet und mit Phenol- $H_2O$  extrahiert. Die wässrige Phase wurde dann gegen Wasser dialysiert und die Inkorporation von  $C^{14}$ -Glucose bestimmt. Gleiche Mengen (50000 cpm) der vollinduzierten und partiell gesilenceten Proben sowie des radioaktiv markierten LAM-Standards wurden auf ein 15%iges SDS-Gel geladen, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend autoradiographisch dokumentiert. Abkürzungen: Atc, Anhydrotetracyclin; LAM, Lipoarabinomannan; LM, Lipomannan. Die Anzucht der Zellen, die Extraktion des LAM sowie die hier abgebildeten Analysen wurden in Kooperation von der AG Besra, University of Birmingham, wie unter 3.28 beschrieben, durchgeführt.

LM hat gegenüber LAM ein geringeres Molekulargewicht und damit eine größere Laufweite in der SDS-PAGE. In Abb. 39 zeigte sich eine sichtbare Reduktion beider Komponenten, des LAM und LM, in der gesilenceten Mutante im Vergleich zur mit 1 µg/ml Atc vollinduzierten Mutante.

Da sich aufgrund der Veränderung des LM und LAM auch die gesamte Zusammensetzung der mycobakteriellen Zellwand weiter verändern könnte, wurde eine gaschromatographische Analyse der Zellwandkomposition durchgeführt. Sie gibt Aufschluss über die Zusammensetzung der Bestandteile Lipoarabinomannan (LAM) und Arabinogalactan (AG), die in den unten stehenden Tab. 12 und 13 gezeigt wird.

**Tab. 12: Gaschromatographische (GC) Analyse der Zusammensetzung des Lipomannans/Lipoarabinomannans in der *M. smegmatis* c-Msmeg\_1817-tetON Mutante nach Anzucht unter verschiedenen Atc-Konzentrationen.** Die Mutante wurde entweder mit 1 µg/ml, 0,5µg/ml oder 0,125µg/ml Atc angezogen. Pellets der Mutanten wurden mit 2 M Trifluoracetat hydrolysiert, mit NaB<sub>2</sub>H<sub>4</sub> reduziert, die aus dieser Behandlung resultierenden Alditole *per*-O-acetyliert und zur GC-Analyse eingesetzt, um das Verhältnis zwischen Arabinose und Mannose zu bestimmen. Abkürzungen: Ara, Arabinose; Atc, Anhydrotetracyclin; Man, Mannose; Area, Fläche unter den relevanten Peaks im Elutionsprofil.

Atc [µg/ml]	Area %		
	Arabinose	Mannose	Ara:Man Ratio
1	44,678	17,754	2,5:1
0,5	39,907	13,363	3,0:1
0,125	27,93	8,136	3,4:1

**Tab. 13: Gaschromatographische Analyse der Zusammensetzung des Arabinogalactans in der *M. smegmatis* c-Msmeg\_1817-tetON Mutante nach Anzucht unter verschiedenen Atc-Konzentrationen.** Die Mutante wurde entweder mit 1 µg/ml, 0,5µg/ml oder 0,125µg/ml Atc angezogen. Pellets der Mutanten wurden mit 2 M Trifluoracetat hydrolysiert, mit NaB<sub>2</sub>H<sub>4</sub> reduziert, die aus dieser Behandlung resultierenden Alditole *per*-O-acetyliert und zur GC-Analyse eingesetzt, um das Verhältnis zwischen Arabinose und Galactose zu bestimmen. Abkürzungen: Ara, Arabinose; Atc, Anhydrotetracyclin; Gal, Galactose; Area, Fläche unter den relevanten Peaks im Elutionsprofil.

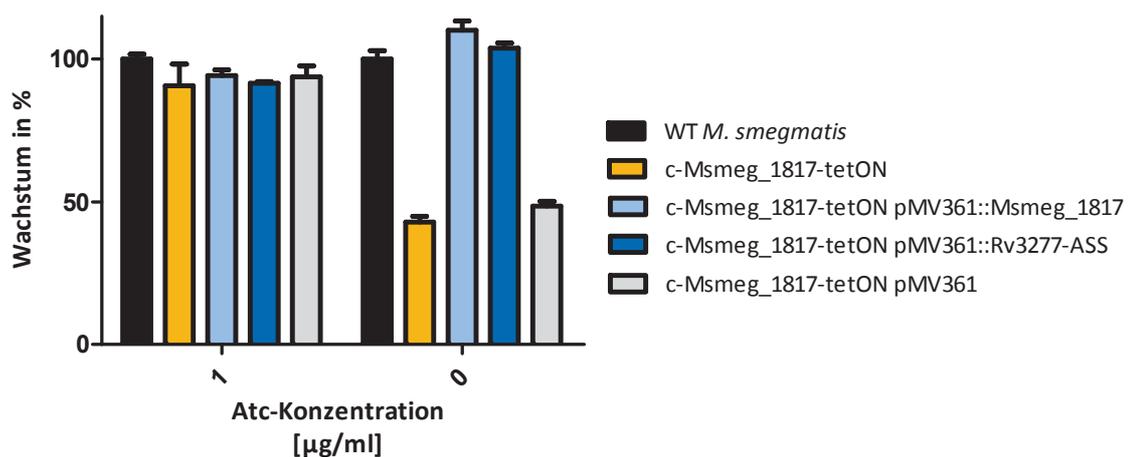
Atc [µg/ml]	Area %		
	Arabinose	Galactose	Ara:Gal Ratio
1	24,019	10,742	2,2:1
0,5	8,634	4,912	1,75:1
0,125	31,626	20,614	1,5:1

Es zeigt sich eine Veränderung beider Zellwandkomponenten – sowohl des AG als auch des LAM und LM. Für das gemeinsam präparierte Lipo(arabino)mannan (siehe Tab. 12) ist ein relativer Anstieg der Arabinose im Verhältnis zur Mannose zu beobachten. Von einem Verhältnis der Arabinose zu Mannose von 2,5:1 in der vollinduzierten Mutante erhöhte sich der Anteil der Arabinose in der gesilenceten Mutante graduell auf 3,4:1. Auch die in Tab. 13 dargestellte relative Zusammensetzung des AG veränderte sich. Hier zeigte sich ein relativer Anstieg der Arabinose im Verhältnis zur Galactose von 2,2:1 unter vollinduzierenden Bedingungen zu 1,5:1 unter gesilenceten Bedingungen.

Um die beobachteten phänotypischen Effekte eindeutig auf die Regulation des Zielgens in der konditionalen Mutante zurückführen zu können, wurde die Mutante genetisch komplementiert. Durch die Komplementation sollte eine Umkehrbarkeit des Effekts bewirkt werden. Dazu wurde

die konditionale Mutante c-Msmeg\_1817-tetON mit einer plasmidkodierten konstitutiv exprimierten Genkopie des Wildtypallels von Msmeg\_1817 bzw. dem Homolog Rv3277 aus *M. tuberculosis* komplementiert.

Eine zuvor durchgeführte, bioinformatische Überprüfung der GtrA-Homologe in verschiedenen Mycobakterien zeigte, dass *M. leprae* (ML\_0734) und *M. smegmatis* (Msmeg\_1817) rund 50 Aminosäuren (AS) kürzere Proteine (ML\_0734, 228 AS; Msmeg\_1817, 223 AS; Rv3277, 272 AS) kodieren. Die Proteine weisen bis auf die N-terminale Sequenz von 50 AS bei Rv3277 jedoch hohe Aminosäureidentitäten auf (80% bzw. 84% Übereinstimmung auf AS-Level über 222/228 AS zwischen Msmeg\_1817 bzw. ML\_0734 und Rv3277). Zur Komplementation wurde deshalb eine trunkierte Variante kloniert, die rund 150 Bp verkürzt ist. Mit diesem wurde das Komplementationsplasmid pMV361::c-Rv3277-ASS (*alternative start site*) generiert. Die Ergebnisse dieser Komplementationsversuche sind in Abb. 40 und Abb. 41 dargestellt.

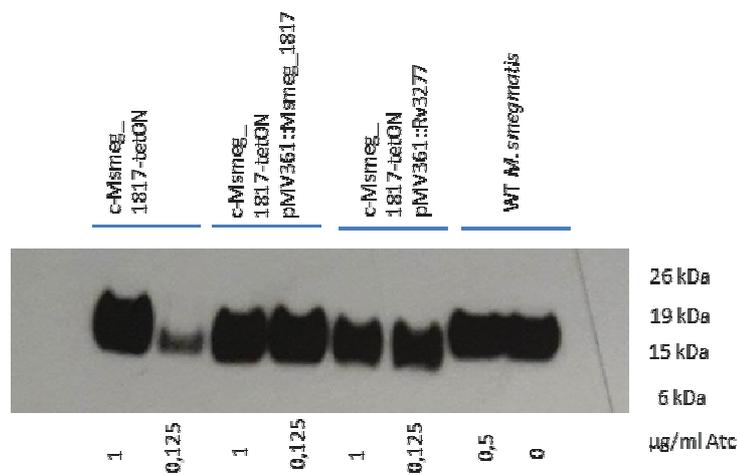


**Abb. 40: Messung des Atc-abhängigen Wachstums der konditionalen Mutante c-Msmeg\_1817-tetON-Mutante.** Die konditionale c-Msmeg\_1817-Mutante (■) wurde zusammen mit dem *M. smegmatis* Wildtyp (■) sowie den komplementierten Mutanten in Middlebrook 7H9 Flüssigmedium im 96-well-Mikrotiterplattenformat kultiviert. Die komplementierten Varianten tragen eine zusätzliche, konstitutiv exprimierte Genkopie von Msmeg\_1817 (■) bzw. des homologen Gens Rv3277 aus *M. tuberculosis* (■). Als Kontrolle diente die konditionale c-Msmeg\_1817-Mutante mit dem Leervektor pMV361 (■). Die Bestimmung des Wachstums erfolgte nach 2 Tagen Inkubation durch einen Resazurin-Assay. Die prozentualen Berechnungen beziehen sich auf das Wachstum des Wildtyps *M. tuberculosis* bei 0 µg/ml Atc (100%). Die Werte repräsentieren Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen.

Das Wachstum der konditionalen Mutante c-Msmeg\_1817-tetON wurde durch die zusätzliche plasmidkodierte, konstitutiv aktive Genkopie von Msmeg\_1817 wieder unabhängig von der Zugabe von Atc im Medium. Der Effekt der Regulation des Wildtypallels in der konditionalen Mutante wurde also durch die Transkription der plasmidkodierten Genkopie vollständig

aufgehoben. Auch die konstitutive heterologe Expression des Homologs zu Msmeg\_1817, des Gens Rv3277 aus *M. tuberculosis*, konnte die Silencingeffekte in der konditionalen c-Msmeg\_1817-tetON Mutante vollständig komplementieren. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Gen Rv3277 tatsächlich um ein funktionelles Homolog zu Msmeg\_1817 handelt. Die Transformation des Leervektors pMV361 führte hingegen zu keiner Veränderung hinsichtlich des Wachstums unter vollinduzierenden oder gesilenceten Bedingungen, sondern verhielt sich wie die konditionale c-Msmeg\_1817-tetON-Mutante (Abb. 40).

Um auch die Komplementation der Mutanten durch Msmeg\_1817 bzw. Rv3277 auf Zellwandebene nachvollziehen zu können, wurde ein Immunoblot unter Verwendung des LAM-spezifischen monoklonalen Antikörpers durchgeführt, für den die Mutanten jeweils vollinduziert (1 µg/ml Atc) und partiell gesilencet (0,125 µg/ml Atc) angezogen und zu Zelllysaten aufbereitet wurden. Die Ergebnisse des Immunoblots dieser Zelllysate sind in Abb. 41 dargestellt.

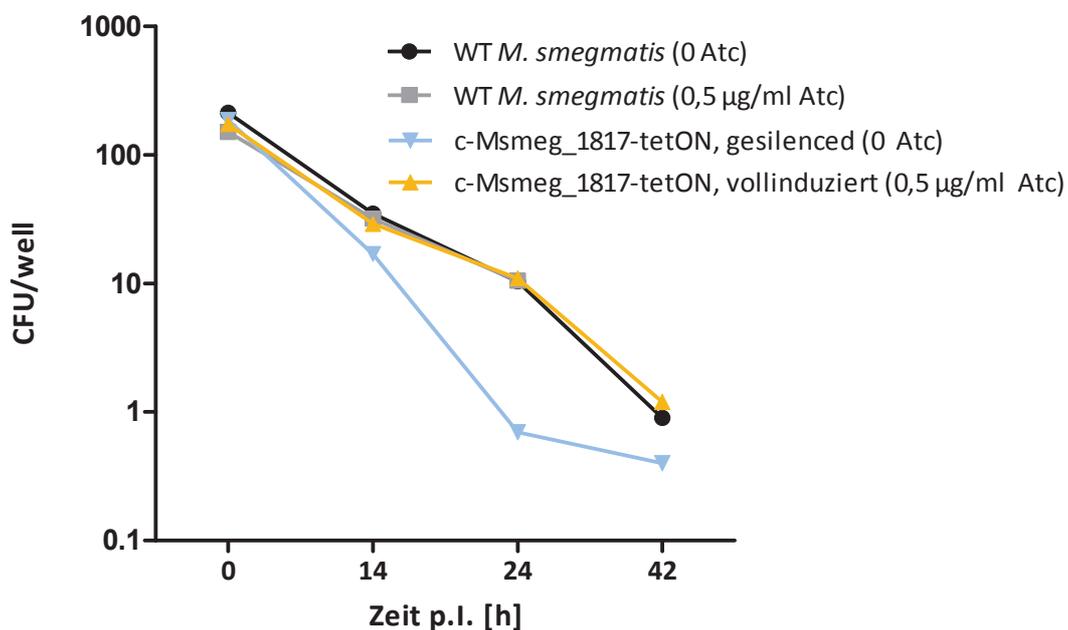


**Abb. 41: LAM Immunoblot der *M. smegmatis* c-Msmeg\_1817-tetON-Mutante und ihrer komplementierten Varianten.** Die c-Msmeg\_1817tetON-Mutante und Wildtyp *M. smegmatis* wurden bis zu einer  $OD_{600nm} \leq 1$  angezogen und zur Herstellung von Zelllysaten eingesetzt. Je 5 µg Protein wurden für die SDS-PAGE eingesetzt und nach Transfer auf eine PVDF Membran einem Immunoblot unter Verwendung eines LAM-spezifischen monoklonalen Antikörpers unterzogen (siehe 3.25).

Der Silencing-Effekt, der sich in der konditionalen Mutante c-Msmeg\_1817-tetON auf den Gehalt an LAM reduzierend auswirkte, war sowohl durch eine zusätzliche Genkopie von Msmeg\_1817 als auch des Homologs Rv3277 aus *M. tuberculosis* vollständig revertierbar. In

beiden komplementierten Mutanten führte das partielle Silencing von Msmeg\_1817 zu keiner erkennbaren Reduktion des LAM-Gehalts mehr. Das LAM-Level des Wildtyps blieb erwartungsgemäß unbeeinflusst von der Zugabe von Atc stabil.

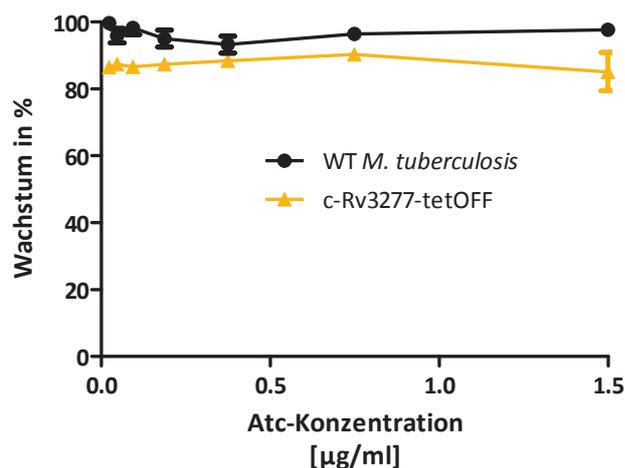
Zur Bestimmung der Auswirkung der Inaktivierung der Flippase Msmeg\_1871 auf die Virulenz von *M. smegmatis* wurden zu Makrophagen ausdifferenzierte THP-1 Zellen unter verschiedenen Bedingungen infiziert und einem Gentamycin-Protektionsassay unterzogen. Die c-Msmeg\_1817-tetON Mutante wurde hierfür zunächst unter partiell gesilenceten (0,125 µg/ml Atc ) Bedingungen zur Vermeidung der Akkumulation von Atc und Genprodukt in den Zellen vorkultiviert, und in einer MOI =1 für die Infektion eingesetzt. Die Infektion erfolgte dann jeweils in An- oder Abwesenheit von 0,5 µg/ml Atc zur differentiellen Geninduktion. Als Kontrollen dienten THP-1 Infektionen mit Wildtyp *M. smegmatis*. Zur Bestimmung der intrazellulären Replikation wurden dann Aliquots von Zelllysaten zu vier verschiedenen Zeitpunkten (0, 14, 24 und 42 Stunden) nach Infektion auf passendem Atc-haltigem Selektionsmedium zur Quantifizierung der Lebendzellzahl ausplattiert (Abb. 42).



**Abb. 42: Infektionskinetik der *M. smegmatis* c-Msmeg\_1817-tetON-Mutante in THP-1-Zellen.** PMA-stimulierte THP-1 Zellen (50 nM, 24 h) wurden mit Wildtyp (WT) *M. smegmatis* und der konditionalen Mutante infiziert (MOI=1) und einem Gentamycin-Protektionsassay unterzogen (vgl. 3.22). Die Kultivierung der infizierten THP1-Zellen erfolgte jeweils unter Bedingungen mit und ohne Atc. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurden die Makrophagen lysiert und seriell verdünnte Aliquots der Lysate zur Bestimmung der Lebendzellzahl ausplattiert. Dargestellt sind Mittelwerte (n=3).

Der Infektionsverlauf des *M. smegmatis* Wildtyps war unabhängig von Atc und zeigte über 42 h insgesamt eine ca. 100-fache Reduktion der intrazellulären Bakterienlast. Dieser Verlauf ist typisch angesichts des im Vergleich zu *M. tuberculosis* geringen Virulenzpotential von *M. smegmatis*. Während sich die vollinduzierte konditionale c-Msmeg\_1817-tetON Mutante während der Makrophageninfektion wie der Wildtyp verhielt, wurde für die gesilenzte Mutante eine schnellere und stärkere Abnahme der Lebendzellzahl beobachtet (Abb. 42).

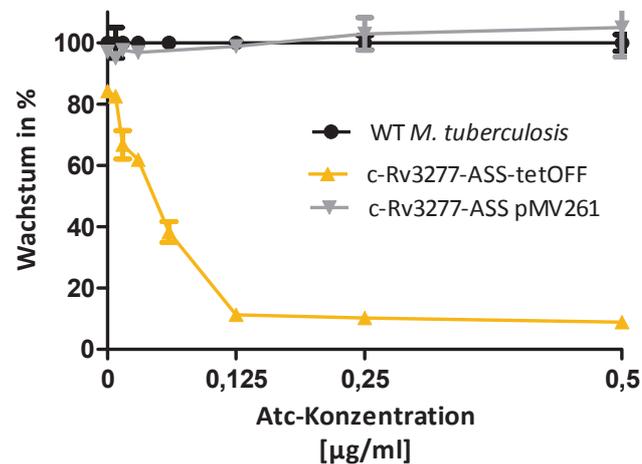
Da die Komplementationsversuche bereits Hinweise auf die funktionelle Kongruenz von Rv3277 und Msmeg\_1817 gaben, sollte nun die Essentialität des Homologs in *M. tuberculosis* geklärt werden. Dazu wurde eine konditionale tetOFF-Mutante für das Gen Rv3277 in *M. tuberculosis* hergestellt. Die ersten erzeugten Mutanten trugen anstelle des nativen Promotors eine 4-fache-Tet-Operorkassette unmittelbar stromaufwärts des annotierten Startcodons, an der in Abhängigkeit von Atc ein reverser Tet-Repressor (revTetR) binden kann.



**Abb. 43: Messung des Atc-abhängigen Wachstums der konditionalen *M. tuberculosis* c-Rv3277-tetOFF Mutante mit 4xtetOperator vor dem annotierten Startcodon.** Die konditionale c-Rv3277-tetOFF-Mutante ( $\blacktriangle$ ) wurde zusammen mit dem *M. tuberculosis* Wildtyp ( $\bullet$ ) in Middlebrook 7H9 Flüssigmedium im 96-well-Mikrotiterplattenformat kultiviert. Die Bestimmung des Wachstums erfolgte nach 6 Tagen Inkubation durch einen Resazurin-Assay. Die prozentualen Berechnungen beziehen sich auf das Wachstum des Wildtyps *M. tuberculosis* bei 0  $\mu\text{g/ml}$  Atc (100%). Die Werte repräsentieren Mittelwerte ( $n=3$ ) und Standardabweichungen.

Die *M. tuberculosis* c-Rv3277-tetOFF Mutante zeigte zwar ein insgesamt etwas schwächeres Wachstum als der Wildtyp *M. tuberculosis*, dieses lag jedoch unabhängig von der Zugabe von Atc auf etwa 80% des Wildtypwachstums (Abb. 43). Daher wurde, wie bereits für die in Abb. 40 und 41 gezeigten Komplementationsversuche, eine trunkierte Version mit einem alternativen

Startcodon genutzt. Dieses Startcodon liegt rund 150 bp stromabwärts des Annotierten. Mit diesem *shift* des Startcodons wurde eine neue konditionale Mutante generiert, deren 4xtetOperator nun vor dem späteren Startcodon positioniert ist: c-Rv3277-ASS-tetOFF (*alternative start site*).

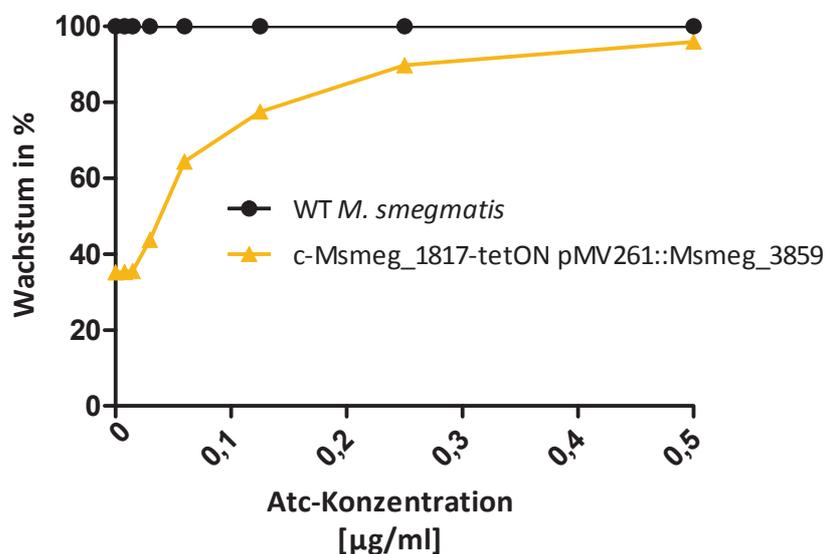


**Abb. 44: Messung des Atc-abhängigen Wachstums der konditionalen *M. tuberculosis* c-Rv3277-ASS-tetOFF Mutante mit 4xtetOperator vor alternativem Startcodon.** Die konditionale c-Rv3277-ASS-tetOFF-Mutante (▲) wurde zusammen mit dem *M. tuberculosis* Wildtyp (●) und der Leervektor-tragenden knock-in Mutante c-Rv3277-ASS pMV261 (◆), die keinen revTetR exprimiert, in Middlebrook 7H9 Flüssigmedium im 96-well-Mikrotiterplattenformat kultiviert. Die Bestimmung des Wachstums erfolgte nach 6 Tagen Inkubation durch einen Resazurin-Assay. Die prozentualen Berechnungen beziehen sich auf das Wachstum des Wildtyps *M. tuberculosis* bei 0 µg/ml Atc (100%). Die Werte repräsentieren Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen.

Die *M. tuberculosis* c-Rv3277-ASS-tetOFF Mutante zeigte ohne Atc im Medium ein Wachstum auf Wildtyp-Level. Mit der Zugabe von 0,125 µg/ml Atc reduzierte sich das Wachstum der Mutante auf nur noch etwa 10% des Wildtypwachstums. Eine Mutante, die anstelle des reversen Tet-Repressor-Plasmids den Leervektor pMV261 trägt, wuchs unabhängig von Atc auf Wildtyp-Level (Abb. 44).

Da in der von von Larrouy-Maumus und Mitarbeitern erzeugten Gendelektionsmutante von Msmeg\_6372 eine Akkumulation von DPA zu beobachten war (Larrouy-Maumus, Skovierova et al. 2012), sollte die potentielle Akkumulation von DPA und/oder DPM auch in der konditionalen c-Msmeg\_1817-tetON-Mutante überprüft werden. Die Analysen der konditionalen Mutante zeigten zunächst keine messbare Akkumulation von DPM oder DPA (Gurdyal Besra, University Birmingham, persönliche Kommunikation). Um einen potentiellen Mangel an Mannose

ausschließen zu können und eine mögliche Akkumulation von DPM hin zu detektierbaren Konzentrationen zu verstärken, wurde eine Überexpressionsmutante hergestellt, welche die DPM-Synthase Msmeg\_3859 aus *M. smegmatis* unter Kontrolle des HSP60-Promotors überexprimiert. Hierzu wurde das Msmeg\_3859 Gen zusätzlich in das Tet-Repressor-Plasmid hineinkloniert und das hieraus resultierende Plasmid pMV261::Msmeg\_3859 für die Erzeugung einer rekombinanten konditionalen *M. smegmatis* Msmeg\_1817-tetON Mutante benutzt. Tatsächlich konnte in diesem Überexpressionstamm im Vergleich zum *M. smegmatis* Wildtyp gesteigerte DPM-Synthaseaktivität in einem *in vitro* Enzymassay nachgewiesen werden (Gurdial Besra, University Birmingham, persönliche Kommunikation).

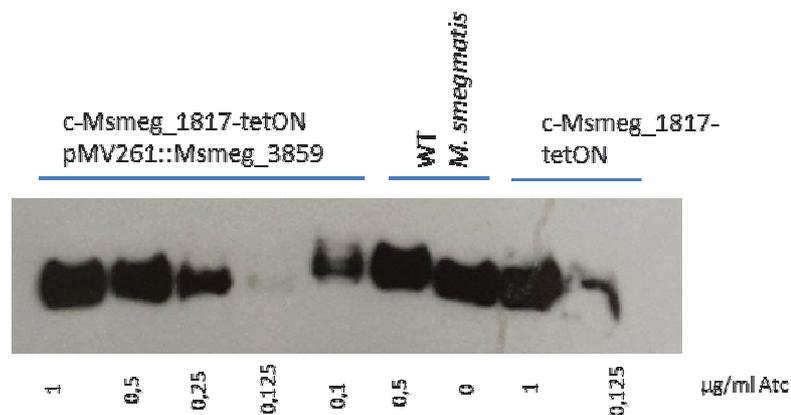


**Abb. 45: Messung des Atc-abhängigen Wachstums der konditionalen *M. smegmatis* c-Msmeg\_1817-tetON pMV261::Msmeg\_3859 Mutante.** Die konditionale PPM-Synthase-Überexpressionsmutante c-Msmeg\_1817-tetON pMV261::Msmeg\_385 (▲) wurde zusammen mit dem *M. smegmatis* Wildtyp (●) in Middlebrook 7H9 Flüssigmedium im 96-well-Mikrotiterplattenformat kultiviert. Die Bestimmung des Wachstums erfolgte nach 2 Tagen Inkubation durch einen Resazurin-Assay. Die prozentualen Berechnungen beziehen sich auf das Wachstum des Wildtyps *M. tuberculosis* bei 0 µg/ml Atc (100%). Die Werte repräsentieren Mittelwerte (n=3) und Standardabweichungen.

Unbeeinflusst von der Überexpression konnte in dieser *M. smegmatis* c-Msmeg\_1817-tetON pMV261::Msmeg\_3859 Mutante weiterhin das typische Atc-abhängige Wachstum in Flüssigkultur beobachtet werden. Auch hier erreichte das Wachstum der Mutante bei etwa 0,5 µg/ml Atc dasjenige des Wildtyps und reduzierte sich ohne Zugabe von Atc auf ungefähr 30% (Abb. 45). Dies beweist, dass eine eventuell insuffiziente Syntheserate von DPM als Ursache für

den beim Silencing des Zielgens Msmeg\_1817 beobachteten Wachstumsdefekt ausgeschlossen werden kann.

Aufgrund der Annahme, dass Msmeg\_1817 eine Flippase für lipidgebundene Zuckermoleküle ist, die möglicherweise das Flipping von DPM und DPA vermittelt, wurde auch in der DPM-Synthase Überexpressionsmutante c-Msmeg\_1817-tetON pMV261::Msmeg\_3859 ein Immunoblot des im Biosyntheseweg *downstream* angeordneten Produkts LAM durchgeführt (vgl. Hypothese in 2.5.2.3). Um die Auswirkungen der Regulation der Expression der Flippase analysieren zu können, wurden die Mutanten mit verschiedenen Atc-Konzentrationen angezogen, um eine abgestufte Repression der Genexpression der Flippase zu erzielen. Aus diesen Kulturen wurden Zelllysate hergestellt, die dann in einem Immunoblot mit Antikörpern zum spezifischen Nachweis von LAM eingesetzt wurden (siehe Abb. 46).

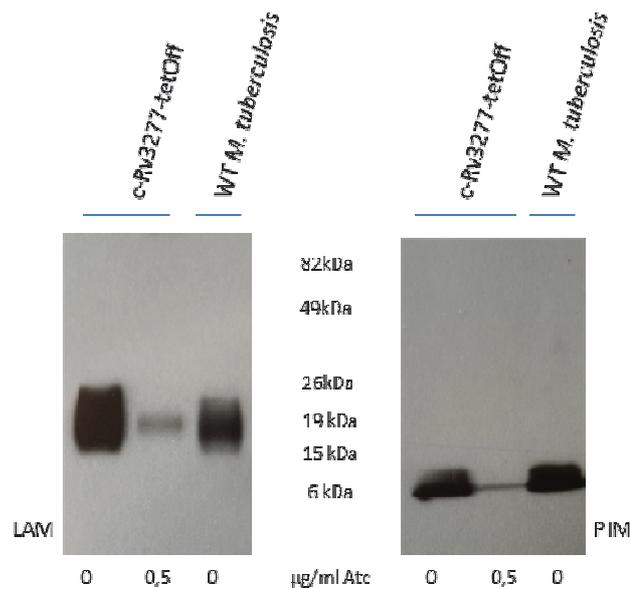


**Abb. 46: LAM Immunoblot in der *M. smegmatis* c-Msmeg\_1817-tetON pMV261::Msmeg\_3859 Mutante im Vergleich zur c-Msmeg\_1817 tetON-Mutante.** Die PPM-Synthase-Überexpressionsmutante c-Msmeg\_1817-tetON pMV261::Msmeg\_3859 sowie die nicht überexprimierende konditionale Mutante c-Msmeg\_1817-tetON und der Wildtyp von *M. smegmatis* wurden bis zu einer  $OD_{600nm} \leq 1$  angezogen und zur Herstellung von Zelllysaten eingesetzt. Je 10 µg Protein wurden für die SDS-PAGE eingesetzt und nach Transfer auf eine PVDF Membran einem Immunoblot unter Verwendung eines LAM-spezifischen monoklonalen Antikörpers unterzogen (vgl. 3.25).

Auch für c-Msmeg\_1817-tetON pMV261::Msmeg\_3859 zeigte sich, dass mit zunehmend stärkerem Silencing eine graduelle Reduktion des LAM einherging. Bei zu starkem Silencing schien sich der Effekt teilweise wieder aufzuheben, wie in der Kultur mit 0,1 µg/ml Atc mittig im Immunoblot in Abb. 45 zu sehen ist. Die vollinduzierte Mutante zeigte ein Signal für LAM auf Wildtyp-Level, während die LAM-Anteile im Wildtyp unbeeinflusst von einer Zugabe von Atc waren (Abb. 45). In Kombination mit der erhöhten DPM-Synthaseaktivität belegt dies, dass

die verminderte LAM Produktion nicht auf einer eventuell insuffizienten Syntheserate von DPM beruhen kann. Anschließend wurde in Kooperation untersucht, ob in dem Überexpressionsstamm eventuell eine Akkumulation von DPM und/oder DPA zu beobachten war, wenn die Flippase MsmeG\_1817 partiell gesilencet wurde. Eine mit der verwendeten Methode detektierbare Akkumulation der vermuteten Flippasesubstrate DPM oder DPA konnte in der konditionalen Mutante jedoch auch hier wiederum nicht nachgewiesen werden (Gurdial Besra, University Birmingham, persönliche Kommunikation).

Um die *M. tuberculosis* c-Rv3277-ASS-tetOFF Mutante phänotypisch zu untersuchen und ihren Phänotyp mit der *M. smegmatis* c-MsmeG\_1817-tetON Mutante vergleichen zu können, wurde auch hier ein Immunoblot gegen LAM und PIM<sub>6</sub> durchgeführt (Abb. 47).

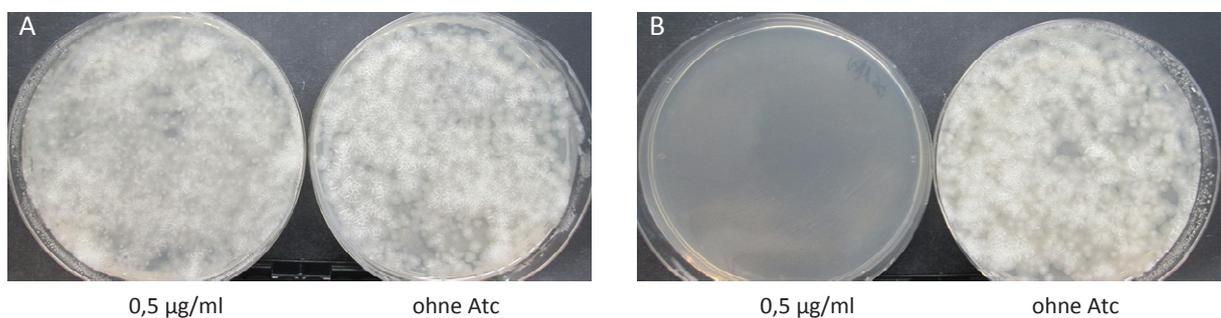


**Abb. 47: Immunoblot gegen LAM (links) und PIM<sub>6</sub> (rechts) der *M. tuberculosis* c-Rv3277-ASS-tetOFF-Mutante.** Die c-Rv3277-ASS-tetOFF-Mutante und Wildtyp *M. tuberculosis* wurden bis zu einer OD<sub>600nm</sub> ≤ 1 angezogen und zur Herstellung von Zelllysaten eingesetzt. Je 5 µg Protein wurden für die SDS-PAGE eingesetzt und nach Transfer auf eine PVDF Membran einem Immunoblot unter Verwendung eines LAM-spezifischen (links) bzw. PIM<sub>6</sub>-spezifischen (rechts) monoklonalen Antikörpers unterzogen.

Es zeigte sich, dass wie in der konditionalen *M. smegmatis* c-MsmeG\_1817-tetON Mutante auch in der konditionalen *M. tuberculosis* c-Rv3277-ASS-tetOFF Mutante unter Silencingbedingungen die *downstream* der DPM/DPA Flippase liegenden biosynthetischen Produkte LAM (Abb. 47,

links) und PIM<sub>6</sub> (Abb. 47, rechts) abnahmen, während die vollinduzierte Mutante ungefähr gleichstarke Signale wie der Wildtyp aufwies. Daher kann von einer funktionellen Homologie zwischen Msmeg\_1817 und Rv3277 ausgegangen werden.

Um die beobachteten Silencing-Phänotypen eindeutig auf die genetische Veränderung in der Mutante zurückführen zu können, wurden Komplementationen mit einer zusätzlichen Genkopie auf dem integrativen Plasmid pMV361::Rv3277-ASS und dem Leervektor als Kontrolle durchgeführt.



**Abb. 48: Komplementation der konditionalen *M. tuberculosis* c-Rv3277-ASS-tetOFF-Mutante.** Die c-Rv3277-ASS-tetOFF-Mutante wurde unter vollinduzierenden Bedingungen ohne Atc bis zu  $OD_{600nm} \leq 0,8$  angezogen und zur Herstellung kompetenter Zellen verwendet. Die Transformation erfolgte mit dem Plasmid pMV361::Rv3277-ASS (A) bzw. mit dem Leervektor pMV361 (B). Die Zellen wurden nach der Elektroporation und einer Regenerationsphase von ungefähr 16 Stunden auf 7H10 Middlebrook Festmedium zu gleichen Anteilen ausplattiert, einmal mit 0,5 µg/ml Atc (jeweils links im Bild) und ohne Zugabe von Atc (rechts im Bild).

Nach der Elektroporation mit dem Komplementationsplasmid pMV361:Rv3277-ASS (Abb. 48) erfolgte das Wachstum wieder unabhängig von Atc. Auf Middlebrook 7H10 Festmedium zeigt sich ein sehr gutes Wachstum der Transformanten auf Agarplatten mit 0,5 µg/ml Atc (A, links) und ohne Atc (A, rechts). Die merodiploide, konstitutiv exprimierte Genkopie konnte offenbar den Atc-abhängigen Wachstumsdefekt der konditionalen c-Rv3277-ASS-tetOFF Mutante vollständig aufheben. Eine Transformation mit dem Leervektor zeigte diesen Effekt nicht. Hier blieb das Wachstum der Mutante weiterhin strikt abhängig von Atc (Abb. 48 B). Diese Daten belegen, dass der Silencingeffekt ausschließlich auf der Regulation des Zielgens Rv3277 beruht, ohne dass eventuelle polare Effekte oder unbekannte sekundäre Mutationen hier einen relevanten Einfluss haben können.

## 5. Diskussion

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung mehrerer ABC-Typ Flippasen und einer ATP-unabhängigen Flippase, die potentiell in den Transport von Glycokonjugaten in *Mycobacterium tuberculosis* und dem nicht-pathogenen Modellorganismus *Mycobacterium smegmatis* involviert sind. Zu Charakterisierungszwecken wurden zahlreiche Mutanten generiert: Deletionsmutanten für nicht-essentielle Gene, konditionale Mutanten für essentielle Gene. Ihre Erzeugung ist trotz den zur Verfügung stehenden Methoden noch immer langwierig und technisch anspruchsvoll. In der vorliegenden Arbeit wurden drei Deletionsmutanten und drei konditionale Mutanten in *M. tuberculosis* erzeugt, sowie zwei konditionale Mutanten in *M. smegmatis*. Die phänotypische Charakterisierung dieser Mutanten sollte Hinweise auf die Funktion der Transporter und der translozierten Substrate geben.

### 5.1 Zuckerimporter: UgpAEBC

Es ist gelungen, eine vollständige Deletionsmutante der Gene des Transporters UgpA-UgpE-UgpB-UgpC in *M. tuberculosis* zu erzeugen und zu verifizieren, obwohl zumindest das für die ATP-Hydrolysedomäne UgpC kodierende Gen dieses putativen Importers als essentiell vorhergesagt wurde (Sasseti, Boyd et al. 2003, Griffin, Gawronski et al. 2011). Die Gendeletionsmutante  $\Delta ugpAEBC$  zeigte keinen Wachstumsdefekt *in vitro* (Abb. 11). Somit kann auf Basis der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse die Essentialität des Transporters zumindest für das Wachstum unter den getesteten Standardkultivierungsbedingungen nunmehr sicher ausgeschlossen werden.

Der UgpAEBC-Transporter weist Homologien zum in *E. coli* beschriebenen Importer für Glycerin-3-phosphat (G3P) auf. Basierend auf diesen Homologien wurde für den Transporter in *M. tuberculosis* eine ähnliche Funktion postuliert (Braibant, Gilot et al. 2000). Jedoch zeigt insbesondere das für den Import entscheidende Substratbindeprotein mit nur 26% Aminosäuresequenzidentität die geringste Übereinstimmung zwischen den beiden Gattungen.

Es wurde trotzdem zunächst versucht, G3P als Kohlenstoffquelle einzusetzen. G3P ist jedoch für den Wildtyp im Vergleich zu Glycerin, das im Labor als Standardkohlenstoffquelle eingesetzt wird, eine sehr ineffiziente Kohlenstoffquelle. Im Vergleich zu Glycerin lag das prozentuale Wachstum bei maximal rund 30% (vgl. Abb. 12). Dieses apparente Wachstum dürfte zudem vermutlich größtenteils auf der spontanen oder vom Bakterium vermittelten

Dephosphorylierung von G3P zu Glycerin beruhen und somit keine direkte Aufnahme und Metabolisierung von G3P widerspiegeln. Zudem zeigten sich zwischen Transporterdeletionsmutante und Wildtyp keine Unterschiede im schwachen Wachstumsniveau, die auf eine Defizienz in der Aufnahme von G3P aufgrund des fehlenden Transporters schließen lassen könnten.

Um auszuschließen, dass zwar ein Import in die Bakterien stattfindet, aber die oxidative Verwertung von G3P nicht vollständig ist und deshalb keine Bildung von Reduktionsäquivalenten erfolgt, die im Resazurin-Assay nachweisbar wären, wurde eine Cokultivierung von G3P zusammen mit einer wachstumslimitierenden Konzentration von 0,1% Glycerin unternommen. So konnte zwar eine leichte Stimulation des Wachstums in Anwesenheit von G3P beobachtet werden, diese fiel jedoch rund 25% geringer aus im Vergleich zu einer Cokultivierung von Pyruvat mit 0,1% Glycerin (Abb. 13). Höchstwahrscheinlich dürfte zudem ein Großteil der Wachstumsverstärkung wieder aus der spontanen oder vom Bakterium vermittelter Dephosphorylierung von G3P zu Glycerin beruhen. Entscheidend ist, dass erneut kein Unterschied in der Verwertung von G3P zwischen der *ΔugpAEBC* Gendeletionsmutante und dem Wildtyp festgestellt werden konnte. Eine Funktion des ABC-Transporters UgpAEBC in der Aufnahme von exogenem G3P für die Verwertung als Kohlenstoffquelle oder als Cosubstrat erscheint im Licht dieser Daten daher sehr unwahrscheinlich.

*Escherichia coli* kann G3P als alleinige Phosphatquelle verwerten (Schweizer and Boos 1984). Der entsprechende UgpBAEC Transporter wird in *E. coli* nur unter Phosphatmangelbedingungen aktiv und bei Konzentrationen oberhalb von 0,5 mM anorganischem Phosphat auf enzymatischer Ebene gehemmt (Brzoska, Rimmele et al. 1994). Um eine mögliche Rolle des Transporters UgpAEBC in der Verwertung von G3P als Phosphatquelle für *M. tuberculosis* zu untersuchen, wurde ein Phosphatmangelmedium entwickelt. Dieses Medium ist statt über Na/K<sub>2</sub>-Phosphat über TRIS gepuffert und erlaubt die Untersuchung des Wachstums von *M. tuberculosis* mit G3P als alleinige Phosphatquelle. G3P konnte jedoch vom *M. tuberculosis* Wildtyp praktisch nicht als Phosphatquelle verwertet werden. Selbst in Konzentrationen von 100 mM zeigte sich maximal ein Wachstum von etwa 5% im Vergleich zur anorganischen Phosphatquelle (Abb. 14). Ein Unterschied zwischen Wildtyp und Transporterdeletionsmutante in der schwachen Verwertung von G3P als Phosphatquelle war nicht zu erkennen.

Zeitgleich mit den in dieser Arbeit generierten Daten, wurden computerbasierte Strukturanalysen der Bindetasche von UgpB in *M. tuberculosis* vorgenommen (Jiang, Zhang et al.

2014). Sie beschreiben für *M. tuberculosis* im Vergleich zu *E. coli* einen kritischen Aminosäureaustausch. Während sich in *E. coli* an Position 169 die aromatische Aminosäure Tryptophan befindet, ist dieser Aminosäurerest in *M. tuberculosis* an der vergleichbaren Position 205 gegen ein hydrophobes Leucin ausgetauscht worden. Computerbasierte molekulare *docking* Studien zeigten, dass dadurch die Bindungsaffinität von UgpB für G3P abnimmt und stattdessen Glycerophosphocholin mit hoher Affinität binden kann (Jiang, Zhang et al. 2014). Diese *in vitro* Daten legen nahe, dass Glycerophosphocholin mit höherer Wahrscheinlichkeit als G3P als Transportersubstrat dienen könnte. Daher wurden Wachstumsversuche mit Glycerophosphocholin und einem Cadmiumsalz des Glycerophosphocholins unternommen (Abb. 15 und 16). Beide Glycerophosphocholine wurden auf ihre Eignung als alleinige Kohlenstoffquelle sowie als alleinige Phosphatquelle hin untersucht. Die Zugabe von 50 mM Glycerophosphocholin war jedoch nicht in der Lage, das Wachstum des *M. tuberculosis* Wildtyps über das basale Hintergrundwachstum ohne Kohlenstoff- bzw. Phosphatquelle hinaus zu stimulieren. Ferner war kein Unterschied zwischen Wildtyp und  $\Delta ugpAEBC$  Mutante im Wachstum zu erkennen. Somit konnten keine Hinweise darauf gewonnen werden, dass G3P oder Glycerophosphocholin über den Importer UgpAEBC in die Zelle aufgenommen und anschließend als Kohlenstoff- oder Phosphatquelle verstoffwechselt werden. Obwohl diese Befunde formal weder die Bindung, noch den Transport der genannten Moleküle über diesen Transporter endgültig ausschließen, ist dies jedoch sehr unwahrscheinlich. Die Funktion und das Substrat von UgpAEBC bleiben daher ungeklärt. Es kann aktuell auch nicht ausgeschlossen werden, dass UgpAEBC unter den hier getesteten Bedingungen möglicherweise nicht exprimiert wird, enzymatisch nicht aktiv ist oder es einen Transporter mit einer redundanten Aufnahmefunktion gibt, der den Transporterverlust in der Deletionsmutante vollständig kompensieren kann.

In weiterführenden Untersuchungen sollte daher das Spektrum möglicher Substrate ausgeweitet werden. Dies könnte, wie am Beispiel des ABC-Transporters Rv2041c-Rv2038c demonstriert, durch phänotypische Mikroarrays zur differentieller Verwertbarkeit einer großen Vielzahl potentieller Kohlenstoff- und Phosphatquellen zwischen *M. tuberculosis* Wildtyp und Mutante erfolgen. Sinnvoll wären solche umfangreichen Untersuchungen jedoch nur, wenn dem Transporter eine Rolle in der Virulenz des Pathogens zukommt.

Um die Funktionalität des Importers *in vivo* für *M. tuberculosis* zu klären, wären Mausinfektionen mit Wildtyp und Gendeletionsmutante sinnvoll, um die Bedeutung im Tiermodell zu analysieren. Es ist denkbar, dass der Transporter im Infektionsverlauf *in vivo*, trotz

des bisherigen Fehlens eines detektierbaren Phänotyps *in vitro*, wichtig für die Virulenz von *M. tuberculosis* ist. Bei dem zu importierenden Substrat könnte es sich entweder um Wirtsmoleküle oder vom Bakterium selbst stammenden Moleküle handeln, die in den bisherigen *in vitro* Tests nicht untersucht worden sind. Sollte sich eine Funktion als Virulenzfaktor tatsächlich nachweisen lassen, könnte versucht werden, durch Inkubation der gereinigten Bindedomäne UgpB mit Zelllysaten von humanen Makrophagen oder von *M. tuberculosis*-Zellen gezielt Moleküle anzureichern, die hieran binden können und daher potentielle Transportersubstrate darstellen könnten.

### 5.2 Zuckerimporter: Rv2041c-Rv2040c-Rv2039c-Rv2038c

Bei der Analyse dieses putativen Importers wurde zunächst eine für das gesamte Operon defiziente Mutante  $\Delta$ Rv2041c-Rv2038c in *M. tuberculosis* erzeugt und deren Genotyp verifiziert. Die Deletion des Operons führte zu keinem Wachstumsdefekt *in vitro* (vgl. Abb. 17). Das Substratbindeprotein des Transporters - nicht jedoch die übrigen Komponenten des Transporters - wurde aufgrund einer genomweiten Microarray-basierten Analyse eines Transposonmutantenpools als essentiell vorhergesagt (Sasseti, Boyd et al. 2003). Jedoch konnte in einer vergleichbaren, auf Genomsequenzierung basierten Analyse diese Vermutung nicht untermauert werden (Griffin, Gawronski et al. 2011). Die erfolgreiche Erzeugung der Gendeletionsmutante in dieser Arbeit beweist nun, dass weder das Substratbindeprotein noch der gesamte Transporter essentiell für das Wachstum von *M. tuberculosis in vitro* sind.

Die Deletionsmutante wurde in phänotypischen Microarrays mithilfe des Biolog-Systems auf ihren Metabolismus verschiedener Kohlenstoffverbindungen hin untersucht und ihr Wachstumsverhalten mit dem des Wildtyps verglichen. Die Anzahl der vom Wildtyp *M. tuberculosis* gut metabolisierbaren Kohlenstoffquellen erwies sich als gering. Eine vergleichbare Beobachtung wurde von einer anderen Arbeitsgruppe gemacht, die bei Verwendung eines leicht unterschiedlichen Basismediums eine Verwertung von 71 der getesteten 390 Kohlenstoffquellen konstatierten (Khatri, Fielder et al. 2013). In weitgehender Übereinstimmung mit dieser publizierten Studie konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass Glycerin, Monomethylsuccinat, Tween 80, Pyruvat und Butyrat sowie 18 weitere Substanzen durch den *M. tuberculosis* Wildtyp sehr gut als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle metabolisiert werden können und 28 weitere ein moderates Wachstum erlauben (vgl. Abb. 18, 19 und 20).

Unter der Annahme, dass die Inaktivierung des Transporters die Aufnahme des spezifischen Transportersubstrats in die Zelle verhindert, und in Folge dessen das Wachstum auf diesem Substrat zumindest stark beeinträchtigt sein muss, wurden in kohlenstofffreiem Medium die Metabolisierungsleistungen des Wildtyps mit denen der  $\Delta$ Rv2041c-Rv2038c-Mutante verglichen. Zwischen Wildtyp und Transporterdeletionsmutante zeigte sich jedoch kein reproduzierbarer Wachstumsunterschied auf Basis der von *M. tuberculosis* metabolisierbaren Kohlenstoffquellen. Der Transporter Rv2041c-Rv2038c scheint daher keine essentielle Rolle in der Verwertung dieser Substanzen zu spielen. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass entweder keine dieser verwertbaren Substanzen das Substrat dieser Permease darstellt oder dass funktional redundante Aufnahmesysteme in *M. tuberculosis* existieren, die den Defekt dieses Transporters kompensieren können. Darüber hinaus ist denkbar, dass der Transporter unter den getesteten Bedingungen (u.a. neutraler pH und normoxische Bedingungen) nicht exprimiert wird oder enzymatisch nicht aktiv ist, so dass ein prinzipiell verwertbares Molekül auch im Wildtyp nicht in die Zelle gelangt und somit gar kein Unterschied zur Deletionsmutante unter den Testbedingungen manifestieren kann.

Neben der Möglichkeit, dass dieser Transporter exogen vom Wirt stammende Moleküle aufnimmt, um diese dann als Kohlenstoff- und Energiequelle unter Infektionsbedingungen zu nutzen, sollte alternativ die Möglichkeit geprüft werden, dass Rv2041c-Rv2038c als Recyclingsystem für die Rückgewinnung zelleigener Bestandteile dient, wie es für den Trehalose-spezifischen Transporter LpqH-SugABC beschrieben wurde (Kalscheuer, Weinrick et al. 2010). Dazu wurden die Deletionsmutante und der Wildtyp in Flüssigkultur angezogen und zellfreie Überstände gaschromatographisch analysiert (Abb. 21). Die Analyse der Überstände der Mutante ergab im Vergleich zum Wildtyp allerdings keine Hinweise auf die Akkumulation einer nicht länger in das Bakterium zurücktransportierten Substanz. Daher konnte bislang keine Rolle des Transporters im Recycling endogener, vom Bakterium freigesetzter Moleküle gefunden werden, die unter den gegebenen Analysebedingungen gaschromatographisch nachweisbar wären.

Um eine mögliche Rolle des Transporters für die Virulenz von *M. tuberculosis* im Mausinfektionsmodell zu überprüfen, wurde eine niedrig dosierte Aerosolinfektion von C57BL/6-Mäusen mit der Transporterdeletionsmutante sowie einer genetisch komplementierten Transporterdeletionsmutante in Kooperation durchgeführt (siehe Abb. 22). Im Vergleich zum Wildtyp konnte jedoch weder in der akuten noch in der chronischen Infektionsphase in der Lunge oder der Milz ein attenuiertes Wachstum der  $\Delta$ Rv2041c-Rv2038c-Mutante festgestellt

werden. Der Transporter scheint daher keine wichtige, nicht-redundante Funktion für die Virulenz von *M. tuberculosis* in der Maus zu spielen. Kooperationspartner haben allerdings eine Deletionsmutante für das die Nukleotidbindedomäne (NBD) kodierende Gen Rv2041c des Transporters erzeugt und im nicht-humanen Primatenmodell getestet. In diesem Fall zeigte sich im Gegensatz zu den hier beschriebenen Daten der Mausinfektion ein stark attenuierter Phänotyp (pers. Kommunikation, Adel Malek, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, USA; Deepak Kaushal, Tulane National Primate Research Center, New Orleans, USA).

Des Weiteren wurde eine Hochregulation des Substratbindepoteins Rv2041c in Anwesenheit von 3 mM Acetat ([www.tbdb.org](http://www.tbdb.org), Samples and Conditions with significant expression of Rv2041c, Yang Liu and Gary Schoolnik's Unpublished Carbon Sources Data) und unter hypoxischen Bedingungen (Shin, Kim et al. 2009) beobachtet. Beide Faktoren – saures Milieu, verringerter Sauerstoffgehalt – würde den Bedingungen entsprechen, denen *M. tuberculosis* bei der intrazellulären Replikation in Makrophagen ausgesetzt ist. Die Hochregulation unter Hypoxie würde eher für eine Bedeutung in der chronischen Infektionsphase sprechen, die im Menschen durch die Bildung von nekrotisierenden, verkästen Granulome gekennzeichnet ist. Mausinfektionen zeigen keine Bildung solcher nekrotisierender Granulome (Saunders and Britton 2007, Ordway and Orme 2011). Die Bedeutung des Transporters in der Infektion *in vivo* kann also im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend beurteilt werden. Denkbar wäre jedoch, dass sich in nicht-humanen Primatenmodellen aufgrund des zur Maus unterschiedlichen Mikromilieus in den Granulomen erst seine tatsächliche Bedeutung für die Virulenz und Pathogenese erkennen lässt. Darüber hinaus wäre eine differentielle Untersuchung von *M. tuberculosis* Wildtyp und Deletionsmutante unter hypoxischen Bedingungen in phänotypischen Microarrays lohnenswert, weil die Permease Rv2038c-Rv2041c möglicherweise erst unter diesen Bedingungen exprimiert wird oder enzymatisch aktiv ist und somit erst dann ein für den Wildtyp prinzipiell nutzbares Substrat in die Zelle aufgenommen werden kann.

### 5.3 Zellwandsynthese-involvierte Kohlenhydratexporter: Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c

Die Gene Rv1456c-1457c-Rv1458c sind zunächst als Gencluster für einen ABC-Exporter beschrieben worden, bei dem es sich mutmaßlich um eine Antibiotika-Effluxpumpe handelt (Braibant, Gilot et al. 2000). Darüber hinaus sind die drei potentiellen Transporterkomponenten Rv1456c, Rv1457c und Rv1458c in klinischen Isolaten, die gegen mindestens eines der

Antibiotika der ersten Linie resistent sind, auf mRNA-Ebene hochreguliert (Hao, Shi-Liang et al. 2011). Bis auf die TMD Rv1458c sind alle Komponenten als essentiell vorhergesagt worden (Sasseti, Boyd et al. 2003, Griffin, Gawronski et al. 2011). Da die postulierte Essentialität der Gene eher auf eine basalere Funktion als den Efflux von Antibiotika schließen lässt, war die dieser Arbeit zugrunde liegende Hypothese, dass Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c einen Exporter für einen Zellwandbestandteil darstellt. Am wahrscheinlichsten erschien aufgrund der im Gencluster nachfolgenden Mannosyltransferase Rv1459c ein Export eines mannosylierten Zellwandbestandteils wie das Phosphatidylinositol-tetramannosid (PIM<sub>4</sub>) als Vorstufe zur Bildung von Lipomannan (LM), Lipoarabinomannan (LAM) und höher mannosylierten Phosphatidylinositolmannosiden (PIMs) (vgl. Einleitung, Abb. 2). Aufgrund der vermuteten Essentialität wurde zunächst versucht, konditionale Mutanten für alle Komponenten des Transporters zu erzeugen. In den erzeugten konditionalen Mutanten für die Gene Rv1456c, Rv1457c und Rv1458c konnte jedoch keine reproduzierbare Regulierbarkeit des Wachstums in Abhängigkeit von Atc beobachtet werden. Nur für die stromaufwärts der eigentlichen ABC-Transporterkomponenten liegende Mannosyltransferase Rv1459c (Mishra, Alderwick et al. 2008) konnten konditionale Mutanten in *M. tuberculosis* erzeugt werden, in der das Silencing des Gens einen apparenten Wachstumsdefekt hervorrief (vgl. Abb. 23). Diese Daten deuteten darauf hin, dass Rv1456c, Rv1457c und Rv1458c entgegen der Vorhersage nicht essentiell für das Wachstum *in vitro* unter den getesteten Bedingungen ist. Tatsächlich ist es gelungen, eine Deletionsmutante der NBD Rv1457c und der TMD Rv1458c in *M. tuberculosis* zu erzeugen, ohne dass eine Beeinträchtigung des *in vitro* Wachstums im Vergleich zum Wildtyp resultierte (Abb. 24). Dies beweist somit eindeutig die Nicht-Essentialität dieser Transporterkomponenten *in vitro*.

Es ist gelungen, Deletionsmutanten der NBD Rv1457c und der TMD Rv1458c in *M. tuberculosis* zu erzeugen, ohne dass eine Beeinträchtigung des *in vitro* Wachstums im Vergleich zum Wildtyp resultierte (Abb. 24). Da das postulierte Substrat des Transporters PIM<sub>4</sub> sein könnte, wurde ein Immunoblot auf LAM durchgeführt. LAM ist ein Produkt, das im Biosyntheseweg stromabwärts von PIM<sub>4</sub> liegt und damit von dessen Transport über die Cytoplasmamembran abhängig ist. Im Immunoblot (Abb. 25) zeigte sich jedoch kein Unterschied im Anteil des LAMs in Proteinlysaten von Wildtyp und  $\Delta$ Rv1457c-Rv1458c-Mutante, sodass geschlossen werden kann, dass das translozierte Substrat keine Vorstufe zur Biosynthese von LAM ist oder eine redundante Permease den Funktionsverlust vollständig kompensieren kann. Denkbar ist, dass der Transporter jedoch am Export anderer, bislang unbekannter Zellwandbestandteile beteiligt ist. Umfangreiche chemische Analysen der relativen Zusammensetzung der Zellwandglykokonjugate

und Lipide der Mutante könnten Hinweise darauf ergeben. Ebenso muss bedacht werden, dass es sich bei Rv1456c-1457c-Rv1458c möglicherweise doch um eine Antibiotikaeffluxpumpe handeln könnte, wie schon früher von anderen Arbeitsgruppen vermutet (Braibant, Gilot et al. 2000, Hao, Shi-Liang et al. 2011). Zur Klärung dieser Frage könnten Suszeptibilitätstests gegenüber verschiedenen Antibiotika vorgenommen werden, in denen die Deletionsmutante  $\Delta$ Rv1457c-Rv1458c mit dem Wildtyp verglichen wird. Handelt es sich um eine Effluxpumpe, sollte die Deletionsmutante eine höhere Suszeptibilität als der Wildtyp aufweisen, der weiterhin zum Ausschleusen von Antibiotika befähigt ist. Mit einem Überexpressionsstamm von Rv1457-Rv1458 unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors wie dem HSP60-Promotor könnten ähnliche Versuche durchgeführt werden. Würde die Effluxpumpe überexprimiert, sollte der Überexpressionsstamm dann eine entsprechend relativ höhere Resistenz gegenüber den umso effektiver ausgeschleusten Antibiotika aufweisen.

Um die Bedeutung des Transporters für die Virulenz zu analysieren, wurden THP-1-Zellen mit *M. tuberculosis* Wildtyp und Deletionsmutante durchgeführt. In dieser Infektion zeigte sich eine Attenuierung der Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 26). Daher wurde eine Analyse der Zytokine im Überstand der infizierten THP-1-Zellen durchgeführt (Abb. 27). Es zeigte sich deutlich, dass MCP-1/CCL2 und RANTES/CCL5, ebenso wie IL-8 für  $\Delta$ Rv1457c-Rv1458c deutlich verringerte Signale geben. Kurashima und Mitarbeiter haben die Broncheolarlavage von Patienten während der akuten Phase der pulmonaren Tuberkulose untersucht und erhöhte Level der auch in diesem Screen auffällig gewordenen Cytokine IL-8, MCP-1 und RANTES beschrieben (Kurashima, Mukaida et al. 1997). Das durch TNF $\alpha$  aktivierte MCP-1 und RANTES dienen der Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen (Flores-Villanueva, Ruiz-Morales et al. 2005). IL-8 ist an der Rekrutierung von T-Lymphozyten während der Infektion mit *M. tuberculosis* beteiligt (Krupa, Fol et al. 2015). Die Ausschüttung von IL-8 in THP-1 Zellen als Reaktion auf eine Infektion mit *M. tuberculosis* wurde von (Friedland, Remick et al. 1992) beschrieben und konnte für den Wildtyp gut reproduziert werden. Kürzlich wurde eine direkte Bindung von IL-8 an *M. tuberculosis* beschrieben, die Neutrophile und Makrophagen bei der Phagozytose und Abtötung der Bakterien unterstützt (Krupa, Fol et al. 2015). Ein erhöhtes Level an MCP-1 korreliert außerdem mit dem Schweregrad der Erkrankung in Patienten mit pulmonaler Tuberkulose (Hasan, Zaidi et al. 2005, Hasan, Cliff et al. 2009). In der spinalen Form der Tuberkuloseerkrankung wurde beschrieben, dass Infektionen mit virulenten Stämmen von *M. tuberculosis* zur erhöhten Produktion von RANTES in Osteoclasten führt, während die Infektion mit einem avirulenten Stamm zu einer verringerten Ausschüttung führt (Hoshino, Hanada et al. 2014). Dass alle drei Zytokine während der Infektion mit der Deletionsmutante  $\Delta$ Rv1457c-

Rv1458c weniger stark als in der Infektion mit dem Wildtyp ausgeschüttet werden, stützt die Hinweise auf eine Attenuierung der Deletionsmutante. Aufgrund der geringeren Virulenz der Mutante werden auch weniger Signale zur Rekrutierung von Makrophagen und Lymphozyten ausgeschüttet. Um eine Attenuierung der Mutante *in vivo* zu überprüfen, würde eine Infektion von Mäusen in Zukunft wichtige Hinweise liefern. Angesichts der möglichen Bedeutung für die Virulenz wäre es sicher lohnenswert, weitere Untersuchungen zur bislang nicht aufgeklärten Funktion und Substratspezifität dieser Permease zukünftig zu unternehmen.

#### **5.4 Zellwandsynthese-involvierte Kohlenhydratexporter: Rv3781c-Rv3783c und Rv3782 und dessen Homolog in *M. smegmatis* Msmeg\_6366**

Da die Gene des Transporters Rv3781-Rv3783 (*rfbE-rfbD*) zu Beginn des Genclusters der Arabinogalactanbiosynthese liegen und sie zudem das Gen für die Galactofuranosyltransferase GltT1, kodiert von Rv3782, flankieren, wurde für diesen ABC-Transporter bereits eine mögliche Rolle im Export des Galactanrückgrats des Arabinogalactans (AG) diskutiert (Dianiskova, Kordulakova et al. 2011). Beide Transporterkomponenten sowie Rv3782 wurden in *M. tuberculosis* als essentiell vorhergesagt (Sasseti, Boyd et al. 2003, Griffin, Gawronski et al. 2011). Für die Charakterisierung des Transporters wurden individuelle konditionale Mutanten für die Komponenten Rv3781 und Rv3783 sowie für die Galactosyltransferase Rv3782 erzeugt. Durch eine phänotypische Charakterisierung von partiell gesilenceten konditionalen Mutanten sollten im Anschluss Erkenntnisse über die Funktion und Substratspezifität des untersuchten ABC-Transporters gewonnen werden. Das Silencing aller drei konditionalen Mutanten resultierte in einem deutlichen Wachstumsdefekt, was stark auf die essentielle Funktion der analysierten Gene hinweist. Durch genetische Komplementation mit einer merodiploid konstitutiv exprimierten Genkopie des jeweiligen Zielgens, konnte für Rv3782 und Rv3783 eine vollständige Reversion des Silencingphänotyps erzielt werden. Dies belegt eindeutig, dass die beobachteten Effekte ausschließlich auf der Regulation des jeweiligen Zielgens beruhen und eventuelle polare Effekte oder sekundäre Mutationen hierbei nicht relevant beteiligt sind. Im Falle von Rv3781 konnte durch Komplementation mit dem Zielgen der Silencingphänotyp zwar zum Großteil, jedoch nicht vollständig kompensiert werden. Auch durch konstitutive heterologe Expression des stromabwärts von Rv3781 gelegenen Gens Rv3782 konnte eine partielle Komplementation erzielt werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Effekt, der im Silencing der *M. tuberculosis* c-Rv3781-tetOFF Mutante zu beobachten ist, nicht nur auf der Regulation der

Transkription von Rv3781 beruht, sondern zum Teil auch auf einen offensichtlichen polaren Effekt auf das nachfolgende essentielle Gen Rv3782 zurückgeführt werden kann. Diese Beobachtung ist nicht vollkommen unerwartet, da alle drei relevanten Gene hintereinander liegen und vermutlich als Operon organisiert sind, sodass ein Silencing des Gens Rv3781 auch einen Effekt auf das nachfolgende Gen Rv3782 ausüben kann (vgl. auch Abb. 10 und 11). Obwohl dies im Verlauf dieser Arbeit nicht weiter analysiert worden ist, scheint das Gen Rv3783 noch über einen eigenen Promoter zu verfügen, da das Silencing von Rv3782 keinen apparenten polaren Effekt auf Rv3783 verursacht hat. Der polare Effekt auf das Gen der essentiellen Galactosyltransferase GlfT1 (Rv3782) resultiert in einem überlappenden, additiven Phänotyp, so dass aus der phänotypischen Charakterisierung der partiell gesilenceten c-Rv3781-tetOFF Mutante keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Funktion des untersuchten ABC-Transporters gezogen werden können. Zu weiteren Untersuchungen des Transporters sollte daher die teilkomplementierte Mutante c-Rv3781-tetOFF pMV361::Rv3782 oder die Mutante c-Rv3783-tetON verwendet werden.

In einer Abtötungskinetik für die *M. tuberculosis* c-Rv3783-tetON-Mutante konnte gezeigt werden, dass das Silencing des essentiellen ABC-Transporters zunächst eine bakterizide Wirkung hat. Im weiteren Verlauf wurde die Analyse jedoch durch das rasche Auswachsen von spontan nicht-regulierten Mutanten, die auch in Abwesenheit von Atc wachsen können, erschwert. Die relativ hohe Rate von spontan nicht-regulierten Mutanten stellt ein generelles großes Problem bei der Charakterisierung konditionaler Mutanten dar. Unter Silencingbedingungen entstehen Mischkulturen aus regulierten und nicht-regulierten Klonen, die sich phänotypisch wie der Wildtyp verhalten. Dadurch können die Effekte, die das Silencing des Gens auf die Bakterien hat, nicht mehr klar beobachtet und analysiert werden können.

Um die nachfolgenden Experimente zur phänotypischen Analyse effizienter zu gestalten, wurden die weiteren Untersuchungen in Mutanten von *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 durchgeführt. Hier wurde Msmeg\_6366, das Homolog zu Rv3781, genauer untersucht. In *M. smegmatis* werden die hintereinander liegenden Gene Msmeg\_6366-6367-6369 cotranskribiert (Dianiskova, Kordulakova et al. 2011), wie es vermutlich auch in *M. tuberculosis* angesichts der Teilkomplementation der konditionalen Mutante von Rv3781 durch Transformation mit pMV361::Rv3782 der Fall ist. Es war möglich, gut regulierte tetON-Mutanten von Msmeg\_6366 zu erzeugen (Abb. 32). Wie für die konditionale Mutante c-Rv3781-tetOFF beschrieben, führte die Komplementation mit dem Zielgen zu einer weitgehenden, aber nicht vollständigen Aufhebung des Silencingeffekts. Auch durch heterologe, konstitutive Expression der

nachfolgenden Galactosyltransferase Msmeg\_6367 konnte wiederum aufgrund des polaren Effekts eine teilweise Komplementation erzielt werden. Erst eine zweite Kopie des gesamten Operons führte schließlich zu einer vollständigen Komplementation (Abb. 33). Die weitreichenden Homologien und die identische Genorganisation der Transporter in *M. tuberculosis* und *M. smegmatis* mit einer Cotranskription des NBD-Gens und des nachfolgenden Galactosyltransferase-Gens lassen vermuten, dass die Funktion des ABC-Transporters in *M. tuberculosis* und *M. smegmatis* hochwahrscheinlich identisch ist.

Da der Transporter als Exporter für LAM beschrieben worden ist (Braibant, Gilot et al. 2000), wurde für die konditionale c-Msmeg\_6366-tetON Mutante ein Immunoblot gegen LAM durchgeführt. Es zeigte sich, dass mit zunehmendem Silencing des Gens Msmeg\_6366 der Anteil an LAM in den Zelllysaten zunimmt (Abb. 34). Wäre der Transporter in den Export von LAM involviert, sollte der Anteil des LAM während des Silencing abnehmen. Da er aber stattdessen ansteigt, ist die Hypothese, dass Rv3781-Rv3783 ein Exporter für Galactan darstellt umso wahrscheinlicher. Wie in Abb. 3 dargestellt, exportiert Rv3781-Rv3783 die Galactankette, die auf der periplasmatischen Seite zum Arabinogalactan (AG) arabinosyliert wird. Es ist vorstellbar, dass durch den verringerten Export der Galactankette Decaprenolphosphoarabinose (DPA) im Überschuss ungenutzt auf der periplasmatischen Seite vorhanden ist und statt in die AG Synthese zu fließen, verstärkt in die Biosynthese von LAM umgeleitet wird. LAM würde demnach als Arabinoseshunt für überschüssiges DPA dienen. In der komplementierten Mutante, die zusätzlich das gesamte Operon trägt, liegen die LAM-Level wieder in etwa auf Wildtyp-Niveau. Die konditionale Mutante c-Msmeg\_6366, die eine zusätzliche Kopie des Gens Msmeg\_6366 trägt, zeigte einen intermediären, jedoch wie aufgrund des polaren Effekts auf die nachfolgende Galactosyltransferase erwartet, keinen vollständig komplementierten Phänotyp (Abb. 35).

Somit war die Arbeitshypothese, dass der Transporter in den Export der Galactankette für die nachfolgende Bildung von AG involviert ist (vgl. Abb. 3). Ein Silencing der Transportergene sollte daher initial zwei prinzipielle phänotypische Konsequenzen zur Folge haben. Zum einen sollte der Gehalt an AG in der Zellwand abnehmen, zum anderen sollte unprozessiertes Galactan und eventuelle Vorstufen in der Zelle akkumulieren. In diesem Sinne wäre eine Detektion von Arabinogalactan im Immunoblot ein wünschenswerter geeigneter, direkter Nachweis. Da Antikörper gegen bakterielles AG bislang nicht verfügbar sind, wäre ein Versuch mit den erhältlichen Antikörpern gegen das pflanzliche AG denkbar. Der monoklonale Antikörper LM5 erkennt jedoch vor allem Moleküle, die drei hintereinanderfolgende Einheiten von  $\beta(1\rightarrow4)$ -verknüpften Galactaneinheiten aufweisen (Jones, Seymour et al. 1997). Da das Galactanrückgrat

im bakteriellen AG alternierend  $\beta(1\rightarrow5)$ -  $\beta(1\rightarrow6)$ -verknüpft vorliegt, ist es jedoch nicht wahrscheinlich, dass ein solcher Blot verlässliche Resultate liefert. Erfolgversprechender wäre hier die chemische Analyse von Präparationen der mycobakteriellen Zellwand und eine quantitative Analyse der Komponenten. Da AG jedoch ein quervernetzter Bestandteil des mycolyl-Arabinogalactan-Peptidoglycan-(mAGP)-Komplex ist, sind Analysen des AG-Gehalts der Zellen und der relativen Arabinose-Galactose-Zusammensetzung des AG nicht trivial. Im Rahmen dieser Arbeit wurden entsprechende vergleichende Analysen von *M. smegmatis* Wildtyp und der konditionalen c-Msmeg\_6366-tetON Mutante im vollinduzierten und partiell gesilenceten Zustand in Kooperation bereits initiiert (AG Besra, University of Birmingham, UK). Aufgrund der begrenzten Zeit konnten diese Analysen jedoch bislang noch nicht abgeschlossen werden, so dass die postulierte Funktion dieses ABC-Transporters momentan noch nicht vollständig geklärt werden konnte. Für die gereinigte NBD Rv3781 konnte allerdings in *in vitro* Experimenten gezeigt werden, dass sie zum einen Galactan spezifisch binden kann und dass sich zum anderen die ATPase-Aktivität in Gegenwart des zu transportierenden Substrats Galactan dosisabhängig verstärkt (pers. Kommunikation, Luke Alderwick, University of Birmingham, UK). Dieser Befund stützt zusätzlich die dieser Arbeit zugrundeliegende Annahme, dass Rv3781 Teil eines ABC-Transporters ist, der unter ATP-Verbrauch am Flipping von Galactan beteiligt ist.

### 5.5 Zellwandsynthese-involvierte Kohlenhydratexporter: Msmeg\_1817 und Rv3277

Das Gen Msmeg\_1817 kodiert für eine GtrA-ähnliche Flippase, wie sie aus *Shigella flexneri* bekannt ist. Während in *Shigella* Glucose transloziert wird, ist die hier zugrunde liegende Vermutung, dass Msmeg\_1817 im Flipping von DPA oder Decaprenophosphomannose (DPM) involviert ist (vgl. Abb. 4 und 5). Es ist gelungen, eine gut regulierte tetON-Mutante von Msmeg\_1817 mit streng Atc-abhängigem Wachstum zu erzeugen (vgl. Abb. 36). Weiterhin konnte der Silencingeffekt durch konstitutive Expression des Zielgens vollständig komplementiert werden. Damit ist der Beweis erbracht, dass Msmeg\_1817 in *M. smegmatis in vitro* ein essentielles Gen darstellt. Eine relevante Beeinflussung der beobachteten Phänotypen durch polare Effekte oder sekundäre Mutationen können sicher ausgeschlossen werden. Das Homolog zu Msmeg\_1817 in *M. tuberculosis* ist Rv3277. Auch für Rv3277 ist im Rahmen dieser Arbeit eine gut regulierbare konditionale Mutante in *M. tuberculosis* erzeugt worden, nachdem anstelle des annotierten Startcodons ein rund 150 Basenpaare später liegendes alternatives Startcodon verwendet worden ist (vgl. Abb. 36 und 37). Das Homolog in *M. tuberculosis* besitzt

also keine, wie zunächst aufgrund der Annotation angenommen werden musste, zusätzliche N-terminale Domäne. Auch hier konnte der Silencingeffekt durch konstitutive Expression des Zielgens vollständig komplementiert werden. Durch die Reannotation des Startcodons ist es daher gelungen, die Essentialität von Rv3277 für *M. tuberculosis in vitro* zweifelsfrei nachzuweisen. Weil der Silencingeffekt in der konditionalen *M. smegmatis* c-Msmeg\_1817-tetON Mutante auch durch heterologe konstitutive Expression von Rv3277 vollständig komplementierbar war, ist eine funktionale Kongruenz der beiden Homologe aus *M. smegmatis* und *M. tuberculosis* sehr wahrscheinlich. Die in *M. smegmatis* erzielten Befunde dürften sich also direkt auch auf *M. tuberculosis* transferieren lassen.

Um die Konsequenzen des Silencings beurteilen zu können, wurde die konditionale *M. smegmatis* Msmeg\_1817-tetON Mutante nun phänotypischen Analysen unterzogen. Auf Basis der postulierten Funktion als Flippase für DPA und/oder DPM sollte ein Silencing des Transportergens initial zwei prinzipielle phänotypische Konsequenzen zur Folge haben. Zum einen sollte der Gehalt an Zellwandmolekülen wie LM, LAM, PIM<sub>6</sub> und AG, an deren Synthese DPM- bzw. DPA-abhängige Transferasen beteiligt sind, abnehmen. Zum anderen wurde die intrazelluläre Akkumulation von DPA und/oder DPM erwartet. Tatsächlich konnte in zwei unabhängigen Nachweisverfahren beobachtet werden, dass das Silencing von Msmeg\_1817 mit einer drastischen Reduzierung des Anteils an PIM<sub>6</sub> korrelierte (Abb. 38 und 39). Ebenso resultierte das Silencing von Msmeg\_1817 in einer dramatischen Abnahme der Anteile von LM und LAM in Zelllysaten (Abb. 39 und 40). Betrachtet man nun die Komposition der Zellwandbestandteile LM und LAM (Tab. 12), so zeigt sich, dass die Mutante unter vollinduzierenden Bedingungen ein Verhältnis von Arabinose zu Mannose von 2,5:1 besitzt. Bei zunehmendem Silencing verschiebt sich das Verhältnis auf bis zu 3,4:1. Die spezifische Abnahme des Mannosegehalts deutet darauf hin, dass es sich bei Msmeg\_1817 um eine DPM-spezifische Flippase handeln könnte. Dahingegen scheint die Translokation von DPA aufgrund der Anwesenheit der beschriebenen alternativen Flippase Msmeg\_6372 und dem von ihr vermittelten DPA-Flipping offensichtlich weniger stark beeinträchtigt zu sein, so dass rein rechnerisch der Anteil der Arabinose im Verhältnis zur Mannose zunimmt. Zusätzlich wurde jedoch auch die Komposition des AG gaschromatographisch überprüft (Tab. 13). Hier zeigt sich, dass das Verhältnis von Arabinose zu Galactose unter vollinduzierenden Bedingungen bei 2,2:1 liegt. Unter Silencing-Bedingungen verschiebt sich das Verhältnis auf 1,5:1. Hier scheint der relative Arabinoseanteil also abzunehmen. Tatsächlich scheint die Flippase Msmeg\_1817 also über die vermutete Doppelspezifität zu verfügen (vgl. Abb. 4 und 5). Neben dem bevorzugten Substrat DPM flippt sie möglicherweise auch in geringeren Anteilen DPA. Unter

Silencingbedingungen steht daher nicht mehr dieselbe Menge DPA wie unter vollinduzierenden Bedingungen zur Verfügung. So verändert sich also auch die Zusammensetzung des Arabinogalactans mit einer relativen Verringerung des Arabinosegehalts im Vergleich zur Galactose.

Nicht auszuschließen ist, dass Msmeg\_1817 und Rv3277, ähnlich wie kürzlich von Kolly und Mitarbeitern für Rv3789 beschrieben, eine Art Rekrutierungsfunktion für andere Transferasen besitzt (Kolly, Mukherjee et al. 2015). Die Wahrscheinlichkeit ist jedoch gering, da die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene im Gegensatz zu Rv3789 essentiell für das *in vitro* Wachstum von *M. tuberculosis* und *M. smegmatis* sind. Darüber hinaus ergaben sich bisher keine Hinweise auf eine nicht direkte Beteiligung von Rv3277 und Msmeg\_1817 auf das Flipping von DPM und/oder DPA. Eine Aufklärung könnte nur über direkte Flippaseaktivitäts-Assays geschehen.

Bislang ist es unserem Kooperationspartner trotz Überexpression der DPM-Synthase nicht gelungen, Hinweise auf die Akkumulation der Substrate DPM oder DPA unter Silencingbedingungen der Flippase zu erhalten. Möglicherweise wird DPM rasch abgebaut oder die DPM-Synthase wird auf enzymatischer Ebene produktinhibiert, so dass sich DPM nicht im nennenswerten Umfang intrazellulär anreichern kann. Dennoch impliziert die Datenlage indirekt sehr deutlich, dass die Flippase Msmeg\_1817 tatsächlich in das Flipping des lipidgebundenen Zuckers DPM involviert ist. Höchstwahrscheinlich flippt Msmeg\_1817 nicht nur DPM, sondern auch in geringeren Anteilen DPA vom Cytoplasma ins Periplasma. Msmeg\_1817 könnte damit die redundante Flippase zu Msmeg\_6372 bilden, die als DPA-Flippase beschrieben worden ist, in deren Deletionsmutante sich zwar der Arabinosegehalt von AG und LAM reduzierte, jedoch ohne einen starken bakteriziden Effekt auf das Wachstum zu haben (Larrouy-Maumus, Skovierova et al. 2012). Aufgrund der essentiellen Funktion der Flippase für die Vitalität und Zelloberflächenmannosylierung von *M. tuberculosis* stellt diese Permease einen neuartigen, äußerst interessanten potentiellen Antibiotikawirkort dar.

## 6. Ausblick

### Kohlenhydratimporter: UgpAEBC und Rv2041c-2038c

Bislang konnten keine Hinweise auf das mögliche Substrat des ABC-Transporters UgpAEBC aus *M. tuberculosis* gewonnen werden. Bevor weitere umfangreiche Untersuchungen in dieser Richtung unternommen werden, wäre es ratsam, zunächst die Funktionalität des Importers *in vivo* zu klären. Dazu wären Mausinfektionen mit Wildtyp und Gendeletionsmutante sinnvoll, um die Essentialität *in vivo* zu analysieren. Sollte sich dabei herausstellen, dass der Transporter keine Relevanz für die Pathogenese von *M. tuberculosis* besitzt, wären weiterführende Studien weniger lohnenswert. Im Hinblick auf die Gewinnung von Hinweisen zur Funktion und Substratspezifität des Transporters könnte mit Kristallisationsversuchen und virtuellen *docking*-Studien das Bindeverhalten des periplasmatischen Substratbindeproteins UgpB näher charakterisiert werden. Eine Affinität zu Substanzen, die G3P, G3P-Diestern oder Glycerophosphocholin ähneln, sollte zunächst überprüft werden. Beispielsweise könnten Phospholipide (Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin oder Diphosphatidylglycerin) ebenfalls gute Bindungspartner darstellen. Potentielle Kandidaten könnten dann anschließend auf eine differentielle Verwertung zwischen *M. tuberculosis* Wildtyp und  $\Delta$ ugpAEBC getestet werden. Wenn ausreichende Mengen des nativen Proteins hergestellt werden können, wäre eine Affinitätschromatographie mit dem immobilisierten Substratbindeprotein UgpB sinnvoll, um das *in vivo* relevante Substrat anzureichern und durch nachfolgende chemische Analysen zu identifizieren. Makrophagenlysate mit ihrer Vielzahl an potentiellen Kohlenstoffquellen würden ein gutes Testsubstrat darstellen, aus dem durch Inkubation mit aufgereinigtem UgpB ein spezifischer Bindungspartner angereichert werden könnte. Da jedoch nur jeweils ein Substratmolekül pro Substratbindeprotein gebunden und aufgereinigt werden kann, müsste zunächst die Herstellung großer Mengen von UgpB ermöglicht werden.

Auch für den ABC-Transporter Rv2041c-Rv2038c konnten bislang keine Hinweise bezüglich Funktion und Substratspezifität erlangt werden. Da die Gendeletionsmutante  $\Delta$ Rv2041c-Rv2038c in der Maus nicht attenuiert ist und es erste Hinweise auf einen wesentlich stärkeren Effekt im nicht-humanen Primatenmodell gibt, sollten die laufenden Tierversuche mit Transposonmutanten im Primatenmodell abgewartet bzw. mit der nun zur Verfügung stehenden Deletionsmutante angestrebt werden. In diesen Experimenten sollte die Mutante hinsichtlich ihrer Attenuierung im Vergleich zur komplementierten Mutante und dem Wildtyp von *M.*

*tuberculosis* überprüft werden. *In vitro* sollten die Substratverwertungstests erneut unter Hypoxie oder unter hypoxischen Bedingungen in Kombination mit einem leicht angesäuerten pH durchgeführt werden, da eine Hochregulation des Substratbindeproteins unter hypoxischen Bedingungen und leicht saurem pH beschrieben worden ist (Shin, Kim et al. 2009). Um das Screening effizienter gestalten zu können, wäre es denkbar, zunächst einen Test unter hypoxischen Bedingungen mit Wildtypbakterien durchzuführen, um nur noch die vom Wildtyp tatsächlich unter diesen Voraussetzungen metabolisierbaren Substanzen in weiteren Tests mitzuführen. Dann könnte die Deletionsmutante durch einen *loss-of-function* der Transporterfunktion und damit verbundenem Wachstumsdefekt in weiteren Screens auffällig werden, die Hinweise auf das Transportersubstrat geben könnten.

### **Zellwandsynthese-involvierte Kohlenhydratexporter: Rv1457c-Rv1458c**

Auch für diesen ABC-Exporter bleibt die Funktion und Substratspezifität weiterhin ungeklärt. Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass diese Permease wahrscheinlich nicht an der Translokation von PIM<sub>4</sub> beteiligt ist und somit nicht die postulierte essentielle Rolle in der LM und LAM-Biosynthese spielt. Die Existenz eines redundanten Transporters kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. Da sich erste Hinweise auf eine Attenuierung des Exporters Rv1457c-Rv1458c in einem humanen Makrophageninfektionsmodell ergaben, sollte zunächst die Reversibilität des attenuierten Phänotyps sowie das unterschiedliche Zytokinprofil durch eine genetische Komplementation überprüft werden. Falls die Komplementation erfolgreich ist, sollten Tierversuche mit der Gendeletionsmutante  $\Delta$ Rv1457-Rv1458c und der komplementierten Mutante im Vergleich zum Wildtyp *M. tuberculosis* angestrebt werden. Eine Untersuchung in der Maus könnte rasch Ergebnisse über eine Attenuierung der Mutante *in vivo* liefern und damit die Bedeutung des Transporters in der Infektion klären. Eventuell wären auch Infektionsversuche in Meerschweinchen oder Primaten wünschenswert, da die Struktur der Granulome dort stärker den humanen Granulomen ähnelt und vergleichbarere Mikromilieus vorherrschen.

Da der Transporter in Gegenwart von Antibiotika hochreguliert wird (Hao, Shi-Liang et al. 2011), könnte auch der Einfluss von verschiedenen Antibiotika auf Wildtyp und Gendeletionsmutante untersucht werden. Wenn es sich bei Rv1457c-Rv1458c tatsächlich um eine Antibiotikaeffluxpumpe handelt, wäre es denkbar, dass die Deletionsmutante susceptibler gegenüber verschiedenen Antibiotika als der Wildtyp ist. Während der Wildtyp noch in der Lage ist, Antibiotika mithilfe von Rv1457c-Rv1458c auszuschleusen, würde dieser Mechanismus der Deletionsmutante nicht mehr zur Verfügung stehen. Die Wirkung der Antibiotika sollte sich

$\Delta$ Rv1457c-Rv1458c in deshalb tendenziell verstärken. Würde eine entsprechende Überexpressionsmutante generiert, die Rv1457c-Rv1458c konstitutiv exprimiert, könnte diese Mutante umgekehrt eine höhere Resistenz gegenüber den ausgeschleusten Antibiotika aufweisen.

### **Zellwandsynthese-involvierte Kohlenhydratexporter: Rv3781-Rv3783 und Msmeg\_6366-Msmeg\_6369**

Die in dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse belegen zweifelsfrei die essentielle Bedeutung des putativen ABC-Exporters Rv3781-Rv3783 für das *in vitro* Wachstum von *M. tuberculosis*. Während das Homolog zu Rv3781 in *M. smegmatis* (Msmeg\_6366) ebenfalls als essentiell nachgewiesen werden konnte, ist das Homolog zu Rv3783 (Msmeg\_6369) überraschenderweise nicht essentiell. Hier scheint ein redundantes Transmembranprotein dessen Funktion übernehmen zu können. Da ein solches redundantes Protein im humanpathogenen Bakterium *M. tuberculosis* offensichtlich fehlt, ist die Suche nach der molekularen Ursache der Nicht-Essentialität von Msmeg\_6369 in *M. smegmatis* jedoch nur von akademischen Interesse. Aufgrund der nachgewiesenen Essentialität stellt der ABC-Exporter Rv3781-Rv3783 einen neuartigen potentiellen Antibiotikawirkort dar. Ein direkter Nachweis für die Beteiligung des Exporters am Transport von Galactan und damit an der Biosynthese von AG fehlt jedoch bislang. Erste Schritte in diese Richtung wäre der Nachweis des reduzierten AG Gehalts in partiell gesilenceten Zellen der konditionalen Mutanten sowie die Akkumulation von Galactanvorstufen. Da AG jedoch mit anderen Zellwandkomponenten den quervernetzten Supermakromolekülkomplex mAGP bildet, ist die Aufreinigung sowie die qualitative und quantitative Analyse von mycobakteriellem AG im nativen Zustand sehr anspruchsvoll. Routinemäßig erfolgt daher nur die gaschromatographische Analyse der Zuckermonomere Arabinose und Galactose nach Hydrolyse von Zellwandpräparationen. Die Durchführung dieser Analysen der konditionalen Mutanten sind mit einem Kooperationspartner (AG Gurdyal Besra, University of Birmingham, UK) aktuell in Planung. Dies wird nähere Erkenntnisse zur hypothetischen Funktion liefern.

### Zellwandsynthese-involvierte Kohlenhydratexporter: Rv3277 und MsmeG\_1817

Für die GtrA-homologe Flippase Rv3277 und ihr Homolog in *M. smegmatis*, MsmeG\_1817, konnte im Rahmen dieser Dissertation eindeutig eine essentielle Rolle für das *in vitro* Wachstum von *M. tuberculosis* bzw. *M. smegmatis* sowie für die Biosynthese von mannosylierten Zelloberflächenglykokonjugaten demonstriert werden. Die Annotierung von Rv3277 im Genom von *M. tuberculosis* Stamm H37Rv ist offensichtlich fehlerhaft. Auf Basis der hier gezeigten Daten kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass das tatsächliche Startcodon stromabwärts liegt und die Translation demnach zu einem Protein von 224 statt 272 AS führt. Dies sollte durch proteinchemische Nachweismethoden im *M. tuberculosis* Wildtyp verifiziert werden. Aufgrund der nachgewiesenen Essentialität stellt die Flippase Rv3277 einen interessanten neuartigen potentiellen Antibiotikawirkort dar. In dieser Hinsicht wäre es interessant, die *M. tuberculosis* c-Rv3277-ASS-tetOFF Mutante hinsichtlich ihrer Virulenz näher zu charakterisieren. Neben einer THP-1-Infektion zur ersten Abschätzung der potentiellen Attenuierung, wäre ein sinnvoller nächster Schritt der Einsatz der konditionalen Mutante in Mausexperimenten. Da die Essentialität des Gens *in vitro* bereits gesichert ist, kann angenommen werden, dass das Silencing des Gens zu verschiedenen Phasen während der Mauseinfektion deutliche Auswirkung auf die Virulenz hat und vermutlich zu einem deutlich attenuierten Phänotyp oder sogar zur Abtötung des Erregers führt.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse unterstützen die hypothetische Funktion dieser Permease als DPM-Flippase mit geringerer Flippingaktivität für DPA. Über den indirekten Nachweis der *downstream* liegenden Zellwandprodukte hinaus, wäre ein direkterer Nachweis der enzymatischen Flippasefunktion von MsmeG\_1817 und Rv3277 wünschenswert. Die Bestimmung der Enzymaktivität ist jedoch durch die Positionierung der Flippase in der Cytoplasmamembran besonders anspruchsvoll, so dass Studien an isolierten Membranen notwendig wären, in denen die Flippase aufgereinigt vorliegt. Nur für sehr wenige Flippasen konnten bislang überhaupt praktikable und verlässliche Enzymassays entwickelt werden, so dass dies ein anspruchsvolles Unterfangen ist.

Ein Screening nach potentiellen Inhibitoren der Flippase Rv3277 ist jedoch auch ohne das Vorliegen eines funktionellen Enzymassays mit Hilfe der konditionalen Mutante grundsätzlich möglich. In einem zellbasierten, differentiellen Suszeptibilitätsscreen könnten Substanzbibliotheken gescreent werden, in denen der Wildtyp von *M. tuberculosis* im Vergleich zur vollinduzierten und der partiell gesilenceten Mutante getestet wird. Die Depletion des Targets

in der partiell gesilencierten Mutante sollte in einer spezifisch erhöhten Suszeptibilität gegenüber Rv3277-Inhibitoren, nicht jedoch gegen andere Substanzen führen. Dahingegen sollte die Überexpression des Targets in einem Überexpressionsstamm zu einer spezifischen Resistenz gegenüber Rv3277-Inhibitoren, aber nicht gegen andere Substanzen führen. Durch diese differentiellen Suszeptibilitäten könnten eventuell vorhandene spezifische Flippaseinhibitoren in Substanzbibliotheken identifiziert werden.

Über seine direkte essentielle Rolle für die Vitalität von *M. tuberculosis* hinaus ist die Flippase Rv3277 als potentieller Antibiotikawirkort auch deshalb höchst interessant, weil ihre Inaktivierung zu einer dramatischen veränderten Zellwandzusammensetzung von *M. tuberculosis* führt. Dies könnte zu einer generell erhöhten Aufnahme von Antibiotika in die Zelle und dadurch zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber vielen Substanzen führen, die beim *M. tuberculosis* Wildtyp nur eine geringe antibiotische Wirkung zeigen. Außerdem könnte eine stärkere Wirkung von Antibiotika erwartet werden, die auf die Zellwandsynthese wirken, wie beispielsweise Ethambutol.

## 7. Literatur

Alderwick, L. J., M. Seidel, H. Sahm, G. S. Besra and L. Eggeling (2006). "Identification of a novel arabinofuranosyltransferase (AftA) involved in cell wall arabinan biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*." J Biol Chem **281**(23): 15653-15661.

Allison, G. E. and N. K. Verma (2000). "Serotype-converting bacteriophages and O-antigen modification in *Shigella flexneri*." Trends Microbiol **8**(1): 17-23.

Ames, G. F., C. S. Mimura and V. Shyamala (1990). "Bacterial periplasmic permeases belong to a family of transport proteins operating from *Escherichia coli* to human: Traffic ATPases." FEMS Microbiol Rev **6**(4): 429-446.

Armstrong, J. A. and P. D. Hart (1975). "Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival." J Exp Med **142**(1): 1-16.

Ashworth, J. M. and H. L. Kornberg (1963). "Fine Control of the Glyoxylate Cycle by Allosteric Inhibition of Isocitrate Lyase." Biochim Biophys Acta **73**: 519-522.

Ates, L. S., R. Ummels, S. Commandeur, R. van der Weerd, M. Sparrius, E. Weerdenburg, M. Alber, R. Kalscheuer, S. R. Piersma, A. M. Abdallah, M. Abd El Ghany, A. M. Abdel-Haleem, A. Pain, C. R. Jimenez, W. Bitter and E. N. Houben (2015). "Essential Role of the ESX-5 Secretion System in Outer Membrane Permeability of Pathogenic *Mycobacteria*." PLoS Genet **11**(5): e1005190.

Belanger, A. E., G. S. Besra, M. E. Ford, K. Mikusova, 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 the antimycobacterial drug ethambutol." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11919-11924.

Belanova, M., P. Dianiskova, P. J. Brennan, G. C. Completo, N. L. Rose, T. L. Lowary and K. Mikusova (2008). "Galactosyl transferases in mycobacterial cell wall synthesis." J Bacteriol **190**(3): 1141-1145.

Birch, H. L., L. J. Alderwick, A. Bhatt, D. Rittmann, K. Krumbach, A. Singh, Y. Bai, T. L. Lowary, L. Eggeling and G. S. Besra (2008). "Biosynthesis of mycobacterial arabinogalactan: identification of a novel alpha(1->3) arabinofuranosyltransferase." Mol Microbiol **69**(5): 1191-1206.

Bloch, A. B., G. M. Cauthen, I. M. Onorato, K. G. Dansbury, G. D. Kelly, C. R. Driver and D. E. Snider, Jr. (1994). "Nationwide survey of drug-resistant tuberculosis in the United States." JAMA **271**(9): 665-671.

Blokpoel, M. C., H. N. Murphy, R. O'Toole, S. Wiles, E. S. Runn, G. R. Stewart, D. B. Young and B. D. Robertson (2005). "Tetracycline-inducible gene regulation in mycobacteria." Nucleic Acids Res **33**(2): e22.

Braibant, M., P. Gilot and J. Content (2000). "The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*." FEMS Microbiol Rev **24**(4): 449-467.

Brennan, P. J. and D. C. Crick (2007). "The cell-wall core of *Mycobacterium tuberculosis* in the context of drug discovery." Curr Top Med Chem **7**(5): 475-488.

Briken, V., S. A. Porcelli, G. S. Besra and L. Kremer (2004). "Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response." Mol Microbiol **53**(2): 391-403.

Brzoska, P., M. Rimmele, K. Brzostek and W. Boos (1994). "The pho regulon-dependent Ugp uptake system for glycerol-3-phosphate in Escherichia coli is trans inhibited by Pi." J Bacteriol **176**(1): 15-20.

Cai, L., X. Zhao, T. Jiang, J. Qiu, L. Owusu, Y. Ma, B. Wang and Y. Xin (2014). "Prokaryotic Expression, Identification and Bioinformatics Analysis of the Mycobacterium tuberculosis Rv3807c Gene Encoding the Putative Enzyme Committed to Decaprenylphosphoryl-d-arabinose Synthesis." Indian J Microbiol **54**(1): 46-51.

Capyk, J. K., R. Kalscheuer, G. R. Stewart, J. Liu, H. Kwon, R. Zhao, S. Okamoto, W. R. Jacobs, Jr., L. D. Eltis and W. W. Mohn (2009). "Mycobacterial cytochrome p450 125 (cyp125) catalyzes the terminal hydroxylation of c27 steroids." J Biol Chem **284**(51): 35534-35542.

Chatterjee, D. and K. H. Khoo (1998). "Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects." Glycobiology **8**(2): 113-120.

Cohn, D. L., F. Bustreo and M. C. Raviglione (1997). "Drug-resistant tuberculosis: review of the worldwide situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease." Clin Infect Dis **24 Suppl 1**: S121-130.

Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, 3rd, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, 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 and B. G. Barrell (1998). "Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence." Nature **393**(6685): 537-544.

Collins, M. D., M. Goodfellow and D. E. Minnikin (1982). "Fatty acid composition of some mycolic acid-containing coryneform bacteria." J Gen Microbiol **128**(11): 2503-2509.

Cosma, C. L., D. R. Sherman and L. Ramakrishnan (2003). "The secret lives of the pathogenic mycobacteria." Annu Rev Microbiol **57**: 641-676.

Crick, D. C., S. Mahapatra and P. J. Brennan (2001). "Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of Mycobacterium tuberculosis." Glycobiology **11**(9): 107R-118R.

Crofton, J. and D. A. Mitchison (1948). "Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis." Br Med J **2**(4588): 1009-1015.

Cuthbertson, L., M. S. Kimber and C. Whitfield (2007). "Substrate binding by a bacterial ABC transporter involved in polysaccharide export." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(49): 19529-19534.

Cuthbertson, L., V. Kos and C. Whitfield (2010). "ABC transporters involved in export of cell surface glycoconjugates." Microbiol Mol Biol Rev **74**(3): 341-362.

Cuthbertson, L., J. Powers and C. Whitfield (2005). "The C-terminal domain of the nucleotide-binding domain protein Wzt determines substrate specificity in the ATP-binding cassette

transporter for the lipopolysaccharide O-antigens in *Escherichia coli* serotypes O8 and O9a." Journal of Biological Chemistry **280**(34): 30310-30319.

D'Arcy Hart, P. (1999). "A change in scientific approach: from alternation to randomised allocation in clinical trials in the 1940s." BMJ **319**(7209): 572-573.

Daleke, D. L. (2007). "Phospholipid flippases." J Biol Chem **282**(2): 821-825.

Davidson, A. L. and J. Chen (2004). "ATP-binding cassette transporters in bacteria." Annu Rev Biochem **73**: 241-268.

De Rossi, E., P. Arrigo, M. Bellinzoni, P. A. Silva, C. Martin, J. A. Ainsa, P. Gugliera and G. Riccardi (2002). "The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*." Mol Med **8**(11): 714-724.

Dianiskova, P., J. Kordulakova, H. Skovierova, D. Kaur, M. Jackson, P. J. Brennan and K. Mikusova (2011). "Investigation of ABC transporter from mycobacterial arabinogalactan biosynthetic cluster." Gen Physiol Biophys **30**(3): 239-250.

Driessen, N. N., R. Ummels, J. J. Maaskant, S. S. Gurcha, G. S. Besra, G. D. Ainge, D. S. Larsen, G. F. Painter, C. M. Vandenbroucke-Grauls, J. Geurtsen and B. J. Appelmelk (2009). "Role of phosphatidylinositol mannosides in the interaction between mycobacteria and DC-SIGN." Infect Immun **77**(10): 4538-4547.

Ehrt, S., X. V. Guo, C. M. Hickey, M. Ryou, M. Monteleone, L. W. Riley and D. Schnappinger (2005). "Controlling gene expression in mycobacteria with anhydrotetracycline and Tet repressor." Nucleic Acids Res **33**(2): e21.

Eoh, H. and K. Y. Rhee (2014). "Methylcitrate cycle defines the bactericidal essentiality of isocitrate lyase for survival of *Mycobacterium tuberculosis* on fatty acids." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(13): 4976-4981.

Eze, M. O. and R. N. McElhaney (1981). "The effect of alterations in the fluidity and phase state of the membrane lipids on the passive permeation and facilitated diffusion of glycerol in *Escherichia coli*." J Gen Microbiol **124**(2): 299-307.

Flores-Villanueva, P. O., J. A. Ruiz-Morales, C. H. Song, L. M. Flores, E. K. Jo, M. Montano, P. F. Barnes, M. Selman and J. Granados (2005). "A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis." J Exp Med **202**(12): 1649-1658.

Flynn, J. L. (2006). "Lessons from experimental *Mycobacterium tuberculosis* infections." Microbes Infect **8**(4): 1179-1188.

Friedland, J. S., D. G. Remick, R. Shattock and G. E. Griffin (1992). "Secretion of interleukin-8 following phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocyte cell lines." Eur J Immunol **22**(6): 1373-1378.

Geijtenbeek, T. B., S. J. Van Vliet, E. A. Koppel, M. Sanchez-Hernandez, C. M. Vandenbroucke-Grauls, B. Appelmelk and Y. Van Kooyk (2003). "Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function." J Exp Med **197**(1): 7-17.

Geissendorfer, M. and W. Hillen (1990). "Regulated expression of heterologous genes in *Bacillus subtilis* using the Tn10 encoded tet regulatory elements." *Appl Microbiol Biotechnol* **33**(6): 657-663.

Gilleron, M., N. Himoudi, O. Adam, P. Constant, A. Venisse, M. Riviere and G. Puzo (1997). "Mycobacterium smegmatis phosphoinositols-glycoarabinomannans. Structure and localization of alkali-labile and alkali-stable phosphoinositides." *J Biol Chem* **272**(1): 117-124.

Glickman, M. S. and W. R. Jacobs, Jr. (2001). "Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline." *Cell* **104**(4): 477-485.

Gomez, J. E. and W. R. Bishai (2000). "whmD is an essential mycobacterial gene required for proper septation and cell division." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(15): 8554-8559.

Goude, R., A. G. Amin, D. Chatterjee and T. Parish (2008). "The critical role of embC in *Mycobacterium tuberculosis*." *J Bacteriol* **190**(12): 4335-4341.

Griffin, J. E., J. D. Gawronski, M. A. Dejesus, T. R. Ioerger, B. J. Akerley and C. M. Sassetti (2011). "High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism." *PLoS Pathog* **7**(9): e1002251.

Grzegorzewicz, A. E., H. Pham, V. A. Gundi, M. S. Scherman, E. J. North, T. Hess, V. Jones, V. Gruppo, S. E. Born, J. Kordulakova, S. S. Chavadi, C. Morisseau, A. J. Lenaerts, R. E. Lee, M. R. McNeil and M. Jackson (2012). "Inhibition of mycolic acid transport across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane." *Nat Chem Biol* **8**(4): 334-341.

Guan, S., D. A. Bastin and N. K. Verma (1999). "Functional analysis of the O antigen glycosylation gene cluster of *Shigella flexneri* bacteriophage Sfx." *Microbiology* **145** ( Pt 5): 1263-1273.

Guerin, M. E., J. Kordulakova, P. M. Alzari, P. J. Brennan and M. Jackson (2010). "Molecular basis of phosphatidyl-myo-inositol mannoside biosynthesis and regulation in mycobacteria." *J Biol Chem* **285**(44): 33577-33583.

Hao, P., Z. Shi-Liang, L. Ju, D. Ya-Xin, H. Biao, W. Xu, H. Min-Tao, K. Shou-Gang and W. Ke (2011). "The role of ABC efflux pump, Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c, from *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in China." *Folia Microbiol (Praha)* **56**(6): 549-553.

Hasan, Z., J. M. Cliff, H. M. Dockrell, B. Jamil, M. Irfan, M. Ashraf and R. Hussain (2009). "CCL2 responses to *Mycobacterium tuberculosis* are associated with disease severity in tuberculosis." *PLoS One* **4**(12): e8459.

Hasan, Z., I. Zaidi, B. Jamil, M. A. Khan, A. Kanji and R. Hussain (2005). "Elevated ex vivo monocyte chemotactic protein-1 (CCL2) in pulmonary as compared with extra-pulmonary tuberculosis." *BMC Immunol* **6**: 14.

Hayakawa, E., F. Tokumasu, G. A. Nardone, A. J. Jin, V. A. Hackley and J. A. Dvorak (2007). "A *Mycobacterium tuberculosis*-derived lipid inhibits membrane fusion by modulating lipid membrane domains." *Biophys J* **93**(11): 4018-4030.

Higgins, C. F. (1992). "ABC transporters: from microorganisms to man." *Annu Rev Cell Biol* **8**: 67-113.

- Higgins, C. F. and M. M. Gottesman (1992). "Is the multidrug transporter a flippase?" Trends Biochem Sci **17**(1): 18-21.
- Higgins, C. F. and K. J. Linton (2004). "The ATP switch model for ABC transporters." Nat Struct Mol Biol **11**(10): 918-926.
- Hoshino, A., S. Hanada, H. Yamada, S. Mii, M. Takahashi, S. Mitarai, K. Yamamoto and Y. Manome (2014). "Mycobacterium tuberculosis escapes from the phagosomes of infected human osteoclasts reprograms osteoclast development via dysregulation of cytokines and chemokines." Pathog Dis **70**(1): 28-39.
- Hotter, G. S., B. J. Wards, P. Mouat, G. S. Besra, J. Gomes, M. Singh, S. Bassett, P. Kawakami, P. R. Wheeler, G. W. de Lisle and D. M. Collins (2005). "Transposon mutagenesis of Mb0100 at the ppe1-nrp locus in Mycobacterium bovis disrupts phthiocerol dimycocerosate (PDIM) and glycosylphenol-PDIM biosynthesis, producing an avirulent strain with vaccine properties at least equal to those of M. bovis BCG." J Bacteriol **187**(7): 2267-2277.
- Indrigo, J., R. L. Hunter, Jr. and J. K. Actor (2002). "Influence of trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) during mycobacterial infection of bone marrow macrophages." Microbiology **148**(Pt 7): 1991-1998.
- Jankute, M., S. Grover, H. L. Birch and G. S. Besra (2014). "Genetics of Mycobacterial Arabinogalactan and Lipoarabinomannan Assembly." Microbiol Spectr **2**(4).
- Jankute, M., S. Grover, A. K. Rana and G. S. Besra (2012). "Arabinogalactan and lipoarabinomannan biosynthesis: structure, biogenesis and their potential as drug targets." Future Microbiol **7**(1): 129-147.
- Jiang, D., Q. Zhang, Q. Zheng, H. Zhou, J. Jin, W. Zhou, M. Bartlam and Z. Rao (2014). "Structural analysis of Mycobacterium tuberculosis ATP-binding cassette transporter subunit UgpB reveals specificity for glycerophosphocholine." FEBS J **281**(1): 331-341.
- Jones, D., H. J. Metzger, A. Schatz and S. A. Waksman (1944). "Control of Gram-Negative Bacteria in Experimental Animals by Streptomycin." Science **100**(2588): 103-105.
- Jones, L., G. B. Seymour and J. P. Knox (1997). "Localization of Pectic Galactan in Tomato Cell Walls Using a Monoclonal Antibody Specific to (1->4)-[beta]-D-Galactan." Plant Physiol **113**(4): 1405-1412.
- Kalscheuer, R., B. Weinrick, U. Veeraraghavan, G. S. Besra and W. R. Jacobs, Jr. (2010). "Trehalose-recycling ABC transporter LpqY-SugA-SugB-SugC is essential for virulence of Mycobacterium tuberculosis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(50): 21761-21766.
- Kapopoulou, A., J. M. Lew and S. T. Cole (2011). "The MycoBrowser portal: a comprehensive and manually annotated resource for mycobacterial genomes." Tuberculosis (Edinb) **91**(1): 8-13.
- Kaur, D., P. J. Brennan and D. C. Crick (2004). "Decaprenyl diphosphate synthesis in Mycobacterium tuberculosis." J Bacteriol **186**(22): 7564-7570.
- Kaur, D., M. E. Guerin, H. Skovierova, P. J. Brennan and M. Jackson (2009). "Chapter 2: Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of Mycobacterium tuberculosis." Adv Appl Microbiol **69**: 23-78.

- Kaur, D., A. Obregon-Henao, H. Pham, D. Chatterjee, P. J. Brennan and M. Jackson (2008). "Lipoarabinomannan of Mycobacterium: mannose capping by a multifunctional terminal mannosyltransferase." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(46): 17973-17977.
- Khatri, B., M. Fielder, G. Jones, W. Newell, M. Abu-Oun and P. R. Wheeler (2013). "High throughput phenotypic analysis of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis strains' metabolism using biolog phenotype microarrays." PLoS One **8**(1): e52673.
- Kolk, A. H., M. L. Ho, P. R. Klatser, T. A. Eggelte, S. Kuijper, S. de Jonge and J. van Leeuwen (1984). "Production and characterization of monoclonal antibodies to Mycobacterium tuberculosis, M. bovis (BCG) and M. leprae." Clin Exp Immunol **58**(3): 511-521.
- Kolly, G. S., R. Mukherjee, E. Kilacskova, L. A. Abriata, M. Raccaud, J. Blasko, C. Sala, M. Dal Peraro, K. Mikusova and S. T. Cole (2015). "GtrA protein Rv3789 is required for arabinosylation of arabinogalactan in Mycobacterium tuberculosis." J Bacteriol.
- Kordulakova, J., M. Gilleron, K. Mikusova, G. Puzo, P. J. Brennan, B. Gicquel and M. Jackson (2002). "Definition of the first mannosylation step in phosphatidylinositol mannoside synthesis. PimA is essential for growth of mycobacteria." J Biol Chem **277**(35): 31335-31344.
- Korres, H., M. Mavris, R. Morona, P. A. Manning and N. K. Verma (2005). "Topological analysis of GtrA and GtrB proteins encoded by the serotype-converting cassette of Shigella flexneri." Biochem Biophys Res Commun **328**(4): 1252-1260.
- Kovacevic, S., D. Anderson, Y. S. Morita, J. Patterson, R. Haites, B. N. McMillan, R. Coppel, M. J. McConville and H. Billman-Jacobe (2006). "Identification of a novel protein with a role in lipoarabinomannan biosynthesis in mycobacteria." J Biol Chem **281**(14): 9011-9017.
- Krupa, A., M. Fol, B. R. Dziadek, E. Kepka, D. Wojciechowska, A. Brzostek, A. Torzewska, J. Dziadek, R. P. Baughman, D. Griffith and A. K. Kurdowska (2015). "Binding of CXCL8/IL-8 to Mycobacterium tuberculosis Modulates the Innate Immune Response." Mediators Inflamm **2015**: 124762.
- Kurashima, K., N. Mukaida, M. Fujimura, M. Yasui, Y. Nakazumi, T. Matsuda and K. Matsushima (1997). "Elevated chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of tuberculosis patients." Am J Respir Crit Care Med **155**(4): 1474-1477.
- Larrouy-Maumus, G., H. Skovierova, R. Dhouib, S. K. Angala, S. Zuberogoitia, H. Pham, A. D. Villela, K. Mikusova, A. Noguera, M. Gilleron, L. Valentinova, J. Kordulakova, P. J. Brennan, G. Puzo, J. Nigou and M. Jackson (2012). "A small multidrug resistance-like transporter involved in the arabinosylation of arabinogalactan and lipoarabinomannan in mycobacteria." J Biol Chem **287**(47): 39933-39941.
- Larsen, M. H., K. Biermann and W. R. Jacobs, Jr. (2007). "Analyses of Mycobacterium tuberculosis proteins." Curr Protoc Microbiol **Chapter 10**: Unit 10A 14.
- Larsen, M. H., K. Biermann and W. R. Jacobs, Jr. (2007). "Laboratory maintenance of Mycobacterium tuberculosis." Curr Protoc Microbiol **Chapter 10**: Unit 10A 11.
- Larsen, M. H., K. Biermann, S. Tandberg, T. Hsu and W. R. Jacobs, Jr. (2007). "Genetic Manipulation of Mycobacterium tuberculosis." Curr Protoc Microbiol **Chapter 10**: Unit 10A 12.

Lee, R. E., P. J. Brennan and G. S. Besra (1996). "Mycobacterium tuberculosis cell envelope." Curr Top Microbiol Immunol **215**: 1-27.

Liu, C. F., L. Tonini, W. Malaga, M. Beau, A. Stella, D. Bouyssie, M. C. Jackson, J. Nigou, G. Puzo, C. Guilhot, O. Burlet-Schiltz and M. Riviere (2013). "Bacterial protein-O-mannosylating enzyme is crucial for virulence of Mycobacterium tuberculosis." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(16): 6560-6565.

Luo, M., E. A. Fadeev and J. T. Groves (2005). "Mycobactin-mediated iron acquisition within macrophages." Nat Chem Biol **1**(3): 149-153.

Lutz, R. and H. Bujard (1997). "Independent and tight regulation of transcriptional units in Escherichia coli via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements." Nucleic Acids Res **25**(6): 1203-1210.

Marrero, J., K. Y. Rhee, D. Schnappinger, K. Pethe and S. Ehrt (2010). "Gluconeogenic carbon flow of tricarboxylic acid cycle intermediates is critical for Mycobacterium tuberculosis to establish and maintain infection." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(21): 9819-9824.

McDonough, K. A., Y. Kress and B. R. Bloom (1993). "Pathogenesis of tuberculosis: interaction of Mycobacterium tuberculosis with macrophages." Infect Immun **61**(7): 2763-2773.

McKinney, J. D., K. Honer zu Bentrup, E. J. Munoz-Elias, A. Miczak, B. Chen, W. T. Chan, D. Swenson, J. C. Sacchettini, W. R. Jacobs, Jr. and D. G. Russell (2000). "Persistence of Mycobacterium tuberculosis in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase." Nature **406**(6797): 735-738.

McNeil, M., M. Daffe and P. J. Brennan (1990). "Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls." J Biol Chem **265**(30): 18200-18206.

McNeil, M., M. Daffe and P. J. Brennan (1991). "Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria." J Biol Chem **266**(20): 13217-13223.

McNeil, M. R. and P. J. Brennan (1991). "Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information." Res Microbiol **142**(4): 451-463.

Means, T. K., E. Lien, A. Yoshimura, S. Wang, D. T. Golenbock and M. J. Fenton (1999). "The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors." J Immunol **163**(12): 6748-6755.

Means, T. K., S. Wang, E. Lien, A. Yoshimura, D. T. Golenbock and M. J. Fenton (1999). "Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis." J Immunol **163**(7): 3920-3927.

Meier, A., P. Kirschner, F. C. Bange, U. Vogel and E. C. Bottger (1994). "Genetic alterations in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis: mapping of mutations conferring resistance." Antimicrob Agents Chemother **38**(2): 228-233.

Menon, A. K. (1995). "Flippases." Trends Cell Biol **5**(9): 355-360.

Mikusova, K., M. Belanova, J. Kordulakova, K. Honda, M. R. McNeil, S. Mahapatra, D. C. Crick and P. J. Brennan (2006). "Identification of a novel galactosyl transferase involved in biosynthesis of the mycobacterial cell wall." J Bacteriol **188**(18): 6592-6598.

Mikusova, K., T. Yagi, R. Stern, M. R. McNeil, G. S. Besra, D. C. Crick and P. J. Brennan (2000). "Biosynthesis of the galactan component of the mycobacterial cell wall." J Biol Chem **275**(43): 33890-33897.

Mills, J. A., K. Motichka, M. Jucker, H. P. Wu, B. C. Uhlik, R. J. Stern, M. S. Scherman, V. D. Vissa, F. Pan, M. Kundu, Y. F. Ma and M. McNeil (2004). "Inactivation of the mycobacterial rhamnosyltransferase, which is needed for the formation of the arabinogalactan-peptidoglycan linker, leads to irreversible loss of viability." J Biol Chem **279**(42): 43540-43546.

Mishra, A. K., L. J. Alderwick, D. Rittmann, R. V. Tatituri, J. Nigou, M. Gilleron, L. Eggeling and G. S. Besra (2007). "Identification of an alpha(1-->6) mannopyranosyltransferase (MptA), involved in *Corynebacterium glutamicum* lipomannan biosynthesis, and identification of its orthologue in *Mycobacterium tuberculosis*." Mol Microbiol **65**(6): 1503-1517.

Mishra, A. K., L. J. Alderwick, D. Rittmann, C. Wang, A. Bhatt, W. R. Jacobs, Jr., K. Takayama, L. Eggeling and G. S. Besra (2008). "Identification of a novel alpha(1-->6) mannopyranosyltransferase MptB from *Corynebacterium glutamicum* by deletion of a conserved gene, NCgl1505, affords a lipomannan- and lipoarabinomannan-deficient mutant." Mol Microbiol **68**(6): 1595-1613.

Mishra, A. K., N. N. Driessen, B. J. Appelmek and G. S. Besra (2011). "Lipoarabinomannan and related glycoconjugates: structure, biogenesis and role in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and host-pathogen interaction." FEMS Microbiol Rev **35**(6): 1126-1157.

Modlin, R. L. and B. R. Bloom (2013). "TB or not TB: that is no longer the question." Sci Transl Med **5**(213): 213sr216.

Morita, Y. S., C. B. Sena, R. F. Waller, K. Kurokawa, M. F. Sernee, F. Nakatani, R. E. Haites, H. Billman-Jacobe, M. J. McConville, Y. Maeda and T. Kinoshita (2006). "PimE is a polyprenol-phosphate-mannose-dependent mannosyltransferase that transfers the fifth mannose of phosphatidylinositol mannoside in mycobacteria." J Biol Chem **281**(35): 25143-25155.

Morscheck, C. (2003). "Strategies for mycobacterial genetics." Int J Med Microbiol **293**(4): 251-259.

Munoz-Elias, E. J. and J. D. McKinney (2005). "Mycobacterium tuberculosis isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence." Nat Med **11**(6): 638-644.

Niederweis, M. (2008). "Nutrient acquisition by mycobacteria." Microbiology **154**(Pt 3): 679-692.

Nigou, J., M. Gilleron and G. Puzo (2003). "Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis." Biochimie **85**(1-2): 153-166.

O'Garra, A., P. S. Redford, F. W. McNab, C. I. Bloom, R. J. Wilkinson and M. P. Berry (2013). "The immune response in tuberculosis." Annu Rev Immunol **31**: 475-527.

Ordway, D. J. and I. M. Orme (2011). "Animal models of mycobacteria infection." Curr Protoc Immunol **Chapter 19**: Unit19 15.

Pandey, A. K. and C. M. Sassetti (2008). "Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(11): 4376-4380.

Paula, S., A. G. Volkov, A. N. Van Hoek, T. H. Haines and D. W. Deamer (1996). "Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness." Biophys J **70**(1): 339-348.

Petit, J. F., A. Adam, J. Wietzerbin-Falszpan, E. Lederer and J. M. Ghuyssen (1969). "Chemical structure of the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. I. Isolation and partial characterization of the peptidoglycan." Biochem Biophys Res Commun **35**(4): 478-485.

Pitarque, S., G. Larrouy-Maumus, B. Payre, M. Jackson, G. Puzo and J. Nigou (2008). "The immunomodulatory lipoglycans, lipoarabinomannan and lipomannan, are exposed at the mycobacterial cell surface." Tuberculosis (Edinb) **88**(6): 560-565.

Qian, F. and W. Pan (2002). "Construction of a tetR-integrated *Salmonella enterica* serovar Typhi CVD908 strain that tightly controls expression of the major merozoite surface protein of *Plasmodium falciparum* for applications in human Vaccine production." Infect Immun **70**(4): 2029-2038.

Raetz, C. R. (1986). "Molecular genetics of membrane phospholipid synthesis." Annu Rev Genet **20**: 253-295.

Rana, A. K., A. Singh, S. S. Gurcha, L. R. Cox, A. Bhatt and G. S. Besra (2012). "Ppm1-encoded polyprenyl monophosphomannose synthase activity is essential for lipoglycan synthesis and survival in mycobacteria." PLoS One **7**(10): e48211.

Reed, M. B., P. Domenech, C. Manca, H. Su, A. K. Barczak, B. N. Kreiswirth, G. Kaplan and C. E. Barry, 3rd (2004). "A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response." Nature **431**(7004): 84-87.

Ren, Q. and I. T. Paulsen (2005). "Comparative analyses of fundamental differences in membrane transport capabilities in prokaryotes and eukaryotes." PLoS Comput Biol **1**(3): e27.

Riley, R. L., C. C. Mills, W. Nyka, N. Weinstock, P. B. Storey, L. U. Sultan, M. C. Riley and W. F. Wells (1995). "Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis. A two-year study of contagion in a tuberculosis ward. 1959." Am J Epidemiol **142**(1): 3-14.

Roberts, G., D. G. Muttucumaru and T. Parish (2003). "Control of the acetamidase gene of *Mycobacterium smegmatis* by multiple regulators." FEMS Microbiol Lett **221**(1): 131-136.

Russell, D. G., H. C. Mwandumba and E. E. Rhoades (2002). "Mycobacterium and the coat of many lipids." J Cell Biol **158**(3): 421-426.

Sassetti, C. M., D. H. Boyd and E. J. Rubin (2003). "Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis." Mol Microbiol **48**(1): 77-84.

Saunders, B. M. and W. J. Britton (2007). "Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis." Immunol Cell Biol **85**(2): 103-111.

Scanga, C. A. and J. L. Flynn (2014). "Modeling tuberculosis in nonhuman primates." Cold Spring Harb Perspect Med **4**(12): a018564.

- Schaeffer, M. L., K. H. Khoo, G. S. Besra, D. Chatterjee, P. J. Brennan, J. T. Belisle and J. M. Inamine (1999). "The *pimB* gene of *Mycobacterium tuberculosis* encodes a mannosyltransferase involved in lipoarabinomannan biosynthesis." J Biol Chem **274**(44): 31625-31631.
- Scherman, M., A. Weston, K. Duncan, A. Whittington, R. Upton, L. Deng, R. Comber, J. D. Friedrich and M. McNeil (1995). "Biosynthetic origin of mycobacterial cell wall arabinosyl residues." J Bacteriol **177**(24): 7125-7130.
- Schleifer, K. H. and O. Kandler (1972). "Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications." Bacteriol Rev **36**(4): 407-477.
- Schweizer, H. and W. Boos (1984). "Characterization of the *ugp* region containing the genes for the *phoB* dependent sn-glycerol-3-phosphate transport system of *Escherichia coli*." Mol Gen Genet **197**(1): 161-168.
- Seidel, M., L. J. Alderwick, H. L. Birch, H. Sahm, L. Eggeling and G. S. Besra (2007). "Identification of a novel arabinofuranosyltransferase AftB involved in a terminal step of cell wall arabinan biosynthesis in *Corynebacteriaceae*, such as *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis*." J Biol Chem **282**(20): 14729-14740.
- Shin, S. J., S. Y. Kim, A. R. Shin, H. J. Kim, S. N. Cho and J. K. Park (2009). "Identification of Rv2041c, a novel immunogenic antigen from *Mycobacterium tuberculosis* with serodiagnostic potential." Scand J Immunol **70**(5): 457-464.
- Skovierova, H., G. Larrouy-Maumus, J. Zhang, D. Kaur, N. Barilone, J. Kordulakova, M. Gilleron, S. Guadagnini, M. Belanova, M. C. Prevost, B. Gicquel, G. Puzo, D. Chatterjee, P. J. Brennan, J. Nigou and M. Jackson (2009). "AftD, a novel essential arabinofuranosyltransferase from mycobacteria." Glycobiology **19**(11): 1235-1247.
- Sreevatsan, S., X. Pan, K. E. Stockbauer, D. L. Williams, B. N. Kreiswirth and J. M. Musser (1996). "Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities." Antimicrob Agents Chemother **40**(4): 1024-1026.
- Stephan, J., J. Bender, F. Wolschendorf, C. Hoffmann, E. Roth, C. Mailander, H. Engelhardt and M. Niederweis (2005). "The growth rate of *Mycobacterium smegmatis* depends on sufficient porin-mediated influx of nutrients." Mol Microbiol **58**(3): 714-730.
- Tailleux, L., O. Schwartz, J. L. Herrmann, E. Pivert, M. Jackson, A. Amara, L. Legres, D. Dreher, L. P. Nicod, J. C. Gluckman, P. H. Lagrange, B. Gicquel and O. Neyrolles (2003). "DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells." J Exp Med **197**(1): 121-127.
- Telenti, A., W. J. Philipp, S. Sreevatsan, C. Bernasconi, K. E. Stockbauer, B. Wiele, J. M. Musser and W. R. Jacobs, Jr. (1997). "The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol." Nat Med **3**(5): 567-570.
- Titgemeyer, F., J. Amon, S. Parche, M. Mahfoud, J. Bail, M. Schlicht, N. Rehm, D. Hillmann, J. Stephan, B. Walter, A. Burkovski and M. Niederweis (2007). "A genomic view of sugar transport in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*." J Bacteriol **189**(16): 5903-5915.

- Tsuchiya, S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno and K. Tada (1980). "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)." Int J Cancer **26**(2): 171-176.
- Tuberculosis Trials Committee, M. S. i. (1948). "STREPTOMYCIN treatment of pulmonary tuberculosis." Br Med J **2**(4582): 769-782.
- Underhill, D. M., A. Ozinsky, K. D. Smith and A. Aderem (1999). "Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14459-14463.
- Vergne, I., J. Chua, S. B. Singh and V. Deretic (2004). "Cell biology of mycobacterium tuberculosis phagosome." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 367-394.
- Vissa, V. D. and P. J. Brennan (2001). "The genome of Mycobacterium leprae: a minimal mycobacterial gene set." Genome Biol **2**(8): REVIEWS1023.
- WHO, W. H. O. (2010). "Treatment of Tuberculosis: Guidelines. 4th edition."
- WHO, W. H. O. (2014). "Global tuberculosis report 2014 "
- Wieland, C. W., S. Knapp, S. Florquin, A. F. de Vos, K. Takeda, S. Akira, D. T. Golenbock, A. Verbon and T. van der Poll (2004). "Non-mannose-capped lipoarabinomannan induces lung inflammation via toll-like receptor 2." Am J Respir Crit Care Med **170**(12): 1367-1374.
- Wolucka, B. A. (2008). "Biosynthesis of D-arabinose in mycobacteria - a novel bacterial pathway with implications for antimycobacterial therapy." FEBS J **275**(11): 2691-2711.
- Yam, K. C., I. D'Angelo, R. Kalscheuer, H. Zhu, J. X. Wang, V. Snieckus, L. H. Ly, P. J. Converse, W. R. Jacobs, Jr., N. Strynadka and L. D. Eltis (2009). "Studies of a ring-cleaving dioxygenase illuminate the role of cholesterol metabolism in the pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis." PLoS Pathog **5**(3): e1000344.
- Yonekawa, A., S. Saijo, Y. Hoshino, Y. Miyake, E. Ishikawa, M. Suzukawa, H. Inoue, M. Tanaka, M. Yoneyama, M. Oh-Hora, K. Akashi and S. Yamasaki (2014). "Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria." Immunity **41**(3): 402-413.
- Zhang, Y. J., M. C. Reddy, T. R. Ioerger, A. C. Rothchild, V. Dartois, B. M. Schuster, A. Trauner, D. Wallis, S. Galaviz, C. Huttenhower, J. C. Sacchettini, S. M. Behar and E. J. Rubin (2013). "Tryptophan biosynthesis protects mycobacteria from CD4 T-cell-mediated killing." Cell **155**(6): 1296-1308.
- Zuber, B., M. Chami, C. Houssin, J. Dubochet, G. Griffiths and M. Daffe (2008). "Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state." J Bacteriol **190**(16): 5672-5680.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel unter Beachtung der "Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf" erstellt worden ist. Die Arbeit wurde weder in der vorgelegten noch in einer ähnlichen Form bei einer anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Milena Hänisch

## Danksagung

Mein Dank gilt vor allem meinem Doktorvater Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die Überlassung des Themas, für die hervorragende Infrastruktur des Instituts, für motivierende Gespräche und nicht zuletzt für seine persönliche Unterstützung.

Prof. Dr. Lutz Schmitt möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens herzlich danken.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rainer Kalscheuer für die sorgfältige und aufmerksame Betreuung meiner Forschungsarbeiten, für seine geduldige Einarbeitung ins S3-Labor, für die konstruktiven Gespräche und die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Ich danke der DFG für die Finanzierung des Promotionsvorhabens.

Ein großes Dankeschön geht auch an die AG Kalscheuer: Lisanna, Nidja, Jan und Alex – ihr macht es mir nicht leicht, jetzt zu gehen. Schön war's mit Euch – und spaßig! Ich danke Euch und allen übrigen Mikrobiologen für Rat und Tat im Labor und außerhalb davon, für's Teilen von Forscherglück und Forscherleid - sowie für Süßigkeiten, Sektchen, Bier und Grillgut.

Ich danke den Mädels im Sekretariat, dass ich meine Stunden bei Euch so flexibel legen durfte, dass immer noch Zeit für die Forschung und für's Schreiben blieb und ihr geduldig Anteil genommen habt an meinen Forschungsergebnissen und -erlebnissen.

Frau Dr. Scheele und Frau Dr. Wottawa danke ich für Ihre telefonischen Sprechstunden und Frau Dr. Warburg für Ihre unzählige Postkarten und Emails. Eure vielen Expertentipps und Motivationsmaßnahmen haben ihre Wirkung glücklicherweise nie verfehlt.

Meinen Lintforter Mädels danke ich für Ihr Verständnis, dass streckenweise eine Papstaudienz leichter zu bekommen war, als ein Termin mit mir.

Ein ganz, ganz herzlicher Dank gilt meinen Eltern. Ihr habt immer an ein gutes Gelingen mit einem Quäntchen Glück geglaubt, mir den Rücken gestärkt und freigehalten. Das ist in Gold nicht aufzuwiegen!

Und: Danke Jan, dass Du mich auch ohne Dokortitel geheiratet hast. Ich liebe Dich!