

Charakterisierung von Genen des
Zellwandstoffwechsels (Rv1500, *hddA*) und der
Nitratassimilation (*glnR*) von *Mycobacterium
tuberculosis*

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von
Dipl.-Biol. Sven Malm
geboren am 6.12.1979 in Hannover

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Glossar	X
1. Zusammenfassung	1
2. Abstract	2
3. Einleitung	3
3.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> – Taxonomische Einordnung, Pathogenese und Epidemiologie	3
3.2 Die mykobakterielle Zellwand und ihre Bedeutung für die Wirt-Pathogen-Interaktion	8
3.3 Die Bedeutung von Rv1500 für die Zellwandsynthese von <i>Mycobacterium marinum</i>	15
3.4 HddA – eine Phosphokinase von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mit Beteiligung an der Zellwandsynthese?	16
3.5 Regulation der Nitratassimilation von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> durch GlnR	18
4. Material und Methoden	20
4.1 Bakterienstämme	20
4.2 Plasmide und Vektoren	20
4.3 Primer	21
4.4 Nährmedien	22
4.4.1 Nährmedien für <i>Escherichia coli</i>	22
4.4.2 Nährmedien für <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
4.4.3 Zusätze für Nährmedien	23
4.5 Lösungen und Puffer	24
4.6 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	28
4.7 Kultivierung von <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	28

4.8	Molekularbiologische Methoden	29
4.8.1	Präparation von DNA	29
4.8.1.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	29
4.8.1.2	Plasmid-Mini-Präparation mit dem NucleoSpin®Plasmid-Kit von Macherey-Nagel	30
4.8.1.3	Plasmid-Midi-Präparation mit dem GeneElute™-Kit von Sigma.....	30
4.8.1.4	Präparation genomischer DNA von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ...	30
4.8.1.5	Präparation genomischer DNA mit Glasbeads für die PCR.....	31
4.8.1.6	Hitzeextraktion genomischer DNA für die PCR	31
4.8.2	Restriktionsspaltung.....	32
4.8.3	Agarose-Gelelektrophorese	32
4.8.4	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	33
4.8.4.1	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	33
4.8.4.2	Aufreinigen von DNA aus Lösungen	33
4.8.5	Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA	33
4.8.6	Bestimmung der DNA-Konzentration	34
4.8.6.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	34
4.8.6.2	Konzentrationsbestimmung mittels Agarose-Gelelektrophorese	34
4.8.7	Ligation	34
4.8.8	Glykogenfällung	35
4.8.9	Herstellung elektrokompetenter <i>Escherichia coli</i>	35
4.8.10	Transformation von DNA in <i>Escherichia coli</i> mittels Elektroporation .	35
4.8.11	Transformation von DNA in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mittels Elektroporation	36
4.8.12	Polymerase-Kettenreaktion	37
4.8.13	Sequenzierung	37
4.8.14	Herstellung, Markierung und Quantifizierung einer Hybridisierungssonde	38

4.8.15	Southern Blot.....	39
4.8.16	Generierung der Deletionsmutanten von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	41
4.8.16.1	Levansucrase-vermittelte Negativselektion für intrachromosomale Rekombination.....	41
4.8.16.2	Generierung der Rv1500-Deletionsmutante	42
4.8.16.3	Generierung der <i>hddA</i> -Deletionsmutante	43
4.8.17	Klonierung von <i>nirBD</i> unter einen heterologen Promoter durch Fusions-PCR.....	43
4.8.18	RNA-Präparation von <i>M. tuberculosis</i> und cDNA-Synthese zum Nachweis von Rv1500 auf mRNA-Ebene.....	45
4.8.19	Untersuchung des Transkriptoms durch Microarray-Technologie	46
4.8.19.1	Kulturbedingungen.....	46
4.8.19.2	Präparation der RNA	47
4.8.19.3	cDNA-Synthese	47
4.8.19.4	cDNA-Fragmentierung und Markierung.....	48
4.8.19.5	Hybridisierung.....	48
4.8.19.6	Färbung und Detektion	49
4.8.20	Real-Time PCR.....	50
4.9	<i>In-vitro</i> Charakterisierung	52
4.9.1	Ziehl-Neelsen Färbung	52
4.9.2	Untersuchung der Koloniemorphologie auf Kongo Rot-haltigen Nährböden.....	52
4.9.3	Lysin-Ruthenium-Rot Einbettung zur Darstellung von <i>M. tuberculosis</i> in der Elektronenmikroskopie.....	52
4.9.4	Empfindlichkeitstestung gegenüber Detergenz-Stressbedingungen.....	53
4.9.4.1	Wachstumskurve und Lebendkeimzahlbestimmung von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ Rv1500 in 7H9-Medium mit 0,02 % und 0,1 % SDS	53

4.9.4.2	Wachstumskurve und Lebendkeimzahlbestimmung von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ <i>hddA</i> in 7H9-Medium mit 0,01 %, 0,04 % und 0,1 % SDS	54
4.9.5	Wachstum von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv Δ glnR::pSMA37 in MB-Medium mit 10 mM KNO ₃	55
4.10	Biochemische Charakterisierung.....	55
4.10.1	Neutralzuckerbestimmung	55
4.10.2	Lipidextraktion	57
4.10.3	Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie	58
4.10.4	Analyse der Zucker und Fettsäuren der nach Bligh und Dyer gewonnenen Lipidextrakte.....	58
4.10.5	Fourier-Transform-Ion-Cyclotron-Resonanz Massenspektrometrie (FT-ICR MS)*	59
4.11	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Infektionsstudien*	59
4.11.1	<i>In vitro</i> Infektionsstudien	59
4.11.2	<i>In vivo</i> Infektionsstudien	60
4.11.3	Statistik.....	61
5.	Ergebnisse	62
5.1	Charakterisierung der Rv1500 Deletionsmutante von <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	62
5.1.1	Genomische Situation und Generierung der Deletionsmutante	62
5.1.2	Analyse der Phosphatidylinositolmannosid-Expression in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv und <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv Δ Rv1500.....	63
5.1.3	Färbeverhalten der Rv1500 Deletionsmutante in der Säurefesten-Färbung nach Ziehl-Neelsen	67
5.1.4	Untersuchung der Koloniemorphologie von <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ Rv1500 auf Kongo-Rot-haltigen Nährböden	67
5.1.5	Charakterisierung der Rv1500 Deletionsmutante unter Detergenz-Stressbedingungen	68
5.1.6	Bestimmung der Neutralzucker.....	70

5.1.7	Nachweis von Rv1500 auf mRNA-Ebene in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	71
5.1.8	Charakterisierung von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv Δ Rv1500 in Makrophagen und im Maus-Infektionsmodell der Tuberkulose*	72
5.2	Deletion von <i>hddA</i> in <i>M. tuberculosis</i> H37Rv und Charakterisierung der Deletionsmutante	75
5.2.1	Genomische Situation und Generierung der Deletionsmutante	75
5.2.2	Lichtmikroskopische Charakterisierung der <i>hddA</i> -Deletionsmutante	76
5.2.3	Elektronenmikroskopie.....	77
5.2.4	Wachstum von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv Δ <i>hddA</i> und <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv auf mit Kongo-Rot supplementierten Nährböden.....	77
5.2.5	Sensitivität von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv Δ <i>hddA</i> gegenüber Detergenz.....	79
5.2.6	Virulenz von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv Δ <i>hddA</i> im Maus-Infektionsmodell*	81
5.3	Die Bedeutung von GlnR für die Nitratassimilation von <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	83
5.3.1	Klonierung von <i>nirBD</i> in einen mykobakteriellen Expressionsvektor und Komplementierung einer <i>glnR</i> -Deletionsmutante von <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	83
5.3.2	Nachweis der GlnR-vermittelten Regulation der Expression der Nitritreduktase <i>nirB</i> durch Microarray-Technologie und Real-Time PCR.....	87
6.	Diskussion	90
6.1	Evaluierung der Bedeutung von Rv1500 für den Zellwandmetabolismus von <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	90
6.2	Charakterisierung der <i>hddA</i> -Deletionsmutante von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	95
6.3	Die Rolle von GlnR als Regulator der Nitratassimilation von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	98

7. Literaturverzeichnis.....	103
8. Anhang.....	117
8.1 Chemikalien und Lösungsmittel.....	117
8.2 Nährmedien.....	119
8.3 Enzyme.....	119
8.4 Kits.....	119
8.5 DNA-Standards.....	120
9. Danksagung.....	121
11. Lebenslauf.....	123

1. Zusammenfassung

Die Zellwandsynthese von *Mycobacterium tuberculosis*, sowie die Assimilation von Nährstoffen im Wirt durch den Pathogen sind essentiell für die Pathogenese der Tuberkulose.

Rv1500 ist bei *M. marinum* an der Synthese von Phosphatidylinositolmannosiden (PIM), einem wesentlichen Bestandteil der mykobakteriellen Zellwand, beteiligt. Die Transkription von Rv1500 wurde bei *M. tuberculosis* auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Es wurde eine Mutante von *M. tuberculosis* mit einer Deletion in Rv1500 generiert, die wie der Wildtyp Phosphatidylinositol (PI), PIM₂, AcPIM₂, Ac₂PIM₂ und AcPIM₆ produzierte. Weder Ac₂PIM₅ noch Ac₂PIM₇ wurden gefunden. Weitere Untersuchungen deuteten auf eine Unversehrtheit der mykobakteriellen Zellwandintegrität. Infektionsexperimente in Makrophagen und im Mausmodell der Tuberkulose zeigten, dass die Deletion von Rv1500 keinen Einfluss auf die intrazelluläre Replikation von *M. tuberculosis* hat. Es konnte die Bedeutung von Rv1500 für die Synthese von PIM in *M. tuberculosis* H37Rv geklärt werden.

hddA ist bei einigen Bakterien an der LPS- und Kapselsynthese, und somit ebenfalls am Aufbau der Zellwand, beteiligt. Eine Mutante von *M. tuberculosis* mit einer Deletion in *hddA* wurde generiert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der *hddA*-Deletionsmutante von *M. tuberculosis* H37Rv zeigten Veränderungen im Bereich der Zellwand. Resistenz von Mutante und Wildtyp gegenüber Detergenz, Koloniemorphologie auf Kongo-Rot-haltigen Nährböden, sowie die Säurefestigkeit nach Ziehl-Neelsen hingegen waren identisch. Die Mutante zeigte im Maus-Infektionsmodell die gleiche Virulenz wie der Wildtyp.

GlnR wurde bei *M. tuberculosis* als zentraler Regulator der Nitratassimilation, die durch die Gene *narGHJI* und *nirBD* vermittelt wird, postuliert. Eine *glnR*-Deletionsmutante von *M. tuberculosis*, wurde mit *nirBD* unter der Kontrolle eines heterologen, GlnR-unabhängigen, Promotors transformiert. Der rekombinante Stamm war wie der Wildtyp in der Lage Nitrat zu assimilieren. Die Transkriptomanalyse der *glnR*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp bestätigte, dass *nirBD*, nicht aber *narGHJI* durch GlnR reguliert wird. Es wurden weitere GlnR-abhängige Gene identifiziert.

Schlagworte: *Mycobacterium tuberculosis*, Zellwand, Nitratassimilation

2. Abstract

Cell wall synthesis of *Mycobacterium tuberculosis*, and assimilation of nutrients from the host by the pathogen are essential for the pathogenesis of tuberculosis.

In *M. marinum*, it was suggested that the homologue of Rv1500 of *M. tuberculosis* is involved in the synthesis of phosphatidylinositol mannosides (PIM), and thus plays a key role in cell wall synthesis. Transcription of Rv1500 mRNA was demonstrated in *M. tuberculosis*. A mutation of Rv1500 was generated in *M. tuberculosis*. We found phosphatidylinositol (PI), PIM₂, AcPIM₂, Ac₂PIM₂, and AcPIM₆ in both wild type and the mutant, and were unable to detect Ac₂PIM₇ or Ac₂PIM₅ in either strain. Further analyses indicated that cell wall synthesis was not affected by the mutation. Infection of macrophages and mice did not result in impairment of intracellular replication or virulence. Thus we clarified the role of Rv1500 in the synthesis of PIM of *M. tuberculosis*.

hddA is crucial for the synthesis of LPS and capsule in various bacteria, and thus is also involved in cell wall synthesis. A *hddA* mutant of *M. tuberculosis* was generated. Electron microscopy of the mutant strain showed an alteration in cell surface properties, whereas acid-fastness, growth on Congo-red containing agar plates, and resistance to detergent stress conditions remained unaffected by the mutation. Virulence was identical for the mutant and wild type in a mouse model of tuberculosis.

GlnR in *M. tuberculosis* was suggested to act as a central regulator in nitrate assimilation, which is mediated by the combined action of *narGHJI* and *nirBD*, by controlling expression of *nirBD*. To test this hypothesis, *nirBD* under the control of a heterologous, GlnR-independent promoter was transformed into the *glnR*-mutant of *M. tuberculosis*. The recombinant strain regained the ability to assimilate nitrate. Whole gene expression analysis of the mutant and the wild type identified additional, GlnR-dependent genes.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, cell wall, nitrate assimilation

3. Einleitung

3.1 *Mycobacterium tuberculosis* – Taxonomische Einordnung, Pathogenese und Epidemiologie

Mycobacterium tuberculosis ist einer der bedeutendsten bakteriellen Krankheitserreger. An einer Infektion mit *M. tuberculosis* starben 2006 weltweit etwa 1,7 Millionen Menschen, von denen 12 % mit HIV koinfiziert waren (World Health Organisation, 2008). Etwa ein Drittel der Weltbevölkerung ist latent infiziert, und das Risiko, eine aktive Erkrankung zu entwickeln, beträgt 10 % (Rook *et al.*, 2005). Die Inzidenz lag im Jahr 2006 bei 9,2 Millionen Neuerkrankungen und die Prävalenz der aktiven Tuberkulose belief sich auf 14,4 Millionen Fälle. Eine halbe Millionen Menschen waren im Jahr 2006 mit MDR-TB Stämmen infiziert. Dabei handelt es sich um Stämme, die mindestens Resistenzen gegen Isoniazid und Rifampicin aufweisen (World Health Organisation, 2008).

Mycobacterium tuberculosis wurde 1882 von Robert Koch als der Erreger der Tuberkulose identifiziert. Koch gelangen die Isolierung des Bakteriums aus tuberkulösem Material und die Anzucht in Reinkultur. Robert Koch konnte durch die Infektion von Meerschweinchen mit dem Mikroorganismus Tuberkulose erzeugen und anschließend den Erregernachweis auf mikroskopischer und kultureller Ebene führen (Wiesmann, 1978).

Mykobakterien besitzen eine stäbchenförmige Morphologie mit einem Durchmesser von etwa 0,4 μm und einer Länge von 3-4 μm . Ihre Zellwand besitzt Merkmale grampositiver Bakterien, kann jedoch nicht in der Gram-Färbung dargestellt werden. Aufgrund ihrer lipidreichen Zellwand, die vor allem durch die Mykolsäuren charakterisiert wird, zeigt sich ein säurefestes Färbeverhalten in der Färbung nach Ziehl-Neelsen. Bei der säurefesten Färbung dringt der in Phenol gelöste basische Farbstoff Fuchsin während des langsamen Erhitzens des Ausstrichs in die Zellen ein (Wiesmann, 1978). Bei der Färbung kommt es wahrscheinlich zu ionischen Wechselwirkungen zwischen der Carboxylgruppe der Mykolsäuren und einer Aminogruppe des Fuchsins, deren Stickstoffatom eine positive Partialladung trägt. Mykobakterien lassen sich mit Säure-Alkohol nicht entfärben (Madigan *et al.*, 2001; Schlegel, 1985). Bei Mykolsäuren handelt es sich um komplexe verzweigteketige

Hydroxylipide. Mykobakterielle Mykolsäuren unterscheiden sich von denen anderer *Genera*, wie zum Beispiel *Corynebacterium* und *Nocardia*. *Nocardia* erscheinen im Direktpräparat schwach säurefest und verlieren bei Subkultivierung weiter diese Eigenschaft. Bei den mykobakteriellen Mykolsäuren handelt es sich um die längsten Mykolsäuren mit einer Kettenlänge zwischen 70 und 90 Kohlenstoffatomen. Es gibt weitere Unterschiede, die die Konformation und die biochemischen Eigenschaften beeinflussen (Brennan und Nikaido, 1995; Pfyffer und Vincent, 2006).

Phylogenetisch ist die Gattung *Mycobacterium* der Familie der *Mycobacteriaceae* und der Ordnung der *Actinomycetales* zuzuordnen. Die Gattung vereint mehr als 100 Spezies, die alle einen GC-Gehalt von 61 bis 71 % aufweisen. Mykobakterien sind unbewegliche, nicht-sporulierende, aerobe oder mikroaerophile Bakterien (Pfyffer und Vincent, 2006). Man unterscheidet die Gruppe der langsam wachsenden von den schnell wachsenden Arten. Schnell wachsende Mykobakterien brauchen bis zu zehn Tage, langsam wachsende Arten bis zu sechs Wochen, bis sie Kolonien auf festen Nährmedien gebildet haben (Parish und Stoker, 1998). Eine weitere Charakterisierung der Mykobakterien kann aufgrund der Fähigkeit zur Ausbildung von Pigmenten erfolgen. Es ergibt sich eine Einteilung in drei Gruppen: nicht Pigment bildende, photochromogene und scotochromogene Bakterien. Photochromogene Mikroorganismen bilden Pigmente nur, wenn sie im Licht kultiviert werden, und Scotochromogene bilden Pigmente auch dann, wenn sie im Dunkeln inkubiert werden. *Mycobacterium tuberculosis* zählt zu den nicht-pigmentierten Mykobakterien (Madigan *et al.*, 2001).

Die drei wichtigsten Spezies des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes sind *M. tuberculosis*, *M. bovis* und *M. africanum*, deren Klinik der Infektion nicht unterscheidbar ist. Die anderen Vertreter des *Genus Mycobacterium* werden als nicht-tuberkulöse, oder früher als atypische, Mykobakterien bezeichnet (Fuehner *et al.*, 2007). Die Übertragung des Erregers der Tuberkulose, *M. tuberculosis*, erfolgt fast ausschließlich über die Luft. Infektios sind Aerosole, die beim Husten, Niesen und Sprechen gebildet werden. *Mycobacterium tuberculosis* ist dabei in den kleinen, 1-5 µm großen Partikeln der Aerosole enthalten. Wegen ihrer geringen Größe können die Partikel für Stunden in der Luft bleiben und beim Atmen bis in den Alveolarraum vordringen. Die Bakterien werden dort von Alveolarmakrophagen phagozytiert (Fuehner *et al.*, 2007; Frieden *et al.*, 2003). *Mycobacterium tuberculosis*

besitzt mehrere Mechanismen, um in die alveolären Makrophagen zu gelangen. So nutzt der Erreger beispielsweise zwei Mechanismen zur Opsonisierung mit den Faktoren C3b und C3bi über den klassischen und alternativen Weg des Komplementsystems, beziehungsweise C2a zur Generierung von opsonisch aktivem C3b. Auf diese Weise opsonierte Bakterien können über die Rezeptoren CR1, CR3 und CR4 an Makrophagen binden. An den Rezeptor CR3 bindet *M. tuberculosis* über zwei Bindedomänen. Opsonierte Bakterien binden an die C3bi-Bindedomäne, während nicht opsonierte Bakterien über Polysaccharide der Kapsel an der β -Glucan-Bindestelle in der Nähe des C-Terminus von CD11b binden können (Ernst, 1998; Ferguson *et al.*, 2004). Lipoarabinomannan ist ein Ligand des Mannoserezeptors (Ernst, 1998). So konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass klinische *M. tuberculosis*-Isolate mit verkürztem und stark verzweigtem ManLAM weniger effektiv in Makrophagen aufgenommen wurden. Dieser Effekt wurde durch die kompetitive Blockierung des Mannoserezeptors mit einem spezifischen Antikörper bestätigt (Torrelles *et al.*, 2008). Die exponierte unterschiedliche Substitution mit Mannose-, Phosphatidylinositol- (PI) oder Arabinoseresten des Lipoarabinomannan (LAM) bedingt auch speziesabhängige Unterschiede im Infektionsverlauf. Dieser Ligand kann sowohl mit dem Mannoserezeptor von Makrophagen als auch mit DC-SIGN dendritischer Zellen wechselwirken (Kang *et al.*, 2005; Tailleux *et al.*, 2003).

Intrazelluläre Pathogene, die Makrophagen als Wirtszelle besiedeln, haben verschiedene Abwehrstrategien entwickelt. Während *Listeria* und *Shigella* aus den Phagosomen in das Zytosol gelangen, adaptieren sich zum Beispiel *Leishmania* und *Coxiella* an das bakterizide Milieu im Lysosom und vermehren sich dort. Mykobakterien verbleiben ebenfalls Phagosom. Sie blockieren die Phagosomen-Lysosomen-Verschmelzung beziehungsweise die Reifung zur aktiven lysosomalen Vakuole und verhindern so den Aufbau eines bakteriziden Milieus. Mit *M. tuberculosis* besiedelte Phagosomen entwickeln sich nicht über ein frühes Reifungsstadium hinaus. So bleibt beispielsweise der pH-Wert im Lumen bei 6,4. Es konnte gezeigt werden, dass unter anderem Lipoarabinomannan, Trehalose-Dimycolat (Cord-Faktor) und Sulfolipide von *M. tuberculosis* die Phagosomen-Lysosomen-Verschmelzung verhindern. Ferner findet eine umfangreiche Adaptation des Transkriptoms statt (Rohde *et al.*, 2007). So wurden insgesamt 585 Gene von *M. tuberculosis* H37Rv nach 4 und/oder 24 Stunden in THP-1-Makrophagen differentiell