

Zuwendungsempfänger: Dr. Cordelia Arndt-Sullivan / Prof. Dr. Dr. h.c. Stefan H.E. Kaufmann Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie Abt. Immunologie Charitéplatz 1 10117 Berlin	Förderkennzeichen: 0313801K
Vorhabensbezeichnung: Globale Proteomanalyse von <i>M. tuberculosis</i> Beijing und afrikanischen TB Isolaten	
Laufzeit des Vorhabens: 1. Juni 2006 bis 31. März 2010	
Berichtszeitraum: 1. Juni 2006 bis 31. März 2010	

I. Kurze Darstellung

<p>1. - 5. Aufgabenstellung war die vergleichende Proteomanalyse von <i>M. tuberculosis</i> Beijing und afrikanischen TB Isolaten. Die Ergebnisse dieser Studie sollten tieferes Verständnis über die Beziehungen zwischen den verschiedenen Stämmen liefern. Es sollten Proteine identifiziert werden, die möglicherweise wichtige Faktoren für Pathogenese, Persistenz und das intrazelluläre Überleben von Mykobakterien darstellen und demzufolge Kandidaten für Impfstoffe, Diagnostik und Chemotherapie sind.</p> <p>Die Hauptaktivitäten fanden am MPIIB Berlin mit wesentlicher Unterstützung seiner Core Facility Protein-Analytik statt, in welcher die vollständige Infrastruktur für 2D-Elektrophorese, LC und MALDI-TOF-MS vorhanden ist. Die mykobakteriellen Anzuchten wurden innerhalb des Projektclusters vom Forschungszentrum Borstel (S. Niemann) durchgeführt. Während die meisten klinischen Isolate aus der mykobakteriellen Stammsammlung in Borstel stammten, wurden einige afrikanische Isolate mit Zustimmung der betroffenen Konsortialmitglieder aus dem Bill & Melinda Gates-Stiftung geförderten internationalen GC6-74 Projekt, das vom MPIIB koordiniert wird, zur Verfügung gestellt. Speziell mit dem Team um S. Niemann gab es intensiven Austausch bezüglich der standardisierten mykobakteriellen Anzuchten klinischer TB-Isolate.</p> <p>Wichtigster methodischer Anknüpfungspunkt waren die 2D- Gelelektrophorese und MALDI-TOF-Massenspektrometrie, die seit Jahren am MPIIB erfolgreich etabliert waren.</p>
--

II. Eingehende Darstellung

1. Eingehende Darstellung der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Phase 1 des Projektes (2006-2008) beschäftigte sich zunächst damit, die zu analysierenden *M. tuberculosis* Beijing und afrikanischen klinischen TB-Isolate auszuwählen und die Kulturbedingungen zu optimieren. Zusätzlich wurde ein Verfahren zur selektiven Extraktion von Plasma-Membranproteinen etabliert.

Die Stammauswahl und Anzuchten wurden vom Forschungszentrum Borstel (Arbeitsgruppe Stefan Niemann) ausgeführt. Für die vergleichende Analyse (2008-2009) wurden die *M. tuberculosis*-Stämme Beijing, EAI, Haarlem, Cameroon, H37Rv und Uganda verwandt. Zusätzlich wurden *M. canetti*, *M. caprae*, *M. africanum* West-Africa 1 and *M. africanum* West-Africa 2 in den Vergleich einbezogen. Die Anzucht in Middlebrook 7H9/OADC-Medium gestaltete sich teilweise außerordentlich schwierig. Für die nachfolgenden Proteomanalysen konnten nur solche Isolate verwendet werden, die vergleichbare *in vitro*-Wachstumskinetik aufwiesen. Des Weiteren wiesen die erhaltenen mykobakteriellen Extrakte eine sehr dünne Proteinkonzentration auf, was anfänglich zu qualitativ minderwertigen Gelen führte. Nach erneuter Extraktion tiefgefrorener mykobakterieller Pellets lagen Anfang 2009 30 qualitativ zufriedenstellende Proteingele vor, mit welchen computergestützte Vergleiche (PD Quest) vorgenommen wurden. Dabei wurde festgestellt, dass die Proteingele der neu aufgearbeiteten, einjährig gelagerten Pellets von *M. africanum* West-Africa 2 und Uganda ein Proteinabbaumuster aufwiesen und demzufolge aus dem globalen Gelvergleich ausgeschlossen werden mussten. Nach Selektion interessanter Proteinspots (nur vorkommend bzw. fehlend in bestimmten Stämmen, verstärkt oder vermindert vorkommend in bestimmten Stämmen) wurden diese mit Hilfe von MALDI-TOF-MS identifiziert.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt beschreiben:

Es gibt ein spezifisches Proteinmuster für phylogenetisch moderne (Clade I) bzw. phylogenetisch altertümliche Stämme (Clade II): Clade I Stämme zeichnen sich durch die Deletion der Region TBD1 aus, wohingegen Clade II Stämme diese Region besitzen. Als für Clade I charakteristische Proteine wurden identifiziert: Rv0952 (SucD), Rv1155 (CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN, Ausnahme Beijing), Rv1383 (CARA), Rv2623 (TB31.7), Rv2970c (LipN) und Rv3275c (PurE). Folgende Proteine wurden nur bei Stämmen von Clade 2 identifiziert: Rv0192 (TBFG_10194), Rv0972 (FADE12), Rv1472 (ECHA12) und Rv2971 (oxidoreductase).

Für die Proteine Rv1409 (RibG) und Rv1596 (nadC) konnten sowohl in Clade I-Stämmen als auch in Clade II-Stämmen charakteristische Proteinspots detektiert werden, die jedoch eine unterschiedliche elektrophoretische Mobilität besaßen. Es ist möglich, dass es sich bei den zuvor erwähnten spots ebenfalls um Proteinvarianten handelt. Einige der Proteine wurden bereits von Mattow et al. (2001) in einem *M. tuberculosis* H37Rv – *M. bovis* BCG – Vergleich wegen ihrer unterschiedlichen Lage im Gel beschrieben.

Cluster- und Korrespondenzanalysen von Proteinspot-Intensitäten der zu vergleichenden Stämme bestätigen die phylogenetische Stellung einzelner Genotypen. So unterschied sich das Proteinmuster von *M. canetti* am stärksten von allen miteinander verglichenen Genotypen, mit 33 einzigartigen und 29 nur dort fehlenden Proteinspots, was einen Hinweis auf die Stellung von *M. canetti* als phylogenetische „Outgroup“ liefert. Weiterhin nahmen *M.*

caprae und *M. africanum* West Africa 1 eine distinkte Stellung ein und unterschieden sich deutlich von den phylogenetisch homogeneren Gruppen *M. tuberculosis* Haarlem, Cameroon und H37Rv.

Ein fehlender Spot in der Analyse konnten auch einer deletierten Region zugeordnet werden. So fehlte sowohl bei *M. caprae* als auch bei *M. africanum* West Africa 2 Rv0222 (EchA1), was Teil von RD10 und somit bei beiden Genotypen auf genetischer Ebene nicht vorhanden ist. Andere in nur bestimmten Genotypen fehlende bzw. modifizierte Proteine sind bereits in früheren Studien als drug targets (Rv3266c, Rv0562) oder als in wichtigen Zellwandprozessen involviert (Rv3509c, Rv3734c, Rv0243, Rv1886c) beschrieben worden. Es ist möglich, dass Modifikationen an derartigen Proteinen Auswirkungen auf die Pathobiologie bzw. die Effektivität von TB- Medikamenten haben könnte. Eine Reihe von Proteinmodifikationen konnten bereits nachgewiesenen SNP's zugeordnet werden, was insbesondere für den Genotyp *M. tuberculosis* Beijing zutrif (Niemann et al. PLoS One. 2009 Oct 12;4(10):e740).

2. Eingehende Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Siehe Schlussabrechnung.

3. Eingehende Darstellung der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Es lagen bei Antragstellung keine Proteomvergleiche von Vertretern der wichtigsten phylogenetischen MTBC-Linien vor. Die durchgeführten Arbeiten haben erstmals Daten zu charakteristischen Proteinen der einzelnen Genotypen geliefert.

4. Eingehende Darstellung des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die gewonnenen Proteomdaten werden für die Allgemeinheit zugänglich auf der 2D-Datenbank des MPIIB abgelegt werden (<http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE>). Die Gele der verschiedenen Genotypen werden Informationen über einzigartige oder fehlende Spots sowie Spotintensitäten vergleichend für alle behandelten Genotypen enthalten.

5. Eingehende Darstellung des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Keine.

6. Eingehende Darstellung der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses

Erschienen:

Mattow J., Siejak F., Hagens K., Schmidt F., Koehler C., Treumann A., Schaible U.E., Kaufmann, S.H.E. An improved strategy for selective and efficient enrichment of integral plasma membrane proteins of mycobacteria. Proteomics. 2007; 7(10):1687-1701

In Vorbereitung:

Arndt-Sullivan C., Mattow J., Siejak F., Pleissner K.P., Jungblut P., Homolka S., Niemann S., Parida S. and Kaufmann S.H.E.: Proteomic Profiling of Pathogenic Mycobacterial Strains /Clinical Isolates of Varying Virulence.

Zuwendungsempfänger: Dr. Jörg Schreiber* / Prof. Dr. Dr. h.c. Stefan Kaufmann Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie Abt. Immunologie Charitéplatz 1 10117 Berlin *bis 31.3.09: Dr. V. Patzel	Förderkennzeichen: 0313801K
Vorhabensbezeichnung: 1) Funktionelle Validierung von Genen von <i>M. tuberculosis</i> Beijing und afrikanischen klinischen TB-Isolaten 2) Identifizierung kleiner, nicht-kodierender RNAs von <i>M. tuberculosis</i> oder humanen Ursprungs, welche im Infektionsverlauf auftreten und gegebenenfalls einen Einfluss auf die Infektion in beiden Richtungen haben können.	
Laufzeit des Vorhabens: 1. Juli 2006 bis 31. März 2010	
Berichtszeitraum: 1. Juli 2006 bis 31. März 2010	

I. Kurze Darstellung

1.-5. Aufgabenstellung

Ziel des Projektes war moderne molekularbiologische Techniken auszunutzen, um unsere Kenntnisse über den Ablauf mykobakterieller Infektionen zu vertiefen. In Projekt 1 sollten kleine interferierende RNAs dazu verwendet werden, die Expression mykobakterieller Gene gezielt zu verkleinern oder sogar komplett stillzulegen. Im zweiten Projekt wurde die Ultra-Hochdurchsatz-Sequenzierung (UHS) eingesetzt, um kleine mykobakterielle RNAs zu identifizieren und Änderungen in der RNA-Expression von Wirtszelle und Bakterium zu bestimmen.

Zu Beginn der Arbeiten in Projekt 1) war die Technik, mit kleinen interferierenden RNAs die Genexpression in Säugetierzellen zu steuern im Labor etabliert. Dies auch in Bakterien zu versuchen, stellte hingegen eine Innovation dar.

Am Anfang der Förderperiode war die in Projekt 2) eingesetzte UHS in ersten Publikationen beschrieben worden, aber nur wenig verbreitet. Seither revolutioniert diese Technik die Biologie und wird in den unterschiedlichsten Bereichen angewendet. Dabei determinieren die jeweiligen Projektziele, welche der verschiedenen UHS-Verfahren für eine bestimmte Fragestellung am geeignetsten und unter finanziellen Gesichtspunkten am günstigsten ist.

Neben der Zusammenarbeit mit dem EBML Hamburg (M. Wilmanns) und dem Forschungszentrum Borstel (S. Niemann) innerhalb des TB-Clusters war die Firma GATC für die UHS eingebunden. Die Analyse der UHS-Daten wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von

Weï Chen am Berliner Institut für medizinische Systembiologie ausgeführt. Bei der Analyse von Sequenzierdaten kooperierten wir außerdem mit dem MPI für Molekulare Genetik in Berlin (R. Krause).

II. Eingehende Darstellung

1. Eingehende Darstellung der erzielten Ergebnisse im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Projekt 1)

In Säugetieren hat die Verwendung kleiner, interferierender RNAs für die Reduktion der Genexpression die Molekularbiologie entscheidend verändert und ist als Hochdurchsatz-Verfahren ein eminent wichtiges Werkzeug zur Charakterisierung der Funktion von Genen geworden. Ein ähnliches Verfahren für bakterielle Zellen würde die Validierung von Genfunktionen sehr vereinfachen und könnte die Infektionsforschung weit voranbringen. Um diese Technik in Mykobakterien zu etablieren, wurden von uns Reportergene wie GFP in Bakterien geschleust und stabil exprimiert. Anschließend wurde getestet welche kleinen RNAs die Genexpression reduzieren können. Wie im Zwischenbericht 2007 beschrieben traten eine ganze Reihe unvorhergesehener Probleme auf: Vor allem die stark variierende Transfektionseffizienz der Mykobakterien sowie die chargenabhängige Güte der eukaryotischen Helferproteine führten dazu, dass in einigen Experimenten die Expression der Reportergens zwar herunterreguliert wurde, dies anschließend aber nicht reproduziert werden konnte. Aus diesen Gründen haben wir uns entschlossen, die Arbeiten an diesem Projekt einzustellen und andere Ansatzpunkte zu verfolgen.

Hierzu gehörte die nähere Charakterisierung von *M. tuberculosis* H37Ra, einer spontan aufgetretenen, avirulenten Form des Laborstamms H37Rv. Da H37Ra noch nicht sequenziert worden war, haben wir das 454 Upstream Homology Sequence (UHS)-Verfahren eingesetzt, um mögliche Mutationen in H37Ra aufzuspüren, die auch die verminderte Virulenz erklären könnten. Neben anderen Abweichungen im H37Ra Genom konnte eine Veränderung in der genomischen Sequenz des PhoP Proteins gefunden werden (Tabelle 1, rot eingefärbter Buchstabe). In weiteren biochemischen Experimenten (wie z.B. Gelshifts) konnte gezeigt werden, dass die nicht synonyme Punktmutation die DNA Bindung des Transkriptionsfaktors PhoP vermindert. Außerdem wurde durch die Einbringung des PhoP von H37Rv der avirulente Phänotyp von H37Ra zumindest teilweise zum ursprünglichen H37Rv Phänotyp revertiert. Diese Ergebnisse konnten hochrangig publiziert werden (siehe Punkt 6 dieses Berichts). Sie belegen eindrucksvoll, wie eine einfache Punktmutation die Gefahr, die von Bakterien für den Menschen ausgeht, entscheidend verändern kann. Bakterielle Stämme, in denen PhoP deletiert ist, werden in anderen Arbeitsgruppen zurzeit auch darauf getestet, ob sie sich als TB-Vakzin eignen.

Tabelle 1:

	gtcaacgctcgtcgagtcctacgtgctcgtatctgcgccgcaagatcgac
H37Rv
H37Rat.....
M.bovis
M.para.t.....c.....
M.aviumt.....c.....
CDC1551