

Das langsame Wachstum von Mykobakterien

Mögliche Ursachen und Bedeutung für die Pathogenität

Die Gattung *Mycobacterium*

Der bedeutsamste Vertreter der Gattung *Mycobacterium* ist der Tuberkuloseerreger *Mycobacterium tuberculosis*, der weltweit jährlich ca. 1,8 Millionen Todesopfer verursacht [1] und somit auch heute noch der wichtigste bakterielle Infektionserreger ist. Neben den hochpathogenen *Mycobacterium*-Spezies, zu denen die Vertreter des *M.-tuberculosis*-Komplexes oder der Lepraerreger *M. leprae* zählen, treten bei Patienten auch opportunistische Keime wie *M. smegmatis*, *M. fortuitum* oder *M. chelonae* auf, die meistens Abszesse und Wundinfektionen und nur selten Lungeninfektionen verursachen [2].

Eine herausragende Eigenschaft insbesondere der hochpathogenen Mykobakterien wie *M. tuberculosis* oder *M. leprae* ist ihre Fähigkeit, sich intrazellulär in Makrophagen zu vermehren. So sind Vertreter des *M.-tuberculosis*-Komplexes in der Lage, die Phagosomenreifung zu unterbrechen, weswegen deren Fusion mit den Lysosomen innerhalb der Makrophagen unterbleibt und die Bakterien den lysosomalen Abwehrmechanismen entgehen. Eine weitere für den Infektionsverlauf entscheidende Eigenschaft ist die Fähigkeit der Tuberkuloseerreger, in einem als Latenz bezeichneten Zustand bis zu Jahrzehnten im Körper von Infizierten in Granulomen zu überdauern, um bei einem Nachlassen des Immunsystems, bedingt durch Faktoren wie Alter, Krankheit oder schlechten Ernährungszustand, reaktiviert zu werden und das Krankheitsbild der Tuberkulose auszulösen.

Die Wachstumsgeschwindigkeit von Mykobakterien und ihre Pathogenität

Zu den auffälligsten Merkmalen der Gattung *Mycobacterium* zählt ihr langsames Wachstum. Auffällig sind auch die innerhalb der Gattung stark voneinander abweichenden Generationszeiten verschiedener Spezies, die von 3 Stunden bei *M. smegmatis* über ca. 14–15 Stunden bei Vertretern des *M.-tuberculosis*-Komplexes bis hin zu 20–30 Tagen bei *M. leprae* reichen [3]. *Mycobacterium*-Spezies, die eine Generationszeit von maximal 5 Stunden haben und innerhalb von 7 Tagen sichtbare Kolonien erzeugen, werden als schnell wachsend bezeichnet. Langsam wachsende *Mycobacterium*-Spezies haben Generationszeiten von über 5 Stunden und benötigen mehr als 7 Tage zur Erzeugung sichtbarer Kolonien [4].

Die Gegenüberstellung von Wachstumsgeschwindigkeit und Pathogenität unterschiedlicher *Mycobacterium*-Spezies (■ **Tabelle 1**) zeigt interessanterweise, dass alle hochpathogenen Arten, die der Risikogruppe 3 angehören, langsam wachsend sind, während die apathogenen Arten der Risikogruppe 1 zu den schnell wachsenden Mykobakterien zählen. Die Risikogruppe 2 umfasst hingegen sowohl pathogene als auch apathogene Arten. Dies legt den Schluss nahe, dass die Wachstumsrate von Mykobakterien von entscheidender Bedeutung für deren Pathogenität ist. Ein Verständnis der Mechanismen der

mykobakteriellen Pathogenität setzt somit auch Kenntnisse über die genetischen Determinanten voraus, die die Wachstumsgeschwindigkeit bestimmen.

Mögliche Determinanten der Wachstumsgeschwindigkeit von Mykobakterien

Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, welche Faktoren das mykobakterielle Wachstum tatsächlich limitieren, aber auf jeden Fall ist das langsame Wachstum multifaktoriell bedingt. Mögliche Ursachen für die generell langsame Wachstumsrate und die zusätzlich stark voneinander abweichenden Wachstumsgeschwindigkeiten unterschiedlicher *Mycobacterium*-Spezies werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

Die mykobakterielle Zellwand und ihre Ausstattung mit Porinen

Zu den besonderen Charakteristika der Gattung *Mycobacterium* zählt der ungewöhnliche Aufbau der Zellwand. Diese zeichnet sich durch eine dicke Mykolsäureschicht aus langkettigen Fettsäuren mit bis zu 60–90 Kohlenstoffatomen aus. Die Mykolsäuren sind mit Arabinogalaktanen verestert, die kovalent mit der Peptidoglykanschicht verbunden sind. Zusätzlich enthält die Zellwand verschiedene nicht-kovalent gebundene extrahierbare Glykolipide. Schon der hohe Energiebedarf für die Synthese der Mykolsäureschicht, deren An-

Tabelle 1

Wachstumsgeschwindigkeit und Pathogenität verschiedener *Mycobacterium*-Spezies

Art	Wachstum	Pathogenität	
	Zeitpunkt des Erscheinens von Kolonien in Tagen ^a	Risikogruppe ^b	Krankheitsbilder bei Menschen
Langsam wachsend			
<i>M. tuberculosis</i>	28	3	Tuberkulose, Lungen- und extrapulmonale TB
<i>M. bovis</i>	≥21	3	Tuberkulose, Lungen- und extrapulmonale TB
<i>M. africanum</i>	28	3	Tuberkulose, Lungen- und extrapulmonale TB
<i>M. leprae</i>	Nicht kultivierbar, Generationszeit in vivo 20–30	3	Lepra
<i>M. ulcerans</i>	28	3	Buruli ulcer
<i>M. asiaticum</i>	15–21	2	Lungenerkrankung
<i>M. avium</i>	≥7	2	Lungen und extrapulmonale Infektionen
<i>M. haemophilum</i>	≥14	2	Hautläsionen und Hautinfektionen
<i>M. intracellulare</i>	≥7	2	Tuberkulose-artige Lungenerkrankung
<i>M. kansasii</i>	≥7	2	Tuberkulose-artige Lungenerkrankung
<i>M. malmoense</i>	≥7	2	Lungeninfektionen
<i>M. marinum</i>	≥7	2	Hautläsionen und Hautinfektionen
<i>M. scrofulaceum</i>	≥7	2	Infektion des lymphatischen Gewebes
<i>M. simiae</i>	≥14	2	Lungeninfektionen
<i>M. szulgai</i>	14	2	Lungeninfektionen
<i>M. xenopi</i>	≥14	2	Lungeninfektionen
Schnell wachsend			
<i>M. chelonae</i>	3–4	2	Iatrogene Abszesse und Wundinfektionen
<i>M. fortuitum</i>	2–4	2	Iatrogene Abszesse und Wundinfektionen
<i>M. smegmatis</i>	2–4	2	Abszesse, Wundinfektionen
<i>M. agri</i>	≤5	1	Apathogen
<i>M. aichiense</i>	≤3	1	Apathogen
<i>M. aurum</i>	≤5	1	Apathogen
<i>M. chitae</i>	3–5	1	Apathogen
<i>M. peregrinum</i>	2–4	1	Apathogen
<i>M. phlei</i>	2–5	1	Apathogen
<i>M. thermoresistibile</i>	3–5	1	Apathogen

^a [3]; ^b Merkblatt B006 der Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie, Einstufung biologischer Agenzien: Prokaryonten, 2005.

teil am Trockengewicht der Zellwand bei *M. tuberculosis* 30%–40% beträgt [5], trägt zu einer Begrenzung der Wachstumsgeschwindigkeit von Mykobakterien bei.

Die Mykolsäureschicht stellt eine Permeabilitätsbarriere ähnlich der äußeren Membran gramnegativer Bakterien dar. Im Vergleich zur Zellwand von *Escherichia coli* ist die mykobakterielle Zellwand jedoch 100- bis 1000fach weniger permeabel für kleine geladene Moleküle und hat somit durch die entsprechend eingeschränkte Durchlässigkeit für Nährstoff

fe einen begrenzenden Einfluss auf das Wachstum [6]. Zusätzlich verfügt die äußere von Mykolsäuren und Glykolipiden gebildete Membran aufgrund der parallelen, relativ starren Anordnung der Mykolsäureketten über eine nur geringe Fluidität, wodurch auch die Diffusion lipophiler Moleküle durch die Zellwand eingeschränkt ist [7].

Zwar wirkt sich die Impermeabilität der Zellwand nachteilig auf die Nährstoffzufuhr der Mykobakterien aus, andererseits erfahren sie hierdurch aber einen

Schutz vor der Wirkung schädlicher Substanzen wie Antibiotika oder bakteriziden Substanzen der Phagolysosomen.

Um eine Diffusion hydrophiler Nährstoffe trotz der Impermeabilität der Zellwand zu gewährleisten, verfügen Mykobakterien über Porine, die die Mykolsäureschicht durchdringen. Die Dichte der Poren in der Mykolsäureschicht ist jedoch beispielsweise bei *M. smegmatis* ca. 15fach geringer als die Porendichte in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien [8]. Diese geringe Porendichte erschwert

Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 2005 · 48:1390–1399
DOI 10.1007/s00103-005-1171-x
© Springer Medizin Verlag 2005

A. Lewin · S. Sharbati-Tehrani

Das langsame Wachstum von Mykobakterien. Mögliche Ursachen und Bedeutung für die Pathogenität

Zusammenfassung

Die Gattung *Mycobacterium* weist als charakteristische Eigenschaft lange sowie bei verschiedenen Spezies der Gattung stark voneinander abweichende Generationszeiten auf. Alle hochpathogenen Spezies wie der Tuberkuloseerreger *M. tuberculosis* oder der Erreger der Lepra *M. leprae* zählen zu den langsam wachsenden Mykobakterien, während die apathogenen und opportunistischen Mykobakterien zu den schnell wachsenden Arten gehören. Dies legt die Frage nach einem möglichen kausalen Zu-

sammenhang zwischen Wachstumsrate und Virulenz nahe. Wir erörtern die möglichen Ursachen des ungewöhnlich langsamen und innerhalb der Gattung variablen Wachstums und diskutieren den aktuellen Kenntnisstand zur möglichen Bedeutung der Wachstumsgeschwindigkeit für die mykobakterielle Pathogenität.

Schlüsselwörter

Mycobacterium · Tuberkulose · Wachstumsrate · Virulenz · Pathogenität

Slow growth rate of mycobacteria. Possible reasons and significance for their pathogenicity

Abstract

A characteristic feature of mycobacteria is their slow growth rate, which in addition strongly varies in different species of the genus. All highly pathogenic species such as *M. tuberculosis* and *M. leprae* causing tuberculosis and leprosy, respectively, belong to the slow growing mycobacteria, while the apathogenic and opportunistic species are members of the fast growing mycobacteria. This suggests that the question be posed whether there is causality between myco-

bacterial growth rate and virulence. We discuss possible reasons for the slow and variable growth rates of mycobacteria and the current state of knowledge concerning the significance of slow growth for mycobacterial pathogenicity.

Keywords

Mycobacterium · Tuberculosis · Growth rate · Virulence · Pathogenicity

zusätzlich die Nährstoffaufnahme und kann zum langsamen mykobakteriellen Wachstum beitragen. Während der generelle Aufbau der Zellwand bei allen *Mycobacterium*-Arten einheitlich ist, unterscheiden sie sich wesentlich in ihrer Ausstattung mit Porinen. Neben der Porendichte können Unterschiede hinsichtlich der Porengrößen, Leitfähigkeiten und Ionenselektivitäten (■ **Tabelle 2**) einen Einfluss auf die Zellwandpermeabilität ausüben.

Eine neue Klasse von Porin-Genen, deren bekanntester Vertreter das Porin MspA aus *M. smegmatis* ist, wurde in verschiedenen schnell wachsenden Mykobakterien nachgewiesen [9]. Die durch MspA gebildeten Poren zeichnen sich im Vergleich zu anderen mykobakteriellen Porinen durch eine relativ hohe Leitfähigkeit aus (■ **Tabelle 2**). Neben dem *mspA*-Gen besitzt *M. smegmatis* die homologen Gene *mspB*, *mspC* und *mspD*. Eine Deletion von *mspA* führt zu einer Verringerung der Glukoseaufnahme um das 5fache [10], was die Bedeutung von MspA für die Nährstoffversorgung verdeutlicht. Auch der Durchtritt hydrophober Substanzen durch die äußere Membran wird durch Anwesenheit von MspA aufgrund des Einflusses des Porins auf die Membranstruktur erhöht [11]. Interessanterweise besitzen verschiedene schnell wachsende Mykobakterien zu *mspA* homologe Gene, während sie bei langsam wachsenden Mykobakterien nicht nachgewiesen wurden [9].

Der Beweis, dass die Ausstattung der mykobakteriellen Zellwand mit Porinen einer der Faktoren ist, die die In-vitro-Wachstumsgeschwindigkeit von Mykobakterien mitbestimmen, wurde durch Expression des *mspA*-Gens aus *M. smegmatis* in *M.-bovis*-BCG¹ erbracht. Die heterologe Expression von *mspA* in *M.-bovis*-BCG führte zu einem leicht beschleunigten Wachstum in Flüssigkultur [12] bzw. auf Agarplatten [13].

ABC-Transportsysteme

Das Ausmaß des Stoffaustauschs zwischen Mykobakterien und ihrer Umwelt wird nicht nur durch die Impermeabilität der Zellwand eingeschränkt. Auch der energie-

¹ *M.-bovis*-BCG: attenuierter Stamm (Bacille Calmette Guérin) von *M. bovis*.

Tabelle 2

Kanalbildende Proteine bei Mykobakterien

<i>Mycobacterium</i> -Spezies	Kanalbildendes Protein	Kanal-durchmesser	Einzelkanal-leitfähigkeit ^a	Selektivität	Referenzen
Langsam wachsend					
<i>M.-bovis</i> -BCG			4,0 nS 0,8 nS	Kationen Anionen	[45] [45]
<i>M. tuberculosis</i>	OmpATb	1,4–1,8 nm	0,7 nS 0,7 nS 3,0 nS	Kationen	[46] [47] [47]
Schnell wachsend					
<i>M. chelonae</i>		2,2 nm	2,7 nS	Kationen	[48]
<i>M. phlei</i>	MppA	1,8–2,0 nm	4,5 nS	Kationen	[49, 50]
<i>M. smegmatis</i>	MspA	2,5 nm	4,6 nS	Kationen	[9]

^a gemessen in 1 M KCl.

abhängige substratspezifische Stofftransport durch die Zytoplasmamembran über ABC-Transportsysteme (ATP binding cassette) spielt hierfür eine Rolle. ABC-Transporter stellen Permeasen dar, die verschiedene Moleküle substratspezifisch durch biologische Membranen transportieren. In Abhängigkeit von der Richtung des Transportvorgangs unterscheidet man Exporter von Importern.

Um mögliche ABC-Transportergene im Genom von *M. tuberculosis* zu identifizieren, wurde die Nukleinsäuresequenz nach in diesen Genen konservierten Regionen durchsucht [14]. Insgesamt wurden in dem Genom von *M. tuberculosis* 37 ABC-Transportsysteme nachgewiesen. Hiervon erwiesen sich 16 als Importer und 21 als Exporter. Im Vergleich dazu verfügt *E. coli* über 57 ABC-Transporter, von denen 44 Importer und 13 Exporter sind [15]. Die 78 ABC-Transporter von *Bacillus subtilis* teilen sich in 38 Importer und 40 Exporter. Diese Gegenüberstellung zeigt, dass *M. tuberculosis* deutlich weniger ABC-Transporter besitzt als die beiden schnell wachsenden Bakterienpezies *E. coli* und *B. subtilis* und dass besonders die Zahl der Importer deutlich geringer ist. Die bei *M. tuberculosis* im Vergleich zu anderen Bakterien geringeren Transportkapazitäten spiegeln sich auch darin wieder, dass *M. tuberculosis* nur ca. 2,5% seines 4,4 Mb großen Genoms [16] für die Kodierung von Proteinen, die an der Bildung von ABC-Transportsystemen beteiligt sind, aufwendet [14],

während beispielsweise bei *E. coli* die für ABC-Transporter kodierenden Gene 5% des 4,6 Mb großen Genoms in Anspruch nehmen [15].

Die Nukleinsäure-Syntheseleistung

Die Nukleinsäure-Syntheserate hängt einerseits von der Zahl der Replikations- und Transkriptionsinitiierungen ab, andererseits von der Geschwindigkeit des Nukleinsäurekettenwachstums. Untersuchungen an *M. smegmatis* und *M. tuberculosis* weisen darauf hin, dass die schnell wachsenden Mykobakterien eine höhere Anzahl starker Promotoren besitzen als langsam wachsende Mykobakterien, was sich in der Rate der Transkriptionsinitiierungen niederschlägt. Dieser Unterschied bezüglich der Promotorstärke kann durch den höheren GC-Gehalt der Promotoren von *M. tuberculosis* (57%) im Vergleich zu *M. smegmatis* (43%) erklärt werden [17].

Ein weiterer möglicher Grund für die eher geringe Rate an Transkriptionsinitiierungen liegt in der ungewöhnlichen Orientierung der Gene in Bezug auf die Richtung der Replikation: Während bei *B. subtilis* 75% der Gene die gleiche Polarität aufweisen wie die Replikation, ist dies bei *M. tuberculosis* nur zu 59% der Fall. Da Gene bei paralleler Orientierung zur Replikationsrichtung effizienter exprimiert werden, könnte diese ungewöhnliche Genpolarität zum langsamen Wachstum von Mykobakterien beitragen [16].

Auch das DNA- und das RNA-Kettenwachstum verlaufen bei Mykobakterien deutlich langsamer als dies bei schnell wachsenden Bakterien zu beobachten ist. Laut Untersuchungen von Hiriyanna und Ramakrishnan [18] ist das DNA-Kettenwachstum bei *M. tuberculosis* mit 3200 Nukleotiden pro Minute ca. 11-mal langsamer als bei *M. smegmatis* und ca. 13- bis 18-mal langsamer als bei *E. coli*. Die Elongationsrate für rRNA-Moleküle wurde bei *M. tuberculosis* auf 10 Nukleotide pro Sekunde berechnet [19]. In der gleichen Studie wurde die Geschwindigkeit des mRNA-Kettenwachstums auf 6 Nukleotide pro Sekunde geschätzt. Demgegenüber beträgt die mRNA-Elongationsrate bei *E. coli* 50 Nukleotide pro Sekunde. Wegen der Kopplung von Transkription und Translation wirkt sich bei Bakterien die Geschwindigkeit der mRNA-Elongation direkt proportional auf das Kettenwachstum bei der Proteinsynthese aus.

Zirka 80% der RNA einer mykobakteriellen Zelle liegen in Form von rRNA als Bestandteil der Ribosomen vor, weswegen das RNA/DNA-Verhältnis die Zahl der Ribosomen pro Zelle reflektiert [20]. Für dieses Verhältnis wurden in der exponentiellen Wachstumsphase Werte von 2:1 für *M. tuberculosis*, 4:1 für *M. smegmatis* und 20:1 für *E. coli* ermittelt [21]. In Übereinstimmung mit diesen Werten wiesen auch Harshey und Ramakrishnan [19] bei *M. tuberculosis* ein 10fach geringeres RNA/DNA-Verhältnis als bei *E. coli* nach.

Tabelle 3

Zahl der *rrn*-Operons und der *rrn*-Promotoren bei verschiedenen *Mycobacterium*-Spezies

<i>Mycobacterium</i> -Spezies	Anzahl der <i>rrn</i> -Operons	Anzahl der <i>rrn</i> -Promotoren	Referenz
Langsam wachsend			
<i>M. africanum</i>	1		[51]
<i>M.-bovis</i> -BCG	1		[51]
<i>M. celatum</i>	2		[52]
<i>M. intracellulare</i>	1		[22]
<i>M. leprae</i>	1		[53]
<i>M. marinum</i>	1	<i>rrnA</i> : 2	[29]
<i>M. microti</i>	1		[51]
<i>M. simiae</i>	1	<i>rrnA</i> : 3	[54]
<i>M. terrae</i>	2		[55]
<i>M. tuberculosis</i>	1	<i>rrnA</i> : 2	[22, 56, 57]
Schnell wachsend			
<i>M. abscessus</i>	1	<i>rrnA</i> : 5	[56, 58]
<i>M. agri</i>	2		[58]
<i>M. alvei</i>	2		[59]
<i>M. aurum</i>	2		[58]
<i>M. brumae</i>	2		[58]
<i>M. chelonae</i>	1	<i>rrnA</i> : 5	[58, 56]
<i>M. chitae</i>	2		[58]
<i>M. diernhoferi</i>	2		[59]
<i>M. fortuitum</i>	2	<i>rrnA</i> : 4; <i>rrnB</i> : 1	[56, 58]
<i>M. gilvum</i>	2		[58]
<i>M. mucogenicum</i>	2		[59]
<i>M. neoaurum</i>	2	<i>rrnA</i> : 3; <i>rrnB</i> : 1	[56]
<i>M. phlei</i>	2	<i>rrnA</i> : 3, <i>rrnB</i> : 1	[22, 56]
<i>M. porcinum</i>	2		[58]
<i>M. senegalense</i>	2		[58]
<i>M. smegmatis</i>	2	<i>rrnA</i> : 3, <i>rrnB</i> : 1	[22, 56]
<i>M. wolinskyi</i>	2		[59]

Anzahl der ribosomalen RNA-Gene (*rrn*) im Genom

Die rRNA-Syntheserate ist ein wesentlicher Faktor für die Regulierung der Ribosomenzahl pro Zelle und legt damit deren Kapazität zur Proteinsynthese fest. In Übereinstimmung mit dem niedrigeren RNA/DNA-Verhältnis sind in *Mycobacterium*-Zellen deutlich weniger Ribosomen vorhanden, als in Zellen von *E. coli*. So wurde die Ribosomenzahl in *M.-bovis*-BCG-Zellen, die sich in der Stationärphase befinden, auf 2200 geschätzt, während *E.-coli*-

Zellen in der gleichen Wachstumsphase über 6200 Ribosomen verfügen [20]. Bei Bakterien besteht eine Kopplung zwischen der Zahl der Ribosomen und der Wachstumsrate, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen ein ausgewogenes Verhältnis zwischen dem zellulären Pool an Ribosomen und den Erfordernissen der Proteinsynthese garantieren soll. Dieser als growth rate dependent control (GRDC) bezeichnete Mechanismus wird auf der Ebene der rRNA-Synthese gesteuert. Die rRNA-Synthesekapazität hängt wiederum von der Gendosis, d. h. der Zahl der *rrn*-

Operons und der Anzahl, Stärke und Regulierung der *rrn*-Promotoren ab.

Als langsam wachsende Bakterien besitzen Mykobakterien mit ein bis maximal 2 Kopien eine im Vergleich zu anderen Bakterien geringe Zahl an *rrn*-Operons [22]. Schnell wachsende Bakterien wie *E. coli* oder *B. subtilis* verfügen über 7 bzw. 10 *rrn*-Operons [23, 24]. Für *E. coli* konnte nachgewiesen werden, dass eine Verringerung dieser Zahl von 7 auf 3 zu einer Verringerung der Wachstumsrate führte [25]. Neben der Zahl der *rrn*-Operons bestimmt auch deren Lage die Menge der zur Ribosomensynthese zur Verfügung stehenden 23S-, 16S- und 5S-rRNA-Moleküle. Bei den meisten Bakterien befinden sich ein oder mehrere *rrn*-Operons in der Nähe des *oriC*, wodurch unter Ausnutzung des Gendosiseffekts während der Replikation eine Steigerung der rRNA-Synthese erzielt werden kann. Bei der Sequenzierung des Genoms von *M. tuberculosis* stellte sich jedoch heraus, dass das einzige *rrn*-Operon durch 1500 Kb vom *oriC* getrennt ist und somit der Gendosiseffekt während der Replikation nicht für eine erhöhte rRNA-Synthese genutzt wird [16].

Aufgrund früherer Untersuchungen bei verschiedenen langsam und schnell wachsenden Mykobakterien wurde lange Zeit angenommen, dass deren unterschiedliche Wachstumsrate durch die unterschiedliche Anzahl an *rrn*-Operons bedingt ist. So zeigten Bercovier et al. [22], dass die langsam wachsenden *M. tuberculosis* und *M. intracellulare* nur ein *rrn*-Operon besitzen, während die schnell wachsenden *M. smegmatis* und *M. phlei* über 2 *rrn*-Operons verfügen. Untersuchungen an anderen Spezies bestätigten, dass langsam wachsende Mykobakterien in der Regel nur ein *rrn*-Operon mit bis zu 3 Promotoren aufweisen, während schnell wachsende in der Regel 2 Operons mit bis zu 5 Promotoren besitzen (■ **Tabelle 3**). Ausnahmen von dieser Regel stehen jedoch der Annahme, die Hauptursache für das unterschiedliche Wachstumsverhalten der Mykobakterien läge in der rRNA-Synthesekapazität, entgegen. So weist das Genom der langsam wachsenden Spezies *M. celatum* und *M. terrae* 2 *rrn*-Kopien auf, während die schnell wachsenden *M. abscessus* und *M. chelonae* nur jeweils ein *rrn*-Operon tragen (■ **Tabelle 3**). In die gleiche Richtung weisen Berechnungen von

Cox [25], nach denen die Synthesekapazität des einzigen *rrn*-Operons von *M. bovis*-BCG bei maximaler Wachstumsrate nur zu 12% genutzt wird. Ein direkter experimenteller Beweis dafür, dass die Zahl der *rrn*-Operons höchstens einen geringen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit hat, wurde durch Erzeugung von *M. smegmatis*-Mutanten geliefert: Trotz Zerstörung entweder des *rrnA*- oder des *rrnB*-Operons war deren Wachstumsgeschwindigkeit in der Flüssigkultur gegenüber dem Wildtyp nicht verändert [26].

Insertionselemente und reduktive Evolution

Mit der Sequenzierung der Genome zahlreicher *Mycobacterium*-Spezies (■ **Tabelle 4**) ergaben sich neue Erkenntnisse zum Verständnis der Hintergründe für die unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der verschiedenen Arten. Als bedeutsam für die Evolution der langsam wachsenden Mykobakterien, die nach neueren Befunden aus schnell wachsenden Mykobakterien hervorgegangen sind [27], erwiesen sich der Erwerb von Insertionselementen (IS-Elemente) sowie auch der Verlust oder die Inaktivierung funktioneller Gene (sog. reduktive Evolution).

Die Sequenzierung des Chromosoms des *M. tuberculosis*-Stammes H37Rv zeigte, dass das Genom reich an repetitiver DNA ist [28]. Es beherbergt mehr als 56 zu 8 Familien gehörende IS-Elemente. Der Erwerb dieser großen Zahl an repetitiven DNA-Elementen, die die Entstehung von Deletionen und Chromosomenrearrangements und somit den Verlust funktioneller Gene förderten, könnte ein wichtiger Faktor für die Reduzierung der Wachstumsgeschwindigkeit gewesen sein [29].

Sehr gut nachvollziehbar ist dieser evolutionäre Prozess bei den Arten *M. ulcerans* und *M. marinum*. *M. ulcerans* ist aus *M. marinum* durch den Erwerb fremder DNA hervorgegangen. Während das Genom von *M. marinum* das IS-Element IS2404 nicht enthält, kommt es in hoher Kopienzahl im Genom aller daraufhin untersuchten *M. ulcerans*-Isolate vor [30]. Als Folge der Aufnahme der IS-Elemente kam es im Genom von *M. ulcerans* höchstwahrscheinlich zu Rekombinationsereignissen, die in Deletionen resultierten. Die-

Tabelle 4

Größe der Genome verschiedener <i>Mycobacterium</i> -Spezies				
Art	Stamm	Genomgröße [Mb]	Organisation	Referenz
<i>M. leprae</i>	TN	3,27	http://www.sanger.ac.uk	[28]
<i>M. bovis</i> -BCG	Pasteur 1173P2	4,0 ^a	http://www.pasteur.fr	
<i>M. microti</i>	OV254	4,26 ^a	http://www.sanger.ac.uk	
<i>M. bovis</i>	AF2122/97	4,35	http://www.sanger.ac.uk	[60]
<i>M. tuberculosis</i>	CDC1551	4,4	http://www.tigr.org	[16, 61]
<i>M. tuberculosis</i>	H37Rv	4,4	http://www.sanger.ac.uk	
<i>M. tuberculosis</i>	210	4,4 ^a	http://www.tigr.org	
<i>M. ulcerans</i>		4,6 ^a	http://www.pasteur.fr	
<i>M. avium</i>	104	4,7 ^a	http://www.tigr.org	
<i>M. avium subsp. paratuberculosis</i>	k10	4,8	http://www.cbc.umn.edu	
<i>M. marinum</i>	M	6,56 ^a	http://www.sanger.ac.uk	
<i>M. smegmatis</i>	MC2 155	6,9	http://www.tigr.org	

^aSequenzierung ist noch nicht komplett, daher ist die Genomgröße eine angenäherte Angabe.

se führten wiederum zu einer Genomverkleinerung von ca. 6,56 Mb (bei *M. marinum*) auf ca. 4,6 Mb (bei *M. ulcerans*) gekoppelt mit einer Verlängerung der Generationszeit (■ **Tabelle 1**).

Beim Vergleich der Genomsequenzen von *M. tuberculosis* und *M. leprae* fällt auf, dass die Parallelität der Genanordnung besonders an solchen Stellen unterbrochen ist, an denen bei *M. leprae* repetitive Elemente liegen. Das Genom von *M. leprae* besteht zu 2% aus repetitiven Sequenzen. Rekombinationsereignisse zwischen diesen Sequenzen führten zu einer Reduktion der Genomgröße auf nur 3,27 Mb [16]. Dies entspricht weniger als 75% des Genoms von *M. tuberculosis* [31].

Vorangetrieben wurde die reduktive Evolution bei Mykobakterien auch durch die Ansammlung von Pseudogenen. So besitzt *M. leprae* 1604 potenziell aktive Gene und 1116 Pseudogene [28]. Interessanterweise zählen zu den Letzteren auch 9 Sigmafaktoren. Die von diesen Sigmafaktoren regulierten Gene sind häufig ebenfalls zu Pseudogenen mutiert [32]. Insgesamt muss *M. leprae* im Verlauf seiner Entstehung aus dem mit *M. tuberculosis* gemeinsamen Vorläufer ungefähr 2000 funktionale Gene verloren haben [28]. Dies führte zu einem Verlust zahlreicher katabolischer Stoffwechselwege, während

die anabolischen Stoffwechselwege wenig betroffen wurden.

Stoffwechselleistungen

Der Verlust wesentlicher Stoffwechselaktivitäten kann sowohl das extrem langsame Wachstum von *M. leprae* unter In-vivo-Bedingungen mit einer Generationszeit von 20 bis 30 Tagen als auch das bis heute anhaltende Misslingen seiner Anzucht in künstlichen Nährmedien erklären. Während *M. tuberculosis* über 300 für den Energiestoffwechsel zuständige Gene verfügt, besitzt *M. leprae* hierfür nur 95 intakte Gene und 20 Pseudogene [33]. Beispielsweise kann *M. leprae* aufgrund des Verlustes der Gene *galK* und *galT* Galaktose nicht als Energiequelle nutzen. Weiterhin hat *M. leprae* verschiedene anaerobe und microaerophile Elektronentransfersysteme wie die Formiat-Dehydrogenase, die Nitrat-Reduktase und die Fumarat-Reduktase verloren. Ein weiteres Beispiel ist das Fehlen des 5'-Endes des NADH-Oxidase-Operons bei *M. leprae*, das zum Verlust der Fähigkeit zur ATP-Synthese durch die NADH-Oxidation führte [28].

Im Gegensatz zu *M. leprae* kann *M. tuberculosis* eine Vielzahl von Kohlenhydraten, Alkoholen, Ketonen und Carbonsäuren metabolisieren [16], sodass zur Erklä-

zung des langsamen Wachstums der Spezies *M. tuberculosis* andere Ursachen in Betracht gezogen werden müssen. Bereits in älteren Arbeiten wird der bei schnell und langsam wachsenden Mykobakterien voneinander abweichende Malat-Stoffwechsel als mögliche Ursache diskutiert. Der Malat-Abbau ist ein wesentliches Element der Energieerzeugung bei Mykobakterien [34]. Messungen der Aktivität der Enzyme Malat-Enzym (malic enzyme, malate dehydrogenase decarboxylating, EC 1.1.1.40) und Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.37) ergaben für das Malat-Enzym bei den schnell wachsenden Mykobakterien *M. smegmatis* und *M. fortuitum* hohe Werte, während bei den langsam wachsenden Spezies *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. kansasii* und *M. scrofulaceum* niedrige Werte gemessen wurden. Die langsam wachsenden Spezies wiesen hingegen hohe Malat-Dehydrogenase-Aktivitäten auf [34, 35]. Eine wichtige Funktion des Malat-Enzyms ist die Bildung von NADPH und Pyruvat, die für die Lipidbiosynthese benötigt werden. Aufgrund des hohen Lipidanteils der mykobakteriellen Zellwand ist ein Einfluss der Aktivität des Malat-Enzyms auf die Wachstumsrate durchaus denkbar. Das für dieses Enzym kodierende *mezG* Gen kann zwar in *M. tuberculosis* nachgewiesen werden, liegt jedoch in *M. leprae* nur als Pseudogen vor [33].

Die Wachstumsgeschwindigkeit von Mykobakterien: ein Virulenzfaktor?

Die zu Beginn bereits dargestellte Korrelation zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und Pathogenität der Mykobakterien legt die Frage nahe, ob hier ein kausaler Zusammenhang besteht und das langsame Wachstum als Virulenzfaktor zu werten ist. Obwohl sich zahlreiche Studien mit dieser Frage auseinander gesetzt haben, kann sie bis heute nicht eindeutig beantwortet werden.

Ein experimenteller Ansatz zur Klärung dieser Frage besteht in der Messung der Wachstumsgeschwindigkeit unterschiedlich virulenter Stämme pathogener Mykobakterien, wie z. B. *M. tuberculosis* und *M. bovis*, in kultivierten Makrophagen und in Tiermodellen. Auf diesem experimentellen Ansatz basierende

Arbeiten von North und Izzo [36] wiesen auf das Vorliegen eines engen Zusammenhangs zwischen In-vivo-Verdopplungsraten und Virulenz hin: Die Autoren untersuchten die Vermehrungsraten der *M. tuberculosis*-Stämme Erdman, des virulenten Stammes H37Rv, seines attenuierten Abkömmlings H37Ra sowie des attenuierten *M. bovis*-BCG-Stammes in SCID-Mäusen, die über keine spezifische Immunität verfügen. Dadurch sollte der Einfluss der spezifischen Immunabwehr auf das Wachstum virulenter und attenuierter Stämme minimiert werden. Es zeigte sich, dass die in den Tieren gemessenen Verdopplungsraten der Virulenz der Stämme entsprachen. Auch Untersuchungen von Silver et al. [37] unterstützen die Hypothese, dass virulentere *M. tuberculosis*- und *M. bovis*-Stämme intrazellulär schneller wachsen als weniger virulente Stämme. Die Autoren infizierten humane Monozyten mit dem virulenten *M. tuberculosis* H37Rv, dem avirulenten *M. tuberculosis* H37Ra und dem attenuierten *M. bovis*-BCG und beobachteten mit der Virulenz der Stämme korrelierende Wachstumsraten. Dieses Ergebnis veranlasste sie zu der Schlussfolgerung, dass sich die Virulenz von Stämmen des *M. tuberculosis*-Komplexes hauptsächlich in ihrer Fähigkeit, sich der intrazellulären Umgebung der Phagozyten anzupassen, ausdrückt. Diese Fähigkeit schlägt sich wiederum in der Wachstumsrate innerhalb der Makrophagen nieder.

Im Gegensatz dazu liegen jedoch auch Untersuchungen vor, die eine Korrelation zwischen Virulenz und Wachstumsrate nicht unterstützen [38, 39]. So verglichen Dunn and North [38] die Verdopplungszeiten unterschiedlicher *M. tuberculosis*- und *M. bovis*-Stämme in den Lungen immunkompetenter Mäuse und parallel dazu die Überlebensdauer der Mäuse. Obwohl z. B. der *M. bovis*-Stamm Branch längere Generationszeiten aufwies als 3 der 4 in die Studie einbezogene *M. tuberculosis*-Stämme, starben die mit diesem *M. bovis*-Stamm infizierten Mäuse früher als die mit den *M. tuberculosis*-Stämmen infizierten Mäuse.

Heftig diskutiert wurde die Bedeutung der Wachstumsgeschwindigkeit für die Virulenz auch im Zusammenhang mit dem *M. tuberculosis*-Isolat CDC1551. Die-

ser Stamm, der zwischen 1994 und 1996 einen Ausbruch in der Nähe der Grenze Kentucky/Tennessee auslöste, zeichnet sich durch eine hohe Übertragungsrates aus und wurde daher zunächst als besonders virulent erachtet. Ersten Untersuchungen zufolge schien er auch ein schnelleres Wachstum in der Lunge von Mäusen aufzuweisen [40]. Spätere Untersuchungen widerlegten jedoch sowohl die angenommene erhöhte Virulenz als auch das schnellere Wachstum des Isolats CDC1551 [39, 41]. Bei Infektionsversuchen mit Mäusen (Stamm C57BL/6) stellte sich heraus, dass *M. tuberculosis* CDC1551 in den Lungen gleiche Wachstumsraten aufwies wie die Stämme *M. tuberculosis* H37Rv und *M. bovis* Ravenel. Die Überlebensrate der Mäuse war jedoch bei einer Infektion mit *M. bovis* Ravenel deutlich geringer als bei einer Infektion mit den beiden *M. tuberculosis*-Stämmen [39]. Infektionsversuche mit Kaninchen, in deren Verlauf die Zahl der Granulome, deren Größe und Gehalt an Mykobakterien erfasst wurden, bestätigten, dass *M. tuberculosis* CDC1551 nicht virulenter ist, als der Vergleichsstamm *M. tuberculosis* H37Rv. Beide Stämme induzierten die gleiche Anzahl an sichtbaren Granulomen, aber die durch *M. tuberculosis* CDC1551 verursachten Granulome waren kleiner und enthielten weniger Bakterien [41]. Der Stamm *M. tuberculosis* CDC1551 induziert allerdings eine schnellere und robustere Immunantwort, die sich darin zeigt, dass er im Vergleich zu anderen *M. tuberculosis*-Stämmen (wie H37Rv) in infizierten Monozyten die Bildung größerer Mengen an TNF- α , IL-10, IL-6 und IL-12 hervorruft [42]. Die Auslösung einer schnellen und starken Immunantwort kann auch die hohe Rate an Tuberkulin-positiven Kontaktpersonen zu Beginn des Ausbruchs erklären.

Ein generelles Problem bei der Interpretation von Infektionsversuchen mit verschiedenen *Mycobacterium*-Stämmen liegt in der Differenzierung zwischen den Auswirkungen der Wachstumsgeschwindigkeit selbst und den Auswirkungen sonstiger Charakteristika der untersuchten Stämme auf den Verlauf der Infektion. Um hier klarer differenzieren zu können, bieten sich experimentelle Ansätze an, die auf dem Hinzufügen

oder Ausschalten eines einzigen Gens eines Stammes und der Analyse der daraus für die Wachstumsgeschwindigkeit und Virulenz resultierenden Folgen basieren. Mittels dieser Strategie konnte bewiesen werden, dass die Ausstattung der mykobakteriellen Zellwand mit Porinen die Wachstumsrate mitbestimmt: So zeigten *M.-bovis*-BCG-Derivate, die das Poringen *mspA* von *M. smegmatis* tragen, ein schnelleres Wachstum in Flüssigkultur oder auf Agarplatten. Entsprechend wuchsen *M.-smegmatis*-Mutanten, bei denen die 2 Poringene *mspA* und *mspC* deletiert waren, in Flüssigkultur deutlich langsamer [12, 13, 43]. Während also das Wachstum in künstlichen Kulturmedien sowohl bei dem schnell wachsenden *M. smegmatis* als auch bei dem langsam wachsenden *M.-bovis*-BCG durch Porine positiv beeinflusst wurde, traten beim Wachstum in kultivierten Maus-Makrophagen vollkommen entgegengesetzte Effekte ein: Das zusätzliche Poringen *mspA* verbesserte das intrazelluläre Wachstum von *M.-bovis*-BCG [13]; das intrazelluläre Überleben von *M. smegmatis* hingegen wurde durch die Deletion von *mspA* bzw. *mspA* und *mspC* stark verbessert [43]. Diese unterschiedlichen Auswirkungen von Porinen in *M. smegmatis* und *M.-bovis*-BCG lassen sich dadurch erklären, dass die Phagosomen, in denen sich diese *Mycobacterium*-Arten innerhalb der Makrophagen befinden, einen unterschiedlichen Reifungsgrad und somit unterschiedliche bakteriozide Aktivitäten aufweisen. Innerhalb des *M.-bovis*-BCG-Phagosoms, dessen Reifung in einem sehr frühen Stadium unterbrochen wird, überwiegt der durch die Porine erzielte Effekt der besseren Nährstoffversorgung, während innerhalb des mit den Lysosomen verschmelzenden *M.-smegmatis*-Phagosoms der durch die Porine verringerte Schutz gegenüber den Abwehrmechanismen des Makrophagen dominiert. An diesen Beispiel wird deutlich, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und Virulenz nicht einfach hergestellt werden kann: ein Merkmal, das das Wachstum zweier *Mycobacterium*-Spezies in künstlichen Kulturmedien fördert, kann in diesen *Mycobacterium*-Arten vollkommen entgegengesetzte Auswirkungen auf Vi-

rulenz-assoziierte Eigenschaften wie die intrazelluläre Persistenz ausüben.

Von herausragender Bedeutung für die mykobakterielle Pathogenität ist die Fähigkeit insbesondere der hochpathogenen, langsam wachsenden Mykobakterien, innerhalb von Granulomen in einem Ruhezustand, der Latenz, bis zu Jahrzehnten zu überdauern, ohne von der Immunabwehr eliminiert zu werden. Die geringen Teilungsraten der langsam wachsenden Mykobakterien sind für das Erlangen und Aufrechterhalten des Latenzzustandes sicherlich vorteilhaft. Das langsame Wachstum erfordert nur eine geringe Nährstoffzufuhr, sodass die Bakterien auch unter den Nährstoff-limitierten Bedingungen im Phagosom und bei geringer Porindichte in der Zellwand persistieren können. Auch die für Mykobakterien typische geringe Rate der Synthese von Makromolekülen [25] und die aufgrund des hohen GC-Gehalts der Promotoren geringe Genexpressionsrate [17] unterstützen ihr Überleben im Zustand der Latenz. Einer Studie von Segovia-Juarez et al. [44] zufolge werden *M.-tuberculosis*-Granulome über längere Zeiträume umso größer, je langsamer die Wachstumsrate der Bakterien ist. Die Autoren kommen zu dem Schluss: „This confirms the importance of the slow mycobacterial growth rate as part of its virulence.“

Fazit

Die grundsätzlich langsame Wachstumsrate von Mykobakterien ist multifaktoriell bedingt, wobei der Zellwandaufbau wahrscheinlich eine wesentliche Rolle spielt. Aufgrund ihres hohen Lipidanteils stellt die mykobakterielle Zellwand eine effektive Diffusionsbarriere dar, die die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen limitiert. Zusätzlich erfordert die Zellwandsynthese wegen des hohen Lipidanteils sehr viel Energie, und auch dadurch ist das Wachstum limitiert. Ein weiterer wesentlicher das Wachstum begrenzender Faktor ist die niedrige Nukleinsäure-Syntheseleistung: Die langsame Replikation beschränkt die Zahl der Chromosomen pro Zelle und verringert so Gendosiseffekte. Geringe Transkriptionsraten, gekoppelt mit niedrigen Ribosomenkonzentrationen (aufgrund der wenigen *rrn*-Ko-

pien) setzen zudem die Genexpressions- und Proteinsynthese-Raten herab. Auch die Unterschiede in den Wachstumsraten verschiedener *Mycobacterium*-Spezies haben multifaktorielle Ursachen, wobei aber bisher in diesem Zusammenhang nur die Ausstattung der Zellwand mit Porinen experimentell als für die Wachstumsrate mitverantwortliche Eigenschaft bewiesen wurde. Hingegen ist das Vorliegen eines oder zweier *rrn*-Operons im Genom, das lange Zeit für die unterschiedlichen Generationszeiten langsam und schnell wachsender Mykobakterien verantwortlich gemacht wurde, hier eher von geringer Bedeutung. Eine Hauptursache für das extrem langsame Wachstum von *M. leprae* liegt sicherlich im Verlust aktiver Gene durch die reduktive Evolution, in deren Verlauf durch die Integration repetitiver DNA-Elemente gefolgt von Rekombinationsereignissen komplette Stoffwechselwege verloren gegangen sind. Die Pathogenität der langsam wachsenden Mykobakterien ist besonders in ihrer Fähigkeit begründet, intrazellulär zu persistieren. Weiterhin ist ihre Fähigkeit zur Latenz von großer Bedeutung. Sowohl für die intrazelluläre Persistenz als auch für die Latenz sind die geringen Wachstumsraten, die eine nur geringe Nährstoffzufuhr und metabolische Aktivität erfordern, von Vorteil, sodass unseres Erachtens das langsame Wachstum als Virulenzfaktor gewertet werden kann.

Korrespondierender Autor

Dr. A. Lewin

P22, Robert Koch-Institut,
Postfach 650261, 13302 Berlin
E-Mail: Lewina@RKI.de

Literatur

1. Corbett EL, Watt CJ, Walker N et al. (2003) The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med* 163:1009–1021
2. Brown-Elliott BA, Wallace RJ (2002) Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 15:716–746
3. Wanyne LG, Kubica GP (1986) *The Mycobacteria*. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, USA, pp 1435–1457

4. Colston MJ, Cox RA (1999) Mycobacterial growth and dormancy. In: Ratledge C, Dale J (eds) *Mycobacteria – molecular biology and virulence*. Blackwell Science, Oxford, pp 198–219
5. Rastogi N, Legrand E, Sola C (2001) The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech* 20:21–54
6. Jarlier V, Nikaido H (1990) Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *J Bacteriol* 172:1418–1423
7. Liu J, Barry CE, Besra GS, Nikaido H (1996) Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J Biol Chem* 271:29545–29551
8. Niederweis M (2003) Mycobacterial porins-new channel proteins in unique outer membranes. *Mol Microbiol* 49:1167–1177
9. Niederweis M, Ehart S, Heinz C et al. (1999) Cloning of the *mmpA* gene encoding a porin from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 33:933–945
10. Stahl C, Kubetzko S, Kaps I et al. (2001) MspA provides the main hydrophilic pathway through the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 40:451–464
11. Stephan J, Mailaender C, Etienne G et al. (2004) Multidrug resistance of a porin deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 48:4163–4170
12. Mailaender C, Reiling N, Engelhardt H et al. (2004) The MspA porin promotes growth and increases antibiotic susceptibility of both *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 150:853–864
13. Sharbati-Tehrani S, Meister B, Appel B, Lewin A (2004) The porin MspA from *Mycobacterium smegmatis* improves growth of *Mycobacterium bovis* BCG. *Int J Med Microbiol* 294:235–245
14. Braibant M (2000) The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Rev* 24:449–467
15. Linton KJ, Higgins CF (1998) The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol* 28:5–13
16. Cole ST (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393:537–544
17. Bashyam MD, Kaushal D, Dasgupta SK, Tyagi AK (1996) A study of the mycobacterial transcriptional apparatus: identification of novel features in promoter elements. *J Bacteriol* 178:4847–4853
18. Hiriyanna KT, Ramakrishnan T (1986) Deoxyribonucleic acid replication time in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Arch Microbiol* 144:105–109
19. Harshey RM, Ramakrishnan T (1977) Rate of ribonucleic acid chain growth in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Bacteriol* 129:616–622
20. Cox RA (2003) Correlation of the rate of protein synthesis and the third power of the RNA: protein ratio in *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 149:729–737
21. Winder FG, Rooney SA (1970) Effects of nitrogenous components of the medium on the carbohydrate and nucleic acid content of *Mycobacterium tuberculosis* BCG. *J Gen Microbiol* 63:29–39
22. Bercovier H, Kafri O, Sela S (1986) Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. *Biochem Biophys Res Commun* 136:1136–1141
23. Kiss A, Sain B, Venetianer P (1977) The number of rRNA genes in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 79:77–79
24. Ogasawara N, Moriya S, Yoshikawa H (1983) Structure and organization of rRNA operons in the region of the replication origin of the *Bacillus subtilis* chromosome. *Nucleic Acids Res* 11:6301–6318
25. Cox RA (2004) Quantitative relationships for specific growth rates and macromolecular compositions of *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Escherichia coli* B/r: an integrative theoretical approach. *Microbiology* 150:1413–1426
26. Sander P, Prammananan T, Böttger EC (1996) Introducing mutations into a chromosomal rRNA gene using a genetically modified eubacterial host with a single rRNA operon. *Mol Microbiol* 22:841–848
27. Brosch R, Pym AS, Gordon SV, Cole ST (2001) The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends Microbiol* 9:452–458
28. Cole ST (2001) Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409:1007–1011
29. Helguera-Repetto C, Cox RA, Munoz-Sanchez JL, Merchand JA (2004) The pathogen *Mycobacterium marinum*, a faster growing close relative of *Mycobacterium tuberculosis*, has a single rRNA operon per genome. *FEMS Microbiol Lett* 235:281–288
30. Chemlal K, Huys G, Laval F et al. (2002) Characterization of an unusual *Mycobacterium*: a possible missing link between *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol* 40:2370–2380
31. Eiglmeier K, Parkhill J, Honore N et al. (2001) The decaying genome of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev* 72:387–398
32. Madan BM (2003) Did the loss of sigma factors initiate pseudogene accumulation in *M. leprae*? *Trends Microbiol* 11:59–61
33. Wheeler PR (2001) The microbial physiologist's guide to the leprosy genome. *Lepr Rev* 72:399–407
34. Tyagi AK (1976) Sources of energy production in *Mycobacterium tuberculosis* BCG. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 18:251–258
35. Seshadri R, Suryanarayana MP, Venkatasubramanian TA (1978) Role of malic enzyme in mycobacteria: Part I – Malic enzyme & its relationship to growth rate & intracellular level of NADPH. *Indian J Biochem Biophys* 15:277–281
36. North RJ, Izzo AA (1993) Mycobacterial virulence. Virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* have faster in vivo doubling times and are better equipped to resist growth-inhibiting functions of macrophages in the presence and absence of specific immunity. *J Exp Med* 177:1723–1733
37. Silver RF, Li Q, Ellner JJ (1998) Expression of virulence of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes: virulence correlates with intracellular growth and induction of tumor necrosis factor alpha but not with evasion of lymphocyte-dependent monocyte effector functions. *Infect Immun* 66:1190–1199
38. Dunn PL, North RJ (1995) Virulence ranking of some *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains according to their ability to multiply in the lungs, induce lung pathology, and cause mortality in mice. *Infect Immun* 63:3428–3437
39. North RJ, Ryan L, LaCourse R et al. (1999) Growth rate of mycobacteria in mice as an unreliable indicator of mycobacterial virulence. *Infect Immun* 67:5483–5485
40. Valway SE, Sanchez MP, Shinnick TF et al. (1998) An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med* 338:633–639
41. Bishai WR, Dannenberg AMJ, Parrish N et al. (1999) Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 and H37Rv in rabbits evaluated by Lurie's pulmonary tubercle count method. *Infect Immun* 67:4931–4934
42. Manca C, Tsenova L, Barry II CE et al. (1999) *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. *J Immunol* 162:6740–6746
43. Sharbati-Tehrani S, Stephan J, Holland G et al. (2005) Porins limit the intracellular persistence of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* 151:2403–2410
44. Segovia-Juarez JL, Ganguli S, Kirschner D (2004) Identifying control mechanisms of granuloma formation during *M. tuberculosis* infection using an agent-based model. *J Theor Biol* 231:357–376
45. Lichtinger T, Heym B, Maier E et al. (1999) Evidence for a small anion-selective channel in the cell wall of *Mycobacterium bovis* BCG besides a wide cation-selective pore. *FEBS Lett* 454:349–355
46. Senaratne RH, Mobasherri H, Papavinasandaram KG et al. (1998) Expression of a gene for a porin-like protein of the OmpA family from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Bacteriol* 180:3541–3547
47. Kartmann B, Stengler S, Niederweis M (1999) Porins in the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 181:6543–6546
48. Trias J, Jarlier V, Benz R (1992) Porins in the cell wall of mycobacteria. *Science* 258:1479–1481
49. Dorner U, Maier E, Benz R (2004) Identification of a cation-specific channel (TipA) in the cell wall of the gram-positive mycolata *Tsukamurella inchoensis*: the gene of the channel-forming protein is identical to *mmpA* of *Mycobacterium smegmatis* and *mppA* of *Mycobacterium phlei*. *Biochem Biophys Acta* 1667:47–55
50. Riess FG, Dorner U, Schiffler B, Benz R (2001) Study of the properties of a channel-forming protein of the cell wall of the gram-positive bacterium *Mycobacterium phlei*. *J Membr Biol* 182:147–157
51. Kempell KE, Ji YE, Estrada IC et al. (1992) The nucleotide sequence of the promoter, 16S rRNA and spacer region of the ribosomal RNA operon of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with *Mycobacterium leprae* precursor rRNA. *J Gen Microbiol* 138:1717–1727
52. Reischl U, Feldmann K, Naumann L et al. (1998) 16S rRNA sequence diversity in *Mycobacterium celatum* strains caused by presence of two different copies of 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 36:1761–1764
53. Sela S, Clark-Curtiss JE, Bercovier H (1989) Characterization and taxonomic implications of the rRNA genes of *Mycobacterium leprae*. *J Bacteriol* 171:70–73
54. Rivera-Gutierrez S, Montoro-Cardoso E, Valdivia JA et al. (2003) The number and organization of the rRNA genes of several strains of *Mycobacterium simiae*. *FEMS Microbiol Lett* 227:133–139
55. Ninet B, Monod M, Emler S et al. (1996) Two different 16S rRNA genes in a mycobacterial strain. *J Clin Microbiol* 34:2531–2536
56. Gonzalez-y-Merchand JA, Garcia MJ, Gonzalez-Rico S et al. (1997) Strategies used by pathogenic and nonpathogenic mycobacteria to synthesize rRNA. *J Bacteriol* 179:6949–6958
57. Merchand JA, Colston MJ, Cox RA (1996) The rRNA operons of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of promoter elements and of neighbouring upstream genes. *Microbiology* 142:667–674
58. Domenech P, Menendez MC, Garcia MJ (1994) Restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes in the differentiation of fast-growing mycobacterial species. *FEMS Microbiol Lett* 116:19–24

59. Menendez MC, Garcia MJ, Navarro MC et al. (2002) Characterization of an rRNA operon (*rrnB*) of *Mycobacterium fortuitum* and other mycobacterial species: implications for the classification of mycobacteria. *J Bacteriol* 184:1078–1088
60. Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC et al. (2003) The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7877–7882
61. Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA et al. (2002) Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol* 184:5479–5490

**N. Litz, W. Wilcke u. B.-M. Wilke (Hrsg.)
Bodengefährdende Stoffe,
Bewertung – Stoffdaten –
Ökotoxikologie – Sanierung**

Ergänzbare Loseblattwerk im Ordner mit CD-Rom. Grundwerk 720 S., 128 €. ecomed-Biowissenschaften, ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg 2004. ISBN 3-609-52000-0

Besonders als Entscheidungshilfe für die Beurteilung von Boden- und Grundwasserschäden durch Stoffeintrag wird ein Katalog von Stoffen geboten, die die Boden- und ggf. auch die Grundwasserqualität beeinträchtigen. Daher stehen Stoffdatenblätter, die Stoffeigenschaften, Anreicherung, Vorkommen und Verhalten im Boden, Nachweisverfahren und Bewertungen der toxischen Wirkungen auf Mensch, Bodenfauna und -flora zusammenfassen, im Mittelpunkt.

Im Abschnitt „II. Grundlagen“ werden Eintragswege (atmosphärische Einträge, nutzungsbedingte Direkteinträge [Klärschlamm], Altlasten und Stadtböden), Prozesse im Boden, Wirkungen und Toxikologie bearbeitet. Die Abschnitte „III. Untersuchung und Bewertung“ sowie „IV. Dekontamination und Reinigung“ werden in späteren Ergänzungen geliefert. Der Abschnitt „V. Bodenschutz im Recht“ behandelt nach vielfältigsten Verweisen (Immissionschutzr., Gewässerschutzr., Düngemittelnr., Pflanzenschutzr., Gentechnikr., Gefahrstoffr., Produktvorschriften, Abfallr., Planungsvorschriften, Flurbereinigung, Naturschutz-, Forst- und Bergrecht) Regelungen des Bundesbodenschutzgesetzes.

Die Stoffdatensammlung ist dann im „Abschnitt VI.“ zusammengefasst (Übersichten und Tabellen zu gefährlichen oder prioritären Stoffen). Im vorliegenden Grundwerk werden Stoffdatenblätter zu folgenden Stoffen geliefert: Atrazin, Benzol, Blei, Cadmium, Endosulfan, Isoproturon, Kupfer, LAS (lineares Alkylbenzolsulfonat), LCKW, Monolinuron, Nickel, Nonylphenol (-Ethoxylate), PAK, PCB, Quecksilber, Styrene, Tetracycline, TNT, Toluol, Xylen und Zink. Es werden Angaben zur Stoffherkunft, zu Hintergrund- und Belastungsgehalten, sowie Hinweise zur Analytik, zum Stoffverhalten im Boden, zu seiner Bewertung und zu ggf. vorhandenen administrativen Vorgaben geboten.

Die dem Werk beiliegende CD-Rom enthält den vollständigen Inhalt des Werkes und zusätzlich ausgewählte Gesetze und Vorschriften im Wortlaut.

Für die wichtige, aber auch sehr anspruchsvolle Aufgabe, einen möglichst effektiven Boden- und Grundwasserschutz zu praktizieren und bei gefährlichen Belastungen sinnvolle Sanierungen zu planen und durchzuführen stellt dieses neue Werk eine gute Hilfe dar.

Gerald Milde, Berlin