

Aus der Molekularen Mykobakteriologie

Forschungszentrum Borstel

Leibniz – Zentrum für Medizin und Biowissenschaften

Programmbereich Infektionen

Leiter der Forschergruppe: Prof. Dr. Stefan Niemann

---

Globale Populationsstruktur und Evolution von  
*Mycobacterium tuberculosis* Komplex-Stämmen des Beijing-Genotyps

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

Matthias Merker

aus Henstedt-Ulzburg

Lübeck 2014

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. Stefan Niemann

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. Ulrich Schaible

Tag der mündlichen Prüfung: 31.03.2014

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 04.12.2014

# INHALTSVERZEICHNIS

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Geschichte der Tuberkulose .....	3
2.2	Aktuelle Epidemiologie der Tuberkulose.....	6
2.3	Tuberkulose-Infektion.....	8
2.4	Tuberkulose-Erreger .....	10
2.5	Methoden zur Genotypisierung von MTBK-Stämmen .....	11
2.5.1.	IS6110 Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus- (RFLP-) Analyse .....	12
2.5.2	Spacer Oligonucleotide- (Spoligo-) Typisierung .....	12
2.5.3	Mycobacterial interspersed repetitive units – variable number tandem repeats- (MIRU-VNTR-) Analyse.....	13
2.6	Methoden für die Visualisierung und Analyse von Genotypisierungsdaten.....	14
2.6.1	Minimum-Spanning-Tree- (MST-) Algorithmus.....	14
2.6.2	Maximum-Likelihood- (ML-) Algorithmus.....	15
2.7	Populationsstruktur, genetische und funktionelle Diversität des MTBK .....	15
2.8	Relative Fitness und Virulenz von resistenten MTBK-Isolaten .....	17
2.9	Assoziation zwischen Resistenz, Virulenz und dem Beijing-Genotyp.....	19
2.10	Zielsetzung der Arbeit .....	23
3	Material und Methoden .....	24
3.1	Material .....	24
3.1.1	Übersicht aller untersuchten klinischen Beijing-Isolate.....	24
3.1.2	Übersicht der analysierten Genomsequenzen .....	24
3.1.3	Übersicht verwendeter Primer.....	24
3.1.4	Material für PCR, Sequenzierung nach Sanger und MIRU-VNTR-Typisierung .....	24
3.1.5	Material für die Genomsequenzierung .....	25
3.1.6	Material für die Kultivierung von MTBK-Isolaten.....	26
3.1.7	Geräte .....	27
3.1.8	Software.....	27

3.1.9 Herstellung gebrauchsfertiger Puffer und Lösungen .....	28
3.2 Methoden .....	29
3.2.1 PCR-Protokoll .....	29
3.2.2 Mycobacterial interspersed repetitive units – variable number tandem repeats- (MIRU-VNTR-) Analyse und Identifikation klonaler Komplexe .....	29
3.2.3 Kapillarsequenzierung nach Sanger .....	30
3.2.4 Next Generation Sequencing (NGS) .....	31
3.2.4.1 Erstellung einer DNA-Bibliothek (library) mit dem Nextera(XT)-Kit .....	31
3.2.4.2 Qualitätskontrolle und Aufbereitung der Daten .....	32
3.2.4.3 Datenverarbeitung .....	33
3.2.5 Phylogenetische Rekonstruktion - Maximum-Likelihood (ML).....	35
3.2.7 Boxplot zur Visualisierung der genetischen Distanzen einzelner Beijing-Subgruppen.....	35
3.2.8 Bayesian-Skyline-Plot .....	36
3.2.9 dN/dS-Analyse .....	36
3.2.10 Identifikation von konvergenten Mutationen und Homoplasie.....	37
3.2.11 Visualisierung der globalen Verteilung von Beijing-Stämmen.....	38
3.2.12 Studienauswahl zur Analyse einer möglichen Assoziation zwischen Resistenz und identifizierten klonalen Komplexen des Beijing-Genotyps .....	38
3.2.13 Anzucht klinischer MTBK-Isolate.....	39
3.2.13.1 Kultivierung von MTBK-Stämmen in Flüssigmedium (7H9).....	39
3.2.13.2 Bestimmung der Lebendkeimzahl von MTBK-Stämmen .....	40
3.2.13.3 Sterilitätskontrollen von MTBK-Flüssigkulturen .....	40
3.2.13.4 Ziehl-Neelsen-Färbung von MTBK-Präparaten.....	41
3.2.13.4 Bestimmung der optischen Dichte (OD <sub>594</sub> ) von MTBK-Flüssigkulturen.....	41
3.2.14 Statistik.....	42
4 Ergebnisse .....	43
4.1 Globale Populationsstruktur von <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Komplex- (MTBK-) Isolaten des Beijing-Genotyps.....	43
4.1.1 Klonale Komplexe des MTBK-Beijing-Genotyps .....	43
4.1.2 Globale Verteilung der klonalen Beijing-Komplexe .....	48
4.1.3 Assoziation von MDR-TB mit klonalen Komplexen des Beijing-Genotyps .....	50

4.1.3 Genombasierte Populationsstruktur und Phylogenie .....	52
4.1.4 Wachstumskurven von MTBK-Beijing-Stämmen .....	57
4.1.5 Hinweise auf positiv selektierte Gene in modernen Beijing-Stämmen.....	58
4.2 Evolution von multiresistenten Beijing-W148-Stämmen (1995-2012) .....	64
4.3 Mikroevolution multiresistenter Beijing-Stämme im Patienten .....	71
4.3.1 Die Mikroevolution in Patient A und B ist beschränkt auf den Erwerb von Resistenz- vermittelnden Mutationen .....	71
4.3.2 Die NGS-Analyse offenbarte eine Reinfektion mit einem XDR-Stamm bei Patient C.....	77
5 Diskussion.....	79
5.1 Globale Diversität von MTBK-Beijing-Stämmen.....	80
5.2 Ursprung und globale Verbreitung von MTBK-Beijing-Stämmen .....	81
5.3 Hinweise auf positive Selektion in modernen Beijing-Stämmen .....	84
5.4 Evolution und Resistenzentwicklung von multiresistenten Outbreak-Stämmen .....	87
5.5 Mikroevolution multiresistenter Beijing-Stämme im Patienten unter MDR-TB-Therapie.....	89
5.6 Neue potentielle Resistenz-vermittelnde Mutationen.....	91
5.7 NGS-Analyse offenbart eine unentdeckte Reinfektion mit einem XDR-Stamm.....	92
5.8 Modell zur Evolution eines hypervirulenten MDR-TB-Klons.....	92
5.9 Ausblick .....	95
Literaturverzeichnis.....	96
Abbildungsverzeichnis.....	108
Tabellenverzeichnis.....	109
Abkürzungsverzeichnis .....	110
Anhang .....	111
Danksagung.....	160
Lebenslauf .....	161
Publikationen.....	162
Erklärung.....	164

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Trotz weltweiter Bemühungen die Ausbreitung der Tuberkulose (TB) einzudämmen, verursachen TB-Bakterien aus dem *Mycobacterium tuberculosis* Komplex (MTBK) jährlich 1,3 Millionen Todesfälle und zählen damit zu den bedeutsamsten Infektionserregern. Eine große Bedrohung für die erfolgreiche TB-Kontrolle ist die Entstehung und Übertragung von multiresistenten (MDR-) TB-Stämmen, die Resistenzen gegen die beiden effektivsten TB-Antibiotika Isoniazid und Rifampicin aufweisen. Eine MDR-TB-Infektion führt zu erheblich längeren Therapiezeiten, bis zu 200-fach höheren Behandlungskosten und einer geringen Heilungsquote. Gleichzeitig besteht das Risiko, dass sich weitere Resistenzen und eine extrem resistente Form der TB entwickelt, welche fast nicht mehr effektiv zu therapieren ist. Interessanterweise ist der Anteil von MDR-Stämmen innerhalb verschiedener phylogenetischer MTBK-Gruppen (Genotypen) unterschiedlich. So wurde in vielen Studienregionen speziell ein Zusammenhang zwischen TB-Stämmen des MTBK-Beijing-Genotyps und der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen beobachtet. Dies warf die Frage auf, ob Beijing-Stämme schneller Resistenzen erwerben oder resistente Beijing-Stämme vermehrt übertragen werden können, was zu einer beschleunigten globalen Ausweitung der MDR-TB-Epidemie mit dramatischen Konsequenzen für die Therapie von TB-Patienten und die öffentliche Gesundheitsfürsorge führen könnte. Allerdings ist die Assoziation von Resistenz und Beijing-Genotyp regional unterschiedlich und veröffentlichte Ergebnisse zu Virulenz, Immunogenität und Pathogenität von Beijing-Stämmen sind teilweise diskrepant. Dies könnte jedoch in der bisher nur unzureichend beschriebenen genetischen Variabilität von Beijing-Stämmen begründet sein.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit basierend auf MIRU-VNTR-Genotypisierungsdaten (24 Loci) von 4.987 klinischen Beijing-Isolaten aus 99 Ländern erstmals die globale Populationsstruktur des Beijing-Genotyps analysiert. Insgesamt konnten sieben klonale Komplexe identifiziert werden, welche geografisch unterschiedlich verteilt waren und signifikante Unterschiede in den MDR-TB-Proportionen aufwiesen. Zwei klonale Komplexe zeigten besonders hohe MIRU-VNTR-Clusterraten von MDR-Stämmen, was auf die verstärkte Übertragung spezifischer MDR-*Outbreak*-Stämme hindeutet.

Basierend auf der MIRU-VNTR-Klassifizierung wurde eine NGS- (*next generation sequencing*-) Genomanalyse einer repräsentativen Kollektionen von 110 klinischen Beijing-Isolaten durchgeführt. In dem genombasierten phylogenetischen Baum konnten insgesamt drei ancestrale und fünf moderne Subgruppen differenziert werden. Die Analyse der Populationsdynamik und genetischen Diversität auf Basis von Sequenzdaten deutete auf eine erhöhte Verbreitung von Stämmen moderner Beijing-Subgruppen seit Beginn des 19. Jahrhunderts hin und zeigte die massive Expansion von zwei resistenten Beijing-Varianten (*Zentralasien-Outbreak* und *W148-Outbreak*) seit ca. 20 - 30 Jahren in Osteuropa.

Die genom-basierte Untersuchung von 122 MDR-Stämmen des W148-*Outbreaks* zeigte, dass die Expansion von multiresistenten Beijing-Stämmen wahrscheinlich durch die Kombination von Resistenz-vermittelnden Mutationen mit geringem Einfluss auf die Fitness (Wachstumsrate) der TB-Bakterien und dem Erwerb von Varianten mit kompensatorischen Effekten begünstigt wird. Weitere Resistenz-vermittelnde Mutationen werden zunächst nur von einzelnen Isolate erworben, es konnte aber auch die Übertragung eines mehrfach resistenten MDR-TB-Klons mit identischen Resistenz-vermittelnden Mutationen gegen sieben unterschiedliche TB-Antibiotika nachgewiesen werden.

Die Analyse der Mikroevolution und weiteren Resistenzentwicklung im Patienten zeigte keine Anzeichen einer erhöhten Mutationsrate von Beijing-Stämmen. Diese erwarben unabhängig voneinander und schrittweise zusätzliche Resistenzmutationen, die mit neuen phänotypischen Antibiotikaresistenzen korrelierten. Der spezifische Erwerb von Resistenzmutationen ohne Hinweise auf eine Kosegregation zusätzlicher Allelvarianten macht das Vorliegen eines transienten Mutator-Phänotyp bei Beijing-Stämmen im Therapieverlauf unwahrscheinlich. Die Evolution der Stämme im Patienten ist jedoch hochkomplex. So konnte die parallele Anwesenheit von unterschiedlichen Subpopulationen über lange Therapiezeiträume (bis zu 32 Monate) nachgewiesen werden. Die Konkurrenz der unterschiedlichen Subpopulationen im Patienten führte zu einer Selektion von Klonen, welche die meisten Antibiotikaresistenzen und wahrscheinlich die geringsten Fitnessdefizite aufwiesen. Darüber hinaus konnte erstmals durch eine NGS-Analyse eine Reinfektion mit einem XDR-Stamm aufgedeckt werden, was die Bedeutung hochauflösender NGS-Methoden für eine individualisierte Therapieüberwachung hervorhebt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zum ersten Mal die globale Populationstruktur von Beijing-Stämmen und erlauben die valide Klassifizierung von acht Subgruppen, die durch spezifische Polymorphismen charakterisiert sind. Diese Klassifizierung ermöglicht in Zukunft die Korrelation von einem definierten genetischen Hintergrund mit spezifischen pathobiologischen Eigenschaften der Stämme aus unterschiedlichen Beijing-Subgruppen, von denen zwei mit MDR-TB-*Outbreaks* assoziiert sind. Die Analyse der Genomevolution von Stämmen eines longitudinalen MDR-TB-*Outbreaks* und von MDR-Stämmen mit zusätzlicher Antibiotikaresistenzentwicklung im Patienten unter MDR-TB-Therapie hat neue potentielle Resistenz-vermittelnde und kompensatorische Mechanismen aufgezeigt, die zur Ausbreitung von MDR-Stämmen beitragen könnten. Diese genetischen Varianten müssen in zukünftigen Arbeiten, z. B. in epidemiologischen Studien oder experimentellen Arbeiten, weiter validiert werden.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 GESCHICHTE DER TUBERKULOSE

„*There is a strange pain at my chest, a haunting cough. It will not let me go*“ – Paris, November 1838 von Frederic Chopin („Ich fühle einen eigenartigen Schmerz in meiner Brust, einen quälenden Husten, der mich nicht los lässt“) (frei übersetzt aus [1]).

Die Tuberkulose (TB) ist eine durch die Luft übertragbare, bakterielle Infektionskrankheit. Im Volksmund auch „Schwindsucht“ oder „weiße Pest“ genannt, verursachte die TB im 19. Jahrhundert und zu Beginn des 20. Jahrhunderts mehr Todesfälle in industrialisierten Ländern als jede andere Erkrankung [2]. Bis zu 90% der urbanen Bevölkerung in Europa und Nordamerika waren zu dieser Zeit mit Tuberkulosebakterien infiziert und 80% der Infizierten starben an TB [2]. Die ältesten Spuren einer TB-ähnlichen Erkrankung wurden an einem 500.000 Jahre alten Schädelknochen des Frühmenschen *Homo erectus* gefunden und deuten auf eine Jahrtausende währende Koevolution von Mensch und TB-Bakterien hin [3]. Der derzeit älteste gesicherte DNA-Nachweis des TB-Erregers stammt von ca. 9.000 Jahre alten Skeletten [4].

Bereits Aristoteles vermutete, dass die Krankheit übertragbar sei [5], aber erst in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts konnte dies im Tierversuch belegt werden [6]. 1882 konnte Robert Koch erstmals den von ihm benannten „Tuberkel-Bacillus“, der Hauptverursacher der Lungentuberkulose im Menschen (*Mycobacterium tuberculosis*), mikroskopisch nachweisen [7]. Franz Ziehl und Friedrich Neelsen entwickelten in den darauf folgenden Jahren eine Färbemethode, die noch heute zum Nachweis der säurefesten Stäbchen (darunter TB-Bakterien) in der TB-Diagnostik angewendet wird [8]. Das von Robert Koch entwickelte Tuberkulin, ein Überstand filtrierter TB-Bakterien, war als Medikament zwar wirkungslos, wurde aber von Charles Mantoux zum Tuberkulin Haut-Test weiterentwickelt [9] und erweiterte die Diagnosemöglichkeiten zusammen mit der neu entwickelten Röntgenuntersuchung von Conrad Röntgen 1895.

TB-Patienten wurden gegen Ende des 19. Jahrhunderts zunehmend in TB-Sanatorien behandelt. Diese Heilstätten befanden sich oft isoliert in ländlichen Regionen. Frische Luft, Bewegung, Entspannung und eine spezielle reichhaltige Ernährung (z. B. mit Milch und Kognak) sollten die Tuberkulose auf natürlichem Wege heilen [10], [11].

Bemühungen einer TB-Infektion durch eine Impfung vorzubeugen, resultierten in dem von Albert Calmette und Camille Guérin entwickeltem BCG-Impfstoff (Bacillus Calmette-Guérin), welcher nach dem zweiten Weltkrieg zum Einsatz kam. Dieser wurde aus einem avirulenten

*Mycobacterium bovis* Stamm (Hauptverursacher der Rindertuberkulose) hergestellt und über Jahrzehnte Neugeborenen verabreicht [11]. Ein tatsächlicher Schutz vor der Lungentuberkulose im Erwachsenenalter ist jedoch höchst umstritten [12]. Heutzutage wird die Impfung daher meist nur noch in TB-Hochinzidenzländern zur Vorbeugung einer TB-Meningitis bei Kindern eingesetzt [12].

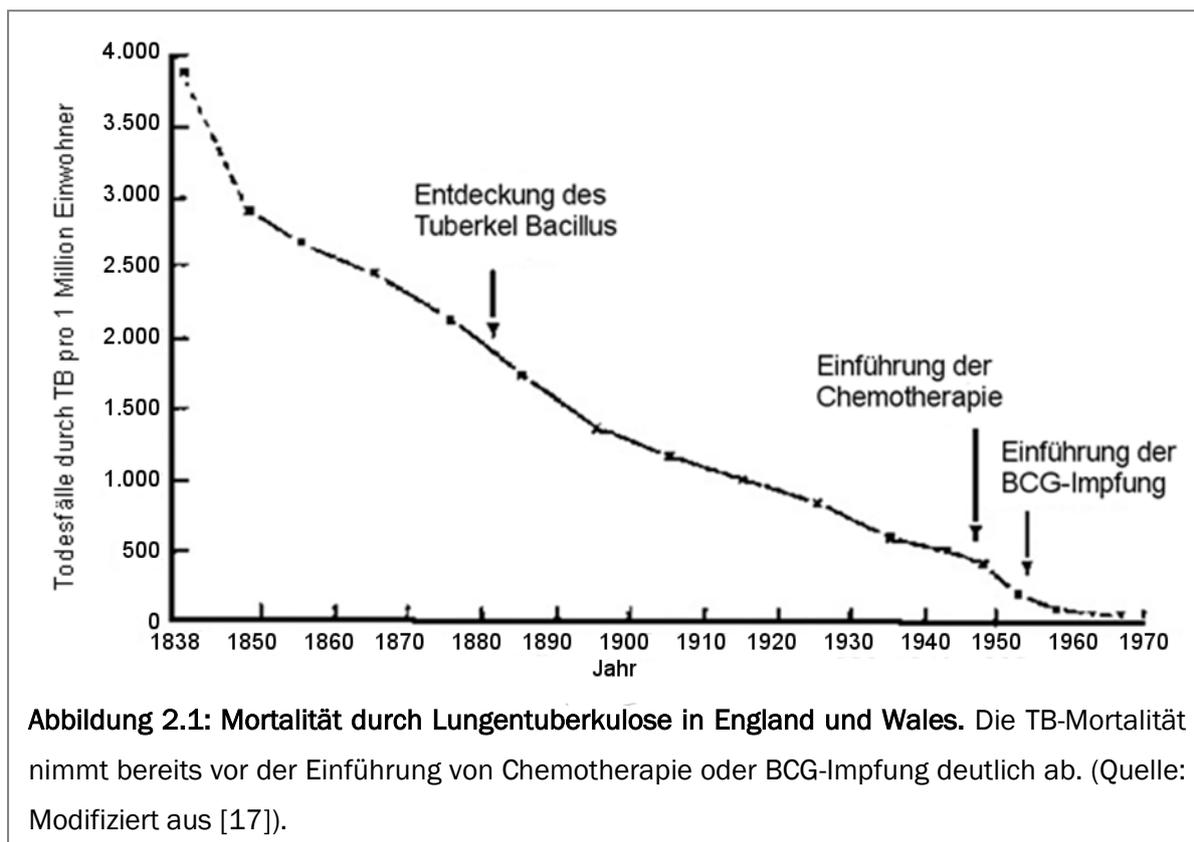
Erst mit Einführung der ersten Antituberkulotika (TB-Antibiotika) im Jahr 1944 (vergleiche Tabelle 2.1) konnte eine TB-Erkrankung verlässlich geheilt werden [10].

**Tabelle 2.1: Antituberkulotika (Quelle: modifiziert nach [13]).**

Antituberkulotika	Abkürzung	Entdeckungsjahr	
Streptomycin	SM	1944	
Isoniazid	INH	1952	Erstrang- antituberkulotika
Rifampicin	RMP	1966	
Ethambutol	EMB	1961	
Pyrazinamid	PZA	1952	
Para-Aminosalicylsäure	PAS	1946	
Cycloserin	CS	1950er	
Ethionamid *	ETH	1956	Zweitrang- antituberkulotika
Prothionamid *	PTH	1956	
Amikacin *	AMI	1957	
Kanamycin *	KAN	1957	
Capreomycin *	CAP	1960	
Ofloxacin *	OFX	1963	
Moxifloxacin *	MXF	1963	
Ciprofloxacin *	CFX	1963	

\* Gegen Antituberkulotika aus den Wirkstoffgruppen der Thioamide (ETH, PTH), Aminoglykoside (AMI, KAN, CAP) und Fluoroquinolone FQ (OFX, MXF, CFX) treten oft kombinierte Resistenzen gegen alle Wirkstoffe innerhalb einer Gruppe auf [14].

Bereits vor der Einführung der ersten Antituberkulotika beobachtete man einen Rückgang der TB-Fälle und der durch TB verursachten Todesfälle in Europa und den USA [2] (vergleiche Abbildung 2.1). Nach einer These von Thomas McKeown aus den 1960er Jahren sind hauptsächlich die verbesserten Lebensumstände (Hygiene, Wohnraum, Ernährung) ausschlaggebend für die Eindämmung von durch die Luft übertragbaren Krankheitserregern, wie z. B. Tuberkulosebakterien [16]. Erst in den 1980er Jahren nahm die Bedeutung von gesundheitspolitischen Maßnahmen, einer verbesserten Diagnostik und der Behandlung mittels Chemotherapie zur aktiven Bekämpfung der Tuberkulose zu [15].



Sinkende TB-Fallzahlen und eine Verringerung der mit TB assoziierten Todesfällen in den meisten Industrieländern folgten erhebliche Kürzungen von Forschungsgeldern und Mitteln für Anti-TB Programme [10]. Auch die Pharmaindustrie investierte zunehmend weniger des Forschungsbudgets in die Entwicklung neuer Antituberkulotika. So waren unter 1.556 neu vermarkteten Wirkstoffen zwischen 1975 und 2004 nur drei TB-Antibiotika [16], [17].

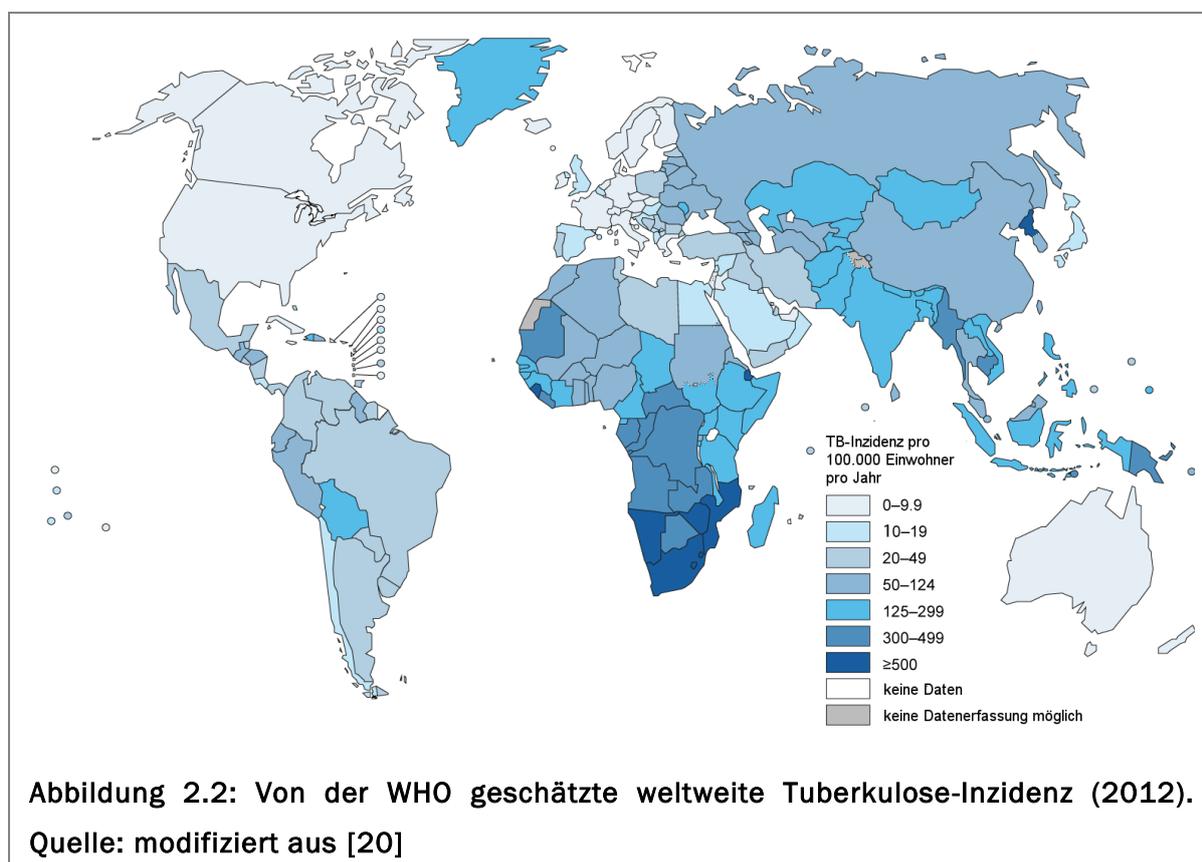
Mitte der 1980er Jahre zeigte sich jedoch ein gegenläufiger Trend und weltweit wurde ein erheblicher Anstieg von TB-Fällen registriert [18]. 1990 verzeichneten z. B. die USA einen Anstieg von TB-Patienten von fast 10% im Vergleich zum Vorjahr [10]. Diese Entwicklung war so dramatisch, dass die Weltgesundheitsorganisation (WHO) 1993 den globalen TB-Notstand ausrief [19]. Experten rechneten damit, dass sich die Zahl der Tuberkuloseerkrankungen bis 2050 weiter erhöhen würde [20]. Als Gründe wurden der Anstieg der Weltbevölkerung, Armut, Migration, Reduktion von TB-Kontrollprogrammen, die Koinfektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) und die Ausbreitung von resistenten TB-Stämmen angegeben [19], [20].

## 2.2 AKTUELLE EPIDEMIOLOGIE DER TUBERKULOSE

Im Jahr 2012 führte die Infektion mit Tuberkulosebakterien zu geschätzten 8,6 Millionen Erkrankten weltweit und 1,3 Millionen Todesfällen. Damit ist die TB-Erkrankung weltweit die zweit häufigste Todesursache (neben einer Infektion mit dem HI-Virus), verursacht durch einen einzelnen Infektionserreger [21]. Die WHO schätzt zudem, dass ein Drittel der Weltbevölkerung latent mit dem TB-Erreger infiziert ist [21]. Die Betroffenen zeigen keine Symptome, sind nicht infektiös [22], haben aber ein lebenslanges Risiko an TB zu erkranken (siehe Abschnitt 2.3) [23].

Über 95% aller TB-Erkrankungen und TB-assoziierten Todesfälle werden heutzutage in Entwicklungsländern registriert [21], ca. 60% aller TB-Patienten weltweit kommen aus Asien. Die höchste Rate von TB-Neuerkrankungen (Inzidenz), mit geschätzten 255 neue TB-Fällen pro 100.000 Einwohner im Jahr 2012, herrscht jedoch in afrikanischen Ländern südlich der Sahara (Abbildung 2.2, [21]). Darunter befinden sich verschiedene Hotspot-Regionen mit sehr hohen Inzidenzen, wie z. B. Swasiland, mit ca. 1.349 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr 2012 [24]. Im Vergleich dazu traten in Niedriginzidenzländern, wie z. B. Deutschland, im Jahr 2012 ca. 5,6 neue TB-Fälle pro 100.000 Einwohner auf [24].

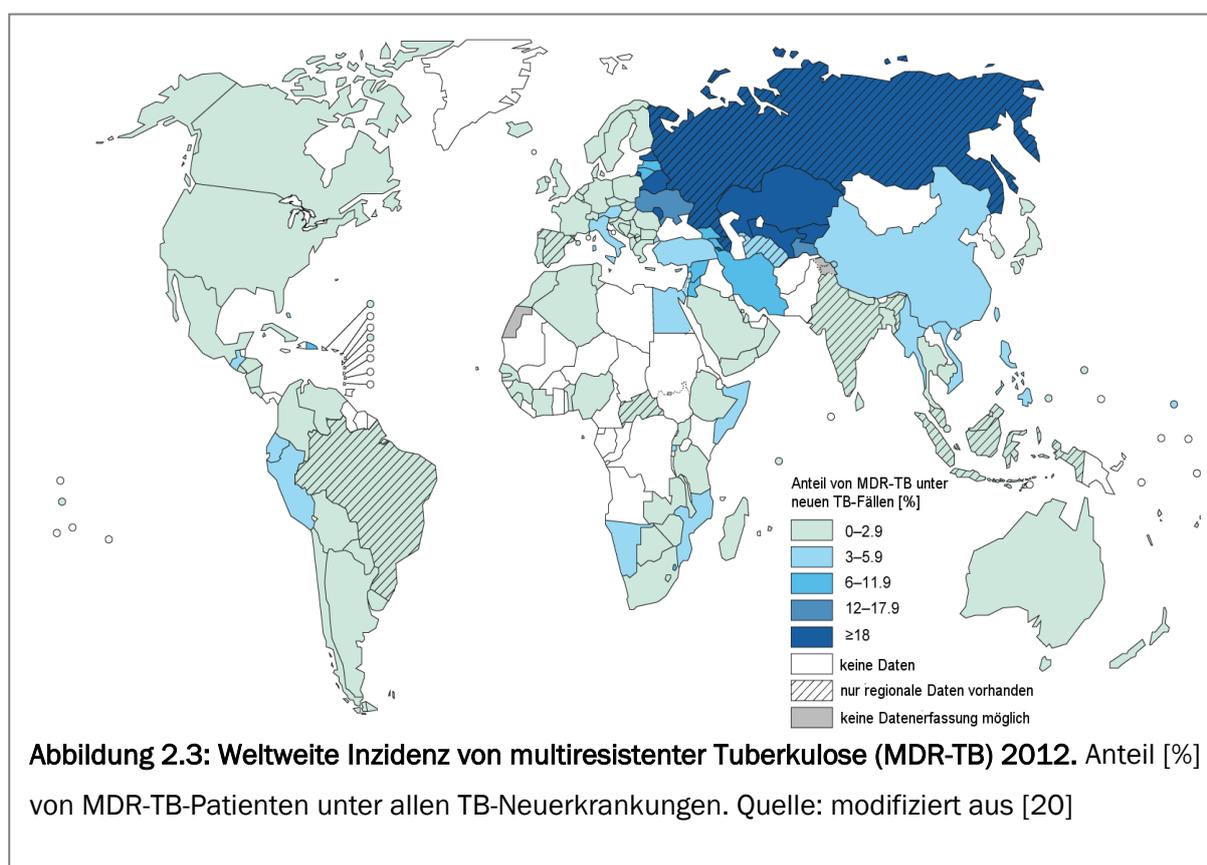
Ein wichtiger Faktor für die aktuelle TB-Epidemiologie ist die Koinfektion mit dem HI-Virus. Eine HIV-Infektion führt durch die Beeinträchtigung des Immunsystems zu deutlich erhöhten Erkrankungsraten bei *M. tuberculosis*-Infizierten (siehe Abschnitt 2.3) und ist eine der



Haupttodesursachen von TB-Patienten speziell im südlichen Afrika [25]. Im Jahr 2012 starben nach WHO-Angaben etwa 320.000 Patienten an einer mit HIV-assoziierten TB. Des Weiteren schätzt die WHO, dass 2012 ca. 1,1 Millionen HIV-Patienten zusätzlich an einer TB erkrankten, davon 75% in Afrika [21].

Ein weiterer wichtiger Faktor für die aktuelle und zukünftige TB-Epidemiologie ist die Ausbreitung von resistenten, bzw. multiresistenten TB-Stämmen. Grundsätzlich unterscheidet man bei resistenten TB-Fällen zwischen der primären Resistenz (Infektion mit bereits resistenten TB-Bakterien) und der sekundären Resistenz (Resistenzerwerb der TB-Bakterien im Therapieverlauf) [22]. Die multiresistente TB (*multidrug-resistant* TB, MDR-TB) ist definitionsgemäß eine TB-Erkrankung, verursacht durch eine Infektion mit TB-Bakterien, die Resistenzen gegen die beiden effektivsten Antituberkulotika Isoniazid (INH) und Rifampicin (RMP) aufweisen. MDR-TB-Patienten sind deutlich schwieriger zu behandeln. Die Therapie wird mit sogenannten Zweitrangmedikamenten durchgeführt und verursacht erheblich höhere Kosten für die eingesetzten Antibiotika (50 bis 200-fach höher als eine Standardtherapie mit ca. 20 US\$ pro Patient [26]), dauert deutlich länger (24 anstatt sechs Monate) und hat geringere Heilungsquoten (ca. 50 - 70% anstatt 95%) [22].

Die WHO schätzt, dass im Jahr 2012 etwa 450.000 TB-Patienten mit einem multiresistenten Stamm infiziert waren. Die Mehrheit dieser Patienten kommt aus Indien, China und Russland [21]. In Weißrussland werden beispielsweise ca. 35% aller TB-Neuerkrankungen durch einen



MDR-Stamm verursacht [24]. Diese hohe MDR-TB-Rate bei TB-Neuerkrankungen (MDR-TB-Inzidenz) gilt als Indikator für die Übertragung von multiresistenten Stämmen (primäre Resistenz) und ist, wie in Abbildung 2.3 zu sehen, in Osteuropa, Zentralasien und Russland am höchsten. Bei vorbehandelten TB-Patienten liegt die MDR-Rate in Weißrussland sogar bei ca. 69% [24].

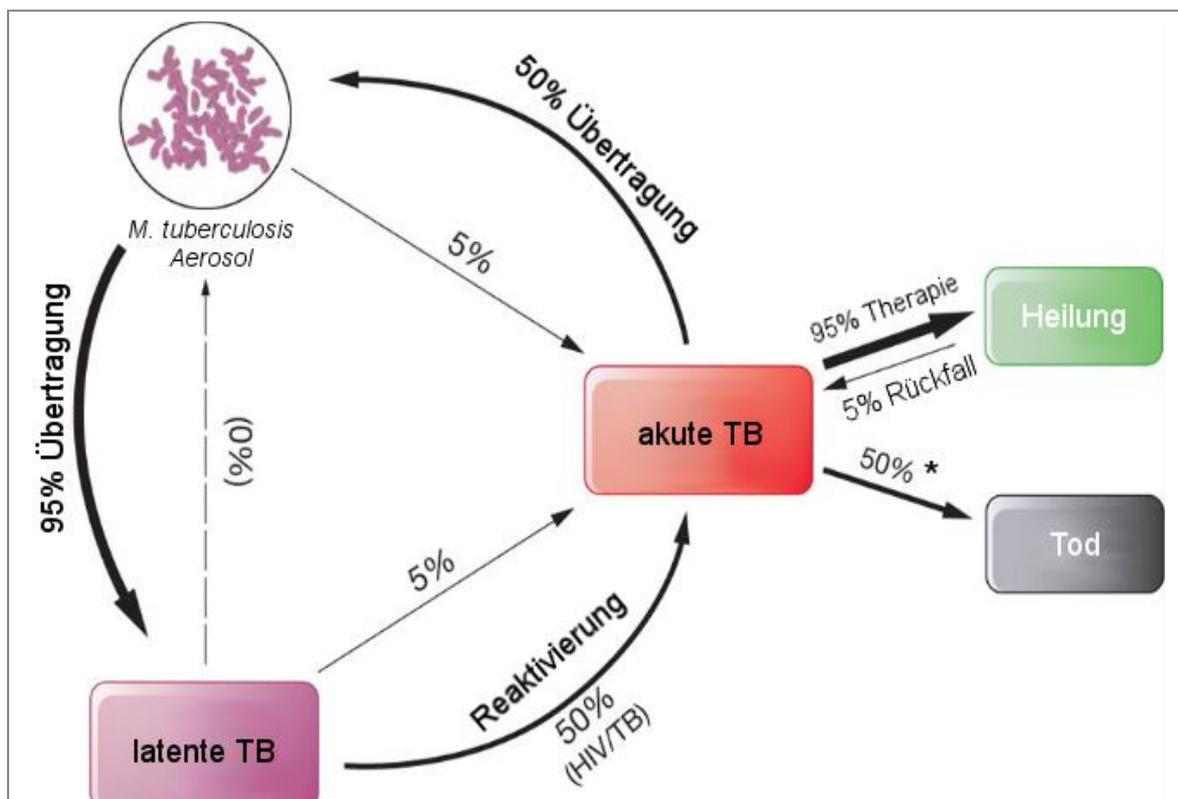
Knapp 10% der MDR-TB-Patienten sind wahrscheinlich mit sogenannten extrem resistenten (*extensively drug-resistant*, XDR) TB-Bakterien infiziert. Diese weisen zusätzliche Resistenzen gegen ein Fluoroquinolon (vergleiche Tabelle 2.1) und gegen mindestens eines der injizierbaren Aminoglykoside (AMI, KAN, CAP) auf. Für XDR-Patienten sind nur noch geringe Therapiemöglichkeiten vorhanden, ein Therapieversagen und die Entwicklung weiterer Resistenzen sind wahrscheinlich [22].

## 2.3 TUBERKULOSE-INFektion

Tuberkulosebakterien können durch kleine Tröpfchen (2 - 5 µm im Durchmesser) von einem Index-Fall (Patient mit offener TB) über die Luft auf andere Menschen (Kontaktpersonen) übertragen werden. Ein bis drei Bakterien können ausreichen, um einen neuen Wirt zu infizieren [22]. Allerdings entwickeln ca. 95% der infizierten, immunkompetenten Menschen innerhalb der ersten zwei Jahre keine TB-Erkrankung und zeigen keine pathologischen Symptome (latente TB-Infektion). Das Immunsystem ist in der Lage, die TB-Bakterien an der Ausbreitung in der Lunge oder in andere Organe durch die Abkapselung der TB-Bakterien in einem sogenannten Granulom zu hindern [8], oder kann die TB-Erreger sogar vollständig abtöten [27]. Bei ca. 5 - 10% der latent mit TB infizierten Personen entwickelt sich im Laufe ihres Lebens eine akute, offene TB [22] (vergleiche Abbildung 2.4). HIV-infizierte Patienten haben im Vergleich zu immunkompetenten Personen, ein etwa 30-fach erhöhtes Risiko nach einer Infektion mit TB-Bakterien eine akute TB zu entwickeln [21]. Wie oben schon ausgeführt, stellt die Koinfektion mit HIV einen wichtigen Faktor für die Ausbreitung der TB-Epidemie, besonders im südlichen Afrika, dar [21].

Unbehandelt sind TB-Patienten, in Abhängigkeit von der Ausprägung des Befundes, hoch infektiös und nur ca. 50% der Patienten können die Erkrankung ohne Therapie erfolgreich bekämpfen [22]. Auch im Falle einer MDR-TB-Erkrankung werden trotz adäquater Antibiotikatherapie vergleichsweise geringe Heilungsraten erzielt. Nur etwa 50-70% der MDR-TB-Patienten, je nach Region, werden erfolgreich therapiert [28], [22] (vergleiche Abbildung 2.4).

Als pathologischer Befund können nach einer Infektion mit TB-Bakterien die charakteristischen Tuberkel auftreten. Diese knotenförmigen Gebilde (Granulome) sind kompakte Aggregate aus ausgereiften, teilweise infizierten Makrophagen, welche sich im Bereich des Granuloms noch weiter differenzieren können [27]. Ein TB-Granulom zeigt zudem nekrotische Regionen im



**Abbildung 2.4: Mögliche Verlaufsformen einer Infektion mit TB-Bakterien.** Die Aufnahme des Erregers erfolgt durch Tröpfcheninfektion. 5% der infizierten Personen erkranken unmittelbar nach der Infektion an einer akuten TB. 90% der mit TB-Erregern infizierten, immunkompetenten Jugendlichen und Erwachsenen zeigen zunächst keine Krankheitssymptome (latente TB-Infektion). Immunschwächen, wie z. B. eine HIV-Infektion, erhöhen das Risiko einer Reaktivierung der TB-Bakterien. Der Therapieerfolg bei einer TB-Erkrankung liegt bei etwa 95%. Ohne Antibiotikabehandlung oder bei Infektion mit multiresistenten TB-Erregern führt dies in etwa 50% der Fälle zum Tod des Patienten (dargestellt durch ein Sternchen) (Quelle: modifiziert aus [21]).

Zentrum und auch andere Immunzellen, wie neutrophile und dendritische Zellen. Auch B- und T-Zellen, natürliche Killerzellen sowie Fibroblasten und Epithelzellen sind an der Eingrenzung des Erregers beteiligt [27]. Diese Eingrenzung hindert die TB-Bakterien an der Ausbreitung in der Lunge. Die TB-Bakterien können jedoch die Granulombildung zu ihren Gunsten beeinflussen und benötigen diese Umgebung sogar für die erfolgreiche Vermehrung und Verbreitung im Menschen [27].

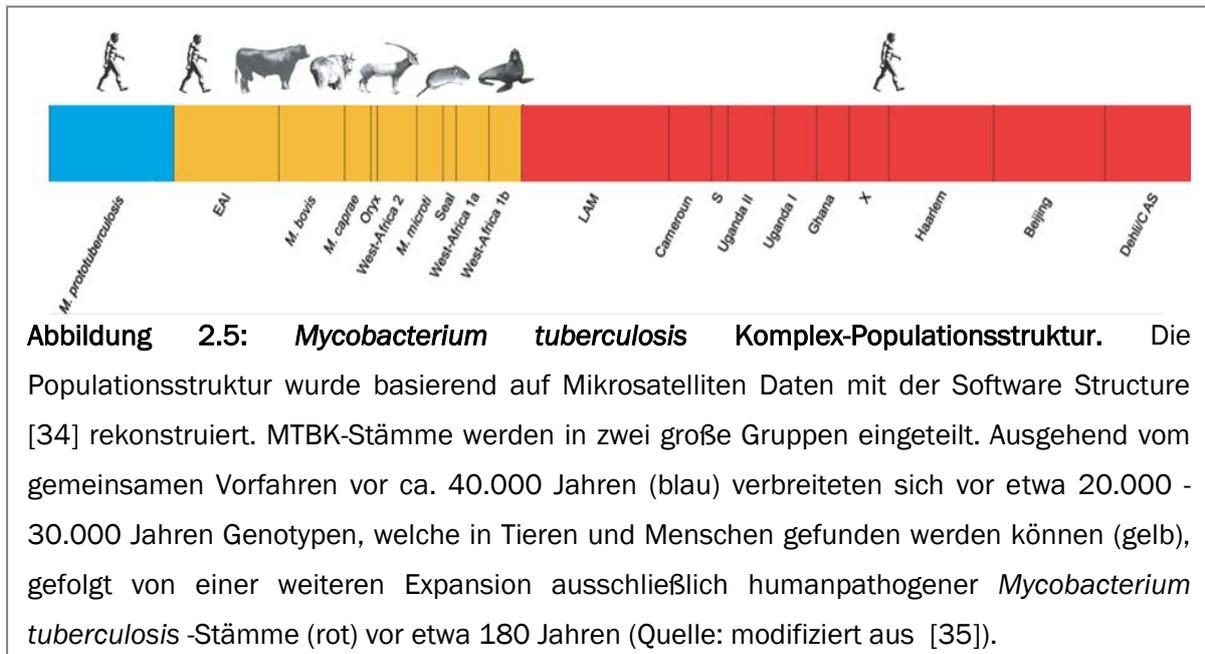
## 2.4 TUBERKULOSE-ERREGER

Der TB-Erreger gehört zur Gattung der Mykobakterien (*Mycobacterium spp.*), die mehr als 100 stäbchenförmige, meist im Boden lebende Arten umfasst [29]. Man unterscheidet zwischen schnell und langsam wachsenden Mykobakterien. Zu den langsamen wachsenden Arten zählen neben *Mycobacterium tuberculosis* auch *Mycobacterium leprae* (Verursacher der Lepraerkrankung).

Ein charakteristisches Merkmal der Mykobakterien ist die komplex aufgebaute Zellwand. Neben einer mehrschichtigen Matrix aus Peptidoglykan (Murein) und Polysacchariden (Arabinogalaktan) besteht die Zellwand aus den namensgebenden Mykolsäuren, welche zu einem charakteristischen Färbverhalten führen. Nach Färbung, mit z. B. Karbolfuchsin, verbleibt der Farbstoff auch nach Säurebehandlung in der Zellwand. Man spricht deswegen auch von säurefesten Stäbchen und nutzt diese Methode zum mikroskopischen Nachweis von Mykobakterien in Patientenproben (Ziehl-Neelsen-Färbung) [8]. Dieser Zellwandaufbau verringert die Permeabilität für viele hydrophile Antibiotika (z. B. Betalaktame) und vermittelt dem TB-Bakterium ein hohes Maß intrinsischer Antibiotikaresistenz [30], [31].

Unter den mehr als 100 Mykobakterienarten werden die Tuberkulosebakterien (TB-auslösende Arten) in dem sogenannten *Mycobacterium tuberculosis* Komplex (MTBK) zusammengefasst. Dieser umfasst die primär humanpathogenen MTBK-Arten *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum* und *M. canettii* [32], aber auch an Tiere angepasste Arten, wie *M. bovis*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. orygis*, *Dassie bacillus* und *M. mungii* [33].

Mittels verschiedener molekularbiologischer Typisierungsmethoden (Genotypisierung, siehe Abschnitt 2.5) können klinische Isolate des MTBK in eine Vielzahl phylogenetischer Gruppen (Genotypen) weiter unterteilt werden (vergleiche Abbildung 2.5). Die verschiedenen MTBK-Genotypen sind weltweit unterschiedlich verbreitet und treten in bestimmten Regionen gehäuft auf [34]. So sind z. B. Stämme des Cameroon-Genotyps für über 40% der durch Sputum Mikroskopie nachweisbaren Lungentuberkulose Erkrankungen in Kamerun verantwortlich [35]. X-Typ-Stämme sind verbreitet in Großbritannien, Nordirland und den USA [36]. Der Beijing-Genotyp wurde am häufigsten in Patientenproben aus China nachgewiesen (45% der regionalen MTBK-Isolate) [36].



## 2.5 METHODEN ZUR GENOTYPISIERUNG VON MTBK-STÄMMEN

Klinische Isolate von TB-Patienten wurden in den 1980er Jahren noch über kaum aussagekräftige Antibiotikaresistenzprofile charakterisiert und in wenige sogenannte Phagentypen eingeteilt [37]. Eine erste Studie zur genetischen Diversität untersuchte Sequenzvariationen in 26 Genen von 842 klinischen TB-Stämmen [38]. Die Autoren fanden nur 32 Polymorphismen die nicht in Verbindung mit Resistenzmechanismen stehen. Diese im Vergleich zu anderen Pathogenen sehr hohe Ähnlichkeit (99,9%) von proteincodierenden DNA-Sequenzen [38], führten zu der Annahme, dass genetische Diversität und pathobiologische Unterschiede von TB-Stämmen ausschließlich auf der Insertion und Variabilität von mobilen DNA-Elementen (z. B. das Insertionselement IS6110) basieren [38].

Erst mit der Einführung von Genotypisierungsmethoden, wie der IS6110 Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus- (RFLP-) Analyse, *Spacer Oligonucleotide-* (Spoligo-) Typisierung und *Mycobacterial interspersed repetitive units – variable number tandem repeats-* (MIRU-VNTR-) Typisierung, war eine Differenzierung klinischer Isolate auf Stammebene möglich. Diese Methoden generieren für einzelne Isolate einen nahezu unverwechselbaren genetischen Fingerabdruck [39] und erlaubten erstmals die Unterscheidung von einzelnen MTBK-Stämmen.

Eine wichtige Anwendung der verschiedenen Genotypisierungsmethoden sind molekularepidemiologische Studien [39]. Hierbei werden die Typisierungsdaten genutzt, um Infektionsketten zu ermitteln. Der Ansatz beruht auf der Beobachtung, dass TB-Stämme von TB-Patienten mit einem nachgewiesenen epidemiologischen Zusammenhang einen identischen oder

sehr ähnlichen DNA-Fingerabdruck aufweisen. Diese Patienten werden in einem sogenannten Cluster zusammengefasst und stellen eine mögliche Infektionskette dar [39]. DNA Fingerprintmuster von MTBK-Stämmen von Patienten ohne epidemiologischen Zusammenhang sind hingegen sehr verschieden [39]. Die Genotypisierungsdaten werden dann mit klassischen epidemiologischen Daten z. B. aus Umgebungsuntersuchungen kombiniert, um Übertragungsketten präzise nachvollziehen zu können.

Molekularepidemiologische Studien wurden bzw. werden in der ganzen Welt durchgeführt und ermöglichen auch einzigartige Erkenntnisse über die lokale und globale Ausbreitung von MTBK-Stämmen und deren Populationsstruktur. Ein wichtiger Schritt für eine erste Erfassung der globalen Diversität waren hierbei Studien globaler Stammkollektionen z. B. basierend auf Spoligo-Typisierung [36] oder MIRU-VNTR-Typisierung [40]. Diese Studien offenbarten, dass MTBK-Stämme in verschiedene phylogenetische Gruppen eingeteilt werden können und die genetische Diversität innerhalb des MTBK wahrscheinlich unterschätzt wurde [41].

Die wichtigsten Genotypisierungsmethoden werden im Folgenden kurz vorgestellt.

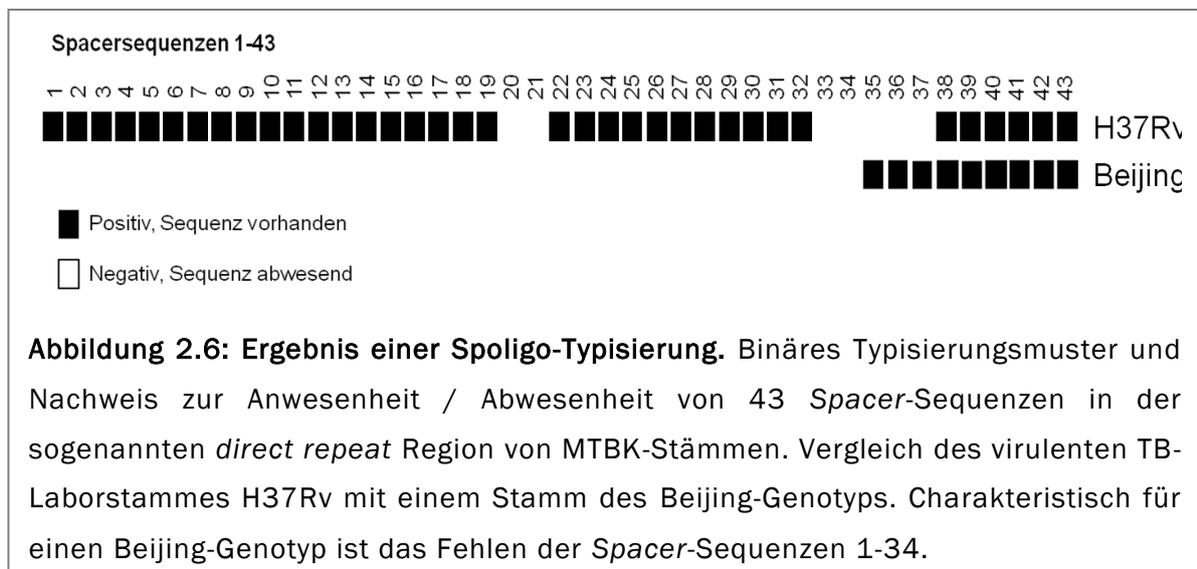
### 2.5.1. IS6110 RESTRIKTIONS-FRAGMENT-LÄNGENPOLYMORPHISMUS- (RFLP-) ANALYSE

Die IS6110 RFLP-Analyse war lange der Goldstandard für die Genotypisierung von MTBK-Stämmen [42]. Erstmals von van Emden *et al.* [43] in einem standardisierten Protokoll beschrieben, basiert die Methode auf der Detektion von IS6110-Insertionssequenzen im Genom klinischer Isolate. Die genomische DNA wird hierfür mit dem Restriktionsenzym *PvuII* fragmentiert, die Fragmente auf einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt, per Southern-Blot (Vakuum-Blot) auf eine Nylonmembran übertragen und anschließend die IS6110-tragende DNA-Fragmente durch Hybridisierung mit einer markierten Sonde nachgewiesen. Da die Anzahl und Genompositionen der IS6110-Sequenzen in klinischen Isolaten variieren, ergibt sich daraus ein stammspezifisches Bandenmuster, der sogenannte IS6110 DNA-Fingerabdruck [39]. Der größte Nachteil dieser Methode ist die erforderliche Menge ( $> 1 \mu\text{g}$ ) mykobakterieller DNA und die damit verbundene drei bis vier Wochen dauernde Kultivierung der MTBK-Isolate.

### 2.5.2 SPACER OLIGONUCLEOTIDE- (SPOLIGO-) TYPISIERUNG

Die Spoligo-Typisierung basiert auf dem standardisierten Protokoll von Kamerbeek *et al.* [44]. Hierbei wird die *Direct Repeat*- (DR-) Region im Genom von MTBK-Stämmen untersucht, die durch bis zu 50 hintereinander liegende, repetitive Sequenzen charakterisiert ist. Diese *Repeats*

werden durch einzigartige *Spacer*-Sequenzen (35-41 bp) getrennt. Bei der Spoligo-Typisierung wird die Variabilität dieser *Spacer*-Sequenzen bei klinischen Isolaten genutzt, um ein binäres Typisierungsmuster zu generieren (vergleiche Abbildung 2.6). Hierzu werden 43 dieser *Spacer*-Sequenzen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und nachfolgend das Vorhandensein / Nichtvorhandensein bestimmter *Spacer*-Sequenzen durch eine reverse Linienhybridisierung bestimmt. Das Typisierungsmuster wird zum schnellen Stammvergleich eingesetzt und weist zusätzlich auch MTBK-Genotyp-spezifische Signaturen auf (vergleiche Abbildung 2.6). Vorteile der Methode sind die einfache Digitalisierung der Typisierungsergebnisse und die PCR-Amplifikation, die nur geringe Mengen mykobakterieller DNA benötigt. Die Spoligo-Typisierung ist jedoch weniger diskriminierend als ein IS6110 DNA-Fingerabdruck [39] und kann in molekularepidemiologischen Studien nur zusammen mit einer höher auflösenden Methode, z. B. IS6110 RFLP-Typisierung oder der im Folgenden beschriebenen MIRU-VNTR-Typisierung eingesetzt werden [39].



### 2.5.3 MYCOBACTERIAL INTERSPERSED REPETITIVE UNITS – VARIABLE NUMBER TANDEM REPEATS- (MIRU-VNTR-) ANALYSE

Die MIRU-VNTR-Analyse basiert auf der Variabilität von Minisatelliten-Markern im Genom von MTBK-Stämmen. Bei der MIRU-VNTR-Typisierung wird die Anzahl und Größe von bis zu 24 Minisatelliten-Markern durch eine Längenanalyse von PCR-Fragmenten bestimmt [45]. Die Methode ist PCR-basiert und erlaubt, bei der Analyse von 24 MIRU-VNTR-Markern, eine ähnlich hohe Differenzierung zwischen einzelnen MTBK-Isolaten wie die IS6110 RFLP-Typisierung [45]. Die Analyse kombiniert damit die Vorteile der Spoligo-Typisierung, wie die kurze Analysezeit und die einfache Digitalisierung der Typisierungsergebnisse, mit der hohen Unterscheidungsfähigkeit der IS6110 RFLP-Typisierung [39].

## 2.6 METHODEN FÜR DIE VISUALISIERUNG UND ANALYSE VON GENOTYPISIERUNGSDATEN

Um einen Zugang zu komplexen Datensätzen, wie kategorischen oder numerischen Daten (z. B. Spoligo-Typisierungsergebnisse oder MIRU-VNTR-Daten) aber auch Sequenzdaten zu bekommen, können verschiedene Verfahren/Algorithmen zur Visualisierung und Analyse eingesetzt werden. Die mathematischen Grundlagen hinter diesen computergestützten Berechnungen unterscheiden sich, haben jedoch das gemeinsame Ziel die gesammelten Daten in Gruppen nach zunehmender Ähnlichkeit zu ordnen und die hierarchische Beziehung der Proben zueinander darzustellen [46]. So eine mathematische Berechnung kann mit geänderten Startbedingungen vielfach wiederholt werden, so dass mehrere mögliche Verknüpfungen/Verzweigungen zwischen einzelnen Proben resultieren. Hierbei wird für jede Verzweigung ein sogenannter *resampling support* angegeben. Dieser spiegelt dann den Anteil wieder, bei dem eine Verzweigung in den wiederholten Berechnungen resultierte und damit die Wahrscheinlichkeit der Verwandtschaft, respektive Ähnlichkeit aller einem Zweig zugeordneten Proben. Zwei typische Anwendungen hierbei sind das Vertauschen der Startwerte (Permutationen) [47] und die Mehrfachauswahl und das Weglassen einzelner Startwerte (*bootstrapping*) [48].

### 2.6.1 MINIMUM-SPANNING-TREE- (MST-) ALGORITHMUS

Der *Minimum-Spanning-Tree*- (MST-) Algorithmus wurde ursprünglich entwickelt, um eine Region möglichst effizient mit elektrischen Leitungen zu vernetzen und damit die kürzeste Verbindung zwischen verschiedenen Knotenpunkte zu berechnen [49]. Dieses Prinzip eines minimalen Spannbaums wurde auch in dieser Arbeit angewendet, um die MIRU-VNTR-Daten (24 Loci) zu analysieren. Die Idee hinter diesem Algorithmus besteht darin, die im Datensatz vorhandene Diversität (hier: Unterschiede in der Anzahl der Minisatelliten-Marker an bestimmten Positionen im Genom) durch eine minimale Anzahl von Mutationen zu erklären. Die Länge der einzelnen Verzweigungen entspricht der Anzahl an Unterschieden zwischen einzelnen Isolaten/Clustern und die summierte Gesamtlänge ist so gering wie möglich. Um der Theorie einer sich evolvierenden klonalen Bakterienpopulation möglichst nahe zu kommen, kann der MST-Algorithmus mit folgendem Parameter erweitert werden: Typen mit möglichst vielen Einzel- und Doppellokus-Varianten werden als parentaler Knotenpunkt priorisiert. Voraussetzung zur Berechnung eines validen MSTs ist die Vollständigkeit, bzw. der Umfang des Datensatzes, da der MST-Algorithmus *per se* keine hypothetischen Knotenpunkte berücksichtigt [46].

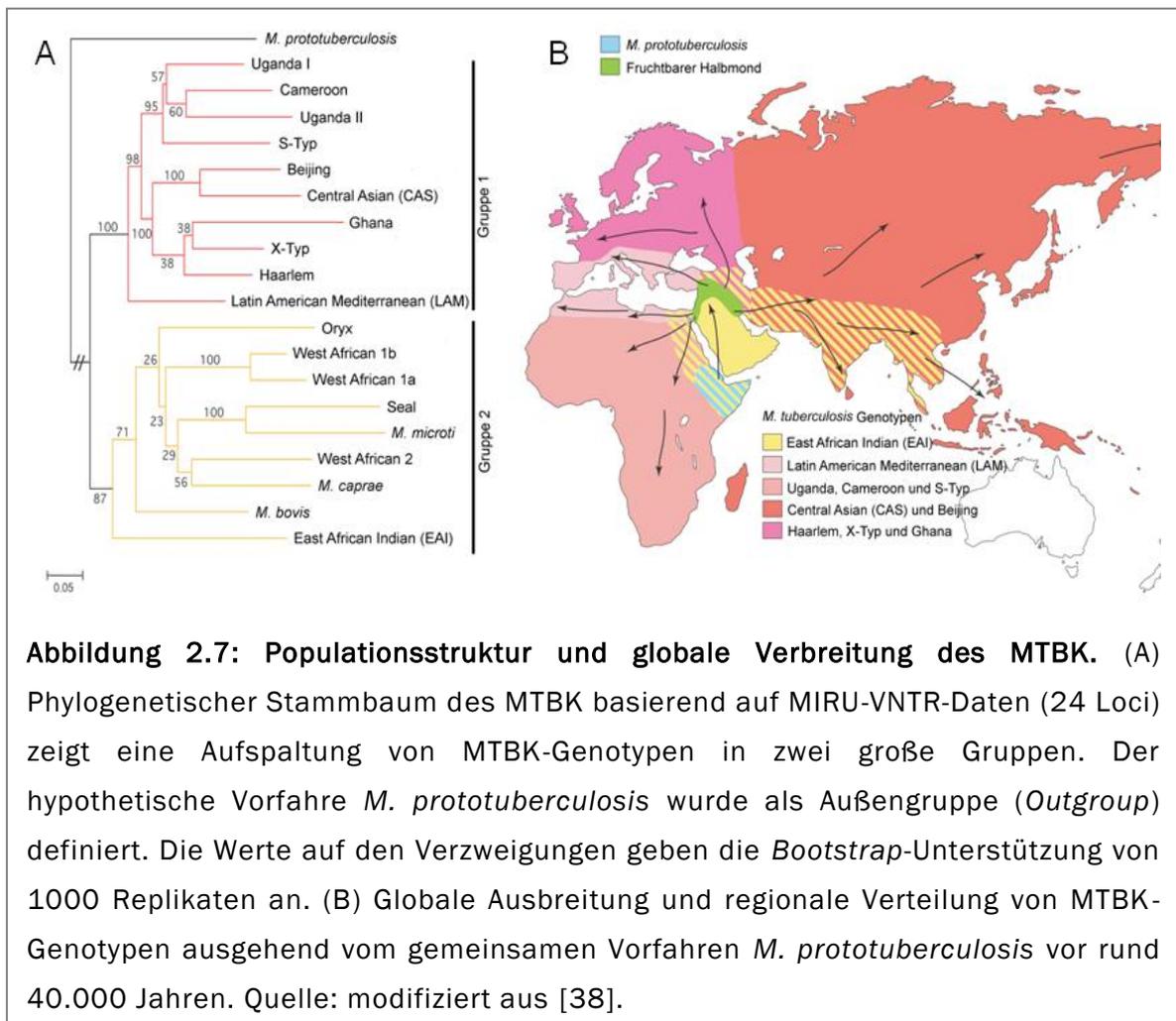
### 2.6.2 MAXIMUM-LIKELIHOOD- (ML-) ALGORITHMUS

Eine rechenintensive Methode zur Rekonstruktion der Phylogenie und Berechnung des wahrscheinlichsten Stammbaumes ist der *Maximum-Likelihood-Algorithmus* [50]. Resultierende ML-Stammbäume mit möglichst wenigen Mutationsereignissen haben die größte Wahrscheinlichkeit, die tatsächliche Phylogenie wider zu spiegeln. Die phylogenetischen Stammbäume in dieser Arbeit wurden auf Basis von konkatenierten Sequenzdaten, artifiziell aneinandergereihte DNA-Polymorphismen, berechnet. Die Länge der Verzweigungen ist proportional zur evolutionären Zeit und berücksichtigt somit auch die Substitutionsrate. Einfache erste Substitutionsmodelle gingen davon aus, dass eine Base mit gleicher Wahrscheinlichkeit zu jeder anderen Base mutieren kann und dass alle Basen im Genom zu gleichen Anteilen vertreten sind (Jukes-Cantor-Modell) [51]. Im Folgenden wurde dieses Modell um verschiedene Parameter erweitert und berücksichtigt u. a. unterschiedliche Transitionsraten (Austausch zwischen zwei Purinen oder zwei Pyrimidinen) und Transversionsraten (Austausch zwischen Purin und Pyrimidin). Zusätzlich ermöglicht die Einbringung einer künstlichen Außengruppe (*Outgroup*), welche wesentlich nicht in enger Verwandtschaft zur untersuchten Population steht, die Bestimmung des letzten gemeinsamen Vorfahren (*most recent common ancestor*, MRCA) und gibt Auskunft über die Richtung der Evolution.

## 2.7 POPULATIONSTRUKTUR, GENETISCHE UND FUNKTIONELLE DIVERSITÄT DES MTBK

Mit Hilfe der beschriebenen Genotypisierungsmethoden (IS6110 RFLP-Analyse, Spoligo-Typisierung und MIRU-VNTR-Analyse) ist es möglich, klinische MTBK-Isolate molekulargenetisch mit einer hohen Auflösung zu charakterisieren. Die valide Einteilung in verschiedene phylogenetische Gruppen ermöglichte zudem die Korrelation von Genotyp und phänotypischen Charakteristika, z. B. mit immunologischer, klinischer oder epidemiologischer Bedeutung.

Basierend auf MIRU-VNTR-Daten [40] aber auch durch den Nachweis bestimmter Deletionen [34] und konkatenierte Sequenzdaten [52] können die Stämme des MTBK in zwei phylogenetische Hauptgruppen eingeteilt werden (vergleiche Abbildung 2.7A). Stämme der MTBK-Gruppe 1, oft auch als „moderne“ MTBK-Stämme bezeichnet [32], [34], [52], [53], umfassen die primär humanpathogenen *M. tuberculosis*-Stämme. Darunter definierte Genotypen, wie z. B. Haarlem, Beijing, oder S-Typ [40]. Zur MTBK-Gruppe 2 gehören die humanpathogenen *M. africanum*-Stämme, der *M. tuberculosis* East African Indian- (EAI-) Genotyp und an verschiedene Tiere adaptierte Varianten, z. B. *M. bovis*, *M. caprae*.



**Abbildung 2.7: Populationsstruktur und globale Verbreitung des MTBK.** (A) Phylogenetischer Stammbaum des MTBK basierend auf MIRU-VNTR-Daten (24 Loci) zeigt eine Aufspaltung von MTBK-Genotypen in zwei große Gruppen. Der hypothetische Vorfahre *M. prototuberculosis* wurde als Außengruppe (*Outgroup*) definiert. Die Werte auf den Verzweigungen geben die *Bootstrap*-Unterstützung von 1000 Replikaten an. (B) Globale Ausbreitung und regionale Verteilung von MTBK-Genotypen ausgehend vom gemeinsamen Vorfahren *M. prototuberculosis* vor rund 40.000 Jahren. Quelle: modifiziert aus [38].

Ein wahrscheinliches phylogenetisches Szenario ist, dass sich die MTBK-Gruppen 1 und 2 ausgehend von einem gemeinsamen Vorfahren vor rund 30 - 50 Tausend Jahren [40], [53] getrennt haben und sich parallel zur Migration des anatomisch modernen Menschen aus Afrika auch auf den anderen Kontinenten ausgebreitet haben (vergleiche Abbildung 2.7B). Die humanpathogenen MTBK-Genotypen der MTBK-Gruppe 2 (*M. africanum* West African 1 und 2, *M. tuberculosis* East African Indien (EAI)) blieben lokal beschränkt auf Regionen in West- und Ostafrika sowie Südasien [34], [40] (vergleiche Abbildung 2.7B).

Die unterschiedliche geographische Verbreitung der verschiedenen MTBK-Genotypen bietet die Basis für deren Adaption an lokale humane Populationen und der Ausbildung einer im genetischen Hintergrund fixierten pathobiologischen Diversität [54]. Eine systematische Analyse der DNA-Sequenzvariabilität in 89 Genen einer repräsentativen Kollektion (n=108) von MTBK-Stämmen belegte eine genetische Variabilität hauptsächlich in Form von Punktmutationen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) [52]. Hierbei führte der Großteil (231/370, 62,4%) der SNPs zu Veränderung der Aminosäuresequenz und könnte damit funktionelle Folgen haben [52]. Diese funktionelle Diversität wurde auch auf Transkriptomebene in *in vitro* Infektionsexperimenten

durch Microarray-Analysen bestätigt [55]. Die genetische Diversität klinischer MTBK-Isolate hat somit funktionelle Konsequenzen und ist wahrscheinlich von pathobiologischer Bedeutung [55]. Mireilla Coscolla und Sebastien Gagneux zeigten zudem retrospektiv, dass klinische Isolate unterschiedlicher Genotypen in diversen Studien auch Unterschiede in ihrer Virulenz aufwiesen [56].

So zeigten Stämme des Beijing-Genotyps u. a. mehr Nekrose [57] und eine erhöhte Wachstumsrate [58] in humanen Makrophagen. Auch eine erhöhte Reaktivierungsrate hin zur einer aktiven, offenen TB [59] und geringere Überlebensraten im Tiermodell wurden beobachtet [60], [61]. Des Weiteren variieren MTBK-Stämme unterschiedlicher Genotypen in ihrer Fähigkeit eine Immunantwort auszulösen (Immunogenität) [62] als auch in bestimmten klinischen Parametern, z. B. der Ausbildung von Antibiotikaresistenzen [56], [63].

Besonders relevant ist auch die Korrelation zwischen dem Auftreten von resistenten TB-Stämmen in vielen Regionen und dem Beijing-Genotyp, die in verschiedenen molekularepidemiologischen Studien in MDR-TB-Hochinzidenzländern aber auch in Deutschland gezeigt werden konnte [64]–[68]. Diese Studien fanden zudem hohe Übertragungsraten (Clusterraten) von multiresistenten TB-Stämmen des Beijing-Genotyps. Diese Daten deuten an, dass die Ausbreitung von MDR-TB maßgeblich von einer erhöhten Virulenz bestimmter MDR-Stämme beeinflusst werden könnte [67]. Auch mit optimalen Therapiemöglichkeiten könnte daher die Ausbreitung solcher MDR-Stämme den Erwerb weiterer Resistenzen, hin zu XDR-Varianten, begünstigen und einen besonders negativen Effekt auf die zukünftige TB-Epidemiologie haben [69], [70].

## 2.8 RELATIVE FITNESS UND VIRULENZ VON RESISTENTEN MTBK-ISOLATEN

Die Virulenz eines MTBK-Stammes korreliert in der Regel mit seiner Fähigkeit sich in der Bevölkerung zu verbreiten. Die Wahrscheinlichkeit dafür steigt, wenn ein Stamm, z. B. nach Infektion des Wirtes, schneller akute und/oder ausgeprägter Krankheitssymptome über einen möglichst langen Zeitraum hervorruft (Pathogenität) [54], [71].

Besonders wichtig in Bezug auf die Virulenz von MDR-TB-Stämmen könnte die relative Wachstumsrate (relative Fitness [72]) im Vergleich zum antibiotikasensiblen Ausgangstamm sein, da ein Resistenzerwerb ursprünglich mit einem Wachstumsdefizit assoziiert wurde [73]. Eine erhöhte relative Wachstumsrate von einem evolvierten antibiotikaresistenten TB-Stamm in Relation zu seinem sensiblen Ausgangstamm, kann zu einer erhöhten Virulenz beitragen [72]. Interessanterweise fand man klinische MTBK-Stämme, die nach einem Resistenzerwerb im Verlauf der Therapie ihre relative Fitness steigern konnten [72]. MTBK-Stämme können Resistenzen gegenüber einzelnen Antibiotika hauptsächlich durch definierte Punktmutationen in

bestimmten Genen erwerben [14]. Diese Resistenz-vermittelnden Mutationen verändern z. B. die Bindestelle eines Antibiotikums zu seinem Zielprotein oder inhibieren ein Enzym, welches für die Aktivierung eines Antibiotikums im Zellinneren benötigt wird [14]. Diese strukturverändernden Resistenzmutationen führen aber in der Regel zu Wachstumsdefiziten, da die betroffenen, essentiellen Proteine (z. B. RNA-Polymerase) an Aktivität verlieren [73]. Basierend auf dieser postulierten verringerten Fitness antibiotikaresistenter TB-Stämme sagten Computermodelle nur eine lokal begrenzte Ausbreitung von MDR-TB und eine geringe Bedeutung für die globale TB-Epidemiologie voraus [74].

Dieses Fitnessdefizit von Antibiotikaresistenten TB-Stämmen ist jedoch abhängig von der Position und Art der jeweiligen Mutation bzw. dem daraus folgenden Aminosäureaustausch und vom genetischen Hintergrund eines MTBK-Stammes [72]. Vergleichende Wachstumsexperimente zeigten, dass bestimmte RMP-Resistenz-vermittelnde Mutationen im Gen *rpoB* (Beta-Untereinheit der RNA-Polymerase, z. B. *rpoB* S531L) im Vergleich zu anderen Varianten (z. B. *rpoB* H526Y) in *in vitro* evolvierten RMP-resistenten TB-Stämmen nur ein geringes Wachstumsdefizit (*low-cost*) vermitteln [72]. Die *Low-cost*-Mutation *rpoB* S531L wurde, wie oben angedeutet, auch in klinischen MTBK-Isolaten gefunden und ist die weltweit am häufigsten auftretende RMP-Resistenz-vermittelnde Mutation [75]. Die relative Wachstumsrate von klinischen Isolaten mit der Mutation *rpoB* S531L war sogar gleich oder höher als die ihrer RMP-sensiblen Vorgänger [72]. Daraus folgerte man, dass entweder spezifische *Low-cost*-Resistenzmutationen in einigen TB-Stämmen bestimmter MTBK-Genotypen gar kein Fitnessdefizit (*no-cost*) verursachen oder den Erwerb von kompensatorischen Mechanismen [72].

Sogenannte kompensatorische Mutationen konnten tatsächlich die relative Fitness von resistenten TB-Stämmen weiter erhöhen [76]. Spezifische Mutationen in den Genen *rpoA* und *rpoC* wurden in *in vitro* selektionierten RMP-resistenten TB-Stämmen und in klinischen MDR-Isolaten aus Hochinzidenzregionen identifiziert [76] und fördern wahrscheinlich die direkte Übertragung von MDR-TB-Stämmen [77].

Unter Berücksichtigung dieser gesteigerten Fitnesslevel von resistenten MTBK-Stämmen deuten aktuelle mathematische Modelle auf eine mögliche globale Ausweitung der MDR-TB-Epidemie hin [78].

## 2.9 ASSOZIATION ZWISCHEN RESISTENZ, VIRULENZ UND DEM BEIJING-GENOTYP

Neben der Bedeutung der beschriebenen Effekte (*low-cost*, *no-cost* und Kompensation) auf die Wachstumsrate resistenter TB-Stämme, hat auch der genetische Hintergrund Auswirkungen auf die relative Fitness und womöglich Virulenz von MDR-Stämmen [79]. Wie oben schon angedeutet, zeigten molekularepidemiologische Studien in MDR-Hochinzidenzländern eine ungleiche Verteilung von Antibiotikaresistenzen bei TB-Stämmen verschiedener Genotypen [64]–[68]. Darüber hinaus zeigte sich in einigen Ländern eine Expansion bestimmter MDR-Stämme, die augenscheinlich besonders gut übertragbar sind [80], [81], [70], [82].

Erste Indizien, dass sich ein hypervirulenter MDR-TB-Klon effektiv ausbreitet und ein Zusammenhang mit dem MTBK-Genotyp bestehen könnte, ergaben sich aus Berichten Anfang der 1990er Jahre in den USA. Zwischen 1990 und 1993 wurden alleine in New York City 357 HIV-positive TB-Patienten registriert, welche mit vier von fünf der heutigen Erstrangmedikamente (INH, RMP, EMB, SM) nicht mehr erfolgreich zu behandeln waren [83]. Die molekulare Typisierung der multiresistenten TB-Stämme ergab identische IS6110 RFLP-Fingerabdrücke und belegte die klonale Ausbreitung eines Stammes (willkürlich als „*strain W*“ benannt). Zur schnellen Identifizierung dieses Stammes wurde eine Multiplex-PCR entwickelt [84], welche die Anwesenheit von ein oder zwei Insertionselementen (IS6110) in einer definierten genomischen Region (*noise transfer function region*, NTF-Region) überprüft. Zudem wiesen diese Stämme alle ein charakteristisches Typisierungsmuster (Spoligotyp) auf (vergleiche Abbildung 2.6), das spezifisch für den Beijing-Genotyp ist. Die per Multiplex-PCR identifizierten Stämme wurden W-Beijing benannt [85]. Im Weiteren wurden Stämme des Beijing-Genotyps in verschiedenen Regionen der Welt mit der Ausbreitung resistenter und multiresistenter Stämme in Verbindung gebracht [65], [86]–[90]. Diese Befunde führten zu der Hypothese, dass Beijing-Stämme in besonderem Maße Resistenzen erwerben und übertragen können [81], [91].

Nach den ersten Studien zur globalen Ausbreitung von Beijing-Stämmen und der möglichen Assoziation mit Resistenz wurden weiterführende Untersuchungen zur genaueren Definition des Beijing-Genotyps durchgeführt. Anthony Tsolaki und Kollegen analysierten Beijing-Stämme überwiegend aus San Francisco und beschrieben verschiedene Deletionen (*regions of difference*, RDs) als Marker zur Feintypisierung von Beijing-Stämmen. Den Autoren zufolge sind W-Beijing-Stämme durch die sukzessive Deletion drei charakteristischer Regionen (RD181 > RD150 > RD142) weiter zu differenzieren [92]. Im Folgenden wurden Stämme des Beijing-Genotyps in zwei Gruppen eingeteilt: atypische Beijing-Stämme ohne IS6110 Insertion in der NTF-Region und typische oder auch moderne W-Beijing-Stämme mit ein oder zwei Insertionen in der NTF-Region und variablen Deletionen der Regionen RD181, RD150 und RD142 [85].

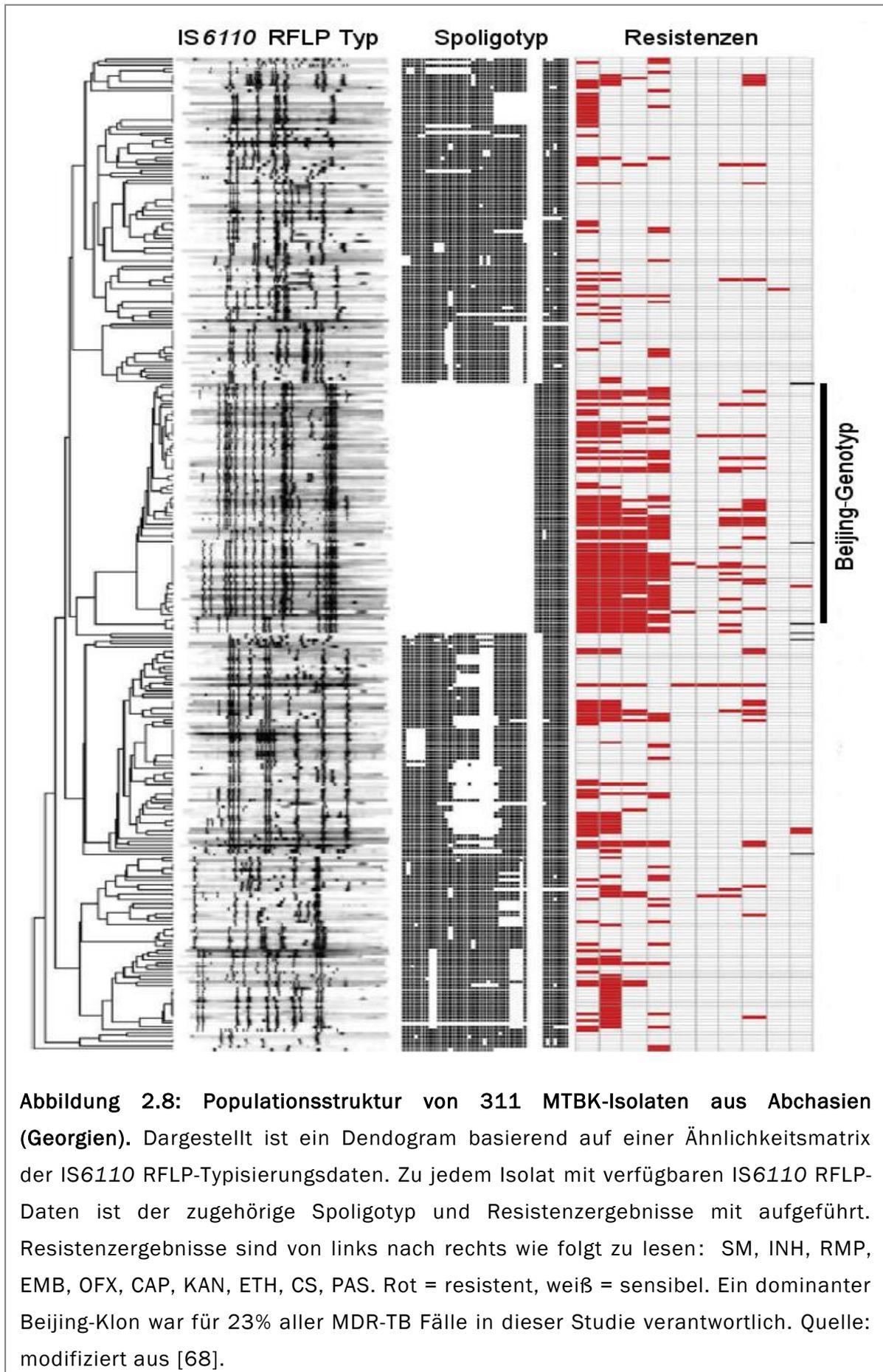
Um Einblicke in die globale Verbreitung von atypischen und typischen Beijing-Stämmen zu erhalten, führten Judith Glynn und Kollegen eine Meta-Analyse durch und untersuchten die regionalen Proportionen von Beijing-Stämmen und die Assoziation mit Antibiotikaresistenz [72]. Am häufigsten wurden Beijing-Stämme in Asien identifiziert (speziell in Peking), allerdings kamen W-Beijing-ähnliche Stämme auch in den USA, Afrika und Südamerika vor. Für Europa, Russland und Zentralasien gab es derzeit (2002) keine IS6110 RFLP-basierten Studien, die eine weitere Klassifizierung zuließen. Eine eindeutige Korrelation mit Resistenz konnte allerdings nicht in allen Studien gezeigt werden, dennoch resümierten die Autoren, dass der Beijing-Genotyp und W-Beijing-Stämme im Speziellen auf Grund ihrer globalen Verbreitung und Assoziation mit lokalen Ausbrüchen eventuell selektive Vorteile gegenüber Stämmen anderer Genotypen besitzen [93].

Diese Hypothese wurde auch von einer prospektiven Studie von Manuela Pardini und Kollegen in Abchasien (Georgien) gestützt. Unter 366 TB-Patienten waren 25% mit einem Beijing-Stamm infiziert. Die Infektion mit einem Beijing-Stamm war jedoch mit einem 25-fach erhöhten Risiko an einer MDR-TB zu leiden verbunden. Die hohe Clusterrate (Anteil von Stämmen mit einem identischen IS6110 RFLP-Fingerabdruck und Spoligo-Typ, vergleiche Abbildung 2.8) von mehrfach resistenten Beijing-Stämmen sowie die hohe Rate (32%) von Beijing-Stämmen unter allen neuen MDR-TB-Fällen deuteten des Weiteren auf eine massive Übertragung einzelner, möglicherweise hypervirulenter MDR-Beijing-Klone in der Studienregion hin [67].

Neben einer erhöhten Virulenz und der daraus möglicherweise resultierenden erhöhten Übertragbarkeit von bereits resistenten W-Beijing-Stämmen wird auch ein beschleunigter Resistenzwerb diskutiert, um die Korrelation zwischen Stämmen des Beijing-Genotyps und Resistenz zu erklären.

Bereits 2003 entdeckte die Gruppe um Brigitte Gicquel drei Mutationen, welche potentiell die Struktur von DNA-Reparatur-Proteinen (*mut*-Genen) verändern und spezifisch für den W-Beijing-Genotyp sind [94]. In klinischen *Pseudomonas aeruginosa*-Isolaten führen Defekte in solchen DNA-Reparatur Genen zu einem Mutator-Phänotyp [95], [96]. Dieser ist durch eine bis zu 1.000-fach erhöhte Mutationsrate gekennzeichnet und gilt als Schlüsselfaktor bei der Resistenzentwicklung von chronischen Infektionen der Lunge, wie Mukoviszidose, Bronchiektasie oder der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung [96].

Im Falle von TB könnten die Veränderungen in den *mut*-Genen von W-Beijing-Stämmen eine evolutionäre Anpassung an veränderte Umgebungsbedingungen (z. B. erhöhte Bevölkerungsdichte) oder auch eine Adaption an unterschiedliche Wirte begünstigt haben [94]. Ein Mutator-Phänotyp ist jedoch in den meisten Fällen transient, da er auf lange Sicht zu viele nachteilige Mutationen anhäuft [97], [98]. Deswegen vermuten die Autoren, dass eine gesteigerte Mutationsrate von W-Beijing-Stämmen zunächst kurzfristig zur verbesserten Adaption an verschiedene Wirtspopulationen führte, anschließend jedoch durch neue Mutationen kompensiert wurde.



Auch eine möglicherweise kurzfristig erhöhte Mutationsrate unter bestimmten Bedingungen (z. B. Antibiotikabehandlung) wurde diskutiert [94].

In Anlehnung an diese Hypothesen untersuchten Jim Werngren und Sven Hoffner mit einem Fluktuationstest (Lauria-Delbrück-Experiment) die Rate von RMP-Resistenz-vermittelnden Mutationen von W-Beijing-Stämmen. Sie fanden jedoch keine erhöhte Mutationsrate im Vergleich zu anderen Genotypen [99]. Neuere Untersuchungen wiederum zeigten jedoch eine deutlich gesteigerte ( $P = 0,003$ ) Mutationsrate von Beijing-Stämmen ( $1.6 \times 10^{-5}$  bis  $5.4 \times 10^{-3}$ ) im Vergleich zu EAI- (East African Indian-) Stämmen ( $6.3 \times 10^{-8}$  bis  $3.8 \times 10^{-4}$ ) unter RMP-Behandlung *in vitro* [100]. Eine aktuelle Studie [63] kommt zu dem Schluss, dass u. a. Stämme des Beijing-Genotyps schneller Resistenzen erwerben, dies jedoch nicht auf eine gesteigerte Mutationsrate zurückzuführen ist. Vielmehr sei die Keimbelastung in der Lunge zu Beginn der Therapie der ausschlaggebende Faktor für die Wahrscheinlichkeit bereits vorhandener (zufälliger) Resistenz-vermittelnder Mutationen innerhalb der TB-Bakterienpopulation [63].

Die in verschiedenen Studien beschriebene Korrelation zwischen dem Beijing-Genotyp und MDR-TB legt spezifische pathobiologische Eigenschaften von Beijing-Stämmen im Zusammenhang mit Resistenzerwerb und/oder erhöhter Übertragungsrate nahe. Die Fragen, ob Patienten, die mit einem Beijing-Stamm infiziert sind eine spezielle Therapie zur Vermeidung einer weiteren Resistenzentwicklung benötigen, ob zur Vermeidung der Übertragung von Beijing-Stämmen andere Infektionskontrollmaßnahmen notwendig sind, oder ob sich multiresistente Beijing-Klone weltweit ausbreiten und die globale TB-Kontrolle langfristig gefährden sind hoch interessant. Allerdings sind, wie oben beschrieben, die Ergebnisse von experimentellen und epidemiologischen Studien widersprüchlich, eine klare Aussage ist kaum möglich. Ein Grund für diese diskrepanten Befunde liegt in der nur ansatzweise verstandenen globalen Populationsstruktur von Beijing-Stämmen und deren Einfluss auf pathobiologisch relevante Eigenschaften, z. B. erhöhte Virulenz und/oder Resistenzerwerb.

## 2.10 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Wie zuvor beschrieben sind MTBK-Stämme des Beijing-Genotyps in vielen Untersuchungen mit einer erhöhten Übertragungsrate, einer erhöhten Virulenz sowie mit Antibiotikaresistenz in verschiedenen Studienregion assoziiert [81], [91]. Allerdings gibt es eine erhebliche Variabilität und teils widersprüchliche Ergebnisse in den bisher veröffentlichten Studien speziell in Bezug auf die Pathogenität und die Immunogenität [91]. Ein Grund hierfür könnte die genetische Variabilität der Stämme innerhalb des Beijing-Genotyps sein. Bisher basierte die phylogenetische Einteilung von Beijing-Stämmen auf größeren Sequenzpolymorphismen und der Differenzierung in atypische Beijing- und typische oder moderne W-Beijing-Stämme. Daten zur globalen Populationsstruktur mit hochauflösenden Methoden liegen nicht vor.

Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit:

- I. die globale Populationsstruktur von Beijing-Stämmen basierend auf MIRU-VNTR-Daten (24 Loci) beschrieben und identifizierte Subgruppen (konale Komplexe) und deren geografische Verteilung sowie die Assoziation mit MDR-TB untersucht werden.
- II. Auf Basis der MIRU-VNTR-Analyse sollte die Phylogenie von Beijing-Stämmen und deren Ausbreitung über die Zeit mittels hochauflösender *next generation sequencing* (NGS-) Technologie erschlossen und mögliche Virulenzfaktoren definiert werden.
- III. Weiterhin sollte die Evolution von Stämmen eines longitudinalen MDR-TB-*Outbreaks* und die Resistenzentwicklung im Patienten untersucht werden, um Resistenz- und/oder kompensatorische Mechanismen zu identifizieren.
- IV. Die Analyse von *in vitro* Wuchscharakteristika sollte erste Einblicke in möglicherweise spezifische pathobiologische Eigenschaften einzelner Beijing-Subgruppen geben.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 MATERIAL

#### 3.1.1 ÜBERSICHT ALLER UNTERSUCHTEN KLINISCHEN BEIJING-ISOLATE

Eine Übersicht und Referenzen zu 4.987 genotypisierten klinischen Beijing-Isolaten, welche in dieser Arbeit analysiert wurden, ist in Anhang 1 aufgelistet. Einbezogene Studien zur Analyse von Resistenz in Assoziation mit identifizierten klonalen Komplexen sind in Anhang 2 aufgelistet.

#### 3.1.2 ÜBERSICHT DER ANALYSIERTEN GENOMSEQUENZEN

Eine Übersicht aller in dieser Arbeit (n=233) untersuchten Genomsequenzen ist in Anhang 3 aufgelistet.

#### 3.1.3 ÜBERSICHT VERWENDETER PRIMER

Eine Übersicht der verwendeten Primer mit Angaben zur verwendeter Primerhybridisierungstemperatur (Ta) und Elongationszeit ist im Anhang 4 aufgelistet.

#### 3.1.4 MATERIAL FÜR PCR, SEQUENZIERUNG NACH SANGER UND MIRU-VNTR-TYPISIERUNG

**Tabelle 3.1: Material für PCR, Sequenzierung nach Sanger und MIRU-VNTR-Typisierung**

Material	Hersteller	Standort
H <sub>2</sub> O (DEPC behandeltes)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase (5U/μL)	Qiagen	Hilden, Deutschland
HotStarTaq Puffer (10x)	Qiagen	Hilden, Deutschland
DMSO	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	Qiagen	Hilden, Deutschland
dNTPs (25mM je Nukleotid)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Exonuklease I (20U/μL)	NEB	Frankfurt a. M., Deutschland
Glycerin zur Analyse (87%)	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
Roti®-Stock TE-Puffer (100x)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland

Fortsetzung von Tabelle 3.1

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>
SAP, <i>shrimp alkaline phosphatase</i> (1 U/ $\mu$ L)	GE Healthcare	Freiburg, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
Ultra Pure™ Agarose	Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
100 bp DNA Leiter extended	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® 50x TAE Puffer	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
BigDye® Terminator v3.1	Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Sequenzpuffer (5x)	Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Sephadex™ G50	GE Healthcare	Freiburg, Deutschland
Hi-Di™ Formamid	Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
MIRU-VNTR Triplex PCR-Kit	Genoscreen	Lille, Frankreich
MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plates	Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Multiscreen®-HV Filtrationsplatte (0,45 $\mu$ m)	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
96 well Septa	Life Technologies	Darmstadt, Deutschland

### 3.1.5 MATERIAL FÜR DIE GENOMSEQUENZIERUNG

**Tabelle 3.2: Material für die Genomsequenzierung auf einem MiSeq-Genomsequenzierer (Illumina)**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>
Nextera™ (XT) Sample Preparation Kit	Illumina	San Diego, USA
Nextera™ Index Kit (24 indices)	Illumina	San Diego, USA
Quant-it™ DNA Assay Kit, high sensitivity	Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
High Sensivity DNA Kit	Agilent Technologies	Santa Clara, USA
MiSeq Reagent Kit v1, v2, v3	Illumina	San Diego, USA
Agencourt® AMPure® XP Kit	Beckmann Coulter	Krefeld, Deutschland
Ethanol (abs.)	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
NaOH (1M)	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
Elution-Buffer (5nM Tris/HCl, pH8,5)	Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
HCl (1M)	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
Tween® 20	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
MicroAmp® 8-Cap Strip	Life Technologies	Darmstadt, Deutschland

### 3.1.6 MATERIAL FÜR DIE KULTIVIERUNG VON MTBK-ISOLATEN

**Tabelle 3.3: Material für die Kultivierung von MTBK-Stämmen in Flüssigmedium**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>
Middelbrook 7H9 Medium	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
Middlebrook 7H10 Agar	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
Glycerin	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
Tween® 80	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
OADC	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
Trypton	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
BBL BHI™ broth	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
Blutagar	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
Karbofuchsinlösung	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
Ethanol (abs.)	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
HCl (1M)	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
Methylenblau-Lösung	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
Objektträger	Langenbrinck	Emmendingen, Deutschland
Zellkulturröhrchen	TPP	Trasadingen, Schweiz
15 mL Falkonröhrchen	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Square bottle 25 mL	Nalgene	Rochester, USA
Corning® 2L Rollerflaschen	Omnilab	Hamburg, Deutschland

### 3.1.7 GERÄTE

**Tabelle 3.4: In dieser Arbeit verwendete Geräte**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>
MiSeq	Illumina	San Diego, USA
3130xl Genetic Analyzer	Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
3500xl Genetic Analyzer	Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
C1000 Touch Thermal Cycler	Bio-Rad	München, Deutschland
T100 Thermal Cycler	Bio-Rad	München, Deutschland
Flex Cycler	Analytik Jena	Jena, Deutschland
Universal 32R Zentrifuge	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen, Deutschland
Gel iX Imager	Intas	Göttingen, Deutschland
Qubit®	Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies	Santa Clara, USA
ELISA Reader Sunrise	Tecan	Crailsheim, Deutschland
Fotoflex Photometer	WTW	Weilheim, Deutschland
NanoPhotometer® P330	Implen	München, Deutschland

### 3.1.8 Software

**Tabelle 3.5: In dieser Arbeit verwendete Software**

<b>Material</b>	<b>Hersteller / Referenz</b>	<b>Standort</b>
Seqscape® v3.7	Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Genemapper v4.1	Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
BioNumerics v6.7	AppliedMaths	Austin, USA
MetaPiga v3.1	[101]	
Figtree v1.4	[102]	
Geneious v6.7	Biomatters	Auckland, Neuseeland
MrBayes v3.2.2	[103]	
BEAUti	[104]	
BEAST v1.7	[104]	
Tracer v1.4.1	[105]	
KaKs_Calculator v1.2	[106]	
MLVA Compare v1.03	Ridom	Münster, Deutschland
Mauve v2.3.1	[107]	
Vardetect v2.0	[108]	
Prism v5	GraphPad	La Jolla, USA

### 3.1.9 HERSTELLUNG GEBRAUCHSFERTIGER PUFFER UND LÖSUNGEN

#### EXONUKLEASE I VERDÜNNUNG (1 U/ $\mu$ L)

5  $\mu$ L Exonuklease I (20 U/ $\mu$ L) wurden in 85  $\mu$ L TE-Puffer (pH7,5) und 10  $\mu$ L Glycerin verdünnt.

#### TRIS-HCL VERDÜNNUNG (10 MM)

5 mL Tris-Lösung (0,1 M) wurden in 45 mL H<sub>2</sub>O (DEPC behandelt) verdünnt, mit 50  $\mu$ L Tween® 20 versetzt und mit HCl (1M) auf pH 8,5 eingestellt.

#### MIDDLEBROOK 7H9 (1L)

4,7g Middlebrook 7H9 Medium wurden in 897,5 mL Aqua dest. gelöst, anschließend wurden 2 mL Glycerin und 500  $\mu$ L Tween® 80 hinzugegeben und die Lösung autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden 100 mL OADC hinzugefügt.

#### MIDDLEBROOK 7H10 (1L)

19 g Middlebrook 7H10 Medium wurden in 895 mL Aqua dest gelöst, 5 mL Glycerin hinzugegeben und die Lösung autoklaviert. Sobald die Lösung auf etwa 45° C abgekühlt war, wurden 100 mL OADC hinzugegeben und etwa 20 mL Agar in Petrischalen gegossen.

#### BHI-MEDIUM (1L)

38g BBL™ BHI Medium wurden in 1 L Aqua dest. gelöst und autoklaviert.

#### LB-MEDIUM (1L)

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl wurden in 1 L Aqua dest. gelöst und autoklaviert.

#### 10% METHYLENBLAU-LÖSUNG(25 ML)

2,5 mL Methylenblau-Lösung wurden in 22,5 mL Aqua dest. verdünnt und anschließend filtriert.

#### 70% ETHANOL / 0,5% HCL LÖSUNG

700 mL Ethanol (abs.) und 5 mL HCl (konz.) wurden mit 295 ml Aqua dest. verdünnt.

## 3.2 METHODEN

### 3.2.1 PCR-PROTOKOLL

Die PCR-Analysen in dieser Arbeit basierten auf folgendem Protokoll: 95°C für 5 min zur Aktivierung der HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland), 30 Zyklen (35 Zyklen bei Multiplex-PCRs) a 30 s bei 95° C (Denaturierung), 30 s bei X° C (Primerhybridisierungstemperatur Ta, siehe Anhang 4), X s bei 72° C (Elongationszeit, siehe Anhang 4). Anschließend wurde der Ansatz für weitere 15 min bei 72° C inkubiert zur Vervollständigung der Syntheseprodukte. Abweichende Parameter sind im Anhang 4 vermerkt.

In einem 25 µL Ansatz wurden 15,325 µL H<sub>2</sub>O (DEPC behandelt) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 2,5 µL 10x HotStarTaq Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland), 1,25 µL DMSO (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland), je 1,25 µL Primer (10 µM), 0,75 µL MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (Qiagen, Hilden, Deutschland), 0,5 µL dNTPs (2,5 mM je Nukleotid) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,125 µL HotStarTaq Plus DNA Polymerase (5 U/µL) und 2 µL DNA (ca. 10 pg) verwendet.

### 3.2.2 MYCOBACTERIAL INTERSPERSED REPETITIVE UNITS – VARIABLE NUMBER TANDEM REPEATS- (MIRU-VNTR-) ANALYSE UND IDENTIFIKATION KLONALER KOMPLEXE

Die *mycobacterial interspersed repetitive units – variable number tandem repeats-* (MIRU-VNTR-) Analyse (24 loci) in dieser Arbeit basiert auf der Methode von Supply *et al.* [45]. Zur Amplifikation der 24 MIRU-VNTR-Loci wurde das Triplex PCR-Kit von Genoscreen (Lille, Frankreich) nach Herstellerangaben verwendet. Die automatisierte Größenanalyse der fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte erfolgte auf einem DNA-Sequencer (3130xl oder 3500xl Genetic Analyzer) (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) und für die Auswertung der Rohdaten wurde die Software Genmapper® v4.1 (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die MIRU-VNTR-Daten (24 Loci) wurden genutzt, um mit Hilfe einer öffentlichen Referenzkollektion auf der Homepage [miru-vntrplus.org](http://miru-vntrplus.org), eine Stammbaum-gestützte Klassifizierung der Genotypen vorzunehmen und jedem Isolat einen *multiple loci VNTR analysis* (MLVA) 15-9 Typ zuzuweisen [109].

Zur Identifikation von klonalen Komplexen, basierend auf den MIRU-VNTR-Daten (24 Loci), wurde der MST-Algorithmus der Software BioNumerics v6.7 (Applied Maths, Austin, USA) angewandt. Die Berechnung umfasste ein *Permutations-resampling* (n=1.000), mit der Priorisierung auf Einzel- und Doppellokusvarianten. Ausgegeben wurde der MST mit dem besten *Resampling-support*. Der in dieser Arbeit gezeigte MST wurde mit der Software MLVA Compare v1.03 (Ridom, Münster,

Deutschland) berechnet und zeigte eine identische Topologie. Die Verzweigungslängen sind hier jedoch nicht proportional, um die Darstellung von klonalen Komplexen zu verbessern.

Ein klonaler Komplex umfasste jeweils einen parentalen Knotenpunkt (MLVA 15-9 Cluster mit identischen MIRU-VNTR-Daten (24 Loci) und alle assoziierten Varianten. Auf Grund der hohen Diversität von MLVA 15-9 Typen von ancestralen Beijing-Stämmen wurde der klonale Komplex 7 mit Hilfe der PCR-Analyse der NTF-Region und der RD181-Region bestätigt. Beijing-Isolate des klonalen Komplexes 7 wurden definiert durch die Abwesenheit einer IS6110 Insertion in der NTF-Region und der Anwesenheit der RD181-Region.

### 3.2.3 KAPILLARSEQUENZIERUNG NACH SANGER

Einzelne Gene oder Sequenzabschnitte wurden zunächst mit einer PCR amplifiziert (verwendete Primer und PCR-Parameter siehe Anhang 4). Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel überprüft und vorhandene Primer und Nukleotide durch Inkubation mit Exonuklease I (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) und SAP (*shrimp alkaline phosphatase*) (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) entfernt.

Hierfür wurden 5 µL PCR-Produkt mit 1 µL Exonuklease I (1 U/µL) und 1 µL SAP (1U/µL) für 30 min bei 37° C in einem Thermocycler inkubiert. Anschließend wurden die beiden Enzyme durch Inkubation für 15 min bei 80° C inaktiviert.

1 µL dieses Ansatzes diente als Template für die Sequenzreaktion. Hierfür wurde das BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Die Sequenzreaktion erfolgte nach folgendem Protokoll in einem Thermocycler: 25 Zyklen a 15s bei 96° C (Denaturierung) und 90s bei 60° C (Primeranlagerung und Elongation).

Die Sequenzreaktion wurde mittels Gelfiltration mit Sephadex G50 (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) aufgereinigt. Hierzu wurde die entsprechende Menge Sephadex G50 in einer Dosierplatte abgemessen und in eine Multiscreen®-HV Filtrationsplatte (0,45µm) (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) überführt. Nach Zugabe von 300 µL H<sub>2</sub>O (DEPC-behandelt) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) quollte die Matrix ca. 1h bei RT. Überschüssiges Wasser wurde für 5min bei 920 rcf abzentrifugiert, anschließend wurde die gesamte Sequenzreaktion auf die Matrix aufgetragen und erneut für 5 min bei 920 rcf zentrifugiert und das Filtrat in einer Mikrotiterplatte aufgefangen.

4 µL des Filtrats wurden zusammen mit 15 µL Hi-Di™ Formamid (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) in MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plates (Life Technologies GmbH,

Darmstadt, Deutschland) überführt. Die Sequenzierung erfolgte auf einem Kapillarsequencer (3130xl oder 3500xl, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland). Die Rohdaten wurden mit der Software Seqscape® v3.7 (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) analysiert.

### 3.2.4 NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)

In dieser Arbeit verwendete Genomsequenzen (n=233) wurden von GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) auf einem Illumina HiSeq 1000 sowie in Kooperation mit Dr. Daniela Indenbirken und Prof. Adam Grundhoff (HPI, Hamburg, Deutschland) auf einem Illumina HiSeq 2500 und intern in Zusammenarbeit mit Julia Zallet und Dr. Thomas Kohl (FZB, Borstel, Deutschland) auf einem Illumina MiSeq generiert. Die Schritte (1) library Erstellung, (2) Qualitätskontrolle, (3) Datenverarbeitung werden im Folgenden beschrieben.

#### 3.2.4.1 ERSTELLUNG EINER DNA-BIBLIOTHEK (LIBRARY) MIT DEM NEXTERA(XT)-KIT

DNA-Bibliotheken von klinischen MTBK-Isolaten wurden mit dem Nextera(XT)-Kit von Illumina (San Diego, USA) nach Herstellerangaben präpariert. Genomische DNA (100 - 1000 ng/ $\mu$ L,  $OD_{260/280} = 1,4 - 2,0$ ) wurde zunächst auf einem 0,8%igem (w/v) Agarosegel auf Degradation überprüft und auf 2 ng/ $\mu$ L mit Elution-Buffer (Macherey-Nagel) verdünnt. Die Konzentrationsbestimmung der verdünnten DNA wurde mit dem Quant-it™ PicoGreen® und dem Quant-it™ DNA Assay Kit, high sensitivity von Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Probe wurde anschließend nochmals 1:10 mit Elution-Buffer verdünnt. 5  $\mu$ L dieser Verdünnung wurden in dem Kit Nextera(XT) von Illumina zur *Library*-Erstellung eingesetzt. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben und gliedert sich in folgende Arbeitsschritte: (1) Fragmentierung und Kennzeichnung der genomischen DNA („*tagmentation*“) und gleichzeitiges Einbringen der Adapter für die PCR, (2) Amplifikation (12 Zyklen) und Addition weiterer Adaptern und Erkennungssequenzen, (3) Vereinigung mehrere Proben und Vorbereitung (Denaturierung und Verdünnung) für die Beladung der Durchflusszelle (*flowcell*). Die durchschnittliche Länge der DNA Fragmente wurde mit dem 2100 Bioanalyzer und dem High Sensivity DNA Kit von Agilent Technologies (Santa Clara, USA) nach Herstellerangaben bestimmt.

Für die Genomsequenzierung in Borstel wurden die DNA Bibliotheken nach Herstellerangaben in die Kartuschen des MiSeq Reagent Kit v1 (respektive v2, bzw. v3) von Illumina (San Diego, USA) geladen. Ein MiSeq-Lauf wurde mit folgenden Parametern gestartet: (1) Sample Preparation Kit:

Nextera(XT), (2) paired end reads, (3) Cycle Read 1 und 2: 151 (bei v1 Chemie), 251 (bei v2 Chemie), bzw. 301 (bei v3 Chemie), (4) Index Reads: 2, (5) Use Adapter trimming.

Nach Beendigung eines Laufes werden die Sequenzdaten in FastQ-Dateien ausgegeben, welche neben der Sequenz auch Qualitätsinformation, angelehnt an die in der Sequenzierung nach Sanger etablierten PhredScores [110] (z.B. Q10, Q20, Q30) enthalten. Diese spiegeln die Wahrscheinlichkeit einer inkorrekt benannten Base wieder (z. B. 10%, 1%, 0,1%).

### 3.2.4.2 QUALITÄTSKONTROLLE UND AUFBEREITUNG DER DATEN

Qualitätskontrolle und Anordnung der Sequenzen entlang des Referenzgenoms H37Rv (GenBank ID: NC\_000962.2) wurden von Dr. Thomas Kohl (FZB, Borstel, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurden die Sequenzen zunächst basierend auf den PhredScores (Q30 Werte) gekürzt und anschließend mit dem Programm Saruman [111] und dem darin implementierten exakten *Mapping*-Algorithmus auf dem Referenzgenom angeordnet (*reference mapping*).

Mit individuell angepassten Perl Scripten (durchgeführt von Dr. Thomas Kohl, FZB, Borstel) wurden aus dem resultierenden genomweiten *Mapping* alle Unterschiede (SNPs, Insertionen, Deletionen und nicht abgedeckte Bereiche) zur Referenz H37Rv extrahiert. Dabei wurden folgende Kriterien berücksichtigt: (1) Die Position muss mit mindestens 10 Sequenzen (*reads*) abgedeckt sein (10x Abdeckung), (2) die detektierte Variante muss von mindestens 75% der generierten Sequenzen (*reads*) an dieser Position bestätigt sein (75% Variantenfrequenz).

Anschließend wurden diese extrahierten Daten für die weitere Analyse in einer Tabelle mit allen untersuchten Isolaten kombiniert. In dieser sind alle variablen Positionen aufgeführt, die in mindestens einem der verglichenen Isolate einen Unterschied zur Referenz H37Rv zeigten. Für jede enthaltene Position wird die Baseninformation mittels der gespeicherten genomweiten *Mappings* komplettiert. Für Isolate mit einer Wildtypbase (identisch zu H37Rv) oder bei nicht erfüllen der Grenzwerte (10x Abdeckung und 75% Variantenfrequenz) wurde die mehrheitlich (> 50%) detektierte Base erneut aus dem *Reference-mapping* erschlossen und zum Vergleich in der kombinierten Liste mit angegeben.

### 3.2.4.3 DATENVERARBEITUNG

Für jeden Datensatz wurde wie unter Abschnitt 3.2.4.2 beschrieben eine kombinierte Liste angefertigt mit allen Polymorphismen einzelner Isolate im Vergleich zum Referenz Genom H37Rv (GenBank ID: NC\_000962.2). Diese wurde wie folgt individuell für jeden Datensatz verarbeitet.

#### GLOBALE BEIJING DIVERSITÄT UND W148-OUTBREAK

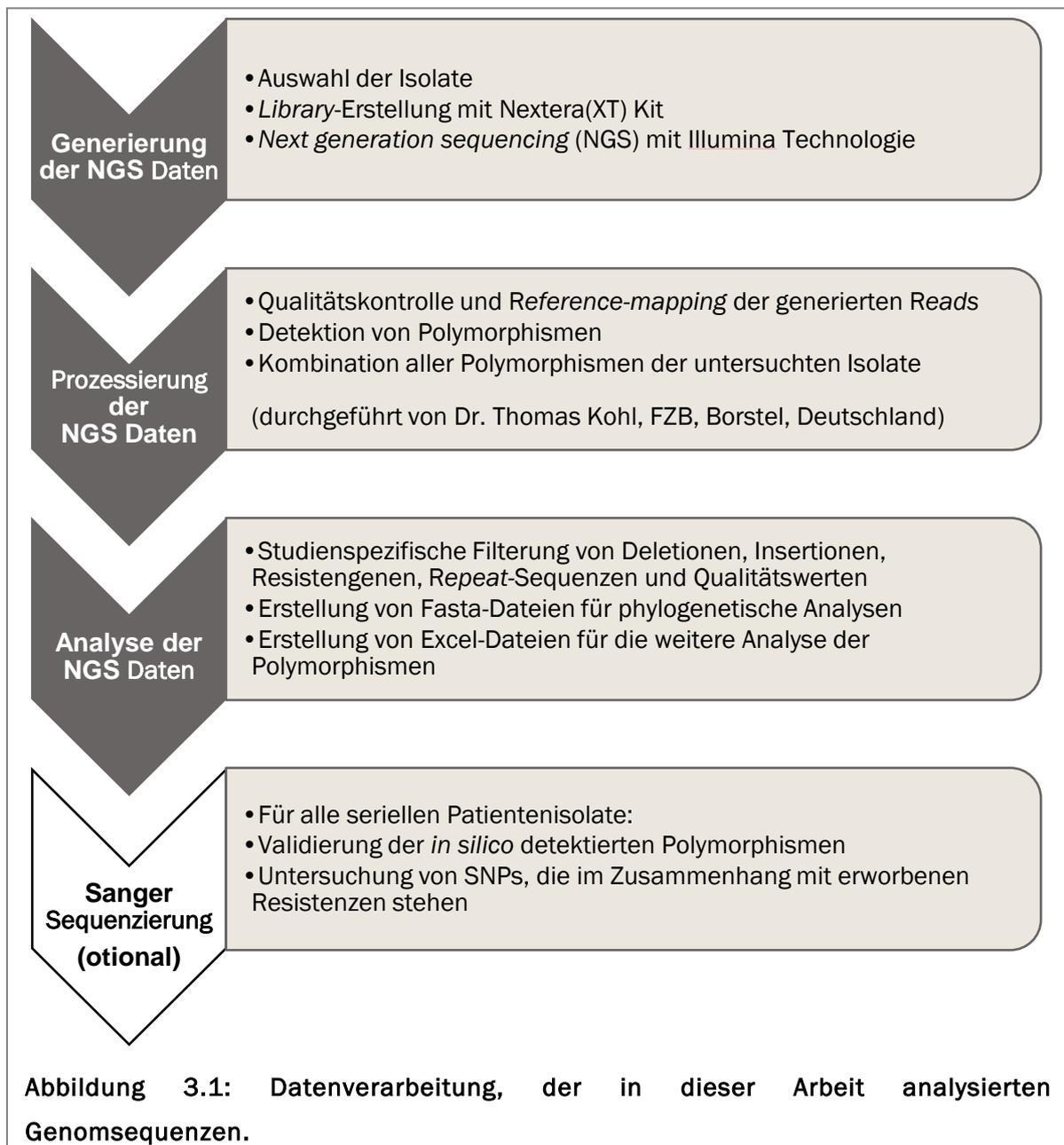
Für die phylogenetische Rekonstruktion der Stämme aus dem Datensatz „Globale Beijing Diversität“ (n=110) und „W148-Outbreak“ (n=112) wurden zunächst Gene, welche in Zusammenhang mit Resistenzmechanismen stehen, und repetitive Elemente ausgeschlossen. Resistenz-vermittelnde SNPs sind phylogenetisch nicht informativ und *Repeat*-Sequenzen können nicht eindeutig auf dem Referenzgenom aligniert werden, was zu falsch detektierten Varianten führt. Des Weiteren wurden mit Geneious v6.7 [112] (Auckland, Neuseeland) Positionen im *Reference-mapping* (siehe Abschnitt 3.2.4.2) kontrolliert, die in einem Abstand von 12 bp mehr als einen SNP aufwiesen. Dies kann einerseits ein Indiz für ein Rekombinationsereignis sein, in den meisten Fällen sind diese SNPs jedoch Randeffekte von Deletionen und Insertionen und kein neuer Polymorphismus. Im letzteren Fall wurde die Position ausgeschlossen. In beiden Datensätzen („Globale Beijing Diversität“ und „W148-Outbreak“) mussten alle Positionen in 100% der analysierten Isolate mit mindestens 10 Sequenzen (*reads*) abgedeckt sein und mindestens 75% der Sequenzen mussten die detektierte Variante im Vergleich zum Referenzgenom H37Rv aufweisen. Die genannten Qualitätskriterien basieren auf den Erfahrungen jüngster NGS-Studien von Timothy Walker *et al.* [113] und Andreas Roetzer *et al.* [114] und dienen der Minimierung von falsch positiv detektierten Varianten.

Für weitere Sequenzanalysen zur Detektion von homoplastischen und konvergenten SNPs wurde der Datensatz erweitert. Hierbei wurden auch Positionen untersucht, wenn mindestens 90% der analysierten Isolate die oben beschriebenen Qualitätskriterien erfüllten. Damit wurden auch Positionen mit einbezogen, die in einzelnen Isolaten die Grenzwerte für Abdeckung und Variantenfrequenz nicht erfüllten.

Des Weiteren wurden jeweils eine Fasta-Datei und ein Excel-Datenblatt mit allen Polymorphismen der untersuchten Isolate erstellt. Die Fasta-Dateien waren Grundlage für nachfolgende phylogenetische Analysen (siehe Abschnitt 3.2.5). Mit Hilfe der Excel-Dateien konnten einzelne Positionen der Fasta-Sequenzen zurück in den genetischen Kontext (Annotation, Genomposition, Aminosäurenaustausch) gesetzt werden.

## MIKROEVOLUTION SERIELLER PATIENTENISOLATE

Für die Sequenzanalyse der seriellen Patientenisolate wurden drei Isolate von Patient A und jeweils vier Isolate von Patient B und C auf neu erworbene Mutationen im Verlauf einer MDR-TB-Therapie untersucht. Filterkriterien waren hierbei: Eine Variante musste mit mindestens 3-10 Sequenzen (abhängig von der mittleren genomweiten Abdeckung einzelner Isolate) an der untersuchten Position abgedeckt sein und die Variantenfrequenz musste in mindestens 90% betragen. In einem von drei (bei Patient A) und einem von vier (bei Patient B und C) Isolaten wurde die Unterschreitung dieser Grenzwerte toleriert. Ziel dieser Filterung war die Detektion, der im Patienten dominierenden Subpopulation an unterschiedlichen Zeitpunkten, ohne Positionen auszuschließen, die im Verlauf der Therapie mutieren und so zu heterogenen SNPs mit einer niedrigen Variantenfrequenz führen.



Darüber hinaus wurden alle so identifizierten Varianten und Gene welche in Verbindung mit den erworbenen Resistenzen stehen per Sanger-Sequenzierung (siehe Abschnitt. 3.2.3) validiert und in allen verfügbaren Patientenisolaten überprüft (Patient A = 11, Patient B = 15, Patient C = 4). So konnte detailliert die Mikroevolution dominierender Subpopulation im Patienten über den Zeitraum der MDR-TB-Therapie nachvollzogen werden.

### 3.2.5 PHYLOGENETISCHE REKONSTRUKTION - MAXIMUM-LIKELIHOOD (ML)

Zur Rekonstruktion der Phylogenie (basierend auf NGS-Daten) wurde die Software MetaPiga v3.1 [101] verwendet. Auf der Basis von konkatenierten Sequenzdaten wurde mit dem implementierten *Likelihood-Ratio-Test* (MODELTEST [115]) das passendste Substitutionsmodell für jeden Datensatz erschlossen. Um die Rechenleistung zu reduzieren wurde die implementierte Heuristic mit vorgegebenen Stoppparametern verwendet (*metaPopulation genetic algorithm* – metaGA [116]). 200 Rechenschritte ohne signifikante Wahrscheinlichkeitssteigerung (0,01%), ein mittlerer relativer Fehler von 10 konsekutiven Konsensus Bäumen unter 5% oder maximal 10.000 Replikate beendeten die Berechnung. Rekombinationsereignisse wurden ausgeschlossen. Die ML-Stammbaum (Konsensus Baum) auf Basis des Datensatzes „Globale Beijing Diversität“ wurde mit der *Midpoint-rooting*-Option des Programms Figtree v1.4 [102] ausgerichtet.

Für den Datensatz „Globale Beijing Diversität“ wurde das GTR (general time reversible) Substitutionsmodell mit folgenden Parametern verwendet: alpha = 0,95, beta = 2,95, gamma = 0,26, delta = 0,47, epsilon = 2,88. Nach 121 Replikaten waren die Stoppkriterien erfüllt.

Für den Datensatz „W148-Outbreak“ wurde das GTR (general time reversible) Substitutionsmodell mit folgenden Parametern verwendet: alpha = 0,93, beta = 2,40, gamma = 0,21, delta = 0,70, epsilon = 2,39. Die Berechnung umfasste 110 Replikate.

### 3.2.7 BOXPLOT ZUR VISUALISIERUNG DER GENETISCHEN DISTANZEN EINZELNER BEIJING-SUBGRUPPEN

Um einen Überblick über die Diversität innerhalb der identifizierten Beijing-Subgruppen zu bekommen wurde die Anzahl von Unterschieden (SNPs) zwischen paarweise angeordneten Isolaten in einem Boxplot mit der Software Prism (GraphPad, La Jolla, USA) dargestellt. Die

Beijing-Subgruppen wurden aus der phylogenetischen Rekonstruktion mit Hilfe des ML-Algorithmus auf Basis von konkatenierten Sequenzdaten erschlossen (vergleiche 3.2.5).

Die diesem Plot zu Grunde liegenden Distanzen (SNPs) basieren auf einer Distanzmatrix, die mit dem Programm MrBayes v3.2.2 [103] auf Basis von konkatenierten Sequenzdaten generiert wurde.

### 3.2.8 BAYESIAN-SKYLINE-PLOT

In Kooperation mit Prof. Dr. Thierry Wirth (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, Frankreich) wurde die Populationsdynamik von Beijing Stämmen in einem Bayesian Skyline Plot [117] über die Zeit berechnet, auf Basis von konkatenierte Sequenzdaten. Die Parameter für dieses Modell wurden von Prof. Dr. Thierry Wirth (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe des Programms BEAUti wurden Konfigurationsdateien mit folgenden Parametern erstellt. Die Substitutionsrate wurde auf den festen Wert  $10^{-7}$  Substitutionen pro Position pro Jahr gesetzt. Diese Mutationsrate basiert auf der Analyse eines Tuberkuloseausbruchs, verbunden mit der Ausbreitung eines Klons über 15 Jahre, von Andreas Roetzer *et al.* [114]. Ein UPGMA-Baum diente als Startbaum für die Analyse. Die Kettenlänge betrug 100.000.000 mit einer burn-in Länge von 10%.

Die Konfigurationsdatei wurde mit dem Programm BEAST v1.7 [104] analysiert. Die durch den in BEAST v1.7 implementierten Markov Chain Monte Carlo (MCMC) Algorithmus [118] produzierten Daten wurden mit dem Programm Tracer v1.4.1 [105] visualisiert.

### 3.2.9 dN/dS-ANALYSE

Eine dN/dS-Analyse kann Aufschluss über die Richtung der natürlichen Selektion auf Proteine oder Proteinfamilien geben und wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{dN}{dS} = \frac{(\text{Summe nicht synonyme Mutationen} : \text{Summe nicht synonyme Positionen})}{(\text{Summe synonyme Mutationen} : \text{Summe synonyme Positionen})}$$

Messung A: Auf Grund der hohen Sequenzähnlichkeit auf Proteinebene (99,9% [32], [38]) zwischen MTBK-Isolaten und Stämmen des hier untersuchten Beijing-Genotyps im Speziellen,

wurden konkatenierte Gensequenzen ausgesuchter Proteinfamilien, -gruppen untersucht (siehe unten). Es wurden jeweils die konkatenierten Gensequenzen des hypothetischen Vorfahren (MRCA) der einzelnen im ML-Stammbaum identifizierten Beijing-Subgruppen paarweise mit dem hypothetischen MRCA des Beijing-Genotyps verglichen. Das dN/dS Verhältnis wurde mit dem Programm KaKs\_Calculator v1.2 [106] analysiert.

Messung B: Auf Grund des Fehlens von nicht synonymen oder synonymen Mutation konnte nicht für alle Vergleichspaare ein dN/dS Verhältnis berechnet werden. Deswegen wurde zusätzlich das Verhältnis der Summe von einzigartigen nicht-synonymen Mutationen zu einzigartigen synonymen Mutationen im gesamten Datensatz angegeben.

Die Auswahl der *mce*-Genfamilie basierte auf Casali und Riley 2007 [119]. Alle als Lipoproteine annotierten Gene im H37Rv-Genom (GenBank ID: NC\_000962.2, [120]) wurden ausgewählt. Über die Textsuche „polymerase“ auf der Webseite <http://tuberculist.epfl.ch/index.html> [120] wurden alle Gene ausgewählt die für Polymerasen, ribosomalen Proteinen und Sigmafaktoren codieren. Die T-Zell Antigene stammen aus der Studie von Comas *et al.* 2012 [76]. 47 im H37Rv-Genom (GenBank ID: NC\_000962.2, [120]) annotierte *vapBC*-Gene wurden für die Analyse verwendet. Aus allen essentiellen und nicht essentiellen Genen wurden mit der Excel-Funktion =RAND() eine zufällige Zahl für jedes Gen vergeben. Die Liste wurde nach Größe sortiert und die Gene mit den 300 höchsten Zufallszahlen ausgewählt. Die verwendeten Gene sind im Anhang 16-22 aufgelistet.

### 3.2.10 IDENTIFIKATION VON KONVERGENTEN MUTATIONEN UND HOMOPLASIE

Konvergenten Mutationen sind Punktmutationen (SNPs) mit unterschiedlichen Varianten an der gleichen Position. Homoplastische SNPs hingegen sind identische Mutationen in unterschiedlichen monophyletischen Gruppen. Beide können ein starker Indikator für eine vorteilhafte (selektierte) Variante des betroffenen Proteins sein, z. B. Resistenz-vermittelnde Mutationen.

Für die Analyse des Datensatzes „Globale Beijing Diversität“ wurden identifizierten monophyletische Beijing-Subgruppen auf einen erweiterten Datensatz der kombinierten Genomsequenzen von 110 Beijing-Stämmen (vergleiche Abschnitt 3.2.4.3) abgebildet und mit der Referenzbase im H37Rv-Genom verglichen. Der Datensatz wurden manuell in einer Excel-Tabelle unter zwei Prioritäten untersucht.

(1) Unterschiedliche SNPs an der gleichen Position in mindestens zwei Isolaten, (2) identische SNPs an der gleichen Position in mindestens zwei Isolaten unterschiedlicher Beijing -Subgruppen. Jede so identifizierte Mutation musste mit mindestens 10 Sequenzen an der jeweiligen Position

abgedeckt sein. Bekannte Resistenz-vermittelnde Mutationen in proteincodierenden Sequenzen wurden separat analysiert. Bekannte kompensatorische Mutationen, z. B. Mutationen in Promotorregionen, die zu einer erhöhten Expression eines Antibiotikazielproteins führen, sind mit aufgeführt und dienen neben der Analyse der Resistenzgene als *proof-of-principle*.

### 3.2.11 VISUALISIERUNG DER GLOBALEN VERTEILUNG VON BEIJING-STÄMMEN

Um die globale Verteilung, der mit Hilfe des MST-Algorithmus bestimmten klonalen Komplexe des Beijing-Genotyps (vergleiche Abschnitt 3.2.2) zu visualisieren, wurde jedem der 4.987 klinischen Isolate ein Herkunftsland zugewiesen.

Isolate aus einem TB-Niedriginzidenzland (weniger als 20 Neuerkrankungen pro Jahr pro 100.000 Einwohner [21]) wurden zunächst dem Geburtsland des Patienten zugeordnet. War diese Information nicht gegeben oder für Isolate aus Studienregionen mit 20 und mehr TB-Neuerkrankungen pro Jahr pro 100.000 Einwohner, wurde das Isolat der jeweiligen Studienregion zugeordnet. Mit der Software MLVA Compare v1.03 (Ridom, Münster, Deutschland) wurde allen Isolaten Koordinaten zugewiesen. Anschließend wurden die klonalen Komplexe basierend auf MIRU-VNTR-Daten (24 Loci) farblich codiert und die globale Verteilung (länderspezifisch) auf der Weltkarte abgebildet.

### 3.2.12 STUDIENAUSWAHL ZUR ANALYSE EINER MÖGLICHEN ASSOZIATION ZWISCHEN RESISTENZ UND IDENTIFIZIERTEN KLONALEN KOMPLEXEN DES BEIJING-GENOTYPS

Isolate mit verfügbaren Resistenzergebnissen für die Antibiotika INH und RMP aus dem MIRU-VNTR-Datensatz „Globale Beijing Diversität“ (n=1054/4987, 21,2%) wurden in Kategorien eingeteilt: MDR (Resistenz gegen INH und RMP), nicht MDR (mindesten eine Resistenz aber kein MDR-TB-Fall), sensibel (vollständig sensibel gegen alle getesteten Antibiotika). Die Daten wurden wiederum den identifizierten klonalen Komplexen zu geordnet. Regionale Studien mit ausschließlich resistenten Isolaten (MDR-TB-Kohorten) wurden in dieser Analyse ausgeschlossen. Eine Übersicht der einbezogenen Studien ist in Tabelle 3.6 und Anhang 2 aufgelistet.

**Tabelle 3.6: Einbezogenen Studien zur Analyse einer möglichen Assoziation zwischen Antibiotikaresistenz und identifizierten klonalen Beijing-Komplexen.**

Studien- Nummer	Studie durchgeführt in:	Jahr	Anzahl der Isolate	sensibel	nicht MDR	MDR
3	China	2005	68	21	23	24
8	Dänemark	1993-2011	62	52	7	3
9	Estland	2008-2009	67	40	27	0
10	Georgien	2007	43	26	9	8
11	Deutschland	2001-2009	60	46	14	0
12	Südafrika	keine Daten	42	22	6	14
15	Kiribati	2010	35	35	0	0
16	Korea	keine Daten	186	76	48	62
17	Litauen	1999-2011	156	11	19	126
18	Abchasien	2003-2005	80	13	21	46
21	Moldawien	2008-2010	35	21	2	12
26	Schweden	2010	12	8	4	0
30	Swasiland	2007-2009	82	74	2	6
32	Turkmenistan	2001-2002	70	20	31	19
37	Peru	2010-2011	56	41	11	4
	Summe		<b>1054</b>	<b>506</b>	<b>224</b>	<b>324</b>

### 3.2.13 ANZUCHT KLINISCHER MTBK-ISOLATE

#### 3.2.13.1 KULTIVIERUNG VON MTBK-STÄMMEN IN FLÜSSIGMEDIUM (7H9)

Basierend auf den mit Hilfe des MST-Algorithmus identifizierten klonalen Beijing-Komplexen (vergleiche Abschnitt 3.2.2) wurden 23 klinische Isolate für die Anzucht im S3-Sicherheitslabor ausgewählt (siehe Tabelle 3.7). Die Isolate stammen aus dem Nationalen Referenzzentrum für Mykobakterien, Borstel, Deutschland und dem International Reference Laboratory of Mycobacteriology, Kopenhagen, Dänemark und wurden für alle Erstrangantibiotika als sensibel eingestuft. Ein gefrorenes Aliquot der original Patientenkultur wurde zunächst in den Referenzlaboren auf Löwenstein-Jensen Medium überimpft.

Für die Subkultivierung wurde zunächst eine homogene Suspension mit 7H9 Medium mit 10% (v/v) OADC (*Oleic acid, bovine albumin, dextrose, catalase*) (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) erstellt. Hierfür wurden mit einer Impföse Kolonien vom Löwenstein-Jensen-Medium abgenommen und in einem Tropfen an der Wand eines 15 mL Falkonröhrchens mit 10mL

7H9/10% (v/v) OADC zerrieben. Sobald eine homogene Suspension entstanden war, wurde der Tropfen in das restliche Medium gezogen. Die so angeimpfte Vorkultur wurde in einer 25 mL Square bottle (Nalgene, Rochester, USA) bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 bei 37 ° C inkubiert. Die optische Dichte (OD<sub>600</sub>) der Kultur wurde in einem ELISA Reader Sunrise (Tecan, Crailsheim, Deutschland) alle zwei Tage gemessen. Eine Hauptkultur wurde mit 1 mL Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,9 (mittlere bis späte logarithmische Wachstumsphase) in einer 2L Rollerflaschen mit 20mL 7H9/10% (v/v) OADC angezogen und anschließend zu je 900 µL aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 3.2.13.2 BESTIMMUNG DER LEBENDKEIMZAHL VON MTBK-STÄMMEN

Drei bis vier Wochen nach der Aliquotierung der Hauptkultur wurden die kolonieformenden Einheiten (*colonie forming units*, CFUs) der gefrorenen Aliquots bestimmt. Hierzu wurde das Aliquot bei RT aufgetaut und fünfmal mit einer 26G Kanüle resuspendiert. 100 µL der homogenen Suspension wurden sukzessive 1:10 in einem Volumen von 1 mL in autoklaviertem Aqua dest. mit 0,05% (v/v) Tween® 80 (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) bis zu einer einem Faktor von 10<sup>-7</sup> verdünnt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 100 µL auf 7H10-Agar ausplattiert und in Folie verpackt bei 37 °C für 3-4 Wochen inkubiert.

Die kolonieformenden Einheiten (CFU) wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{CFU}{mL} = \text{Anzahl der Kolonien} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10$$

### 3.2.13.3 STERILITÄTSKONTROLLEN VON MTBK-FLÜSSIGKULTUREN

Vorkulturen und Hauptkulturen wurden auf Kontaminationen überprüft. Dazu wurden jeweils 100 µL Bakteriensuspension in 5 mL LB (*lysogeny broth*) Medium und BHI (*brain-heart infusion*) Medium inokuliert sowie 100 µL auf Blutagar (Becton Dickinson, Darmstadt, Deutschland) plattiert. Die Sterilitätskontrollen wurden für mindestens drei Tage bei 37 ° C inkubiert.

#### *3.2.13.4 ZIEHL-NEELSEN-FÄRBUNG VON MTBK-PRÄPARATEN*

Zum Nachweis von Mykobakterien in der Hauptkultur und als weitere Kontaminationskontrolle wurde eine Ziehl-Neelsen-Färbung von jedem MTBK-Stamm angefertigt. Hierfür wurden 20 µL der Hauptkultur auf einem Objektträger ausgestrichen und 15 min getrocknet. Zum Sterilisieren und Fixieren der eingetrockneten Suspension auf dem Objektträger wurde dieser anschließend fünfmal mit der unteren Seite über eine Bunsenbrennerflamme gezogen und einmal mit der oberen Seite.

Für die Färbung wurde der Objektträger jeweils dreimal mit einer filtrierten Karbofuchsinlösung (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) bedeckt und über einer Flamme erwärmt ohne die Färbelösung zum Kochen zu bringen oder das Präparat austrocknen zu lassen. Nach einer Abkühlungsphase von 10 min wurde der Objektträger mit Aqua dest. gewaschen und das Präparat durch mehrmaliges Eintauchen des Objektträgers in einer 70% Ethanol / 0,5% HCl (v/v) Lösung entfärbt. Nach dem Waschen in Aqua dest. folgte eine Gegenfärbung in einer filtrierten 10%igen Methylenblau-Lösung (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) für 1 min, erneutes Waschen in Aqua dest. und abschließend Trocknen des Objektträgers. Mikroskopiert wurde mit Immersionsöl unter einem 100x Objektiv.

#### *3.2.13.4 BESTIMMUNG DER OPTISCHEN DICHTEN ( $OD_{594}$ ) VON MTBK-FLÜSSIGKULTUREN*

Ausgehend von der CFU-Doppelbestimmung der gefrorenen Aliquots (vergleiche Abschnitt 3.2.13.2) wurden jeweils  $10^7$  Zellen in 6 mL 7H9 / 10% (v/v) OADC Medium in 20 mL Zellkulturröhrchen (TPP, Trasadingen, Schweiz) inokuliert und täglich die optische Dichte ( $OD_{594}$ ) mit dem Fotoflex Photometer (WTW, Weilheim, Deutschland) bestimmt. Der Endzeitpunkt war 14 Tage nach Inokulation. Die optische Dichte ( $OD_{594}$ ) wurde in biologischen Triplikaten gemessen.

Tabelle 3.7: Kultivierte MTBK-Beijing-Isolate.

klonaler Komplex	Borstel-ID	OD <sub>600</sub>	CFU/mL Mittelwert
1	2280/07	0,8	8,50E+08
1	1232/02	0,724	1,95E+09
1	49/02	0,741	1,11E+09
2	R10-0225	0,734	6,40E+08
2	R04-0039	0,708	5,90E+08
3	5790/04	0,805	2,13E+09
3	7194/05	0,712	7,40E+08
3	8195/08	0,94	5,00E+08
4	6265/09	0,94	1,59E+09
4	8654/06	0,59	1,55E+09
4	1339/07	0,573	3,40E+08
4	9589/07	0,746	1,03E+09
4	4688/09	0,478	7,50E+08
4	4950/09	0,9	8,80E+08
5	178/03	0,871	1,57E+09
5	4703/09	0,673	5,00E+08
5	3454/10	0,53	1,73E+09
6	3435/06	0,601	1,67E+09
6	3936/02	0,55	1,62E+09
6	1314/02	0,83	9,10E+08
7	5331/05	0,361	1,29E+09
7	7253/02	0,425	1,38E+09
7	57/02	0,666	1,89E+09

### 3.2.14 STATISTIK

Die statistischen Berechnungen wurden mit der Software Prism v5 (GraphPad, La Jolla, USA) durchgeführt. Der jeweils verwendete Test ist im Text angegeben. Ein  $P$ -Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 GLOBALE POPULATIONSTRUKTUR VON *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* KOMPLEX- (MTBK-) ISOLATEN DES BEIJING-GENOTYPS

Bisherige Studien zur Untersuchung der globalen Diversität und Populationsstruktur von MTBK-Isolaten des Beijing-Genotyps waren auf regionale Stammsammlungen und ausgewählte Referenzstämme beschränkt [92], [121]–[123]. Die derzeit am häufigsten verwendeten Marker zur Klassifizierung von Beijing-Stämmen umfassen charakteristische IS6110 RFLP-Bandenmuster [85], fünf große Sequenzpolymorphismen (Deletion der Regionen RD207, RD105, RD181, RD150, RD142) [92] und die PCR-Analyse der NTF-Region auf Insertion von IS6110-Elementen [84]. Die Insertion von ein oder zwei IS6110-Sequenzen am 3'- oder am 3'- und 5'-Ende der NTF-Region unterscheidet typische Beijing-Stämme von atypischen Beijing-Stämmen (keine IS6110-Insertion in der NTF-Region) [85].

Um die globale Populationsstruktur weltweit zirkulierender MTBK-Stämme des Beijing-Genotyps zu erfassen, habe ich in Kooperation mit 27 Partnern, im Rahmen von 36 verschiedenen Studien, Typisierungsdaten (MIRU-VNTR-Daten, 24 Loci) von 4.987 klinischen Beijing-Isolaten aus 99 Ländern zusammen getragen (Anhang 1 und 23). Insgesamt wurden am FZB (Borstel, Deutschland) 1.081 MIRU-VNTR-Daten (24 Loci) für diese weltweite Kollektion von Beijing-Stämmen generiert. Davon stammen 411 MIRU-VNTR-Ergebnisse aus sieben Studien, an deren Genotypisierung ich im Rahmen dieser Doktorarbeit beteiligt war.

Die meisten Beijing-Isolate in dieser Kollektion stammen aus den USA (n=787, 15,8%), China (n=575, 11,5%), Vietnam (n=431, 8,6%) und Russland (n=267, 5,4%) (Anhang 23). Insgesamt umfasst die Kollektion Isolate aus 99 Ländern, ca. 75% aller klinischen Isolate stammen jedoch aus 18 Ländern, respektive ca. 90% aller Beijing-Isolate aus 32 Ländern (Anhang 23).

#### 4.1.1 KLONALE KOMPLEXE DES MTBK-BEIJING-GENOTYPS

Die hier analysierten Beijing-Stämme wurden über den charakteristischen Spoligotyp (Deletion der Spacer-Sequenzen 1-34, vergleiche Abbildung 2.6) selektiert. Mit Hilfe der stammbaumbasierten Klassifizierung von MTBK-Stämmen auf der Webseite [miru-vntrplus.org](http://miru-vntrplus.org), wurde der Beijing-Genotyp für jedes Isolat über die MIRU-VNTR-Daten bestätigt (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde jedem Isolat über den Nomenklaturserver der Webseite [miru-vntrplus.org](http://miru-vntrplus.org) ein MLVA (*multiple locus VNTR analysis*) 15-9 Code (24 Loci MIRU-VNTR-Nomenklatur) zugewiesen.

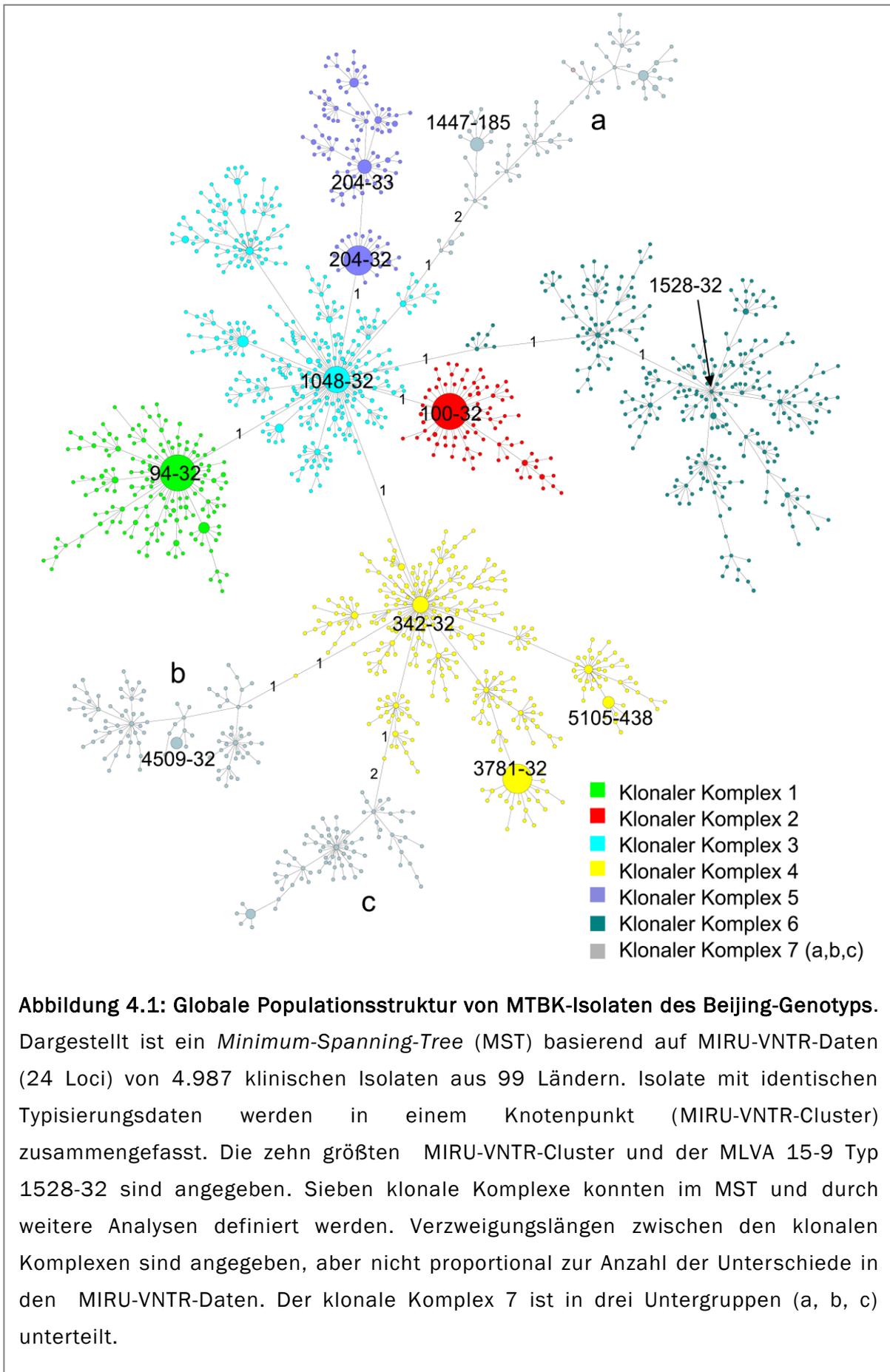
Insgesamt wurden 1.549 verschiedene MLVA 15-9 Typen identifiziert. Dabei konnten 1.108 MLVA 15-9 Typen lediglich einem einzigen Isolat zugeordnet werden. 441 MLVA 15-9 Typen repräsentierten Cluster (mindestens zwei Stämme mit identischem MIRU-VNTR-Daten) mit 2 - 505 Isolaten (Anhang 5), wobei die zwei größten MLVA 15-9 Cluster (94-32, 100-32) 16,2% (807/4987) aller analysierten Stämme umfassten (Tabelle 4.1).

**Tabelle 4.1: MTBK-Beijing MLVA 15-9 Cluster.** Gezeigt sind die zehn größten MLVA 15-9 Cluster und ihr proportionaler Anteil, der in dieser Arbeit analysierten Beijing-Stammkollektion (n=4.987).

#	MLVA 15-9 Typ	Anzahl	Anteil
1	94-32	505	10,1%
2	100-32	302	6,1%
3	204-32	180	3,6%
4	3781-32	179	3,6%
5	1048-32	158	3,2%
6	342-32	89	1,8%
7	204-33	72	1,4%
8	1447-185	69	1,4%
9	5105-438	57	1,1%
10	4509-32	57	1,1%

Zur Visualisierung der globalen Beijing-Populationsstruktur und Bestimmung größerer Subgruppen (klonale Komplexe) wurde ein *Minimum-Spanning-Tree* (MST), basierend auf den MIRU-VNTR-Daten, berechnet (Abbildung 4.1). Im MST wurden unter den zehn größten MLVA 15-9 Clustern (vergleiche Tabelle 4.1) fünf sogenannte parentale Knotenpunkte identifiziert. Diese sind mit möglichst vielen Einzel- und Doppellokus-Varianten assoziiert und somit der hypothetische Ausgangspunkt einer sich klonal ausbreitenden Bakterienpopulation [46]. Zusätzlich konnte ein weiterer parentaler Knotenpunkt (MLVA 15-9 Typ: 1528-32) identifiziert werden, welcher jedoch nur von einem Isolat repräsentiert wird. Basierend auf diesen Knotenpunkten wurden zunächst sechs klonale Komplexe definiert. Ein klonaler Komplex umfasste dabei einen der beschriebenen sechs Knotenpunkte und alle assoziierten Einzel- und Multilokus-Varianten (Abbildung 4.1). Die klonalen Komplexe 1 - 6 sind mit den folgenden MLVA 15-9 Typen assoziiert: 94-32 (klonaler Komplex 1), 100-32 (klonaler Komplex 2), 1048-32 (klonaler Komplex 3), 342-32 (klonaler Komplex 4), 204-32 (klonaler Komplex 5) und 1528-32 (klonaler Komplex 6).

Um moderne von ancestralen Beijing-Stämmen zu unterscheiden, wurde in insgesamt 337 Isolaten aus den verschiedenen klonalen Komplexen die Insertion von IS6110-Elementen in der NTF-Region per PCR überprüft (Tabelle 4.2).



Interessanter Weise wurden ancestrale Beijing-Stämme ohne IS6110-Insertion in der NTF-Region hauptsächlich im klonalen Komplex 6 und in drei separaten Gruppen/Verzweigungen, welche mit den klonalen Komplexen 3 und 4 assoziiert waren, gefunden (Tabelle 4.2). Im Folgenden wurden die drei Gruppen (a, b, c) mit ancestralen Beijing-Stämmen dem klonalen Komplex 7 zugeordnet (siehe Tabelle 3.2 und vergleiche Abbildung 4.1). Neben den vorher in der Literatur beschriebenen IS6110-Insertionen [84], [85], [91], hatten einige Isolate eine unbekannte IS6110-Insertion am 5' Ende der NTF-Region (Tabelle 4.2).

**Tabelle 4.2: PCR-Analyse zur Insertion von IS6110-Elementen in der NTF-Region.**

Klonaler Komplex	IS6110-Insertion(en) in der NTF-Region			
	WT	5'	3'	5' und 3'
1	0	0	119	3
2	0	5	35	0
3	1	0	32	38
4	1	0	29	25
5	0	1	4	16
6	5	3	1	0
7 (a, b, c)	17	1	1	0
Summe			337	

Zur weiteren Validierung der Einteilung von Beijing-Stämmen in die sieben klonalen Komplexe wurde eine Selektion von 91 Beijing-Stämmen auf bekannte Beijing-spezifische Deletionen (RD105, RD207, RD181, RD150, RD142) untersucht (Tabelle 4.3).

**Tabelle 4.3: PCR-Analyse zu Polymorphismen in Beijing-spezifischen Regionen RD207, RD105, RD142, RD181, RD150.**

Klonaler Komplex	RD207		RD105		RD142		RD181		RD150		
	WT	DEL	INS								
1	0	33*	0	34	34	0	0	34	34	0	0
2	0	10	0	10	10	0	0	10	2	0	8
3	0	17	0	17	17	0	0	17	17	0	0
4	0	14	0	14	14	0	0	14	13	0	1
5	0	7	0	7	7	0	0	7	0	7	0
6	0	3	0	3	3	0	0	3	3	0	0
7 (a, b, c)	0	5*	0	6	6	0	5	1	6	0	0
Summe		89*		91		91		91			91

\* Für zwei Isolate war kein PCR-Produkt amplifizierbar (drei Wiederholungen)

In keinem der 91 Isolate konnte die Deletion der Region RD142 nachgewiesen werden, hingegen wiesen alle Isolate eine Deletion der Regionen RD105 und RD207 auf. Die Regionen RD181 und RD150 waren variabel zwischen den untersuchten Isolaten (Tabelle 4.3). Zur weiteren Analyse der Deletionen der Regionen RD181 und RD150 wurden diese in weiteren Isolaten aus den klonalen Komplexen 2, 5 und 7 per PCR überprüft (Tabelle 4.4). Die Auswahl der Stämme für diese Analyse erfolgte entlang der Verzweigungen im MST, um die klonalen Komplexe möglichst gut eingrenzen zu können.

Die Region RD150 war nur in Isolaten aus dem klonalen Komplex 5 deletiert, in Isolaten des klonalen Komplexes 2 und in einzelnen Isolaten des klonalen Komplexes 4 wurde hingegen eine vorher nicht beschriebene Insertion in dieser Genomregion nachgewiesen (Tabelle 4.4). Die Isolate des ancestralen klonalen Komplexes 7 hatten überwiegend eine intakte RD181-Region, wohingegen Isolate des ancestralen klonalen Komplexes 6 eine Deletion der Region RD181 aufwiesen und somit näher mit den modernen Beijing-Stämmen (klonale Komplexe 1-5) verwandt sind, die nahezu alle eine RD181-Deletion aufwiesen (Tabelle 4.4).

**Tabelle 4.4: PCR-Analyse zu Polymorphismen in den variablen Regionen RD181, RD150 mit einer erweiterten Auswahl von Beijing-Isolaten.**

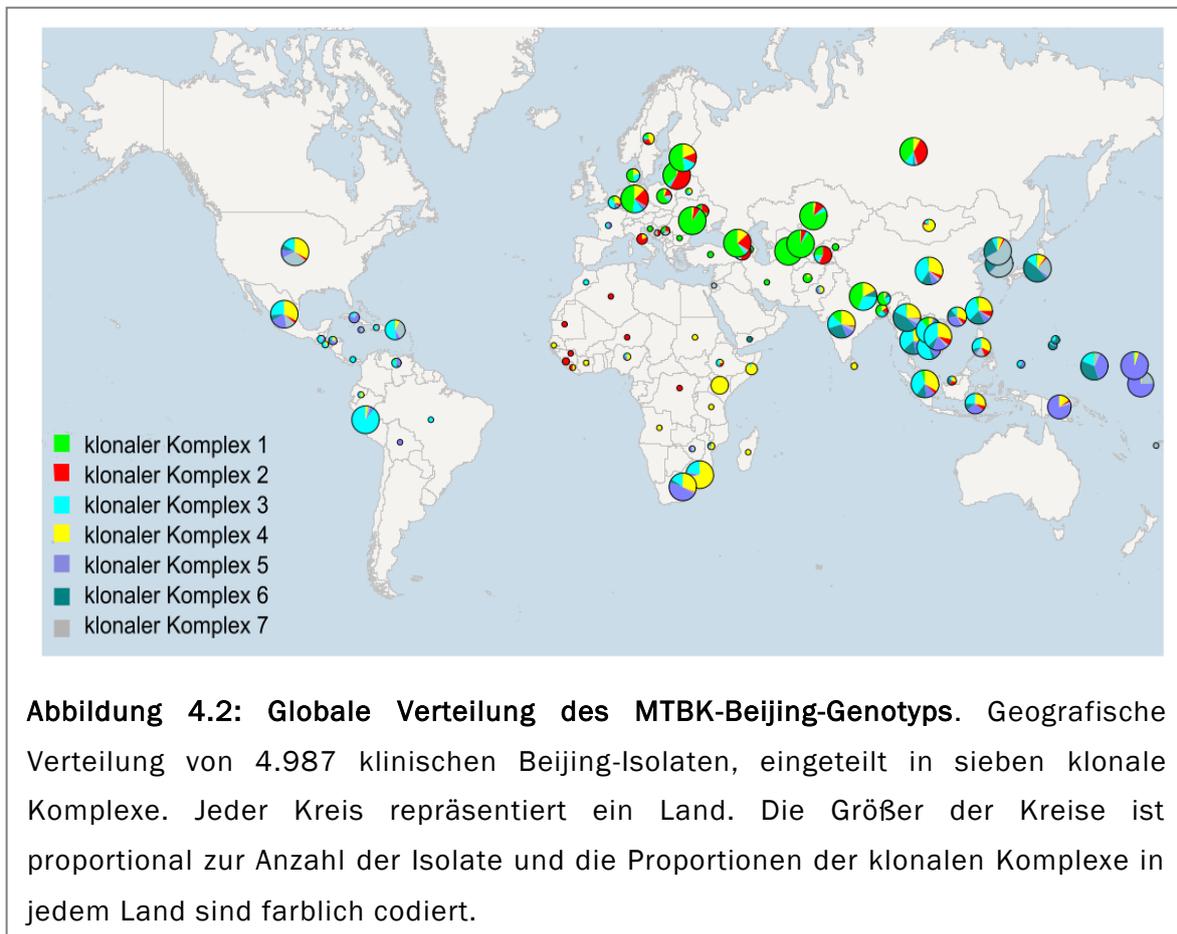
Klonaler Komplex	RD181		RD150		
	WT	DEL	WT	DEL	INS
1	0	34	58	0	0
2	0	10	5	0	21
3	0	17	32	0	0
4	1	14	17	0	4
5	0	32	0	43	0
6	0	6	3	0	0
7 (a, b, c)	15	1	18	0	0
Summe	130		201		

Wie zuvor beschrieben, sind die modernen klonalen Komplexe 1 - 5 mit parentalen Knotenpunkten assoziiert, welche gleichzeitig zu den größten MIRU-VNTR-Clustern (MLVA 15-9 Typen) zählen (vergleiche Tabelle 4.1). Dies spiegelt sich auch in der höheren ( $P < 0,0001$ , Fischer Exakt Test) Clusterrate (Anzahl von Beijing-Isolaten in einem MIRU-VNTR-Cluster) aller modernen Beijing-Komplexe (1 - 5) im Vergleich zu den ancestralen Komplexen 6 und 7 wieder. So konnten 816/907 (90,1%) der Isolate aus dem klonalen Komplex 1, 402/457 (88,0%) der Isolate aus dem klonalen Komplex 2, 757/972 (77,9%) der Isolate aus dem klonalen Komplex 3, 797/1027 (77,6%) der Isolate aus dem klonalen Komplex 4 und 475/542 (87,6%) der Isolate

aus dem klonalen Komplex 5 mit einem MIRU-VNTR-Cluster assoziiert werden (Daten nicht gezeigt). In den ancestralen klonalen Komplexen 6 und 7 wurden nur 231/475 (48,6%) bzw. 401/607 (66,1%) der Isolate mit einem MIRU-VNTR-Cluster assoziiert. Die MIRU-VNTR-Clusterrate der klonalen Komplexe 1, 2 und 5 war zudem signifikant höher ( $P < 0,0001$ , Fischer Exakt Test) als die Clusterrate der klonalen Komplexen 3 und 4 (Daten nicht gezeigt).

#### 4.1.2 GLOBALE VERTEILUNG DER KLONALEN BEIJING-KOMPLEXE

Zur Analyse der globalen Verteilung der Beijing-Stämme aus den sieben identifizierten klonalen Komplexen wurde jedem der 4.987 analysierten klinischen Isolate mit der Software MLVA Compare v1.03 (Ridom, Münster, Deutschland) die geografischen Koordinaten des Herkunftslandes zugewiesen. Die weltweite Verteilung der sieben klonalen Komplexe ist regional stark unterschiedlich. Man erkennt man eine hohe Diversität der Komplexe in Ost- und Südasiens aber auch in Nordamerika (Abbildung 4.2). Südafrika, Südamerika, die Pazifikregion, und Osteuropa, bzw. Russland sind hingegen von definierten regional verbreiteten klonalen Komplexen dominiert (Abbildung 4.2).

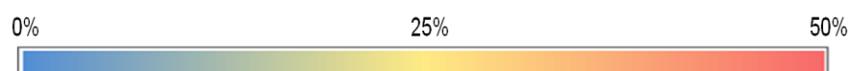


Mit Ausnahme von Australien konnte das Vorkommen von Beijing-Stämmen in der hier analysierten Stammkollektion auf jedem Kontinent nachweisen werden, in Südamerika stammen die Isolate jedoch hauptsächlich aus Peru. Der arabischen Halbinsel wurden nahezu keine Beijing-Isolate zugeordnet und in Afrika kommen die Beijing-Stämme zum Großteil aus den Ländern Somalia, Kenia, Südafrika und Swasiland (Abbildung 4.2).

Das unterschiedliche weltweite Auftreten der klonalen Komplexe des Beijing-Genotyps wird auch durch die proportionale Verteilung der Stämme innerhalb der sieben klonalen Komplexe deutlich. Knapp die Hälfte (48,2%) aller Stämme des klonalen Komplexes 1 stammt aus Zentralasien (speziell Usbekistan, Kasachstan und Turkmenistan). 54,2% der Stämme aus dem klonalen Komplex 2 wurden Russland und Ländern in Europa zugeordnet (Tabelle 4.5). Dagegen sind die klonalen Komplexe 3 und 4 nahezu zu gleichen Anteilen auf Länder in Süd- und Ostasien, als auch in Nordamerika aufgeteilt (Tabelle 4.5). Ein ähnliches Bild zeichnet sich für Stämme des klonalen Komplexes 5 ab, wobei diese zu einem Großteil (38,7%) in der Pazifikregion zu finden sind (Tabelle 4.5). Die ancestralen Stämme aus den klonalen Komplexen 6 und 7 dominieren in Ostasien (48,2%, bzw. 43,3%) aber auch in Nordamerika findet man 45,3% der Stämme aus dem klonalen Komplex 7 (Tabelle 4.5).

**Tabelle 4.5: Proportionale Verteilung der sieben klonalen Beijing-Komplexen auf unterschiedliche geografische Regionen.** EUR - Europa, RUS - Russland, ZAS - Zentralasien, SAS - Südasien, OAS - Ostasien, NAM - Nordamerika, PAZ - Pazifikregion, AFR - Afrika, SAM - Südamerika.

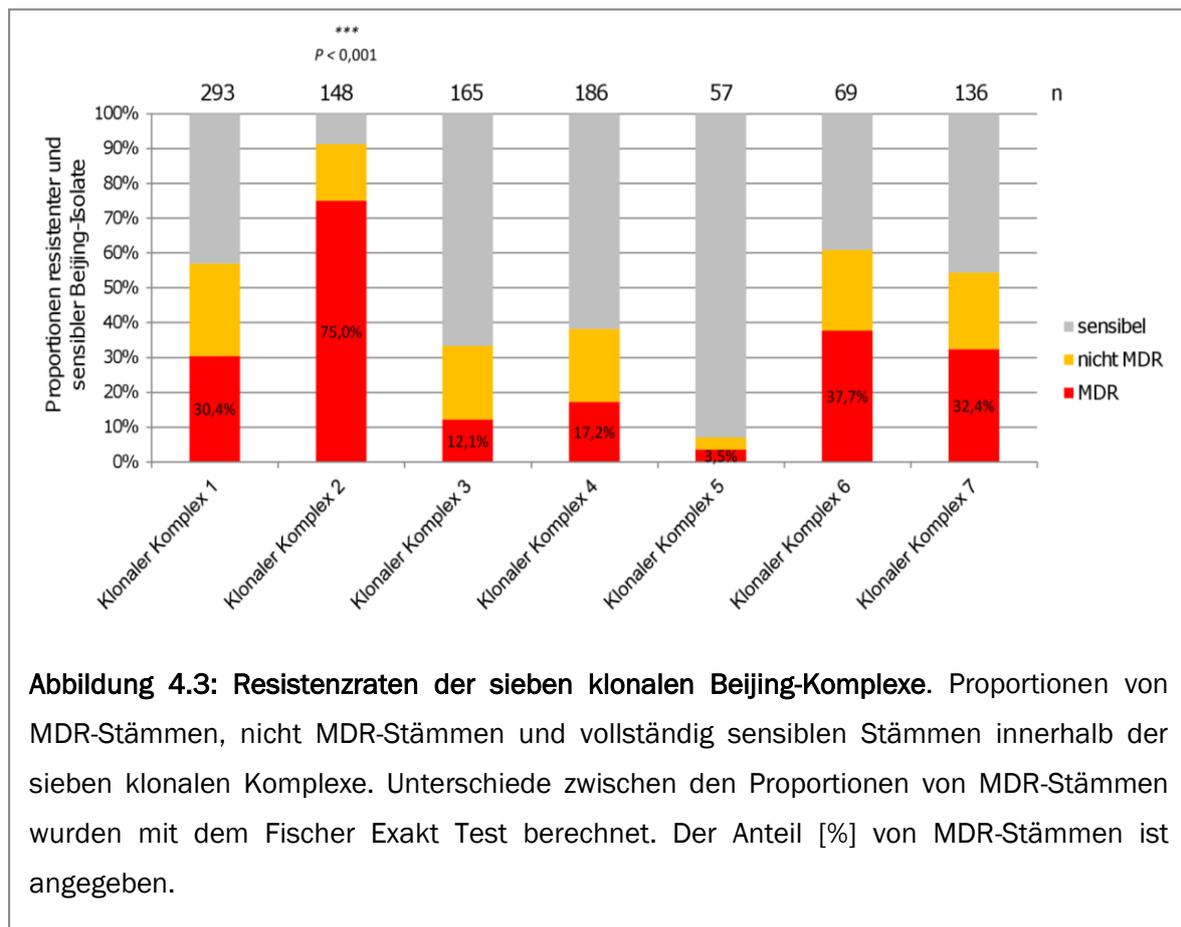
Klonaler Komplex	EUR	RUS	ZAS	SAS	OAS	NAM	PAZ	AFR	SAM	Σ
1	249 27,5%	106 11,7%	437 48,2%	76 8,4%	21 2,3%	14 1,5%	2 0,2%	1 0,1%	1 0,1%	907
2	150 32,8%	98 21,4%	80 17,5%	44 9,6%	41 9,0%	25 5,5%	7 1,5%	12 2,6%	0 0,0%	457
3	46 4,7%	26 2,7%	29 3,0%	278 28,6%	271 27,9%	161 16,6%	49 5,0%	37 3,8%	75 7,7%	972
4	53 5,2%	22 2,1%	31 3,0%	221 21,5%	232 22,6%	292 28,4%	39 3,8%	134 13,0%	3 0,3%	1027
5	6 1,1%	3 0,6%	1 0,2%	98 18,1%	62 11,4%	106 19,6%	210 38,7%	49 9,0%	7 1,3%	542
6	7 1,5%	7 1,5%	2 0,4%	122 25,7%	229 48,2%	60 12,6%	41 8,6%	5 1,1%	2 0,4%	475
7	7 1,2%	5 0,8%	10 1,6%	24 4,0%	263 43,3%	275 45,3%	18 3,0%	3 0,5%	2 0,3%	607



### 4.1.3 ASSOZIATION VON MDR-TB MIT KLONALEN KOMPLEXEN DES BEIJING-GENOTYPS

Um die proportionale Verteilung von antibiotikaresistenten Isolaten innerhalb der sieben klonalen Komplexe des Beijing-Genotyps zu untersuchen, wurden 1.054 von insgesamt 1.590 klinischen Isolaten mit verfügbaren Resistenzergebnissen aus 15 verschiedenen Studien analysiert (Anhang 2). Bei dieser Auswahl wurden regionale Studien mit ausschließlich resistenten Isolaten (MDR-TB-Kohorten) ausgeschlossen.

Der Anteil (111/148, 75,0%) von multiresistenten (MDR-) Isolaten des klonalen Komplexes 2 ist höher ( $P < 0,0001$ , Fischer Exakt Test) als in allen anderen klonalen Komplexen. Die klonalen Komplexe 3, 4 und 5 weisen die geringsten Anteile mit 20/165 (12,1%), 32/186 (17,2%), respektive 2/57 (3,5%) MDR-Isolate in dieser Stamm-Kollektion auf. Obwohl die klonalen Komplexe 1 (89/293, 30,4%), 6 (26/69, 37,7%) und 7 (44/136, 32,4%) ähnliche Proportionen von multiresistenten Stämmen aufweisen (Abbildung 4.3), ist die Clusterrate von MDR-Stämmen (Anteil von MDR-Isolaten in MIRU-VNTR-Clustern) aus dem klonalen Komplex 1 (94,4%) im Vergleich zu den klonalen Komplexen 6 (42,3%), bzw. 7 (56,8%), signifikant höher ( $P < 0,0001$ , Fischer Exakt Test) (vergleiche Tabelle 4.6). Der klonale Komplex 2 weist neben der höchsten Rate von MDR-Isolaten (75,0%) auch die höchste MIRU-VNTR-Clusterrate von MDR-Stämmen (95,5%) auf (Tabelle 4.6). Insgesamt ist die MIRU-VNTR-Clusterrate von MDR-Stämmen in den



klonalen Komplexen 1 und 2 höher ( $P < 0,0001$ , Fischer Exakt Test) als in den klonalen Komplexen 3, 4, 6 und 7. Im klonalen Komplex 5 wurden lediglich 2/57 Isolaten mit MDR-TB assoziiert.

**Tabelle 4.6: Verteilung von antibiotikasensiblen und -resistenten Isolaten innerhalb der sieben klonalen Beijing-Komplexe differenziert nach Studien.** Die Clusterrate (Anteil der Stämme in einem MIRU-VNTR-Cluster) von MDR-Stämmen innerhalb der klonalen Komplexe ist angegeben.

Studie [Nr.] durchgeführt in:	Klonaler Komplex (sensibel/nicht MDR/MDR)							Σ
	1	2	3	4	5	6	7	
[3] China	1/1/0	3/5/1	4/6/10	6/7/3	1/0/0	6/2/9	0/2/1	68
[8] Dänemark	13/2/0	3/0/3	21/2/0	10/3/0	4/0/0	1/0/0	0/0/0	62
[9] Estland	25/10/0	1/7/0	9/2/0	5/8/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	67
[10] Georgien	20/6/3	0/2/3	0/0/1	6/1/1	0/0/0	0/0/0	0/0/0	43
[11] Deutschland	12/7/0	1/2/0	6/3/0	15/1/0	5/0/0	3/0/0	4/1/0	60
[12] Südafrika	1/0/0	0/0/0	2/3/0	6/2/12	12/1/2	1/0/0	0/0/0	42
[15] Kiribati	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	27/0/0	0/0/0	8/0/0	35
[16] Korea	0/0/0	3/0/2	4/5/3	7/5/3	0/0/0	14/13/17	48/25/37	186
[17] Litauen	7/10/42	0/4/80	4/1/0	0/2/4	0/0/0	0/1/0	0/1/0	156
[18] Abchasien	11/14/18	0/1/20	0/1/2	2/5/1	0/0/0	0/0/0	0/0/5	80
[21] Moldawien	19/1/11	1/1/1	1/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	35
[26] Schweden	1/1/0	1/2/0	1/0/0	4/1/0	0/0/0	1/0/0	0/0/0	12
[30] Swasiland	0/0/0	0/0/0	19/0/0	51/1/6	4/1/0	0/0/0	0/0/0	82
[32] Turkmenistan	16/26/15	0/0/3	1/1/0	2/3/1	0/0/0	0/0/0	1/1/0	70
[37] Peru	0/0/0	0/0/0	38/11/4	1/0/0	0/0/0	1/0/0	1/0/0	56
<b>MDR-Clusterrate</b>	<b>94,4%</b> <b>(84/89)</b>	<b>95,5%</b> <b>(106/111)</b>	<b>65,0%</b> <b>(13/20)</b>	<b>75,0%</b> <b>(24/32)</b>	<b>(2/2)</b>	<b>42,3%</b> <b>(11/26)</b>	<b>56,8%</b> <b>(25/44)</b>	

Ein Großteil (105/150, 70%) der Isolate mit Antibiotikaresistenzergebnissen aus dem klonalen Komplex 2 stammt aus Litauen und Abchasien (autonome Republik in Georgien). In diesen beiden Ländern/Regionen konnte auch ein erheblicher Anteil (Litauen: 42/156, 26,9%; Abchasien: 18/80, 22,5%) multiresistenter Isolate dem klonalen Komplex 1 zugeordnet werden. Interessanterweise ist der klonale Komplex 2 jedoch hier im Vergleich zum klonalen Komplex 1, fast ausschließlich mit MDR-TB assoziiert (100/105, 95,2% im Vergleich zu 60/102, 58,8%,  $P < 0,0001$ , Fischer Exakt Test). Auch in Deutschland finden wir Stämme aus dem klonalen Komplex 2 mit ähnlichen charakteristischen IS6110 RFLP-Fingerabdrücken seit 1995 ausschließlich als MDR-Variante (siehe Abschnitt 4.2).

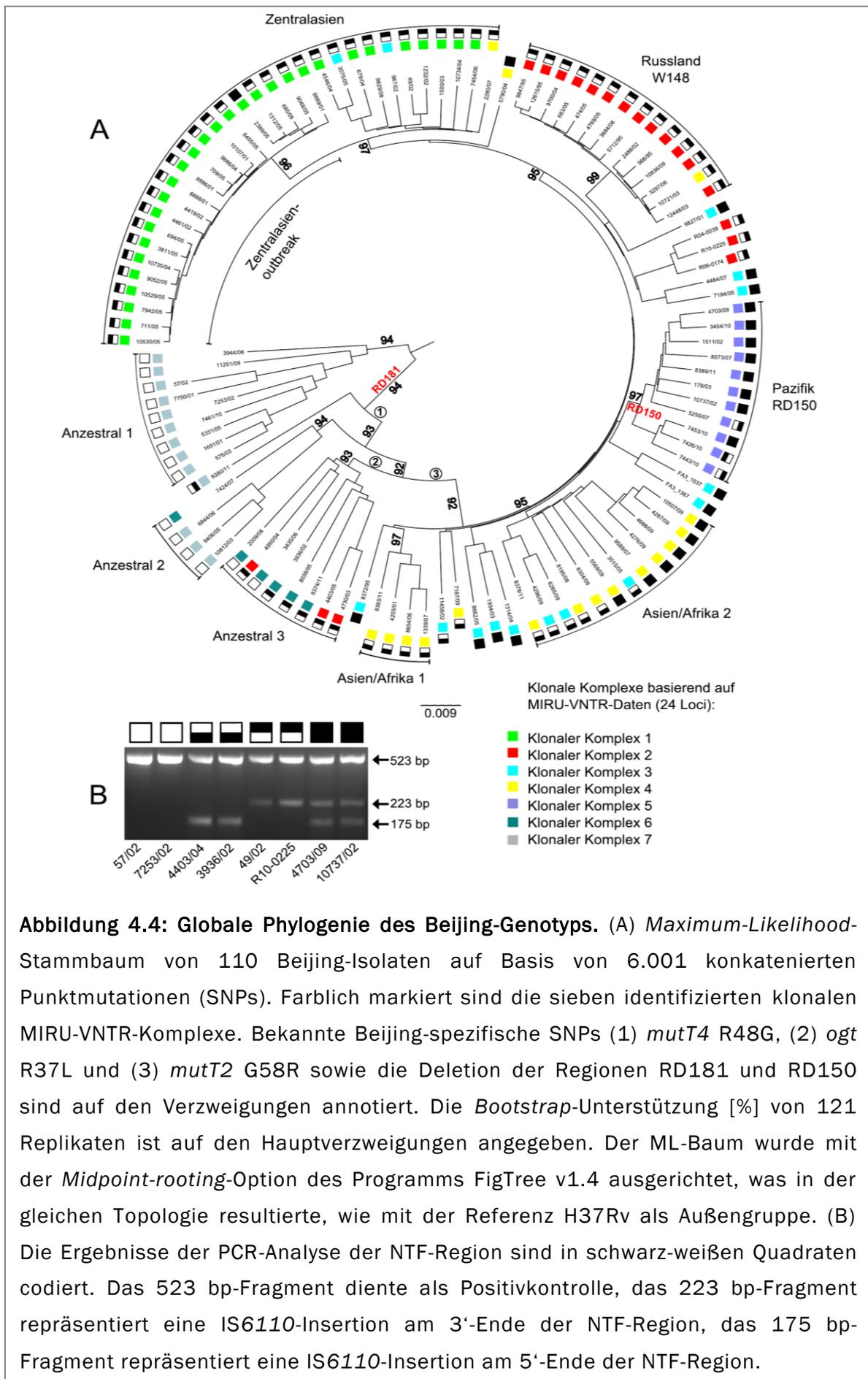
### 4.1.3 GENOMBASIERTE POPULATIONSTRUKTUR UND PHYLOGENIE

Basierend auf der Analyse der MIRU-VNTR-Daten (24 Loci) der globalen Kollektion von 4.987 Beijing-Stämmen konnten sieben klonale Komplexe für den Beijing-Genotyp definiert werden. Diese unterscheiden sich in ihrer globalen Verteilung, dem Anteil von Isolaten in MIRU-VNTR-Clustern und dem Auftreten von Antibiotikaresistenzen (vergleiche Abschnitt 4.1.1 und 4.1.2). Die prinzipielle Einteilung in fünf moderne und zwei ancestrale Komplexe korreliert mit weiteren Markern, z. B. dem Vorkommen von Deletionen (RD181 und RD150) oder IS6110-Insertionen in der NTF-Region. Allerdings sind die Distanzen (Anzahl von Unterschieden in 24 MIRU-VNTR-Loci) im MST gering (1 - 2 unterschiedliche Loci zwischen den klonalen Komplexen, vergleiche Abbildung 4.1) und für einige Isolate ergaben sich diskrepante Ergebnisse bei der Validierung der klonalen Komplexe. Letzteres könnte ein Anzeichen von konvergenter Evolution bestimmter MIRU-VNTR-Marker in verschiedenen klonalen Komplexen sein, wie bereits von Inaki Comas und Kollegen beschrieben [124].

Um die globale Populationsstruktur, die Phylogenie und Evolution des MTBK-Beijing-Genotyps ausgehend vom letzten gemeinsamen Vorfahren (MRCA) genauer zu analysieren und Unterschiede im Genom zu definieren, wurden 110 Isolate für eine NGS-Genomanalyse ausgewählt. Die Isolate verteilen sich wie folgt auf die sieben klonalen Komplexe: Klonaler Komplex 1 (29/907, 3,2%), klonaler Komplex 2 (19/457, 4,2%), klonaler Komplex 3 (14/972, 1,4%), klonaler Komplex 4 (18/1027, 1,8%), klonaler Komplex 5 (11/542, 2,0%), klonaler Komplex 6 (7/475, 1,5%), klonaler Komplex 7 (12/607, 2,0%).

Die verwendeten Isolate stammen aus 14 Studien und konnten 28 unterschiedlichen Herkunftsländern zugeordnet werden. Die genomweite Abdeckung einzelner Isolate lag zwischen 35x und 782x. Damit wurde für jedes Isolat mindestens 94% des H37Rv-Referenzgenoms (GenBank ID: NC\_000962.2) mit mindestens 10 Sequenzen pro Position und 75% Variantenfrequenz abgedeckt. Insgesamt wurden zwischen 1.237 und 1.527 Varianten (SNPs) pro Isolat im Vergleich zur Referenz H37Rv identifiziert. Die kombinierte Analyse aller SNPs (mit Ausnahme von Resistenz-assoziierten Genen und repetitiven Sequenzen) der 110 Isolate resultierte in 6.001 variablen Positionen, die in jedem der analysierten Isolate eine 10-fache Abdeckung und 75% Variantenfrequenz aufwiesen (vergleiche auch Abschnitt 3.2.4.3).

Zur Rekonstruktion der Phylogenie von Beijing-Stämmen wurde ein *Maximum-Likelihood*-Ansatz, basierend auf den 6.001 konkatenierten SNPs, verwendet. Auf dem resultierenden ML-Stammbaum wurden die klonalen Komplexe, basierend auf MIRU-VNTR-Daten sowie bekannte Deletionen (RD181 und RD150), IS6110-Insertionen in der NTF-Region und SNPs zur Klassifizierung von Beijing-Stämmen abgebildet (Abbildung 4.4).



In dem genom-basierten ML-Baum wurden die meisten Isolate entsprechend der sieben MIRU-VNTR-Komplexe gruppiert (Abbildung 4.4), d. h. die MIRU-VNTR-basierten klonalen Komplexe sind weitestgehend kongruent mit dem SNP-basierten ML-Stammbaum. Allerdings zeigte sich für einige Isolate keine eindeutige phylogenetische Gruppierung, speziell der klonale Komplex 3 stellt keine monophyletische Gruppe in der genom-basierten Phylogenie dar.

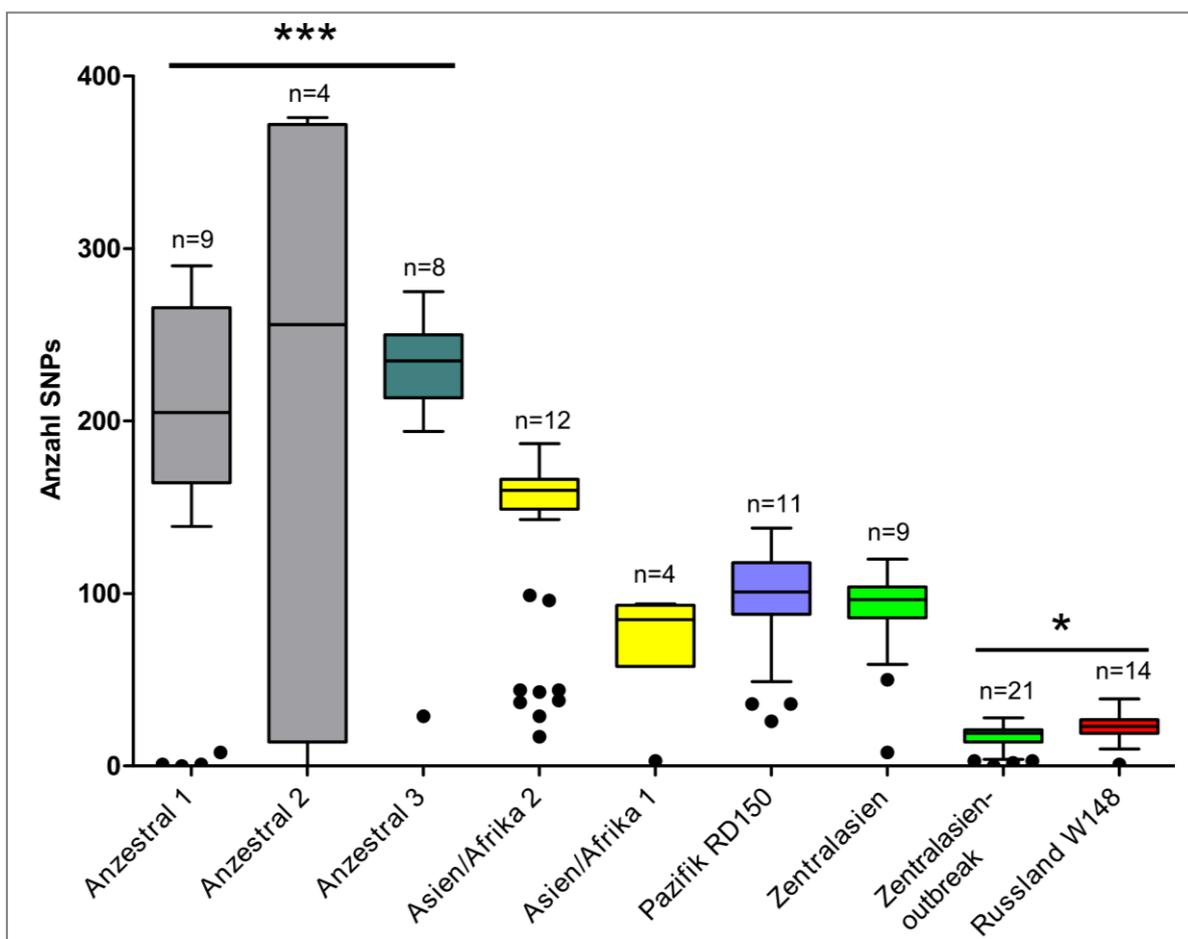
Der ML-Stammbaum zeigt hingegen eine hohe *Resampling*-Unterstützung von mehr als 90% für die Hauptverzweigungen und somit eine robuste Topologie, die mit vorher beschriebenen robusten phylogenetischen Markern wie z. B. Deletionen korreliert (Abbildung 4.4, siehe unten). Die genom-basierte Analyse der Populationsstruktur ermöglichte die Klassifizierung von Beijing-Stämmen in acht Subgruppen (Abbildung 4.4). Die Bezeichnungen sollen die ancestralen Beijing-Stämme (Ancestral 1-3) von den modernen Beijing-Stämmen (Asien/Afrika 1 und 2, Pazifik RD150, Russland W148, Zentralasien) differenzieren. Die modernen Beijing-Stämme wurden basierend auf der geografischen Verteilung der assoziierten klonalen Komplexe (vergleiche Tabelle 3.5) und nach bekannten Markern (RD150 [92]) oder dem Vorkommen bekannter Stammvarianten (W148 [125]) benannt.

Die einzelnen Subgruppen sind durch 10-73 spezifische SNPs und kleine Deletionen (<10 bp) definiert (siehe Anhang 7-15). Moderne Beijing-Stämme unterscheiden sich durch 80 SNPs und eine ein bp Deletion im Startcodon, bzw. Stoppcodon der überlappenden Gene *Rv2147c* und *Rv2148c* (Anhang 6). Analog zu vorher beschriebenen Marker (Deletionen und SNPs) für die Subtypisierung von Beijing-Stämmen [85], [92], [94] wird die Subgruppe Ancestral 3 z. B. durch die Mutation *ogt R37L* [94] von den anderen beiden ancestralen Subgruppen (Ancestral 1 und 2) differenziert. Die Mutation *mutT2 G58R* [94] unterscheidet die modernen Beijing-Subgruppen von den drei ancestralen Subgruppen. Die Deletion der Region RD150 ist spezifisch für die Subgruppe Pazifik RD150. Im Gegensatz zu dem gruppenspezifischen Auftreten von SNPs und großen Deletionen zeigte die Insertion von IS6110-Elementen ein variables Ergebnis. So unterscheidet das IS6110 NTF-Insertionsprofil zwar moderne Beijing-Subgruppen (3'-Insertion oder 5'- und 3'-Insertion) von den Subgruppen Ancestral 1 und 2 (keine IS6110-Insertion in der NTF-Region), ist aber variabel innerhalb einzelner moderner Subgruppen (Abbildung 4.4). Isolate mit einer einzelnen, bisher unbekanntem, IS6110 Insertion am 5'-Ende der NTF-Region wurden in der Subgruppe Ancestral 3 nachgewiesen.

Die Verzweigungslänge im ML-Stammbaum (Abbildung 4.4) ist proportional zur Substitutionsrate und erlaubt somit auch Einblicke in die Diversität innerhalb der Subgruppen und Rückschlüsse auf deren evolutionäres Alter, respektive das Alter ihres jüngsten gemeinsamen Vorfahren. Geht man von einer konstanten Mutationsrate von MTBK-Stämmen aus [53], [113], [114], reflektiert die Distanz einzelner Isolate zueinander die evolutionäre Zeit zu ihrem letzten gemeinsamen hypothetischen Vorfahren (MRCA).

In Abbildung 4.5 ist die Distanz (SNPs) zwischen paarweise angeordneten Isolaten verschiedener Beijing-Subgruppen in einem Boxplot dargestellt. Die ancestralen Subgruppen sind mit einer mittleren Distanz von 198-228 SNPs zwischen den einzelnen Isolaten deutlich diverser als die modernen Subgruppen ( $P < 0,0001$ , Bonferrini's-Multiple-Comparison-Test) (vergleiche Abbildung 4.5, Daten nicht gezeigt).

Die Subgruppen Asien/Afrika 1 und 2 trennen im Durchschnitt 73 SNPs, bzw. 146 SNPs, Isolate der Subgruppe Pazifik RD150 sind im Mittel 100 SNPs voneinander entfernt (vergleiche Abbildung 4.5, Daten nicht gezeigt). In der Subgruppe Zentralasien lässt sich ein durch 44 SNPs charakterisierter „Zentralasien-Outbreak“ (Anhang 12) weiter differenzieren. Dies wird deutlich

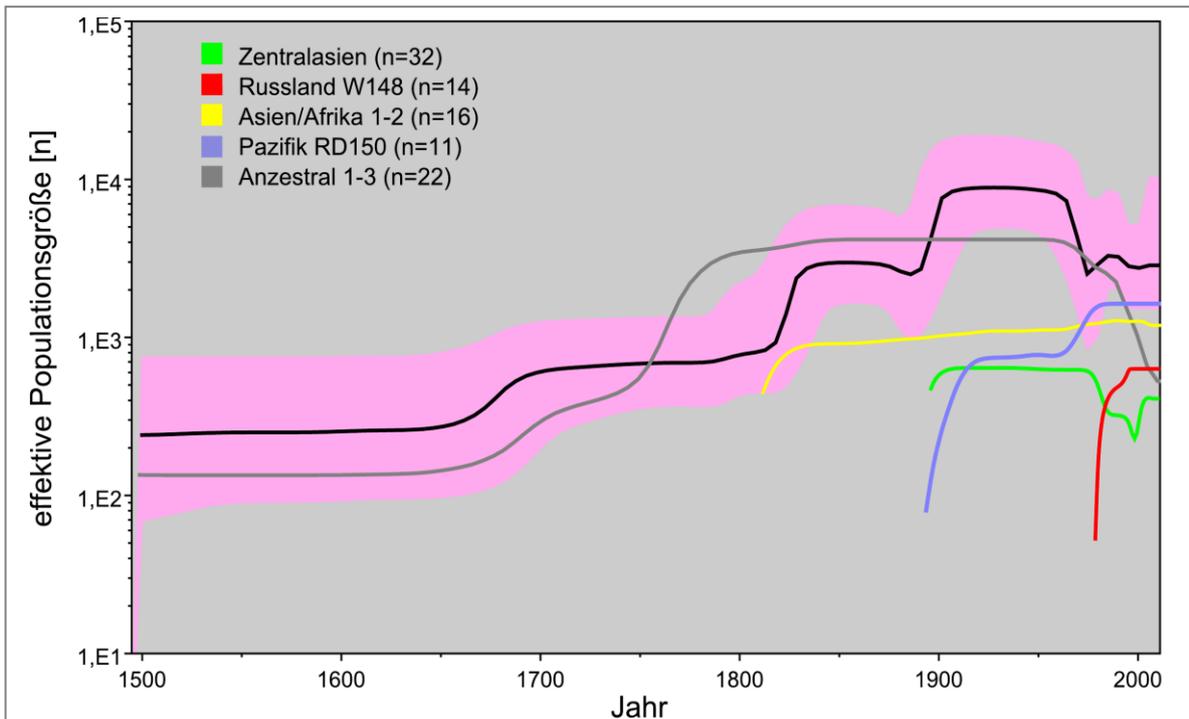


**Abbildung 4.5: Boxplot der genetischen Diversität von MTBK-Beijing-Subgruppen.** Dargestellt ist die Distanz (SNPs) von paarweise angeordneten Isolaten. Die Box repräsentiert 50% der Daten (Interquartilsabstand). Der Median (schwarze Linie) ist innerhalb der Box angegeben, die Antennen (Whisker) sind in dieser Darstellung auf das 1,5 fache des Interquartilsabstandes beschränkt und Ausreißer sind als Punkte dargestellt. Die verwendete Distanzmatrix wurde mit dem Programm MrBayes [89] generiert (Daten nicht gezeigt).  $P$ -Werte nach Bonferrini's-Multiple-Comparison-Test sind für die Subgruppen Anzestral 1 - 3 und Zentralasien-outbreak und Russland W148 zusammen gefasst. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*  $P < 0,05$ .

durch den Vergleich der SNP-Distanzen innerhalb dieser Subgruppe. Isolate aus dem Zentralasien-*Outbreak* liegen durchschnittlich 17 SNPs voneinander entfernt, wohingegen die restlichen Isolate der Subgruppe im Mittel durch 95 SNPs getrennt sind. Auch Isolate der Subgruppe Russland W148 sind nur durch durchschnittlich 23 SNPs voneinander getrennt (vergleiche Abbildung 4.5, Daten nicht gezeigt). Diese wird im Folgenden auch als W148-*Outbreak* bezeichnet. Die beiden *Outbreaks* haben eine geringe Genomvariabilität ( $P < 0,05$ , Bonferrini's-Multiple-Comparison-Test) im Vergleich zu den anderen Beijing-Subgruppen. Hohe MDR-TB-Raten der hier untersuchten TB-Stämme im Zentralasien-*Outbreak* (16/21 Isolaten) und im W148-*Outbreak* (13/14 Isolaten) deuten auf die Expansion von zwei MDR-TB-Klonen hin. Tatsächlich sind alle *Outbreak*-Stämme bereits gegen die Antibiotika INH und SM resistent (vergleiche Anhang 3). Die Analyse der Sequenzdaten offenbarte in beiden *Outbreaks* die Resistenz-vermittelnden Mutationen *katG* S315T (INH-Resistenz) und *rpsL* K43R (SM-Resistenz) (Daten nicht gezeigt).

Geht man von einer Mutationsrate in einem TB-*Outbreak* von 0,3 - 0,5 SNPs pro Genom und pro Jahr aus [113], [114], [126] und unter der Annahme, dass die mittlere genetische Distanz zwischen *Outbreak*-Stämmen etwa die Hälfte der Distanz zu ihrem letzten gemeinsamen Vorfahren (MRCA) reflektiert, deuten diese Daten auf den Ursprung der Expansion der beiden Klone vor etwa 17-28 Jahren (Zentralasien-*Outbreak*), bzw. 23-38 Jahren (W148-*Outbreak*) hin.

Um einen tieferen Einblick in die Populationsdynamik von Beijing-Stämmen und speziell die Expansion einzelner Subgruppen zu erhalten, habe ich mit dem Programmen BEAST [104] und Tracer [105] einen Bayesian Skyline Plot berechnet, welcher die effektive Populationsgröße an Hand von konkatenierten Sequenzdaten über die Zeit berechnet (Koaleszenz-Analyse) (Abbildung 4.6). Die effektive Populationsgröße beschreibt die Anzahl von Individuen, die zu einem Zeitpunkt zur Verbreitung ihrer Spezies beitragen können. Die Parameter für diese Simulation wurden von Thierry Wirth (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Ein stetiger Anstieg der effektiven Populationsgröße bis zu Beginn des 19. Jahrhunderts korrelierte mit der Expansion der ancestralen Subgruppen (Abbildung 4.6). Um das Jahr 1800 und 1900 erhöht sich die effektive Populationsgröße schrittweise. Dies geht einher mit der Expansion der Subgruppen Asien/Afrika 1 - 2 und später mit den Subgruppen Zentralasien und Pazifik RD150. Die Subgruppe Russland W148 scheint sich erst gegen Ende des 20. Jahrhunderts auszubreiten (Abbildung 4.6). Interessanterweise reduziert sich die effektive Populationsgröße der ancestralen Beijing-Subgruppen in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts deutlich. Moderne Beijing-Subgruppen hingegen, wie Pazifik RD150 und Russland W148, breiten sich weiter aus (Abbildung 4.6). Die effektive Populationsgröße der Subgruppen Asien/Afrika 1 - 2 bleibt konstant und auch die Subgruppe Zentralasien kann einen Einbruch in der effektiven Populationsgröße kompensieren (Abbildung 4.6).

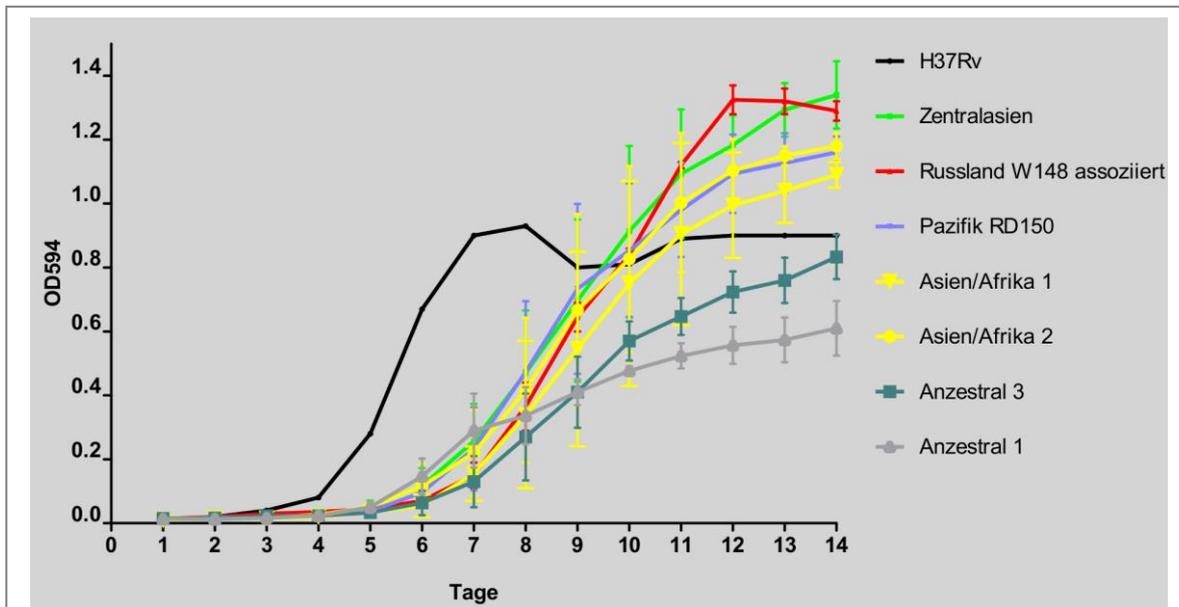


**Abbildung 4.6: Effektive Populationsgröße von Beijing-Isolaten über die Zeit.** Je 6.001 konkatenierte SNPs von 110 klinischen Beijing-Isolaten wurden verwendet, um mit dem Programm BEAST [16] einen Bayesian-Skyline-Plot zu berechnen. Die schwarze Linie (Median, mit 95% Konfidenzintervall in rosa) repräsentiert die Analyse aller Beijing-Isolate. Die Mediane einzelner Subgruppen (11-32 Isolate) sind farblich codiert.

#### 4.1.4 WACHSTUMSKURVEN VON MTBK-BEIJING-STÄMMEN

Die starke Expansion (vergleiche Abbildung 4.6) und signifikant höhere MIRU-VNTR-Clusterraten (vergleiche Abschnitt 4.1.1) von modernen Beijing-Stämmen (77,6 - 87,8%) im Vergleich zu den ancestralen Beijing-Stämmen (46,6 - 65,7%), deuten auf eine beschleunigte weltweite Ausbreitung von modernen Beijing-Stämmen hin, welche eventuell durch eine erhöhte Wachstumsrate bedingt sein könnte.

In einem *in vitro* Wachstumsexperiment habe ich hierzu das Wachstum von 19 klinischen Beijing-Isolaten (je 2 - 3 Isolate von jeder Beijing-Subgruppe, mit Ausnahme der Subgruppe Anzestral 2) gemessen (Anhang 24). Dabei wurden  $10^7$  CFUs inokuliert und in einem Rollmischer 14 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Interessanterweise zeigten alle getesteten modernen Beijing-Isolate ( $n=13$ ) eine steilere Wachstumskurve im Vergleich zu den Stämmen aus den ancestralen Subgruppen ( $n=6$ ) (Abbildung 3.7). Alle modernen Beijing-Subgruppen erreichten nach 14 Tagen eine höhere ( $P < 0,01$ , Bonferrini's-Multiple-Comparison-Test) optische Dichte ( $OD_{594}$ ) als Stämme der Subgruppe



**Abbildung 4.7: Wachstumskurven klinischer Beijing-Isolaten.** Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von je zwei bis drei Isolaten aus sieben verschiedenen Subgruppen. An Tag 0 wurden  $10^7$  CFUs in 6 mL 7H9/10% OADC-Medium inokuliert und täglich die optische Dichte ( $OD_{594}$ ) von biologischen Triplikaten gemessen.

Anzestral 1 (Anhang 27). Im Vergleich zu den Stämmen der Subgruppe Anzestral 3 war die maximal erreichte optische Dichte nur für die Subgruppen Zentralasien, Russland W148 und Asien/Afrika 2 signifikant erhöht ( $P < 0,05$ , Bonferrini's-Multiple-Comparison-Test).

#### 4.1.5 HINWEISE AUF POSITIV SELEKTIONIERT E GENE IN MODERNEN BEIJING-STÄMMEN

Wie beschrieben, deuten die bisherigen Daten (höhere MIRU-VNTR-Clusterrate, globale Verbreitung, niedrigere Genomvariabilität) auf eine massive Expansion von modernen Beijing-Stämmen im Vergleich zu anzestralen Beijing-Stämmen hin. Im *in vitro* Wachstumsversuch (Abbildung 4.7) konnte ein veränderter Phänotyp von modernen Beijing-Stämmen detektiert werden. Möglicherweise sind dies Anzeichen für eine erhöhte Virulenz oder gesteigerte Fitness von modernen Beijing-Stämmen als Adaption auf veränderte Umweltbedingungen, z. B. Bevölkerungsexplosion und Urbanisierung.

Um potentielle genetische Virulenzfaktoren zu identifizieren, wurden im Folgenden spezifische Mutationen von modernen Beijing-Subgruppen (Anhang 6-11) im Detail untersucht. Von insgesamt 80 SNPs, welche charakteristisch für alle modernen Beijing-Stämme sind, befanden

sich 69 SNPs in proteincodierenden Bereichen (Tabelle 4.7). 53/69 SNPs (76,8%) führten zu einem Aminosäureaustausch und könnten funktionelle Auswirkungen auf alle modernen Beijing-Subgruppen haben.

**Tabelle 4.7: Spezifische Punktmutationen (SNPs) für moderne Beijing-Stämme.** Intergenische Regionen und konservierte hypothetische Gene sind nicht aufgeführt. AA = Aminosäureaustausch.

Gen	Annotation	AA	Gen	Annotation	AA
<b>Zellwand und Zellprozesse</b>			<b>Intermediärmetabolismus, Zellatmung</b>		
<i>ctpA</i>	cation transporting ATPase A	G319G	<i>Rv0044c</i>	oxidoreductase	R175R
<i>mce1E</i>	MCE-family lipoprotein LprK	V10V	<i>Rv0245</i>	oxidoreductase	S103F
<i>lpqI</i>	lipoprotein	L359L	<i>hemB</i>	dehydratase	R183R
<i>mmpL5</i>	transmembrane transport	G767G	<i>dapC</i>	aminotransferase	A274T
<i>Rv0987</i>	ABC transporter	A372V	<i>dapC</i>	aminotransferase	A151A
<i>Rv0988</i>	hypothetical protein	L191A	<i>narJ</i>	respiratory nitrate reductase	P179R
<i>secA2</i>	preprotein translocase	V410M	<i>ansA</i>	L-aperaginase	G281S
<i>Rv1972</i>	mce3 associated	H124Q	<i>glcB</i>	malate synthase G	G104S
<i>Rv1986</i>	T-Zell Antigen	C12Y	<i>cobN</i>	cobaltochelataase	E677L
<i>ctpG</i>	cation transporting ATPase G	F740F	<i>cobN</i>	cobaltochelataase	R145H
<i>murC</i>	ligase	F209F	<i>mtr</i>	reductase	S144S
<i>Rv2180c</i>	integral membrane protein	W249*	<i>Rv3174</i>	short chain dehydrogenase	G28S
<i>esxU</i>	ESAT-6 like protein	P63S	<i>sseA</i>	thiosulfate sulfurtransferase	E276L
<i>Rv3835</i>	hypothetical protein	L294R	<i>Rv3591c</i>	hydrolase	F156L
<b>Transkription und Translation</b>			<b>Lipid Metabolismus</b>		
<i>rimJ</i>	acetyltransferase	G23S	<i>far</i>	fatty-acid-CoA racemase	A24V
<i>mutT2</i>	Guaninriphosphatase	G58R	<i>fadD36</i>	acyl-CoA synthetase	P124L
<i>ogt</i>	methyltransferase	G12G	<i>fadD28</i>	acyl-CoA synthetase	T436A
<i>lysX</i>	lysyl-tRNA synthetase	I701T	<i>ltp3</i>	acetyl-CoA acetyltransferase	F68L
<i>recX</i>	recombination regulator	V59L	<i>pks13</i>	polyketide synthase	T1014M
<b>Virulenz, Entgiftung und Anpassung</b>			<b>Regulatorische Proteine</b>		
<i>clpB</i>	endopeptidase	K530K	<i>pknA</i>	PKNA (protein kinase A)	Q370P
<i>yrbE2B</i>	mce2 membrane protein	A113T	<i>pknA</i>	PKNA (protein kinase A)	Q369R
<i>vapC37</i>	Possible toxin	T16A	<i>Rv0302</i>	TetR family	H84D
<i>vapC38</i>	Possible toxin	V48A	<i>Rv0452</i>	probably TetR family	H125D
<i>vapB47</i>	Possible antitoxin	R84C	<i>Rv0691c</i>	transcriptional regulator	A140T
<i>otsA</i>	synthase	E77G	<i>Rv0890c</i>	probably LuxR family	E234G
<i>mce4C</i>	mce4, T-Zell Antigen	R191S	<i>kdpE</i>	transcriptional regulator	G60S
<i>proV</i>	ABC transporter PROV	N84D	<i>Rv2488c</i>	probably LuxR family	T265I

Auffällig bei der Sequenzanalyse war die Häufung von Mutationen in der *mce*-Genfamilie (*mammalian cell entry*) und in Virulenz-assoziierten Genen (*vapBC*) sowie deren Spezifität für einige Subgruppen. Neben vier spezifischen SNPs in *mce*-Genen (Tabelle 4.7) in allen modernen Beijing-Stämmen, sind die Polymorphismen *mce3B* S49A und *Rv1972* (*mce3*-assoziiert) V44del spezifisch für die Subgruppe Russland W148 (Anhang 10). Die Mutationen *mce1D* I188T und *mce2F* N432S wurden ebenfalls in allen modernen Beijing-Stämmen gefunden, aber auch in den Subgruppen Ancestral 1 und 2 (Daten nicht gezeigt).

Die Mutationen *vapC37* T16A, *vapC38* V48A und *vapB47* R84C sind spezifische Marker für alle modernen Beijing-Stämme (Tabelle 4.7), *vapC1* S32P ist ein Marker der Subgruppe Ancestral 1

(Anhang 13) und *vapC12* H32R wurde in allen Stämmen der Subgruppe Russland W148 gefunden (Anhang 10).

Um einen möglichen positiven Selektionsdruck auf *mce*- und *vapBC*-Gene von modernen Beijing-Stämmen zu testen, wurde das Verhältnis von nicht synonymen zu synonymen Mutationen in den *mce*- und *vapBC*-Genfamilien im Vergleich zu Lipoproteinen, ribosomalen Proteinen und Polymerasen, T-Zell Antigenen und randomisierten Gensets aus 300 essentiellen und 300 nicht essentiellen Genen (Anhang 16-22) untersucht.

Eine Möglichkeit, Hinweise auf eine positive Selektion von Genen zu erhalten, ist die Analyse des dN/dS Verhältnisses. Bei einem dN/dS Verhältnis der untersuchten Sequenz  $<1$  wird angenommen, dass eine negative Selektion neu erworbener, meist unvorteilhafter Allele überwiegt (stabilisierende Selektion). Ein Verhältnis  $>1$  deutet auf eine positive Selektion der untersuchten Sequenz hin. Unter veränderten Umweltbedingungen werden oft alternative Phänotypen bevorzugt und die Proportionen von neuen vorteilhaften Allelen können schnell zunehmen und zur Fixierung in der Population gelangen (gerichtete Selektion). Auf Grund der hohen Sequenzidentität von modernen Beijing-Stämmen auf Genebene, wurden größere konkatenierte Sequenzdaten (27.975 – 351.744 bp) untersucht. Da auch mit diesen Datensätzen, auf Grund fehlender Mutationen, nicht für jede Subgruppe ein dN/dS Verhältnis berechnet werden konnte, wurde auch das Verhältnis von einzigartigen nicht synonymen zu synonymen Mutationen angegeben (vergleiche Tabelle 4.8).

**Tabelle 4.8: dN/dS-Analyse von modernen Beijing-Stämmen mit unterschiedlicher Gensets.** Nsyn = Nicht synonyme Mutationen, syn= synonyme Mutationen (syn), NA = nicht anwendbar.

	Einzigartige Mutationen [SNPs]		nsyn / syn	Sequenz-länge [bp]	SNPs pro bp	Asien/ Afrika 1	Asien/ Afrika 2	Pazifik RD150	Russland W148	Zentral-asien
	nsyn	syn								
300 essentielle Gene	13	10	1,3	351.744	6,5E-05	0,68	0,73	0,80	0,79	0,79
300 nicht essentielle Gene	9	9	1,0	270.978	6,6E-05	0,30	0,26	0,42	0,27	0,26
<i>mce1-4</i>	6	2	3,0	47.247	16,9E-05	1,83	1,83	1,83	1,10	0,91
<i>vapBC</i>	4	1	4,0	27.975	17,9E-05	NA	NA	1,10	NA	NA
Polymerasen, ribosomale Proteine	3	1	3,0	60.978	6,6E-05	NA	NA	NA	NA	0,71
T-Zell Antigene	5	2	2,5	82.716	8,5E-05	0,53	0,53	0,47	0,71	0,53
Lipoproteine	0	1	NA	48.012	2,1E-05	NA	NA	NA	NA	NA

Obwohl die Anzahl der Mutationen sehr gering ist, konnte für alle modernen Beijing Subgruppen ein dN/dS Verhältnis für die *mce*-Genfamilie bestimmt werden. Für die Virulenz-assoziierten Gene *vapBC* war dies nur für die Subgruppe Pazifik RD150 möglich. Beide Genfamilien wiesen im Vergleich zu den anderen Gensets, sowohl die höchsten dN/dS Verhältnisse, als auch die größten Proportionen von nicht synonymen zu synonymen Mutationen auf (Tabelle 4.8). Bezogen auf die analysierte Sequenzlänge ist die Mutationsrate pro Basenpaar (bp) in den *mce*-Genen und *vapBC*-Genen etwa zwei bis dreimal höher als in den Vergleichsdatensätzen (Tabelle 4.8). Auffällig war auch, dass lediglich eine Mutation in dem 48.012 bp umfassenden Datensatz von Lipoproteinen auftrat (Tabelle 4.8).

Weiterhin wurde überprüft, ob Mutationen in den *mce*- und *vapBC*-Genen in modernen Beijing-Stämmen häufiger zu einem Aminosäureaustausch führen als in ancestralen Beijing-Stämmen. Dafür wurden paarweise die jeweiligen Gensets jeweils mit der randomisierten Kollektion aus 300 essentiellen und 300 nicht essentiellen Genen verglichen. Diese Vergleiche wurden separat für moderne Beijing-Stämme und ancestrale Beijing-Stämme durchgeführt (vergleiche Tabelle 4.9). Interessanterweise zeigte sich hier, dass moderne Beijing-Stämme signifikant mehr Aminosäuresubstitutionen in *Mce*- und *VapBC*-Proteinen aufweisen als in essentiellen oder nicht essentiellen Proteinen (Tabelle 4.9). Dieser Zusammenhang wurde für kein anderes der untersuchten Gensets und nicht für ancestrale Beijing-Stämme gefunden (Tabelle 4.9).

Eine weitere Möglichkeit, Hinweise auf positiv selektionierte Gene zu erhalten ist die Suche nach sogenannten „konvergenten“ Mutationen. In Anlehnung an den Begriff „konvergente Evolution“, welcher eine ähnliche Merkmalsausprägung in unterschiedlichen Spezies beschreibt (z. B. Flügel), sind in Tabelle 4.10 alle „konvergenten“ Mutationen aufgeführt, welche an der gleichen Genomposition unterschiedliche Aminosäuresubstitutionen bewirken. Mit einbezogen wurden auch homoplastische SNPs, welche zu einem identischen Basenaustausch in unterschiedlichen Subgruppen führen.

Analysiert wurde ein erweiterter Datensatz der 110 Beijing-Isolate basierend auf 6.696 SNPs (Daten nicht gezeigt). Dieser schloss auch Positionen ein, die in bis zu 10% der Isolate eine geringere Variantenfrequenz als 75% aufwiesen oder in einzelnen Position mit weniger als 10 Sequenzen abgedeckt waren (vergleiche Abschnitt 3.4.2). Mit dieser Methode konnten zunächst bekannte Promotormutationen (*inhA* -15, *inhA* -8, *eis* -10, *embA* -16) identifiziert werden, die die Genexpression von Antibiotikaresistenzgenen erhöhen und so ein Defizit dieser Proteine unter Therapiebedingungen kompensieren. Betrachtete man nur die Gene, welche mit Resistenzmechanismen in Verbindung stehen, wurden auch bekannten Resistenz-vermittelnden Mutationen, z. B. *katG* Codon 315 (INH-Resistenz), *rpsL* Codon 43 (SM-Resistenz), *embB* Codon 306 und 406 (EMB-Resistenz), *gyrA* Codon 94 (FQ-Resistenz), *rrs* Position 1401 (AMI-, KAN-, CAP-Resistenz) und Mutationen in der *rpoB*-Hotspotregion (Codon 426 bis 452, H37Rv Annotation,

GenBank ID: NC\_000962.2) (RMP-Resistenz) identifiziert. Auch kompensatorische Mutationen in *rpoC* (Codon 483 und 485) [76] wurden in dieser Analyse erkannt. Weitere 15 in dieser Arbeit beobachtete konvergente Mutationen (Tabelle 4.10) könnten, zumindest im genetischen Hintergrund der Beijing Familie, eine mögliche Adaption oder Kompensation vermitteln.

**Tabelle 4.9: Chi-Quadratstest (mit Yates Korrektur) auf Gleichverteilung von nicht synonymen Mutationen in verschiedenen Genfamilien im Vergleich zu je einem randomisierten Genset (300 essentielle Gene, 300 nicht essentielle Gene).** Die Vergleiche wurden jeweils für moderne Beijing-Subgruppen (links) und ancestrale Beijing-Subgruppen (rechts) durchgeführt.

	Veränderte Aminosäuren	unveränderte Aminosäuren	Veränderte Aminosäuren	unveränderte Aminosäuren
<b>essentielle Gene <sup>1</sup></b>	13	117.241	6	117.248
<b>nicht essentielle Gene <sup>2</sup></b>	9	92.327	10	92.326
<b>mce 1-4</b>	6	15.743	3	15.746
<i>P</i> -Werte	* ( <i>P</i> =0,0210) <sup>1</sup> * ( <i>P</i> =0,0153) <sup>2</sup>		ns ( <i>P</i> =0,1389) <sup>1</sup> ns ( <i>P</i> =0,6339) <sup>2</sup>	
<b>vapBC</b>	4	9.321	1	9.324
<i>P</i> -Werte	* ( <i>P</i> =0,0369) <sup>1</sup> * ( <i>P</i> =0,0266) <sup>2</sup>		ns ( <i>P</i> =0,9819) <sup>1</sup> ns ( <i>P</i> =0,6080) <sup>2</sup>	
<b>Ribosomale Proteine und Polymerasen</b>	3	20.323	2	20.324
<i>P</i> -Werte	ns ( <i>P</i> =0,9236) <sup>1</sup> ns ( <i>P</i> =0,8014) <sup>2</sup>		ns ( <i>P</i> =0,7513) <sup>1</sup> ns ( <i>P</i> =0,8014) <sup>2</sup>	
<b>T-Zell Antigene</b>	5	27.569	3	27.569
<i>P</i> -Werte	ns ( <i>P</i> =0,5194) <sup>1</sup> ns ( <i>P</i> =0,4195) <sup>2</sup>		ns ( <i>P</i> =0,5042) <sup>1</sup> ns ( <i>P</i> =0,7471) <sup>2</sup>	
<b>Lipoproteine</b>	0	16.004	3	16.001
<i>P</i> -Werte	ns ( <i>P</i> =0,3652) <sup>1</sup> ns ( <i>P</i> =0,4358) <sup>2</sup>		ns ( <i>P</i> =0,1456) <sup>1</sup> ns ( <i>P</i> =0,6505) <sup>2</sup>	
	<b>Vergleich von modernen Beijing-Subgruppen</b>		<b>Vergleich von ancestralen Beijing-Subgruppen</b>	

Die Mutationen in den Genen *rpoC* Codon 483 und 485, *inhA* -8, *eis* -10, *emBA* -16, *mmpL11* Codon 920, *folC* Codon 40 und *Rv2670c* Codon 5 wurden ausschließlich in antibiotikaresistenten Isolaten gefunden (Daten nicht gezeigt). Mutationen in den anderen, in Tabelle 4.10 aufgelisteten Genen, traten auch in antibiotikasensiblen Stämmen auf (Daten nicht gezeigt).

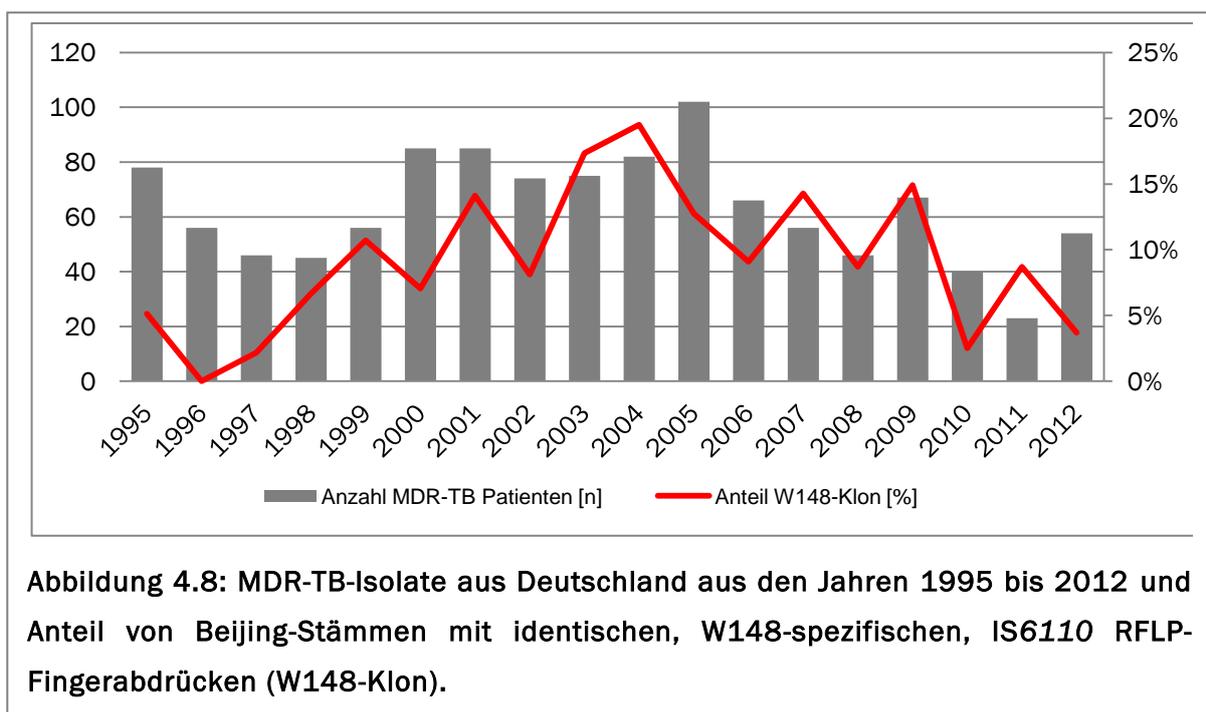
Tabelle 4.10: Homoplastische und konvergente Mutationen von Beijing-Stämmen.

Gen	Annotation	gefunden in Isolaten der Subgruppe:	Mutation	Referenz
<i>Rv0081</i>	transcriptional regulatory protein	Anzestral 1, Pazifik RD150	nt96 G>A	Diese Arbeit
<i>mmpL11</i>	transmembrane transport protein	Russland W148, Asien/Afrika 1	T920A, P	Diese Arbeit
<i>Rv0370c</i>	Possible oxidoreductase	Anzestral 1, andere	T73A	Diese Arbeit
<i>rpoC</i>	RNA polymerase subunit beta'	Anzestral 3, Asien/Afrika 2	V483A, G	[76]
<i>rpoC</i>	RNA polymerase subunit beta'	Russland W148, Anzestral 2	D485N, Y	[76]
IGR	EsxL , 3' UTR	Anzestral 3, Pazifik RD150	+5 A>G	Diese Arbeit
<i>inhA</i> Promotor	NADH-dependent reductase	Russland W148, Pazifik RD150, Zentralasien	-15 C>T	[127]
<i>inhA</i> Promotor	NADH-dependent reductase	Russland W148	-8 T>A,C	[127]
<i>pk5</i>	polyketide synthase <i>pk5</i>	Russland W148, andere	L2.061Q	Diese Arbeit
<i>aoa</i>	D-amino acid oxidase	Anzestral 3, Zentralasien	nt228 G>A	Diese Arbeit
<i>Rv2172c</i>	hypothetical protein	Anzestral 3, andere	nt873 C>T	Diese Arbeit
<i>eis</i> Promotor	Enhanced intracellular survival protein	Russland W148, Zentralasien	-10 C>T	[128], [129]
<i>folC</i>	folylpolyglutamate synthase	Russland W148, Zentralasien	E40G	Diese Arbeit
<i>Rv2652c</i> 5' UTR	Probable PhiRv2 prophage	Anzestral 1, Anzestral 3, andere	-10 C>T	Diese Arbeit
<i>Rv2670c</i>	hypothetical protein	Russland W148, Anzestral 3, Zentralasien	A5V, E	Diese Arbeit
<i>Rv2824c</i>	hypothetical protein	Pazifik RD150, Asien/Afrika 2	T77I, N	Diese Arbeit
<i>Rv2828c</i> 5' UTR	hypothetical protein	Anzestral 1, Asien/Afrika 2	-2 G>A	Diese Arbeit
<i>Rv3177</i> 5' UTR	Possible peroxidase	Anzestral 3, andere	-46 T>C	Diese Arbeit
<i>Rv3403c</i>	hypothetical protein	Anzestral 3, andere	V455G, A	Diese Arbeit
<i>embA</i> Promotor	arabinoxyltransferase	Russland W148, Anzestral 3	-16 C>T	[130]
<i>fbpD</i>	secreted MPT51/MPB51 antigen	andere	Nt648 C>T	Diese Arbeit

## 4.2 EVOLUTION VON MULTIRESENTENTEN BEIJING-W148-STÄMMEN (1995-2012)

Die Analyse der globalen Populationsstruktur und Genomdiversität von Beijing-Stämmen (Abschnitt 4.1.3) deutete auf die Ausbreitung von zwei INH- und SM-resistenten Klonen in Osteuropa und Russland hin (Zentralasien-*Outbreak* und W148-*Outbreak*) (vergleiche Abbildung 4.4 und 4.5). Beide *Outbreak*-Klone verbreiten sich bereits mit den Resistenz-vermittelnden *Low-cost*-Varianten *katG* S315T (INH-Resistenz) und *rpsL* K43R (SM-Resistenz). Speziell der W148-*Outbreak* war zusätzlich vermehrt mit bekannten oder potentiellen kompensatorischen Mutationen assoziiert (*rpoC* Codon 485, *embA* -16, *inhA* -15, *eis* -10, *foiC* Codon 40 und *Rv2670v* Codon 5) (vergleiche Tabelle 4.10). Zur genauen Analyse der Populationsstruktur und longitudinalen Evolution der W148-*Outbreak*-Stämme wurde eine Genomanalyse einer Kollektion von 112 multiresistenten Russland W148-Stämmen aus Deutschland (1995-2012) durchgeführt.

Die Isolate stammen aus einer einzigartigen Stammkollektion aus den Jahren 1995-2012 von 1.134 in Deutschland lebenden MDR-TB-Patienten, welche auch Stämme anderer (nicht Beijing) Genotypen umfasst. Basierend auf dem W148-spezifischen IS6110 RFLP-Fingerabdruck (W148-Klon) [125] wurden 112 Patientenisolat ausgewählt. Der Anteil dieser Stämme unter allen MDR-Isolaten stieg von 1995-2004 stetig. 2004 waren 19,5% der in Deutschland lebenden MDR-TB-Patienten mit einem Stamm dieser W148-Variante infiziert (Daten nicht gezeigt, vergleiche Abbildung 4.8). Dieser Trend setzte sich nicht weiter fort, dennoch sind Beijing W148-Stämme für einen erheblichen Anteil aller in Deutschland diagnostizierten MDR-TB-Fälle verantwortlich (Daten nicht gezeigt). 28/62 (45,2%) der MDR-TB-Patienten, mit bekanntem Geburtsort, kamen aus



Russland, dem vermeintlichen Ursprung des W148-Outbreaks.

112/112 (100%) Isolaten waren phänotypisch resistent gegen INH, SM, RMP. 69/112 (62,0%) Isolaten wurden resistent gegen EMB getestet (ein Stamm ohne Testergebnis, zwei Ergebnisse waren nicht eindeutig) und 42/112 (37,2%) (ein Stamm ohne Testergebnis) Isolaten waren phänotypisch resistent gegen PZA. Resistenzen gegen weitere Antibiotika ETH/PTH, CAP, AMI, PAS, OFX und CS wurden in einzelnen Isolaten gefunden (Tabelle 4.11).

**Tabelle 4.11: Antibiotikaresistenzen der W148-Beijing-Stämme.**

Antibiotikum	INH	SM	RMP	EMB	PZA	ETA/ PTH	CAP	AMI	PAS	OFX	CS
resistent	111	108	111	69	42	39	19	14	11	6	2
keine Daten	1	2	1	2	1	2	7	53	0	4	0
nicht eindeutig	0	0	0	2	0	2	0	1	1	0	0
sensibel	0	2	0	39	69	69	86	44	100	102	110

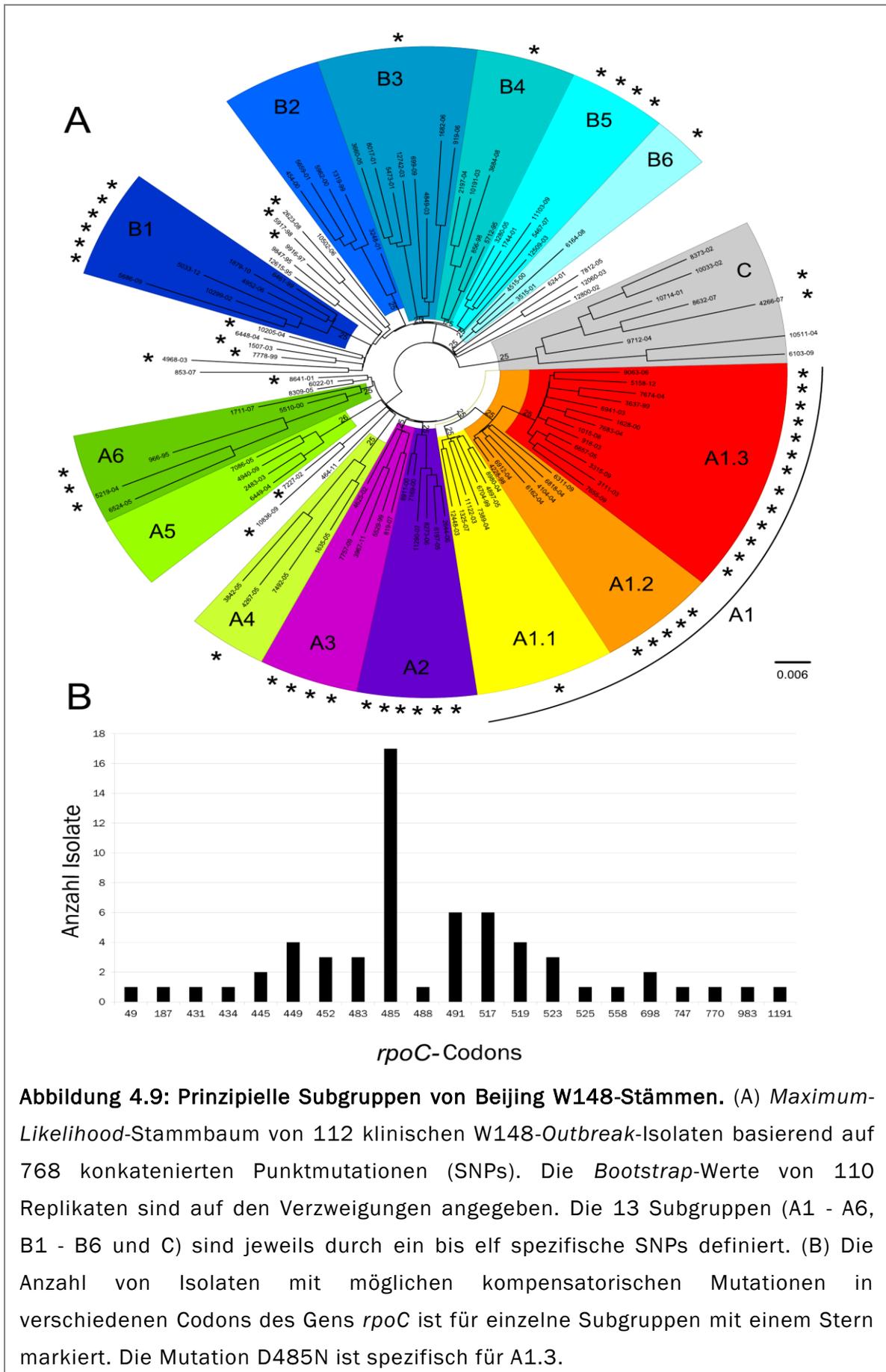
Die Sequenzanalyse der Antibiotikaresistenz-vermittelnden Gene bestätigte, dass alle 112 Isolate die Mutationen *katG* S315T (INH-Resistenz) und die Mutation *rpsL* K43R (SM-Resistenz) aufwiesen. Interessanterweise gab es eine größere Vielfalt bei RMP-Resistenz-vermittelnden Mutationen im Gen *rpoB*. In 95/112 (92%) der Stämme wurde jedoch die Mutation *rpoB* S450L nachgewiesen, eine beschriebene *Low-cost*-Mutation mit geringen Fitnessseinbußen [72]. In der sogenannten Hotspotregion, oder auch RMP-Resistenz-vermittelnden-Region, wurden sieben weitere nicht synonyme Mutationen und zwei synonyme Mutationen identifiziert. Darüber hinaus wiesen einzelne Isolate zwölf nicht synonyme Mutationen außerhalb der *rpoB*-Hotspotregion auf, meist in Verbindung mit der Mutation *rpoB* S450L (Tabelle 4.12). In einem Isolat (6311/09) wurde trotz RMP-resistenten Phänotypen keine Mutation in *rpoB* entdeckt.

Zur weiteren Analyse der Genomvariabilität und zur Rekonstruktion der Populationsstruktur der untersuchten W148-Beijing-Isolate wurden Punktmutationen (SNPs) im Vergleich zum Genom des Referenzstamms H37Rv bestimmt, wobei Resistenz-vermittelnde Gene und repetitive Elemente ausgeschlossen wurden. Insgesamt konnten 768 SNPs identifiziert werden (Daten nicht gezeigt), die in mindestens einem der 112 untersuchten Isolate variabel waren. Auf dieser Basis wurde ein *Maximum-Likelihood*-Baum (Abbildung 3.9) berechnet, in dem sich zunächst drei große Gruppen (A, B, C) unterscheiden ließen.

Tabelle 4.12: Mutationen im Gen *rpoB* in 112 MTBK-Beijing-Isolaten vom Typ W148.

Genom Position	Mutation	In Kombination mit	Anzahl	<i>rpoB</i> -Hotspot Region	Referenz
759.939	P45S	S450L	1	Nein	Nicht bekannt
760.041	G79S	S450L	2	Nein	Nicht bekannt
762.477	K891E				
761.095	L430R	D435Y	1	Ja	[131]
761.101	Q432L	R827C	1	Ja	[131]
761.109	D435Tyr	L430R	2	Ja	[131]
761.110	D435V		6	Ja	[131]
761.139	H445Y, N		7	Ja	[131]
761.138	C>G				
761.140	H445S		1	Ja	[132], [133]
761.142	K446Q				
761.155	S450L	diverse	95	Ja	[134]
761.279	I491M	H445N	4	Nein	Nicht bekannt
761.293	V496A	S450L	2	Nein	Nicht bekannt
761.460	R552C	S450L	5	Nein	[135]
761.973	H723D	S450L	3	Nein	Nicht bekannt
761.998	L731P	S450L	1	Nein	Nicht bekannt
762.285	R827C	Q432L	1	Nein	Nicht bekannt
762.286	R827L	S450L	5	Nein	Nicht bekannt
762.312	G836S	S450L	1	Nein	Nicht bekannt
762.744	Q980K	S450L	1	Nein	Nicht bekannt

Isolate der Gruppe A (n=56) wurden durch die drei Polymorphismen *ctpF* 933 C>T, *Rv2219A* 393 C>T und *nuoJ* V39I definiert und wiesen eine mittlere genetische Distanz von 21 SNPs zueinander auf (Anhang 25). Gruppe B-Stämme (n=41) wiesen die spezifischen Mutationen *ureD* S58G, *Rv3649* 2043 C>T und *Rv3695* V5G auf. Durchschnittlich trennten 25 SNPs einzelne Isolate der Gruppe B (Anhang 25). Isolate der Gruppe C (n=8) differenzierten sich durch elf einzigartige Punktmutationen und waren im Mittel durch 20 SNPs voneinander getrennt (Anhang 25). Innerhalb der zwei großen Gruppen A und B konnten zwölf prinzipielle Subgruppen identifiziert werden (vergleiche Abbildung 4.9), die ein bis acht spezifische SNPs aufwiesen (Anhang 25), wobei Subgruppe A1 erheblich mehr Isolate umfasste (n=26) als alle anderen Subgruppen ( $3 \leq n \leq 8$ ) (Abbildung 4.9).



Die Analyse der Sequenzdaten von Antibiotikaresistenz-assoziierten Genen bei allen W148-Stämmen zeigte bereits, dass alle Isolate die Mutationen *katG* S315T (INH-Resistenz) und *rpsL* K43R (SM-Resistenz) aufweisen und somit W148-Stämme mindestens seit 1995 als doppelt resistente Varianten übertragen werden. Die in allen Isolaten beobachtete phänotypische Resistenz gegen RMP korrelierte, wie oben beschrieben, zu 92% mit der Mutation *rpoB* S450L. Diese Variante wurde nicht in allen W148-Stämmen übertragen (vergleiche Tabelle 4.12), ist jedoch mit Abstand die erfolgreichste RMP-Resistenz-vermittelnde Mutation im W148-Outbreak.

Die Übertragung von Stämmen mit weiteren spezifischen Resistenz-vermittelnden Mutationen wurde in den identifizierten Subgruppen (A1 - A6, B1 - B6 und C) detailliert analysiert (Anhang 26) und wird an dieser Stelle exemplarisch für die größte Subgruppe A1 (n=26) gezeigt (Tabelle 4.13).

Der schrittweise Erwerb von zusätzlichen Mutationen zeigte die Mikroevolution der Gruppe A1 (definiert durch die Mutation *rpmI* Q25R). Die Stämme der Variante A1.1 sind durch die Mutationen *dnaG* S558G und *Rv3395c* N200D charakterisiert (Anhang 25). Mit Ausnahme von einem Isolat weisen A1.1-Stämme die Mutation *rpoB* S450L (RMP-Resistenz) auf, vereinzelt in Kombination mit weiteren *rpoB*-Mutationen außerhalb der Hotspot-Region (Tabelle 4.13). EMB-Resistenz wird in A1.1 durch zwei unterschiedliche Mutationen im Gen *embB* vermittelt (M306I, M306V). Eine mögliche direkte Übertragung eines sechsfach resistenten Klons ist charakterisiert durch weitere Polymorphismen in den Genen *ethA* (Del) und *pncA* (Y64D) (Tabelle 4.13).

Die Stämme der Variante A1.2 weisen alle die Mutationen *mtn* A239V, *pgsA3* G52S und einen SNP in einer nicht proteincodierenden Region auf (Anhang 25). Bis auf ein Isolat ohne *rpoB*-Mutation, wurde auch hier die Variante *rpoB* S450L nachgewiesen. EMB-Resistenz wird durch verschiedene *embB*-Mutationen (M306V, D328G in Kombination mit L402V) in einzelnen Isolaten vermittelt (Tabelle 4.13).

A1.3 umfasste Stämme die zusätzlich zu den A1.2 spezifischen SNPs die Mutationen *rpoC* D485N, *cut3* S141R, *Rv1066* I83V, *Rv3466* 102 A>G und *embA* -16 C>T erwarben (Anhang 25). Die Mutation *embA* -16 C>T wurde zwar als kompensatorische Mutation von EMB-resistenten Isolaten diskutiert [130], jedoch zeigten nur 4/13 Isolaten aus A1.3 einen EMB-resistenten Phänotyp (Tabelle 3.13). Die phänotypische PZA-Resistenz in drei A1.3 Isolaten wird durch einzigartige Mutationen im Gen *pncA* vermittelt (V131F, S59P, Q141P). RMP-Resistenz in A1.3 korreliert mit der Mutation *rpoB* S450L (Tabelle 4.13).

Die A1.3-spezifische Mutation *rpoC* D485N wurde als kompensatorische Mutation von RMP-resistenten Isolaten beschrieben [76]. Insgesamt wurden in 58/112 (51,8%) der W148-Stämme

**Tabelle 4.13: Phänotypische Resistenzen und Mutationen in Resistenz-assoziierten Genen im größten Cluster A1 des Beijing W148-Outbreaks. SG = Subgruppe.**

Borstel -ID	SG	Phänotypische Resistenztestung							Resistenz-assoziierte Polymorphismen				
		EMB	ETH PTH	PZA	OFX	CAP	AMI	PAS	<i>rpoB</i> (RMP)	<i>embB</i> (EMB)	<i>ethA</i> (ETH/ PTH)	<i>pncA</i> (PZA)	<i>gyrB</i> (OFX)
11122/03	A1.1	s	s	s	s	s		s	D435V		C294*		
12448/03	A1.1	s	s	s	s	s		s	S450L				
7389/04	A1.1	r	s	r	s	s		s	S450L, L731P	M306I		T76P	
1325/07	A1.1	s	s	s	s	s	s	s	S450L	M306V		G97S	
6704/99	A1.1	r	r	s	s	r	r	r	S450L	M306I	Del	S164P	
4897/05	A1.1	r	r	r	s	s		s	S450L, V496A	M306I	Del	Y64D	
8980/04	A1.1	r	r	s	s	s	s	s	S450L, V496A	M306I	Del	Y64D	
4228/98	A1.2	r	s	r	s	s	s	s	S450L	M306I		Del	
6818/04	A1.2	r	s	s	s	s	s	s	S450L				
6912/04	A1.2	r	s	s	s	s	s	s	S450L				
4104/04	A1.2	r	s	s	s	s		s	S450L	M306V			
6162/04	A1.2	r	s	r	s	s	s	s	S450L	D328G, L402V			
6311/09	A1.2	r	r	s	s	r	r	s					
3637/99	A1.3	r	s	r	s	s	s	s	S450L	E504D		V131F	
1628/00	A1.3	s	s	s	s	r	s	s	S450L				
918/03	A1.3	s	s	s	s	s		s	S450L				
6941/03	A1.3	s	s	s	s			s	S450L				
3111/03	A1.3	r	s	s	s	s		s	S450L	M306V			
7674/04	A1.3	s	s	s	s	s		s	S450L			P62S	
7683/04	A1.3	s	s	r	s	s	s	s	S450L			S59P	
6657/05	A1.3	r	s	s	s	s		s	S450L				
9063/06	A1.3	s	s	r	s	s	s	s	S450L			Q141P	
1015/08	A1.3	s	s	s	s	s	s	s	S450L				
3315/09	A1.3	b	s	s	s	s	s	s	S450L				
7655/09	A1.3	r	s	r	s	s	s	s	S450L	M306I		G162R	D500N
5158/12	A1.3	s	s	r	s	s	s	s	S450L			T76P	

25 weitere *rpoC*-Varianten in 21 unterschiedlichen Codons identifiziert (vergleiche Abbildung 4.9, Daten nicht gezeigt). In vier Isolaten der Gruppe B1 wurde die möglicherweise kompensatorische Mutation *rpoA* T187A gefunden. Interessanterweise zeigte sich eine Häufung von potentiell kompensatorischen *rpoC*-Mutationen in der Gruppe A, speziell in den Varianten A1.2 und A1.3 (Abbildung 4.9), welche jedoch nicht statistisch signifikant ist ( $P = 0,15$ , Fischer Exakt Test).

Die Analyse der anderen definierten Subgruppen (A2 - A6, B1 - B6 und C, Anhang 26) zeigte, dass neben Resistenzen gegen INH, SM und RMP weitere Resistenzen, respektive weitere Resistenzmutationen in assoziierten Genen auftreten und im Einzelfall auch von Patient zu Patient übertragen werden. Bei der Gruppe C hingegen handelte es sich um einen fünffach resistenten Klon. Alle Isolate wiesen die Mutationen *katG* S315T (INH-Resistenz), *rpsL* K43R (SM-Resistenz), *embB* G406A (EMB-Resistenz), *ethA* 361delA (ETH/PTH Resistenz) und *pncA* I31S

(PZA-Resistenz) auf. Eine mittlere genetische Distanz von 20 SNPs (0 – 37 SNPs zwischen einzelnen Isolaten, Daten nicht gezeigt) schließt eine kürzliche direkte Übertragungskette zwischen allen Patienten aus. Im weiteren Verlauf erwarb dieser Klon (Gruppe C) weitere Resistenz-vermittelnde Mutationen. Die zusätzlichen Polymorphismen *rpoB* S450L (RMP-Resistenz, in 7/8 Stämmen) und *rrs* 1401 a>g (AMI-, KAN-, CAP-Resistenz, 5/8 Stämmen) deuten auf die Verbreitung eines aktuell siebenfach resistenten Klons hin (Anhang 26).

Die Daten zeigen, dass die meisten W148-Stämme bereits eine Kombination der Mutationen *katG* S315 (INH-Resistenz), *rpsL* K43R (SM-Resistenz) und *rpoB* S450L (RMP-Resistenz) besitzen. Potentiell kompensatorische Mutationen im Gen *rpoC* traten vermehrt in der am häufigsten detektierten Variante A1 auf. Weitere Antibiotikaresistenzen entstehen zunächst in einzelnen Isolaten durch einzigartige Mutationen, wahrscheinlich während einer Antibiotikabehandlung. Am Beispiel von Gruppe C wird jedoch auch deutlich, dass polyresistente Klone bereits existieren und mehrfach übertragen werden.

**Tabelle 4.14: Übersicht zur klonalen Ausbreitung von W148-Stämmen mit identischen Resistenz-vermittelnden Mutationen innerhalb der identifizierten W148-Subgruppen.** Rot = klonale Ausbreitung (Übertragung) von Stämmen mit einer spezifischen Resistenz-vermittelnden Mutation, orange = alle untersuchten Isolate haben eine Mutation im assoziierten Gen, welche aber nicht Subgruppen-spezifisch ist, grün = einzelne Isolate weisen Resistenz-vermittelnde Mutationen auf, weiß=keine Mutationen detektiert.

Sub-gruppe	Mittlere Distanz [SNPs]	Resistenz-vermittelnde Mutationen					
		RMP ( <i>rpoB</i> )	EMB ( <i>embB</i> )	PZA ( <i>pncA</i> )	ETH/PTH ( <i>ethA</i> )	FQ ( <i>gyrA</i> )	AMI/KAN/CAP ( <i>rrs</i> )
A1.1	17	orange	grün	grün	grün		
A1.2	12	orange	grün				
A1.3	14	rot	grün			grün	
A2	10	rot	rot				
A3	18	rot	grün	grün	rot		
A4	14	rot	grün		grün		
A5	1	rot	rot	rot			
A6	22	orange	orange	grün	grün	grün	grün
B1	14	rot	rot	grün	rot	grün	
B2	5	rot	rot	grün	rot		
B3	22	orange	grün	grün	grün		grün
B4	16	rot	orange	grün	orange	grün	grün
B5	20	orange	grün	grün	grün		
B6	13	rot	grün		rot		
C	20	orange	rot	rot	rot		grün

### 4.3 MIKROEVOLUTION MULTIRESISTENTER BEIJING-STÄMME IM PATIENTEN

Die bisherigen Ergebnisse belegen, dass sich bestimmte resistente Beijing-*Outbreak*-Varianten speziell in den modernen Subgruppen Zentralasien und Russland W148 in den letzten 20 - 30 Jahren entwickelt und effektiv ausgebreitet haben. Die Übertragbarkeit von INH-, SM- und RMP-resistenten *Outbreak*-Stämmen wird wahrscheinlich durch die Kombination von genetischem Hintergrund, spezifischen *Low-cost*-Resistenz-vermittelnden Mutationen und kompensatorischen Effekten im Vergleich zu anderen MDR-Stämmen erhöht. Diese Eigenschaften könnten einen Teil der in verschiedenen Regionen der Welt gefundenen Assoziation zwischen Beijing-Genotyp und MDR-TB erklären. Ein weiterer Faktor könnte ein beschleunigter Resistenzwerb durch erhöhte Mutationsraten unter den verschiedenen physiologischen Bedingungen der langwierigen Therapie von MDR-TB-Patienten sein, der allerdings kontrovers diskutiert wird [63], [99], [100].

Um diese Hypothese zu überprüfen, habe ich die Genome von je drei bis vier seriellen Isolaten von drei MDR-TB-Patienten mittels NGS untersucht (Anhang 3). Patient A und C waren mit einem Beijing-Stamm der Subgruppe Zentralasien infiziert, Patient B mit einem Stamm der Subgruppe Russland W148. Alle Patienten entwickelten im Verlauf von bis zu 32 Monaten Antibiotikatherapie weitere Resistenzen. Dies führte zu einer extrem resistenten TB-Variante (XDR-TB). Identische IS6110 RFLP-Fingerabdrücke ließen nicht auf eine Reinfektion schließen (Daten nicht gezeigt, vergleiche [136]).

Ziel der NGS-Analyse war die Identifikation von dominierenden Subpopulationen in einem Patientenisolat und von Mutationen, die mit dem Erwerb von neuen Antibiotikaresistenzen in Verbindung stehen. Bei der Entwicklung eines Mutator-Phänotyps wurde das vermehrte Auftreten von nicht funktionellen oder nicht mit Resistenz-assoziierten Mutationen erwartet. Diese müssten mit den Resistenz-vermittelnden Mutationen kosegregieren, respektive mit selektioniert werden (*hitchhiking mutations*).

#### 4.3.1 DIE MIKROEVOLUTION IN PATIENT A UND B IST BESCHRÄNKT AUF DEN ERWERB VON RESISTENZ-VERMITTELNDEN MUTATIONEN

**Patient A** war zunächst mit einem multiresistenten Beijing-Stamm und einem INH- und SM-resistenten nicht Beijing Stamm infiziert, was bereits in der vorherigen Studie [137] durch standardisierte Genotypisierungstechniken erkannt wurde. Nach vier Monaten Therapie mit den Erstrangantibiotika INH, RMP, EMB, PZA wurde nur noch der Beijing-Stamm nachgewiesen und die Behandlung an die letzten bekannten Resistenzdaten angepasst. Durch mehrfache Fehltherapie, hauptsächlich durch Verzögerungen in der Detektion neuer Resistenzen, kam es im

Verlauf von 32 Monaten zur Entwicklung von sechs weiteren Resistenzen (PZA, PTH, PAS, AMI, CAP, LFX) (Abbildung 4.10C).

Durch eine erste Analyse der NGS-Daten konnten Mutationen, die Resistenzen gegen die Antibiotika INH, RMP, SM und EMB vermitteln, in allen analysierten Isolaten bestimmt werden (Tabelle 4.15). Interessanterweise wurden keine der typischen RMP-Resistenz-vermittelnden *Low-cost-* oder *No-cost-*Mutationen in der *rpoB* Hotspotregion zwischen dem Codon 426 und 452 (H37Rv Annotation, GenBank ID: NC\_000962.2) gefunden, sondern die Mutation *rpoB* V170F. Im Gen *rpoC* wurde die Mutation V483A identifiziert. Diese vermittelt keine Antibiotikaresistenz, wurde aber als kompensatorische Mutation von RMP-resistenten Isolaten beschrieben [76]. Ein weiterer interessanter Befund war, dass eine *Nonsense*-Mutation im Gen *ethA* nicht mit einer phänotypischen Resistenz gegen PTH korrelierte, wie in einigen Studien berichtet [138], [139].

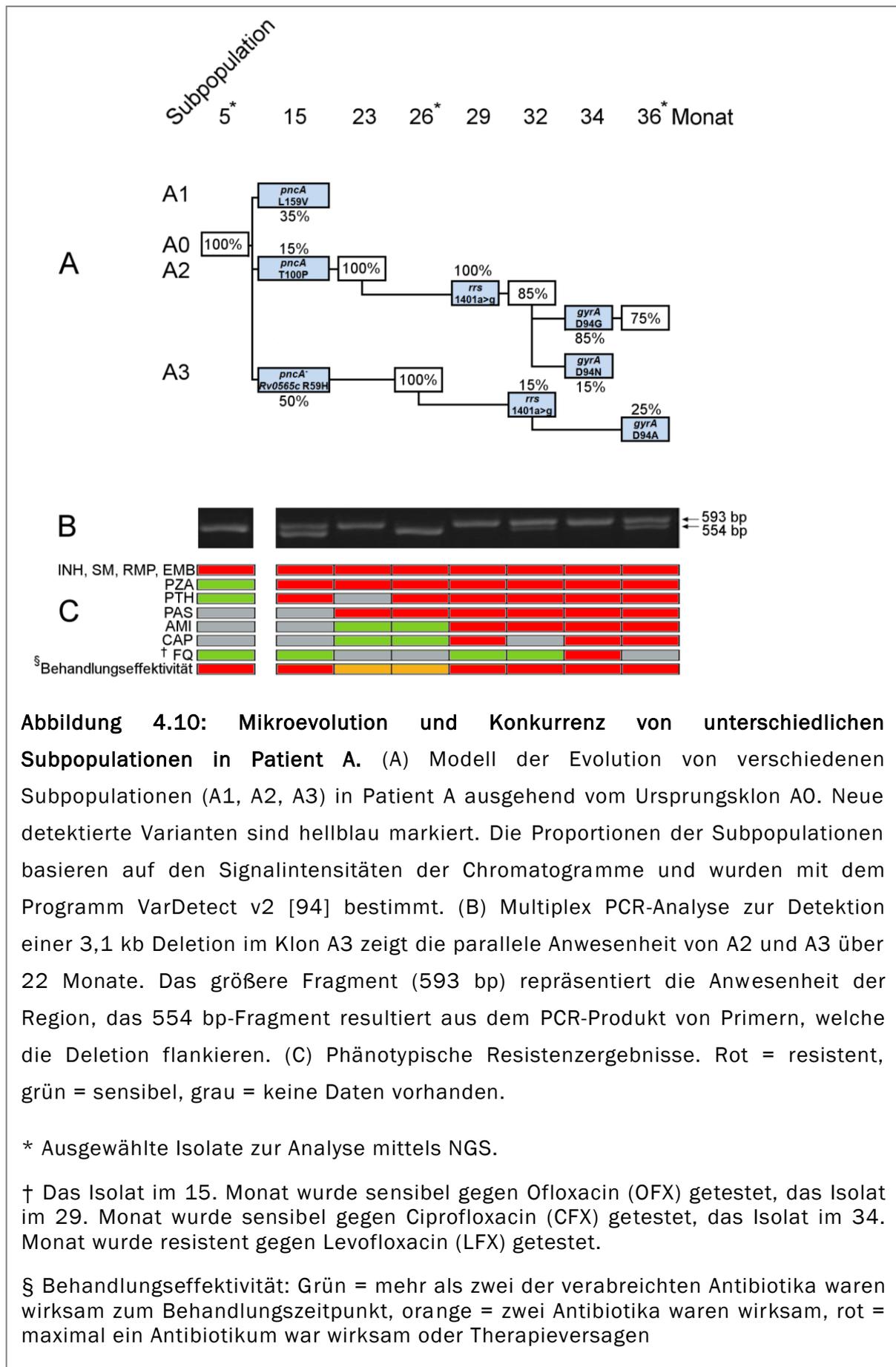
**Tabelle 4.15: Resistenz-vermittelnde Mutationen in allen Isolaten von Patient A.**

Gen	Polymorphismus	Vermittelt Resistenz gegen	Referenz
<i>katG</i>	S315T	INH	[140]
<i>rpsL</i>	K43R	SM	[14]
<i>embB</i>	M306I	EMB	[141]
<i>rpoB</i>	V170F	Nicht bekannt	Diese Arbeit
<i>ethA</i>	Q215*	PTH	[138], [139]

Insgesamt wurden in der Analyse der NGS-Daten 1.072 Polymorphismen im Vergleich zum Referenzgenom des Laborstammes H37Rv (GenBank ID: NC\_000962.2) identifiziert (Daten nicht gezeigt, vergleiche [136]). Dabei waren vier Polymorphismen variabel zwischen den drei seriellen Patientenisolaten, inklusive einer größeren (3,1 kb) Deletion *Rv2042\_Rv2045cdel* in einem Isolat (Daten nicht gezeigt, vergleiche [136]).

Um die Mikroevolution im Patienten detailliert zu verfolgen, wurden die vier mittels NGS detektierten Polymorphismen und Gene, die assoziiert sind mit neu erworbenen Resistenzen gegen die Antibiotika PZA, PTH, PAS, AMI, CAP, LFX (*pncA*, *ethA*, *thyA*, *rrs*, *gyrA*) durch Sanger-Sequenzierung in elf verfügbaren seriellen Isolaten untersucht. Diese Analyse offenbarte weitere, heterogene (gemischte) SNPs in einigen Isolaten, welche auf die Anwesenheit von drei Subpopulationen (A1, A2 und A3) schließen ließen (Daten nicht gezeigt, vergleiche [136]).

Im 15. Monat der MDR-TB-Therapie wurden erstmals die drei unterschiedlichen Subpopulationen durch unterschiedliche Varianten in den Genen *pncA* und *Rv0565c* detektiert (Abbildung 4.10A).



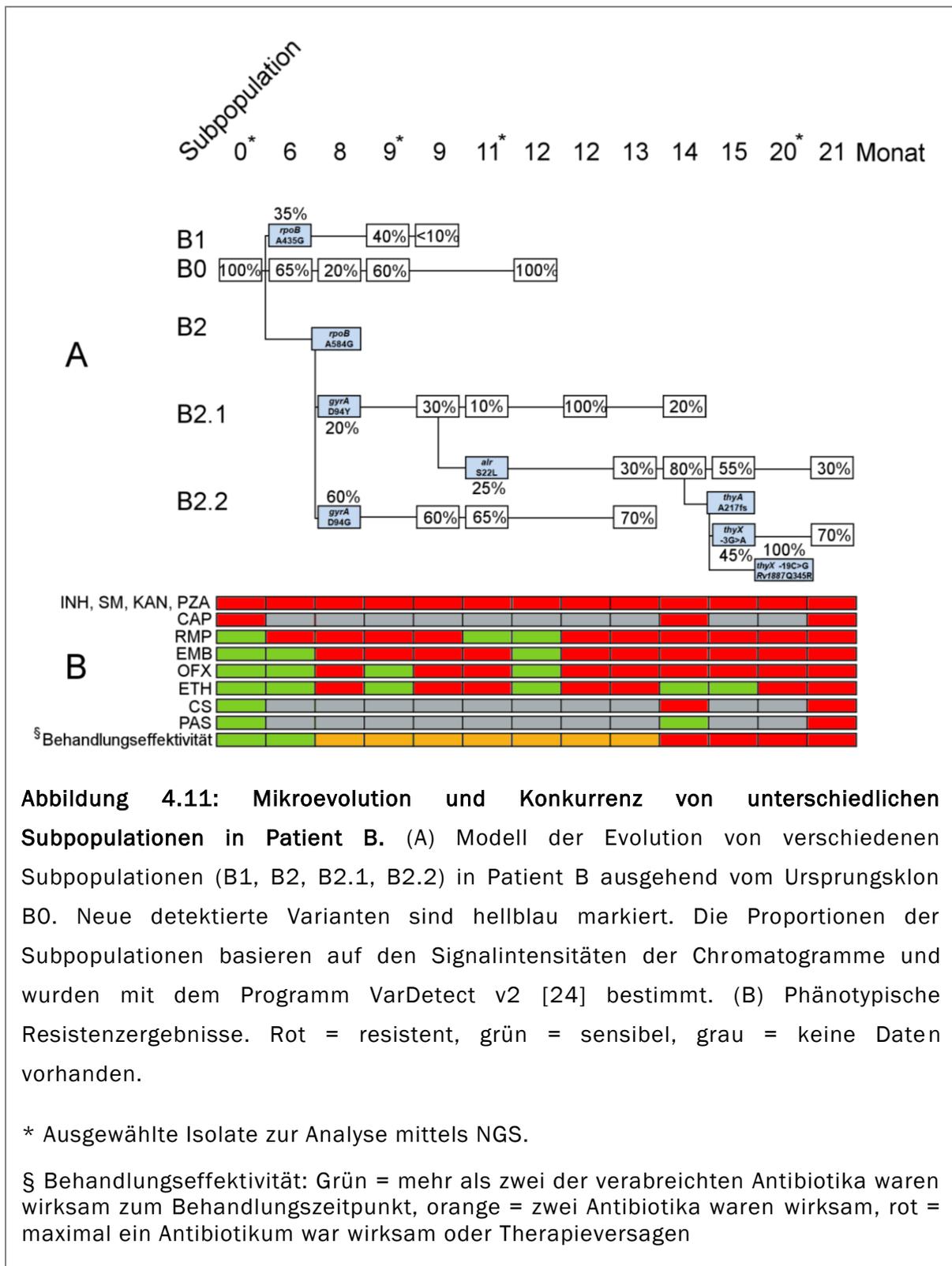
Dies ging einher mit einer phänotypischen Resistenzentwicklung gegen PZA und PTH (Abbildung 4.10A und C). Die Subpopulationen unterschieden sich durch die Polymorphismen *pncA* L159V (A1), T100P (A2) und *pncA*- (A3). *PncA*- (A3) wies eine 3,1 kb umfassenden Deletion, welche u. a. das Gen *pncA* betraf (aktiviert PZA [14], [142]), in Kombination mit der Mutation *Rv0565c* R59H auf. A1 wurde nur im Isolat aus dem 15. Monat detektiert. Die Anwesenheit der beiden Subpopulationen A2 und A3 wurde mittels PCR-Analyse bis in den 36. Monat der Therapie nachgewiesen (Abbildung 4.10B). Im weiteren Verlauf der Therapie haben die beiden Klone A2 und A3 beide die Mutation 1401 a>g im Gen *rrs* (kombinierte Resistenz gegen AMI und CAP [143], [144]) sowie unterschiedliche Mutationen im Gen *gyrA*: D94G und D94N (A2), D94A (A3) erworben. Letztere korrelierten mit dem Auftreten der Resistenz gegen LFX (Abbildung 4.10A und C).

**Patient B** war ursprünglich Teil einer prospektiven Studie [67], [145] zur Untersuchung von MDR-TB-Risikofaktoren in Abchasien (Georgien). Der Patient wurde zunächst nicht als MDR-Fall eingestuft (mit Resistenzen gegen INH, SM und KAN) und erhielt eine standardisierte Behandlung mit den Erstrangantibiotika INH, RMP, EMB und PZA für 13 Monate. Nachdem Resistenzen gegen RMP EMB nachgewiesen wurden, erfolgte die Umstellung auf eine MDR-TB-Therapie (hier als Monat 0 angegeben). Die Behandlung wurde mit den Antibiotika ETH, CAP, OFX, CS und PAS weitergeführt (persönliche Kommunikation mit Francis Varaine, Médecins sans Frontières, Paris, Frankreich).

Das Resistenzprofil in den folgenden 21 Monaten MDR-TB-Therapie war gekennzeichnet durch alternierende Episoden von resistenten und sensiblen Resistenztestungen gegen RMP, EMB, OFX, ETH (Abbildung 4.11B). Alle Isolate wurden zunächst sensibel gegen CAP, CS und PAS getestet. Basierend auf den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen wurde die Testung wiederholt und es konnte eine kombinierte Resistenz gegen KAN und CAP nachgewiesen werden, als auch der Resistenzerwerb gegen CS und PAS (Abbildung 4.11B). Durch die Analyse der NGS-Daten konnten Resistenzen gegen die Antibiotika INH, ETH, SM, PZA, KAN, RMP, EMB mit spezifischen Mutationen in allen Isolaten von Patient B korreliert werden (Tabelle 4.16).

**Tabelle 4.16: Resistenz-vermittelnde Mutationen in allen Isolaten von Patient B.**

Gen	Polymorphismus	Vermittelt Resistenz gegen	Referenz
<i>katG</i>	S315T	INH	[140]
<i>inhA</i> promotor	-15 C>T	INH/ETH	[146], [147]
<i>rpsL</i>	K43R	SM	[14]
<i>pncA</i>	L151S	PZA	[14], [142]
<i>rrs</i>	1401 a>g	KAN	[14], [148]
<i>rpoB</i>	L452P	RMP	[149]
<i>embB</i>	G406D	EMB	[130]



In den vier mittels NGS untersuchten Isolaten wurden zunächst 1.575 Polymorphismen im Vergleich zur Referenz H37Rv (GenBank ID: NC\_000962.2) identifiziert (Daten nicht gezeigt, vergleiche [136]). Davon waren sechs Polymorphismen variabel zwischen den seriellen Isolaten (Daten nicht gezeigt, vergleiche [136]).

Analog zu Patient A wurden bei Patient B diese sechs Polymorphismen und Gene (*rpoB*, *embB*, *gyrA*, *ethA*, *alr*, *thyA*), die in Verbindung mit erworbenen Resistenzen gegen die Antibiotika RMP, EMB, OFX, ETH, CS und PAS stehen, per Sanger-Sequenzierung in 15 verfügbaren seriellen Isolaten untersucht. Insgesamt wurden acht SNPs und eine ein bp Deletion gefunden. Diese Polymorphismen korrelierten mit dem Erwerb weiterer Antibiotikaresistenzen und konnten fünf unterschiedlichen, parallel existierenden Subpopulationen (B0, B1, B2, B2.1, B2.2) zugeordnet werden (Abbildung 4.11A und B).

B1 und B2 unterschieden sich durch die Mutationen *rpoB* A435G (B1) und *rpoB* A584G (B2), deren Auftreten in den seriellen Isolaten mit einem RMP-resistenten Phänotypen korrelierte (Abbildung 4.11A und B). Der RMP-sensible Klon B0 konnte alleinig im 12. Monat detektiert werden und wies keine weiteren Mutationen auf.

Der Klon B2 differenzierte sich in weitere Subpopulation (B2.1 und B2.2), die durch Mutationen im Gen *gyrA*: D94Y (B2.1) und D94G (B2.2) charakterisiert sind (vermitteln Resistenz gegen FQ [150]). B2.1 wurde mit der Kombination der Mutationen *rpoB* A584G und *gyrA* D94Y ausschließlich in Isolaten nach dem 13. Monat der MDR-TB-Therapie gefunden (Abbildung 4.11A). Weiterhin erwarb B2.1 zusätzliche Mutationen in den Genen *alr* (S22L) und *thyA* (A217fs), die mit dem Erwerb von Antibiotikaresistenzen gegen CS und PAS korrelierten. Damit war B2.1 gegen elf Antibiotika resistent und der einzige nachweisbare Klon nach 15 Monaten MDR-TB-Therapie (Abbildung 4.11A und B). Weiterhin wurden in B2.1 die Promotormutationen *thyX* -3G>A und -19C>T in PAS-resistenten Isolaten mit der Mutation *thyA* A217fs gefunden (Abbildung 4.11A und B). Die Mutation Q345R im Gen *Rv1887* trat nur in Kombination mit der Mutation *thyX* -19C>T auf.

Insgesamt war die Mikroevolution von Beijing-Stämmen in Patient A und B charakterisiert durch die parallele Anwesenheit und Konkurrenz unterschiedlicher Subpopulationen. Diese erworben unabhängig voneinander und schrittweise verschiedene Resistenz-vermittelnde Mutationen im Verlauf einer, in diesen Fällen mangels aktueller Resistenzergebnisse, unzureichenden MDR-TB-Therapie. In diesem Prozess wurden Subpopulationen mit den meisten Antibiotikaresistenzen selektioniert, gefolgt von dem Erwerb zusätzlicher, möglicherweise kompensatorischer Mutationen (z. B. *thyX*-Promotormutationen in PAS-resistenten Isolaten).

### 4.3.2 DIE NGS-ANALYSE OFFENBARTE EINE REINFEKTION MIT EINEM XDR-STAMM BEI PATIENT C

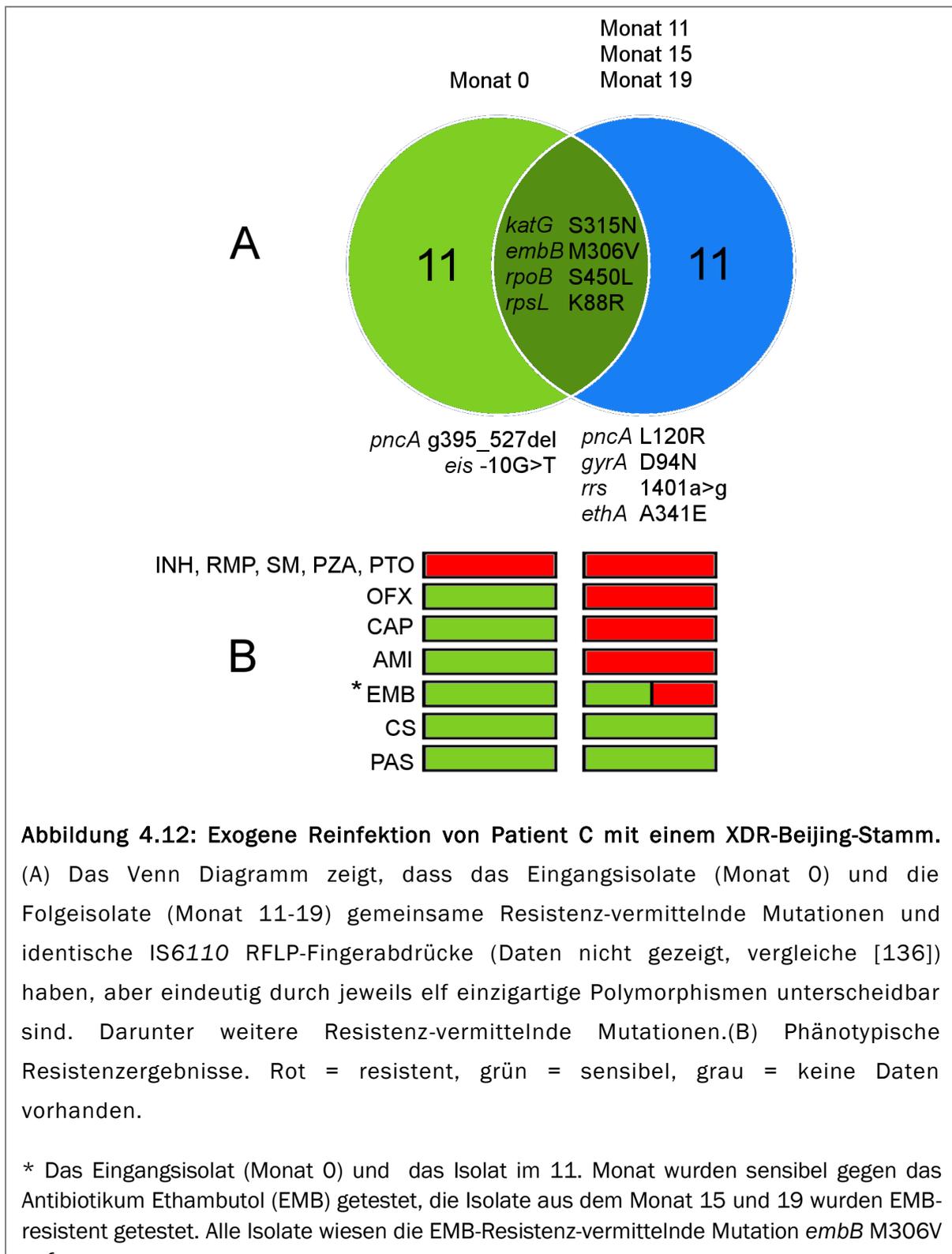
Patient C war Teil einer Studie [69], welche die Entwicklung von OFX-Resistenz und XDR-TB im Verlauf einer MDR-TB-Behandlung in Usbekistan untersuchte. Das Eingangsisolat wurde resistent gegen INH, RMP, SM, PZA und PTH getestet. Nach elf Monaten wurden weitere Resistenzen gegen OFX, AMI und CAP festgestellt, welche den Patienten als XDR-Fall klassifizierten. Weitere vier Monate später wurde die Kultur zusätzlich resistent gegen EMB getestet. Alle vier seriellen Isolate wiesen einen identischen genetischen Fingerabdruck (IS6110 RFLP-Typ und Spoligotyp) auf (Daten nicht gezeigt, vergleiche [136]), zudem hatten alle vier seriellen Isolate identische Resistenz-vermittelnde Mutationen für die Erstrangantibiotika INH, SM, EMB, RMP (Tabelle 4.17). Diese Daten deuteten, wie bei Patient A und B, auf ein Therapieversagen und die Entwicklung von vier weiteren Antibiotikaresistenzen innerhalb von 15 Therapiemonaten hin (Abbildung 4.12B).

**Tabelle 4.17: Resistenz-vermittelnde Mutationen in allen Isolaten von Patient C.**

Gen	Polymorphismus	Vermittelt Resistenz gegen	Referenz
<i>katG</i>	S315T	INH	[140]
<i>rpsL</i>	K88R	SM	[14]
<i>embB</i>	M306V	EMB	[130]
<i>rpoB</i>	S450L	RMP	[149]

In den vier mittels NGS untersuchten seriellen Isolaten wurden insgesamt 1.164 Polymorphismen im Vergleich zur Referenz H37Rv (GenBank ID: NC\_000962.2) identifiziert (Daten nicht gezeigt, vergleiche [136]). Im Gegensatz zu Patient A und B, welche einen schrittweisen Erwerb einzelner Resistenz-vermittelnder Mutationen zeigten, wurden bei Patient C jeweils elf einzigartige Polymorphismen gefunden, die das Eingangsisolat (Monat 0) von dem Folgeisolat (Monat 11) differenzierten (Abbildung 4.12A). Dagegen wiesen die seriellen Isolate aus dem 15. Monat und dem 19. Monat keine weiteren Mutationen auf.

Die Resistenz gegen OFX ist auf die Mutation *gyrA* D94N zurückzuführen [150]. Die Mutation 1401 a>g im Gen *rrs* vermittelt Resistenz gegen die Antibiotika AMI und CAP [143], [144]. Unterschiedliche Mutationen im Gen *pncA* (vermittelt Resistenz gegen PZA [14], [142]): Monat 0 *pncA* g.395\_527del und Monat 11-19 *pncA* L120R, bestätigten, dass es sich hier nicht um eine Resistenzentwicklung durch Fehltherapie, sondern um eine Reinfektion mit einem XDR-Stamm handelte. Dies konnte im Nachhinein durch eine MIRU-VNTR-Typisierung belegt werden, welche einen Unterschied in einem von 24 untersuchten MIRU-VNTR-Loci zeigte (Daten nicht gezeigt, vergleiche [136]).



## 5 DISKUSSION

Die Übertragung von multiresistenten TB-Stämmen ist eine der größten Bedrohungen bei der Bekämpfung der TB und der MDR-TB-Epidemie. In den USA [83], Südafrika [151], der ehemaligen Sowjet-Union und Russland [86], [64]–[66], [152], [67], [68] wurden bereits hohe MDR-TB-Raten, hauptsächlich durch die Übertragung von MDR-Klonen, nachgewiesen. Die in vielen Studienregionen gezeigte Assoziation zwischen Antibiotika-Resistenz und Stämmen des Beijing-Genotyps könnte auf eine spezielle Kapazität von Beijing-Stämmen zum Erwerb und Übertragung von Resistenzen sowie der Entwicklung von hochvirulenten Varianten von resistenten TB-Stämmen hinweisen [81], [85], [91], [93]. Bei mangelnder Infektionskontrolle und dem Erwerb weiterer Resistenzen durch Therapieversagen besteht das Risiko, dass ein möglicherweise hypervirulenter extrem resistenter Phänotyp zu einer globalen Ausbreitung von XDR-TB führt, welche auch mit neuesten Antibiotika sehr schwer zu kontrollieren wäre. Auf die spezielle Bedeutung von Beijing-Stämmen für die Ausbreitung von MDR-TB deuten auch *in vivo* Studien hin, die Anzeichen für eine erhöhte Virulenz von Beijing-Stämmen im Mausmodell [153], [60], [61] und in humanen Makrophagen [58], [154]–[156] zeigen. Allerdings berichten nicht alle Studien von einer erhöhten Virulenz und sogar nah verwandte Beijing-Stämme wiesen unterschiedliche Virulenzlevel oder widersprüchliche immunologische Charakteristika (z. B. Fähigkeit für die Induktion einer Immunantwort) oder unterschiedliche klinische Parameter (z. B. Ausprägung pathologischer Befunde) auf [91].

Eine Hauptursache dafür könnte in der genetischen Variabilität von Beijing-Stämmen liegen. Um diese Hypothese zu untersuchen wurde in dieser Arbeit erstmals die globale Populationsstruktur von Beijing-Stämmen beschrieben und die Assoziation von bestimmten Subgruppen (klonale Komplexe) mit MDR-TB gezeigt. Die Genomanalyse einer repräsentativen Kollektion von Beijing-Stämmen belegte die massive Expansion von zwei INH- und SM-resistenten Varianten. Die klonale Ausbreitung einer dieser Beijing-Varianten (*W148-outbreak*) in den letzten Jahrzehnten ist gekennzeichnet durch die Selektion von speziellen RMP-Resistenz-vermittelnden Mutationen mit sehr geringen Wachstumsdefiziten und der Akkumulation von kompensatorischen Mutationen innerhalb der Population. Der schrittweise Erwerb weiterer Resistenzen hin zu einzelnen XDR-Varianten und möglicherweise weiteren kompensatorischen Effekten wurde in drei Patienten untersucht.

## 5.1 GLOBALE DIVERSITÄT VON MTBK-BEIJING-STÄMMEN

In bisherigen Studien wurden die genetische Diversität der weltweit zirkulierenden Stämme des Beijing-Genotyps und die globale Populationsstruktur von Beijing-Stämmen nur unzureichend beschrieben. Ein erstes Indiz für eine größere Diversität von Beijing-Stämmen ergab der Genomvergleich von zwei klinischen Beijing-Isolaten aus Karakalpakstan (Usbekistan) mit identischen IS6110 RFLP-Fingerabdrücken. Die beiden Stämme wiesen eine genetische Distanz von 130 Punktmutationen (SNPs) und einer 257 bp-Deletion auf [157]. Extrapoliert auf die globale Population von Beijing-Stämmen deuten diese Daten eine sehr große Genomvariabilität an, die maßgeblich die Pathogenität verschiedener Beijing-Varianten beeinflussen könnte. Dies würde auch diskrepante Ergebnisse von Beijing-Stämmen zu einem erhöhten Resistenzerwerb und Unterschieden in der Virulenz oder der Immunogenität (Fähigkeit eine Immunantwort auszulösen) erklären [91], [157].

Um Beijing-Stämme in Zukunft detailliert beschreiben zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit die globale Populationsstruktur von 4.987 klinischen Isolaten des Beijing-Genotyps auf Basis von Mikrosatelliten-Markern (MIRU-VNTR, 24 Loci) analysiert, sieben klonale Komplexe identifiziert und deren weltweite Verbreitung und Assoziation mit MDR-TB aufgezeigt. Auf dieser Grundlage wurde eine genombasierte Phylogenie von 110 Beijing-Stämmen aus 28 Herkunftsländern rekonstruiert, welche die Unterteilung in acht Subgruppen erlaubte und die Expansion von zwei INH- und SM-resistenten Beijing-Varianten (*Zentralasien-Outbreak* und *W148-Outbreak*) offenbarte.

Die Unterteilung der MIRU-VNTR-basierten Populationsstruktur von Beijing-Stämmen in sieben klonale Komplexe ist weitestgehend kongruent mit bekannten Beijing-spezifischen Deletionen (*regions of difference*, RD) [92] und IS6110-Insertionen in der NTF-Region (*noise transfer function region*) [85] (Tabelle 4.2 - 4.4). In Kombination mit einer robusten genombasierten Phylogenie und in Übereinstimmung mit weiteren bekannten Markern (SNPs) [94], konnten sechs klonale Komplexe bestätigt und die klonalen Komplexe 4 und 6 weiter differenziert werden, so dass insgesamt acht Subgruppen mit spezifischen Punktmutationen bestimmt werden konnten (Abbildung 4.4). Isolate aus dem MIRU-VNTR-basierten klonalen Komplex 3 und dem assoziierte parentale Knotenpunkt (MLVA 15-9 Cluster: 1048-32) gehören allerdings im genom-basierten Stammbaum nicht zu einer monophyletischen Gruppe. In diesem Fall sowie für einzelne Isolate an den äußeren Spitzen der anderen klonalen Komplexe hat die konvergente Evolution bestimmter MIRU-VNTR-Marker zu einer inkorrekten Gruppierung nicht nah verwandter Isolate geführt (Homoplasie) [124].

Die PCR-Analyse der größeren Beijing-spezifischen chromosomalen Deletionen RD207, RD105, RD181, RD150, RD142 bestätigt, dass die Deletion der Regionen RD207 und RD105 charakteristisch für alle Beijing-Stämme ist. Des Weiteren differenzieren sich die Subgruppen Ancestral 2 und 3 sowie die modernen Subgruppen durch die Deletion der Region RD181 von der ursprünglichsten Subgruppe Ancestral 1. Die Deletion der Region RD150 ist spezifisch für die Subgruppe Pazifik RD150 (Abbildung 4.4). Eine Deletion der RD142-Region konnte hingegen in keinem der getesteten Isolate durch eine PCR-Analyse bestätigt werden. Dieser Befund konnte auch in allen 110 mittels NGS untersuchten Isolate durch 100%ige Abdeckung der 2.851 bp umfassenden Region von Position 1.332.182 -1.335.033 (H37Rv Annotation, GenBank ID: NC\_000962.2) durch Sequenzdaten (*reads*) bestätigt werden. Dies schließt die Deletion der Region RD142 als spezifischen Marker für einzelne globale Subgruppen von Beijing-Stämmen aus. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob die Deletion der Region RD142 ein Marker für bestimmte US-amerikanischen Beijing-Isolate ist, oder aufgrund falscher Stammklassifizierung von Tsolaki und Kollegen als Beijing-Marker identifiziert worden ist [92].

Die Insertion von IS6110-Sequenzen in der NTF-Region wurde bisher verwendet, um moderne Beijing-Stämme von ancestralen Beijing-Stämmen zu differenzieren [81], [91], [142]. Die Insertion eines IS6110-Elementes am 3'-Ende bzw. zwei Insertionen am 5'- und 3'-Ende der NTF-Region diskriminiert moderne Beijing-Subgruppen von den Subgruppen Ancestral 1 und 2 (keine IS6110-Insertion in der NTF-Region) (Abbildung 4.4). Die Subgruppe Ancestral 3 nimmt entsprechend der Topologie des *Maximum-Likelihood*-Stammbaums eine Übergangposition zwischen ancestralen und modernen Beijing-Stämmen ein. In dieser Subgruppe wurden Isolate mit einer einzelnen bisher nicht bekannten IS6110-Insertion am 5'-Ende der NTF-Region gefunden (Abbildung 4.4). Aufgrund einiger diskrepanter IS6110 NTF-Insertionsprofile in modernen Beijing-Subgruppen (Abbildung 4.4) sind die zwei bereits beschriebenen Mutationen *ogt R37L* und *mut2 G58R* [94] am besten geeignet, um moderne Beijing-Stämme (*mut2 G58R*), von ancestralen Beijing-Stämmen zu unterscheiden. Weiterhin kann die Subgruppe Ancestral 3 durch die Mutationen *ogt R37L* von den Subgruppen Ancestral 1 und 2 unterschieden werden (Abbildung 4.4).

## 5.2 URSPRUNG UND GLOBALE VERBREITUNG VON MTBK-BEIJING-STÄMMEN

Beijing-Stämme sind heutzutage weltweit verbreitet (Abbildung 4.2). Die globalen Proportionen von Beijing-Stämmen unter allen klinischen TB-Isolaten wurden von Madelaine Hanekom und Kollegen [91] 2011 in einer Metaanalyse wie folgt aufgelistet: Afrika (9,2%, n=1.491), Nordamerika (15,1%, n=9.149), Mittelamerika (2,8%, n=1.232), Südamerika (0,65%, n=2.471),

Europa (7,1%, n=11.393), Ostasien (43,1%, n=2.600), Zentralasien (18,2%, n=2.422), Pazifik (24,6%, n=187). Durch die Klassifizierung in verschiedene klonale Komplexe konnte in dieser Arbeit auch erstmals eine differenzierte weltweite Verteilung unterschiedlicher Beijing-Subgruppen gezeigt werden.

Die hohen Proportionen von ancestralen Beijing-Stämmen (klonaler Komplex 6 und 7) in Ostasien (Abbildung 4.2) bestätigten den bereits vermuteten Ursprung dieses Genotyps in China, nahe der Hauptstadt Peking, in der 1995 über 80% der klinischen Isolate dem Beijing-Genotyp zugeordnet wurden [158]. Basierend auf den Herkunftsländern der ancestralen Beijing-Stämme der hier untersuchten globalen Stammkollektion, könnte der Ursprung allerdings auch in Korea liegen. Hier wurden 219/400 (54,8%) der Isolate aus dem ancestralen klonalen Komplex 7 zugeordnet. Im Vergleich dazu gehören nur 21/549 (3,8%) der Isolate aus China und 3/68 (4,4%) der Isolate aus Peking sowie 21/91 (23,1%) der Isolate aus Japan zu diesen ursprünglichsten heute noch vorkommenden Beijing-Stämmen (klonaler Komplex 7).

Interessanterweise konnten diese ancestralen Stämme (klonaler Komplex 7) auch bei 251/787 (31,9%) der mit einem Beijing-Stamm infizierten TB-Patienten in den USA isoliert werden (Anhang 23). Der Großteil dieser Isolate (207/251, 82,5%) wurde jedoch in vier MIRU-VNTR-Clustern nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Dies deutet auf eine starke kürzliche regionale Ausbreitung von vier unterschiedlichen Klonen hin. Diese Daten widersprechen der Hypothese, dass sich ancestrale Beijing-Stämme bereits vor über zehn Tausend Jahren mit der Migration der ersten Menschen über die Behring-Landbrücke nach Nordamerika ausgebreitet haben [159]. In diesem Fall würde man eine vergleichbare Anzahl von unterschiedlichen MLVA 15-9 Typen aus dem ursprünglichen klonalen Komplex 7 in den USA und beispielsweise Korea erwarten. In den USA hingegen umfassen die Beijing-Stämme lediglich 38 verschiedene MLVA 15-9 Typen unter 251 Stämmen aus dem klonalen Komplex 7 (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich dazu wurden unter 219 Stämmen des klonalen Komplexes 7 aus Korea 161 unterschiedliche MLVA 15-9 Typen identifiziert.

Diese reduzierte Diversität von ancestralen Beijing-Stämmen (klonaler Komplex 7) in den USA im Vergleich zum hypothetischen Ursprung in Korea, deutet auf eine Einführung der Beijing-Stämmen in Nordamerika frühestens zu Beginn der Neuzeit (ca. 16. Jahrhundert) hin. Diese Hypothese wird unterstützt von einer kürzlich veröffentlichten NGS-Studie von Inaki Comas und Kollegen zum Ursprung und zur globalen Ausbreitung von MTBK-Genotypen [53]. Die Autoren berechneten das Alter des letzten gemeinsamen Beijing-Vorfahren auf etwa 8.000 Jahre (Konfidenzintervall: 6.000 – 11.000 Jahre). Mit Ende der letzten Eiszeit vor 10.000 Jahren war jedoch die Landverbindung zwischen Asien und Nordamerika bereits unterbrochen [160]. Die Ausbreitung ancestraler Beijing-Stämme in Nordamerika vor dem Ende der letzten Eiszeit ist damit sehr unwahrscheinlich.

Die Ausbreitung moderner Beijing-Stämme korrelierte in der in dieser Arbeit durchgeführten Sequenz-basierten Analyse der Populationsdynamik (effektiven Populationsgröße, Koaleszenzanalyse, Abbildung 4.6) mit dem Beginn der Industrialisierung und Urbanisierung zu Beginn des 19. Jahrhunderts. Auch die signifikant ( $P < 0,0001$ ) erhöhten MIRU-VNTR-Clusterraten von modernen Beijing-Stämme (klonale Komplexe 1 - 5) im Vergleich zu den ancestralen Beijing-Stämmen (klonale Komplexe 6 und 7) deuten auf eine kürzlich erfolgte weltweite Expansion aller modernen Beijing-Subgruppen.

Die Diversität der modernen klonalen Komplexe ist in Süd-Ostasien und Nordamerika am höchsten (Abbildung 4.2 und Tabelle 4.5). Dies könnte einerseits auf eine lokale, andauernde Diversifizierung des Beijing-Genotyps hindeuten oder es ist ein, evolutionär gesehen, kurzfristiger Effekt der Globalisierung und der massiven Durchmischung von verschiedenen TB-Stämmen in der lokalen Bevölkerung. Wie oben beschrieben, haben die heute weltweit vorkommenden Beijing-Stämme ihren Ursprung wahrscheinlich in Ostchina, was die Diversität von Beijing-Stämmen in Süd-Ostasien erklärt. Die Diversität von modernen Beijing-Stämmen in den USA basiert, analog zur Verbreitung der ancestralen Beijing-Stämme (klonaler Komplex 7) in den USA, wahrscheinlich auf demografischen Effekten der Neuzeit (Globalisierung). Ein Indiz dafür ist auch die hohe Clusterrate von 88,1% (693/787) von US-amerikanischen Beijing-Isolaten im Vergleich zu 53,0% (291/549) von chinesischen Beijing-Isolaten (Daten nicht gezeigt). In der Pazifikregion, Süd- und Ostafrika, Zentralasien, Europa und Russland dominieren einzelne moderne klonale Komplexe bzw. die jeweiligen assoziierten Subgruppen (Abbildung 4.2).

Ein interessanter Aspekt bei den in Osteuropa und Russland dominierenden klonalen Komplexen 1 und 2 ist die signifikant erhöhte Rate von MDR-Stämmen die zusätzlich eine hohe MIRU-VNTR-Clustertrate aufwiesen (Abschnitt 4.1.3, Tabelle 4.6), was auf eine massive Expansion von zwei multiresistenten Beijing-Varianten schließen ließ. Tatsächlich bestätigte die erheblich geringere ( $P < 0,05$ ) Genomdiversität dieser beiden Beijing-Varianten im Vergleich zu allen anderen Subgruppen die klonale Ausbreitung (*Outbreak*) von zwei INH- und SM-resistenten Klonen (Zentralasien-*Outbreak* und W148-*Outbreak*). Ein Großteil der Isolate in beiden *Outbreaks* wies zusätzliche RMP-Resistenz-vermittelnde Mutationen auf. Auf Grundlage der mittleren genetischen Distanz beider *Outbreak*-Klone und einer beobachteten Mutationsrate von 0,3 - 0,5 SNPs pro Genom pro Jahr in nachgewiesenen Infektionsketten [113], [114], [126], verbreiten sich beide Varianten wahrscheinlich bereits seit ca. 20 - 30 Jahren.

Anzeichen für einen Beijing-*Outbreak* wurden auch in Peru gefunden. 66/78 (84,6%) der peruanischen Beijing-Stämme konnten mit einem MIRU-VNTR-Cluster assoziiert werden. Dabei dominieren die beiden MLVA 15-9 Typen 3832-175 ( $n = 29$  Isolate) und 1048-32 ( $n = 20$  Isolate) (Daten nicht gezeigt). Tomotada Iwamoto und Kollegen [161] beobachteten eine ähnlich hohe MIRU-VNTR-Clusterrate (80,3% basierend auf 24 Loci MIRU-VNTR-Daten) in Lima. Beide MLVA 15-

9 Typen (3832-175 und 1048-32) gehören jedoch zum klonalen Komplex 3, welcher Anzeichen von konvergenten MIRU-VNTR-Markern zeigte (vergleiche Abschnitt 5.1), die zwei in dieser Arbeit mittels NGS sequenzierten Beijing-Stämme aus Lima (beide MLVA 15-9 Typ 3832-175) trennten allerdings nur 14 SNPs. Sollte sich diese genetische Distanz für weitere Isolate aus Lima bestätigen, wäre das vergleichbar mit dem in dieser Arbeit definierten Zentralasien-*Outbreak* und dem W148-*Outbreak* mit einer mittleren Distanz von 17 SNPs, respektive 23 SNPs (Abbildung 4.5 und Abschnitt 4.1.3).

### 5.3 HINWEISE AUF POSITIVE SELEKTION IN MODERNEN BEIJING-STÄMMEN

Wie in Abschnitt 5.2 angedeutet kann aus der weltweiten Dominanz und den signifikant höheren Clusterraten (77,6% - 87,8%) von modernen Beijing-Stämmen im Vergleich zu den ancestralen Beijing-Stämmen (46,6% - 65,7%) (vergleiche Abschnitt 4.1.1 und 5.2) auf die vermehrte Verbreitung dieser Stämme geschlossen werden. Interessanterweise konnten auch eindeutige Unterschiede in den Wachstumskurven zwischen modernen und ancestralen Beijing-Stämmen in Flüssigmedium beobachtet werden (Abbildung 4.7). Moderne Beijing-Stämme zeigten eine steilere Wachstumskurve und erreichten eine signifikant höhere optische Dichte ( $OD_{594}$ ) nach 14 Tagen *in vitro* Kultivierung (Abbildung 4.7, Anhang 27). Diese Unterschiede in den Wachstumskurven deuten auf einen veränderten Phänotyp von modernen Beijing-Stämmen hin. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich in den 81 für moderne Beijing-Stämme spezifische Polymorphismen (SNPs und kleinen Deletionen) (Anhang 6) codiert, welche möglicherweise die genetische Grundlage für eine erhöhte Virulenz, im Vergleich zu ancestralen Beijing-Stämmen, vermitteln und dadurch die Evolution von *Outbreak*-Varianten begünstigen. Eine visuelle Inspektion von nicht durch Sequenzdaten abgedeckten Genombereichen der H37Rv-Referenzsequenz in allen mittels NGS analysierten Beijing-Isolaten ergab keine Hinweise auf neue größere Deletionen (RDs) in modernen Beijing-Stämmen. Die 81 für moderne Beijing-Stämme charakteristischen Polymorphismen bieten damit hervorragende Ansatzpunkte, um die Funktion potentieller Virulenz-erhöhender Varianten zu untersuchen.

Mit diesen 81 Polymorphismen konnte ein Set von definierten Genvarianten identifiziert werden, das den spezifischen genetischen Hintergrund von modernen Beijing-Stämmen beschreibt. Darunter waren 69 SNPs in proteincodierenden Bereichen, wovon 53 SNPs (76,8%) zu einem Austausch einer Aminosäure (nicht synonyme Mutation) führten und einen selektiven Vorteil vermitteln könnten. Ein ähnlich hohes Verhältnis (62%) von nicht synonymen zu synonymen Mutationen wurde von Ruth Hershberg und Kollegen für den gesamten MTBK in 89 konkatenierten Gensequenzen beobachtet [52]. Die Autoren deuteten dies als Konsequenz einer durch das menschliche Immunsystem gesteuerten diversifizierenden Selektion von MTBK-

Stämmen [52]. Die Analyse des Verhältnisses von nicht synonymen zu synonymen Mutationen von einzelnen Subgruppen moderner Beijing-Stämme in dieser Arbeit zeigte vergleichsweise hohe dN/dS-Raten von *mce*-Genen (*mammalian cell entry*) (0,91 - 1,83) und Virulenz-assoziierten Proteinen (*vapBC*) (1,1). Dies könnte ein Hinweis auf eine positive Selektion dieser Genfamilien sein (Tabelle 4.8). Im Vergleich dazu wurden in randomisierten Gensets aus jeweils 300 essentiellen (0,68 - 0,8) und 300 nicht essentiellen Genen (0,26 - 0,42) sowie Lipoproteinen (mangels Mutationen nicht berechenbar), ribosomalen Proteinen und Polymerasen (0,71) und T-Zell Antigenen (0,47 - 0,71) in allen modernen Beijing-Subgruppen geringere dN/dS-Raten gefunden (Tabelle 4.8). Dies spiegelt sich auch in einer zwei bis dreifach erhöhten Mutationsrate pro bp von *mce*- und *vapBC*-Genen wider (Tabelle 4.8). Darüber hinaus wiesen moderne Beijing-Stämme signifikant mehr nicht synonyme Mutationen in *mce*- und *vapBC*-Genen auf als in essentiellen Genen sowie in nicht essentiellen Genen. Diese erhöhte Aminosäuresubstitutionsrate in Mce- und VapBC-Proteinen ist einzigartig in modernen Beijing-Stämmen und konnte nicht bei ancestralen Beijing-Stämmen nachgewiesen werden (Tabelle 4.9). Die Anzahl der SNPs ist jedoch sehr gering und eine möglicherweise biologische Funktionalität der Genvarianten muss z.B. durch Komplementationsexperimente und entsprechende Mutanten bewiesen werden.

Bisherige Studien unterstreichen die Bedeutung der *mce*-Operons [162]–[166] und *vapBC*-Gene [167]–[169] im Zusammenhang mit Virulenz und Fitness. *Mce*-Operons wurden bisher in allen *Mycobacterium*-Spezies identifiziert. Im Referenzgenom des virulenten Laborstammes *M. tuberculosis* H37Rv (GenBank ID: NC\_000962.2) sind vier Operons codiert [119]. In *M. smegmatis* wurden sechs Operons identifiziert [170]. Jedes *mce*-Operon besteht aus zwei sogenannten *yrbE*-Genen (A und B) und sechs *mce*-Genen (A - F) und möglicherweise weiteren konservierten *mce*-assoziierten Genen [119]. Die Funktion dieser Gene ist größtenteils noch unklar. Es wird vermutet, dass Mce-Proteine an der Zelloberfläche lokalisiert sind und mit den Wirtszellen interagieren und einige *mce*-Gene für mögliche ABC-Transporter codieren [171]. Das *M. tuberculosis* *mce3*-Operon fehlt im attenuierten TB-Stamm *M. bovis* sowie in den nicht tuberkulösen Mykobakterien *M. avium* und *M. smegmatis* [171]. Erstaunlicherweise gelang es der Gruppe um Lee Riley, durch Expression des *mce1A* Gens in einem nicht invasivem *Escherichia coli* Stamm, diesen so zu modifizieren, dass er in der Lage war humane Epithelzellen zu infizieren und in humanen Makrophagen zu überleben [172]. Die Inaktivierung des *mce1*-Operons in *M. tuberculosis* führte zu einem hypervirulenten Phänotyp, möglicherweise durch eine gestörte Wirt-Pathogen-Interaktion [162], [164]. Andere *mce*-Operon Mutanten zeigten einen attenuierten Phänotyp [163], [165]. Ein möglicher Einfluss von *mce*-Genen auf die Biosynthese der Zellwand oder in der Aufrechterhaltung der Zellstruktur konnte in *M. smegmatis* gezeigt werden [170]. Die Deletion von *mce*-Operons führte hier zu einem veränderten Kolonienwachstum, zu mehr Klumpenbildung und zu veränderten Biofilmeigenschaften [170].

Neben den vier spezifischen SNPs in modernen Beijing-Stämmen in *mce*-Genen (*mce1E* 30 G>T, *Rv1972* H124Q, *yrbE2B* A113T, *mce4C* R191D) könnten auch die Varianten *mce1D* I188T und *mce2F* N432S, welche in allen Beijing-Stämmen mit Ausnahme der Subgruppe Ancestral 1 auftreten sowie die Russland W148-Polymorphismen *mce3B* S49A und *Rv1972* V44del möglicherweise zu einer erhöhten Virulenz oder zu einer veränderten Wirt-Pathogen-Interaktion beitragen.

Die Virulenz-assoziierten Proteine VapBC wurden in einer Vielzahl unterschiedlicher Spezies von Prokaryoten identifiziert [167]. Die Gene *vapB* und *vapC* sind im Genom immer hintereinander geschaltet und gehören zu einer Toxin-Antitoxin-Familie [167]. *VapC* ist eine kleine (etwa 130 Aminosäuren umfassende) Domäne, welche einzelsträngige RNA sequenzspezifisch degradieren kann. *VapB* wiederum reguliert die Expression von *vapC*. Interessanterweise befinden sich im *M. tuberculosis*-Genom 47 *vapBC*-Operons [120], wohingegen in avirulenten *M. smegmatis* nur ein Operon identifiziert wurde [167]. Das deutet an, dass *vapBC*-Gene eine Rolle bei der Pathobiologie virulenter MTBK-Stämme spielen und das Vorhandensein mehrere diverser *vapBC*-Operons einen selektiven Vorteil bietet.

Über die Funktion der *vapBC*-Gene in *M. tuberculosis*-Stämmen kann allerdings nur spekuliert werden. Toxin-Antitoxin-Gene im Allgemeinen könnten ursprünglich sogenannte „autonome“ DNA-Fragmente (*selfish genetic elements*) gewesen sein, was die weite Verbreitung in unterschiedlichen Bakterien-Spezies und die Variabilität in der Anzahl im Genom codierter Operons erklären könnte [167]. In *M. tuberculosis* sind VapBC-Proteine assoziiert mit Virulenzfaktoren, Transposasen und repetitiven Elementen. Möglicherweise regulieren sie, aktiviert durch verschiedene Stressbedingungen, sequenzspezifisch die Expression von Zielgenen (z. B. Virulenzfaktoren oder Antibiotikaresistenz-assoziierten Genen) [167].

Modifikationen in der Regulator-Domäne (VapB) oder in der Ribonuklease-Domäne (VapC) könnten die Spezifität oder Aktivität der Proteine verändern und die Regulation ihrer Zielproteine beeinflussen. Eine möglicherweise erhöhte Virulenz eines TB-Stammes würde indirekt auch in einer vermehrten Verbreitung des mutierten *vapBC*-Gens und der Selektion von mehreren Kopien im Genom resultieren.

In allen modernen Beijing-Stämmen wurden die Mutationen *vapC37* T16A, *vapC38* V48A und *vapB47* R84C gefunden. *VapC1* S32P ist ein Marker der Subgruppe Ancestral 1 und *vapC12* H32R ist charakteristisch für die Subgruppe Russland W148. Eine interessante Hypothese ist, dass die möglichen Zielproteine dieser *vapBC*-Gene in modernen Beijing-Stämmen oder speziell in den Subgruppen Ancestral 1 oder Russland W148 differentiell exprimiert sind und zu einem veränderten Phänotyp führen. Es wären allerdings weitere Studien nötig, um zu klären, ob VapBC-Proteine überhaupt sequenzspezifische Ziele im Genom von MTBK-Stämmen haben.

## 5.4 EVOLUTION UND RESISTENZENTWICKLUNG VON MULTIESISTENTEN OUTBREAK-STÄMMEN

Ähnliche epistatische Interaktionen von möglichen Regulatoren mit spezifischen Zielproteinen werden auch im Zusammenhang zwischen der Virulenz oder der relativen Fitness von TB-Stämmen mit ihrem genetischen Hintergrund oder im Zusammenhang mit kompensatorischen Effekten bei MDR-Stämmen diskutiert [173], [174].

Die Adaption an eine Antibiotikabehandlung erfolgt beispielsweise durch Resistenz-vermittelnde Mutationen mit geringen Wachstumsdefiziten/Fitness-Defiziten (*low-cost*) [175], [72]. Diese *Low-cost*-Mutationen wurden in einigen Stämmen sogar mit identischen *in vitro* Wachstumsraten im Vergleich zu einem antibiotikasensiblen Ausgangsstamm gefunden [72]. Möglicherweise führen bestimmte Mutation in Kombination mit dem jeweiligen genetischen Hintergrund zu einer unveränderten relativen Fitness (*no-cost*) [72]. Die Mutationen *katG* S315T (INH-Resistenz), *rpsL* K43R (SM-Resistenz) und *rpoB* S450L (RMP-Resistenz) sind experimentell validierte *Low-cost*-Resistenz-vermittelnden Mutationen [72], [175], [176]. Neben dem Erwerb von Resistenzmutationen mit geringem negativen Einfluss auf die relative Fitness, können resistente Stämme ihre Fitness durch kompensatorische Mutationen weiter erhöhen [76]. Ziele von solchen kompensatorischen Mutationen sind z. B. die Gene *rpoA* und *rpoC*, speziell in RMP-resistenten Isolaten mit der Mutation *rpoB* S450L. Die Änderungen der Konformation der ribosomalen Untereinheiten verändern hierbei nicht nur die Bindestelle von RMP an die Beta-Untereinheit RpoB, sondern modifizieren wahrscheinlich auch das aktive Zentrum in diesem Proteinkomplex, bestehend aus RpoB, RpoC, RpoA und RpoD [76].

Die Kombination aus genetischem Hintergrund von modernen Beijing-Stämmen, *Low-cost*- und kompensatorischen Mutationen könnte in der Selektion von hypervirulenten und multiresistenten Beijing-Varianten resultieren und die regionale und globale Ausbreitung der MDR-TB maßgeblich beeinflussen. Interessanterweise wurde speziell die oben beschriebene Kombination von *Low-cost*-Resistenz-vermittelnden Mutationen und kompensatorischen Mutationen auch in Stämmen des Russland W148-*Outbreaks* gefunden (Abschnitt 4.2). Zudem zeigen alle W148-Stämme auch spezifische Mutationen (*mce3B* S49A, *Rv1972* V44del, *vapC12* H32R) in den oben beschriebenen, möglicherweise positiv selektionierten Genen *mce1-4* und *vapBC* (Abschnitt 4.1.5, Anhang 8). Darüber hinaus wurden zusätzliche kompensatorische und/oder mit Antibiotikaresistenz-assoziierte Varianten (*inhA* -15 [146], [147], *eis* -10 [128], [148], *foiC* Codon 40 (diese Arbeit) und *Rv2670v* Codon 5 (diese Arbeit)) in einigen W148-Stämmen gefunden (Tabelle 4.10). Eine weitere sehr interessante Variante ist die W148-spezifische zwei bp *frameshift*-Deletion im Gen *kdpD* (Sensor Kinase) (Anhang 8). Diese Deletion führt hypothetisch zu einer Verschmelzung, respektive Funktionslosigkeit, vom Sensor (KdpD) und dem assoziierten Regulator (KdpE) eines Zweikomponenten-Systems. In *E. coli* vermittelt das KdpDE-System die

Primärantwort auf osmotischen Stress und kann durch oxidativen Stress beeinflusst werden [177], [178]. Interessanterweise führt eine partielle Deletion der Gene *kdpD* und *kdpE* zu einer hypervirulenten H37Rv-Variante mit einer signifikant verringerten Überlebensrate im Mausmodell im Vergleich zum Wildtyp Stamm [179]. Damit zeigten die Autoren zum ersten Mal, dass auch der Verlust von Genen zu einer erhöhten Virulenz von *M. tuberculosis*-Stämmen *in vivo* führen kann [179]. Neben der massiven regionalen Verbreitung (Abbildung 4.2) im Zusammenhang mit der geringen genetischen Distanz der Subgruppe Russland W148 (Abbildung 4.5) sind diese Daten ein weiterer wichtiger Hinweis auf eine erhöhte Virulenz von Stämmen des W148-Outbreaks, verursacht durch den Verlust der regulatorischen KdpDE-Aktivität.

Um die longitudinale Evolution von MDR-Outbreak Stämmen genauer zu untersuchen, spez. den Erwerb von kompensatorischen, wurden die Genomsequenzen von 112 W148-Stämmen aus einer longitudinalen Studie von MDR-Stämmen in Deutschland analysiert. Diese Daten bestätigten die Übertragung der W148-Stämme als exklusiv INH- und SM-resistente Variante (durch das Vorhandensein entsprechender Mutationen). Die Dominanz der Low-cost-Mutation *rpoB* S450L und die Häufung von verschiedenen kompensatorischen Mutationen im Gen *rpoC* zeigt die Mikroevolution von W148-Stämmen ausgehend von einer INH- und SM-resistenten Variante in verschiedene W-148 MDR-Subgruppen (Clustern) mit den geringsten Fitnessdefiziten. Der wahrscheinlich erfolgreichste W148-Outbreak Klon A1.3 wird bereits mit einer Kombination der Mutationen *katG* S315T, *rpsL* K43R, *rpoB* S450L und *rpoC* D485N übertragen. Die größere Varianz weiterer Antibiotikaresistenz-vermittelnde Mutationen deuten einen zunächst unabhängig Erwerb weiterer Resistenzen an (z.B. PZA, EMB) erworben. Die klonale Verbreitung von TB-Stämmen mit weiteren Resistenz-vermittelnden Mutationen ist jedoch nicht ausgeschlossen, wie in der Subgruppe C des W148-Outbreaks gezeigt wurde (Anhang 26).

Ein ähnliches Bild zeigte sich für zwei MDR-Beijing-Klone (A und B) in Samara, Russland [82]. Klon A wurde mit den Resistenz-vermittelnden Mutationen *rpoB* S450L und *katG* S315T übertragen, Klon B wies zusätzlich die Mutation *rpsL* K43R auf. Weitere Resistenz-vermittelnde Mutationen wurden unabhängig von einzelnen Stämmen innerhalb der beiden Klone A und B durch einzigartige Mutationen erworben. Darüber hinaus fand man neun nicht synonyme SNPs im Gen *rpoC*. Diese traten ausschließlich in Stämmen mit der Mutation *rpoB* S450L auf [82]. Auch hier konstatierten die Autoren, dass die Übertragung von XDR-TB-Stämmen 2012 in Russland noch nicht weit verbreitet ist [82].

Die klonale Ausbreitung von multiresistenten Beijing-Stämmen mit weiteren Resistenz-vermittelnden Mutationen konnte auch in Südafrika nicht beobachtet werden [151]. Eine NGS-Analyse von 14 modernen und sechs ancestralen Beijing-Stämmen zeigte ebenfalls die Übertragung von spezifischen INH-Resistenz-vermittelnden Mutationen in beiden Gruppen. Moderne Beijing-Stämme wiesen hier die Mutation *inhA* -15 C>T auf, ancestrale Beijing-Stämme

die Mutation *katG* S315T. Beide Gruppen zeigten weiterhin unterschiedliche Resistenz-vermittelnde Mutationen gegen die Antibiotika RMP, SM, EMB, KAN/AMI/CAP, ETH, FQ und PZA [151]. Diese Momentaufnahme zur genetischen Variabilität von multiresistenten Beijing-Stämmen aus Südafrika aus dem Jahr 2010 [151] zeigte ähnliche Mechanismen des Erwerbs und der Verbreitung von Antibiotikaresistenz-vermittelnden Mutationen wie es im W148-*Outbreak* beobachtet wurde. Zu diesem Zeitpunkt hatten sich anscheinend noch keine *rpoC*-Mutationen in den beiden Beijing-Populationen verbreitet.

Das Auftreten von *rpoC*-Mutationen in RMP-resistenten TB-Stämmen in Südafrika wurde jedoch bereits 2013 in der selben Studienregion ebenfalls mit einer massiven Expansion einer spezifischer Stammvarianten in Verbindung gebracht [77]. 30,8% aller RMP-resistenten Isolate aus einem IS6110 RFLP-Cluster wiesen bereits eine Mutation im Gen *rpoC* auf im Vergleich zu 9,4% RMP-resistenter Isolate mit einzigartigen IS6110 RFLP-Fingerabdrücken. Speziell die Kombination aus den Mutationen *rpoB* S450L und *rpoC* V483G war in Südafrika erfolgreich und auch eine Assoziation von ancestralen Beijing-Stämmen (ohne IS6110-Insertion in der NTF-Region) und *rpoC*-Mutationen wurde beobachtet [77].

Die Ausbreitung von kompensatorischen Mutationen in Population von MDR-TB-Stämmen innerhalb weniger Jahre zeigt den Erfolg dieser Varianten gegenüber anderen regionalen MDR-Stämmen und basiert höchstwahrscheinlich auf einer gesteigerten Virulenz.

## 5.5 MIKROEVOLUTION MULTIRESENTENTER BEIJING-STÄMME IM PATIENTEN UNTER MDR-TB-THERAPIE

Neben einer möglicherweise erhöhten Virulenz von einzelnen Beijing-*Outbreak*-Klonen, z. B. Zentralasien-*Outbreak* oder W148-*Outbreak*, könnte eine transient oder permanent gesteigerte Mutationsrate ein weiterer Faktor für die Assoziation zwischen Beijing-Stämmen und MDR-TB sein. Ein möglicher Mutator-Phänotyp mit einer bis zu 1.000-fach gesteigerten Mutationsrate, z. B. unter Therapiebedingungen, würde neue Behandlungsstrategien erfordern. Auch hier gibt es widersprüchliche Ergebnisse aus *in vitro* Studien [99], [100]. Eine aktuelle Untersuchung bestätigt, dass u. a. Beijing-Stämme schneller Resistenzen gegen Antibiotika erwerben, dies aber auf die initiale Keimbelastung in der Lunge zu Beginn der Therapie zurückzuführen ist [63].

Um diese Frage zu untersuchen, habe ich in dieser Arbeit die Mikroevolution von modernen Beijing-Stämmen der Subgruppen Zentralasien und Russland W148 in drei Patienten im Verlauf von bis zu 32 Monaten Antibiotika-Therapie untersucht [136]. Ziel war die Identifikation von neu erworbenen Mutationen im Verlauf der Therapie. Erwartet wurden neue Resistenz-vermittelnde Mutationen in Korrelation zu neuen phänotypischen Antibiotikaresistenzen und, besonders bei

Vorliegen eines Mutator Phänotyps, auch zufällig im Genom verteilte Mutationen. Für den Fall, dass ein Beijing-Mutator-Phänotyp (10 - 1.000-fach erhöhte Mutationsrate [97], [180]) existiert, wie in einigen Studien vermutet wurde [100], [181], und wie auch bereits bei *Pseudomonas aeruginosa* beobachtet wurde [95], sollte eine Vielzahl von funktionslosen Mutationen oder Mutationen in nicht proteincodierenden Bereichen mit den Resistenz-vermittelnden SNPs selektioniert werden (*hitchhiking selection*).

Trotz konstantem physiologischen Stress, verursacht durch die eingesetzten Antibiotika, im Verlauf der MDR-TB-Therapie bei den analysierten Isolaten, wurde kein Anzeichen für eine gesteigerte Mutationsrate, durch z. B. eine fehlerhafte DNA-Reparatur während der Replikation [94], gefunden. Fast alle neu erworbenen Mutationen betrafen Gene, die in Verbindung mit Resistenzmechanismen stehen. Neue Mutationen traten schrittweise auf und korrelierten mit dem Erwerb von neuen phänotypischen Antibiotikaresistenzen (Abbildung 4.10 und 4.11).

Diese Daten widersprechen der Hypothese einer durch physiologischen Stress ausgelösten Häufung von Mutationen in Beijing-Stämmen [100]. Allerdings bestätigte die Analyse die longitudinale Koexistenz und komplexe Evolution von verschiedenen klonalen Subpopulationen im Patienten [182]–[185]. Die Untersuchung von bis zu 15 seriellen Isolaten pro Patient zeigte die Mikroevolution von verschiedenen Subpopulationen, die unabhängig voneinander unterschiedliche Resistenz-vermittelnde Mutationen erwarben. Zusätzlich dominieren unterschiedliche Klone in einzelnen Patientenisolaten, die zum selben Zeitpunkt der MDR-TB-Therapie abgegeben wurden. Diese Diversität in seriellen Patientenproben (Sputum) muss bei der Interpretation molekularer und phänotypischer Resistenztestungen berücksichtigt werden [135], [186].

Die Mikroevolution von einzelnen Beijing-Klonen in Patient A und B wurde wahrscheinlich durch die Verabreichung ineffektiver Antibiotikakombinationen gefördert (Abbildung 4.10 und 4.11). Hierdurch konnten einzelne Klone weitere Antibiotikaresistenz-vermittelnde Mutationen und möglicherweise kompensatorische Mutationen (z. B. *thyX* -19C>G und -3G>A in PAS-resistenten Isolaten) erwerben. Der Selektionsdruck im Verlauf der MDR-TB-Therapie führte dann zur Selektion von Klonen mit den meisten Resistenz-vermittelnden Mutationen und den geringsten Wachstumsdefiziten (höchsten Fitnesslevel).

## 5.6 NEUE POTENTIELLE RESISTENZ-VERMITTELNDE MUTATIONEN

Die NGS-Daten erlauben auch direkte Rückschlüsse auf die Wirksamkeit von Zweitrangantibiotika, wie OFX, AMI, KAN, CAP, ETH, PTH, PAS, CS. Das Auftreten von Resistenzvermittelnden Mutationen erfolgt durch den evolutionären Druck durch die Therapie mit Zweitrangantibiotika, so dass weitere Resistenzenmutationen im Patienten selektioniert werden. Zusätzlich können Resistenzmechanismen validiert oder neu beschrieben werden. So sind z. B. die Resistenzmechanismen der oral verabreichten, bakteriostatischen Antibiotika PAS, CS und ETH/PTH nicht vollständig aufgeklärt.

Die Resistenz gegen PAS steht in Verbindung mit Mutationen im Gen *thyA* [187], [188]. In dieser Arbeit korrelierte eine *frameshift*-Mutation im Gen *thyA* (A217fs) mit einer PAS-Resistenz in Patient B. Interessanterweise wurden zwei potentielle Promotormutationen (*thyX* -19C>G und -3G>A) in diesen, wahrscheinlich ThyA-defekten, Mutanten gefunden. In diesem Zusammenhang zeigte Amanda Fivian-Hughes *et al.*, dass ThyA und ThyX zwei verschiedene Varianten von Thymidylat- (dTMP-) Synthasen darstellen, wobei ThyX *in vivo* wahrscheinlich in der Lage ist, die dTMP-Synthase-Aktivität bei ThyA-Defekten zu kompensieren. Somit könnte die Steigerung der Transkription von *thyX* ein wichtiger kompensatorischer Mechanismus in PAS-resistenten MTBK-Isolaten darstellen [136].

Die Analyse von Patient B zeigte eine Verbindung zwischen CS-Resistenz und Mutationen im Gen *alr* (speziell die Mutation S22L). Es wird vermutet, dass die mykobakterielle Alanin-Racemase Alr das Ziel von CS darstellt [14], [189] und auch die Überexpression von Alr in *M. smegmatis* vermittelt eine Resistenz gegen CS.

Strukturelle Veränderungen im Protein EthA (Monooxygenase, welche die Antibiotika ETH und PTH aktiviert) [138] oder eine erhöhte Expression des Zielproteins InhA [146], [147] wurden bisher mit einer kombinierten Resistenz gegen die Thioamide ETH und PTH in Verbindung gebracht. Die Analyse der seriellen Isolate von Patient A lässt vermuten, dass die *Nonsense*-Mutation im Gen *ethA* (Q215\*) nicht ausreichend ist, um Resistenz gegen PTH zu vermitteln. Erst der Erwerb der Mutation R59H in der vermeintlichen Monooxygenase Rv0565c korrelierte mit einem PTH-resistenten Phänotyp (vergleiche Abbildung 4.10). Die unterschiedlichen Ergebnisse zur phänotypischen ETH-Resistenz in Patient B sind wahrscheinlich das Ergebnis einer ETH/PTH Toleranz durch die Promotormutation -15C>T im Gen *fabG1/inhA*.

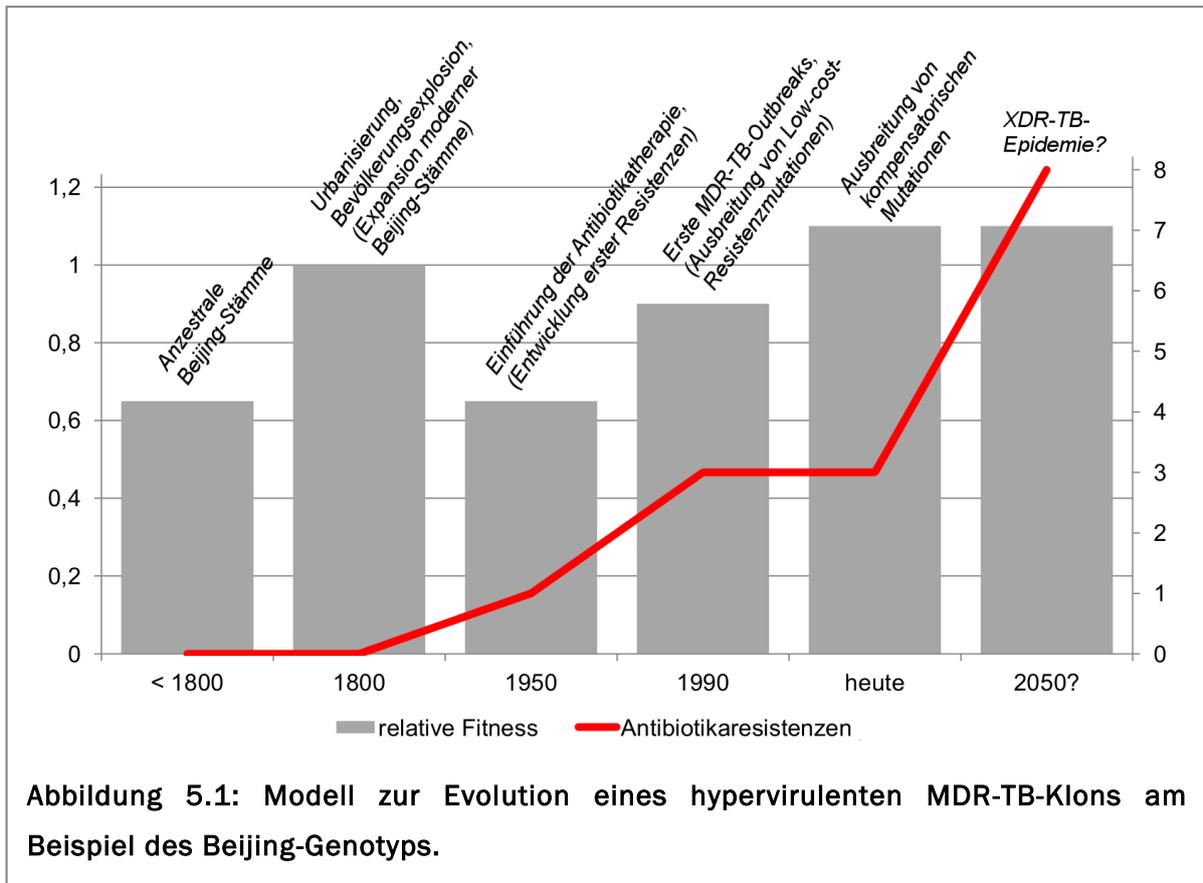
## 5.7 NGS-ANALYSE OFFENBART EINE UNENTDECKTE REINFEKTION MIT EINEM XDR-STAMM

Im Falle von Patient C konnte wahrscheinlich zum ersten Mal mit Hilfe von NGS-Daten eine exogene Reinfektion mit einem XDR-TB Stamm nachgewiesen werden. Diese war nicht durch eine IS6110 RFLP-Genotypisierung zu differenzieren, zudem hatten beide Klone (MDR- und XDR-Stamm) identische Mutationen, welche Resistenzen gegen vier Erstrangantibiotika (INH, RMP, EMB, SM) vermitteln. Basierend auf den vorliegenden Daten kann eine gemischte Infektion zu Beginn der MDR-TB-Therapie nicht vollständig ausgeschlossen werden. Dies ist allerdings sehr unwahrscheinlich. Entweder war der XDR-Klon in der ersten Patientenprobe (Monat 0) abwesend oder nur in extrem geringen Anteilen ( $< 1\%$ , nicht detektierbar durch die hier angewendete 1% Proportionsmethode für die phänotypische Resistenztestung) nachzuweisen. Hervorzuheben in diesem Fall ist die Möglichkeit mittels hochauflösender NGS-Methoden zuverlässig zwischen Therapieversagen und exogener Reinfektion unterscheiden zu können und die Tatsache, dass das Risiko einer Übertragung von XDR-Stämmen speziell in TB-Hochinzidenzländern gegeben ist.

Die gefundene Variabilität (22 Polymorphismen und eine im Nachhinein identifizierte MIRU-VNTR-Variante) zwischen dem MDR- und dem XDR-Isolat schließt auch im Hintergrund zu aktuellen NGS-basierten Studien von TB-*Outbreak*-Stämmen [73], [74] eine direkte Übertragung aus TB-Stämme aus einer epidemiologisch bestätigten Übertragungskette sind demnach durch maximal fünf SNPs voneinander getrennt [113].

## 5.8 MODELL ZUR EVOLUTION EINES HYPERVIRULENTEN MDR-TB-KLONS

Wie bereits beschrieben, sind moderne Beijing-Stämme im Vergleich zu den ancestralen Beijing-Stämmen, global weiter verbreitet (Abbildung 4.2), haben höhere MIRU-VNTR-Clusterraten (Abschnitt 4.1.1) und eine geringere genetische Diversität innerhalb einzelner Subgruppen (Abbildung 4.5). Des Weiteren korrelierte eine zweistufige Erhöhung der effektiven Populationsgröße von Beijing-Stämmen mit dem Auftreten der modernen Subgruppen bei der Analyse der Populationsdynamik auf Basis von konkatenierten Sequenzdaten (Bayesian-Skyline-Plot, Abbildung 4.6). Zwar ist die Anzahl der Isolate pro Subgruppe zu gering ( $< 30$ ), um eine exakte Aussage über die Populationsdynamik einzelner Subgruppen zu treffen (persönliche Kommunikation mit Thierry Wirth, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris), dennoch korreliert die Expansion von Beijing-Stämmen zu Beginn des 19. Jahrhunderts erstaunlicherweise mit der Expansion von allen modernen MTBK-Genotypen vor etwa 180 Jahren (basierend auf MIRU-VNTR-Daten) [40]. Möglicherweise führte der demografische Wandel der Weltbevölkerung (Urbanisierung, Bevölkerungsexplosion) auch innerhalb des Beijing-Genotyps zu einer Selektion



eines Phänotyps mit erhöhter Virulenz im Vergleich zu den ursprünglichen Beijing-Stämmen, wie es für moderne MTBK-Genotypen vermutet wird [40], [54] (vergleiche Abbildung 5.1).

Mit der Einführung der Antibiotikatherapie um 1950 realisierte man schnell, dass sich erste Resistenzen in einzelnen Stämmen ausbilden, diese aber mit einem Wachstumsdefizit verbunden waren [73], [74] (vergleiche Abbildung 5.1). Man nahm an, dass die damit verbundene verringerte relative Fitness nur zu einer lokalen Ausbreitung von MDR-Stämmen führen würde [74] (vergleiche Abbildung 5.1).

40 Jahre später war man mit den ersten MDR-TB-Outbreaks in den USA [83] und der ehemaligen Sowjet-Union [190] konfrontiert. Es zeigte sich, dass multiresistente TB-Stämme Mutationen mit einem sehr geringen Wachstumsdefizit (*low-cost*) erwerben können [72], [175] und diese Varianten auch weltweit am meisten verbreitet sind [72]. Bei einem Vergleich der Wachstumsraten (relative Fitness) von RMP-resistenten Mutanten im Vergleich zu den sensiblen Vorgängern wies die Mutation *rpoB* S450L die höchste relative Fitness (~0,9) im Vergleich zu allen anderen RMP-Resistenz-vermittelnden Mutationen (~0,6 - 0,8) auf [72] (vergleiche Abbildung 5.1). Diese gesteigerte relative Fitness wird auch von einer aktuellen Studie bestätigt, die zeigt, dass sogar einige INH-, SM- und RMP-resistente Stämme mit den Mutationen *katG* S315T, *rpsL* K43R, *rpoB* S450L schneller wachsen als sensible Stämme [176]. Auch Sebastien

Gagneux und Kollegen fanden bereits klinische Patientenisolat, die eine höhere relative Fitness als das RMP-sensible Ausgangsisolat hatten [72].

Diese Beobachtung war ein erstes Indiz, dass TB-Stämme zusätzlich zu den Resistenz-vermittelnden Mutationen auch kompensatorische Mutationen erwerben können, die im Falle von spezifischen Mutationen in den Genen *rpoC* und *rpoA* die relative Fitness weiter erhöhen (~1,1) [76] (vergleiche Abbildung 5.1). Diese kompensatorischen Varianten können bereits im Verlauf weniger Jahre einen erheblichen Anteil der Stämme in regionalen MDR-TB-Populationen ausmachen (Feuerriegel *et al.*, Manuskript eingereicht). Dies zeigt den enormen Erfolg dieser adaptierten multiresistenten Varianten, die wahrscheinlich die Ausbreitung der MDR-TB-Epidemie in vielen Regionen beschleunigt haben.

Die oben beschriebenen Resistenz-vermittelnden Mutationen (*katG* S315T, *rpsL* K43R, *rpoB* S450L) mit sehr geringen Wachstumsdefiziten in Kombination mit weiteren kompensatorischen Effekten wurde auch im hier untersuchten W148-Outbreak beobachtet (Abschnitt 4.2, Abbildung 4.9). Die Analyse einzelner W148-Subgruppen (Anhang 26) zeigte, dass Resistenzen gegen zusätzliche Antibiotika überwiegend durch einzigartige Mutationen vermittelt werden. Dies lässt vermuten, dass derzeit weitere Antibiotikaresistenzen hauptsächlich im klinischen Umfeld übertragen werden [69]. Vermutlich sind weitere Resistenz-vermittelnde Mutationen mit einem erheblichen Fitnessdefizit verbunden. Die Übertragung von polyresistenten Klonen ist jedoch nicht ausgeschlossen, wie am Beispiel der Gruppe C des W148-Outbreaks beschrieben (Abschnitt 4.2).

Möglicherweise können in XDR-Klonen zusätzliche kompensatorische Mutationen entstehen, z. B. *thyX*-Promotormutationen in PAS-resistenten Isolaten (Abbildung 4.11, Abschnitt 4.3.1). Eine jüngste NGS-Studie [191] konnte *thyX*-Promotormutationen ebenfalls mit Resistenzmechanismen in Verbindung bringen. Die Klonierung der mutierten *thyX*-Promotorregion resultierte in einer fünf bis 18-fach erhöhten Genexpressionsrate in *M. smegmatis* [191] und ist ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Kompensation der reduzierten Thymidylat- (dTMP-) Synthase-Aktivität, vermittelt durch ThyA-Defekte, in PAS-resistenten Isolaten [188], [136], [191].

Dieses Beispiel eines neuen potentiellen kompensatorischen Mechanismus in PAS-resistenten Isolaten deutet an, dass beispielweise auch in XDR-Stämmen Fitness-steigernde Mutationen im Patienten selektioniert werden. Aktuell kann über mögliche epistatische Effekte mit anderen Resistenz-vermittelnden Mutationen oder mit dem genetischen Hintergrund nur spekuliert werden. Erste *in vitro* Wachstumsversuche [176] deuten jedoch an, dass eine Kombination spezifischer Resistenzmutationen zu erhöhten Wachstumsraten von MDR-Isolaten im Vergleich zu sensiblen Isolaten führen kann. Besonders in TB-Hochinzidenzregionen ist neben einer effektiven Infektionskontrolle auch die schnelle Detektion von Antibiotikaresistenz-vermittelnden Mutationen von entscheidender Bedeutung. Eine NGS-basierte Therapieüberwachung könnte die

schnelle Entwicklung individualisierter Antibiotikatherapien ermöglichen sowie eine sichere Detektion von Reinfektionen in Regionen mit einer stark reduzierten Populationsdiversität von MDR-TB-Stämmen (Feuerriegel *et al.*, Manuskript eingereicht) gewährleisten. Dies ist notwendig, um die Verbreitung von weiteren Resistenz-vermittelnden Mutationen und neuen kompensatorischen Effekten zu verhindern.

## 5.9 AUSBLICK

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal die globale Populationstruktur von Beijing-Stämmen aufgeklärt werden, die eine valide Klassifizierung von acht Subgruppen erlaubt, welche durch spezifische Polymorphismen charakterisiert sind. Diese Klassifizierung ist die Basis für zukünftige Studien zur Korrelation von Genotyp und Pathobiologie von Beijing-Stämmen im Vergleich zu Stämmen anderer phylogenetischen Gruppen des MTBK. Darüber hinaus erlauben definierte Beijing-Subgruppen-spezifische Genvarianten möglicherweise Rückschlüsse auf genetische Mechanismen, welche unterschiedliche *in vitro* Phänotypen, z. B. in Bezug auf Immunogenität, Pathogenität, Dormanzverhalten, Persistenz erklären könnten.

Die Analyse des W148-*Outbreaks* offenbarte interessante Details zur Verbreitung von Resistenzen in einem MDR-TB-*Outbreak* und der Evolution von weiteren kompensatorischen Mutationen. Die konvergente Mutation *foiC* E40G beispielsweise, wurde erst kürzlich in einer NGS-Studie zur Identifikation von neuen Resistenzmechanismen hervorgehoben [191]. Mit einem erweiterten Datensatz von W148-Isolaten aus unterschiedlichen Regionen sollen diese Erkenntnisse vertieft werden und die Analyse auf die Korrelation von phänotypischen Resistenzen gegen Zweitrangantibiotika und assoziierten Resistenzmutationen ausgeweitet werden. Diese Daten könnten zur NGS-unterstützten Identifizierung von Antibiotikaresistenzen im Therapieverlauf eingesetzt werden. Eine weitere interessante Beobachtung in W148-Stämmen ist die wahrscheinliche Inaktivierung des KdpDE-Zweikomponentensystems. Der Mangel der regulatorischen KdpDE-Aktivität führte bereits zu einer erhöhten Pathogenität des Laborstammes H37Rv im Mausmodell [179] und könnte möglicherweise zu einer erhöhten Virulenz von Beijing W148-Stämmen beitragen.

Die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass *vapBC*-Gene an einer sequenzspezifischen Genregulation in MTBK-Stämmen beteiligt sind, ist ein interessanter Ansatzpunkt bei der Analyse von RNA-Sequenzierungsprojekten. Diese könnten weiterhin eine Interaktion von möglichen epistatischen Effekten in multiresistenten TB-Stämmen mit dem in dieser Arbeit definierten genetischen Hintergrund des Beijing-Genotyps aufklären.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. Lee, *Unfinished Portraits Stories of Musicians and Artists*. New York: Charles Scribner's Sons, 1916.
- [2] „Open Collections Program: Contagion, Tuberculosis in Europe and North America, 1800–1922“. [Online]. Verfügbar unter: <http://ocp.hul.harvard.edu/contagion/tuberculosis.html>. [Zugegriffen: 19-Nov-2013].
- [3] J. Kappelman, M. C. Alçiçek, N. Kazanci, M. Schultz, M. Ozkul, und S. Sen, „First Homo erectus from Turkey and implications for migrations into temperate Eurasia“, *Am. J. Phys. Anthropol.*, Bd. 135, Nr. 1, S. 110–116, Jan. 2008.
- [4] I. Hershkovitz, H. D. Donoghue, D. E. Minnikin, G. S. Besra, O. Y.-C. Lee, A. M. Gernaey, E. Galili, V. Eshed, C. L. Greenblatt, E. Lemma, G. K. Bar-Gal, und M. Spigelman, „Detection and Molecular Characterization of 9000-Year-Old Mycobacterium tuberculosis from a Neolithic Settlement in the Eastern Mediterranean“, *PLoS ONE*, Bd. 3, Nr. 10, S. e3426, Okt. 2008.
- [5] W. Löffler, *Geschichte der Tuberkulose*, Bd. I. Stuttgart: Thieme Verlag, 1958.
- [6] J.-A. Villemin, *Études sur la tuberculose: preuves rationnelles et expérimentales de sa spécificité et de son inoculabilité*. J.-B. Baillière et fils, 1868.
- [7] von D. R. Koch, „Die Aetiologie der Tuberkulose“, *Berl. Klin. Wochenschr.*, Bd. 19, 1882.
- [8] „RKI - RKI-Ratgeber für Ärzte - Tuberkulose“. [Online]. Verfügbar unter: [http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Tuberkulose.html;sessionid=3620DA209D285720B7538FF1B83EE660.2\\_cid372#doc2374486bodyText8](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Tuberkulose.html;sessionid=3620DA209D285720B7538FF1B83EE660.2_cid372#doc2374486bodyText8). [Zugegriffen: 30-Nov-2013].
- [9] C. Mantoux, „L'intradermo-réaction à la tuberculine et son interprétation clinique“, *Presse Méd.*, Bd. 10, Nr. 3, 1910.
- [10] D. Yancey, *Tuberculosis*. Twenty-First Century Books, 2001.
- [11] A. Nienhaus, *Tuberkulose als Berufskrankheit: ein Leitfaden zur Begutachtung und Vorsorge*. Hühlig Jehle Rehm, 2009.
- [12] M. Morandi, M. Sali, R. Manganelli, und G. Delogu, „Exploiting the mycobacterial cell wall to design improved vaccines against tuberculosis“, *J. Infect. Dev. Ctries.*, Bd. 7, Nr. 3, S. 169–181, März 2013.
- [13] Y. Zhang und W. W. Yew, „Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis“, *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.*, Bd. 13, Nr. 11, S. 1320–1330, Nov. 2009.
- [14] P. E. A. da Silva und J. C. Palomino, „Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs“, *J. Antimicrob. Chemother.*, Bd. 66, Nr. 7, S. 1417–1430, Juli 2011.
- [15] J. Colgrove, „The McKeown Thesis: A Historical Controversy and Its Enduring Influence“, *Am. J. Public Health*, Bd. 92, Nr. 5, S. 725–729, Mai 2002.
- [16] C. Nathan, „Antibiotics at the crossroads“, *Nature*, Bd. 431, Nr. 7011, S. 899–902, Okt. 2004.
- [17] M. Casenghi, S. T. Cole, und C. F. Nathan, „New Approaches to Filling the Gap in Tuberculosis Drug Discovery“, *PLoS Med*, Bd. 4, Nr. 11, S. e293, Nov. 2007.
- [18] P. D. O. Davies, „The world-wide increase in tuberculosis: how demographic changes, HIV infection and increasing numbers in poverty are increasing tuberculosis“, *Ann. Med.*, Bd. 35, Nr. 4, S. 235–243, 2003.
- [19] J. M. Grange und A. Zumla, „The global emergency of tuberculosis: what is the cause?“, *J. R. Soc. Promot. Health*, Bd. 122, Nr. 2, S. 78–81, Juni 2002.
- [20] P. D. Davies, „Tuberculosis: the global epidemic“, *J. Indian Med. Assoc.*, Bd. 98, Nr. 3, S. 100–102, März 2000.

- [21] „WHO | Global tuberculosis report 2013“. [Online]. Verfügbar unter: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/index.html](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html). [Zugegriffen: 05-Nov-2013].
- [22] A. Koul, E. Arnoult, N. Lounis, J. Guillemont, und K. Andries, „The challenge of new drug discovery for tuberculosis“, *Nature*, Bd. 469, Nr. 7331, S. 483–490, Jan. 2011.
- [23] A. Vernon, „Treatment of Latent Tuberculosis Infection“, *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, Bd. 34, Nr. 01, S. 067–086, März 2013.
- [24] „WHO | Tuberculosis country profiles“, *WHO*. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.who.int/tb/country/data/profiles/en/index.html>. [Zugegriffen: 08-Okt-2013].
- [25] E. L. Corbett, C. J. Watt, N. Walker, D. Maher, B. G. Williams, M. C. Raviglione, und C. Dye, „The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic“, *Arch. Intern. Med.*, Bd. 163, Nr. 9, S. 1009–1021, Mai 2003.
- [26] „WHO | Drug-resistant tuberculosis now at record levels“, *WHO*. [Online]. Verfügbar unter: [http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/drug\\_resistant\\_tb\\_20100318/en/](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/drug_resistant_tb_20100318/en/). [Zugegriffen: 07-Jan-2014].
- [27] L. Ramakrishnan, „Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis“, *Nat. Rev. Immunol.*, Bd. 12, Nr. 5, S. 352–366, Mai 2012.
- [28] L. P. Ormerod, „Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): epidemiology, prevention and treatment“, *Br. Med. Bull.*, Bd. 73–74, Nr. 1, S. 17–24, Okt. 2005.
- [29] „Genus Mycobacterium“, *UniProt Taxonomy*. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.uniprot.org/taxonomy/1763>. [Zugegriffen: 07-Jan-2014].
- [30] V. Jarlier und H. Nikaido, „Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics“, *FEMS Microbiol. Lett.*, Bd. 123, Nr. 1–2, S. 11–18, Okt. 1994.
- [31] P. J. Brennan und H. Nikaido, „The envelope of mycobacteria“, *Annu. Rev. Biochem.*, Bd. 64, S. 29–63, 1995.
- [32] R. Brosch, S. V. Gordon, M. Marmiesse, P. Brodin, C. Buchrieser, K. Eiglmeier, T. Garnier, C. Gutierrez, G. Hewinson, K. Kremer, L. M. Parsons, A. S. Pym, S. Samper, D. van Soolingen, und S. T. Cole, „A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 99, Nr. 6, S. 3684–3689, März 2002.
- [33] J. van Ingen, Z. Rahim, A. Mulder, M. J. Boeree, R. Simeone, R. Brosch, und D. van Soolingen, „Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* Complex Subspecies“, *Emerg. Infect. Dis.*, Bd. 18, Nr. 4, S. 653–655, Apr. 2012.
- [34] S. Gagneux, K. DeRiemer, T. Van, M. Kato-Maeda, B. C. de Jong, S. Narayanan, M. Nicol, S. Niemann, K. Kremer, M. C. Gutierrez, M. Hilty, P. C. Hopewell, und P. M. Small, „Variable host–pathogen compatibility in Mycobacterium tuberculosis“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 103, Nr. 8, S. 2869–2873, Feb. 2006.
- [35] S. N. Niobe-Eyangoh, C. Kuaban, P. Sorlin, P. Cunin, J. Thonnon, C. Sola, N. Rastogi, V. Vincent, und M. C. Gutierrez, „Genetic biodiversity of Mycobacterium tuberculosis complex strains from patients with pulmonary tuberculosis in Cameroon“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 41, Nr. 6, S. 2547–2553, Juni 2003.
- [36] I. Filliol, J. R. Driscoll, D. van Soolingen, B. N. Kreiswirth, K. Kremer, G. Valétudie, D. A. Dang, R. Barlow, D. Banerjee, P. J. Bifani, K. Brudey, A. Cataldi, R. C. Cooksey, D. V. Cousins, J. W. Dale, O. A. Dellagostin, F. Drobniowski, G. Engelmann, S. Ferdinand, D. Gascoyne-Binzi, M. Gordon, M. C. Gutierrez, W. H. Haas, H. Heersma, E. Kassa-Kelembho, M. L. Ho, A. Makristathis, C. Mammina, G. Martin, P. Moström, I. Mokrousov, V. Narbonne, O. Narvskaya, A. Nastasi, S. N. Niobe-Eyangoh, J. W. Pape, V. Rasolofo-Razanamparany, M. Ridell, M. L. Rossetti, F. Stauffer, P. N. Suffys, H. Takiff, J. Texier-Maugein, V. Vincent, J. H. de Waard, C. Sola, und N. Rastogi, „Snapshot of moving and expanding clones of Mycobacterium tuberculosis and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 41, Nr. 5, S. 1963–1970, Mai 2003.
- [37] D. Van Soolingen, „Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements“, *J. Intern. Med.*, Bd. 249, Nr. 1, S. 1–26, Jan. 2001.

- [38] S. Sreevatsan, X. Pan, K. E. Stockbauer, N. D. Connell, B. N. Kreiswirth, T. S. Whittam, und J. M. Musser, „Restricted structural gene polymorphism in the Mycobacterium tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Bd. 94, Nr. 18, S. 9869–9874, Feb. 1997.
- [39] P. F. Barnes und M. D. Cave, „Molecular epidemiology of tuberculosis“, *N. Engl. J. Med.*, Bd. 349, Nr. 12, S. 1149–1156, Sep. 2003.
- [40] T. Wirth, F. Hildebrand, C. Allix-Béguec, F. Wölbeling, T. Kubica, K. Kremer, D. van Soolingen, S. Rüsç-Gerdes, C. Loch, S. Brisse, A. Meyer, P. Supply, und S. Niemann, „Origin, spread and demography of the Mycobacterium tuberculosis complex“, *PLoS Pathog.*, Bd. 4, Nr. 9, S. e1000160, 2008.
- [41] S. Gagneux und P. M. Small, „Global phylogeography of Mycobacterium tuberculosis and implications for tuberculosis product development“, *Lancet Infect. Dis.*, Bd. 7, Nr. 5, S. 328–337, Mai 2007.
- [42] E. Kanduma, T. D. McHugh, und S. H. Gillespie, „Molecular methods for Mycobacterium tuberculosis strain typing: a users guide“, *J. Appl. Microbiol.*, Bd. 94, Nr. 5, S. 781–791, 2003.
- [43] J. D. van Embden, M. D. Cave, J. T. Crawford, J. W. Dale, K. D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, und T. M. Shinnick, „Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology.“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 31, Nr. 2, S. 406–409, Jan. 1993.
- [44] J. Kamerbeek, L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, und J. van Embden, „Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 35, Nr. 4, S. 907–914, Apr. 1997.
- [45] P. Supply, S. Lesjean, E. Savine, K. Kremer, D. van Soolingen, und C. Loch, „Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of Mycobacterium tuberculosis based on mycobacterial interspersed repetitive units“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 39, Nr. 10, S. 3563–3571, Okt. 2001.
- [46] L. Vauterin und P. Vauterin, „Integrated Databasing and Analysis“, in *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes*, P. D. E. Stackebrandt, Hrsg. Springer Berlin Heidelberg, 2006, S. 141–217.
- [47] E. J. G. Pitman, „Significance Tests Which May be Applied to Samples From any Populations“, *Suppl. J. R. Stat. Soc.*, Bd. 4, Nr. 1, S. 119, 1937.
- [48] B. Efron, „Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife“, in *Breakthroughs in Statistics*, S. Kotz und N. L. Johnson, Hrsg. Springer New York, 1979, S. 569–593.
- [49] J. Nešetřil, E. Milková, und H. Nešetřilová, „Otakar Borůvka on minimum spanning tree problem Translation of both the 1926 papers, comments, history“, *Discrete Math.*, Bd. 233, Nr. 1–3, S. 3–36, Apr. 2001.
- [50] J. Felsenstein, „Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach“, *J. Mol. Evol.*, Bd. 17, Nr. 6, S. 368–376, 1981.
- [51] T. H. Jukes und C. R. Cantor, „Evolution of protein molecules“, Bd. Mammalian protein metabolism, Nr. Vol. III, S. 21–132, 1969.
- [52] R. Hershberg, M. Lipatov, P. M. Small, H. Sheffer, S. Niemann, S. Homolka, J. C. Roach, K. Kremer, D. A. Petrov, M. W. Feldman, und S. Gagneux, „High functional diversity in Mycobacterium tuberculosis driven by genetic drift and human demography“, *PLoS Biol.*, Bd. 6, Nr. 12, S. e311, Dez. 2008.
- [53] I. Comas, M. Coscolla, T. Luo, S. Borrell, K. E. Holt, M. Kato-Maeda, J. Parkhill, B. Malla, S. Berg, G. Thwaites, D. Yeboah-Manu, G. Bothamley, J. Mei, L. Wei, S. Bentley, S. R. Harris, S. Niemann, R. Diel, A. Aseffa, Q. Gao, D. Young, und S. Gagneux, „Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of Mycobacterium tuberculosis with modern humans“, *Nat. Genet.*, Bd. 45, Nr. 10, S. 1176–1182, Okt. 2013.
- [54] D. Brites und S. Gagneux, „Old and new selective pressures on Mycobacterium tuberculosis“, *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.*, Bd. 12, Nr. 4, S. 678–685, Juni 2012.

- [55] S. Homolka, S. Niemann, D. G. Russell, und K. H. Rohde, „Functional genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* complex clinical isolates: delineation of conserved core and lineage-specific transcriptomes during intracellular survival“, *PLoS Pathog.*, Bd. 6, Nr. 7, S. e1000988, 2010.
- [56] M. Coscolla und S. Gagneux, „Does *M. tuberculosis* genomic diversity explain disease diversity?“, *Drug Discov. Today Dis. Mech.*, Bd. 7, Nr. 1, S. e43–e59, 2010.
- [57] H. Sohn, K.-S. Lee, S.-Y. Kim, D.-M. Shin, S.-J. Shin, E.-K. Jo, J.-K. Park, und H.-J. Kim, „Induction of cell death in human macrophages by a highly virulent Korean Isolate of *Mycobacterium tuberculosis* and the virulent strain H37Rv“, *Scand. J. Immunol.*, Bd. 69, Nr. 1, S. 43–50, Jan. 2009.
- [58] Q. Li, C. C. Whalen, J. M. Albert, R. Larkin, L. Zukowski, M. D. Cave, und R. F. Silver, „Differences in rate and variability of intracellular growth of a panel of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates within a human monocyte model“, *Infect. Immun.*, Bd. 70, Nr. 11, S. 6489–6493, Nov. 2002.
- [59] B. C. de Jong, P. C. Hill, A. Aiken, T. Awine, M. Antonio, I. M. Adetifa, D. J. Jackson-Sillah, A. Fox, K. Deriemer, S. Gagneux, M. W. Borgdorff, K. P. W. J. McAdam, T. Corrah, P. M. Small, und R. A. Adegbola, „Progression to active tuberculosis, but not transmission, varies by *Mycobacterium tuberculosis* lineage in The Gambia“, *J. Infect. Dis.*, Bd. 198, Nr. 7, S. 1037–1043, Okt. 2008.
- [60] B. López, D. Aguilar, H. Orozco, M. Burger, C. Espitia, V. Ritacco, L. Barrera, K. Kremer, R. Hernandez-Pando, K. Huygen, und D. van Soolingen, „A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes“, *Clin. Exp. Immunol.*, Bd. 133, Nr. 1, S. 30–37, Juli 2003.
- [61] J. Dormans, M. Burger, D. Aguilar, R. Hernandez-Pando, K. Kremer, P. Roholl, S. M. Arend, und D. van Soolingen, „Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model“, *Clin. Exp. Immunol.*, Bd. 137, Nr. 3, S. 460–468, Sep. 2004.
- [62] N. Reiling, S. Homolka, K. Walter, J. Brandenburg, L. Niwinski, M. Ernst, C. Herzmann, C. Lange, R. Diel, S. Ehlers, und S. Niemann, „Clade-specific virulence patterns of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains in human primary macrophages and aerogenically infected mice“, *mBio*, Bd. 4, Nr. 4, 2013.
- [63] C. B. Ford, R. R. Shah, M. K. Maeda, S. Gagneux, M. B. Murray, T. Cohen, J. C. Johnston, J. Gardy, M. Lipsitch, und S. M. Fortune, „*Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis“, *Nat. Genet.*, Bd. 45, Nr. 7, S. 784–790, Juli 2013.
- [64] T. Kubica, S. Rüscher-Gerdes, und S. Niemann, „The Beijing genotype is emerging among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Germany“, *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.*, Bd. 8, Nr. 9, S. 1107–1113, Sep. 2004.
- [65] T. Kubica, R. Agzamova, A. Wright, M. A. Aziz, G. Rakishev, V. Bismilda, E. Richter, S. Rüscher-Gerdes, und S. Niemann, „The Beijing genotype is a major cause of drug-resistant tuberculosis in Kazakhstan“, *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.*, Bd. 9, Nr. 6, S. 646–653, Juni 2005.
- [66] H. S. Cox, T. Kubica, D. Doshetov, Y. Kebede, S. Rüscher-Gerdes, und S. Niemann, „The Beijing genotype and drug resistant tuberculosis in the Aral Sea region of Central Asia“, *Respir. Res.*, Bd. 6, S. 134, 2005.
- [67] M. Pardini, S. Niemann, F. Varaine, E. Iona, F. Meacci, G. Orrù, H. Yesilkaya, T. Jarosz, P. Andrew, M. Barer, F. Checchi, H. Rinder, G. Orefici, S. Rüscher-Gerdes, L. Fattorini, M. R. Oggioni, und M. Bonnet, „Characteristics of drug-resistant tuberculosis in Abkhazia (Georgia), a high-prevalence area in Eastern Europe“, *Tuberc. Edinb. Scotl.*, Bd. 89, Nr. 4, S. 317–324, Juli 2009.
- [68] S. Niemann, R. Diel, G. Khechinashvili, M. Gegia, N. Mdivani, und Y.-W. Tang, „*Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage favors the spread of multidrug-resistant tuberculosis in the Republic of Georgia“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 48, Nr. 10, S. 3544–3550, Okt. 2010.

- [69] H. S. Cox, C. Sibilía, S. Feuerriegel, S. Kalon, J. Polonsky, A. K. Khamraev, S. Rüscher-Gerdes, C. Mills, und S. Niemann, „Emergence of Extensive Drug Resistance during Treatment for Multidrug-Resistant Tuberculosis“, *N. Engl. J. Med.*, Bd. 359, Nr. 22, S. 2398–2400, Nov. 2008.
- [70] T. R. Ioerger, Y. Feng, X. Chen, K. M. Dobos, T. C. Victor, E. M. Streicher, R. M. Warren, N. C. Gey van Pittius, P. D. Van Helden, und J. C. Sacchettini, „The non-clonality of drug resistance in Beijing-genotype isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the Western Cape of South Africa“, *BMC Genomics*, Bd. 11, S. 670, 2010.
- [71] C. Dye und B. G. Williams, „The population dynamics and control of tuberculosis“, *Science*, Bd. 328, Nr. 5980, S. 856–861, Mai 2010.
- [72] S. Gagneux, C. D. Long, P. M. Small, T. Van, G. K. Schoolnik, und B. J. M. Bohannan, „The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*“, *Science*, Bd. 312, Nr. 5782, S. 1944–1946, Juni 2006.
- [73] G. Meissner, *Fortschritte der Tuberkuloseforschung*, Bd. VII. Basel: S. Karger, 1956.
- [74] C. Dye und M. A. Espinal, „Will tuberculosis become resistant to all antibiotics?“, *Proc. Biol. Sci.*, Bd. 268, Nr. 1462, S. 45–52, Jan. 2001.
- [75] S. Gagneux, „Fitness cost of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*“, *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, Bd. 15 Suppl 1, S. 66–68, Jan. 2009.
- [76] I. Comas, S. Borrell, A. Roetzer, G. Rose, B. Malla, M. Kato-Maeda, J. Galagan, S. Niemann, und S. Gagneux, „Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes“, *Nat. Genet.*, Bd. 44, Nr. 1, S. 106–110, Jan. 2012.
- [77] M. de Vos, B. Müller, S. Borrell, P. A. Black, P. D. van Helden, R. M. Warren, S. Gagneux, und T. C. Victor, „Putative compensatory mutations in the *rpoC* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* are associated with ongoing transmission“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 57, Nr. 2, S. 827–832, Feb. 2013.
- [78] T. Cohen und M. Murray, „Modeling epidemics of multidrug-resistant *M. tuberculosis* of heterogeneous fitness“, *Nat. Med.*, Bd. 10, Nr. 10, S. 1117–1121, Okt. 2004.
- [79] S. Borrell und S. Gagneux, „Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*“, *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.*, Bd. 13, Nr. 12, S. 1456–1466, Dez. 2009.
- [80] T. R. Ioerger, S. Koo, E.-G. No, X. Chen, M. H. Larsen, W. R. Jacobs Jr, M. Pillay, A. W. Sturm, und J. C. Sacchettini, „Genome analysis of multi- and extensively-drug-resistant tuberculosis from KwaZulu-Natal, South Africa“, *PLoS One*, Bd. 4, Nr. 11, S. e7778, 2009.
- [81] I. Parwati, R. van Crevel, und D. van Soolingen, „Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains“, *Lancet Infect. Dis.*, Bd. 10, Nr. 2, S. 103–111, Feb. 2010.
- [82] N. Casali, V. Nikolayevskyy, Y. Balabanova, O. Ignatyeva, I. Kontsevaya, S. R. Harris, S. D. Bentley, J. Parkhill, S. Nejentsev, S. E. Hoffner, R. D. Horstmann, T. Brown, und F. Drobniowski, „Microevolution of extensively drug-resistant tuberculosis in Russia“, *Genome Res.*, Bd. 22, Nr. 4, S. 735–745, Apr. 2012.
- [83] P. J. Bifani, B. B. Plikaytis, V. Kapur, K. Stockbauer, X. Pan, M. L. Lutfey, S. L. Moghazeh, W. Eisner, T. M. Daniel, M. H. Kaplan, J. T. Crawford, J. M. Musser, und B. N. Kreiswirth, „Origin and interstate spread of a New York City multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family“, *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, Bd. 275, Nr. 6, S. 452–457, Feb. 1996.
- [84] B. B. Plikaytis, J. L. Marden, J. T. Crawford, C. L. Woodley, W. R. Butler, und T. M. Shinnick, „Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain W of *Mycobacterium tuberculosis*“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 32, Nr. 6, S. 1542–1546, Juni 1994.
- [85] P. J. Bifani, B. Mathema, N. E. Kurepina, und B. N. Kreiswirth, „Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains“, *Trends Microbiol.*, Bd. 10, Nr. 1, S. 45–52, Jan. 2002.
- [86] O. S. Toungousova, P. Sandven, A. O. Mariandyshev, N. I. Nizovtseva, G. Bjune, und D. A. Caugant, „Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing

- genotype in the Archangel Oblast, Russia", *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 40, Nr. 6, S. 1930–1937, Juni 2002.
- [87] T. Tracevska, I. Jansone, V. Baumanis, O. Marga, und T. Lillebaek, „Prevalence of Beijing genotype in Latvian multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates", *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.*, Bd. 7, Nr. 11, S. 1097–1103, Nov. 2003.
- [88] F. Drobniewski, Y. Balabanova, V. Nikolayevsky, M. Ruddy, S. Kuznetzov, S. Zakharova, A. Melentyev, und I. Fedorin, „Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia", *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, Bd. 293, Nr. 22, S. 2726–2731, Juni 2005.
- [89] Y. K. Park, S. Shin, S. Ryu, S. N. Cho, W.-J. Koh, O. J. Kwon, Y. S. Shim, W. J. Lew, und G. H. Bai, „Comparison of drug resistance genotypes between Beijing and non-Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Korea", *J. Microbiol. Methods*, Bd. 63, Nr. 2, S. 165–172, Nov. 2005.
- [90] M. Caws, G. Thwaites, K. Stepniewska, T. N. L. Nguyen, T. H. D. Nguyen, T. P. Nguyen, N. T. H. Mai, M. D. Phan, H. L. Tran, T. H. C. Tran, D. van Soolingen, K. Kremer, V. V. C. Nguyen, T. C. Nguyen, und J. Farrar, „Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is significantly associated with human immunodeficiency virus infection and multidrug resistance in cases of tuberculous meningitis", *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 44, Nr. 11, S. 3934–3939, Nov. 2006.
- [91] M. Hanekom, N. C. Gey van Pittius, C. McEvoy, T. C. Victor, P. D. Van Helden, und R. M. Warren, „*Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: A template for success", *Tuberc. Edinb. Scotl.*, Aug. 2011.
- [92] A. G. Tsolaki, S. Gagneux, A. S. Pym, Y.-O. L. Goguet de la Salmoniere, B. N. Kreiswirth, D. Van Soolingen, und P. M. Small, „Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis*", *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 43, Nr. 7, S. 3185–3191, Juli 2005.
- [93] J. R. Glynn, J. Whiteley, P. J. Bifani, K. Kremer, und D. van Soolingen, „Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review", *Emerg. Infect. Dis.*, Bd. 8, Nr. 8, S. 843–849, Aug. 2002.
- [94] M. Ebrahimi-Rad, P. Bifani, C. Martin, K. Kremer, S. Samper, J. Rauzier, B. Kreiswirth, J. Blazquez, M. Jouan, D. van Soolingen, und B. Gicquel, „Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family", *Emerg. Infect. Dis.*, Bd. 9, Nr. 7, S. 838–845, Juli 2003.
- [95] A. Oliver, R. Cantón, P. Campo, F. Baquero, und J. Blázquez, „High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection", *Science*, Bd. 288, Nr. 5469, S. 1251–1254, Mai 2000.
- [96] M. D. Maciá, D. Blanquer, B. Togoies, J. Sauleda, J. L. Pérez, und A. Oliver, „Hypermutation Is a Key Factor in Development of Multiple-Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Causing Chronic Lung Infections", *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 49, Nr. 8, S. 3382–3386, Jan. 2005.
- [97] F. Taddei, M. Radman, J. Maynard-Smith, B. Toupance, P. H. Gouyon, und B. Godelle, „Role of mutator alleles in adaptive evolution", *Nature*, Bd. 387, Nr. 6634, S. 700–702, Juni 1997.
- [98] T. Wirth, D. Falush, R. Lan, F. Colles, P. Mensa, L. H. Wieler, H. Karch, P. R. Reeves, M. C. J. Maiden, H. Ochman, und M. Achtman, „Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective", *Mol. Microbiol.*, Bd. 60, Nr. 5, S. 1136–1151, 2006.
- [99] J. Werngren und S. E. Hoffner, „Drug-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype does not develop mutation-conferred resistance to rifampin at an elevated rate", *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 41, Nr. 4, S. 1520–1524, Apr. 2003.
- [100] J. E. M. de Steenwinkel, M. T. ten Kate, G. J. de Knegt, K. Kremer, R. E. Aarnoutse, M. J. Boeree, H. A. Verbrugh, D. van Soolingen, und I. A. J. M. Bakker-Woudenberg, „Drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and association with MDR TB", *Emerg. Infect. Dis.*, Bd. 18, Nr. 4, S. 660–663, Apr. 2012.

- [101] R. Helaers und M. C. Milinkovitch, „MetaPIGA v2.0: maximum likelihood large phylogeny estimation using the metapopulation genetic algorithm and other stochastic heuristics“, *BMC Bioinformatics*, Bd. 11, S. 379, 2010.
- [102] „FigTree“. [Online]. Verfügbar unter: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. [Zugegriffen: 23-Okt-2013].
- [103] J. P. Huelsenbeck und F. Ronquist, „MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees“, *Bioinforma. Oxf. Engl.*, Bd. 17, Nr. 8, S. 754–755, Aug. 2001.
- [104] A. J. Drummond, M. A. Suchard, D. Xie, und A. Rambaut, „Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7“, *Mol. Biol. Evol.*, Bd. 29, Nr. 8, S. 1969–1973, Aug. 2012.
- [105] A. Rambaut und A. J. Drummond, *Tracer*. .
- [106] Z. Zhang, J. Li, X.-Q. Zhao, J. Wang, G. K.-S. Wong, und J. Yu, „KaKs\_Calculator: calculating Ka and Ks through model selection and model averaging“, *Genomics Proteomics Bioinformatics*, Bd. 4, Nr. 4, S. 259–263, Nov. 2006.
- [107] A. C. E. Darling, B. Mau, F. R. Blattner, und N. T. Perna, „Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements“, *Genome Res.*, Bd. 14, Nr. 7, S. 1394–1403, Juli 2004.
- [108] C. Ngamphiw, S. Kulawonganunchai, A. Assawamakin, E. Jenwitheesuk, und S. Tongsimma, „VarDetect: a nucleotide sequence variation exploratory tool“, *BMC Bioinformatics*, Bd. 9 Suppl 12, S. S9, 2008.
- [109] C. Allix-Béguec, D. Harmsen, T. Weniger, P. Supply, und S. Niemann, „Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 46, Nr. 8, S. 2692–2699, Aug. 2008.
- [110] B. Ewing, L. Hillier, M. C. Wendl, und P. Green, „Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment“, *Genome Res.*, Bd. 8, Nr. 3, S. 175–185, März 1998.
- [111] J. Blom, T. Jakobi, D. Doppmeier, S. Jaenicke, J. Kalinowski, J. Stoye, und A. Goemann, „Exact and complete short-read alignment to microbial genomes using Graphics Processing Unit programming“, *Bioinforma. Oxf. Engl.*, Bd. 27, Nr. 10, S. 1351–1358, Mai 2011.
- [112] „Geneious - Home page“. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.geneious.com/>. [Zugegriffen: 24-Okt-2013].
- [113] T. M. Walker, C. L. C. Ip, R. H. Harrell, J. T. Evans, G. Kapatai, M. J. Dedicoat, D. W. Eyre, D. J. Wilson, P. M. Hawkey, D. W. Crook, J. Parkhill, D. Harris, A. S. Walker, R. Bowden, P. Monk, E. G. Smith, und T. E. A. Peto, „Whole-genome sequencing to delineate Mycobacterium tuberculosis outbreaks: a retrospective observational study“, *Lancet Infect. Dis.*, Bd. 13, Nr. 2, S. 137–146, Feb. 2013.
- [114] A. Roetzer, R. Diel, T. A. Kohl, C. Rückert, U. Nübel, J. Blom, T. Wirth, S. Jaenicke, S. Schuback, S. Rüscher-Gerdes, P. Supply, J. Kalinowski, und S. Niemann, „Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a Mycobacterium tuberculosis outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study“, *PLoS Med.*, Bd. 10, Nr. 2, S. e1001387, Feb. 2013.
- [115] D. Posada und K. A. Crandall, „MODELTEST: testing the model of DNA substitution“, *Bioinforma. Oxf. Engl.*, Bd. 14, Nr. 9, S. 817–818, 1998.
- [116] A. R. Lemmon und M. C. Milinkovitch, „The metapopulation genetic algorithm: An efficient solution for the problem of large phylogeny estimation“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 99, Nr. 16, S. 10516–10521, Aug. 2002.
- [117] A. J. Drummond, A. Rambaut, B. Shapiro, und O. G. Pybus, „Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences“, *Mol. Biol. Evol.*, Bd. 22, Nr. 5, S. 1185–1192, Mai 2005.
- [118] W. K. Hastings, „Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications“, *Biometrika*, Bd. 57, Nr. 1, S. 97–109, Jan. 1970.
- [119] N. Casali und L. W. Riley, „A phylogenomic analysis of the Actinomycetales mce operons“, *BMC Genomics*, Bd. 8, S. 60, 2007.

- [120] „TubercuList - Mycobacterium tuberculosis Database“. [Online]. Verfügbar unter: <http://tuberculist.epfl.ch/>. [Zugegriffen: 07-Okt-2012].
- [121] M. Hanekom, G. D. van der Spuy, E. Streicher, S. L. Ndabambi, C. R. E. McEvoy, M. Kidd, N. Beyers, T. C. Victor, P. D. van Helden, und R. M. Warren, „A recently evolved sublineage of the Mycobacterium tuberculosis Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 45, Nr. 5, S. 1483–1490, Mai 2007.
- [122] T. Iwamoto, S. Yoshida, K. Suzuki, und T. Wada, „Population structure analysis of the Mycobacterium tuberculosis Beijing family indicates an association between certain sublineages and multidrug resistance“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 52, Nr. 10, S. 3805–3809, Okt. 2008.
- [123] O. Mestre, T. Luo, T. Dos Vultos, K. Kremer, A. Murray, A. Namouchi, C. Jackson, J. Rauzier, P. Bifani, R. Warren, V. Rasolofo, J. Mei, Q. Gao, und B. Gicquel, „Phylogeny of Mycobacterium tuberculosis Beijing strains constructed from polymorphisms in genes involved in DNA replication, recombination and repair“, *PLoS One*, Bd. 6, Nr. 1, S. e16020, 2011.
- [124] I. Comas, S. Homolka, S. Niemann, und S. Gagneux, „Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in Mycobacterium tuberculosis highlights the limitations of current methodologies“, *PLoS One*, Bd. 4, Nr. 11, S. e7815, 2009.
- [125] I. Mokrousov, O. Narvskaya, A. Vyazovaya, T. Otten, W.-W. Jiao, L. L. Gomes, P. N. Suffys, A.-D. Shen, und B. Vishnevsky, „Russian ‚successful‘ clone B0/W148 of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: a multiplex PCR assay for rapid detection and global screening“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 50, Nr. 11, S. 3757–3759, Nov. 2012.
- [126] J. M. Bryant, S. R. Harris, J. Parkhill, R. Dawson, A. H. Diacon, P. van Helden, A. Pym, A. A. Mahayiddin, C. Chuchottaworn, I. M. Sanne, C. Louw, M. J. Boeree, M. Hoelscher, T. D. McHugh, A. L. C. Bateson, R. D. Hunt, S. Mwaigwisya, L. Wright, S. H. Gillespie, und S. D. Bentley, „Whole-genome sequencing to establish relapse or re-infection with Mycobacterium tuberculosis: a retrospective observational study“, *Lancet Respir. Med.*, Bd. 1, Nr. 10, S. 786–792, Dez. 2013.
- [127] L. V. Baker, T. J. Brown, O. Maxwell, A. L. Gibson, Z. Fang, M. D. Yates, und F. A. Drobniowski, „Molecular analysis of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from England and Wales reveals the phylogenetic significance of the *ahpC* -46A polymorphism“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 49, Nr. 4, S. 1455–1464, Apr. 2005.
- [128] J. Wei, J. L. Dahl, J. W. Moulder, E. A. Roberts, P. O’Gaora, D. B. Young, und R. L. Friedman, „Identification of a Mycobacterium tuberculosis gene that enhances mycobacterial survival in macrophages“, *J. Bacteriol.*, Bd. 182, Nr. 2, S. 377–384, Jan. 2000.
- [129] M. A. Zaunbrecher, R. D. Sikes Jr, B. Metchock, T. M. Shinnick, und J. E. Posey, „Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase *eis* confers kanamycin resistance in Mycobacterium tuberculosis“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 106, Nr. 47, S. 20004–20009, Nov. 2009.
- [130] S. V. Ramaswamy, A. G. Amin, S. Göksel, C. E. Stager, S. J. Dou, H. El Sahly, S. L. Moghazeh, B. N. Kreiswirth, und J. M. Musser, „Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of Mycobacterium tuberculosis“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 44, Nr. 2, S. 326–336, Feb. 2000.
- [131] V. Kapur, L. L. Li, S. Iordanescu, M. R. Hamrick, A. Wanger, B. N. Kreiswirth, und J. M. Musser, „Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (*rpoB*) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains from New York City and Texas“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 32, Nr. 4, S. 1095–1098, Apr. 1994.
- [132] D. L. Williams, C. Waguespack, K. Eisenach, J. T. Crawford, F. Portaels, M. Salfinger, C. M. Nolan, C. Abe, V. Sticht-Groh, und T. P. Gillis, „Characterization of rifampin-resistance in pathogenic mycobacteria“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 38, Nr. 10, S. 2380–2386, Okt. 1994.
- [133] T. Bodmer, G. Zürcher, P. Imboden, und A. Telenti, „Mutation position and type of substitution in the beta-subunit of the RNA polymerase influence in-vitro activity of rifamycins in

- rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*“, *J. Antimicrob. Chemother.*, Bd. 35, Nr. 2, S. 345–348, Feb. 1995.
- [134] V. Donnabella, F. Martiniuk, D. Kinney, M. Bacerdo, S. Bonk, B. Hanna, und W. N. Rom, „Isolation of the gene for the beta subunit of RNA polymerase from rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and identification of new mutations“, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, Bd. 11, Nr. 6, S. 639–643, Dez. 1994.
- [135] M. Heep, B. Brandstätter, U. Rieger, N. Lehn, E. Richter, S. Rüscher-Gerdes, und S. Niemann, „Frequency of *rpoB* Mutations Inside and Outside the Cluster I Region in Rifampin-Resistant Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 39, Nr. 1, S. 107–110, Jan. 2001.
- [136] M. Merker, T. A. Kohl, A. Roetzer, L. Truebe, E. Richter, S. Rüscher-Gerdes, L. Fattorini, M. R. Oggioni, H. Cox, F. Varaine, und S. Niemann, „Whole Genome Sequencing Reveals Complex Evolution Patterns of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strains in Patients“, *PLoS ONE*, Bd. 8, Nr. 12, S. e82551, Dez. 2013.
- [137] S. Niemann, E. Richter, S. Rüscher-Gerdes, M. Schlaak, und U. Greinert, „Double infection with a resistant and a multidrug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*“, *Emerg. Infect. Dis.*, Bd. 6, Nr. 5, S. 548–551, Okt. 2000.
- [138] A. E. DeBarber, K. Mdluli, M. Bosman, L. G. Bekker, und C. E. Barry 3rd, „Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 97, Nr. 17, S. 9677–9682, Aug. 2000.
- [139] F. Wang, R. Langley, G. Gulten, L. G. Dover, G. S. Besra, W. R. Jacobs Jr, und J. C. Sacchettini, „Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy“, *J. Exp. Med.*, Bd. 204, Nr. 1, S. 73–78, Jan. 2007.
- [140] S. V. Ramaswamy, R. Reich, S.-J. Dou, L. Jasperse, X. Pan, A. Wanger, T. Quitugua, und E. A. Graviss, „Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 47, Nr. 4, S. 1241–1250, Apr. 2003.
- [141] C. Plinke, H. S. Cox, S. Kalon, D. Doshetov, S. Rüscher-Gerdes, und S. Niemann, „Tuberculosis ethambutol resistance: concordance between phenotypic and genotypic test results“, *Tuberc. Edinb. Scotl.*, Bd. 89, Nr. 6, S. 448–452, Nov. 2009.
- [142] K. Stoffels, V. Mathys, M. Fauville-Dufaux, R. Wintjens, und P. Bifani, „Systematic Analysis of Pyrazinamide-Resistant Spontaneous Mutants and Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Juli 2012.
- [143] C. E. Maus, B. B. Plikaytis, und T. M. Shinnick, „Molecular Analysis of Cross-Resistance to Capreomycin, Kanamycin, Amikacin, and Viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 49, Nr. 8, S. 3192–3197, Aug. 2005.
- [144] L. Jugheli, N. Bzekalava, P. de Rijk, K. Fissette, F. Portaels, und L. Rigouts, „High level of cross-resistance between kanamycin, amikacin, and capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Georgia and a close relation with mutations in the *rrs* gene“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 53, Nr. 12, S. 5064–5068, Dez. 2009.
- [145] M. Bonnet, M. Pardini, F. Meacci, G. Orrù, H. Yesilkaya, T. Jarosz, P. W. Andrew, M. Barer, F. Checchi, H. Rinder, G. Orefici, S. Rüscher-Gerdes, L. Fattorini, M. R. Oggioni, J. Melzer, S. Niemann, und F. Varaine, „Treatment of tuberculosis in a region with high drug resistance: outcomes, drug resistance amplification and re-infection“, *PloS One*, Bd. 6, Nr. 8, S. e23081, 2011.
- [146] H. Lee, S. N. Cho, H. E. Bang, J. H. Lee, G. H. Bai, S. J. Kim, und J. D. Kim, „Exclusive mutations related to isoniazid and ethionamide resistance among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea“, *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.*, Bd. 4, Nr. 5, S. 441–447, Mai 2000.
- [147] M. H. Larsen, C. Vilchèze, L. Kremer, G. S. Besra, L. Parsons, M. Salfinger, L. Heifets, M. H. Hazbon, D. Alland, J. C. Sacchettini, und W. R. Jacobs Jr, „Overexpression of *inhA*, but not *kasA*, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*“, *Mol. Microbiol.*, Bd. 46, Nr. 2, S. 453–466, Okt. 2002.

- [148] A. Engström, N. Morcillo, B. Imperiale, S. E. Hoffner, und P. Juréen, „Detection of First- and Second-Line Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates using Pyrosequencing“, *J. Clin. Microbiol.*, März 2012.
- [149] C. Cavusoglu, Y. Karaca-Derici, und A. Bilgic, „In-vitro activity of rifabutin against rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates with known rpoB mutations“, *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, Bd. 10, Nr. 7, S. 662–665, Juli 2004.
- [150] Z. Sun, J. Zhang, X. Zhang, S. Wang, Y. Zhang, und C. Li, „Comparison of gyrA gene mutations between laboratory-selected ofloxacin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains and clinical isolates“, *Int. J. Antimicrob. Agents*, Bd. 31, Nr. 2, S. 115–121, Feb. 2008.
- [151] T. R. Ioerger, Y. Feng, X. Chen, K. M. Dobos, T. C. Victor, E. M. Streicher, R. M. Warren, N. C. Gey van Pittius, P. D. Van Helden, und J. C. Sacchettini, „The non-clonality of drug resistance in Beijing-genotype isolates of Mycobacterium tuberculosis from the Western Cape of South Africa“, *BMC Genomics*, Bd. 11, S. 670, Nov. 2010.
- [152] F. Drobniewski, Y. Balabanova, V. Nikolayevsky, M. Ruddy, S. Kuznetzov, S. Zakharova, A. Melentyev, und I. Fedorin, „Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia“, *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, Bd. 293, Nr. 22, S. 2726–2731, Juni 2005.
- [153] C. Manca, L. Tsenova, A. Bergtold, S. Freeman, M. Tovey, J. M. Musser, C. E. Barry 3rd, V. H. Freedman, und G. Kaplan, „Virulence of a Mycobacterium tuberculosis clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha /beta“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 98, Nr. 10, S. 5752–5757, Mai 2001.
- [154] M. Zhang, J. Gong, Z. Yang, B. Samten, M. D. Cave, und P. F. Barnes, „Enhanced capacity of a widespread strain of Mycobacterium tuberculosis to grow in human macrophages“, *J. Infect. Dis.*, Bd. 179, Nr. 5, S. 1213–1217, Mai 1999.
- [155] S. Theus, K. Eisenach, N. Fomukong, R. F. Silver, und M. D. Cave, „Beijing family Mycobacterium tuberculosis strains differ in their intracellular growth in THP-1 macrophages“, *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.*, Bd. 11, Nr. 10, S. 1087–1093, Okt. 2007.
- [156] O. A. Manicheva, E. B. Lasunskaja, V. I. Zhuravlev, T. F. Otten, A. O. Barnaulov, I. V. Mokrousov, M. V. Pavlova, B. I. Vishnevskii, und O. V. Narvskaja, „[Drug sensitivity in Mycobacterium tuberculosis versus its viability, cytotoxicity, genotype, and the course of the process in patients with pulmonary tuberculosis]“, *Probl. Tuberk. Bolezn. Legk.*, Nr. 12, S. 18–22, 2008.
- [157] S. Niemann, C. U. Köser, S. Gagneux, C. Plinke, S. Homolka, H. Bignell, R. J. Carter, R. K. Cheetham, A. Cox, N. A. Gormley, P. Kokko-Gonzales, L. J. Murray, R. Rigatti, V. P. Smith, F. P. M. Arends, H. S. Cox, G. Smith, und J. A. C. Archer, „Genomic diversity among drug sensitive and multidrug resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis with identical DNA fingerprints“, *PLoS One*, Bd. 4, Nr. 10, S. e7407, 2009.
- [158] D. van Soolingen, L. Qian, P. E. de Haas, J. T. Douglas, H. Traore, F. Portaels, H. Z. Qing, D. Enkhsaikan, P. Nymadawa, und J. D. van Embden, „Predominance of a single genotype of Mycobacterium tuberculosis in countries of east Asia.“, *J. Clin. Microbiol.*, Bd. 33, Nr. 12, S. 3234–3238, Jan. 1995.
- [159] I. Mokrousov, H. M. Ly, T. Otten, N. N. Lan, B. Vyshnevskiy, S. Hoffner, und O. Narvskaya, „Origin and primary dispersal of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: clues from human phylogeography“, *Genome Res.*, Bd. 15, Nr. 10, S. 1357–1364, Okt. 2005.
- [160] J. Ehlers und P. L. Gibbard, „Extent and chronology of glaciations“, *Quat. Sci. Rev.*, Bd. 22, Nr. 15–17, S. 1561–1568, Juli 2003.
- [161] T. Iwamoto, L. Grandjean, K. Arikawa, N. Nakanishi, L. Caviedes, J. Coronel, P. Sheen, T. Wada, C. A. Taype, M.-A. Shaw, D. A. J. Moore, und R. H. Gilman, „Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing family strains of Mycobacterium tuberculosis in Peru“, *PLoS One*, Bd. 7, Nr. 11, S. e49651, 2012.
- [162] N. Shimono, L. Morici, N. Casali, S. Cantrell, B. Sidders, S. Ehrh, und L. W. Riley, „Hypervirulent mutant of Mycobacterium tuberculosis resulting from disruption of the mce1 operon“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 100, Nr. 26, S. 15918–15923, Dez. 2003.

- [163] A. Gioffré, E. Infante, D. Aguilar, M. D. la P. Santangelo, L. Klepp, A. Amadio, V. Meikle, I. Etchechoury, M. I. Romano, A. Cataldi, R. P. Hernández, und F. Bigi, „Mutation in mce operons attenuates *Mycobacterium tuberculosis* virulence“, *Microbes Infect.*, Bd. 7, Nr. 3, S. 325–334, März 2005.
- [164] P. Lima, B. Sidders, L. Morici, R. Reader, R. Senaratne, N. Casali, und L. W. Riley, „Enhanced mortality despite control of lung infection in mice aerogenically infected with a *Mycobacterium tuberculosis* mce1 operon mutant“, *Microbes Infect. Inst. Pasteur*, Bd. 9, Nr. 11, S. 1285–1290, Sep. 2007.
- [165] O. Marjanovic, T. Miyata, A. Goodridge, L. V. Kendall, und L. W. Riley, „Mce2 operon mutant strain of *Mycobacterium tuberculosis* is attenuated in C57BL/6 mice“, *Tuberc. Edinb. Scotl.*, Bd. 90, Nr. 1, S. 50–56, Jan. 2010.
- [166] L. C. Clark, R. F. Seipke, P. Prieto, J. Willemse, G. P. van Wezel, M. I. Hutchings, und P. A. Hoskisson, „Mammalian cell entry genes in *Streptomyces* may provide clues to the evolution of bacterial virulence“, *Sci. Rep.*, Bd. 3, Jan. 2013.
- [167] V. L. Arcus, J. L. McKenzie, J. Robson, und G. M. Cook, „The PIN-domain ribonucleases and the prokaryotic VapBC toxin-antitoxin array“, *Protein Eng. Des. Sel. PEDS*, Bd. 24, Nr. 1–2, S. 33–40, Jan. 2011.
- [168] D. Ren, A. N. Walker, und D. A. Daines, „Toxin-antitoxin loci vapBC-1 and vapXD contribute to survival and virulence in nontypeable *Haemophilus influenzae*“, *BMC Microbiol.*, Bd. 12, S. 263, 2012.
- [169] R. Frampton, R. B. M. Aggio, S. G. Villas-Bôas, V. L. Arcus, und G. M. Cook, „Toxin-antitoxin systems of *Mycobacterium smegmatis* are essential for cell survival“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 287, Nr. 8, S. 5340–5356, Feb. 2012.
- [170] L. I. Klepp, M. A. Forrellad, A. V. Osella, F. C. Blanco, E. J. Stella, M. V. Bianco, M. de la P. Santangelo, C. Sasseti, M. Jackson, A. A. Cataldi, F. Bigi, und H. R. Morbidoni, „Impact of the deletion of the six mce operons in *Mycobacterium smegmatis*“, *Microbes Infect. Inst. Pasteur*, Bd. 14, Nr. 7–8, S. 590–599, Juli 2012.
- [171] F. Zhang und J.-P. Xie, „Mammalian cell entry gene family of *Mycobacterium tuberculosis*“, *Mol. Cell. Biochem.*, Bd. 352, Nr. 1–2, S. 1–10, Juni 2011.
- [172] S. Arruda, G. Bomfim, R. Knights, T. Huima-Byron, und L. W. Riley, „Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells“, *Science*, Bd. 261, Nr. 5127, S. 1454–1457, Sep. 1993.
- [173] S. Borrell und S. Gagneux, „Strain diversity, epistasis and the evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*“, *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, Bd. 17, Nr. 6, S. 815–820, Juni 2011.
- [174] B. Müller, S. Borrell, G. Rose, und S. Gagneux, „The heterogeneous evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*“, *Trends Genet. TIG*, Bd. 29, Nr. 3, S. 160–169, März 2013.
- [175] E. C. Böttger, B. Springer, M. Pletschette, und P. Sander, „Fitness of antibiotic-resistant microorganisms and compensatory mutations“, *Nat. Med.*, Bd. 4, Nr. 12, S. 1343–1344, Dez. 1998.
- [176] F. S. Spies, A. von Groll, A. W. Ribeiro, D. F. Ramos, M. O. Ribeiro, E. R. Dalla Costa, A. Martin, J. C. Palomino, M. L. Rossetti, A. Zaha, und P. E. A. da Silva, „Biological cost in *Mycobacterium tuberculosis* with mutations in the rpsL, rrs, rpoB, and katG genes“, *Tuberculosis*, Bd. 93, Nr. 2, S. 150–154, März 2013.
- [177] M. O. Walderhaug, J. W. Polarek, P. Voelkner, J. M. Daniel, J. E. Hesse, K. Altendorf, und W. Epstein, „KdpD and KdpE, proteins that control expression of the kdpABC operon, are members of the two-component sensor-effector class of regulators“, *J. Bacteriol.*, Bd. 174, Nr. 7, S. 2152–2159, Apr. 1992.
- [178] A. J. C. Steyn, J. Joseph, und B. R. Bloom, „Interaction of the sensor module of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv KdpD with members of the Lpr family“, *Mol. Microbiol.*, Bd. 47, Nr. 4, S. 1075–1089, Feb. 2003.

- [179] T. Parish, D. A. Smith, S. Kendall, N. Casali, G. J. Bancroft, und N. G. Stoker, „Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*“, *Infect. Immun.*, Bd. 71, Nr. 3, S. 1134–1140, März 2003.
- [180] P. D. Sniegowski, P. J. Gerrish, und R. E. Lenski, „Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*“, *Nature*, Bd. 387, Nr. 6634, S. 703–705, Juni 1997.
- [181] A. C. Schürch, K. Kremer, A. Kiers, O. Daviena, M. J. Boeree, R. J. Siezen, N. H. Smith, und D. van Soolingen, „The tempo and mode of molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis* at patient-to-patient scale“, *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.*, Bd. 10, Nr. 1, S. 108–114, Jan. 2010.
- [182] F. A. Post, P. A. Willcox, B. Mathema, L. M. Steyn, K. Shean, S. V. Ramaswamy, E. A. Graviss, E. Shashkina, B. N. Kreiswirth, und G. Kaplan, „Genetic polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with chronic multidrug-resistant tuberculosis“, *J. Infect. Dis.*, Bd. 190, Nr. 1, S. 99–106, Juli 2004.
- [183] N. J. Saunders, U. H. Trivedi, M. L. Thomson, C. Doig, I. F. Laurenson, und M. L. Blaxter, „Deep resequencing of serial sputum isolates of *Mycobacterium tuberculosis* during therapeutic failure due to poor compliance reveals stepwise mutation of key resistance genes on an otherwise stable genetic background“, *J. Infect.*, Bd. 62, Nr. 3, S. 212–217, März 2011.
- [184] C. B. Ford, P. L. Lin, M. R. Chase, R. R. Shah, O. Iartchouk, J. Galagan, N. Mohaideen, T. R. Ioerger, J. C. Sacchettini, M. Lipsitch, J. L. Flynn, und S. M. Fortune, „Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection“, *Nat. Genet.*, Bd. 43, Nr. 5, S. 482–486, Mai 2011.
- [185] G. Sun, T. Luo, C. Yang, X. Dong, J. Li, Y. Zhu, H. Zheng, W. Tian, S. Wang, C. E. Barry, J. Mei, und Q. Gao, „Dynamic population changes in *Mycobacterium tuberculosis* during acquisition and fixation of drug resistance in patients“, *J. Infect. Dis.*, Sep. 2012.
- [186] E. M. Streicher, I. Bergval, K. Dheda, E. C. Böttger, N. C. Gey van Pittius, M. Bosman, G. Coetzee, R. M. Anthony, P. D. van Helden, T. C. Victor, und R. M. Warren, „*Mycobacterium tuberculosis* population structure determines the outcome of genetics-based second-line drug resistance testing“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 56, Nr. 5, S. 2420–2427, Mai 2012.
- [187] V. Mathys, R. Wintjens, P. Lefevre, J. Bertout, A. Singhal, M. Kiass, N. Kurepina, X.-M. Wang, B. Mathema, A. Baulard, B. N. Kreiswirth, und P. Bifani, „Molecular genetics of para-aminosalicylic acid resistance in clinical isolates and spontaneous mutants of *Mycobacterium tuberculosis*“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, Bd. 53, Nr. 5, S. 2100–2109, Mai 2009.
- [188] A. S. Fivian-Hughes, J. Houghton, und E. O. Davis, „*Mycobacterium tuberculosis* thymidylate synthase gene *thyX* is essential and potentially bifunctional, while *thyA* deletion confers resistance to p-aminosalicylic acid“, *Microbiol. Read. Engl.*, Bd. 158, Nr. Pt 2, S. 308–318, Feb. 2012.
- [189] Y. Zhang, „The magic bullets and tuberculosis drug targets“, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, Bd. 45, S. 529–564, 2005.
- [190] C. Holden, „Stalking a Killer in Russia’s Prisons“, *Science*, Bd. 286, Nr. 5445, S. 1670–1670, Nov. 1999.
- [191] H. Zhang, D. Li, L. Zhao, J. Fleming, N. Lin, T. Wang, Z. Liu, C. Li, N. Galwey, J. Deng, Y. Zhou, Y. Zhu, Y. Gao, T. Wang, S. Wang, Y. Huang, M. Wang, Q. Zhong, L. Zhou, T. Chen, J. Zhou, R. Yang, G. Zhu, H. Hang, J. Zhang, F. Li, K. Wan, J. Wang, X.-E. Zhang, und L. Bi, „Genome sequencing of 161 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China identifies genes and intergenic regions associated with drug resistance“, *Nat. Genet.*, Bd. 45, Nr. 10, S. 1255–1260, Okt. 2013.

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2.1: Mortalität durch Lungentuberkulose in England und Wales. ....	5
Abbildung 2.2: Von der WHO geschätzte weltweite Tuberkulose-Inzidenz (2012). ....	6
Abbildung 2.3: Weltweite Inzidenz von multiresistenter Tuberkulose (MDR-TB) 2012. ....	7
Abbildung 2.4: Mögliche Verlaufsformen einer Infektion mit TB-Bakterien. ....	9
ABBILDUNG 2.5: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Komplex-Populationsstruktur. ....	11
Abbildung 2.6: Ergebnis einer Spoligo-Typisierung. ....	13
Abbildung 2.7: Populationsstruktur und globale Verbreitung des MTBK. ....	16
Abbildung 2.8: Populationsstruktur von 311 MTBK-Isolaten aus Abchasien (Georgien). ....	21
Abbildung 3.1: Datenverarbeitung, der in dieser Arbeit analysierten Genomsequenzen. ....	34
Abbildung 4.1: Globale Populationsstruktur von MTBK-Isolaten des Beijing-Genotyps. ....	45
Abbildung 4.2: Globale Verteilung des MTBK-Beijing-Genotyps. ....	48
Abbildung 4.3: Resistenzraten der sieben klonalen Beijing-Komplexe. ....	50
Abbildung 4.4: Globale Phylogenie des Beijing-Genotyps. ....	53
Abbildung 4.5: Boxplot der genetischen Diversität von MTBK-Beijing-Subgruppen. ....	55
Abbildung 4.6: Effektive Populationsgröße von Beijing-Isolaten über die Zeit. ....	57
Abbildung 4.7: Wachstumskurven klinischer Beijing-Isolaten. ....	58
Abbildung 4.8: MDR-TB-Isolate aus Deutschland aus den Jahren 1995 bis 2012 und Anteil von Beijing-Stämmen des Typs W148. ....	64
Abbildung 4.9: Prinzipielle Subgruppen von Beijing W148-Stämmen. ....	67
Abbildung 4.10: Mikroevolution und Konkurrenz von unterschiedlichen Subpopulationen in Patient A. ....	73
Abbildung 4.11: Mikroevolution und Konkurrenz von unterschiedlichen Subpopulationen in Patient B. ....	75
Abbildung 4.12: Exogene Reinfektion von Patient C mit einem XDR-Beijing-Stamm. ....	78
Abbildung 5.1: Modell zur Evolution eines hypervirulenten MDR-TB-Klons am Beispiel des Beijing- Genotyps. ....	93

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1: Antituberkulotika .....	4
Tabelle 3.1: Material für PCR, Sequenzierung nach Sanger und MIRU-VNTR-Typisierung .....	24
Tabelle 3.2: Material für die Genomsequenzierung auf einem MiSeq-Genomsequenzierer (Illumina) .....	25
Tabelle 3.3: Material für die Kultivierung von MTBK Stämmen in Flüssigmedium .....	26
Tabelle 3.4: In dieser Arbeit verwendete Geräte .....	27
Tabelle 3.5: In dieser Arbeit verwendete Software .....	27
Tabelle 3.6: Einbezogenen Studien zur Analyse einer möglichen Assoziation zwischen Antibiotikaresistenz und identifizierten klonalen Beijing-Komplexen .....	39
Tabelle 3.7: Kultivierten MTBK-Beijing Isolate .....	42
Tabelle 4.1: MTBK-Beijing MLVA 15-9 Cluster .....	44
Tabelle 4.2: PCR-Analyse zur Insertion von IS6110 Elementen in der NTF-Region .....	46
Tabelle 4.3: PCR-Analyse zu Polymorphismen in Beijing-spezifischen Regionen RD207, RD105, RD142, RD181, RD150 .....	46
Tabelle 4.4: PCR-Analyse zu Polymorphismen in den variablen Regionen RD181, RD150 mit einer erweiterten Auswahl von Beijing-Isolaten .....	47
Tabelle 4.5: Proportionale Verteilung der sieben klonalen Beijing-Komplexe auf unterschiedliche geografische Regionen .....	49
Tabelle 4.6: Verteilung von antibiotikasensiblen und -resistenten Isolaten innerhalb der sieben klonalen Beijing-Komplexe differenziert nach Studien .....	51
Tabelle 4.7: Spezifische Punktmutationen (SNPs) für moderne Beijing-Stämme .....	59
Tabelle 4.8: dN/dS-Analyse von modernen Beijing-Stämmen mit unterschiedlicher Gensets .....	60
Tabelle 4.9: Chi-Quadratstest (mit Yates Korrektur) auf Gleichverteilung von nicht synonymen Mutationen in verschiedenen Genfamilien im Vergleich zu je einem randomisierten Genset (300 essentielle Gene, 300 nicht essentielle Gene) .....	62
Tabelle 4.10: Homoplastische und konvergente Mutationen von Beijing-Stämmen .....	63
Tabelle 4.11: Übersicht zur klonalen Ausbreitung von W148-Stämmen mit identischen Resistenz- vermittelnden Mutationen innerhalb der identifizierten W148-Subgruppen .....	65
Tabelle 4.12: Mutationen im Gen <i>rpoB</i> in 112 MTBK-Beijing Isolaten vom Typ W148 .....	66
Tabelle 4.13: Phänotypische Resistenzen und Mutationen in Resistenz-assoziierten Genen im größten Cluster A1 des Beijing W148-Outbreaks .....	69
Tabelle 4.14: Übersicht zur klonalen Ausbreitung von Resistenzen in W148-Subgruppen .....	70
Tabelle 4.15: Resistenz-vermittelnde Mutationen in allen Isolaten von Patient A .....	72
Tabelle 4.16: Resistenz-vermittelnde Mutationen in allen Isolaten von Patient B .....	74
Tabelle 4.17: Resistenz-vermittelnde Mutationen in allen Isolaten von Patient C .....	77

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TB	Tuberkulose
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
SM	Streptomycin
PAS	Paraaminosalicylsäure
CS	Cycloserin
INH	Isoniazid
PZA	Pyrazinamid
ETH	Prothionamid
PTH	Ethionamid
AMI	Kanamycin
KAN	Amikacin/Kanamycin
CAP	Capreomycin
EMB	Ethambutol
FQ	Fluoroquinolone
OFX	Ofloxacin
MXF	Moxifloxacin
LFX	Levofloxacin
RMP	Rifampicin
HIV	humaner Immundefizienz-Virus
MDR-TB	<i>multidrug-resistant TB</i>
XDR-TB	<i>extensively drug-resistant TB</i>
MTBK	<i>Mycobakterium tuberculosis</i> Komplex
IS6110	Insertionselement 6110
RFLP	Restriktionsfragment Längenpolymorphismus
Spoligo	<i>Spacer Oligonukleotid</i>
MIRU	<i>mycobacterial interspersed repetitive units</i>
VNTR	<i>variable number tandem repeat</i>
MLVA	<i>multiple loci VNTR analysis</i>
DR	<i>direct repeat</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
MST	<i>Minimum Spanning Tree</i>
ML	<i>Maximum Likelihood</i>
MRCA	<i>most recent common ancestor</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
NTF	<i>noise transfer function</i>
RD	<i>region of difference</i>
CFU	<i>colonie forming units</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

## ANHANG

Anhang 1-2: Übersicht und Referenzen der einbezogenen Studien

Anhang 3: Übersicht der mittels NGS untersuchten Beijing-Isolate

Anhang 4: Verwendete Primer und PCR-Parameter

Anhang 5: Identifizierte Beijing MLVA 15-9 Typen

Anhang 6-15: Beijing-Subgruppen-spezifische Polymorphismen

Anhang 16-22: Übersicht der untersuchten Gensets

Anhang 23: Regionale Verteilung aller untersuchten Beijing-Isolate differenziert nach klonalen Beijing-Komplexen

Anhang 24: Ergebnisse der Messung der optischen Dichte (OD<sub>596</sub>) ausgewählter Beijing-Isolate

Anhang 25: W148-Subgruppen spezifische Mutationen

Anhang 26: Resistenz-vermittelnde Mutationen in einzelnen W148-Subgruppen

Anhang 27: Optische Dichte (OD<sub>594</sub>) von ausgewählten Beijing-Stämmen nach 14 Tagen *in vitro* Kultivierung

**Anhang 1: Studienübersicht der klinischen Isolate zur Beschreibung der Globalen Diversität von MTBK Beijing Stämmen.**

#	Studie durchgeführt in:	Anzahl der Isolate	Resistenztests vorhanden:	MIRU-VNTR Typisierung in	Kontakt	Adresse	email
1	Kasachstan	106	ja	Borstel	Borstel	National Reference Center for Mycobacteria, Molecular Mycobacteriology Research Center Borstel, Borstel, Germany	srueschg@fz-borstel.de, stniemann@yahoo.de
2	Armenien	20	ja	Borstel	Stobdan Kalon, Dr. Elisabeth Sanchez-Padilla	Clinical Research department, Geneva, Switzerland Epicentre, Paris, France	Elisabeth.SANCHEZ@epicentre.msf.org
3	China	68	ja	China	Dr. Igor Mokrousov	Laboratory of Molecular Microbiology St. Petersburg Pasteur Institute St. Petersburg 197101 Russia	igormokrousov@yahoo.com
4	Serbien	6	nein	Borstel	Dr. Branislava Savic, Dr. Dragana Vukovic	Department of Bacteriology Institute of Microbiology and Immunology, School of Medicine 11000 Belgrade, Serbia	branislava.savic@gmail.com
5	Brasilien	1	nein	Lille	Dr. Philip Supply	CIL - Center for Infection and Immunity of Lille Institut Pasteur de Lille 1 Rue du professeur Calmette 59019 Lille, FRANCE	philip.supply@ibl.fr
6	Belgien	14	nein	Lille	Dr. Philip Supply	CIL - Center for Infection and Immunity of Lille Institut Pasteur de Lille 1 Rue du professeur Calmette 59019 Lille, FRANCE	philip.supply@ibl.fr
7	Deutschland	17	nein	Borstel	Borstel	National Reference Center for Mycobacteria, Molecular Mycobacteriology Research Center Borstel, Borstel, Germany	srueschg@fz-borstel.de, stniemann@yahoo.de
8	Dänemark	62	ja	Denmark	Dr. Michael Rasmussen	International Reference Laboratory of Mycobacteriology Statens Serum Institute, Sector for Microbiology and Diagnostics Kopenhagen, Denmark	MRE@ssi.dk
9	Estland	67	ja	Lille	Dr. Philip Supply	CIL - Center for Infection and Immunity of Lille Institut Pasteur de Lille 1 Rue du professeur Calmette 59019 Lille, FRANCE	philip.supply@ibl.fr

## Fortsetzung von Anhang 1

#	Studie durchgeführt in:	Anzahl der Isolate	Resistenztests vorhanden:	MIRU-VNTR Typisierung in	Kontakt	Adresse	email
10	Georgien	46	ja	Borstel	Dr. Medea Gegia	The National Center for TB and Lung Diseases, Georgia Tbilisi, Georgia	medeagegia@yahoo.com.au
11	Deutschland	60	ja	Borstel	Dr. Roland Diel	Department of Pulmonary Medicine Medical School Hannover (MHH) Hannover, Germany.	roland.diel@harburg.hamburg.de
12	Japan, Russland, Singapur, Südafrika	381	nein	Lille	Dr. Philip Supply	CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille Institut Pasteur de Lille 1 Rue du professeur Calmette 59019 Lille, FRANCE	philip.supply@ibl.fr
13	Italien	33	ja	Italy	Dr. Emanuele Borroni, Dr. Daniela Cirillo	TB Supranational Reference laboratory San Raffaele Scientific Institute Via Olgettina 58 20132 Milano , Italy	borroni.emanuele@hsr.it, cirillo.daniela@hsr.it
14	Usbekistan	1	ja	Borstel	Borstel	National Reference Center for Mycobacteria, Molecular Mycobacteriology Research Center Borstel, Borstel, Germany	srueschg@fz-borstel.de, stniemann@yahoo.de
15	Kiribati	37	nein	Borstel	Borstel	National Reference Center for Mycobacteria, Molecular Mycobacteriology Research Center Borstel, Borstel, Germany	srueschg@fz-borstel.de, stniemann@yahoo.de
16	Korea	186	ja	Lille	Dr. Clifton Barry, Chola Shamputa	Tuberculosis Research Section, Laboratory of Clinical Infectious Disease National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health	shamputa@gmail.com
17	Litauen	156	ja	Vilnius	Dr. Petras Stakenas	Department of Immunology and Cell Biology, Institute of Biotechnology, Vilnius University V.A. Graiciuno 8, LT-02241 Vilnius, Lithuania	pstak@ibt.lt
18	Abchasien (Georgien)	80	ja	Borstel	Dr. Francis Varaine	Médecins Sans Frontières-France Paris, France	Francis.VARAINÉ@paris.msf.org

## Fortsetzung von Anhang 1

#	Studie durchgeführt in:	Anzahl der Isolate	Resistenztests vorhanden:	MIRU-VNTR Typisierung in	Kontakt	Adresse	email
19	Deutschland	133	ja	Borstel	Borstel	National Reference Center for Mycobacteria, Molecular Mycobacteriology Research Center Borstel, Borstel, Germany	srueschg@fz-borstel.de
20	Moldawien	51	ja	Borstel	Dr. Valeriu Crudu	National TB Reference Laboratory Phthysiopneumology Institute Chisinau, Republic of Moldova	valeriu.crudu@gmail.com
21	Nepal	54	nein	Borstel	Prof. Dr. Sebastien Gagneux	Tuberculosis Research Unit Dep. of Med. Parasitology & Infection Biol. Swiss Tropical & Public Health Institute Socinstrasse 57, 4002 Basel, Switzerland	Sebastien.Gagneux@unibas.ch
22	Usbekistan	190	ja	Borstel	Dr. Helen Cox	Médecins Sans Frontières Town One Properties - Site B Sulani Drive, Khayelitsha Cape Town, South Africa	hcox@burnet.edu.au
23	Papua Neu Guinea	33	nein	Borstel	Marie Ballif, Prof. Dr. Hans Peter Beck	Molecular Parasitology-Epidemiology Swiss Tropical and Public Health Institute Socinstrasse 57 CH 4002 Basel, Switzerland	Hans-Peter.Beck@unibas.ch
24	Polen	17	ja	Borstel	Prof. Ewa Augustynowicz-Kopec	Head of Microbiology Department NTRL 26 Plocka 01-138 Warsaw, Poland	araceli@op.pl
25	Schweden	12	ja	Sweden	Dr. Sven Hoffner	Department for Preparedness Swedish Institute for Communicable Disease Control SE-171 82 Solna, Sweden	sven.hoffner@smi.se
26	Deutschland	11	nein	Borstel	Borstel	National Reference Center for Mycobacteria, Molecular Mycobacteriology Research Center Borstel, Borstel, Germany	srueschg@fz-borstel.de, stniemann@yahoo.de
27	Sierra Leone	4	ja	Borstel	Borstel	National Reference Center for Mycobacteria, Molecular Mycobacteriology Research Center Borstel, Borstel, Germany	srueschg@fz-borstel.de, stniemann@yahoo.de
28	Russland	44	nein	Russia	Dr. Igor Mokrousov	Laboratory of Molecular Microbiology St. Petersburg Pasteur Institute St. Petersburg 197101 Russia	igormokrousov@yahoo.com

## Fortsetzung von Anhang 1

#	Studie durchgeführt in:	Anzahl der Isolate	Resistenztests vorhanden:	MIRU-VNTR Typisierung in	Kontakt	Adresse	email
29	Swasiland	84	ja	Borstel	Dr. Elisabeth Sanchez-Padilla, Dr. Maryline Bonnet	Epicentre, Paris, France Clinical Research department, Epicentre, Geneva, Switzerland	Elisabeth.SANCHEZ@epicentre.msf.org; Maryline.BONNET@geneva.msf.org
30	Thailand	12	nein	Borstel	Borstel	National Reference Center for Mycobacteria, Molecular Mycobacteriology Research Center Borstel, Borstel, Germany	srueschg@fz-borstel.de, stniemann@yahoo.de
31	Turkmenistan	70	ja	Borstel	Dr. Helen Cox	Médecins Sans Frontières Town One Properties - Site B Sulani Drive, Khayelitsha Cape Town, South Africa	hcox@burnet.edu.au
32	Russland	32	ja	Borstel	Borstel	National Reference Center for Mycobacteria, Molecular Mycobacteriology Research Center Borstel, Borstel, Germany	srueschg@fz-borstel.de, stniemann@yahoo.de
33	Deutschland	15	nein	Borstel	Borstel	National Reference Center for Mycobacteria, Molecular Mycobacteriology Research Center Borstel, Borstel, Germany	srueschg@fz-borstel.de, stniemann@yahoo.de
34	Diverse	31	nein	Lille	Dr. Philip Supply, P. Biffani	CIL - Center for Infection and Immunity of Lille Institut Pasteur de Lille 1 Rue du professeur Calmette 59019 Lille, FRANCE	philip.supply@ibl.fr
35	USA	2793	nein	CDC	Lauren Cowan, James E. Posey	CDC	los4@cdc.gov, hzp9@cdc.gov
36	Peru	60	nein	Borstel	Francesca Barletta	Laboratorio de Enfermedades Entericas y Nutricion Unidad de Epidemiologia Molecular en TB Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt Universidad Peruana Cayetano Heredia	francescabarletta@yahoo.es
<b>Summe</b>		<b>4987</b>					

**Anhang 2: Einbezogene Studien zur Darstellung der Proportionen von MDR-Stämmen innerhalb der sieben identifizierten klonalen Komplexe des MTBK Beijing Genotyps.**

#	Studie durchgeführt in:	Jahr	Anzahl der Isolate	sensibel	nicht MDR	MDR	Studienleitung
3	China	2005	68	21	23	24	I. Mokrousov, St. Petersburg Pasteur Institute , St. Petersburg, Russland
8	Dänemark	1993-2011	62	52	7	3	M. Rasmussen, Statens Serum Institute, Kopenhagen, Dänemark
9	Estland	2008-2009	67	40	27	0	P. Supply, Institut Pasteur de Lille, Lille, Frankreich
10	Georgien	2007	43	26	9	8	M. Gegja, The National Center for TB and Lung Diseases, Tbilisi, Georgia
11	Deutschland	2001-2009	60	46	14	0	Borstel
12	Südafrika	keine Daten	42	22	6	14	P. Supply, Institut Pasteur de Lille, Lille, Frankreich
15	Kiribati	2010	35	35	0	0	Borstel
16	Korea	keine Daten	186	76	48	62	C. Shamputa, National Institutes of Health, Bethesda, USA
17	Litauen	1999-2011	156	11	19	126	T. Stakenas, Institute of Biotechnology, Vilnius, Lettland
18	Abchasien (Georgien)	2003-2005	80	13	21	46	Dr. Francis Varaine, Médecins Sans Frontières-France, Paris, France
20	Moldawien	2008-2010	35	21	2	12	Borstel
29	Swasiland	2007-2009	82	74	2	6	Borstel
25	Schweden	2010	12	8	4	0	S. Hoffner, Swedish Institute for Communicable Disease Control, Solna, Schweden
31	Turkmenistan	2001-2002	70	20	31	19	Borstel
36	Peru	2010-2011	56	41	11	4	F. Barletta, Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Lima, Peru
	Summe		<b>1054</b>	<b>506</b>	<b>224</b>	<b>324</b>	



## Fortsetzung von Anhang 3

Borstel ID	Sequenz		Daten- satz	INH	SM	RMP	EMB	PZA	PTH	CAP	AMI	PAS	OFX	CS
	Länge	Abd.												
10107-01	200 bp	83,3	1)	r	r	s	s	r	s	kA	kA	kA	kA	kA
10529-05	200 bp	58,2	1)	r	r	r	r	s	kA	b	r	s	s	s
10735-04	200 bp	52,7	1)	r	r	r	r	s	kA	s	s	s	s	s
10737-02	200 bp	84,2	1)	s	s	s	s	s	s	kA	kA	kA	kA	kA
10812-03	200 bp	68,6	1)	r	r	r	b	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA
11251-09	200 bp	59,4	1)	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA
11458-02	200 bp	49,7	1)	r	r	s	s	s	s	kA	kA	kA	kA	kA
12448-03	200 bp	68,7	1)	r	r	r	s	s	s	s	kA	s	s	s
1312-05	200 bp	54,1	1)	r	r	r	r	r	kA	s	s	s	s	s
1339-07	200 bp	54,8	1)	s	s	s	s	s	s	kA	kA	kA	kA	kA
1500-03	200 bp	96,8	1)	s	s	s	s	s	s	kA	kA	kA	kA	kA
1511-02	200 bp	47,5	1)	s	s	s	s	s	s	kA	kA	kA	kA	kA
178-03	200 bp	52,4	1)	s	s	s	s	s	s	kA	kA	kA	kA	kA
1934-03	200 bp	90,5	1)	s	s	s	s	s	s	kA	kA	kA	kA	kA
2009-08	200 bp	72,8	1)	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA
2389-05	200 bp	59,2	1)	r	r	r	r	s	kA	s	s	s	s	s
3435-06	200 bp	85,3	1)	s	s	s	s	s	s	kA	kA	kA	kA	kA
3811-05	200 bp	70,8	1)	r	r	r	r	r	kA	s	s	s	s	s
4296-09	200 bp	90,6	1)	s	s	s	s	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA
4403-05	200 bp	107,9	1)	r	r	s	s	s	r	kA	kA	kA	kA	kA
5250-07	200 bp	64	1)	r	r	r	r	r	s	s	s	s	s	s
5569-09	200 bp	54,2	1)	s	s	s	s	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA
5712-95	200 bp	109,5	1)	r	r	r	s	s	kA	kA	kA	s	kA	kA
6844-06	200 bp	100,5	1)	r	r	r	r	r	r	s	s	s	r	r
7187-09	200 bp	40,2	1)	s	s	s	s	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA
7426-10	200 bp	54,5	1)	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA
7443-10	200 bp	53	1)	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA
7453-10	200 bp	84,3	1)	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA
7461-10	200 bp	70,9	1)	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA
7942-05	200 bp	63,3	1)	r	r	r	r	r	kA	s	s	s	s	s
8073-07	200 bp	38	1)	r	r	r	r	s	s	s	s	kA	r	r
8304-09	200 bp	79,7	1)	s	s	r	s	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA
8380-11	200 bp	80	1)	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA
8383-11	200 bp	98	1)	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA
8389-11	200 bp	49,1	1)	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA
8455-05	200 bp	67,2	1)	r	r	r	r	r	kA	s	s	s	s	s
8888-01	200 bp	71,7	1)	r	r	s	s	s	s	kA	kA	kA	kA	kA
9052-05	200 bp	106,3	1)	r	r	r	r	r	kA	s	s	s	s	s
9406-05	200 bp	73,4	1)	r	r	r	r	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA
966-95	200 bp	88,2	1)	r	kA	r	r	r	s	kA	kA	s	kA	kA
9827-01	200 bp	88,6	1)	r	r	s	r	r	r	kA	kA	kA	kA	kA
R04-0039	200 bp	48,4	1)	s	kA	s	s	s	kA	kA	kA	kA	kA	kA
R06-0174	200 bp	61,3	1)	s	kA	s	s	s	kA	kA	kA	kA	kA	kA
R10-0225	200 bp	57,4	1)	s	kA	s	s	s	kA	kA	kA	kA	kA	kA
10507-09	51 bp	138,2	1)	r	r	r	r	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA
683-05	51 bp	208,1	1)	r	r	r	r	r	kA	s	s	f	s	s
4287-09	51 bp	388	1)	s	s	s	s	kA	kA	kA	kA	kA	kA	kA
4419-02	51 bp	446,9	1)	r	r	r	r	s	s	kA	kA	kA	kA	kA
4461-02	51 bp	782,4	1)	r	r	r	r	s	s	kA	kA	kA	kA	kA
694-05	51 bp	617,1	1)	r	r	r	r	r	kA	s	s	s	s	s
9686-04	51 bp	728,4	1)	r	r	r	s	r	kA	r	r	s	s	s
967-02	72 bp	71,1	1)	r	s	s	s	s	s	kA	kA	kA	kA	kA
4546-04	72 bp	34,8	1), 3)	r	r	r	s	s	kA	s	s	s	s	s
3075-05	72 bp	53,5	1), 3)	r	r	r	s	r	kA	r	r	s	r	r
6590-05	72 bp	24,2	3)	r	r	r	s	r	kA	r	r	s	r	r
10525-05	72 bp	51,3	3)	r	r	r	s	r	kA	r	r	s	r	r
10721-03	46 bp	96,7	3)	r	r	s	s	s	r	r	s	s	s	s
10723-03	46 bp	93,9	3)	r	r	r	s	s	r	r	s	s	s	s
1785-04	46 bp	104,7	3)	r	s	r	s	r	r	r	s	r	s	r
4706-05	46 bp	121,1	3)	r	s	r	s	s	r	r	s	r	r	r

## Fortsetzung von Anhang 3

Borstel ID	Sequenz		Daten- satz	INH	SM	RMP	EMB	PZA	PTH	CAP	AMI	PAS	OFX	CS
	Länge	Abd.												
5692-96	72 bp	13	3)	r	r	r	s	s	s	kA	s	kA	s	s
4572-98	72 bp	23,6	3)	r	r	r	s	r	s	kA	s	r	s	s
2752-99	72 bp	32	3)	r	r	r	s	r	s	r	r	r	s	s
10033-02	150 bp	85,1	2)	r	r	r	r	s	r	s	kA	s	s	s
1015-08	150 bp	79	2)	r	r	r	s	s	s	s	s	s	s	s
10191-03	150 bp	95,5	2)	r	r	r	r	r	b	r	kA	s	s	s
10205-04	150 bp	97,7	2)	r	r	r	r	s	r	s	kA	s	s	s
10299-02	150 bp	93,7	2)	r	r	r	s	r	r	s	kA	r	s	s
10502-06	150 bp	60	2)	r	r	r	s	s	s	s	s	s	s	s
10511-04	150 bp	85,1	2)	r	r	r	s	s	r	s	kA	s	r	r
10714-01	150 bp	73,8	2)	r	r	r	r	r	r	s	kA	s	s	s
10836-09	150 bp	228,5	2)	r	r	r	s	s	s	s	s	s	s	s
11103-09	150 bp	81	2)	r	r	r	r	r	r	s	s	s	s	s
11122-03	150 bp	74,1	2)	r	r	r	s	s	s	s	kA	s	s	s
11290-07	150 bp	96,3	2)	r	r	r	r	s	s	s	s	s	s	s
12060-03	150 bp	91	2)	r	r	r	r	s	r	s	kA	s	s	s
12448-03	150 bp	236,2	2)	r	r	r	s	s	s	s	kA	s	s	s
12509-03	150 bp	76,9	2)	r	r	r	r	s	r	r	kA	s	s	s
12742-03	150 bp	83	2)	r	r	r	r	s	s	r	kA	s	s	s
12800-02	150 bp	82,2	2)	r	r	r	s	s	s	s	kA	r	s	s
1507-03	150 bp	91,9	2)	r	r	r	r	s	r	s	kA	s	s	s
1635-05	150 bp	66,8	2)	r	r	r	s	s	s	s	kA	s	s	s
1682-06	150 bp	64,1	2)	r	r	r	s	s	s	s	r	s	s	s
1711-07	150 bp	71,3	2)	r	r	r	r	s	s	r	r	s	s	s
1879-10	150 bp	73,4	2)	r	r	r	s	r	r	s	s	b	s	s
2197-04	150 bp	115,8	2)	r	r	r	r	r	s	r	r	r	s	s
2483-03	150 bp	74,5	2)	r	r	r	r	r	s	s	kA	s	s	s
2623-08	150 bp	78,8	2)	r	r	r	r	s	s	s	s	s	s	s
2644-06	150 bp	66,6	2)	r	r	r	r	s	s	s	s	s	s	s
3111-03	150 bp	89,9	2)	r	r	r	r	s	s	s	kA	s	s	s
3248-01	150 bp	78,1	2)	r	r	r	s	s	s	s	kA	s	s	s
3280-05	150 bp	89,4	2)	r	r	r	s	s	s	s	kA	s	s	s
3315-09	150 bp	95,7	2)	r	r	r	b	s	s	s	s	s	s	s
3660-05	150 bp	56,1	2)	r	r	r	r	r	s	r	r	s	s	s
3684-08	150 bp	71,8	2)	r	r	r	kA	r	b	r	r	r	r	r
3842-05	150 bp	61,1	2)	r	r	r	r	r	s	s	kA	s	s	s
3967-11	150 bp	67,4	2)	r	r	r	r	s	r	s	s	s	s	s
4104-04	150 bp	91,8	2)	r	r	r	r	s	s	s	kA	s	s	s
4228-98	150 bp	81,5	2)	r	r	r	s	r	s	s	s	s	s	s
4266-07	150 bp	98,9	2)	r	r	r	r	r	r	r	r	s	s	s
4267-05	150 bp	71,7	2)	r	r	r	r	r	s	s	kA	s	s	s
4625-02	150 bp	85,3	2)	r	r	r	r	s	s	s	kA	s	s	s
464-11	150 bp	67,7	2)	r	r	r	r	r	s	s	s	s	r	r
4849-03	150 bp	92,6	2)	r	r	r	s	s	s	s	s	r	s	s
4897-05	150 bp	75,2	2)	r	r	r	r	r	r	s	kA	s	s	s
4968-03	150 bp	73,3	2)	r	r	r	r	r	r	s	kA	s	s	s
5219-04	150 bp	63,1	2)	r	r	r	r	r	s	s	kA	s	r	r
5467-07	150 bp	78,8	2)	r	r	r	r	r	s	s	s	s	s	s
5510-00	150 bp	294,3	2)	r	r	r	s	s	s	s	kA	s	s	s
5529-99	150 bp	91,6	2)	r	r	r	s	s	r	s	s	r	s	s
5659-01	150 bp	79,9	2)	r	r	r	r	s	s	s	kA	s	s	s
5686-09	150 bp	76,4	2)	r	r	r	r	r	r	s	b	s	r	r
6103-09	150 bp	71,8	2)	r	r	r	s	r	r	s	s	s	s	s
6162-04	150 bp	96,3	2)	r	r	r	r	r	s	s	s	s	s	s
6164-08	150 bp	83,6	2)	r	r	r	r	s	s	s	s	s	s	s
6197-05	150 bp	70,1	2)	r	r	r	r	s	s	s	kA	r	s	s
6311-09	150 bp	123,8	2)	r	r	r	s	s	r	r	r	s	s	s
6448-04	150 bp	88	2)	r	r	r	r	s	s	s	s	s	s	s
6449-04	150 bp	84,8	2)	r	r	r	r	r	s	s	s	s	s	s
6524-05	150 bp	65	2)	r	r	r	r	r	s	s	kA	s	s	s

## Fortsetzung von Anhang 3

Borstel ID	Sequenz		Daten- satz	INH	SM	RMP	EMB	PZA	PTH	CAP	AMI	PAS	OFX	CS
	Länge	Abd.												
6657-05	150 bp	65,4	2)	r	r	r	r	s	s	s	kA	s	s	s
6818-04	150 bp	100,9	2)	r	r	r	s	s	s	s	s	s	s	s
6912-04	150 bp	92,9	2)	r	r	r	s	s	s	s	s	s	s	s
6941-03	150 bp	82	2)	r	r	r	s	s	s	kA	kA	s	s	s
699-09	150 bp	67,7	2)	r	r	r	r	s	r	s	s	s	s	s
7086-05	150 bp	59,6	2)	r	r	r	r	r	s	s	kA	s	s	s
7227-02	150 bp	76,5	2)	r	r	r	s	s	s	s	kA	s	s	s
7389-04	150 bp	53,7	2)	r	r	r	r	r	s	s	kA	s	s	s
7492-05	150 bp	77,7	2)	r	r	r	r	s	s	s	kA	s	s	s
7655-09	150 bp	71,4	2)	r	r	r	r	r	s	s	s	s	s	s
7674-04	150 bp	92,2	2)	r	r	r	s	s	s	s	kA	s	s	s
7683-04	150 bp	85,5	2)	r	r	r	s	r	s	s	s	s	s	s
7757-09	150 bp	84,2	2)	r	r	r	r	s	r	s	s	s	s	s
8273-06	150 bp	106,4	2)	r	r	r	r	s	s	s	s	s	s	s
8309-05	150 bp	66	2)	r	r	r	s	s	s	r	kA	s	s	s
8373-02	150 bp	81,5	2)	r	r	r	r	s	r	r	kA	r	s	s
853-07	150 bp	93,1	2)	r	r	r	r	r	s	r	r	s	s	s
8632-07	150 bp	77,3	2)	r	r	r	r	r	r	r	r	s	s	s
8980-04	150 bp	95	2)	r	r	r	r	s	r	s	s	s	s	s
9063-06	150 bp	79,2	2)	r	r	r	s	r	s	s	s	s	s	s
918-03	150 bp	79,2	2)	r	r	r	s	s	s	s	kA	s	s	s
919-06	150 bp	94	2)	r	r	r	s	s	s	s	s	s	s	s
9712-04	150 bp	87,3	2)	r	r	r	r	r	r	r	r	s	s	s
5033-12	150 bp	78,2	2)	r	r	r	s	s	r	s	s	s	s	s
5158-12	150 bp	91,8	2)	r	r	r	s	r	s	s	s	s	s	s
6022-01	150 bp	66,9	2)	r	r	r	r	s	s	r	r	s	s	s
12615-95	250 bp	78,7	2)	r	r	r	r	r	r	kA	kA	s	kA	kA
1319-99	250 bp	127,4	2)	r	r	r	r	s	s	s	s	s	s	s
1325-07	250 bp	81,6	2)	r	r	r	s	s	s	s	s	s	s	s
1628-00	250 bp	115,1	2)	r	r	r	s	s	s	r	s	s	s	s
1744-01	250 bp	55,9	2)	r	s	r	s	s	r	s	kA	s	s	s
3515-01	250 bp	63,6	2)	r	r	r	s	s	s	s	kA	s	s	s
3637-99	250 bp	109,3	2)	r	r	r	r	r	s	s	s	s	s	s
4515-00	250 bp	53,3	2)	r	r	r	r	s	r	s	kA	s	s	s
454-00	250 bp	95	2)	r	r	r	r	s	s	s	s	s	s	s
4940-09	250 bp	101,2	2)	r	s	r	kA	kA	s	s	s	s	r	r
4952-06	250 bp	113,9	2)	r	r	r	s	s	r	s	s	s	s	s
5473-01	250 bp	71	2)	r	r	r	r	r	r	r	r	s	s	s
5712-95	250 bp	109,5	2)	r	r	r	s	s	kA	kA	kA	s	kA	kA
5917-98	250 bp	74,8	2)	r	r	r	r	r	s	s	s	r	s	s
5962-00	250 bp	57,3	2)	r	r	r	r	s	s	s	kA	s	s	s
624-01	250 bp	66,9	2)	r	r	r	s	s	r	s	kA	s	s	s
6461-99	250 bp	131,2	2)	r	r	r	s	s	r	s	s	s	s	s
6704-99	250 bp	119	2)	r	r	r	r	s	r	r	r	r	s	s
7169-00	250 bp	58,5	2)	r	r	r	r	s	s	s	kA	s	s	s
7778-99	250 bp	101,1	2)	r	r	r	r	s	r	s	s	s	s	s
7812-05	250 bp	145,7	2)	r	r	r	r	s	r	s	kA	s	s	s
8017-01	250 bp	82,6	2)	r	r	r	r	r	r	r	r	s	s	s
819-07	250 bp	55,7	2)	r	r	r	r	r	r	s	s	s	s	s
856-98	250 bp	93,6	2)	r	r	r	r	r	kA	s	s	s	s	s
8641-01	250 bp	53,6	2)	kA	kA	kA	r	s	s	kA	kA	s	s	s
8911-00	250 bp	87,2	2)	r	r	r	r	s	s	s	kA	r	s	s
966-95	250 bp	88,2	2)	r	kA	r	r	r	s	kA	kA	s	kA	kA
9847-95	250 bp	64,4	2)	r	r	r	r	r	r	kA	kA	s	kA	kA
9916-97	250 bp	85,7	2)	r	r	r	b	r	r	kA	kA	s	s	s

**Anhang 4: In dieser Arbeit verwendete Primer. Angegeben sind Sequenz, Amplikongröße [bp], Primerhybridisierungstemperatur (T<sub>a</sub>) und Elongationszeit bei 72 °C**

Rv #	Primer	Sequenz 5'-3'	Pos 5'	Amplikon [bp]	T <sub>a</sub> [C°] / Elongation[s]
Rv0021c	Rv0021c_F_546	CCTTGCCGCCGCGTTGATGTTGG	546	696	62/90
	Rv0021c_R_1242	TGCGGGCGAGTGGCGGAATGG	1242		
Rv0036c	Rv0036c_F_308	GGGGGCGGCTGCACGAGAACT	308	812	62/90
	Rv0036c_R_1120	GCCGAAGCCGACCGACTGAGATGT	1120		
Rv0107c	Rv0107c_F_1900	GCCCGGGCAGCCAGTGAATCC	1900	555	62/90
	Rv0107c_R_2455	CGCCTCGGCTCGCAATCGTT	2455		
Rv0336	Rv0336_F_675	CGATCCGCGCAGCCGTGAGCAG	675	750	62/90
	Rv0336_R_1425	TGGCGGGCGGCGTGGTTTTGTC	1425		
Rv1300	Rv1300_F_46	GCGGGGAGAGCGGCACAAT	46	483	62/90
	Rv1300_R_529	GCGGCGGCATAGTCAAG	529		
Rv1588c	Rv1588c_F_101	CGGAACGGCTGCGGTCTCTGG	101	891	62/90
	Rv1588c_R_992	GTAGTGGTGGGCGTGGCTGGTCAT	992		
Rv1662	Rv1662_F_4013	TCCTGCAGTTCGCCGATACCA	4013	875	62/90
	Rv1662_R_4888	GCCGATGCAGCGCTTCAATTT	4888		
Rv1737c	Rv1737c_F_56	TCTGGGCGTGGAACCTGAT	56	848	62/90
	Rv1737c_R_904	GGCCGCCGACCACACCTC	904		
Rv1830	Rv1830_F_-215	GCGACGGCGAGCATCCATTATTG	-215	935	62/90
	Rv1830_R_720	TGCCGCGTGCATTCTGTGTCTGT	720		
Rv2048c	Rv2048c_F_10290	CGTCATGATCGCGCTGGGTCTGTA	10290	1432	62/90
	Rv2048c_R_11722	GCGGGCGAAGCGTTGAAGTCC	11722		
Rv2259	Rv2259_F_-556	GGTCATGCCGCTAGCCACTCC	-556	707	62/90
	Rv2259_R_151	CTCGCGTAGGTCAGGTCGGTATG	151		
Rv2344c	Rv2344c_F_776	GGGTGAGCGCCGACGAGTTGATGG	776	724	65/90
	Rv2344c_R_1500	CGCCGCAGCCGAAAGCAGTGGA	1500		
Rv2491	Rv2491_F_-27	TTAACGAACCCGAGACGAGGAGAG	-27	938	62/90
	Rv2491_R_911	TTTTTGCGCCACGACTGAAGC	911		
Rv3610c	Rv3610c_F_1750	GCCGGCGAGCTGCTGGAAAAGGAG	1750	880	62/90
	Rv3610c_R_2630	CGTCGTCGCCCGGATGTAGC	2630		
Rv3862c	Rv3862c_F_-228	TGCCGCTACAGTTCACCTCACACC	-228	756	62/90
	Rv3862c_R_528	CAGGCCTGCAAAACGTCAATCTC	528		
Rv3894c	Rv3894c_F_3906	GGGTGCGGCGCTGTGGAAGTTGA	3906	408	62/90
	Rv3894c_R_4314	CGGTACGTGTGGGCGGATGTGAA	4314		
Rv3854c	ethA_F_839	AGCACTTCGGCCCGCACTACAACC	839	453	62/90
	ethA_R_1292	AGGGCCGCTCTTCGACATCTGA	1292		
Rv0006	gyrA_F_78	CAGCTACATCGACTATGCG	78	319	62/60
	gyrA_R_397	GGGCTTCGGTGTACCTCAT	397		
Rv0667	rpoB_F_1253	TCGCCGCGATCAAGGAGT	1253	157	62/60
	rpoB_R_1410	GTGCACGTCGCGGACCTCCA	1410		
Rv1694	tlyA_F_-77	GCATCGCAGCTCGTCTTT	-77	946	62/90
	tlyA_R_869	GGTCTCGGTGGCTTCGTC	869		
Rv1908c	katG_F_781	GAAACAGCGGCGCTGATCGT	781	209	62/60
	katG_R_990	GTTGTCCATTCGTCGGGG	990		
Rv3795	embB_F_2958	GGAATGGGCGGTGCGTTTG	2958	577	62/90
	embB_R_3535	CAACCGGGGTGATGATGGC	3535		
Rv3795	embB_F_725	TGGACGGGCGGGGCTCAAT	725	333	62/90
	embB_R_1058	GGCAGGCGCATCCACAGACT	1058		
MTB000019	rrs_F_1202	CTTATGTCCAGGGCTTCA	1202	363	48/60
	rrs_R_1565	CAGTTGGGGCGTTTTTC	1565		
Rv2416c	Rv2416c_F_-298	CGACCCGCGAGCTGCGAACGAC	-298	484	65/90
	Rv2416c_R_186	CGCCATCCCGACCACCTCAGAACC	186		
Rv0281	Rv0281_F_696	CGCCGAGGAGCCGAGGAGCAC	696	650	64/90
	Rv0281_R_1346	TCAGCGCGCGAAACCAGACC	1346		
Rv0380c	Rv0380c_F_-240	CCTCGGTGCTGATCCTTCTGACG	-240	448	62/90
	Rv0380c_R_208	ACCGCCGACGCCGACGATGTG	208		
Rv1076	Rv1076_F_528	CAAGCAGGCGCATCCCAACATCAA	528	709	62/90
	Rv1076_R_1237	TCCGGGACAGCAACACGCACTT	1237		
Rv3619c	Rv3619c_F_-200	CGGCGGGGCTGGAGTGG	-200	466	61/90

## Fortsetzung Anhang 4

Rv #	Primer	Sequenz 5'-3'	Pos 5'	Amplikon [bp]	T <sub>A</sub> [C°] / Elongation[s]
	Rv3619c_R_266	ACGGCGCTGTCGGTTTGTGC	266		
Rv0094c	Rv0094c_F_693	TGACGCACCGGCTACCACAG	693	411	61/90
	Rv0094c_R_1104	CCAGCGGGCTCGGACCACATC	1104		
Rv2043c	pncA_F_108	CGAAGCGGCGGACTACCATCACG	108	496	62/90
	pncA_R_604	CGCTCCACCGCCGCAACAG	604		
Rv0006	gyrA_F_-138	GCCGCGCGGACGAGTTGTTCT	-138	521	62/90
	gyrA_R_383	CTCATCGCCGCGGTGGGTCAT	383		
Rv0006	gyrA_F_1882	CGCAACGGGCTGGTAAAAAGTCC	1882	551	62/90
	gyrA_R_2433	TGTGTCGCCCTCGCCAGATTCAT	2433		
Rv0667	rpoB_F_6	AGATTCCCGCCAGAGCAAAACAGC	6	907	62/90
	rpoB_R_913	CGCGGGCCAGGTCGTAGC	913		
Rv0667	rpoB_F_1670	GCAAGGCGGGCGAGGTGGAGTA	1670	1823	62/150
	rpoB_R_3493	ATTCGTTGCGGGACAGATTGATTC	3493		
Rv0668	rpoC_F_1076	ATCTGGGTGCGCCGGAATCATC	1076	773	65/90
	rpoC_R_1849	CGGCCGCGAAGAGTAGACACCAG	1849		
Rv0668	rpoC_F_3166	GAGGACGCGGAGCGGTTCTACAAG	3166	378	65/90
	rpoC_R_3544	CGATCAGCGAGCCAGGCAAAAAC	3544		
Rv1358	Rv1358_F_2247	GGAAGCCGCTCAACCTACT	2247	668	62/90
	Rv1358_R_2915	ACTCGCGCCCGTGCTATC	2915		
Rv1847	Rv1847_F_221	ACGGCGAAGGCGGAGTGTGGT	221	361	62/90
	Rv1847_R_582	CGCGATGGCTCCGGATGATTGAG	582		
Rv1908c	katG_F_1115	GGCGCTCCCCGACGATGCT	1115	484	62/90
	katG_R_1599	CGGCGCCGCGGAGTTGAAT	1599		
Rv1887	Rv1887_F_771	CGCCGCGCCGTGACCTT	771	588	60/60
	Rv1887_R_1359	GCATAATGTGGCCTTCGCTACTGG	1359		
Rv2101	Rv2101_F_1620	TCTGGCGTGGCTGGCGTTTTTGTG	1620	519	62/90
	Rv2101_R_2139	GAGCAGGCCCGGTTGAGGAAGTC	2139		
Rv2754c	Rv2754c_F_-348	CAGGAGCGGTGCGCGATTGGTA	-348	521	65/90
	Rv2754c_R_173	GCGTTGGTGGCGGCTTTGGGATTG	173		
Rv2812	Rv2812_F_1104	GGTCGGCCGAAAGTGGAGTTGGT	1104	153	62/90
	Rv2812_R_1257	GGGCGGTGCGGTGGGGGTTTC	1257		
Rv2931	Rv2931_F_1014	GGGTGCCGGGAGTGGTGTCTCAA	1014	1525	62/90
	Rv2931_R_2539	TGGTGGGGTCCGTGGGGTCAGAT	2539		
Rv3011c	Rv3011c_F_427	ACCCGCAACCCGTGGAATCTCG	427	1065	62/90
	Rv3011c_R_1462	CGCGGGCGGCCTCATAAGC	1462		
Rv3423c	Rv3423c_F_-190	CACGGGCGCAATAGGTTCACTTCC	-190	800	62/90
	Rv3423c_R_510	TGCCGGTCCCACGCCATTG	510		
Rv3564	Rv3564_F_148	GGTGCCGCGCGCTGGTCATTC	148	382	62/90
	Rv3564_R_530	TCGGGGCACAGCGGCTCGGTCTCT	530		
Rv3793	embC_F_2637	GGCGCCGTGCTGGTGGTGA	2637	580	62/90
	embC_R_3217	CGGGCTGGGCGTGGGGTAGTAAG	3217		
Rv3794	embA_F_140	CGCCTAGCAGCCGTCGTCTC	140	460	62/90
	embA_R_600	GCCGGGCTCGTGATAAACC	600		
Rv3795	embB_F_934	CACGCCGCTACATGTCCAATAT	934	366	62/90
	embB_R_1300	CCAGCGCCGCGGTGTGAGC	1300		
	Rv2544_R_342	ATCGGCACTGAGTTCCTTACACAA	342		
Rv3854c	ethA_F_121	ATGGGCGGCACCTGGGATTTGTT	121	741	65/90
	ethA_R_862	GGTTGTAGTGCGGGCCGAAGTGCT	862		
	Rv3889c_R_357	GGTGCCGGCCGGGTAGAGC	357		
Rv0682	rpsL_F_-203	CGGCGGGTATTGTGGTTGCTCGTG	-203	800	65/90
	rpsL_R_597	CCTCCAGGGCGGGTTTGACATTG	597		
MTB000063	mcr11_F_-363	GCTCGGGCCGCACTTCTTCC	-363	605	62/90
	mcr11_R_242	ATCCGGGGTGACGTCAGGCTTTTT	242		
Rv2584c	Rv2584c_F_321	CGACGCCGCGGGTTTCTGGTG	321	220	65/90
	Rv2584_R_541	CGATGGTGCCGCGGTTGCTAA	541		
Rv0565c	Rv0565c_F_-469	TTCCGCGGCACCGACACCAAGAT	-469	902	65/90
	Rv0565c_R_433	AGCCGCTGCCGAAGAACACGAACC	433		
Rv2764c	Rv2764c_F_371	ATTCCGCGCATCATCGTGTGCG	371	921	65/90
	Rv2764c_R_1292	GTCTCGCCCGCCATGTCTCGTC	1292		
Rv0486	Rv0486_F_88	CCATCCGGCCATCCAATC	88	389	62/90

## Fortsetzung Anhang 4

Rv #	Primer	Sequenz 5'-3'	Pos 5'	Amplikon [bp]	T <sub>A</sub> [C°] / Elongation[s]
	Rv0486_R_477	ACCCGACAGCCAGTAGTGCAGTG	477		
Rv1918c	Rv1918c_F_544	CCCGCGGCCGTGGTGAC	544	/	Kein Produkt
	Rv1918c_R_1220	GCGCCGCCGTGTTGAAGGTA	1220		
Rv2041c	4572_98_del_F	CGCGCCCCGACCCCGTAACAGACT	2.287.796	554	65/90
Rv2043c	4572_98_del_R	GACCCGCCTCAATCCAAGACACGA	2.291.453		
	4572_98_int	TTCCCGCCTTCTACGCTATGACC	2.288.389		
IGR	RD150F	GCTTGCCGGGTGGGTGGAGGTC	1.895.624	2.056	65/180
Rv1675c	RD150R	CGCGCGCCGTGGTGAACA	1.900.693		
Rv1672c	RD150RI	CGGCTGGCGGGCAATGTTT	1.897.680		
Rv2813	RD207F	CCTGCGCGCGCGGATGAAACT	3.118.727	2.605	65/180
Rv2820c	RD207R	TGCCCCGCGGACACCCCTCTACTCT	3.128.194		
Rv2818c	RD207FI	CGCCGCGGATCAGATTGCTCACT	3.125.589		
IGR	RD105F	GCATCATGGCGCCGCTCTACACCT	79.135	1.673	65/180
Rv0076c	RD105R	AACGCCGAGCCACGCATTCATAA	85.298		
Rv0072	RD105RI	GCGCCGGATCTGACGACGAATACA	80.808		
Rv1187	RD142F	GCACGCGGATCGGGCACCAAC	1.330.890	2.956	67/210
Rv1193	RD142R	GGCGGCGGAGACGACAGCAGGATT	1.335.835		
Rv1189	RD142FI	TCGAGGCCGCAAGATCACAAAAA	1.332.879		
Rv2259	RD181F	TCGGCGGCCTCACGGATGGATT	2.532.963	2.492	65/180
Rv2263	RD181R	CGGGCGGCTGCGGGAACCTT	2.536.518		
Rv2262c	RD181RI	CTTGTTGGTGGCTGGCTGGTTTCG	2.535.455		
IS6110	IS54	TCGACTGGTTCAACCATCGCCG			60/90
IS6110	IS56	GCGACCTCACTGATCGCTGC			
IS6110	IS59	GCGCCAGGCGCAGGTCGATGC			
IS6110	IS60	GATCAGCGATCGTGGTCCTGC			
IS6110	IS61	GACCGCGATCTCTGCGACC			
IS6110	IS62	ACCAGTACTGCGGCGACGTC		523	
NTF	MDR-6	CCAGATATCGGGTGTGTGCAC	3.493.990	223	
NTF	MDR-7	CGCGAGATCTCATCGACAACC	3.494.412	175	
Rv0668	rpoC_K0178	TCCGACTTGAACGACCTGTA	1013	1301	62/90
	rpoC_K0179	GTTGCGCTCGTCGTGGTTCA	2314		
Rv3457c	rpoA_fw_1212	GTGCCCGGGTCAAAGAAGATGTC	196	746	62/90
	rpoA_rv_1919	GCTCGGCGGGCTGTCCT	942		

## Anhang 5: 1.108 identifizierte MLVA 15-9 Typen und Anzahl der zugeordneten Beiing-Isolate

MLVA Typ	Anzahl	MLVA Typ	Anzahl	MLVA Typ	Anzahl	MLVA Typ	Anzahl	MLVA Typ	Anzahl
94-32	505	3828-32	12	5547-175	7	3894-32	5	4837-32	4
100-32	302	95-32	12	900-32	7	1048-33	5	5371-185	4
204-32	180	895-32	12	1549-33	7	5387-32	5	6129-32	4
3781-32	179	4324-33	12	1083-33	7	4558-32	5	10513-32	4
1048-32	158	4655-32	12	4212-32	7	6213-32	5	797-32	4
342-32	89	4754-32	12	3725-32	7	1078-32	5	10167-32	4
204-33	72	3802-32	12	3317-32	7	1069-32	4	1724-32	4
1447-185	69	342-33	12	9138-32	7	809-32	4	9471-33	4
5105-438	57	5542-472	12	9356-32	6	95-34	4	9437-32	4
4509-32	57	1127-32	11	4553-32	6	1745-32	4	4737-32	3
1076-32	53	4201-32	11	1081-33	6	6564-32	4	10515-32	3
1065-32	52	2283-32	11	10512-32	6	5191-32	4	9127-32	3
5113-32	46	3804-32	11	811-32	6	5024-32	4	893-32	3
5108-439	44	1547-32	10	9391-32	6	1083-554	4	9136-32	3
1465-33	39	4829-456	10	10315-32	6	5552-32	4	9510-32	3
1310-189	34	9360-32	9	9378-32	5	4328-33	4	9421-122	3
3832-175	34	1047-189	9	1072-32	5	6065-33	4	1080-15	3
898-32	29	3365-32	9	230-32	5	7551-189	4	894-296	3
1325-32	25	6598-32	9	506-32	5	4743-32	4	94-296	3
407-32	24	5023-32	9	894-32	5	4747-32	4	1066-34	3
1749-33	24	5238-32	9	96-32	5	7553-145	4	6512-32	3
5143-32	22	4651-32	9	1940-189	5	9124-32	4	5498-332	3
99-32	20	7037-32	9	1465-572	5	3383-189	4	4201-332	3
1547-88	19	3763-32	9	9138-34	5	4197-32	4	6877-32	3
1631-32	19	3817-32	9	3828-85	5	4214-32	4	1048-332	3
1923-311	18	4517-32	9	9412-32	5	3819-229	4	5121-32	3
1068-32	18	9375-32	8	4563-32	5	3712-32	4	6232-32	3
2043-32	18	770-32	8	3805-32	5	1080-32	4	809-15	3
3839-32	18	9129-32	8	1749-32	5	2010-32	4	5629-32	3
2083-32	17	1963-32	8	1194-33	5	3769-32	4	4320-32	3
1066-32	17	9125-32	8	5238-33	5	3782-32	4	10608-32	3
4839-32	17	3873-32	8	9365-32	5	3801-32	4	4326-33	3
96-145	16	3821-32	8	5115-32	5	3808-32	4	7484-145	3
342-122	16	99-332	8	4620-189	5	2057-32	4	4744-25	3
3737-32	15	4205-32	8	3781-15	5	1048-394	4	6103-32	3
5967-33	15	9380-32	8	4694-32	5	3840-32	4	9487-73	3
5113-122	15	9473-33	8	3568-32	5	1048-387	4	4401-32	3
1905-122	14	9474-33	8	1262-32	5	2011-32	4	4403-32	3
3819-32	14	5386-32	7	897-32	5	2058-32	4	5117-32	3
1083-32	14	213-32	7	3846-32	5	9340-32	4	1075-32	3
1942-32	14	7188-32	7	3850-32	5	3899-32	4	6395-189	3
1071-32	13	801-32	7	3882-32	5	4515-32	4	4618-189	3
2061-32	13	7308-32	7	3891-32	5	6664-32	4	9530-32	3
9527-32	3	407-88	2	6825-33	2	10787-32	2	10872-34	2
10782-32	3	213-792	2	7549-33	2	1048-412	2	6873-32	2
9386-32	3	1922-88	2	10159-32	2	10801-32	2	5500-32	2
1738-164	3	3445-32	2	10710-32	2	10806-32	2	4557-32	2
5283-32	3	9397-32	2	7554-456	2	4695-32	2	4561-32	2
5284-32	3	9354-32	2	900-145	2	3713-88	2	4562-32	2
4694-25	3	1067-32	2	1048-145	2	3722-32	2	10896-32	2
1815-32	3	9422-122	2	10722-456	2	3729-32	2	10907-32	2
3728-32	3	1967-32	2	342-379	2	3735-32	2	5526-32	2
3747-32	3	9417-189	2	5868-494	2	10633-32	2	8912-32	2
3765-32	3	9420-122	2	100-63	2	1942-133	2	94-175	2
3788-32	3	9342-32	2	4650-32	2	9389-32	2	1076-175	2
3799-32	3	9427-32	2	4653-32	2	9371-32	2	5103-438	2
3807-32	3	9361-32	2	9329-122	2	3774-32	2	3802-175	2
3809-32	3	10161-32	2	10736-32	2	10837-32	2	1066-175	2
3814-32	3	10163-32	2	7545-32	2	3790-25	2	6730-499	2
1048-133	3	6491-32	2	9385-32	2	3798-32	2	1635-25	2
3865-32	3	10631-332	2	7559-164	2	9442-32	2	9556-185	2
3868-32	3	4404-32	2	4397-32	2	10647-32	2	7420-32	2
3885-32	3	10641-873	2	4398-32	2	3806-32	2	9331-32	2
3887-32	3	3770-15	2	4399-133	2	1923-32	2	6318-32	2
4520-32	3	1724-69	2	10616-32	2	898-34	2	8256-32	2
1942-33	3	6712-15	2	4402-32	2	3812-32	2	10517-32	2
3888-343	3	10660-493	2	9344-32	2	3820-32	2	9370-32	2
342-1147	3	396-32	2	10954-122	2	342-25	2	10155-32	2
342-175	3	9411-32	2	7561-33	2	3827-32	2	1047-32	2
100-175	3	6695-32	2	7054-32	2	3823-32	2	4398-34	2
4838-32	3	10672-15	2	10764-32	2	3829-32	2	9317-790	2



**Anhang 6: Charakteristische Polymorphismen für moderne Beijing-Stämme.** SNPs sind relativ zur H37Rv Genomposition angegeben.

Gen	SNP Pos.	SNP	Annotation	AS Austausch
<b>Zellwand und Zellprozesse</b>				
<i>ctpA</i>	101.539	C>T	cation transporter P-type ATPase A	-
<i>mce1E</i>	204.094	G>T	MCE-family lipoprotein LprK	-
<i>lpqI</i>	288.260	C>T	lipoprotein LpqI	-
<i>mmpL5</i>	776.182	C>T	transmembrane transport protein MmpL5	Asp->Asn
<i>Rv0987</i>	1.103.656	C>T	adhesion component transport transmembrane protein ABC transporter	Ala->Val
<i>Rv0988</i>	1.105.686	C>G	hypothetical protein	Leu->Val
<i>Rv0988</i>	1.105.687	T>C	hypothetical protein	Leu->Pro
<i>secA2</i>	2.067.684	G>A	preprotein translocase subunit SecA	Val->Met
<i>Rv1972</i>	2.216.963	C>G	mce associated membrane protein	His->Gln
<i>Rv1986</i>	2.230.045	G>A	integral membrane protein	Cys->Tyr
<i>ctpG</i>	2.235.087	G>A	metal cation transporter P-type ATPase G CtpG	-
<i>murC</i>	2.411.496	G>A	UDP-N-acetylmuramate-L-alanine ligase	-
<i>Rv2180c</i>	2.442.468	C>T	integral membrane protein	Trp->_
<i>esxU</i>	3.863.138	G>A	ESAT-6 like protein ESXU	Pro->Ser
<i>Rv3835</i>	4.309.927	T>G	hypothetical protein	Leu->Arg
<b>Konservierte, hypothetische Proteine</b>				
<i>Rv0307c</i>	377.014	C>T	hypothetical protein	-
<i>Rv0530</i>	621.598	C>T	hypothetical protein	Pro->Leu
<i>Rv1190</i>	1.333.669	T>G	hypothetical protein	-
<i>Rv1515c</i>	1.706.685	C>A	hypothetical protein	Gly->Val
<i>Rv1823</i>	2.069.771	C>A	hypothetical protein	Gln->Lys
<i>Rv1835c</i>	2.082.053	A>G	hypothetical protein	Cys->Arg
<i>Rv2059</i>	2.316.123	C>A	hypothetical protein	Thr->Lys
<i>Rv2189c</i>	2.451.700	A>C	hypothetical protein	-
<i>Rv2248</i>	2.522.955	T>G	hypothetical protein	Val->Gly
<i>Rv2712c</i>	3.024.343	G>A	hypothetical protein	Thr->Ile
<i>Rv3294c</i>	3.675.504	G>T	hypothetical protein	-
<i>Rv3415c</i>	3.834.486	T>C	hypothetical protein	-
<i>Rv3446c</i>	3.863.681	C>G	hypothetical protein	Arg->Pro
<i>Rv3531c</i>	3.968.006	A>C	hypothetical protein	Phe->Leu
<b>Transkription und Translation</b>				
<i>rimJ</i>	1.111.678	G>A	ribosomal-protein-alanine acetyltransferase	Gly->Ser
<i>mutT2</i>	1.286.766	G>C	7,8-dihydro-8-oxoguanine-triphosphatase	Gly->Arg
<i>ogt</i>	1.477.596	C>T	methylated-DNA-protein-cysteinemethyltransferase	-
<i>lysX</i>	1.849.934	A>G	lysyl-tRNA synthetase	Ile->Thr
<i>recX</i>	3.048.912	C>G	recombination regulator RecX	Val->Leu
<b>Intermediärmetabolismus und Zellatmung</b>				
<i>Rv0044c</i>	48.503	T>C	oxidoreductase	-
<i>Rv0245</i>	296.312	C>T	oxidoreductase	Ser->Phe
<i>hemB</i>	605.150	G>A	delta-aminolevulinic acid dehydratase	-
<i>dapC</i>	954.101	C>T	aminotransferase	Ala->Thr
<i>dapC</i>	954.468	C>G	aminotransferase	-
<i>narJ</i>	1.293.333	C>G	respiratory nitrate reductase subunit delta NarJ	Pro->Arg
<i>ansA</i>	1.741.352	C>T	L-aporaginase ansA	Gly->Ser
<i>glcB</i>	2.086.672	C>T	malate synthase G	Gly->Ser
<i>cobN</i>	2.318.725	C>T	cobaltochelatase	Glu->Lys
<i>cobN</i>	2.320.320	C>T	cobaltochelatase	Arg->His
<i>mtr</i>	3.165.636	G>A	mycothione/glutathione reductase	-
<i>Rv3174</i>	3.542.219	G>A	short chain dehydrogenase	Gly->Ser
<i>sseA</i>	3.665.753	G>A	thiosulfate sulfurtransferase SseA	Glu->Lys
<i>Rv3591c</i>	4.033.577	A>G	hydrolase	Phe->Leu
<b>Lipid Metabolismus</b>				
<i>far</i>	951.702	C>T	fatty-acid-CoA racemase	Ala->Val
<i>fadD36</i>	1.336.164	C>T	acyl-CoA synthetase	Pro->Leu
<i>fadD28</i>	3.284.640	A>G	acyl-CoA synthetase	Thr->Ala
<i>ltp3</i>	3.959.730	T>C	acetyl-CoA acetyltransferase	Phe->Leu
<i>pkS13</i>	4.258.106	G>A	polyketide synthase PKS13	Thr->Met

## Fortsetzung Anhang 6

Gen	SNP Pos.	SNP	Annotation	AS Austausch
<b>Regulatorische Proteine</b>				
<i>pknA</i>	17.654	T>G	transmembrane serine/threonine-protein kinase A PKNA (protein kinase A)	Gln->Pro
<i>pknA</i>	17.657	T>C	transmembrane serine/threonine-protein kinase A PKNA (protein kinase A)	Gln->Arg
<i>Rv0302</i>	364.854	C>G	TetR/ACRR family transcriptional regulator	His->Asp
<i>Rv0452</i>	542.514	C>G	transcriptional regulatory protein	His->Asp
<i>Rv0691c</i>	791.249	C>T	transcriptional regulatory protein	Ala->Thr
<i>Rv0890c</i>	991.896	T>C	LuxR family transcriptional regulator	Glu->Gly
<i>kdpE</i>	1.148.930	C>T	transcriptional regulatory protein KdpE	Gly->Ser
<i>Rv2488c</i>	2.800.087	G>A	LuxR family transcriptional regulator	Thr->Ile
<b>Virulenz, Entgiftung und Anpassung</b>				
<i>clpB</i>	46.0413	C>T	endopeptidase ATP binding protein	-
<i>yrbE2B</i>	686.264	G>A	integral membrane protein YrbE2b	Ala->Thr
<i>vapC37</i>	2.364.475	T>C	hypothetical protein	Thr->Ala
<i>vapC38</i>	2.808.452	T>C	hypothetical protein	Val->Ala
<i>vapB47</i>	3.826.501	C>T	hypothetical protein	Arg->Cys
<i>otsA</i>	3.908.465	A>G	alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase	Glu->Gly
<i>mce4C</i>	3.916.386	G>T	MCE-family protein MCE4C	Arg->Ser
<i>proV</i>	4.204.168	T>C	osmoprotectant (glycine betaine/carnitine/choline/L-proline) transport ATP-binding protein ABC transporter PROV	Asn->Asp
<b>Intergenische Regionen</b>				
IGR	699.840	A>C		
IGR	1.108.521	G>A		
IGR	1.265.070	G>T		
IGR	1.526.311	G>T		
IGR	1.697.896	C>T		
IGR	1.774.659	C>T		
IGR	2.138.436	A>G		
IGR	2.225.365	T>C		
IGR	3.110.140	G>T		
IGR	3.447.293	T>G		
IGR	4.214.988	G>A		
<b>Kleine Deletionen</b>				
<i>Rv2147c/ Rv2148c</i>			hypothetical proteins	-259fs/M1fs

**Anhang 7: Charakteristische Punktmutationen für die Beijing-Subgruppe Asien/Afrika 1.** SNPs sind relativ zur H37Rv Genomposition angegeben.

Gen	SNP Pos.	SNP	Annotation	AS Austausch
<b>Zellwand und Zellprozesse</b>				
<i>ctpH</i>	513.789	C>T	metal cation transporting P-type ATPase CtpH	-
<b>Konservierte, hypothetische Proteine</b>				
<i>Rv0674</i>	774.065	T>C	hypothetical protein	Met->Thr
<i>Rv1116A</i>	1.241.386	C>T	hypothetical protein	Gly->Asp
<i>Rv1637c</i>	1.843.620	T>C	hypothetical protein	Asn->Asp
<i>Rv1889c</i>	2.138.730	G>T	hypothetical protein	Asp->Glu
<i>Rv3094c</i>	3.462.822	G>T	hypothetical protein	Ala->Glu
<i>Rv3172c</i>	3.540.882	T>C	hypothetical protein	-
<b>Transkription und Translation</b>				
<i>recC</i>	725.365	A>G	exonuclease V gamma chain	Phe->Ser
<i>rpsG</i>	782.148	C>A	30S ribosomal protein S7	Ala->Asp
<i>fusA1</i>	782.634	A>G	elongation factor G	-
<i>hsdM</i>	3.068.497	T>C	type I restriction/modification system DNA methylase HsdM	-
<i>nrdE</i>	3.413.574	G>C	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	Ala->Gly
<i>uvrD2</i>	3.570.896	G>T	ATP-dependent DNA helicase II UVRD2	-
<b>Insertionssequenzen und Phagen</b>				
<i>Rv2100</i>	2.358.525	A>C	hypothetical protein	Asp->Ala

## Fortsetzung Anhang 7

Gen	SNP Pos.	SNP	Annotation	AS Austausch
<b>Intermediärmetabolismus und Zellatmung</b>				
Rv0331	396.771	C>G	dehydrogenase/reductase	Pro->Ala
Rv0373c	449.633	G>A	carbon monoxide dehydrogenase large subunit	Thr->Ile
Rv0373c	450.525	T>G	carbon monoxide dehydrogenase large subunit	Thr->Pro
Rv0458	549.777	C>T	aldehyde dehydrogenase	Arg->Cys
cbs	1.202.643	G>T	cystathionine beta-synthase CBS (Serine sulfhydrylase)	-
pyrC	1.554.418	G>A	dihydroorotase	-
csd	1.651.706	C>T	cysteine desulfurase	-
hemZ	1.675.193	C>G	ferrochelatase	-
frdD	1.760.688	C>G	fumarate reductase subunit D	Pro->Arg
cysE	2.610.381	C>T	serine acetyltransferase CysE	Pro->Leu
obg	2.739.546	G>C	GTPase ObgE	-
Rv2949c	3.300.005	C>A	hypothetical protein	Trp->Leu
<b>Lipid Metabolismus</b>				
fadA2	292.679	A>G	acetyl-CoA acetyltransferase	Glu->Gly
pks6	489.741	G>A	membrane bound polyketide synthase	-
echA8	1.194.351	A>G	enoyl-CoA hydratase	-
Rv3480c	3.899.672	C>T	hypothetical protein	Arg->His
<b>Regulatorische Proteine</b>				
oxyS	141.457	G>C	oxidative stress response regulatory protein OXYS	-
Rv0891c	993.352	G>A	transcriptional regulatory protein	Ala->Val
<b>Virulenz, Entgiftung und Anpassung</b>				
Rv2005c	2.251.313	T>C	hypothetical protein	Ile->Val
otsB1	2.255.482	G>A	trehalose-6-phosphate phosphatase OtsB1	Gly->Ser
<b>Intergenische Regionen (IGR)</b>				
IGR	312.686	C>T	-	-
IGR	3.007.221	A>C	-	-
IGR	3.007.229	T>C	-	-
IGR	3.193.202	G>A	-	-
IGR	3.721.174	T>G	-	-
IGR	3.770.743	T>C	-	-
IGR	3.844.733	A>C	-	-
<b>Kleine Deletionen</b>				
Rv1105			hypothetical protein	nt466_470delTGAC
Rv1977			hypothetical protein	nt729delA
eis			enhanced intracellular survival protein	nt807_808delCA

**Anhang 8: Charakteristische Punktmutationen für die Beijing-Subgruppe Asien/Afrika 2.** SNPs sind relativ zur H37Rv Genomposition angegeben.

Gen	SNP Pos.	SNP	Annotation	AS
<b>Zellwand und Zellprozesse</b>				
Rv1231c	1.374.685	C>G	hypothetical protein	-
mpa	2.376.135	A>G	ATPase	-
ftsK	3.061.703	G>A	cell division transmembrane protein FtsK	-
<b>Konservierte, hypothetische Proteine</b>				
Rv0775	868.663	G>A	hypothetical protein	Arg->Gln
Rv2910c	3.217.905	G>A	hypothetical protein	-
Rv3730c	4.180.839	G>C	hypothetical protein	-
<b>Intermediärmetabolismus und Zellatmung</b>				
trpG	15.087	C>G	para-aminobenzoate synthase component II	-
thrC	1.451.405	G>A	threonine synthase	Gly->Ser
mscR	2.532.616	G>A	zinc-dependent alcohol dehydrogenase AdhE2	-
<b>Lipid Metabolismus</b>				
fadE17	2.185.884	T>C	acyl-CoA dehydrogenase FADE17	Asn->Ser
<b>Regulatorische Proteine</b>				
Rv1152	1.279.968	G>C	transcriptional regulatory protein	Gly->Ala

**Anhang 9: Charakteristische Punktmutationen für die Beijing-Subgruppe Pazifik RD150.** SNPs sind relativ zur H37Rv Genomposition angegeben.

Gen	SNP Pos.	SNP	Annotation	AS
<b>Zellwand und Zellprozesse</b>				
Rv0051	57.298	C>G	transmembrane protein	Arg->Gly
rpfB	1.128.883	G>A	resuscitation-promoting factor rpfB	Val->Met
Rv1140	1.267.597	G>A	integral membrane protein	Gly->Asp
Rv1510	1.701.684	G>A	hypothetical protein	-
fic	4.080.525	C>T	cell filamentation protein FIC	-
<b>Konservierte, hypothetische Proteine</b>				
TB27.3	671.385	C>G	hypothetical protein	Pro->Ala
Rv2165c	2.428.517	A>G	S-adenosyl-methyltransferase MraW	-
Rv2567	2.891.379	A>C	hypothetical protein	Thr->Pro
<b>Transkription und Translation</b>				
uvrA	1.844.339	A>G	excinuclease ABC subunit A	Asp->Gly
<b>Intermediärmetabolismus und Zellatmung</b>				
aceAb	2.161.902	G>A	isocitrate lyase	Asp->Asn
gdh	2.780.415	G>A	NAD-dependent glutamate dehydrogenase	-
Rv2715	3.028.884	C>T	hydrolase	Pro->Ser
mycP2	4.370.038	G>T	alanine and proline rich membrane-anchored mycosin	Pro->Thr
<b>Lipid Metabolismus</b>				
pkc11	1.891.388	C>G	chalcone synthase	Pro->Ala
acs	4.109.342	G>A	acetyl-CoA synthetase	-
<b>Regulatorische Proteine</b>				
Rv3167c	3.535.572	C>A	TetR family transcriptional regulator	Leu->Phe
<b>Virulenz, Entgiftung und Anpassung</b>				
Rv0634c	731.015	A>G	glyoxalase II	Tyr->His
vapC12	1.947.282	A>G	hypothetical protein	-
eis	2.714.846	C>T	hypothetical protein	Val->Ile
<b>Intergenische Regionen (IGR)</b>				
IGR	3.874.206	G>A	-	-

**Anhang 10: Charakteristische Punktmutationen für die Beijing-Subgruppe Russland W148.** SNPs sind relativ zur H37Rv Genomposition angegeben.

Gen	SNP Pos.	SNP	Annotation	AS
<b>Zellwand und Zellprozesse</b>				
mkl	751.999	C>T	ribonucleotide ABC transporter ATP-binding protein	-
pstS3	1.035.426	T>G	periplasmic phosphate-binding lipoprotein PSTS3 (PBP-3) (PSTS3) (PHOS1)	Phe->Cys
kdpB	1.154.618	C>T	potassium-transporting ATPase subunit B	-
kdpC	1.155.884	T>C	potassium-transporting ATPase C chain KDPC )	Met->Thr
mmpL13a	1.272.899	T>G	transmembrane transport protein MmpL13A	-
Rv1877	2.127.011	T>G	integral membrane protein	Trp->Gly
Rv2698	3.014.343	C>T	alanine rich transmembrane protein	-
Rv2719c	3.031.090	G>A	hypothetical protein	Gln->_
Rv3728	4.175.847	G>A	hypothetical protein	Trp->_
eccCb1	4.349.982	G>T	hypothetical protein	Ala->Ser
Rv3910	4.399.683	C>G	transmembrane protein	-
<b>Konservierte, hypothetische Proteine</b>				
pra	1.203.693	C>T	proline-rich antigen	-
Rv1209	1.353.462	G>A	hypothetical protein	-
Rv1518	1.710.601	T>A	hypothetical protein	_->Lys
Rv2022c	2.267.125	T>C	hypothetical protein	-
Rv2079	2.335.638	T>C	hypothetical protein	Leu->Ser
Rv2298	2.569.288	G>C	hypothetical protein	-
Rv2331A	2.604.740	A>G	hypothetical protein	Met->Val
Rv2627c	2.954.197	G>A	hypothetical protein	-
Rv2638	2.964.454	C>T	hypothetical protein	Pro->Leu
Rv3196	3.566.107	C>A	hypothetical protein	Ala->Asp

## Fortsetzung Anhang 10

Gen	SNP Pos.	SNP	Annotation	AS Austausch
<b>Transkription und Translation</b>				
recF	4.086	G>T	recombination protein F	-
uvrB	1.838.646	C>T	excinuclease ABC subunit B	-
<b>Intermediärmetabolismus und Zellatmung</b>				
oxcA	143.120	C>A	putative oxalyl-CoA decarboxylase	Ala->Ser
Rv0338c	404.130	T>C	iron-sulfur-binding reductase	Glu->Gly
Rv0439c	527.895	T>C	short chain dehydrogenase	-
Rv0802c	895.164	G>A	hypothetical protein	-
Rv0812	907.046	G>A	4-amino-4-deoxychorismate lyase	-
Rv1319c	1.482.185	C>T	adenylate cyclase	Gly->Asp
rpe	1.584.762	G>A	ribulose-phosphate 3-epimerase	-
Rv1833c	2.078.967	C>A	haloalkane dehalogenase	Asp->Tyr
ureC	2.099.129	C>T	urease subunit alpha	Ala->Val
Rv1882c	2.132.640	G>C	short chain dehydrogenase	-
cyp128	2.544.135	A>C	cytochrome P450 128	Ser->Ala
relA	2.908.357	G>A	GTP pyrophosphokinase	-
mqo	3.161.858	T>G	malate:quinone oxidoreductase	-
upp	3.697.016	G>C	uracil phosphoribosyltransferase	-
<b>Lipid Metabolismus</b>				
Rv3233c	3.610.335	G>T	hypothetical protein	Arg->Ser
<b>Regulatorische Proteine</b>				
Rv2779c	3.086.731	A>G	LRP/AsnC family transcriptional regulator	-
Rv3575c	4.017.448	G>A	transcriptional regulatory protein Lacl-family	-
whiB6	4.338.371	T>G	transcriptional regulatory protein WHIB-like WHIB6	Thr->Pro
<b>Virulenz, Entgiftung und Anpassung</b>				
ripA	1.668.082	G>C	invasion protein	Ala->Pro
vapC12	1.947.325	T>C	hypothetical protein	His->Arg
mce3B	2.210.745	T>G	MCE-family protein MCE3B	Ser->Ala
<b>Intergenische Regionen (IGR)</b>				
IGR	886.661	C>T	-	-
IGR	1.023.883	G>A	-	-
IGR	2.205.550	A>G	-	-
IGR	2.468.180	G>A	-	-
IGR	3.557.244	C>G	-	-
IGR	4.216.783	A>C	-	-
IGR	4.321.479	G>A	-	-
<b>Kleine Deletionen</b>				
kdpD			sensor protein KDPD	nt2542_2543delCA
Rv1972			mce associated membrane protein	V44del
Rv1995			hypothetical protein	nt721delA

**Anhang 11: Charakteristische Punktmutationen für die Beijing-Subgruppe Zentralasien.** SNPs sind relativ zur H37Rv Genomposition angegeben.

Gen	SNP Pos.	SNP	Annotation	AS Austausch
<b>Zellwand und Zellprozesse</b>				
Rv3629c	4.068.468	C>A	integral membrane protein	Gly->Val
aftA	4.238.675	C>T	transmembrane protein	-
<b>Konservierte, hypothetische Proteine</b>				
Rv1775	2.009.848	C>G	hypothetical protein	Ser->Cys
<b>Transkription und Translation</b>				
rpoC	766.645	A>C	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	Glu->Asp
sigE	1.364.706	G>A	RNA polymerase sigma factor SigE	-
ileS	1.739.559	T>C	isoleucyl-tRNA synthetase	Ile->Thr
<b>Regulatorische Proteine</b>				
Rv0465c	555.366	C>T	transcriptional regulatory protein	Arg->Gln

## Fortsetzung von Anhang 11

Gen	SNP Pos.	SNP	Annotation	AS Austausch
<b>Lipid Metabolismus</b>				
fadE15	1.654.730	T>G	acyl-CoA dehydrogenase FADE15	Lys->Thr
pks17	1.887.060	C>G	polyketide synthase pks17	-
mbtD	2.668.467	G>A	polyketide synthetase MBTD (polyketide synthase)	-
fas	2.844.573	C>T	fatty acid synthase	Arg->His
<b>Intergenische Regionen (IGR)</b>				
IGR	295.731	T>C	-	-
IGR	888.647	C>T	-	-
IGR	1.728.603	C>T	-	-
IGR	1.753.483	T>C	-	-
IGR	4.121.112	C>A	-	-

**Anhang 12: Charakteristische Punktmutationen für die Beijing-Subgruppe Zentralasien-Outbreak.** SNPs sind relativ zur H37Rv Genomposition angegeben.

Gen	SNP Pos.	SNP	Annotation	AS Austausch
<b>Zellwand und Zellprozesse</b>				
Rv0039c	42227	G>A	transmembrane protein	Thr->Met
kdpA	1152701	C>T	potassium-transporting ATPase subunit A	-
Rv1132	1257452	T>C	hypothetical protein	Leu->Pro
lpqW	1296834	A>C	lipoprotein LpqW	Glu->Ala
lprA	1419658	C>T	lipoprotein LprA	Ala->Thr
modC	2107264	C>T	molybdenum ABC transporter ATP-binding protein	Arg->Cys
lppG	2197921	T>A	lipoprotein	Ser->Cys
yajC	2915934	T>G	preprotein translocase subunit YajC	Asp->Ala
Rv3437	3857226	G>T	transmembrane protein	Asp->Tyr
<b>Konservierte, hypothetische Proteine</b>				
Rv0966c	1077626	C>A	hypothetical protein	-
Rv1084	1208181	G>A	hypothetical protein	-
Rv1367c	1540352	G>A	hypothetical protein	-
Rv1767	2000234	C>T	hypothetical protein	Ala->Val
Rv2665	2982829	T>G	hypothetical protein	Leu->Arg
Rv3365c	3777389	G>A	hypothetical protein	Pro->Leu
<b>Transkription und Translation</b>				
leuS	46324	T>C	leucyl-tRNA synthetase	-
ung	3332110	G>A	uracil-DNA glycosylase	-
nrdF2	3408521	G>A	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	-
uvrD2	3570220	T>C	ATP-dependent DNA helicase II UVRD2	Glu->Gly
trpS	3723401	G>A	tryptophanyl-tRNA synthetase	-
<b>Intermediärmetabolismus und Zellatmung</b>				
pepA	151798	A>G	serine protease PepA	-
cyp138	163467	A>G	cytochrome P450 138	-
eno	1145736	T>A	phosphopyruvate hydratase	-
Rv1279	1431097	G>T	dehydrogenase FAD flavoprotein GMC oxidoreductase	Glu->_
metK	1567524	G>A	S-adenosylmethionine synthetase	Glu->Lys
zwf2	1626655	T>C	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	Glu->Gly
Rv3778c	4224185	A>G	aminotransferase	-
<b>Lipid Metabolismus</b>				
fadD2	325703	C>T	acyl-CoA synthetase	-
umaA	560615	A>C	mycolic acid synthase	Glu->Ala
fadE9	843909	A>G	acyl-CoA dehydrogenase FADE9	Val->Ala
pks8	1884305	T>G	polyketide synthase pks8	Phe->Val
Rv2252	2527575	G>A	diacylglycerol kinase	Gly->Asp
accD1	2817269	C>T	acetyl-/propionyl-CoA carboxylase subunit beta	-
Rv2611c	2939372	A>G	lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase	-
gpdA2	3338820	T>C	NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase	-
fadE25	3657759	C>T	acyl-CoA dehydrogenase FADE25	Gly->Ser
fadE29	3982279	T>C	acyl-CoA dehydrogenase FADE29	Ile->Val

## Fortsetzung Anhang 12

Gen	SNP Pos.	SNP	Annotation	AS Austausch
<b>Intergenische Regionen (IGR)</b>				
IGR	139850	T>A	-	-
IGR	767670	T>C	-	-
IGR	2030355	A>G	-	-
IGR	2062735	T>C	-	-
IGR	2968452	G>A	-	-
IGR	3302980	T>C	-	-
IGR	3597879	T>C	-	-
<b>Kleine Deletionen</b>				
Rv0272c			hypothetical protein	nt1117delC

**Anhang 13: Charakteristische Punktmutationen für die Beijing-Subgruppe Ancestral 1.** SNPs sind relativ zur H37Rv Genomposition angegeben.

Gen	SNP Pos.	SNP	Annotation	AS Austausch
<b>Zellwand und Zellprozesse</b>				
mmpL11	239.733	G>T	transmembrane transport protein MmpL11	Phe->Leu
lpqI	287.747	A>C	lipoprotein LpqI	Thr->Pro
eccC3	346.693	G>T	hypothetical protein	-
lpqM	505.843	A>G	lipoprotein peptidase LpqM	Glu->Gly
Rv0622	716.025	C>T	hypothetical protein	Pro->Leu
secY	825.655	C>A	preprotein translocase subunit SecY	His->Asn
Rv0842	938.240	G>C	integral membrane protein	-
Rv0954	1.065.793	T>G	transmembrane protein	Tyr->Asp
mmpL6	1.762.216	C>G	transmembrane transport protein MmpL6	Ala->Gly
Rv1707	1.935.437	C>T	transmembrane protein	Pro->Ser
narK1	2.602.454	T>G	nitrite extrusion protein 1 NarK1	-
lppQ	2.619.799	A>C	lipoprotein LppQ	Glu->Ala
Rv2563	2.883.217	G>C	glutamine-transport transmembrane protein ABC transporter	Val->Leu
Rv2688c	3.005.014	A>G	antibiotic ABC transporter ATP-binding protein	Cys->Arg
lpqA	3.375.807	T>C	lipoprotein LpqA	Ile->Thr
eccD2	4.370.678	T>C	transmembrane protein	Asp->Gly
<b>Konservierte, hypothetische Proteine</b>				
Rv0061	65.246	C>T	hypothetical protein	-
Rv0372c	449.194	G>A	hypothetical protein	-
Rv1051c	1.174.655	C>T	hypothetical protein	Asp->Asn
Rv1073	1.197.567	G>C	hypothetical protein	Val->Leu
Rv1891	2.140.076	G>A	hypothetical protein	Met->Ile
Rv1894c	2.141.368	C>T	hypothetical protein	Val->Met
Rv2561	2.881.542	C>G	hypothetical protein	Ala->Gly
35kd_ag	3.057.256	G>A	hypothetical protein	Gln->_
Rv2821c	3.128.345	C>G	hypothetical protein	Val->Leu
Rv2826c	3.134.017	G>T	hypothetical protein	-
Rv3075c	3.438.664	G>C	hypothetical protein	Pro->Ala
Rv3205c	3.581.967	G>C	hypothetical protein	Ala->Gly
Rv3403c	3.823.194	T>C	hypothetical protein	Asn->Asp
<b>Transkription und Translation</b>				
ligD	1.047.873	C>T	ATP-dependent DNA ligase	-
Rv0944	1.053.912	T>C	formamidopyrimidine-DNA glycosylase	Tyr->His
dnaE1	1.750.386	C>T	DNA polymerase III subunit alpha	Ser->Leu
glyS	2.640.807	G>A	glycyl-tRNA synthetase	-
mrr	2.852.598	G>C	restriction system protein mrr	Ala->Gly
Rv3204	3.581.476	C>T	DNA-methyltransferase (modification methylase)	-
sigM	4.400.839	T>C	RNA polymerase sigma factor SigM	-

## Fortsetzung Anhang 13

Gen	SNP Pos.	SNP	Annotation	AS Austausch
<b>Insertionssequenzen und Phagen</b>				
Rv3828c	4.302.926	C>G	resolvase	Ala->Pro
<b>Intermediärmetabolismus und Zellatmung</b>				
cyp138	163.940	A>G	cytochrome P450 138	Lys->Arg
pckA	252.900	C>T	phosphoenolpyruvate carboxykinase	-
cyp135A1	393.387	C>T	cytochrome P450 135A1	Arg->His
Rv0380c	456.299	C>G	RNA methyltransferase	Arg->Pro
Rv0892	994.382	C>T	monooxygenase	Thr->Ile
grcC2	1.106.614	G>T	polyprenyl-diphosphate synthase	Leu->Met
mshB	1.301.002	G>A	GlcNAc-Ins deacetylase	-
dfp	1.565.566	C>T	bifunctional phosphopantothencysteine	-
frdA	1.758.588	A>G	fumarate reductase flavoprotein subunit	Asp->Gly
bioB	1.790.479	C>G	biotin synthase	Arg->Gly
dhaA	2.903.643	C>A	haloalkane dehalogenase	Thr->Lys
mqo	3.162.021	G>C	malate:quinone oxidoreductase	Ala->Gly
mapB	3.173.283	T>G	methionine aminopeptidase	-
Rv2959c	3.312.401	A>C	methyltransferase (methylase)	Ile->Met
Rv3057c	3.418.386	C>T	short chain dehydrogenase	Val->Met
nuoN	3.526.873	G>T	NADH dehydrogenase subunit N	Ala->Ser
Rv3378c	3.792.765	C>A	hypothetical protein	Gly->Cys
<b>Lipid Metabolismus</b>				
fadE5	294.596	T>G	acyl-CoA dehydrogenase FADE5	-
fadA	955.127	A>C	acetyl-CoA acetyltransferase	Lys->Asn
mbtN	1.511.460	C>T	acyl-CoA dehydrogenase	-
fadE17	2.185.009	C>T	acyl-CoA dehydrogenase FADE17	Glu->Lys
<b>Regulatorische Proteine</b>				
pknB	15.890	G>A	transmembrane serine/threonine-protein kinase B PKNB	-
Rv0823c	917.596	C>A	transcriptional regulatory protein	-
<b>Virulenz, Entgiftung und Anpassung</b>				
vapC1	71.914	T>C	hypothetical protein	Ser->Pro
mak	154.990	G>T	hypothetical protein	-
bpoB	1.246.500	C>T	peroxidase BpoB	Glu->Lys
<b>Intergenische Regionen (IGR)</b>				
IGR	1.021.776	A>G	-	-
IGR	1.190.472	C>T	-	-
IGR	1.276.232	C>A	-	-
IGR	1.731.293	C>G	-	-
IGR	2.626.600	G>A	-	-
IGR	3.150.049	G>T	-	-
IGR	3.187.987	C>T	-	-
IGR	3.841.663	C>T	-	-
<b>Kleine Deletionen</b>				
IGR				nt1.338.804_1.338.806delCGG
IGR				nt3.015.055delC

**Anhang 14: Charakteristische Punktmutationen für die Beijing-Subgruppe Anzestral 2.**

SNPs sind relativ zur H37Rv Genomposition angegeben.

Gen	SNP Pos.	SNP	Annotation	AS Austausch
<b>Zellwand und Zellprozesse</b>				
Rv1291c	1.445.516	A>G	hypothetical protein	Tyr->His
Rv2507	2.822.461	G>A	proline rich membrane protein	-
Rv3524	3.960.979	A>C	hypothetical protein	-
<b>Konservierte, hypothetische Proteine</b>				
Rv0614	710.275	C>T	hypothetical protein	Ala->Val
Rv0628c	719.136	C>T	hypothetical protein	-

## Fortsetzung Anhang 14

Gen	SNP Pos.	SNP	Annotation	AS Austausch
Rv1062	1.185.154	T>G	hypothetical protein	Phe->Cys
Rv1156	1.282.687	C>A	hypothetical protein	Gln->Lys
wbbL2	1.720.081	A>G	rhamnosyl transferase WbbL2	His->Arg
Rv3076	3.439.387	C>T	hypothetical protein	Pro->Ser
<b>Intermediärmetabolismus und Zellatmung</b>				
adhB	855.199	C>T	zinc-containing alcohol dehydrogenase NAD dependent ADHB	Gly->Ser
Rv2170	2.432.565	G>A	hypothetical protein	Gly->Ser
Rv2776c	3.084.195	G>T	oxidoreductase	Pro->Thr
viuB	3.204.720	C>G	mycobactin utilization protein ViuB	-
fbiA	3.640.879	C>T	LPPG:FO 2-phospho-L-lactate transferase	-
pcd	3.674.012	C>G	piperidine-6-carboxylic acid dehydrogenase	-
moaX	3.709.528	C>A	MOAD-MOAE fusion protein MOAX	Ala->Ser
ask	4.153.340	G>A	aspartate kinase	-
<b>Lipid Metabolismus</b>				
fadD30	484.395	C>T	acyl-CoA synthetase	Pro->Leu
Rv1866	2.115.075	C>G	hypothetical protein	Arg->Gly
ppsD	3.266.769	A>C	phenolphthiocerol synthesis type-I polyketide synthase PPSD	Ile->Leu
<b>Regulatorische Proteine</b>				
Rv0792c	886.115	T>C	GntR family transcriptional regulator	Thr->Ala
<b>Intergenische Regionen (IGR)</b>				
IGR	122.215	A>G	-	-
IGR	268.628	C>T	-	-
IGR	2.881.358	C>A	-	-
<b>Kleine Deletionen</b>				
Rv0849			integral membrane transport protein	nt586delA

**Anhang 15: Charakteristische Punktmutationen für die Beijing-Subgruppe Anzestral 3.**  
SNPs sind relativ zur H37Rv Genomposition angegeben.

Gen	SNP Pos.	SNP	Annotation	AS Austausch
<b>Zellwand und Zellprozesse</b>				
ctpV	1.079.697	G>C	metal cation transporter P-type ATPase CtpV	Val->Leu
Rv2037c	2.283.528	C>A	transmembrane protein	Arg->Leu
<b>Konservierte, hypothetische Proteine</b>				
Rv1179c	1.312.065	A>C	hypothetical protein	Val->Gly
Rv1944c	2.195.864	G>A	hypothetical protein	Ala->Val
ogt	1.477.522	C>A	methylated-DNA-protein-cysteinemethyltransferase	Arg->Leu
<b>Transkription und Translation</b>				
recA	3.051.182	C>T	recombinase A	-
ligA	3.373.397	G>A	NAD-dependent DNA ligase LigA	-
<b>Intermediärmetabolismus und Zellatmung</b>				
Rv0373c	449.943	C>T	carbon monoxide dehydrogenase large subunit	Gly->Ser
<b>Lipid Metabolismus</b>				
pkc2	4.296.225	G>A	polyketide synthase PKS2	-
<b>Virulenz, Entgiftung und Anpassung</b>				
yrbE1B	197.705	G>A	integral membrane protein YRBE1B	Ala->Thr

## Anhang 16: Genset: Ribosomale Proteine und Polymerasen

H37Rv ID	Gen	Länge (Basen)	Annotation
Rv0053	rpsF	291	30S ribosomal protein S6 rpsF
Rv0055	rpsR	255	30S ribosomal protein S18 rpsR
Rv0056	rplI	459	50S ribosomal protein L9 rplI
Rv0105c	rpmB	285	50S ribosomal protein L28 rpmB
Rv0634B	rpmG	168	50S ribosomal protein L33 rpmG
Rv0640	rplK	429	50S ribosomal protein L11 rplK
Rv0641	rplA	708	50S ribosomal protein L1 rplA
Rv0651	rplJ	537	50S ribosomal protein L10 rplJ
Rv0652	rplL	393	50S ribosomal protein L7/L12 rplL
Rv0682	rpsL	375	30S ribosomal protein S12 rpsL
Rv0683		471	30S ribosomal protein S7
Rv0700	rpsJ	306	30S ribosomal protein S10 rpsJ
Rv0701	rplC	654	50S ribosomal protein L3 rplC
Rv0702	rplD	672	50S ribosomal protein L4 rplD
Rv0703	rplW	303	50S ribosomal protein L23 rplW
Rv0704	rplB	843	50S ribosomal protein L2 rplB
Rv0705	rpsS	282	30S ribosomal protein S19 rpsS
Rv0706	rplV	594	50S ribosomal protein L22 rplV
Rv0707	rpsC	825	30S ribosomal protein S3 rpsC
Rv0708	rplP	417	50S ribosomal protein L16 rplP
Rv0709	rpmC	234	50S ribosomal protein L29 rpmC
Rv0710	rpsQ	411	30S ribosomal protein S17 rpsQ
Rv0714	rplN	369	50S ribosomal protein L14 rplN
Rv0715	rplX	318	50S ribosomal protein L24 rplX
Rv0716	rplE	564	50S ribosomal protein L5 rplE
Rv0717	rpsN	186	30S ribosomal protein S14 rpsN
Rv0718	rpsH	399	30S ribosomal protein S8 rpsH
Rv0719	rplF	540	50S ribosomal protein L6 rplF
Rv0720	rplR	369	50S ribosomal protein L18 rplR
Rv0721	rpsE	663	30S ribosomal protein S5 rpsE
Rv0722	rpmD	198	50S ribosomal protein L30 rpmD
Rv0723	rplO	441	50S ribosomal protein L15 rplO
Rv0979A	rpmF	174	50S ribosomal protein L32 rpmF
Rv1015c	rplY	648	50S ribosomal protein L25/general stress protein Ctc rplY
Rv1298	rpmE	243	50S ribosomal protein L31 rpmE
Rv1630	rpsA	1446	30S ribosomal protein S1 rpsA
Rv1642	rplI	195	50S ribosomal protein L35 rplI
Rv1643	rplT	390	50S ribosomal protein L20 rplT
Rv2055c	rpsR	267	30S ribosomal protein S18 rpsR
Rv2056c	rpsN	306	30S ribosomal protein S14 rpsN
Rv2057c	rpmG	165	50S ribosomal protein L33 rpmG
Rv2058c	rpmB	237	50S ribosomal protein L28 rpmB
Rv2412	rpsT	261	30S ribosomal protein S20 rpsT
Rv2441c	rpmA	261	50S ribosomal protein L27 rpmA
Rv2442c	rplU	315	50S ribosomal protein L21 rplU
Rv2785c	rpsO	270	30S ribosomal protein S15 rpsO
Rv2890c	rpsB	864	30S ribosomal protein S2 rpsB
Rv2904c	rplS	342	50S ribosomal protein L19 rplS
Rv2909c	rpsP	489	30S ribosomal protein S16 rpsP
Rv3442c	rpsI	456	30S ribosomal protein S9 rpsI
Rv3443c	rplM	444	50S ribosomal protein L13 rplM
Rv3456c	rplQ	543	50S ribosomal protein L17 rplQ
Rv3458c	rpsD	606	30S ribosomal protein S4 rpsD
Rv3459c	rpsK	420	30S ribosomal protein S11 rpsK
Rv3460c	rpsM	375	30S ribosomal protein S13 rpsM
Rv3461c	rpmJ	114	50S ribosomal protein L36 rpmJ
Rv3924c	rpmH	144	50S ribosomal protein L34 rpmH
Rv0002	dnaN	1209	DNA polymerase III subunit beta dnaN
Rv0182c	sigG	1113	RNA polymerase factor sigma-70 sigG

## Fortsetzung Anhang 16

H37Rv ID	Gen	Länge (Basen)	Annotation
Rv0445c	sigK	564	RNA polymerase sigma factor SigK sigK
Rv0667	rpoB	3519	DNA-directed RNA polymerase subunit beta rpoB
Rv0668	rpoC	3951	DNA-directed RNA polymerase subunit beta' rpoC
Rv0735	sigL	534	RNA polymerase sigma factor SigL sigL
Rv1189	sigI	873	RNA polymerase sigma factor SigI sigI
Rv1221	sigE	774	RNA polymerase sigma factor SigE sigE
Rv1390	rpoZ	333	DNA-directed RNA polymerase subunit omega rpoZ
Rv1537	dinX	1407	DNA polymerase IV dinX
Rv1547	dnaE	3555	DNA polymerase III subunit alpha dnaE
Rv1629	polA	2715	DNA polymerase I polA
Rv2069	sigC	558	RNA polymerase sigma factor SigC sigC
Rv2703	sigA	1587	RNA polymerase sigma factor sigA
Rv2710	sigB	972	RNA polymerase sigma factor SigB sigB
Rv3223c	sigH	651	RNA polymerase sigma factor RpoE sigH
Rv3286c	sigF	786	RNA polymerase sigma factor SigF sigF
Rv3328c	sigJ	939	RNA polymerase sigma factor SigJ sigJ
Rv3370c	dnaE2	3276	error-prone DNA polymerase dnaE2
Rv3414c	sigD	639	RNA polymerase sigma factor SigD sigD
Rv3457c	rpoA	1044	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha rpoA
Rv3644c		1206	DNA polymerase III subunit delta'
Rv3711c	dnaQ	990	DNA polymerase III subunit epsilon dnaQ
Rv3721c	dnaZX	1737	DNA polymerase III subunits gamma and tau dnaZX
Rv3907c	pcnA	1443	poly(A) polymerase pcnA
Rv3911	sigM	669	RNA polymerase sigma factor SigM sigM

Anhang 17: Genset: *mce*-Operons (*mce* 1-4)

H37Rv ID	Gen	Länge (Basen)	Annotation
Rv0165c		795	GntR family transcriptional regulator
Rv0166	fadD5	1665	acyl-CoA synthetase fadD5
Rv0167	yrbE1A	798	integral membrane protein YRBE1A yrbE1A
Rv0168	yrbE1B	870	integral membrane protein YRBE1B yrbE1B
Rv0169	mce1A	1365	MCE-family protein MCE1A mce1A
Rv0170	mce1B	1041	MCE-family protein MCE1B mce1B
Rv0171	mce1C	1548	MCE-family protein MCE1C mce1C
Rv0172	mce1D	1593	MCE-family protein MCE1D mce1D
Rv0173	lprK	1173	MCE-family lipoprotein LprK lprK
Rv0174	mce1F	1548	MCE-family protein MCE1F mce1F
Rv0175		642	mce associated membrane protein
Rv0176		969	mce associated transmembrane protein
Rv0177		555	MCE associated protein
Rv0178		735	mce associated membrane protein
Rv0586		723	GntR family transcriptional regulator
Rv0587	yrbE2A	798	integral membrane protein YrbE2a yrbE2A
Rv0588	yrbE2B	888	integral membrane protein YrbE2b yrbE2B
Rv0589	mce2A	1215	MCE-family protein MCE2A mce2A
Rv0590	mce2B	828	MCE-family protein MCE2B mce2B
Rv0590A		255	MCE family-like protein
Rv0591	mce2C	1446	MCE-family protein MCE2C mce2C
Rv0592	mce2D	1527	MCE-family protein MCE2D mce2D
Rv0593	lprL	1209	MCE-family lipoprotein LprL lprL
Rv0594	mce2F	1551	MCE-family protein MCE2F mce2F
Rv1963c	mce3R	1221	transcriptional repressor (probably TETR-family)MCE3R mce3R
Rv1964	yrbE3A	798	integral membrane protein YrbE3A yrbE3A
Rv1965	yrbE3B	816	integral membrane protein YrbE3b yrbE3B
Rv1966	mce3A	1278	MCE-family protein MCE3A mce3A

## Fortsetzung Anhang 17

H37Rv ID	Gen	Länge (Basen)	Annotation
Rv1967	mce3B	1029	MCE-family protein MCE3B mce3B
Rv1968	mce3C	1233	MCE-family protein MCE3C mce3C
Rv1969	mce3D	1272	MCE-family protein MCE3D mce3D
Rv1970	lprM	1134	MCE-family lipoprotein LprM lprM
Rv1971	mce3F	1314	MCE-family protein MCE3F mce3F
Rv1972		576	mce associated membrane protein
Rv1973		483	MCE associated membrane protein
Rv3492c		483	Mce associated protein
Rv3493c		729	Mce associated alanine and valine rich protein
Rv3494c	mce4F	1695	MCE-family protein MCE4F mce4F
Rv3495c		1155	MCE-family lipoprotein LprN
Rv3496c	mce4D	1356	MCE-family protein MCE4D mce4D
Rv3497c	mce4C	1074	MCE-family protein MCE4C mce4C
Rv3498c	mce4B	1053	MCE-family protein MCE4B mce4B
Rv3499c	mce4A	1203	MCE-family protein MCE4A mce4A
Rv3500c	yrbE4B	843	integral membrane protein YrbE4b yrbE4B
Rv3501c	yrbE4A	765	integral membrane protein YrbE4a yrbE4A

## Anhang 18: Genset: T-Zell Antigene

H37Rv ID	Gen	Länge (Basen)	Annotation
Rv0125	pepA	1068	serine protease PepA pepA
Rv0129c	fbpC	1023	secreted antigen 85-C FBPC (85C) (antigen 85complex C) (AG58C)
Rv0200		690	transmembrane protein
Rv0203		411	hypothetical protein
Rv0222	echA1	789	enoyl-CoA hydratase echA1
Rv0287	esxG	294	hypothetical protein esxG
Rv0288	esxH	291	low molecular weight protein antigen 7 ESXH (10kDa antigen) (CFP-7) (protein TB10.4) esxH
Rv0309		657	hypothetical protein
Rv0341	iniB	1440	isoniazid inductible gene protein INIB iniB
Rv0440	groEL	1623	chaperonin GroEL groEL
Rv0589	mce2A	1215	MCE-family protein MCE2A mce2A
Rv0667	rpoB	3519	DNA-directed RNA polymerase subunit beta rpoB
Rv0670	end	759	endonuclease IV end
Rv0934	pstS1	1125	periplasmic phosphate-binding lipoprotein PSTS1(PBP-1) (PSTS1) pstS1
Rv1158c		684	hypothetical protein
Rv1174c	TB8.4	333	low molecular weight T-cell antigen TB8.4 TB8.4
Rv1184c		1080	hypothetical protein
Rv1198	esxL	285	putative ESAT-6 like protein ESXL (ESAT-6 likeprotein 4) esxL
Rv1242		432	hypothetical protein
Rv1255c		609	transcriptional regulatory protein
Rv1256c	cyp13	1218	ytochrome P450 130 CYP130 cyp130
Rv1280c	oppA	1776	periplasmic oligopeptide-binding lipoproteinOppA oppA
Rv1291c		336	hypothetical protein
Rv1461		2541	hypothetical protein
Rv1623c	cydA	1458	integral membrane cytochrome D ubiquinol oxidase(subunit I) cydA (
Rv1641	infC	606	translation initiation factor IF-3 infC
Rv1694	tlyA	807	cytotoxin/hemolysin TlyA tlyA
Rv1793	esxN	285	putative ESAT-6 like protein ESXN (ESAT-6 likeprotein 5) esxN
Rv1860	apa	978	hypothetical protein apa
Rv1886c	fbpB	978	secreted antigen 85-B fbpB (85B) (antigen 85complex B) (MycolyI transferase 85B)
Rv1926c	mpt63	480	immunogenic protein MPT63 (antigen MPT63/MPB63)
Rv1945		1365	hypothetical protein
Rv1977		1047	hypothetical protein
Rv1980c	mpt64	687	immunogenic protein MPT64 (antigen MPT64/MPB64) mpt64
Rv1985c		912	chromosome replication initiation inhibitorprotein

## Fortsetzung Anhang 18

H37Rv ID	Gen	Länge (Basen)	Annotation
Rv1986		600	integral membrane protein
Rv1987		429	chitinase
Rv2031c	hspX	435	heat shock protein hspX hspX
Rv2182c		744	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase
Rv2190c		1158	hypothetical protein
Rv2220	glnA1	1437	glutamine synthetase GLNA1 (glutamine synthase)(GS-I) glnA1
Rv2223c		1563	exported protease
Rv2290	lppO	516	lipoprotein lppO lppO
Rv2346c	esxO	285	putative ESAT-6 like protein ESXO (ESAT-6 likeprotein 6) esxO
Rv2351c	plcA	1539	membrane-associated phospholipase C plcA
Rv2476c	gdh	4875	NAD-dependent glutamate dehydrogenase gdh
Rv2666		804	truncated IS1081 transposase
Rv2715		1026	hydrolase
Rv2780	ald	1116	secreted L-alanine dehydrogenase ALD (40 kDaantigen) (TB43) ald
Rv2823c		2430	hypothetical protein
Rv2875	mpt70	582	major secreted immunogenic protein MPT70 mpt70
Rv2878c	mpt53	522	soluble secreted antigen MPT53 precursor mpt53
Rv2903c	lepB	885	signal peptidase I LepB lepB
Rv2945c	lppX	702	lipoprotein LppX lppX
Rv3017c	esxQ	363	Esat-6 like protein esxQ (TB12.9) (Esat-6 likeprotein 8) esxQ
Rv3019c	esxR	291	secreted ESAT-6 like protein ESXR (TB10.3) (ESAT-6 like protein 9) esxR
Rv3106	fprA	1371	NADPH:adrenodoxin oxidoreductase FPRA (NADPH-ferredoxin reductase) fprA
Rv3201c		3306	ATP-dependent DNA helicase
Rv3207c		858	hypothetical protein
Rv3296	lhr	4542	ATP-dependent helicase lhr
Rv3333c		846	hypothetical protein
Rv3378c		891	hypothetical protein
Rv3418c	groES	303	co-chaperonin GroES groES
Rv3467		954	hypothetical protein
Rv3497c	mce4C	1074	MCE-family protein MCE4C mce4C
Rv3619c	esxV	285	putative ESAT-6 like protein ESXV (ESAT-6 likeprotein 1) esxV
Rv3689		1356	transmembrane protein
Rv3714c		891	hypothetical protein
Rv3763	lpqH	480	19 kDa lipoprotein antigen precursor LPQH lpqH
Rv3803c	fbpD	900	secreted MPT51/MPB51 antigen protein FBPD(MPT51/MPB51 antigen 85 complex C) (AG58C)
Rv3804c	fbpA	1017	secreted antigen 85-A FBPA (Mycoly transferase85A) (fibronectin-binding protein A)
Rv3812	PE_PGRS62	1515	PE-PGRS family protein PE_PGRS62
Rv3846	sodA	624	superoxide dismutase [Fe] SODA sodA
Rv3871		1776	hypothetical protein
Rv3874	esxB	303	10 kDa culture filtrate antigen EsxB esxB
Rv3875	esxA	288	6 kDa early secretory antigenic target ESXA(ESAT-6) esxA
Rv3878		843	hypothetical protein
Rv3879c		2190	hypothetical protein

## Anhang 19: Genset: Lipoproteine

H37Rv ID	Gen	Länge (Basen)	Annotation
Rv0179c	lprO	1110	lipoprotein LprO lprO
Rv0237	lpqI	1167	lipoprotein LpqI lpqI
Rv0344c	lpqJ	561	lipoprotein LpqJ lpqJ
Rv0399c	lpqK	1230	lipoprotein LpqK lpqK
Rv0483	lprQ	1356	lipoprotein LprQ lprQ
Rv0583c	lpqN	687	lipoprotein LpqN lpqN
Rv0604	lpqO	951	lipoprotein LpqO lpqO
Rv0671	lpqP	843	lipoprotein LpqP lpqP
Rv0835	lpqQ	645	lipoprotein LpqQ lpqQ

## Fortsetzung Anhang 19

H37Rv ID	Gen	Länge (Basen)	Annotation
Rv0838	lpqR	771	lipoprotein LpqR lpqR
Rv0847	lpqS	393	lipoprotein LpqS lpqS
Rv0962c	lprP	675	lipoprotein LprP lprP
Rv1016c	lpqT	681	lipoprotein LpqT lpqT
Rv1022	lpqU	732	lipoprotein LpqU lpqU
Rv1064c	lpqV	420	lipoprotein LpqV lpqV
Rv1166	lpqW	1908	lipoprotein LpqW lpqW
Rv1228	lpqX	558	lipoprotein LpqX lpqX
Rv1244	lpqZ	861	lipoprotein LpqZ lpqZ
Rv1252c	lprE	609	lipoprotein LprE lprE
Rv1270c	lprA	735	lipoprotein LprA lprA
Rv1274	lprB	558	lipoprotein LprB lprB
Rv1275	lprC	543	lipoprotein LprC lprC
Rv1343c	lprD	381	lipoprotein LprD lprD
Rv1368	lprF	786	lipoprotein LprF lprF
Rv1411c	lprG	711	lipoprotein LprG lprG
Rv1418	lprH	687	lipoprotein LprH lprH
Rv1541c	lprI	594	lipoprotein LprI lprI
Rv1677	dsbF	549	lipoprotein DsbF dsbF
Rv1690	lprJ	384	lipoprotein LprJ lprJ
Rv1799	lppT	192	lipoprotein LppT lppT
Rv1881c	lppE	423	lipoprotein LppE lppE
Rv1899c	lppD	1032	lipoprotein LppD lppD
Rv1911c	lppC	606	lipoprotein LppC lppC
Rv1921c	lppF	1272	lipoprotein LppF lppF
Rv1922		1116	lipoprotein
Rv1946c	lppG	453	lipoprotein lppG
Rv2046	lppi	657	lipoprotein lppi lppi
Rv2080	lppJ	564	lipoprotein LppJ lppJ
Rv2116	lppK	570	lipoprotein LppK lppK
Rv2138	lppL	1077	lipoprotein LppL lppL
Rv2171	lppM	684	lipoprotein LppM lppM
Rv2270	lppN	528	lipoprotein LppN lppN
Rv2290	lppO	516	lipoprotein LppO lppO
Rv2330c	lppP	528	lipoprotein LppP lppP
Rv2341	lppQ	420	lipoprotein LppQ lppQ
Rv2403c	lppR	756	lipoprotein LppR lppR
Rv2518c	lppS	1227	lipoprotein LppS lppS
Rv2543	lppA	660	lipoprotein LppA lppA
Rv2544	lppB	663	lipoprotein LppB lppB
Rv2585c		1674	lipoprotein
Rv2784c	lppU	516	lipoprotein LppU lppU
Rv2796c	lppV	564	lipoprotein LppV lppV
Rv2945c	lppX	702	lipoprotein LppX lppX
Rv2999	lppY	966	lipoprotein LppY lppY
Rv3006	lppZ	1122	lipoprotein LppZ lppZ
Rv3016	lpqA	630	lipoprotein LpqA lpqA
Rv3244c	lpqB	1752	lipoprotein LpqB lpqB
Rv3390	lpqD	711	lipoprotein LpqD lpqD
Rv3576	lppH	714	lipoprotein LppH lppH
Rv3584	lpqE	549	lipoprotein LpqE lpqE
Rv3593	lpqF	1359	lipoprotein LpqF lpqF
Rv3623	lpqG	723	lipoprotein LpqG lpqG

Anhang 20: Genset: Virulenz assoziierte Gene (*vapBC*)

H37Rv ID	Gen	Länge (Basen)	Annotation
Rv0065	vapC1	402	Possible toxin VapC1
Rv0239	vapB24	234	Possible antitoxin VapB24
Rv0240	vapC24	438	Possible toxin VapC24. Contains PIN domain.
Rv0277c	vapC25	429	Possible toxin VapC25. Contains PIN domain.
Rv0300	vapB2	222	Possible antitoxin VapB2
Rv0301	vapC2	426	Possible toxin VapC2
Rv0549c	vapC3	414	Possible toxin VapC3
Rv0550c	vapB3	267	Possible antitoxin VapB3
Rv0581	vapB26	216	Possible antitoxin VapB26
Rv0582	vapC26	408	Possible toxin VapC26. Contains PIN domain.
Rv0595c	vapC4	393	Possible toxin VapC4
Rv0596c	vapB4	258	Possible antitoxin VapB4
Rv0598c	vapC27	414	Possible toxin VapC27. Contains PIN domain.
Rv0599c	vapB27	237	Possible antitoxin VapB27
Rv0608	vapB28	246	Possible antitoxin VapB28
Rv0609	vapC28	402	Possible toxin VapC28. Contains PIN domain.
Rv0617	vapC29	402	Possible toxin VapC29. Contains PIN domain.
Rv0623	vapB30	255	Possible antitoxin VapB30
Rv0624	vapC30	396	Possible toxin VapC30. Contains PIN domain.
Rv0626	vapB5	261	Possible antitoxin VapB5
Rv0627	vapC5	408	Possible toxin VapC5
Rv0656c	vapC6	384	Possible toxin VapC6
Rv0657c	vapB6	156	Possible antitoxin VapB6
Rv0661c	vapC7	438	Possible toxin VapC7
Rv0662c	vapB7	369	Possible antitoxin VapB7
Rv0664	vapB8	273	Possible antitoxin VapB8
Rv0665	vapC8	339	Possible toxin VapC8
Rv0748	vapB31	258	Possible antitoxin VapB31
Rv0749	vapC31	429	Possible toxin VapC31. Contains PIN domain.
Rv0960	vapC9	384	Possible toxin VapC9
Rv1113	vapB32	198	Possible antitoxin VapB32
Rv1114	vapC32	375	Possible toxin VapC32. Contains PIN domain.
Rv1241	vapB33	261	Possible antitoxin VapB33
Rv1242	vapC33	432	Possible toxin VapC33. Contains PIN domain.
Rv1397c	vapC10	402	Possible toxin VapC10
Rv1398c	vapB10	258	Possible antitoxin VapB10
Rv1560	vapB11	219	Possible antitoxin VapB11
Rv1561	vapC11	405	Possible toxin VapC11
Rv1720c	vapC12	390	Possible toxin VapC12
Rv1721c	vapB12	228	Possible antitoxin VapB12
Rv1740	vapB34	213	Possible antitoxin VapB34
Rv1741	vapC34	249	Possible toxin VapC34. Contains PIN domain.
Rv1838c	vapC13	396	Possible toxin VapC13
Rv1839c	vapB13	264	Possible antitoxin VapB13
Rv1952	vapB14	216	Possible antitoxin VapB14
Rv1953	vapC14	312	Possible toxin VapC14
Rv1962c	vapC35	408	Possible toxin VapC35. Contains PIN domain.
Rv1982c	vapC36	420	Possible toxin VapC36. Contains PIN domain.
Rv2009	vapB15	243	Antitoxin VapB15
Rv2010	vapC15	399	Toxin VapC15
Rv2103c	vapC37	435	Possible toxin VapC37. Contains PIN domain.
Rv2104c	vapB37	255	Possible antitoxin VapB37
Rv2493	vapB38	222	Possible antitoxin VapB38
Rv2494	vapC38	426	Possible toxin VapC38. Contains PIN domain.
Rv2526	vapB17	228	Possible antitoxin VapB17
Rv2527	vapC17	402	Possible toxin VapC17
Rv2530c	vapC39	420	Possible toxin VapC39. Contains PIN domain.
Rv2530A	vapB39	225	Possible antitoxin VapB39
Rv2545	vapB18	279	Possible antitoxin VapB18

## Fortsetzung Anhang 20

H37Rv ID	Gen	Länge (Basen)	Annotation
Rv2546	vapC18	414	Possible toxin VapC18
Rv2547	vapB19	258	Possible antitoxin VapB19
Rv2548	vapC19	378	Possible toxin VapC19
Rv2549c	vapC20	396	Possible toxin VapC20
Rv2550c	vapB20	246	Possible antitoxin VapB20
Rv2595	vapB40	246	Possible antitoxin VapB40
Rv2596	vapC40	405	Possible toxin VapC40. Contains PIN domain.
Rv2601A	vapB41	288	Possible antitoxin VapB41
Rv2602	vapC41	441	Possible toxin VapC41. Contains PIN domain.
Rv2757c	vapC21	417	Possible toxin VapC21
Rv2758c	vapB21	267	Possible antitoxin VapB21
Rv2759c	vapC42	396	Possible toxin VapC42. Contains PIN domain.
Rv2760c	vapB42	270	Possible antitoxin VapB42
Rv2829c	vapC22	393	Possible toxin VapC22
Rv2830c	vapB22	216	Possible antitoxin VapB22
Rv2863	vapC23	381	Possible toxin VapC23
Rv2871	vapB43	258	Possible antitoxin VapB43
Rv2872	vapC43	444	Possible toxin VapC43. Contains PIN domain.
Rv3320c	vapC44	429	Possible toxin VapC44. Contains PIN domain.
Rv3321c	vapB44	243	Possible antitoxin VapB44
Rv3384c	vapC46	393	Possible toxin VapC46. Contains PIN domain.
Rv3385c	vapB46	309	Possible antitoxin VapB46
Rv3407	vapB47	300	Possible antitoxin VapB47
Rv3408	vapC47	411	Possible toxin VapC47. Contains PIN domain.
Rv3697c	vapC48	438	Possible toxin VapC48. Contains PIN domain.

## Anhang 21: Genset: 300 randomisierte essentielle Gene

H37Rv ID	Gen	Länge (Basen)	Annotation
Rv3519		711	hypothetical protein
Rv2218	lipA	936	lipoyl synthase lipA
Rv0993	galU	921	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferaseGalU galU
Rv0721	rpsE	663	30S ribosomal protein S5 rpsE
Rv3489		165	hypothetical protein
Rv3781	rfbE	822	o-antigen/lipopolysaccharide transport ATP-binding protein ABC transporter RfbE rfbE
Rv3423c	alr	1227	alanine racemase alr
Rv1697		1182	hypothetical protein
Rv2229c		738	hypothetical protein
Rv3132c	devS	1737	two component sensor histidine kinase DEVS devS
Rv1569	bioF1	1161	8-amino-7-oxononanoate synthase bioF1
Rv3011c	gatA	1485	aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunitA gatA
Rv3800c	pkS13	5202	polyketide synthase PKS13 pkS13
Rv3722c		1308	hypothetical protein
Rv1614	lgt	1407	prolipoprotein diacylglyceryl transferase lgt
Rv3341	metX	1140	homoserine O-acetyltransferase metX
Rv1683		3000	acyl-CoA synthetase
Rv3277		819	transmembrane protein
Rv3559c		789	short chain dehydrogenase
Rv1323	fadA4	1170	acetyl-CoA acetyltransferase fadA4
Rv0334	rmlA	867	alpha-D-glucose-1-phosphatethymidyltransferase RmlA rmlA
Rv2388c	hemN	1128	coproporphyrinogen III oxidase hemN
Rv0701	rplC	654	50S ribosomal protein L3 rplC
Rv1024		687	hypothetical protein
Rv2832c	ugpC	1083	sn-glycerol-3-phosphate transport ATP-bindingprotein ABC transporter UGPC ugpc
Rv2808		258	hypothetical protein

## Fortsetzung Anhang 21

H37Rv ID	Gen	Länge (Basen)	Annotation
Rv1599	hisD	1317	histidinol dehydrogenase hisD
Rv2178c	aroG	1389	3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphatesynthase AroG aroG
Rv1315	murA	1257	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase murA
Rv1410c		1557	aminoglycosides/tetracycline-transport integralmembrane protein
Rv1382		498	export or membrane protein
Rv2210c	ilvE	1107	branched-chain amino acid aminotransferase ilvE
Rv0780	hemH	894	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamidesynthase hemH
Rv1182	papA3	1419	polyketide synthase associated protein PapA3 papA3
Rv0627		408	hypothetical protein
Rv1194c		1266	hypothetical protein
Rv2040c		903	sugar-transport integral membrane protein ABCtransporter
Rv3913	trxB2	1008	thioredoxin reductase TRXB2 trxB2
Rv1301		654	hypothetical protein
Rv3109	moaA1	1080	molybdenum cofactor biosynthesis protein A moaA1
Rv0101	nrp	7539	peptide synthetase nrp
Rv2906c	trmD	693	tRNA (guanine-N(1)-)methyltransferase trmD
Rv3111	moaC	513	molybdenum cofactor biosynthesis protein C moaC
Rv3615c		312	hypothetical protein
Rv0284		3993	hypothetical protein
Rv0352	dnaJ1	1188	chaperone protein DnaJ1 dnaJ1
Rv2472		294	hypothetical protein
Rv2155c	murD	1461	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamatesynthetase murD
Rv0338c		2649	iron-sulfur-binding reductase
Rv0411c	glnH	987	glutamine-binding lipoprotein glnH
Rv3336c	trpS	1011	tryptophanyl-tRNA synthetase trpS
Rv0894		1182	LuxR family transcriptional regulator
Rv0098		552	hypothetical protein
Rv1930c		525	hypothetical protein
Rv1122	gnd2	1023	6-phosphogluconate dehydrogenase-like protein gnd2
Rv1187	rocA	1632	pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase ROCA rocA
Rv1589	bioB	1050	biotin synthase bioB
Rv0636		429	(3R)-hydroxyacyl-ACP dehydratase subunit HadB
Rv0700	rpsJ	306	30S ribosomal protein S10 rpsJ
Rv1235	lpqY	1407	sugar-binding lipoprotein LpqY lpqY
Rv2283		195	hypothetical protein
Rv1347c		633	hypothetical protein
Rv0086	hycQ	1467	hydrogenase HycQ hycQ
Rv0651	rpJ	537	50S ribosomal protein L10 rpJ
Rv0236c		4203	transmembrane protein
Rv0557	pimB	1137	mannosyltransferase PIMB pimB
Rv2502c	accD1	1590	acetyl-/propionyl-CoA carboxylase subunit beta accD1
Rv3646c	topA	2805	DNA topoisomerase I topA
Rv2192c	trpD	1113	anthranilate phosphoribosyltransferase trpD
Rv1631	coaE	1224	dephospho-CoA kinase/unknown domain fusionprotein coaE
Rv3666c	dppA	1626	periplasmic dipeptide-binding lipoprotein DppA dppA
Rv0540		663	hypothetical protein
Rv2220	glnA1	1437	glutamine synthetase GLNA1 (glutamine synthase)(GS-I) glnA1
Rv2154c	ftsW	1575	FtsW-like protein FtsW ftsW
Rv1002c		1512	hypothetical protein
Rv1464	csd	1254	cysteine desulfurase csd
Rv1284		492	hypothetical protein
Rv1184c		1080	hypothetical protein
Rv3436c	glmS	1875	glucosamine-fructose-6-phosphateaminotransferase glmS
Rv2533c		471	transcription antitermination protein NusB
Rv3910		3555	transmembrane protein
Rv1349		1740	drugs-transport transmembrane ATP-bindingprotein ABC transporter
Rv0562	grcC1	1008	polyprenyl-diphosphate synthase grcC1

## Fortsetzung Anhang 21

Gen	Länge (Basen)	Annotation
Rv3140	fadE23	1206 acyl-CoA dehydrogenase FADE23 fadE23
Rv3002c	ilvH	507 acetolactate synthase 3 regulatory subunit ilvH
Rv0429c	def	594 peptide deformylase def
Rv1326c	glgB	2196 glycogen branching enzyme glgB
Rv1603	hisA	738 phosphoribosyl isomerase A hisA
Rv1462		1194 hypothetical protein
Rv0666		174 hypothetical protein
Rv0399c	lpqK	1230 lipoprotein LpqK lpqK
Rv3540c	ltp2	1161 lipid-transfer protein ltp2
Rv1388	mihF	573 putative integration host factor MIHF mihF
Rv2700		651 secreted alanine rich protein
Rv2179c		507 hypothetical protein
Rv3043c	ctaD	1722 cytochrome C oxidase polypeptide I ctaD
Rv1111c		984 hypothetical protein
Rv3258c		492 hypothetical protein
Rv1126c		606 hypothetical protein
Rv1224	tatB	396 sec-independent translocase tatB
Rv3604c		1194 transmembrane protein
Rv3752c		459 cytidine/deoxycytidylate deaminase
Rv1695	ppnK	924 inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase ppnK
Rv2224c		1563 exported protease
Rv1821	secA2	2427 preprotein translocase subunit SecA secA2
Rv3255c	manA	1227 mannose-6-phosphate isomerase manA
Rv0588	yrbE2B	888 integral membrane protein YrbE2b yrbE2B
Rv1109c		639 hypothetical protein
Rv2109c	prcA	747 proteasome (alpha subunit) PrcA prcA
Rv3596c	clpC1	2547 ATP-dependent protease ATP-binding subunitClpC1 clpC1
Rv1640c		3519 lysyl-tRNA synthetase
Rv2373c	dnaJ2	1149 chaperone protein DnaJ2 dnaJ2
Rv3001c	ilvC	1002 ketol-acid reductoisomerase ilvC
Rv2524c	fas	9210 fatty acid synthase fas
Rv2378c	mbtG	1296 lysine-N-oxygenase MBTG (L-lysine 6-monooxygenase) (lysine N6-hydroxylase) mbtG
Rv1696	recN	1764 DNA repair protein recN (recombination proteinN) recN
Rv0470c	pcaA	864 mycolic acid synthase pcaA (cyclopropanesynthase) pcaA
Rv1738		285 hypothetical protein
Rv1183	mmpL1	3009 transmembrane transport protein MmpL10 mmpL10
Rv2977c	thiL	1002 thiamine monophosphate kinase thiL
Rv0416	thiS	207 sulfur carrier protein ThiS thiS
Rv0205		1104 transmembrane protein
Rv1303		486 hypothetical protein
Rv0788	purQ	675 phosphoribosylformylglycinamide synthase I purQ
Rv3855	ethR	651 transcriptional regulatory repressor protein(TETR-family) ETHR ethR
Rv2869c		1215 transmembrane protein
Rv2623	TB31.7	894 hypothetical protein TB31.7
Rv3538		861 dehydrogenase
Rv3275c	purE	525 phosphoribosylaminoimidazole carboxylasecatalytic subunit purE
Rv2156c	mraY	1080 phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase mraY
Rv1026		960 hypothetical protein
Rv1306	atpF	516 FOF1 ATP synthase subunit B atpF
Rv3465	rmIC	609 dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase RmIC rmIC
Rv1456c		933 unidentified antibiotic-transport integralmembrane ABC transporter
Rv2335	cysE	690 serine acetyltransferase CysE cysE
Rv3236c		1158 integral membrane transport protein
Rv2696c		780 hypothetical protein
Rv0732	secY	1326 preprotein translocase subunit SecY secY
Rv3490	otsA	1503 alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase otsA
Rv1285	cysD	999 sulfate adenylyltransferase subunit 2 cysD

## Fortsetzung Anhang 21

Gen	Länge (Basen)	Annotation
Rv3398c	idsA1	1080 synthetase/farnesyltranstransferase
Rv0635		477 (3R)-hydroxyacyl-ACP dehydratase subunit HadA
Rv2277c		906 glycerolphosphodiesterase
Rv1595	nadB	1584 L-aspartate oxidase nadB
Rv1092c	coaA	939 pantothenate kinase coaA
Rv0684	fusA1	2106 elongation factor G fusA1
Rv2753c		903 dihydrodipicolinate synthase
Rv3502c	fabG	954 3-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase fabG
Rv1641	infC	606 translation initiation factor IF-3 infC
Rv2534c	efp	564 elongation factor P efp
Rv2515c		1248 hypothetical protein
Rv2937	drrB	870 daunorubicin-DIM-transport integral membraneprotein ABC transporter DrrB drrB
Rv0982	mprB	1515 two component sensor kinase MprB mprB
Rv2537c	aroD	444 3-dehydroquinat dehydratase aroD
Rv3683		960 hypothetical protein
Rv1333		1035 hydrolase
Rv1005c	pabB	1377 aminodeoxychorismate synthase component I pabB
Rv1014c	pth	576 peptidyl-tRNA hydrolase pth
Rv0685	tuf	1191 elongation factor Tu tuf
Rv1293	lysA	1344 diaminopimelate decarboxylase LysA lysA
Rv2382c	mbtC	1335 polyketide synthetase MBTC (polyketidesynthase) mbtC
Rv1490		1308 hypothetical protein
Rv2539c	aroK	531 shikimate kinase aroK
Rv1350	fabG	744 3-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase fabG
Rv1594	nadA	1050 quinolinate synthetase nadA
Rv0772	purD	1269 phosphoribosylamine-glycine ligase purD
Rv2421c	nadD	636 nicotinic acid mononucleotideadenylyltransferase nadD
Rv0798c	cfp29	798 29 kDa antigen CFP29 cfp29
Rv3244c	lpqB	1752 lipoprotein LpqB lpqB
Rv3455c	truA	894 tRNA pseudouridine synthase A truA
Rv3805c		1884 transmembrane protein
Rv1272c		1896 drugs-transport transmembrane ATP-bindingprotein ABC transporter
Rv3574		600 transcriptional regulatory protein TetR-family
Rv3625c	mesJ	972 cell cycle protein MESJ mesJ
Rv2182c		744 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase
Rv0290		1419 transmembrane protein
Rv1248c	kgd	3696 alpha-ketoglutarate decarboxylase kgd
Rv2828c		546 hypothetical protein
Rv0383c		855 hypothetical protein
Rv3462c	infA	222 translation initiation factor IF-1 infA
Rv1007c	metG	1560 methionyl-tRNA synthetase metG
Rv3545c	cyp125	1302 cytochrome P450 125 cyp125
Rv2163c	pbpB	2040 penicillin-binding membrane protein pbpB pbpB
Rv2747		525 N-acetylglutamate synthase
Rv3648c	cspA	204 cold shock protein A cspA
Rv0326		456 hypothetical protein
Rv1461		2541 hypothetical protein
Rv0652	rpIL	393 50S ribosomal protein L7/L12 rpIL
Rv2697c	dut	465 deoxyuridine 5'-triphosphatenucleotidohydrolase dut
Rv1028c	kdpD	2583 sensor protein KDPD kdpD
Rv0973c	accA2	2004 acetyl-/propionyl-coenzyme A carboxylase subunitalpha accA2
Rv3061c	fadE22	2166 acyl-CoA dehydrogenase FADE22 fadE22
Rv2438c	nadE	2040 NAD synthetase nadE
Rv0337c	aspC	1290 aminotransferase AlaT aspC
Rv3551		879 CoA-transferase subunit alpha
Rv2221c	glnE	2985 glutamate-ammonia-ligase adenylyltransferaseGLNE
Rv1658	argG	1197 argininosuccinate synthase argG

## Fortsetzung Anhang 21

Gen	Länge (Basen)	Annotation
Rv2338c	moeW	957 hypothetical protein moeW
Rv2225	panB	846 3-methyl-2-oxobutanoatehydroxymethyltransferase panB
Rv0430		309 hypothetical protein
Rv1298	rpmE	243 50S ribosomal protein L31 rpmE
Rv3372	otsB2	1176 trehalose 6-phosphate phosphatase otsB2
Rv3607c	folB	402 dihydroneopterin aldolase FolB folB
Rv2538c	aroB	1089 3-dehydroquinate synthase aroB
Rv2726c	dapF	870 diaminopimelate epimerase dapF
Rv2516c		804 hypothetical protein
Rv2748c	ftsK	2652 cell division transmembrane protein FtsK ftsK
Rv0291	mycP3	1386 membrane-anchored mycosin mycP3
Rv1828		744 hypothetical protein
Rv0708	rplP	417 50S ribosomal protein L16 rplP
Rv3210c		696 hypothetical protein
Rv3243c		843 hypothetical protein
Rv1476		561 hypothetical protein
Rv0781	ptrBa	711 oligopeptidase B ptrBa
Rv0705	rpsS	282 30S ribosomal protein S19 rpsS
Rv3560c	fadE3	1158 acyl-CoA dehydrogenase FADE30 fadE30
Rv2041c		1320 sugar-binding lipoprotein
Rv2164c		1155 hypothetical protein
Rv3356c	foID	846 bifunctional methylenetetrahydrofolatedehydrogenase
Rv3597c	lsr2	339 iron-regulated LSR2 protein precursor lsr2
Rv2152c	murC	1485 UDP-N-acetylmuramate-L-alanine ligase murC
Rv2477c		1677 putative ABC transporter ATP-binding protein
Rv1294	thrA	1326 homoserine dehydrogenase thrA
Rv1332		657 transcriptional regulatory protein
Rv2845c	proS	1749 prolyl-tRNA synthetase proS
Rv3609c	foIE	609 GTP cyclohydrolase I foIE
Rv1188		990 proline dehydrogenase
Rv1237	sugB	825 sugar-transport integral membrane protein ABCtransporter SugB sugB
Rv1514c		789 hypothetical protein
Rv0085	hycP	663 hydrogenase HycP hycP
Rv0224c		765 methyltransferase (methylase)
Rv2442c	rplU	315 50S ribosomal protein L21 rplU
Rv2365c		342 hypothetical protein
Rv1223	htrA	1587 serine protease HtrA htrA
Rv0226c		1731 transmembrane protein
Rv3709c	ask	1266 aspartate kinase ask
Rv0720	rplR	369 50S ribosomal protein L18 rplR
Rv1254		1152 acyltransferase
Rv1600	hisC1	1143 histidinol-phosphate aminotransferase hisC1
Rv1299	prfA	1074 peptide chain release factor 1 prfA
Rv1629	polA	2715 DNA polymerase I polA
Rv0218		1329 transmembrane protein
Rv0001	dnaA	1524 chromosomal replication initiation protein dnaA
Rv1437	pgk	1239 phosphoglycerate kinase pgk
Rv0955		1368 integral membrane protein
Rv3113		669 phosphatase
Rv3882c		1389 hypothetical protein
Rv3627c		1386 hypothetical protein
Rv3782		915 L-rhamnosyltransferase
Rv2976c	ung	684 uracil-DNA glycosylase ung
Rv2215	dlaT	1662 dihydrolipoamide acetyltransferase dlaT
Rv3616c		1179 hypothetical protein
Rv2856	nicT	1119 nickel-transport integral membrane protein nicT

## Fortsetzung Anhang 21

Gen	Länge (Basen)	Annotation
Rv1539	lspA	609 lipoprotein signal peptidase lspA
Rv1436	gap	1020 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gap
Rv2386c	mbtI	1353 salicylate synthase MbtI mbtI
Rv1602	hisH	621 imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH hisH
Rv1144		753 short-chain type dehydrogenase/reductase
Rv3721c	dnaZX	1737 DNA polymerase III subunits gamma and tau dnaZX
Rv3177		861 peroxidase
Rv2510c		1602 hypothetical protein
Rv2739c		1167 alanine rich transferase
Rv0527	ccdA	780 cytochrome C-type biogenesis protein CcdA ccdA
Rv0282		1896 hypothetical protein
Rv2157c	murF	1533 UDP-N-acetylmuramoylalanine-D-glutamyl-2, 6-diaminopimelate- D-alanyl-D-alanyl ligase
Rv1479	moxR1	1134 transcriptional regulatory protein MOXR1 moxR1
Rv1713	engA	1392 GTP-binding protein EngA engA
Rv3032		1245 transferase
Rv2217	lipB	693 lipoyltransferase lipB
Rv0640	rplK	429 50S ribosomal protein L11 rplK
Rv3660c		1053 hypothetical protein
Rv2968c		633 integral membrane protein
Rv2359	furB	393 ferric uptake regulation protein FURB furB
Rv2881c		921 integral membrane phosphatidatecytidyltransferase A
Rv3792		1932 transmembrane protein
Rv2153c	murG	1233 undecaprenyldiphospho-muramoylpentapeptide beta-N- acetylglucosaminyltransferase
Rv0744c		507 transcriptional regulatory protein
Rv3801c	fadD32	1914 acyl-CoA synthetase fadD32
Rv3248c	sahH	1488 S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase sahH
Rv2727c	miaA	945 tRNA delta(2)-isopentenylpyrophosphatetransferase miaA
Rv2196	qcrB	1650 ubiquinol-cytochrome C reductase QcrB(cytochrome B subunit) qcrB
Rv1392	metK	1212 S-adenosylmethionine synthetase metK
Rv3791		765 short chain dehydrogenase
Rv0950c		999 hypothetical protein
Rv3834c	serS	1260 seryl-tRNA synthetase serS
Rv3050c		741 AsnC family transcriptional regulator
Rv3923c	rnpA	351 ribonuclease P rnpA
Rv1449c	tkt	2103 transketolase tkt
Rv1699	pyrG	1761 CTP synthetase pyrG
Rv1466		348 hypothetical protein
Rv1524		1245 glycosyltransferase
Rv0357c	purA	1299 adenylosuccinate synthetase purA
Rv3723		765 transmembrane protein
Rv1338	murl	816 glutamate racemase murl
Rv3501c	yrbE4A	765 integral membrane protein YrbE4a yrbE4A
Rv3246c	mtrA	687 two component sensory transduction/transcriptional regulatory protein MTRA mtrA
Rv1710		696 hypothetical protein
Rv2987c	leuD	597 isopropylmalate isomerase small subunit leuD
Rv3441c	mrsA	1347 phospho-sugar mutase / MRSA protein mrsA

## Anhang 22: Genset: 300 randomisierte nicht essentielle Gene

H37Rv ID	Gen	Länge (Basen)	Annotation
Rv0903c	prpA	711	two component response transcriptional/regulatory protein PRPA prpA
Rv0466		795	hypothetical protein
Rv1973		483	MCE associated membrane protein
Rv0200		690	transmembrane protein
Rv3820c	papA2	1407	polyketide synthase associated protein PapA2 papA2
Rv2497c	pdhA	1104	pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit PdhA pdhA

## Fortsetzung Anhang 22

H37Rv ID	Gen	Länge (Basen)	Annotation
Rv2309c		456	hypothetical protein
Rv1029	kdpA	1716	potassium-transporting ATPase subunit A kdpA
Rv1213		1215	glucose-1-phosphate adenylyltransferase
Rv1322		297	hypothetical protein
Rv2589	gabT	1350	4-aminobutyrate aminotransferase gabT
Rv0007		915	hypothetical protein
Rv2913c		1836	D-amino acid aminohydrolase
Rv0634c		714	glyoxalase II
Rv0913c		1509	dioxygenase
Rv3433c		1422	hypothetical protein
Rv1920		864	hypothetical protein
Rv1767		360	hypothetical protein
Rv0567		1020	methyltransferase/methylase
Rv3304		480	hypothetical protein
Rv0881		867	rRNA methyltransferase
Rv3319	sdhB	792	succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit sdhB
Rv0471c		489	hypothetical protein
Rv3550	echA2	744	enoyl-CoA hydratase echA20
Rv1876	bfrA	480	bacterioferritin bfrA
Rv3857c		198	hypothetical protein
Rv1889c		357	hypothetical protein
Rv3488		324	hypothetical protein
Rv0064		2940	hypothetical protein
Rv1735c		498	hypothetical protein
Rv2007c	fdxA	345	ferredoxin FDxA fdxA
Rv3234c		816	hypothetical protein
Rv0768	aldA	1470	aldehyde dehydrogenase NAD dependent AldA aldA
Rv1988		540	methyltransferase
Rv1280c	oppA	1776	periplasmic oligopeptide-binding lipoproteinOppA oppA
Rv0717	rpsN	186	30S ribosomal protein S14 rpsN
Rv1227c		534	hypothetical protein
Rv1434		138	hypothetical protein
Rv1221	sigE	774	RNA polymerase sigma factor SigE sigE
Rv0487		552	hypothetical protein
Rv1921c	lppF	1272	lipoprotein LppF lppF
Rv0339c		2499	transcriptional regulatory protein
Rv3724B	cut5b	564	cutinase cut5b
Rv1028A	kdpF	93	membrane protein kdpF kdpF
Rv3707c		1011	hypothetical protein
Rv0802c		657	hypothetical protein
Rv1085c		729	hemolysin-like protein
Rv0931c	pknD	1995	transmembrane serine/threonine-protein kinase DPKND (protein kinase D) (STPK D) pknD
Rv2074		414	hypothetical protein
Rv0568	cyp135B1	1419	cytochrome P450 135B1 cyp135B1
Rv3035		1083	hypothetical protein
Rv3584	lpqE	549	lipoprotein LpqE lpqE
Rv1885c		600	chorismate mutase
Rv1526c		1281	glycosyltransferase
Rv2255c		195	hypothetical protein
Rv1993c		273	hypothetical protein
Rv2854		1041	hypothetical protein
Rv0029		1098	hypothetical protein
Rv1245c		831	short-chain type dehydrogenase/reductase
Rv2129c		882	short chain dehydrogenase
Rv3403c		1602	hypothetical protein
Rv3670	ephE	984	epoxide hydrolase EphE ephE
Rv1754c		1692	hypothetical protein
Rv3399		1047	hypothetical protein
Rv1882c		834	short chain dehydrogenase
Rv2795c		975	hypothetical protein

## Fortsetzung Anhang 22

H37Rv ID	Gen	Länge (Basen)	Annotation
Rv1164	narI	741	respiratory nitrate reductase subunit gammaNarI narI
Rv1125		1245	hypothetical protein
Rv0467	icl	1287	isocitrate lyase icl
Rv1769		1245	hypothetical protein
Rv3628	ppa	489	inorganic pyrophosphatase ppa
Rv1593c		711	hypothetical protein
Rv0259c		744	hypothetical protein
Rv0502		1077	hypothetical protein
Rv0215c	fadE3	1074	acyl-CoA dehydrogenase FADE3 fadE3
Rv0045c		897	hydrolase
Rv1290c		1566	hypothetical protein
Rv3374	echA18.1	249	enoyl-CoA hydratase echA18.1
Rv0849		1260	integral membrane transport protein
Rv2761c	hsdS	1095	type I restriction/modification systemspecificity determinant HsdS hsdS
Rv0464c		573	hypothetical protein
Rv2341	lppQ	420	lipoprotein LppQ lppQ
Rv2393		846	hypothetical protein
Rv2596		405	hypothetical protein
Rv0008c		438	hypothetical protein
Rv1729c		939	hypothetical protein
Rv3835		1350	hypothetical protein
Rv1636	TB15.3	441	hypothetical protein TB15.3
Rv3850		657	hypothetical protein
Rv3278c		519	transmembrane protein
Rv3852	hns	405	histone-like protein HNS hns
Rv1424c		762	hypothetical protein
Rv0070c	glyA	1278	serine hydroxymethyltransferase glyA
Rv3415c		828	hypothetical protein
Rv3453		333	transmembrane protein
Rv0791c		1044	hypothetical protein
Rv1887		1143	hypothetical protein
Rv0620	galK	1092	galactokinase galK
Rv1679	fadE16	1122	acyl-CoA dehydrogenase fadE16
Rv1258c		1260	integral membrane transport protein
Rv2733c		1539	hypothetical protein
Rv1657	argR	513	arginine repressor argR
Rv0477		447	hypothetical protein
Rv0255c	cobQ1	1485	cobyric acid synthase cobQ1
Rv1090	celA2b	456	endo-1,4-beta-glucanase celA2b
Rv1414		402	hypothetical protein
Rv1375		1320	hypothetical protein
Rv1824		366	hypothetical protein
Rv3088		1425	hypothetical protein
Rv1709		837	hypothetical protein
Rv1942c		330	hypothetical protein
Rv2339	mmpL9	2889	transmembrane transport protein MmpL9 mmpL9
Rv0814c	sseC2	303	hypothetical protein sseC2
Rv0062	celA1	1143	endo-1,4-beta-glucanase celA1
Rv3492c		483	Mce associated protein
Rv3017c	esxQ	363	Esat-6 like protein esxQ (TB12.9) (Esat-6 likeprotein 8) esxQ
Rv0926c		1077	hypothetical protein
Rv2765		738	hypothetical protein
Rv3106	fprA	1371	NADPH:adrenodoxin oxidoreductase FPRA (NADPH-ferredoxin reductase) fprA
Rv3123		495	hypothetical protein
Rv2787		1764	hypothetical protein
Rv3463		858	hypothetical protein
Rv0046c	ino1	1104	myo-inositol-1-phosphate synthase INO1 (inositol1-phosphate synthetase)
Rv3866		852	hypothetical protein
Rv3711c	dnaQ	990	DNA polymerase III subunit epsilon dnaQ
Rv2732c		615	transmembrane protein

## Fortsetzung Anhang 22

H37Rv ID	Gen	Länge (Basen)	Annotation
Rv2322c	rocD1	666	ornithine aminotransferase rocD1
Rv3618		1188	monooxygenase
Rv2346c	esxO	285	putative ESAT-6 like protein ESXO (ESAT-6 likeprotein 6) esxO
Rv0887c		459	hypothetical protein
Rv1541c	lprL	594	lipoprotein LprL lprL
Rv0899	ompA	981	outer membrane protein A OMPA ompA
Rv3755c		600	hypothetical protein
Rv0134	ephF	903	epoxide hydrolase EphF ephF
Rv3456c	rplQ	543	50S ribosomal protein L17 rplQ
Rv0712		900	hypothetical protein
Rv1052		390	hypothetical protein
Rv1074c	fadA3	1218	acetyl-CoA acetyltransferase fadA3
Rv3454		1269	integral membrane protein
Rv2114		624	hypothetical protein
Rv0432	sodC	723	periplasmic superoxide dismutase [Cu-Zn] SodC sodC
Rv3813c		822	hypothetical protein
Rv0734	mapA	801	methionine aminopeptidase mapA
Rv2349c	plcC	1527	phospholipase C 3 PLCC plcC
Rv0254c	cobU	525	bifunctional cobinamide kinase/cobinamidephosphate guanylyltransferase cobU
Rv2982c	gpsA	1005	NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphatedehydrogenase gpsA
Rv1865c		861	short chain dehydrogenase
Rv2804c		630	hypothetical protein
Rv2677c	hemY	1359	protoporphyrinogen oxidase hemY
Rv1913		753	hypothetical protein
Rv0577	TB27.3	786	hypothetical protein TB27.3
Rv1049		447	transcriptional repressor protein
Rv2919c	glnB	339	nitrogen regulatory protein P-II GLNB glnB
Rv0919		501	hypothetical protein
Rv2873	mpt83	663	cell surface lipoprotein mpt83 (lipoproteinP23) mpt83
Rv1095	phoH2	1302	PhoH-like protein PhoH2 (phosphate starvation-inducible protein PsiH) phoH2
Rv2661c		390	hypothetical protein
Rv0486		1443	mannosyltransferase
Rv0733	adk	546	adenylate kinase adk
Rv1362c		663	hypothetical protein
Rv2305		1290	hypothetical protein
Rv1833c		861	haloalkane dehalogenase
Rv1777	cyp144	1305	cytochrome p450 144 CYP144 cyp144
Rv2337c		1119	hypothetical protein
Rv1986		600	integral membrane protein
Rv1537	dinX	1407	DNA polymerase IV dinX
Rv1495		318	hypothetical protein
Rv0381c		909	hypothetical protein
Rv1443c		486	hypothetical protein
Rv3313c	add	1098	adenosine deaminase add
Rv1273c		1749	drugs-transport transmembrane ATP-bindingprotein ABC transporter
Rv1344		321	acyl carrier protein
Rv2863		381	hypothetical protein
Rv2797c		1689	hypothetical protein
Rv0348		654	transcriptional regulatory protein
Rv1841c		1038	hypothetical protein
Rv2282c		939	LysR family transcriptional regulator
Rv0083		1923	oxidoreductase
Rv1684		225	hypothetical protein
Rv1866		2337	hypothetical protein
Rv1897c		432	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase
Rv2467	pepN	2586	aminopeptidase N pepN
Rv1108c	xseA	1248	exodeoxyribonuclease VII large subunit xseA
Rv2866		264	hypothetical protein
Rv2556c		390	hypothetical protein
Rv2876		315	transmembrane protein

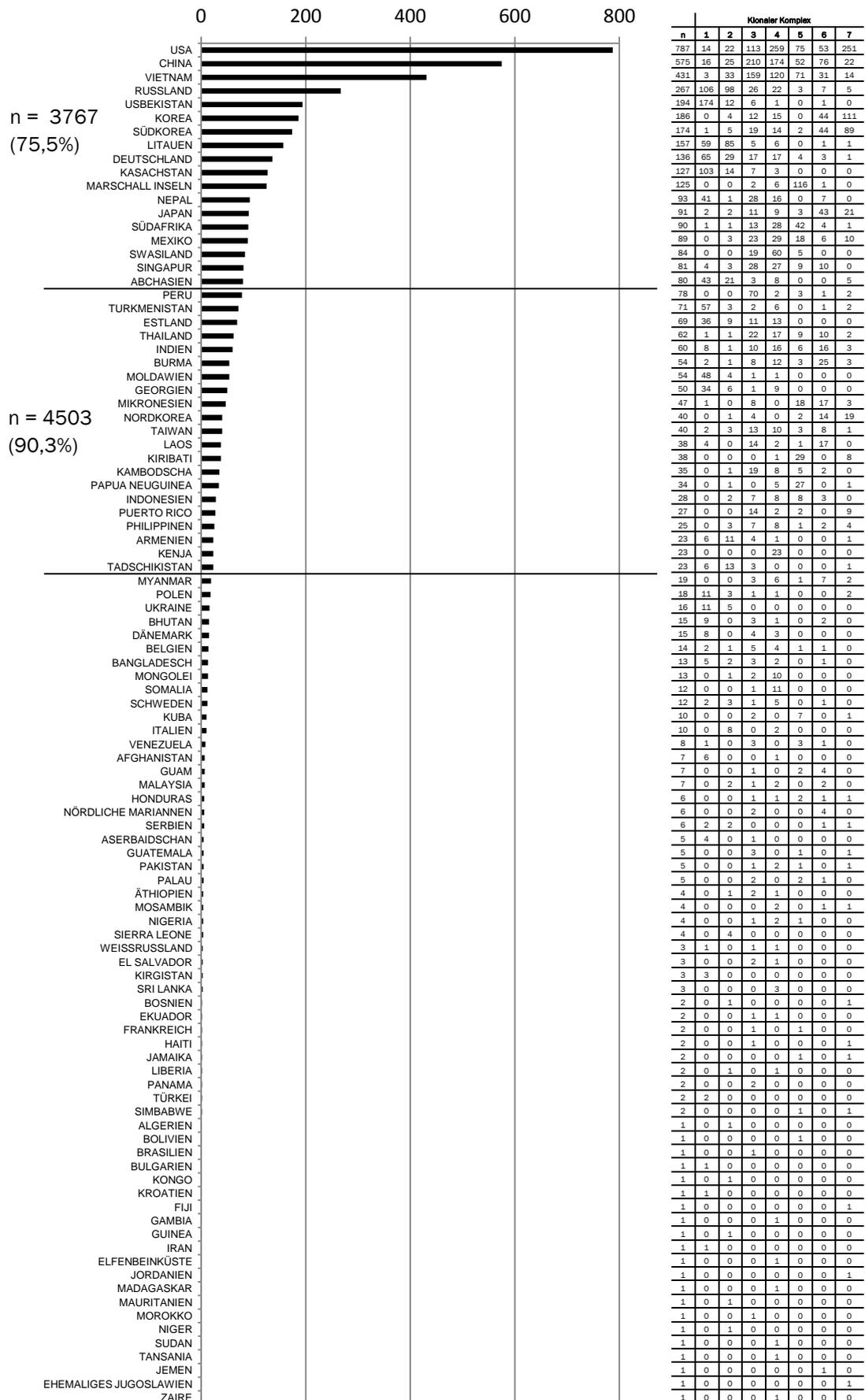
## Fortsetzung Anhang 22

H37Rv ID	Gen	Länge (Basen)	Annotation
Rv2718c	nrdR	465	transcriptional regulator NrdR nrdR
Rv2835c	ugpA	912	sn-glycerol-3-phosphate transport integralmembrane protein ABC transporter UGPA ugpa
Rv0237	lpql	1167	lipoprotein Lpql lpql
Rv2462c	tig	1401	trigger factor tig
Rv1336	cysM	972	cysteine synthase B CysM cysM
Rv1407	fmu	1374	Fmu protein (SUN protein) fmu
Rv0192A		303	hypothetical protein
Rv0027		318	hypothetical protein
Rv2822c		375	hypothetical protein
Rv3466		669	hypothetical protein
Rv1797		1221	hypothetical protein
Rv3828c		612	resolvase
Rv2367c		549	putative metalloprotease
Rv2094c	tatA	252	twin arginine translocase protein A tatA
Rv3493c		729	Mce associated alanine and valine rich protein
Rv3166c		960	hypothetical protein
Rv3033		549	hypothetical protein
Rv3702c		702	hypothetical protein
Rv2529		1392	hypothetical protein
Rv1719		780	transcriptional regulatory protein
Rv2210c	ilvE	1107	branched-chain amino acid aminotransferase ilvE
Rv2909c	rpsP	489	30S ribosomal protein S16 rpsP
Rv0138		504	hypothetical protein
Rv0780	hemH	894	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamidesynthase hemH
Rv2254c		456	integral membrane protein
Rv3447c		3711	hypothetical protein
Rv1182	papA3	1419	polyketide synthase associated protein PapA3 papA3
Rv2414c		1545	hypothetical protein
Rv2409c		840	hypothetical protein
Rv1051c		756	hypothetical protein
Rv0603		312	hypothetical protein
Rv2202c	cbhK	975	carbohydrate kinase CbhK cbhK
Rv3483c		663	hypothetical protein
Rv0397		369	13E12 repeat family protein
Rv3297	nei	768	endonuclease VIII nei
Rv0627		408	hypothetical protein
Rv1741		249	hypothetical protein
Rv0954		912	transmembrane protein
Rv1194c		1266	hypothetical protein
Rv1063c		1083	hypothetical protein
Rv1058	fadD14	1632	acyl-CoA synthetase fadD14
Rv3594		828	hypothetical protein
Rv0111		2058	transmembrane acyltransferase
Rv3840		414	transcriptional regulatory protein
Rv2040c		903	sugar-transport integral membrane protein ABCtransporter
Rv0036c		774	hypothetical protein
Rv3059	cyp136	1479	cytochrome P450 136 cyp136
Rv3360		369	hypothetical protein
Rv1990A		336	dehydrogenase
Rv0751c	mmsB	885	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase MmsB mmsB
Rv1793	esxN	285	putative ESAT-6 like protein ESXN (ESAT-6 likeprotein 5) esxN
Rv0559c		339	hypothetical protein
Rv1758	cut1	525	cutinase Cut1 cut1
Rv3913	trxB2	1008	thioredoxin reductase TRXB2 trxB2
Rv3444c	esxT	303	putative ESAT-6 like protein ESXT esxT
Rv3647c		579	hypothetical protein
Rv1935c	echA13	957	enoyl-CoA hydratase echA13
Rv0456A		282	hypothetical protein
Rv3692	moxR2	1077	methanol dehydrogenase transcriptionalregulatory protein MOXR2 moxR2
Rv2562		390	hypothetical protein

## Fortsetzung Anhang 22

H37Rv ID	Gen	Länge (Basen)	Annotation
Rv0650		909	sugar kinase
Rv1919c		465	hypothetical protein
Rv2084		1137	hypothetical protein
Rv0864	moaC	504	molybdenum cofactor biosynthesis protein C moaC
Rv0571c		1332	hypothetical protein
Rv3298c	lpqC	915	esterase lipoprotein LpqC lpqC
Rv1301		654	hypothetical protein
Rv0044c		795	oxidoreductase
Rv2504c	scoA	747	succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferasesubunit alpha ScoA scoA
Rv0538		1647	hypothetical protein
Rv0576		1305	ArsR family transcriptional regulator
Rv0145		954	hypothetical protein
Rv2915c		1113	hypothetical protein
Rv3109	moaA1	1080	molybdenum cofactor biosynthesis protein A moaA1
Rv1751		1383	hypothetical protein
Rv0101	nrp	7539	peptide synthetase nrp
Rv2061c		405	hypothetical protein
Rv2067c		1224	hypothetical protein
Rv3555c		870	hypothetical protein
Rv2906c	trmD	693	tRNA (guanine-N(1)-)-methyltransferase trmD
Rv0379	secE2	216	protein transport protein secE2
Rv3111	moaC	513	molybdenum cofactor biosynthesis protein C moaC
Rv2899c	fdhD	831	formate dehydrogenase accessory protein fdhD
Rv3615c		312	hypothetical protein
Rv3816c		780	acyltransferase
Rv1928c		768	short chain dehydrogenase
Rv0996		1077	transmembrane protein
Rv2530c		420	hypothetical protein
Rv2159c		1035	hypothetical protein
Rv2347c	esxP	297	putative ESAT-6 like protein ESXP (ESAT-6 likeprotein 7) esxP
Rv0518		696	hypothetical protein
Rv2329c	narK1	1548	nitrite extrusion protein 1 NarK1 narK1
Rv1423	whiA	978	transcriptional regulatory protein WHIA whiA
Rv3181c		453	hypothetical protein
Rv1937		2520	oxygenase
Rv1733c		633	transmembrane protein
Rv1542c	glbN	411	hemoglobin glbN glbN
Rv0284		3993	hypothetical protein
Rv0121c		435	hypothetical protein
Rv0222	echA1	789	enoyl-CoA hydratase echA1
Rv3393	iunH	927	nucleoside hydrolase iunH iunH
Rv0759c		333	hypothetical protein
Rv2077A		300	hypothetical protein
Rv3286c	sigF	786	RNA polymerase sigma factor SigF sigF
Rv2198c	mmpS3	900	membrane protein mmpS3
Rv3569c	bphD	876	2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoatehydrolase BphD bphD
Rv3295		666	TetR family transcriptional regulator
Rv0940c		867	oxidoreductase
Rv2931	ppsA	5631	phenolphthiocerol synthesis type-I polyketidesynthase PPSA ppsA
Rv0352	dnaJ1	1188	chaperone protein DnaJ1 dnaJ1
Rv0626		261	hypothetical protein
Rv3639c		567	hypothetical protein
Rv2155c	murD	1461	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamatesynthetase murD
Rv0669c		1914	hydrolase

Anhang 23: Regionale Verteilung von 4.987 Beijing-Isolaten differenziert nach klonalen Beijing-Komplexen



### Anhang 24: OD<sub>594</sub> - Werte aus 14 Tagen *in vitro* Kultivierung ausgewählter Beijing-Stämme.

\*, zwei Replikate wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Einmal wurde kein Wachstum detektiert, einmal klumpt die Kultur.

Borstel-ID	klonaler Komplex	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
H37Rv		0,01	0,02	0,04	0,09	0,33	0,75	1,00	0,87	0,77	0,78	0,83	0,91	0,90	0,88
		0,02	0,02	0,05	0,08	0,30	0,72	0,89	0,93	0,73	0,74	0,88	0,84	0,86	0,89
		0,01	0,02	0,03	0,06	0,20	0,53	0,82	0,99	0,90	0,90	0,95	0,96	0,94	0,93
2280/07	1	0,02	0,02	0,04	0,05	0,13	0,32	0,58	0,81	1,08	1,27	1,37	1,35	1,32	1,51
		0,01	0,01	0,02	0,02	0,05	0,11	0,26	0,57	0,80	1,10	1,38	1,36	1,88	1,98
		0,01	0,02	0,02	0,04	0,08	0,23	0,48	0,68	0,93	1,09	1,16	1,20	1,19	1,17
1232/02	1	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	0,06	0,12	0,30	0,59	0,89	1,20	1,26	1,19
		0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,06	0,10	0,20	0,49	0,78	1,05	1,25
		0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,03	0,04	0,06	0,16	0,36	0,69	1,02	1,25	1,30
49/02	1	0,01	0,01	0,01	0,02	0,04	0,10	0,30	0,67	0,98	1,23	1,22	1,20	1,19	1,18
		0,01	0,01	0,01	0,01	0,04	0,10	0,27	0,61	0,93	1,19	1,29	1,25	1,22	1,21
		0,01	0,01	0,02	0,03	0,05	0,11	0,30	0,64	0,97	1,22	1,35	1,31	1,28	1,27
R10-0225	2	0,02	0,02	0,02	0,02	0,04	0,06	0,11	0,30	0,62	0,82	1,12	1,36	1,36	1,30
		0,01	0,03	0,03	0,03	0,05	0,07	0,12	0,30	0,61	0,84	1,16	1,36	1,33	1,31
		0,01	0,02	0,03	0,03	0,04	0,06	0,10	0,27	0,57	0,80	1,12	1,38	1,38	1,35
R04-0039	2	0,02	0,03	0,04	0,04	0,06	0,08	0,17	0,39	0,65	0,81	1,05	1,24	1,29	1,26
		0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,06	0,15	0,38	0,64	0,80	1,04	1,21	1,20	1,17
		0,01	0,03	0,03	0,04	0,06	0,11	0,25	0,56	0,78	0,98	1,23	1,39	1,35	1,34
4703/09	5	0,01	0,03	0,02	0,02	0,03	0,05	0,07	0,12	0,32	0,59	0,83	1,08	1,19	1,18
		0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	0,03	0,04	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01
		0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,04	0,07	0,19	0,49	0,79	1,10	1,29	1,24	1,23
178/03	5	0,02	0,01	0,03	0,05	0,18	0,48	0,91	1,27	1,27	1,23	1,27	1,22	1,21	
		0,01	0,02	0,01	0,02	0,06	0,15	0,40	0,78	1,14	1,13	1,11	1,09	1,08	1,08
		0,01	0,01	0,02	0,03	0,08	0,25	0,60	1,02	1,38	1,42	1,38	1,37	1,35	1,35
3454/10	5	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,06	0,18	0,42	0,55	0,64	0,77	0,90	0,98	1,09
		0,01	0,01	0,02	0,02	0,04	0,10	0,30	0,50	0,56	0,68	0,80	0,90	1,02	
		0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	0,06	0,18	0,40	0,93	0,50	0,51	0,51	0,51	0,50
9589/07	4	0,02	0,02	0,04	0,05	0,09	0,20	0,46	0,82	1,13	1,36	1,39	1,34	1,31	1,31
		0,02	0,03	0,03	0,04	0,09	0,20	0,49	0,83	1,23	1,16	1,15	1,14	1,13	1,14
		0,01	0,02	0,03	0,07	0,35	0,50	0,85	1,16	1,30	1,25	1,23	1,20	1,20	
4688/09	4	0,01	0,01	0,02	0,04	0,07	0,13	0,33	0,64	0,83	1,10	1,04	1,03	1,02	
		0,02	0,03	0,03	0,05	0,08	0,16	0,37	0,70	0,95	1,25	1,27	1,20	1,17	
		0,01	0,02	0,02	0,03	0,05	0,08	0,17	0,41	0,76	1,01	1,20	1,17	1,12	1,10
6265/09	4	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,04	0,06	0,14	0,34	0,68	1,00	1,20	1,24
		0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,07	0,19	0,40	0,74	1,08	1,27	1,24
		0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,06	0,10	0,29	0,65	0,89	1,18
8654/06	4	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,07	0,06	0,12	0,20	0,38	0,62	0,74	0,93
		0,02	0,01	0,01		0,02	0,03	0,06	0,16	0,38	0,61	0,81	1,00	1,10	1,06
		0,01	0,03	0,02		0,01	0,02	0,07	0,12	0,21	0,47	0,67	0,87	0,99	1,15
1339/07	4	0,01	0,02	0,03	0,05	0,09	0,27	0,63	0,89	1,13	1,22	1,19	1,17	1,16	
		0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,06	0,15	0,44	0,78	1,01	1,23	1,18	1,16	1,15
		0,01	0,02	0,02	0,04	0,06	0,11	0,31	0,65	0,89	1,06	1,13	1,12	1,09	1,07
3435/06	6	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,09	0,23	0,43	0,60	0,66	0,68	0,79
		0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,05	0,11	0,26	0,49	0,62	0,70	0,75	0,81	
		0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,05	0,12	0,32	0,54	0,60	0,67	0,71	0,78	
3936/02	6			0,01	0,01	0,02	0,06	0,15	0,34	0,53	0,58	0,65	0,68	0,73	
					0,02	0,03	0,06	0,16	0,36	0,54	0,54	0,63	0,65	0,73	
				0,01	0,01	0,02	0,03	0,05	0,16	0,29	0,51	0,58	0,65	0,69	0,75
4950/04	6	0,01	0,02	0,06	0,05	0,07	0,18	0,37	0,55	0,63	0,67	0,73	0,80	0,85	0,91
		0,02	0,02	0,03	0,03	0,07	0,13	0,29	0,55	0,62	0,69	0,77	0,86	0,92	0,99
		0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,11	0,21	0,51	0,63	0,70	0,78	0,88	0,93	1,00
5331/05	7	0,02	0,01	0,04	0,03	0,10	0,22	0,41	0,44	0,46	0,48	0,49	0,52	0,54	0,54
		0,01	0,01	0,02	0,03	0,07	0,23	0,42	0,44	0,47	0,49	0,51	0,53	0,54	0,55
			0,01	0,01	0,03	0,07	0,23	0,46	0,44	0,46	0,48	0,49	0,51	0,52	0,54
7253/02	7	0,01	0,01		0,01	0,04	0,14	0,35	0,41	0,45	0,46	0,48	0,50	0,50	0,52
			0,01		0,02	0,05	0,18	0,39	0,40	0,43	0,44	0,46	0,47	0,45	0,52
		0,01	0,01	0,01	0,02	0,05	0,18	0,39	0,41	0,44	0,44	0,46	0,48	0,48	0,49
57/02	7	0,01	0,02	0,01	0,02	0,03	0,05	0,09	0,23	0,45	0,58	0,64	0,73	0,77	0,85
		0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,04	0,06	0,16	0,32	0,52	0,58	0,66	0,70	0,75
		0,01	0,02		0,01	0,01	0,02	0,04	0,10	0,23	0,39	0,57	0,61	0,66	0,73
1314/04	3	0,02	0,02	0,02	0,03	0,04	0,07	0,09	0,13	0,33	0,58	0,85	1,18	1,33	1,27
		0,01	0,03	0,05	0,03	0,04	0,05	0,08	0,15	0,27	0,51	0,81	1,13	1,33	1,43
			0,01	0,01	0,01	0,02	0,04	0,05	0,07	0,14	0,29	0,59	0,89	1,11	1,28
8195/08	3	0,02	0,03	0,05	0,05	0,07	0,10	0,18	0,39	0,74	0,99	1,29	1,33	1,27	1,24
		0,02	0,03	0,04	0,05	0,07	0,09	0,16	0,37	0,69	0,95	1,25	1,31	1,22	1,17
		0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,10	0,16	0,35	0,67	0,93	1,24	1,38	1,27	1,22
5790/04	3	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	0,09	0,26	0,54	0,69	0,89	1,02	1,11	1,12
			0,01		0,01	0,02	0,03	0,07	0,22	0,47	0,64	0,84	1,03	1,15	1,21
			0,02	0,02	0,02	0,02	0,05	0,13	0,33	0,56	0,72	0,91	1,03	1,17	
7194/05	3	0,01	0,02	0,03	0,06	0,12	0,35	0,70	1,07	1,24	1,20	1,19	1,19	1,17	1,17
		0,01	0,02	0,04	0,07	0,13	0,38	0,73	1,07	1,17	1,13	1,12	1,11	1,10	1,10
		0,01	0,02	0,03	0,05	0,12	0,36	0,72	1,11	1,38	1,36	1,34	1,34	1,30	1,31

**Anhang 25: Identifizierte Subgruppen und SNP-Marker von W148 Beijing-Isolaten.** SNPs sind relativ zur H37Rv Genomposition angegeben.

Subgruppe	Gen	Aminosäuren- austausch	Position H37Rv	SNP	Anzahl Isolate	Mittlere Distanz [SNPs]
<b>A</b>	<i>ctpF</i>	R311R	2.241.091	C>T	56	21
	<i>Rv2219A</i>	R131R	2.487.024	C>T		
	<i>nuoJ</i>	V39I	3.521.253	G>A		
<b>A1</b>	<i>rpmI</i>	Q25R	1.853.001	A>G	26	17
<b>A1.1</b>	<i>dnaG</i>	S558G	2620781	T>C	7	12
<b>A1.2</b>	<i>Rv3395c</i>	N200D	3811039	T>C	6	14
	-	-	230.599	T>G		
<b>A1.3</b>	<i>PgsA3</i>	G52S	3.059.078	C>T	13	10
	<i>rpoC</i>	D485N	764.822	G>A		
	<i>Rv1066</i>	I83V	1.188.244	A>G		
	<i>cut3</i>	S141R	3.873.037	A>C		
	<i>Rv3466</i>	P34P	3.883.626	A>G		
	<i>embA</i>	-16 C>T	4.243.217	C>T		
<b>A2</b>	<i>pntA</i>	A325D	184.595	C>A	6	7
	<i>glmU</i>	V161A	1.137.579	A>G		
<b>A3</b>	<i>Rv0213c</i>	Y416H	254.705	A>G	5	18
	-	-	2.715.342	C>T		
<b>A4</b>	<i>atsA</i>	T762I	808.619	C>T	4	14
	<i>moaA2</i>	I80I	967.108	T>G		
	-	-	2.388.076	A>C		
<b>A5</b>	<i>dnaB</i>	E467E	61.796	G>A	4	1
	<i>Rv1118c</i>	R204R	1.242.220	G>T		
	<i>Rv1429</i>	A82A	1.605.123	C>T		
	<i>Rv2732c</i>	G59G	3.044.813	G>A		
	-	-	3.893.819	G>C		
	<i>fadE32</i>	L117R	4.004.640	T>G		
	<i>eccCa1</i>	A182V	4.347.025	C>T		
	<i>eccE2</i>	V493G	4.367.044	A>C		
<b>A6</b>	-	-	96.899	G>T	5	22
	<i>Rv0216</i>	V60V	259.092	G>A		
<b>B</b>	<i>ureD</i>	S58G	2.101.193	A>G	41	25
	<i>Rv3649</i>	G681G	4.090.823	C>T		
	<i>Rv3695</i>	V5G	4.137.219	T>G		
<b>B1</b>	<i>irtB</i>	A175T	1.516.145	G>A	7	14
	<i>mce3F</i>	D410A	2.216.485	A>C		
	-	-	2.573.793	A>C		
	<i>devS</i>	D469D	3.497.859	G>A		
	<i>idsB</i>	T143Lys	3.798.062	G>T		
	<i>vapC46</i>	A38G	3.799.523	G>C		
<b>B2</b>	<i>ctpL</i>	T1537T	125.931	T>C	5	5
	<i>Rv1812c</i>	V36A	2.055.253	A>G		
	<i>aroE</i>	T80A	2.871.778	T>C		
	<i>TB9.4</i>	L42L	3.585.826	G>A		
	<i>Rv3788</i>	G89R	4.235.044	G>C		
<b>B3</b>	<i>Rv2100</i>	L132L	2.358.782	C>T	8	22
<b>B4</b>	<i>Rv0149</i>	S308R	176.621	A>C	5	16
<b>B5</b>	<i>mce2D</i>	R296R	691.388	G>T	5	20
<b>B6</b>	-	-	712.497	G>A	3	13
	<i>Rv2658c</i>	E45E	2.979.554	T>C		
	-	-	3.381.100	G>A		
	<i>Rv3038c</i>	G62G	3.399.223	G>A		

Fortsetzung von Anhang 25

Subgruppe	Gen	Aminosäuren- austausch	Position H37Rv	SNP	Anzahl Isolate	Mittlere Distanz [SNPs]
<b>C</b>	<i>Rv0843</i>	A203T	939.996	T>G	8	20
	<i>dapC</i>	A230T	954.233	C>T		
	<i>Rv0907</i>	L426M	1.011.411	C>A		
	<i>atpG</i>	A15T	1.464.926	G>A		
	<i>mbtA</i>	G218G	2.676.589	C>T		
	<i>Rv2670c</i>	A5V	2.986.827	G>A		
	<i>ppgK</i>	V145V	3.017.292	A>G		
	<i>infB</i>	R735H	3.145.670	C>T		
	<i>Rv3050c</i>	R20Cys	3.411.900	G>A		
	<i>eccD1</i>	D131G	4.355.398	A>G		
	<i>espB</i>	Q255P	4.361.162	T>G		

## Anhang 26: Resistenz-vermittelnde Mutationen in einzelnen Subgruppen des MTBK-Beijing W148-Outbreaks.

Subgruppe	BorsteID	<i>katG</i>	<i>rpsL</i>	<i>rpoB</i>	<i>embB</i>	<i>embA</i>	<i>etha</i>	<i>pncA</i>	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>rrs</i>
A1.3	1628/00	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu							
A1.3	3637/99	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Glu504Asp			Val131Phe			
A1.3	7674/04	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu				Pro62Ser			
A1.3	918/03	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu							
A1.3	6941/03	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu							
A1.3	1015/08	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu							
A1.3	3111/03	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Val						
A1.3	6657/05	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu							
A1.3	3315/09	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu							
A1.3	9063/06	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu				Gln141Pro			
A1.3	7655/09	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Ile			Gly162Arg		Asp500Asn	
A1.3	5158/12	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu				Thr76Pro			
A1.3	7683/04	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu				Ser59Pro			
A1.2	4228/98	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Ile			Del			
A1.2	6818/04	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu							
A1.2	6912/04	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu							
A1.2	4104/04	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Val						
A1.2	6162/04	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Asp328Gly Leu402Val						
A1.2	6311/09	Ser315Thr	Lys43Arg								
A1.1	11122/03	Ser315Thr	Lys43Arg	Asp435Val			Cys294*				
A1.1	12448/03	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu							
A1.1	7389/04	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu Leu731Pro	Met306Ile				Thr76Pro		
A1.1	1325/07	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Val				Gly97Ser		
A1.1	6704/99	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Ile		Del		Ser164Pro		
A1.1	4897/05	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu Val496Ala	Met306Ile		Del		Tyr64Asp		
A1.1	8980/04	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu Val496Ala	Met306Ile		Del		Tyr64Asp		
A2	11290/07	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Ile						
A2	7169/00	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Ile						
A2	8911/00	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Ile						
A2	8273/06	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Ile						
A2	2644/06	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Ile						
A2	6197/05	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Ile						

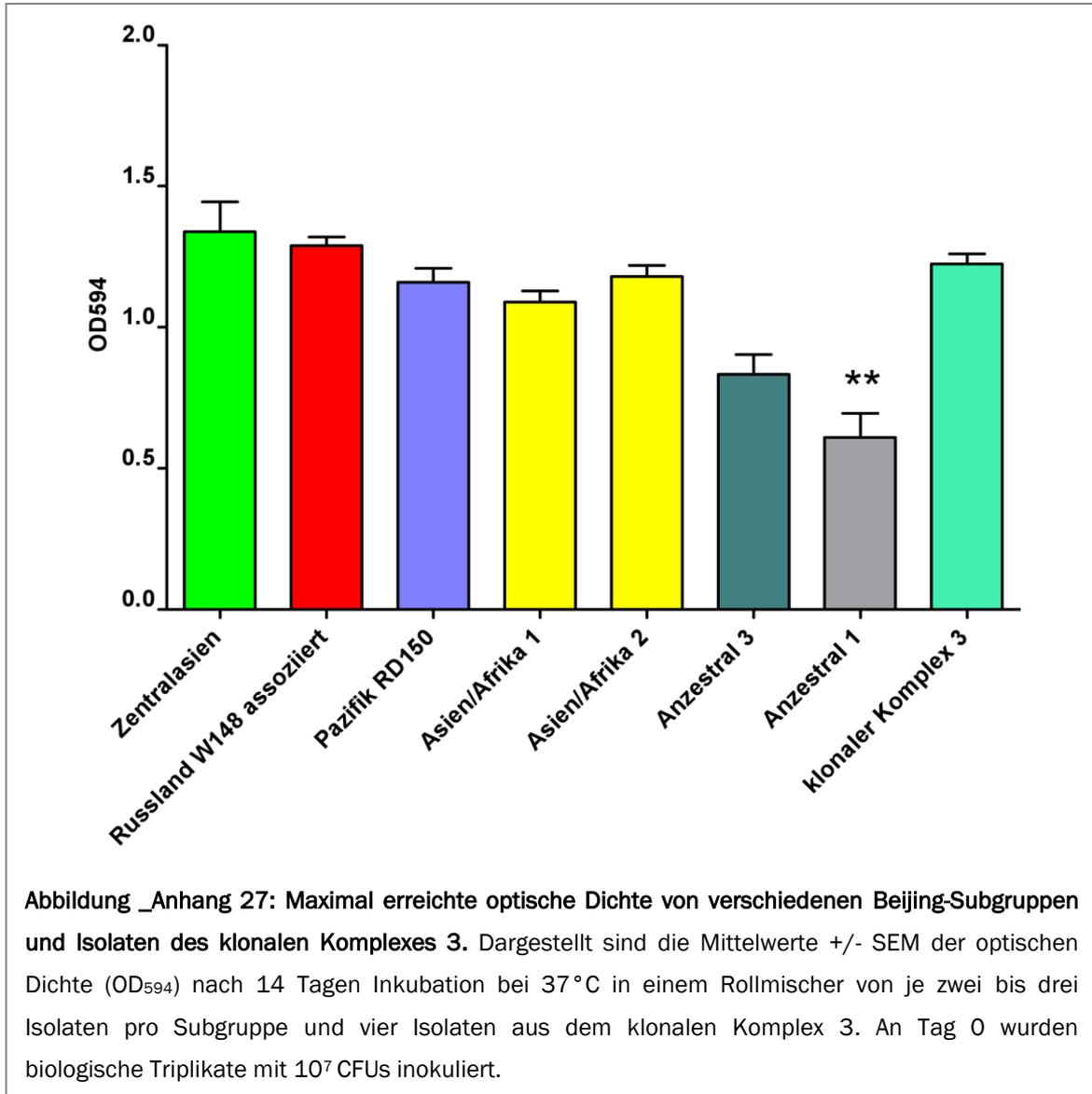
## Fortsetzung von Anhang 26

Subgruppe	BorsteHD	<i>katG</i>	<i>rpsL</i>	<i>rpoB</i>	<i>embB</i>	<i>embA</i>	<i>etha</i>	<i>pncA</i>	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>rrs</i>
A3	5529/99	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu			Del				
A3	819/07	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu			Del				
A3	7757/09	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Val		Del	Ala171Val			
A3	3967/11	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Val		Del	Ala171Val			
A3	4625/02	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Val		Del	Val93Met			
A4	1635/05	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu							
A4	7492/05	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Val			Leu27Gln			
A4	3842/05	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Val		Gln359*	Leu172Pro			
A4	4267/05	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Val		Gln359*	Leu172Pro			
A5	4940/09	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Asp328Gly			Leu27Pro			
A5	2483/03	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Asp328Gly			Leu27Pro			
A5	6449/04	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Asp328Gly			Leu27Pro			
A5	7086/05	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Asp328Gly			Leu27Pro			
A6	5510/00	Ser315Thr	Lys43Arg	His445Tyr	Met306Ile						
A6	1711/07	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Val						1401 a>g
A6	5219/04	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Ile		Del	Trp68Gly	Asp94Gly		
A6	6524/05	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Ile		Del	Trp68Gly			
A6	966/95	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Ile		Del	Thr135Pro			
B1	6461/99	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Asn296His		Del				
B1	5033/12	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Asn296His		Del				
B1	4952/06	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Asn296His		Del			Ile245Ser	
B1	10299/02	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Asn296His		Del				
B1	1879/10	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Asn296His		Del	Ser67Pro			
B1	5686/09	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Asn296His		Del	His71Arg	Asp94Ala		
B2	1319/99	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Ile		Leu440Pro				
B2	5962/00	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Ile		Leu440Pro				
B2	454/00	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Ile		Leu440Pro				
B2	5659/01	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Ile		Leu440Pro				
B2	3248/01	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Ile		Leu440Pro	Ser65Pro			
				Arg552Cys							

## Fortsetzung von Anhang 26

Subgruppe	BorsteID	<i>katG</i>	<i>rpsL</i>	<i>rpoB</i>	<i>embB</i>	<i>embA</i>	<i>etha</i>	<i>pncA</i>	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>rrs</i>
<b>B3</b>	12742/03	Ser315Thr	Lys43Arg	His445Asn Ile491Met	Met306Val		Ile305Ser				1401 a>g
<b>B3</b>	5473/01	Ser315Thr	Lys43Arg	His445Asn Ile491Met	Met306Val		Ile305Ser				1401 a>g
<b>B3</b>	3660/05	Ser315Thr	Lys43Arg	His445Asn Ile491Met	Met306Val		Ile305Ser	Del			1401 a>g
<b>B3</b>	8017/01	Ser315Thr	Lys43Arg	His445Asn Ile491Met	Met306Val		Ile305Ser	Del			1401 a>g
<b>B3</b>	4849/03	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu							
<b>B3</b>	919/06	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu Gly79Ser			Ser183Gly				
<b>B3</b>	1682/06	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu Gly79Ser			Ser183Gly				
<b>B3</b>	699/09	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu Gln980Lys	Met306Val		Ala187Val	Phe106Ile			
<b>B4</b>	856/98	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Ile		Arg441Pro	Gln10Pro			
<b>B4</b>	5712/95	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Ile		Arg441Pro				
<b>B4</b>	10191/03	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu His723Asp	Gly406Ala		Trp391*	Lys96Thr			1401 a>g
<b>B4</b>	2197/04	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu His723Asp	Gly406Ala		Trp391*	Lys96Thr			1401 a>g
<b>B4</b>	3684/08	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu His723Asp	Gly406Ala		Trp391*	Lys96Thr	Asp94Gly		1401 a>g
<b>B5</b>	12509/03	Ser315Thr	Lys43Arg	Asp435Val	Gly406Cys		Del				1401 a>g
<b>B5</b>	1744/01	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu							
<b>B5</b>	3280/05	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu							
<b>B5</b>	11103/09	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Val		Val202Gly	Leu85Pro			
<b>B5</b>	5467/07	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu		Gln497Arg	Trp167Arg	Tyr99*			
<b>B6</b>	4515/00	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Met306Val		Tyr461Cys				
<b>B6</b>	6164/08	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu			Tyr461Cys				
<b>B6</b>	3515/01	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu			Tyr461Cys				
<b>C</b>	10511/04	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Gly406Ala		Del	Ile31Ser			
<b>C</b>	6103/09	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu	Gly406Ala		Del	Ile31Ser			
<b>C</b>	9712/04	Ser315Thr	Lys43Arg	His445Ser Lys446Gln	Gly406Ala		Del	Ile31Ser			1401 a>g
<b>C</b>	8632/07	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu Arg827Leu	Gly406Ala		Del	Ile31Ser			1401 a>g
<b>C</b>	10714/01	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu Arg827Leu	Gly406Ala	Ala302Ala	Del	Ile31Ser			
<b>C</b>	4266/07	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu Arg827Leu	Met306Ile Gly406Ala	Ala302Ala	Del	Ile31Ser			1401 a>g
<b>C</b>	10033/02	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu Arg827Leu	Gly406Ala	Ala302Ala	Del +mshA Del	Ile31Ser			1401 a>g
<b>C</b>	8373/02	Ser315Thr	Lys43Arg	Ser450Leu Arg827Leu	Gly406Ala	Ala302Ala	Del +mshA Del	Ile31Ser			1401 a>g

Anhang 27: Vergleich der maximal erreichten optischen Dichte (OD<sub>594</sub>) nach 14 Tagen *in vitro* Kultivierung ausgewählter Beijing-Stämme.



## DANKSAGUNG

An dieser Stelle bedanke ich bei Herrn PD Dr. Stefan Niemann für die Vergabe dieses hoch interessanten Themas und die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Forschungsgruppe anfertigen zu können. Als „Doktorvater“ hat er durch seine hilfreichen Ratschläge, Anregungen und Ideen aber auch durch seine stete Bereitschaft für wissenschaftliche Diskussionen zum Fortschritt der Projekte und zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen. Besonders bedanke ich mich für die zahlreichen Forschungsreisen, die mir die Präsentation der Ergebnisse und die Entwicklung neuer Ideen ermöglichten.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Schaible für die Übernahme des Zweitgutachtens und bei Herrn Prof. Dr. Stefan Ehlers als Zweitbetreuer für die zahlreichen konstruktiven Gespräche und Kommentare bei der Erstellung der Doktorarbeit. Bei Dr. Norbert Reiling und Lisa Niwinski bedanke ich mich für die Unterstützung und Diskussion bei den Wachstumsexperimenten.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Kollegen aus der Forschungsgruppe Molekulare Mykobakteriologie für die hilfreichen wissenschaftlichen und manchmal darüber hinaus gehenden motivierenden Kommentare und Diskussionen. Speziell bei Tanja Ubben, Julia Zallet, Tanja Struve und Anja Lüdemann möchte ich mich für die Unterstützung im Labor bei den experimentellen Arbeiten bedanken. Alle Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe sind mir in dieser Zeit sehr ans Herz gewachsen.

Die Zusammenarbeit mit den zahlreichen Kooperationspartnern, welche ihre Typisierungs- und Resistenzergebnisse für diese Arbeit zur Verfügung gestellt haben, machten eine globale Populationsanalyse in diesem Umfang erst möglich und ich bedanke mich für ihre Unterstützung. Besonders die Kooperation mit Prof. Dr. Thierry Wirth vom Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris und Dr. Philip Supply vom Institut Pasteur, Lille haben maßgeblich zum Fortschritt dieser Arbeit beigetragen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die auf meinem Weg immer für mich da waren und mich jederzeit unterstützt haben.

## LEBENS LAUF

Matthias Merker  
Moltkestr. 15  
20253 Hamburg  
merker82@googlemail.com



### Persönliche Daten

---

geboren am 10.06. 1982 in Henstedt-Ulzburg, Schleswig-Holstein, ledig

### Ausbildung

---

04 / 2011 – z. Z.	Doktorarbeit: Phylogenie und Evolution von multiresistenten <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Komplex (MTBK) Stämmen des Beijing-Genotyps
10 / 2008 – 10 / 2010	Masterstudium: Angewandte und Molekulare Botanik (Uni Hamburg) mit dem Abschluss Master of Science
10 / 2005 – 09 / 2008	Bachelorstudium: Biologie (Uni Hamburg) mit dem Abschluss Bachelor of Science
04 / 2005 – 09 / 2005	Wartesemester
04 / 2003 – 03 / 2005	Bachelorstudium: Verfahrenstechnik (HAW Hamburg)
10 / 2002 – 03 / 2003	Bachelorstudium: Biotechnologie (Uni Lübeck)
10 / 2001 – 06 / 2002	Grundwehrdienst: Sanitätsdienst (Heide SH)
07 / 1992 – 06 / 2001	Elsensee-Gymnasium Quickborn

### Praktische Laborerfahrung

---

12 / 2010 – z. Z.	Praktikum und Doktorarbeit im Bereich „Molekulare Mykobakteriologie“ im Leibniz Forschungszentrum Borstel unter der Leitung von PD Dr. Stefan Niemann
01 / 2010 – 10 / 2010	Masterarbeit: „Untersuchungen zu genspezifischen und globalen Methylierungsprofilen in der frühen Embryonalentwicklung von Mais“ unter der Leitung von PD Dr. Stefan Scholten (Uni Hamburg)
01 / 2008 – 06 / 2008	Bachelorarbeit: „Untersuchungen zur RNAi-vermittelten Geninaktivierung in <i>Nicotiana tabaccum</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i> “ unter der Leitung von Dr. Dirk Becker (Uni Hamburg)
06 / 2007 – 12 / 2007	Berufspraktikum beim DNA Cloning Service (Hamburg), anschließend Studentische Aushilfe

### Auszeichnungen

---

Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) auf der Jahrestagung 2012 in Hamburg

Posterpreis des Wissenschaftlichen Beirats des Forschungszentrums Borstel zur Evaluierungsveranstaltung 2012

## PUBLIKATIONEN

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

- Merker M, Rüscher-Gerdes S, Blin C, Mokrousov I, Supply P, Niemann S, Wirth T. Evolutionary history and molecular epidemiology of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage: A global scale analysis. (Manuskriptentwurf)
- Feuerriegel S, Cox H, Merker M, Kohl TA, Borrell S, Gagneux S, Rüscher-Gerdes S, Niemann S. Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*: selection for the most successful. (Manuskript eingereicht)
- Merker M, Kohl TA, Roetzer A, Truebe L, Richter E, Rüscher-Gerdes S, Fattorini L, Oggioni MR, Cox H, Varaine F, Niemann S. Whole Genome Sequencing Reveals Complex Evolution Patterns of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strains in Patients. PLoS One. 2013 Dec 6;8(12):e82551. doi: 10.1371
- Tessema B, Beer J, Merker M, Emmrich F, Sack U, Rodloff AC, Niemann S. Molecular epidemiology and transmission dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in Northwest Ethiopia: new phylogenetic lineages found in Northwest Ethiopia. BMC Infect Dis. 2013 Mar 11;13:131. doi: 10.1186/1471-2334-13-131.
- Aleksic E, Merker M, Cox H, Reiher B, Sekawi Z, Hearps AC, Ryan CE, Lee AV, Goursaud R, Malau C, O'Connor J, Cherry CL, Niemann S, Crowe SM. First molecular epidemiology study of *Mycobacterium tuberculosis* in Kiribati. PLoS One. 2013;8(1):e55423

Zusätzlich wurden Inhalte dieser Arbeit auf folgenden Tagungen vorgestellt:

- ESM 2011, 32. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Mykobakteriologie, Lübeck. Microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* strains in tuberculosis patients. (Poster)
- DGHM 2011, 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Essen. Resistance related phylogeny and microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* complex clinical isolates. (Vortrag)
- FGMS 2011, Statusseminar "Molecular epidemiology and microbial evolution" der DGHM Sektion Microbial Systematics, Population Genetics and Infection, Würzburg. Insights into diversity and microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) clinical isolates of the Beijing lineage. (Vortrag)

- ESM 2012, 33. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Mykobakteriologie, Brasov. Phylogeny and microevolution of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) strains of the Beijing family. (Vortrag)
- TB-PAN-NET 2012, Beiratssitzung des Pan-European network for study and clinical management of drug resistant tuberculosis, Mailand. Phylogeny and microevolution of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) strains of the Beijing family. (Poster)
- Tuberculosis 2012, EMBO Konferenz. Biology, Pathogenesis, Intervention strategies, Paris. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing W-family strains shows microevolution and adaption of serial isolates under longitudinal multi drug treatment. (Poster)
- DGHM 2012, 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Hamburg. Phylogeny and microevolution of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) strains of the Beijing family. (Poster)
- LCI Symposium 2013, Infection Epidemiology, Hamburg. Phylogeny and Evolution of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains. (Vortrag)
- TB-PAN-NET 2012, Beiratssitzung des Pan-European network for study and clinical management of drug resistant tuberculosis, Florenz. Global population structure of the *M. tuberculosis* Beijing lineage. (Vortrag)
- ESM 2013, 34. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Mykobakteriologie, Florenz. Multidrug resistant tuberculosis epidemic in Swaziland: ongoing transmission of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. (Poster)
- DGHM 2013, 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Rostock. Multidrug resistant tuberculosis epidemic in Swaziland: ongoing transmission of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. (Poster)

## ERKLÄRUNG

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

Hamburg, den 27.01. 2014

---

Vorname, Nachname