
**Untersuchungen zur Signalwahrnehmung der
Sensor kinase BvgS des BvgAS-Zwei-Komponentensystems
aus *Bordetella bronchiseptica*
und
Struktur-Funktionsanalyse des Response Regulator-
Proteins BvgA aus *Bordetella holmesii***

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Aleksandra Horvat

aus Würzburg

Würzburg, 2007

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. R. Gross

Gutachter: Prof. Dr. R. Benz

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg vom Januar 2003 bis April 2006 unter Betreuung von Prof. Dr. R. Gross angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt wurde. Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Außer dem Titel Diplom-Biologin (Univ.) habe ich bislang keine anderen akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

.....

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Roy Gross für die Überlassung des interessanten Themas und seine ständige Gesprächsbereitschaft aber auch vor allem für sein Vertrauen und seine Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Werner Goebel danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie Herrn Prof. Dr. Roland Benz für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit.

Frau PD Dr. Dagmar Beier möchte ich dafür danken, dass sie für Fragen aller Art immer ein offenes Ohr hatte.

Ein herzliches Dankeschön an meine Laborkollegin Melanie Lechner für die entspannte Arbeitsatmosphäre im Labor, die schönen Gespräche und ihre kreativen Einfälle zu so mancher Doktorfeier.

Besonders bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern der AG Gross und AG Beier, ohne die sowohl die Arbeit als auch die Pausen nur halb so schön gewesen wären. Darunter im Besonderen Steffi Link für ihre Hilfsbereitschaft und den Satz: „Kaffee, um drei?!“, Jenni Pohlert und Karin Schmitt, die nettesten „Nachbarn“ auf dem Gang, Steffi Müller und Michael Pflock für das geduldige Einweisen in die Geheimnisse der Primer-Extension, Jenni Schär für ihre aufmunternden Besuche im Labor sowie Sascha Stoll und Christian Tritsch für die langersehnte männliche Unterstützung.

Ein Dank geht auch an die „Ehemaligen“ Doro Rogoll, Claudia Schemm und Anto Jiménez Pearson, die mir in den Anfängen immer helfend zur Seite standen und so manchen Abend unvergesslich machten.

Ein besonders liebes Dankeschön geht an Simone Janzen und Gabriele Gerlach, die mir in den Anfängen lehrreiche Laborkolleginnen waren und mit den Jahren zu wertvollen Freunden wurden. Simone möchte ich für ihre offene und herzliche Art, ihren herrlich trockenen Humor und ihre Hilfsbereitschaft auch außerhalb der Labormauern danken. Gaby (und auch Christoph) danke ich für die vielen schönen Stunden im „Centrale & Co“ und dafür, dass sie mir auch nach Verlassen des Labors immer unterstützend und konstruktiv zur Seite stand und mit ihren Ideen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Im Weiteren möchte ich mich natürlich auch bei allen MitarbeiterInnen des Institutes für eine angenehme Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Florian danke ich von Herzen, dass er mir liebevoll zur Seite stand.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Freunden und vor allem meiner Familie, die auch über die Grenzen Deutschlands hinaus immer Interesse zeigten.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern danken, die mich in all der Zeit immer vorbehaltlos unterstützt haben und mir durch ihr Vertrauen und ihre Geduld diese Arbeit ermöglichen.

Inhaltsverzeichnis

<u>A</u>	<u>Zusammenfassung</u>	1
<u>B</u>	<u>Einleitung</u>	5
1	Der Genus <i>Bordetella</i>	5
1.1	Die humanpathogenen Arten der Gattung <i>Bordetella</i>	6
1.1.1	Das <i>B. bronchiseptica</i> -Cluster und seine vergleichende Genomanalyse	6
1.1.2	Unterschiede der Wirtsspezifität innerhalb des <i>B. bronchiseptica</i> -Clusters	7
1.1.3	<i>Bordetella holmesii</i>	9
2	Die Virulenzfaktoren der Gattung <i>Bordetella</i>	10
2.1	Virulenzfaktoren des <i>B. bronchiseptica</i>-Clusters	10
2.2	Virulenzfaktoren der „neuen“ <i>Bordetella</i>-Arten	12
3	Regulation der Virulenzgen-Expression durch das BvgAS-Zwei-Komponentensystem	14
3.1	Phasenvariation und phänotypische Modulation	14
3.2	Das BvgAS-Zwei-Komponentensystem	14
3.3	Charakterisierung der <i>bvgAS</i>-Loci der „neuen“ <i>Bordetella</i>-Arten	18
3.4	Das BvgAS-Regulon des <i>B. bronchiseptica</i>-Clusters	19
3.4.1	Die <i>bvg</i> -aktivierten Gene; die Bvg ⁺ -Phase	19
3.4.2	Die <i>bvg</i> -reprimierten Gene, die Bvg ⁻ -Phase	22
3.4.3	Die Bvg ⁱ -Phase	23
3.4.4	<i>In vivo</i> Relevanz der einzelnen Bvg-Phasen	24
4	Signaltransduktion durch Zwei-Komponentensysteme	24
5	Zielsetzung der Arbeit	28
<u>C</u>	<u>Material</u>	29
1	Geräte	29
2	Bakterienstämme	30
3	Hefestämme	30
4	Vektoren und rekombinante Plasmide	31
5	Oligonukleotide	32
6	Verbrauchsmaterialien	33
6.1	Chemikalien	33
6.2	Enzyme	33
6.3	Sonstiges	33
7	Wachstumsmedien und Zusätze	34
7.1	Wachstumsmedien für Bakterien	34
7.1.1	Medienzusätze	35
7.2	Wachstumsmedien für Hefen	35
7.2.1	Medienzusätze	35
8	Molekulargewichtsmarker	36
8.1	Molekulargewichtsmarker für die Agarosegelelektrophorese	36
8.2	Molekulargewichtsmarker für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	36
<u>D</u>	<u>Methoden</u>	37
1	Molekularbiologische und genetische Techniken	37
1.1	Isolierung von DNA	37

1.1.1	Isolierung chromosomaler DNA	
1.1.2	Plasmidpräparation im analytischen Maßstab (Minipräparation)	37
1.1.3	Plasmidpräparation im analytischen Maßstab mittels GFX Micro Plasmid Prep Kit von Amersham Biosciences (Minipräparation)	38
1.1.4	Plasmidpräparation im präparativen Maßstab Nucleobond®-AX-Kit von Macherey & Nagel (Midipräparation)	38
1.2	Fällung von DNA	38
1.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	38
1.4	Enzymatische Modifikation von DNA	38
1.4.1	Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen	38
1.4.2	Ligation	39
1.4.3	Alkalische Phosphatase Reaktion von DNA-Fragmenten	39
1.5	Isolierung von RNA	39
1.5.1	Isolierung von RNA aus <i>Bordetella</i> -Stämmen	39
1.5.2	Konzentrationsbestimmung von RNA	40
1.6	Auftrennung, Analyse und Aufreinigung von DNA-Molekülen und RNA-Molekülen	40
1.6.1	Horizontale Agarosegelelektrophorese	40
1.6.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mittels QIAquick Gelextraktionskit (Qiagen)	40
1.6.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mittels eiskalter Phenolextraktion	41
1.7	Transformation von DNA	41
1.7.1	Transformation von DNA in CaCl ₂ -kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	41
1.7.1.1	Herstellung von CaCl ₂ -kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	41
1.7.1.2	Transformation	41
1.7.2	Transformation von DNA in elektrokompetente <i>E. coli</i> -Zellen	41
1.7.2.1	Herstellung von elektrokompetente <i>E. coli</i> -Zellen	41
1.7.2.2	Elektroporation	41
1.8	Anlegen von Glycerinkulturen	42
1.9	Konjugation und Allelaustausch	42
1.9.1	Allelaustausch	42
1.9.2	Durchführung der Konjugation	42
1.10	Die Polymerase-Ketten-Reaktion	42
1.10.1	Die PCR-Reaktion	42
1.10.2	Reinigung von PCR-Produkten über QIAquick-Säulchen (Qiagen)	43
1.11	DNA-Sequenzierung	43
1.11.1.	Automatische DNA-Sequenzierung mit dem CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit (P/N 608120) von Beckman Coulter	43
1.11.2	DNA-Sequenzierung mit $\alpha^{33}\text{P}$ -dATP	44
1.11	Primer-Extension	44
1.11.1	5'-Markierung des Oligonukleotid-Primers	44
1.11.2	Primer-Extension-Experiment	45
1.12	Ortspezifische Mutagenese mit Hilfe des „Quick change“-Kits von Stratagene	45
2	Methoden im Yeast Two-Hybrid System	46
2.1	Erstellen einer <i>Bordetella bronchiseptica</i> Genbank	46
2.1.1	Scheren chromosomaler <i>B. bronchiseptica</i> -DNA mittels Ultraschall	46
2.1.2	Auffüllen überhängender DNA-Enden	46
2.1.3	Phosphorylierung aufgefüllter DNA-Enden	47
2.2	Transformation in <i>S. cerevisiae</i> mit <u>geringer Effizienz</u> mittels Grow'n'Glow Fast & Easy Yeast Transformation Kit (MoBiTec)	47
2.3	Transformation in <i>S. cerevisiae</i> mit <u>hoher Effizienz</u> mittels YEASTMAKER™ Yeast Transformation System 2 (BD Bioscience)	47
2.4	Plasmidisolierung aus <i>S. cerevisiae</i> mittels Grow'n'Glow Yeast Plasmid Isolation Kit (MoBiTec)	47
2.5	β-Galaktosidase-Filter-Assay	47
2.6	Mating von <i>S. cerevisiae</i>	48

3	Proteinbiochemische Methoden	48
3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	48
3.2	Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure	49
3.3	Westernblot	49
3.4	Überproduktion von Proteinen mit dem IPTG-induzierbaren pQE30-Vektor (QIAexpress system)	50
3.5	Proteinreinigung	50
3.5.1	Zellaufschluss mittels French-Press	50
3.5.2	Zellaufschluss mittels <i>N</i> -laurylsarcosin (Sarkosyl) und Ultraschall	51
3.6	Proteinreinigung mittels Ni-NTA-Agarose (Affinitätschromatographie)	51
3.6.1	Reinigung von unlöslichen Proteinen über Ni-NTA-Agarose mittels der His-Trap TM -Säulen der <i>Äkta prime</i> (Amersham Pharmacia Biotech)	51
3.7	Proteinreinigung mittels Glutathion-Sepharose (Afinitätschromatographie)	52
3.7.1	Überproduktion von GST-Fusionsproteinen	52
3.7.2	Vorbereitung der Glutathion-Sepharose-Säule	52
3.7.3	Reinigung von Proteinen über die Glutathion-Sepharose-Säule	52
3.8	Bestimmung der Proteinkonzentration	53
3.9	<i>in vitro</i> Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen	53
3.9.1	GST-Pulldownassay	53
3.10	Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen	53
3.10.1	Gelretardations-Experiment	53
3.10.2	Radioaktive Markierung der DNA-Sonde	54
3.10.3	Bestimmung der spezifischen Aktivität	54
3.10.4	Bindungsstudien mit gereinigtem Protein	54
3.10.5	Elektrophoretische Auftrennung im nativen Polyacrylamidgel	55
3.10.6	Kompetitions-Experiment	55
3.11	<i>In vitro</i>-Phosphorylierungsassay (nach Bock, 2002)	55
3.11.1	Autophosphorylierung von Histidinkinasen und Phosphotransfer auf Response-Regulatoren	55
3.11.2	Bestimmung der kinetischen Verläufe der Phosphorylierungsreaktionen	56
<u>E</u>	<u>Ergebnisse</u>	57
1	Identifizierung von Interaktionspartnern der periplasmatischen-, der PAS- und der HPt-Domäne der Histidinkinase BvgS aus <i>B. bronchiseptica</i> im Yeast Two-Hybrid System	57
1.1	Einführung in die Funktionsweise des Yeast Two-Hybrid Systems	57
1.1.1	Konstruktion der „Köder“- Plasmide pGBT9-BvgS-PAS, pGBT9-BvgS-PP und pGBT9-BvgS-HPt	58
1.1.2	Konstruktion der <i>B. bronchiseptica</i> - Genbank im Vektor pGAD424	59
1.1.3	Suche nach Interaktionspartnern von BvgS-PAS, BvgS-PP und BvgS-HPt mit Hilfe des Yeast Two-Hybrid Systems	61
1.1.4	Ergebnisse des YTH-Screenings	62
1.1.5	Verifizierung der im YTH-System identifizierten Proteininteraktionen zwischen BvgS-PAS und BB0602 mittels GST-Pulldown-Assay	62
1.1.5.1	Konstruktion von pGEX-3X-BB2599, pGEX-3X-BB1905, pGEX-3X-BB0602 und Überexpression des entsprechenden GST-Fusionsproteins	63
1.1.5.2	Konstruktion von pQE30- <i>bvgS</i> -PAS und Überexpression des entsprechenden His ₆ -Fusionsproteins	64
1.1.5.3	Untersuchung der Protein-Interaktion von His ₆ -BvgS-PAS und GST-BB0602 im GST-Pulldown-Assay	64
2	Versuche zur funktionellen und strukturellen Konservierung der Response Regulatoren BvgA aus <i>B. holmesii</i> (BvgA_{BH}) und BvgA aus <i>B. pertussis</i> (BvgA_{BP})	66

2.1	Konstruktion von pQE30- <i>bvgA</i> _{fus} und Überexpression des entsprechenden hybriden Fusionsproteins His ₆ - <i>BvgA</i> _{fus}	68
2.2	Aufreinigung des Fusionsproteins His ₆ - <i>BvgA</i> _{fus}	69
2.3	Untersuchung der <i>in vitro</i> -DNA-Bindeeigenschaft des hybriden Response Regulators <i>BvgA</i> _{fus} an die <i>fhaB</i> -Promotorregion aus <i>B. pertussis</i>	69
2.4	Untersuchung der <i>in vitro</i> -Phosphorylierbarkeit des His ₆ - <i>BvgA</i> _{fus} -Fusionsproteins durch die Histidinkinase <i>BvgS</i> aus <i>B. pertussis</i>	71
2.5	Konstruktion und Charakterisierung des hybriden <i>B. pertussis</i> (BP) - Stammes BP 359 (pMMB208- <i>bvgA</i> _{BP} <i>bvgA</i> _{fus})	72
2.6	Versuche zur Charakterisierung der unterschiedlichen DNA-Bindeeigenschaften der Output-Domänen von <i>BvgA</i> _{BH} und <i>BvgA</i> _{fus} an die <i>fhaB</i> -Promotorsequenz aus <i>B. pertussis</i>	75
2.6.1	Ortspezifische Mutagenese zur Konstruktion des Response Regulators <i>BvgA</i> _{BH} *	76
2.6.2	Überexpression und Reinigung des Response Regulators <i>BvgA</i> _{BH} *	76
2.6.3	Untersuchung der <i>in vitro</i> -DNA-Bindeeigenschaft des Response Regulators <i>BvgA</i> _{BH} * an die <i>fhaB</i> -Promotorregion aus <i>B. pertussis</i>	77
2.6.4	Konstruktion und Charakterisierung des hybriden <i>B. pertussis</i> -Stammes (BP) BP 359 (pMMB208- <i>bvgA</i> _{BP} <i>bvgA</i> _{BH} *)	78
2.6.5	Analyse der <i>bvgA</i> _{BH} *-Transkription in BP 359 (pMMB208- <i>bvgA</i> _{BP} <i>bvgA</i> _{BH} *)	80
2.7	Vergleichende Analyse der Phosphorylierungseffizienz der His ₆ - <i>BvgA</i> _{BH} *- und His ₆ - <i>BvgA</i> _{fus} -Fusionsproteine durch die Histidin-Kinase <i>BvgS</i> aus <i>B. pertussis</i>	81

F Diskussion 83

1.	Signalwahrnehmung durch die unorthodoxe Histidin-Kinase <i>BvgS</i>	83
1.1	Identifizierung neuer Interaktionspartner der periplasmatischen, der PAS- und der HPT-Domäne von <i>BvgS</i> mittels des Yeast Two-Hybrid Systems	85
2.	Struktur-Funktionsanalyse des Response Regulators <i>BvgA</i> aus <i>B. holmesii</i>	91
2.1	Molekulare Charakterisierung der Response Regulatoren <i>BvgA</i> _{fus} und <i>BvgA</i> _{BH} *	93
2.1.1	Analyse der Phosphorylierungseffizienz der Response Regulatoren <i>BvgA</i> _{fus} und <i>BvgA</i> _{BH} *	95
2.1.2	Analyse der DNA-Bindeeigenschaften der Response Regulatoren <i>BvgA</i> _{fus} und <i>BvgA</i> _{BH} *	97
2.1.3	<i>in vivo</i> -Analyse zur Charakterisierung der transkriptionsaktivierenden Aktivität der Response Regulatoren <i>BvgA</i> _{fus} und <i>BvgA</i> _{BH} *	100

G Literaturverzeichnis 104

H Anhang 125

1	Abkürzungsverzeichnis	125
2	Lebenslauf	128
3	Publikationsliste	129
4	DNA- und Proteinsequenzen	130

A Zusammenfassung

Viele Bakterien können sich mit Hilfe von Zwei-Komponentensystemen an veränderte Umweltbedingungen, wie beispielsweise Temperaturschwankungen, modifizierten pH-Wert oder Veränderungen im Nährstoffangebot anpassen. Der Signalübermittlung folgt dann eine Vielzahl zellulärer Prozesse, die zur Adaption des Bakteriums an die neuen Lebensbedingungen führen und sich oftmals in der Regulation der Expression entsprechender Gene widerspiegelt. Die Signale werden mit Hilfe einer sensorischen Histidin-Kinase aufgenommen und durch einen Histidin-Asparat-Phosphotransfer auf einen Response Regulator weitergeleitet. Der Aufbau von Zwei-Komponentensystemen und deren Funktionsweise sind in den letzten Jahren gut charakterisiert worden. Allerdings sind in wenigen Fällen die Signale bekannt, die durch die Histidin-Kinase wahrgenommen werden, so dass im Bereich der Signalwahrnehmung und der *in vivo*-Relevanz der jeweiligen Signale noch viele Fragen offen bleiben.

Die Histidin-Kinase BvgS des BvgAS-Zwei-Komponentensystems gehört zu den unorthodoxen Histidin-Kinasen, die im Gegensatz zu den klassischen Sensorkinasen durch eine komplexere Domänen-Struktur gekennzeichnet ist. Schon seit längerem ist bekannt, dass BvgS durch verschiedene Umweltfaktoren modulierbar ist und niedrige Temperaturen oder die Anwesenheit von chemischen Substanzen, wie Sulfationen oder Nikotinsäure zu einer Inaktivierung des Proteins und somit zur Abschaltung des Systems führen. Zudem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Autophosphorylierungs-Aktivität der BvgS Histidin-Kinase nach Inkubation mit oxidiertem Ubichinon inhibiert wird (Bock & Gross, 2002). Bislang ist weitgehend unklar, welche Bedeutung die zusätzlichen Domänen, wie die periplasmatische-, PAS- bzw. HPt-Domäne für die Signalwahrnehmung besitzen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb nach Erstellung einer *B. bronchiseptica* spezifischen Genbank mit Hilfe des GAL4-Yeast Two-Hybrid (YTH) Systems nach Interaktionspartnern der einzelnen BvgS-Domänen gesucht. Nach dem Ausschluss von falsch-positiven Klonen und dem Durchlauf entsprechender Kontrollen konnten im YTH-System für die periplasmatische und die PAS-Domäne von BvgS insgesamt vier Interaktionspartner identifiziert werden. Für die HPt-Domäne konnte mit Hilfe des YTH-Systems kein möglicher Interaktionspartner gefunden werden. Als ein putativer Interaktionspartner der BvgS-PAS-Domäne wurde das BB0602-Protein identifiziert, das ein ATP-Bindeprotein darstellt, welches als Bestandteil eines ABC-Transport-System für den Transport von verzweigten Aminosäuren verantwortlich gemacht wird. Diese Interaktion konnte mittels eines GST-Pulldownassays bestätigt werden. Der biochemische Nachweis der übrigen identifizierten Protein-Interaktionen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erbracht werden. Die Ergebnisse des YTH-Screenings deuten darauf hin, dass die Aktivität der BvgS Histidin-Kinase und damit die Virulenzgenexpression durch die An- bzw. Abwesenheit von verzweigten Aminosäuren beeinflusst werden könnte. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Relevanz der Interaktion zwischen der PAS-Domäne und dem ATP-Bindeprotein BB0602 nicht näher charakterisiert werden, so dass in Zukunft unter anderem die Konstruktion einer *B. bronchiseptica* *bb0602*-Deletionsmutante (BB765 Δ *bb0602*) geplant ist, um somit mögliche Auswirkungen auf die Expression von *bvg*-abhängigen Genen zu beobachten.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit lag in der Struktur-Funktionsanalyse des Response Regulators BvgA aus *B. holmesii* (BvgA_{BH}). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass trotz der umfangreichen Sequenzkonservierung der BvgA-Proteine aus *B. holmesii* und *B. pertussis*, eine *B. pertussis* *bvgA*-Mutante nicht durch den *bvgA*-Lokus aus *B. holmesii* komplementiert werden konnte (Gerlach *et al.*, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein hybrider Response Regulator BvgA_{fus} konstruiert, der aus der Receiver- und Linker-Domäne des BvgA_{BH}-Proteins und der Output-Domäne von BvgA_{BP} zusammengesetzt ist. Voraussetzung hierfür

war die Kenntnis der einzelnen Domänengrenzen und die Sequenz des Linker-Bereiches des Response Regulators BvgA aus *B. pertussis* (BvgA_{BP}), welche durch limitierte Proteolyse und massenspektrometrische Methoden identifiziert wurden (Bantscheff *et al.*, 2000). Im Falle des hybriden Proteins konnte im Gegensatz zu BvgA_{BH} eine Bindung an BvgA_{BP}-abhängige Promotorsequenzen beobachtet werden. Zudem war BvgA_{fus} in der Lage, die Expression BvgA_{BP}-abhängiger Gene *in vivo* zu induzieren. Allerdings war es in seiner Phosphorylierungseffizienz im Vergleich zum wildtypischen Response Regulator-Protein aus *B. holmesii* eingeschränkt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die wenigen Abweichungen zwischen den Aminosäuresequenzen der Output-Domänen dafür verantwortlich sind, dass das BvgA_{BH}-Protein die Funktion von BvgA_{BP} *in vivo* und *in vitro* nicht übernehmen kann. So unterscheiden sich die Output-Domänen der Response Regulatoren aus *B. pertussis* und *B. holmesii* in zehn Aminosäureaustauschen, wobei davon vier Aminosäuren innerhalb des Helix-Turn-Helix-Motives verändert sind. Um zu untersuchen, ob die unterschiedlichen DNA-Binde- und transkriptionsaktivierenden Eigenschaften von BvgA_{BH} im Besonderen auf diese Aminosäureunterschiede zurückzuführen sind, wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese die Aminosäuresequenz innerhalb des Helix-Turn-Helix-Motives an die Sequenz aus *B. pertussis* angeglichen. Das resultierende Protein BvgA_{BH}* zeigte eine dem wildtypischen BvgA_{BH}-Protein ähnliche Phosphorylierungseffizienz, war aber nicht in der Lage, BvgA_{BP}-abhängige Zielsequenzen spezifisch zu erkennen bzw. die Funktion des BvgA_{BP}-Proteins *in vivo* zu ersetzen. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die wenigen Aminosäureunterschiede der Output-Domäne außerhalb der DNA-Binderegion zwar nicht im Zusammenhang mit der Phosphorylierungseffizienz stehen, jedoch die DNA-Bindeeigenschaften beeinflussen. Die fortschreitende Identifikation weiterer BvgA_{BH} regulierter Gene von *B. holmesii* und die Charakterisierung von BvgA_{BH}-Bindestellen wird eine nähere Untersuchung der funktionellen Unterschiede zwischen den orthologen BvgA-Proteinen aus *B. holmesii* und *B. pertussis* ermöglichen.

Summary

Many prokaryotes are able to adapt to changing environmental parameters including temperature, pH or concentrations of nutrients by mechanisms mediated by two-component systems. The signal transduction is followed by numerous cellular processes, which mediate bacterial adaptation to new growth conditions mainly, through changes in gene expression. Generally, environmental stimuli detected by two-component systems are sensed by a membrane-bound histidine-kinase protein and transferred through a histidine-aspartate phosphorelay to a corresponding response regulator. The structure of two-component systems and their principle mechanisms have been well characterized during the last years. On the other hand the nature of the environmental cue sensed by the histidine-kinase has been verified experimentally only in very few cases and so the knowledge about the sensing of the kinase and about the *in vivo*-relevance of the incoming signals still remains quite small.

The BvgS protein of the BvgAS two-component system belongs to the family of unorthodox histidine-kinases, which are characterized by a more complex domain-structure compared to the classical sensor proteins. Since a long time it is known that the activity of BvgS can be modulated by several external stimuli. At low temperature or in the presence of nicotinic acid or sulfate, the protein is inactivated *in vivo* and therefore the respective system is switched off under these conditions. Moreover, it has been shown that the incubation of BvgS with oxidized ubiquinone had an inhibitory effect on the autophosphorylation activity of the kinase (Bock & Gross, 2002). So far, the relevance for the signal perception of the additional BvgS-domains, like the periplasmic, the PAS- or the HPt-domain is still unclear. Therefore in this work a self-constructed *Bordetella bronchiseptica* specific gene bank was screened with the periplasmic, the PAS- and the HPt-Domain of BvgS for protein-interactions in the GAL4-yeast two-hybrid (YTH) system. All together four putative protein-interactions were found in the case of the periplasmic and the PAS domain after exclusion of false-positive clones and after going through corresponding controls, while on the other hand no protein interaction could be detected for the HPt domain. Among the detected putative protein interactions of the PAS domain the protein BB0602 was identified as an ATP binding protein of an ABC transport system for branched chain amino acids. This interaction could also be verified by GST-pull down assay. The biochemical proof for the other protein interactions still remains to be done. The results of the YTH screening indicate that the activity of BvgS and therefore the virulence gene expression might be influenced by the presence or absence of branched chain amino acids. Among others characterization of a *B. bronchiseptica* *bb0602* deletion mutant with respect to the possible effect on the expression of *bvg*-dependent genes will further elucidate the relevance of the detected protein interaction between the BvgS-PAS domain and the BB0602 protein.

Another aim of this work was the structural and functional characterization of the response regulator BvgA of *B. holmesii* (BvgA_{BH}). Recently, it was shown that despite extensive sequence conservation between the response regulator BvgA of *B. holmesii* and BvgA of *B. pertussis* (BvgA_{BP}), the BvgA_{BH} protein is not able to replace the function of the BvgA_{BP} protein *in vitro* and *in vivo* (Gerlach *et al.*, 2004). Therefore in this work a hybrid response regulator protein BvgA_{fus} was constructed, which contains the receiver and the linker domain of BvgA_{BH} and the output domain of BvgA_{BP}. A prerequisite for this experiment was the knowledge of domain borders and linker sequences of BvgA_{BP}, which have been identified by means of limited proteolysis in combination with mass spectrometric methods (Bantscheff *et al.*, 2000). In contrast to the BvgA_{BH} protein, the hybrid response regulator BvgA_{fus} showed binding to BvgA_{BP}-dependent promoter sequences. Additionally, BvgA_{fus} was able to induce the expression of BvgA_{BP}-dependent genes *in vivo*. But compared to the wild-type protein BvgA_{BH} the hybrid response regulator BvgA_{fus} was limited in its phosphorylation efficiency. These results indicate that the inability of BvgA_{BH} to complement BvgA_{BP} in *B. pertussis* is

due to the small number of sequence variations present in its output domain. The output domains of BvgA_{BH} and BvgA_{BP} differ in ten amino acids of which four amino acid substitutions are located in the helix-turn-helix motif (HTH). To investigate whether the different binding and transcription activating properties of BvgA_{BH} are due to the sequence variations in the HTH, the sequence was adjusted as compared to BvgA_{BP} by means of site directed mutagenesis. The resulting protein BvgA_{BH}* showed similar phosphorylation efficiency compared to the wild-type protein BvgA_{BH} but no specific binding to BvgA_{BP}-dependent promoter sequences and was not able to replace BvgA_{BP} functionally *in vivo*. This result indicates that the few additional amino acid differences outside of the HTH present in the output domain of BvgA_{BH} which do not interfere much with the phosphorylation efficiency of the protein influence its DNA binding properties. The identification of further BvgA_{BH} regulated genes of *B. holmesii* and the characterization of BvgA_{BH} binding sites will help to further clarify the functional differences between the orthologous BvgA proteins of *B. holmesii* and *B. pertussis*.

B Einleitung

1. Das Genus *Bordetella*

Das Genus *Bordetella* gehört wie die Gattungen *Achromobacter* und *Alcaligenes* zur Familie der *Alcaligenaceae*, in der sowohl Umweltkeime, als auch fakultativ und obligat pathogene Organismen zu finden sind (Gerlach *et al.*, 2001; von Wintzingerode *et al.*, 2001a). Die gegenwärtige Genusdefinition beschreibt die *Bordetella*-Arten als kleine, Gram-negative Kokkobazillen mit einer Länge von 0,5-2 µm, die einzeln oder paarweise, selten in kurzen Ketten vorliegen. Sie weisen mit der Ausnahme von *B. petrii* einen respiratorischen Stoffwechsel auf, der auf die Veratmung von Aminosäuren spezialisiert ist.

Zur Gattung *Bordetella* zählen nach heutigem Stand neun Arten. Hierzu gehören zum einen die sog. „klassischen“, human- bzw. säugetierpathogenen Arten *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica*. Die Erreger *B. avium*, *B. holmesii*, *B. hinzii*, *B. trematum*, *B. petrii* und *B. ansorpii* besitzen zum Teil tierpathogenes aber auch humanpathogenes Potential und werden als „neue“ *Bordetella*-Arten bezeichnet. Die Vertreter der „klassischen“ Arten *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* verursachen respiratorische Erkrankungen beim Menschen bzw. Säugetieren und werden unter 1.1 näher beschrieben. Mit Ausnahme von *B. holmesii* konnten die restlichen *Bordetella*-Arten bislang nicht aus dem respiratorischen Trakt des Menschen isoliert werden. So wurde *B. trematum* beim Menschen aktuell nur aus Wundinfektionen bzw. entzündlichen Erkrankungen des Gehörganges isoliert. Allerdings konnte dabei nicht geklärt werden, ob dieser Erreger Ursache der Erkrankung war, oder es sich hierbei lediglich um Sekundärinfektionen handelte (Vandamme *et al.*, 1996). *B. avium* konnte bis heute nur aus dem respiratorischen Trakt von verschiedenen Geflügelarten isoliert werden. Er wird für Bordetellosis bei Vögeln verantwortlich gemacht (Skeeles and Arp, 1997), wobei das klinische und histopathologische Krankheitsbild dem einer *B. bronchiseptica*- und *B. pertussis*-Infektion bei Säugern ähnelt (Gentry-Weeks *et al.*, 1988; Temple *et al.*, 1998). *B. hinzii* wurde vorwiegend als Kommensal aus dem respiratorischen Trakt von asymptomatischem Geflügel isoliert. In seltenen Fällen wurde dieser Keim auch aus Blutkulturen immunsupprimierter Patienten isoliert, die als Folge der Infektion an einer Sepsis erkrankten (Cookson *et al.*, 1994; Vandamme *et al.*, 1995; Kattar *et al.*, 2000). Zudem erfolgte die Isolierung von *B. hinzii* aus einem Patienten mit Cystischer Fibrose (Funke *et al.*, 1996). *B. petrii* stellt den bis heute einzigen Umweltkeim innerhalb des Genus *Bordetella* dar und wurde aus dem Flusssediment der Saale isoliert (von Wintzingerode *et al.*, 2001). Bis zu seiner Beschreibung nahm man an, dass die Vertreter dieser Gattung ausschließlich in enger Assoziation mit einem Wirtsorganismus vorkommen und auf einen aeroben Metabolismus beschränkt sind. Das Vermögen von *B. petrii* unter anaeroben Bedingungen durch Nitrat- oder Selenatreduktion zu wachsen, unterscheidet diese Art von den anderen, obligat aeroben Vertretern seiner Gattung. Eine erst kürzlich beschriebene Spezies innerhalb des Genus *Bordetella* stellt *B. ansorpii* dar. Dieser Erreger wurde aus dem eitrigen Sekret einer epidermalen Zyste einer immunsupprimierten Patientin isoliert und mittels 16S rRNA- und biochemischen Analysen dieser Gattung zugeordnet (Ko *et al.*, 2005). Abb. 1 zeigt einen phylogenetischen Stammbaum der Gattung *Bordetella*, der anhand eines Homologievergleiches der 16S RNA Gene erstellt wurde.

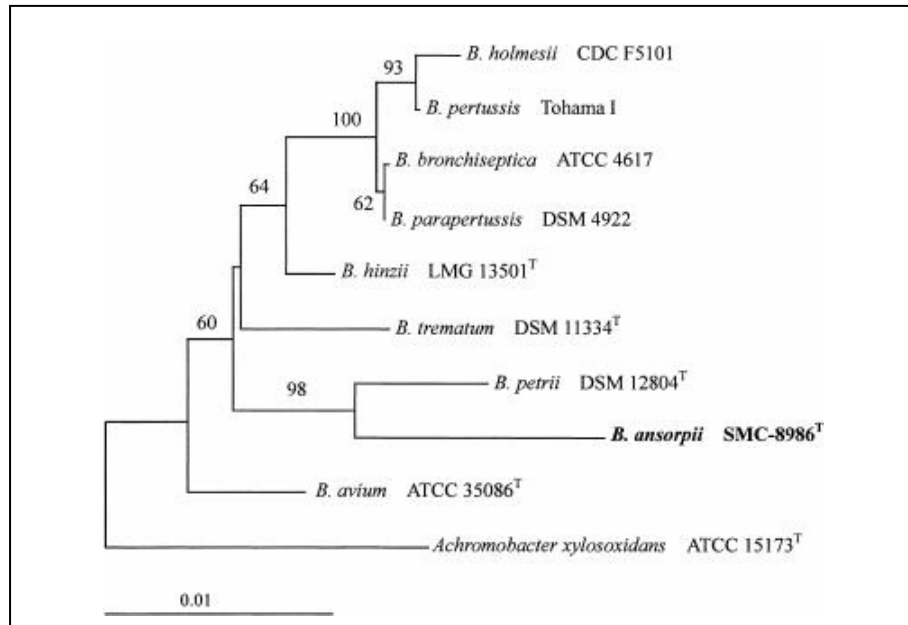


Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der Gattung *Bordetella* basierend auf den 16S rDNA Sequenzen (Ko *et al.*, 2005). Der Balken entspricht 10 % geschätzte Sequenzdivergenz.

1.1 Die humanpathogenen Arten der Gattung *Bordetella*

Im Folgenden werden vier Vertreter des Genus *Bordetella* näher beschrieben, die für respiratorische Erkrankungen beim Menschen verantwortlich gemacht werden.

1.1.1 Das *B. bronchiseptica*-Cluster und seine vergleichende Genomanalyse

B. pertussis, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* kolonisieren den respiratorischen Trakt von Säugetieren und verursachen Erkrankungen der oberen Atemwege. *B. pertussis* (Janda *et al.*, 1994) und *B. bronchiseptica* (Katzenstein *et al.*, 1984; Borrás *et al.*, 1991; Qureshi *et al.*, 1992; Bauwens *et al.*, 1992) konnten in wenigen Fällen auch aus Blutkulturen immunsupprimierter Patienten isoliert und so mit Bakteriämien assoziiert werden. Aufgrund zahlreicher Untersuchungen wie Sequenzanalysen der 16S- und 23S rDNA (Müller & Hildebrandt, 1993), DNA/RNA-Hybridisierungen (Dobrogosz *et al.*, 1979) und Multilokus-Enzym-Elektrophorese (van der Zee *et al.*, 1997) konnte eine sehr enge Verwandtschaft der genannten drei Arten gezeigt werden, so dass diese heute im Allgemeinen nicht als unterschiedliche Arten, sondern als Subspezies einer Art angesehen und deshalb als Mitglieder des *B. bronchiseptica*-Clusters bezeichnet werden (Kloos *et al.*, 1979).

Eindeutige Unterschiede zwischen den Vertretern des *B. bronchiseptica*-Clusters sind hinsichtlich ihrer Genomgröße zu verzeichnen (Tab.1). So ist das Genom von *B. pertussis* und *B. parapertussis* mit ca. 4,0 Mbp bzw. 4,8 Mbp deutlich kleiner als das von *B. bronchiseptica* mit 5,3 Mbp (Parkhill *et al.*, 2003). Zusätzlich besitzen *B. pertussis* 358 und *B. parapertussis* 220 Pseudogene, was auf einen vermutlich noch anhaltenden Prozess der Genomdegeneration schließen lässt (Parkhill *et al.*, 2003). Das Phänomen der Genomreduktion konnte auch bei anderen pathogenen Erregern, wie Rickettsien und Mycoplasmen (Andersson *et al.*, 1998), *Mycobacterium leprae* (Cole *et al.*, 2001), *Salmonella enterica* Serovar Typhi (Parkhill *et al.*, 2001) oder Yersinien (Mira *et al.*, 2001) beobachtet werden.

Die unter Abschnitt 2.1 einzeln aufgeführten Virulenzgene können zwar zum größten Teil bei allen drei Arten nachgewiesen werden, doch werden diese oftmals nur art- bzw. stammspezifisch exprimiert. Die Anpassung und Spezialisierung erfolgte im Falle der Vertreter des *B. bronchiseptica*-Clusters wahrscheinlich nicht durch einen für andere pathogene Erreger beschriebenen horizontalen Gentransfer von Virulenzgenclustern, sondern vielmehr durch einen Verlust an genetischer Information. Bei der Betrachtung der Tabelle 1 sind deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Arten zu erkennen. So kodiert *B. bronchiseptica* RB50 für 1191 Gene mehr als *B. pertussis* Tohama I, ein großer Unterschied, wenn man zusätzlich die 358 Pseudogene in *B. pertussis* Tohama I in Betracht zieht. Ein Vergleich der bei *B. pertussis* Tohama I und *B. parapertussis* 128222 vorkommenden IS-Elemente zeigt, dass sich diese beiden Subspezies in der Evolution vermutlich von zwei unabhängigen *B. bronchiseptica* Linien ableiten und dass humane *B. parapertussis*-Isolate eine sehr viel engere Verwandtschaft zu der tierpathogenen Art *B. bronchiseptica* besitzen als zu dem ebenfalls humanpathogenen Erreger *B. pertussis* (Parkhill *et al.*, 2003; Diavatopoulous *et al.*, 2005).

Tab. 1: Charakteristika des *Bordetella*-Genoms (Preston *et al.*, 2004)

Charakteristika	<i>B. pertussis</i> Tohama I	<i>B. parapertussis</i> 128222	<i>B. bronchiseptica</i> RB50
Genomgröße (bp)	4,086,186	4,773,551	5,338,400
Anzahl der Gene	3,816	4,404	5,007
Anzahl der Pseudogene	358	220	18
G+C-Gehalt	67,72	68,10	68,07
IS-Elemente (Kopienanzahl)	IS481(238) IS1002(6) IS1663(17)	IS1001(22) IS1002(90)	--

So kommt das IS-Element IS481 in großer Zahl ausschließlich bei *B. pertussis* Tohama I vor, wobei IS1001 nur im *B. parapertussis*-Stamm 128222 zu finden ist. Die Kolinearität zwischen den Genomen von *B. bronchiseptica* RB50 und *B. parapertussis* 128222 wird meist durch die IS-Elemente IS1001 und IS1002 unterbrochen, die eine Umordnung des Genoms verursachen. Man nimmt an, dass es durch Rekombination durch die IS481-Wiederholungen eine Reihe von Pseudogenen und Genomumordnungen aber auch Deletionen entstanden sind, die zur Genomreduktion bei *B. pertussis* führten. Durch Microarray-Studien konnte gezeigt werden, dass 114 Gene spezifisch für *B. pertussis* sind, wobei deren Funktion allerdings bislang nicht identifiziert werden konnte (Cummings *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu besitzt *B. bronchiseptica* 600 Gene, die den anderen beiden Arten fehlen. Einige dieser Gene sind am Transport und Metabolismus von Aminosäuren, anderen aromatischen Komponenten und Fettsäuren beteiligt. *In silico*-Analysen der Pseudogene aus *B. pertussis* und *B. parapertussis* ergaben, dass diese Gene bei Transportvorgängen, im Metabolismus und Ausbildung von Oberflächenstrukturen involviert sind (Parkhill *et al.*, 2003). Der Verlust von einer Vielzahl an alternativen Stoffwechselwegen zur Erschließung von unterschiedlichen Nahrungsquellen scheint demnach dafür verantwortlich zu sein, dass *B. pertussis* und *B. parapertussis* nicht mehr in der Lage sind, in der Umwelt außerhalb des Wirtes zu überleben.

1.1.2 Unterschiede der Wirtsspezifität innerhalb des *B. bronchiseptica*-Clusters

Trotz der engen Verwandtschaft können die Mitglieder des *B. bronchiseptica*-Clusters aufgrund einiger physiologischer Merkmale (Tab. 2) voneinander unterschieden werden, wobei der signifikanteste Unterschied wohl im Bereich der Wirtsspezifität liegt.

Der obligat humanpathogene Erreger *B. pertussis* verursacht Keuchhusten und wird direkt von Mensch zu Mensch mittels Tröpfcheninfektion übertragen. Ein anderer Wirtsorganismus oder ein Umweltreservoir sind für diesen Organismus bislang nicht bekannt. Kinder unter fünf Jahre sind am häufigsten von dieser Infektionskrankheit betroffen, wobei Säuglinge unter einem Jahr die größte Risikogruppe ausmachen (Cherry & Heininger, 1999; Hewlett, 1997). Trotz groß angelegten Impfkampagnen registriert man weltweit immer noch 30 bis 50 Millionen Pertussis-Infektionen pro Jahr, davon 90% in den Entwicklungsländern, wobei ca. 300.000 Menschen diesen zum Opfer fallen (WHO, 2005).

Das klinische Krankheitsbild variiert mit dem Alter und dem Immunstatus der Patienten. Eine typische Pertussis-Infektion lässt sich in drei Phasen gliedern: nach einer Inkubationszeit von 1-2 Wochen beginnt das katarrhalische Stadium, das durch Symptome ähnlich einer Erkältung, wie Schnupfen, mäßiges Fieber und uncharakteristischen Husten gekennzeichnet ist. In diesem Zeitraum ist eine Diagnose sehr schwierig und die Erkrankung bleibt im Umfeld des Patienten meist unerkant. Im darauf folgenden drei- bis sechswöchigen Konvulsivstadium kann der Pertussis-Erreger leicht diagnostiziert und behandelt werden. In diesem Zeitraum kommt es zu den typischen stakkatoartigen Hustenanfällen, die vermehrt in der Nacht auftreten. Am Ende des oft minutenlangen Hustenanfalls ziehen die Patienten die Luft hörbar ein, was nach dem für die Infektion typischen Keuchen klingt. Für junge Säuglinge ist die Erkrankung besonders gefährlich, da sie während der Keuchhustenattacken mit Atemaussetzern (Apnoe) zu kämpfen haben, was die Behandlung im Krankenhaus erfordert. In dem anschließend mehrere Wochen bis Monate andauernden Rekonvaleszenzstadium klingt der Husten langsam ab. Die Keuchhusten-Symptome können durch Antibiotika-Therapie gemildert werden, wenn damit während der katarrhalischen Phase oder während der ersten zwei Wochen nach Beginn des Hustens begonnen wird. Nach Erreichen des Konvulsivstadiums hat die Antibiotikagabe keinen großen Einfluss mehr auf den klinischen Verlauf. Sie ist dann nur noch zur Verminderung der Ansteckungsgefahr (Kontagiosität) des Erregers indiziert. Eine Impfung im frühen Säuglings- und Kindesalter gilt als beste Prävention vor einer Keuchhusten-Erkrankung. Zurzeit wird in den meisten Impfprogrammen der Einsatz des azellulären Impfstoffes DTP_a (Diphtherie/Tetanus/Pertussis_a) empfohlen, da seine Verträglichkeit besser ist, als die eines Ganzkeimimpfstoffes. Obwohl der Durchimpfungsgrad von mehr als 95% bei den Säuglingen in den Industrieländern eine markante Reduktion der Keuchhusten-Inzidenz bewirkt hat (Cherry, 1996), treten vermehrt bei älteren Kindern und Erwachsenen *B. pertussis*-Infektionen auf. Neben dem oben beschriebenen typischen Krankheitsbild des Keuchhustens kann man bei Jugendlichen und Erwachsenen auch einen milderen und abgeschwächten Verlauf dieser Krankheit beobachten (Cherry, 1999b), welcher auf die abnehmende Immunität der Betroffenen zurückzuführen ist, da die Schutzwirkung des Erstimpfstoffes auf sechs bis zehn Jahre begrenzt scheint. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass zwischen 12 und 32% der persistierenden Hustenerkrankungen auf eine Pertussis-Infektion zurückzuführen sind (Devill *et al.*, 1995). Erwachsene mit atypischen und deswegen meist nicht diagnostiziertem Keuchhusten stellen für Kleinkinder eine Ansteckungsgefahr dar (Cotter & Miller, 2000).

Ein weiterer Vertreter des *B. bronchiseptica*-Clusters, *B. parapertussis*, verursacht einen milderen dem Keuchhusten ähnlichen Krankheitsverlauf beim Menschen. Bis zu seiner Isolation aus dem Respirationstrakt von Schafen mit chronisch non-progressiver Pneumonie (Yuk *et al.*, 1998a) wurde dieser Erreger lange Zeit ähnlich wie *B. pertussis* als obligat humanpathogen angesehen. Die Human- bzw. Schafisolate stellen unterschiedliche Stämme mit verschiedener Wirtsadaptation dar, da es keine Hinweise auf eine Übertragung der Erreger zwischen Mensch und Schaf gibt (Porter *et al.*, 1994; Yuk *et al.*, 1998a, Diavatatopoulous *et al.*, 2006).

Im Gegensatz zur engen Wirtsspezifität von *B. pertussis* und *B. parapertussis*, konnte *B. bronchiseptica* aus einer Vielzahl von Säugetieren, wie Mäusen, Ratten, Meerschweinchen, Hasen, Hunden, Schweinen, etc. isoliert werden. Dort verursacht der Erreger z.B. Zwingerhusten beim Hund, atropische Rhinitis bei Schweinen oder „Schnupfen“ bei Hasen und Katzen (Cotter & DiRita, 2000). Beim Menschen kolonisiert *B. bronchiseptica* fast ausschließlich den respiratorischen Trakt von älteren oder immunsupprimierten Personen, die in engem Kontakt mit infizierten Haustieren stehen (Gueirard *et al.*, 1995; Woolfrey & Moody, 1991), wobei chronische und oftmals asymptomatisch verlaufende, respiratorische Erkrankungen die Folge sind (Gueirard *et al.*, 1995; Woolfrey & Moody, 1991; Decker *et al.*, 1991; Amador *et al.*, 1991). Im Gegensatz zu *B. pertussis* und *B. parapertussis* ist *B. bronchiseptica* demnach durch ein breites Wirtsspektrum gekennzeichnet. Die Persistenz in unterschiedlichen Wirtsorganismen setzt voraus, dass der Keim in der Lage ist, eine Reihe von verschiedenen Nährstoffquellen zu verwerten und mit einer Vielzahl von Oberflächenstrukturen zu interagieren. Dies könnte möglicherweise durch das große Genrepertoire von *B. bronchiseptica* gewährleistet werden, welches wahrscheinlich ebenfalls dafür verantwortlich ist, dass dieser Keim in der Lage ist, in der Umwelt außerhalb des Wirtes zu überleben. *B. bronchiseptica* kodiert beispielsweise für mehrere TonB-abhängige Rezeptoren auf der äußeren Membran, die unter anderem für die Eisenaufnahme verantwortlich sind. Die entsprechenden Gene oder ihre zugehörigen Regulatoren sind in *B. pertussis* oder *B. parapertussis* mutiert oder deletiert. Eine ähnliche Tendenz lässt sich auch im Hinblick auf die für die Adhäsion wichtigen Moleküle, beispielsweise dem BrkA (Fernandez & Weiss, 1994), dem trachealen Kolonisierungsfaktor THF (Finn & Stevens, 1995a) und dem filamentösen Hämagglutinin FHA (siehe Abschnitt 3.1) (Parkhill *et al.*, 2003) erkennen. Durch die fortschreitende Genomreduktion ist anzunehmen, dass *B. pertussis* und *B. parapertussis* ihre Fähigkeit verloren haben, ein breites Wirtsspektrum zu besiedeln und in der Umwelt zu überleben (Parkhill *et al.*, 2003; Preston *et al.*, 2004). Andererseits spiegelt die Genomreduktion auch die Adaptation von *B. pertussis* an seinen einzigen Wirt wider. Man geht davon aus, dass der Verlust von Oberflächenstrukturen, wie Flagellen oder Polysaccharide wahrscheinlich die Virulenzeigenschaften von *B. pertussis* (und in abgeschwächter Form auch von *B. parapertussis*) positiv beeinflusst hat, da dadurch Angriffspunkte für eine humane Immunantwort reduziert werden (Parkhill *et al.*, 2003).

1.1.3 *Bordetella holmesii*

Die Isolation von *B. holmesii* gelang in den ersten Jahren nach seiner Erstbeschreibung ausschließlich aus Blutkulturen immunsupprimierter Patienten, die an einer Sepsis erkrankt waren (Weyant *et al.*, 1995; Lindquist *et al.*, 1995; Morris & Meyers 1998; Tang *et al.*, 1998; Shepard *et al.*, 2004). Aus diesem Grund nahm man an, dass dieser Erreger nicht in der Lage sei, den respiratorischen Trakt des Menschen zu besiedeln. Im Jahr 1998 gelang jedoch seine Isolation aus dem Sputum einer Patientin mit Atemwegsbeschwerden (Tang *et al.*, 1998) sowie aus dem Nasenrachenraum von insgesamt 31 Personen mit dem Keuchhusten ähnlichen Symptomen, wobei in diesen Fällen eine Koinfektion mit *B. pertussis* ausgeschlossen werden konnte (Yhi *et al.*, 1999). Durch einige physiologische Merkmale wie z.B. seine Cephalexinsensitivität und seine fehlende β -Hämolyse kann *B. holmesii* von den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters unterschieden werden (Tab. 2). Aufgrund der fehlenden Oxidase-Aktivität lässt sich *B. holmesii* zudem von *B. pertussis* und *B. bronchiseptica*, aufgrund seiner fehlenden Urease-Aktivität von *B. parapertussis* abgrenzen. Die Verwendung von Methicillin-haltigen BG-Blutplatten ermöglichte das Wachstum und somit die Isolation von *B. holmesii* aus den Patientenproben, da dieses Antibiotikum im Gegensatz zu dem sonst verwendeten Cephalexin keinen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum des Erregers

aufzeigt. Cephalalexin-haltige Selektionsmedien wurden bis dahin in der Regel für den Nachweis von *Bordetella* spp. verwendet, was auch eine Erklärung dafür liefern könnte, warum dieser Keim in der Regel nicht im respiratorischen Trakt des Menschen nachgewiesen werden konnte (Mazengia *et al.*, 2000).

physiologisches Merkmal	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. holmesii</i>
Wachstum auf McConkey Agar:	-	+	+	+
Oxidase-Aktivität:	+	-	+	-
Urease-Aktivität:	-	+	+	-
Beweglichkeit:	-	-	+	-
braune Pigmentierung:	-	+	-	+
β-Hämolyse:	+	+	+	-
Cephalalexinresistenz:	+	+	+	-
Methicillinresistenz:	+	+	+	+
Oxacillinresistenz:	+	+	+	+

Tabelle 2: Physiologische Merkmale zur Unterscheidung einzelner *Bordetella*-Arten (modifiziert nach Weyant *et al.*, 1995; Mazengia *et al.*, 2000).

Die phylogenetische Zuordnung von *B. holmesii* ist bislang noch unklar. Aufgrund von 16S rDNA-Sequenzvergleichen wurde *B. holmesii* eine Stellung innerhalb der Vertreter des *B. bronchiseptica*-Clusters zugeordnet. Der Vergleich anderer phylogenetischer Marker, wie die Sequenzierung von Haushaltsgenen, die Charakterisierung des *bvgAS*-Lokus von *B. holmesii* (siehe 3.2) und die Analyse der zellulären Fettsäuren, jedoch zeigte eine eher engere Verwandtschaft von *B. holmesii* zu Vertretern der „neuen“ Arten wie *B. avium* bzw. *B. hinzii* (Gerlach *et al.*, 2004; Diavatopoulos *et al.*, 2006). Kürzlich konnte durch Genom-Hybridisierungs-Analysen eine stark konservierte, ca. 66 kb große genomische Region identifiziert werden, die für eine „Eisenaufnahme-Insel“ IUI (**iron uptake island**) kodiert und durch horizontalen Gentransfer von *B. pertussis* auf *B. holmesii* übertragen wurde. Diese Region enthält unter anderem einen eisenregulierten Locus, der für die Biosynthese, Export und Aufnahme des Siderophors Alcaligin kodiert. Die Aufnahme der IUI könnte *B. holmesii* mit einem sehr effizienten Eisenaufnahmesystem ausgestattet haben, was möglicherweise zur Adaptation an den menschlichen Wirt beigetragen hat (Diavatopoulos *et al.*, 2006). Zudem wird postuliert, dass die Gene der 16S rDNA ebenfalls durch horizontalen Gentransfer zwischen *B. pertussis* und *B. holmesii* übertragen wurden, was ihre hohe Sequenzkonservierung erklären würde (Diavatopoulos *et al.*, 2006).

2. Die Virulenzfaktoren der Gattung *Bordetella*

Für eine erfolgreiche Kolonisierung des oberen Respirationstraktes benötigen die Vertreter des *B. bronchiseptica*-Clusters die im Folgenden näher beschriebenen Virulenzfaktoren.

2.1 Virulenzfaktoren des *B. bronchiseptica*-Clusters

Die Virulenzfaktoren der „klassischen“ Bordetellen sind für eine erfolgreiche Besiedelung des oberen respiratorischen Traktes erforderlich (Gross *et al.*, 1993; Mooi *et al.*, 1992; Weiss *et al.*, 1984; Weiss & Goodwin, 1989). Der erste Schritt im Infektionszyklus von *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* besteht in der Kolonisierung der oberen Atemwege des

Wirtes, was durch die spezifische Adhäsion an zilientragende Epithelzellen vermittelt wird. Das Hauptadhäsion stellt dabei das filamentöse Hämagglutinin (FhaB) dar, das sowohl an der Zellwand assoziiert als auch im Überstand lokalisiert werden kann (Arico *et al.*, 1993; Makohv *et al.*, 1994). Das 220 kDa große FHA-Protein geht aus einem 367 kDa Vorläuferprotein durch Prozessierung an der Zelloberfläche mittels der SphB1-Protease hervor (Coutte *et al.*, 2001). Es wird Sec-abhängig in das Periplasma transportiert (Chevalier *et al.*, 2004), dort mittels des spezifischen Transporters FhaC durch die äußere Membran transloziert und mit dem C-terminalen Ende an der Bakterienoberfläche verankert (Domenighini *et al.*, 1990; Lochter *et al.*, 1993). Es besitzt mehrere Bindemotive am N-terminalen Ende, die eine Bindung an eukaryotische Zellen ermöglichen. Hierzu gehört das RGD-Motiv, welches die Bindung an Monocyten, Makrophagen und andere Leukocyten ermöglicht. Zudem besitzt das FhaB eine Kohlenhydrat-Erkennungssequenz, welche die Adhäsion an zilientragende Zellen des oberen respiratorischen Traktes und Makrophagen vermittelt (Tuomanen *et al.*, 1988; Relman *et al.*, 1989, 1990; Coutte *et al.*, 2003), sowie eine Heparinbindestelle, die für die Bindung an nichtzilientragende Zellen oder für die Interaktion mit der extrazellulären Matrix verantwortlich ist (Sato *et al.*, 1981; Urisu *et al.*, 1986). Das N-terminale Ende von FhaB kann allerdings auch von der Bakterienoberfläche abgespalten werden (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990), was für die Verbreitung der Bakterien innerhalb des Wirtsorganismus bzw. auf einen Folgewirt erforderlich ist (Menozzi *et al.*, 1994). Zusätzlich besitzt das filamentöse Hämagglutinin eine Funktion als „Brückenadhäsion“, da es die Anlagerung von anderen Mikroorganismen an das Zilienepithel erleichtert, wodurch schwere Sekundärinfektionen ausgelöst werden können (Tuomanen, 1986).

Andere für die Adhäsion und Kolonisierung notwendige Faktoren sind hauptsächlich in der äußeren Membran lokalisiert und gehören überwiegend zu der Gruppe der Autotransporterproteine. Hierzu zählen unter anderem das Pertaktin (PRN) (Leininger *et al.*, 1991; Roberts *et al.*, 1991; Emsley *et al.*, 1996; Everest *et al.*, 1996), der tracheale Kolonisierungsfaktor Tcf (Finn *et al.*, 1995a), der Serumresistenz Locus *brk* (*bordetella* resistance to killing) (Fernandez & Weiss, 1998) und Vag8 (Finn *et al.*, 1998), welche alle ein oder mehrere RGD-Motive aufweisen. Daneben produzieren die klassischen *Bordetella*-Arten mehrere sero-spezifische Fimbrien (Fim2, Fim3, FimA, FimN und FimX), die zusätzlich an der Kolonisierung der Epithelien des Respirationstraktes beteiligt sind (Geuijen *et al.*, 1997; Mattoo *et al.*, 2000).

Nach der Adhäsion an die Wirtszellen produzieren die Mitglieder des *B. bronchiseptica*-Clusters eine Reihe von eng verwandten Toxinen, die ihre Funktion vor allem in der Schwächung der Abwehrmechanismen des Wirtes ausüben. Hierzu zählt unter anderem das Calmodulin-abhängige Adenylat-Cyclase-Toxin (CYA), das sowohl cAMP synthetisiert als auch porenbildende Eigenschaft besitzt (Ladant & Ullmann, 1999). Dieses bifunktionale Toxin besitzt sowohl hämolytische als auch cAMP-synthetisierende Aktivität (Glaser *et al.*, 1988) und ermöglicht dem Bakterium, einer Immunantwort des Wirtes entgegenzuwirken, indem es zum Beispiel die Phagozytose durch humane Neutrophile verhindert (Weingart & Weiss, 2000) und die Apoptose phagozytischer Zellen einleiten kann (Gueirard *et al.*, 1998; Khelef *et al.*, 1992). Kürzlich konnte ebenfalls gezeigt werden, dass CYA einen Einfluss auf FHA während der Anlagerung an Zielzellen ausübt, indem es die adhäsiven Eigenschaften von FHA verstärkt und die durch die Heparinbindestelle vermittelte Wirkung modifiziert (Perez Vidakovics *et al.*, 2006).

Das Dermonekrotische-Toxin (DNT) wurde bislang nur im Cytosol der Bordetellen nachgewiesen. Es verursacht Hautläsionen und besitzt eine vasokonstriktive Wirkung (Endoh *et al.*, 1990). Durch Desaminierung von Gln-63 des GTP-bindenden Rho-Proteins stimuliert DNT die Bildung von Aktin-Stress-Fasern, was letztendlich zu morphologischen Veränderungen z.B. in Osteoplasten-ähnlichen Zellen führt (Horiguchi *et al.*, 1997; Schmidt

et al., 1999). Zudem besitzt es eine Transglutaminase-Aktivität in Bezug auf Rho-GTPasen. Seine Bedeutung für die Pathogenese ist noch nicht bekannt.

Das tracheale Cytotoxin (TCT), ein Disaccharid-Tetrapeptid, ist ein Bestandteil aus dem bakteriellen Peptidoglycan, das während des normalen Zellwachstums in das Medium abgegeben wird. Es wirkt ergänzend zum bakteriellen Lipopolysaccharid, indem es die Bildung von Interleukin-1 α stimuliert, was letztendlich die verstärkte Produktion von Stickstoffmonooxid (NO) zur Folge hat (Heiss *et al.*, 1994; Flak *et al.*, 2000). NO ist aufgrund seines cytotoxischen Effekts gegenüber zilienträgenden Zellen des oberen Respirationstraktes möglicherweise für die krampfartigen Hustenanfälle verantwortlich (Luker *et al.*, 1995).

Das Pertussis-Toxin (PTX), das nur von der obligat humanpathogenen Art *B. pertussis* synthetisiert wird, gehört zu der Familie der AB-Toxine und ist aus fünf nicht kovalent verbundenen Untereinheiten (S1-S5) aufgebaut (Tamura *et al.*, 1982a). Die PTX-Sekretion erfolgt über den Sec-abhängigen Transportweg durch die innere Membran und anschließend über ein TypIV-Sekretionssystem durch die äußere Membran (Farizo *et al.*, 2000). Es beeinträchtigt den cAMP-Spiegel der eukaryotischen Zelle, indem es durch seine ADP-Ribosyltransferaseaktivität regulatorische G-Proteine modifiziert. Diese Veränderung der G-Proteine führt über eine massive und unkontrollierte Freisetzung von Botenstoffen wie cAMP letztendlich zu einer Beeinträchtigung von wichtigen Signalkaskaden in der Wirtszelle (Katada *et al.*, 1986). Zudem besitzt PTX eine schwächende Eigenschaft gegenüber bestimmten Zellen des wirtseigenen Immunsystems, und scheint somit für die wirtsspezifische Immunabwehr eine wichtige Rolle zu spielen (Weiss, 1997). Interessanterweise wird das PTX von *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* nicht exprimiert, obwohl die entsprechenden Gene in der Genomsequenz vorhanden sind. Diese können aber aufgrund von Mutationen im Promotorbereich nicht mehr abgelesen werden und liegen deshalb als stille Pseudogene vor (Gross & Rappuoli, 1988; Hewlett *et al.*, 1995).

Neben dem PTX gibt es noch weitere Virulenzfaktoren, die zwar von allen Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters codiert, nicht aber von allen exprimiert werden. So wird der Virulenzfaktor TcfA ebenso wie PTX nur von *B. pertussis* produziert, nicht aber von *B. parapertussis* oder *B. bronchiseptica* (Finn *et al.*, 1995a). Im Gegensatz dazu ist nur *B. bronchiseptica* beweglich und exprimiert Flagellen-Gene, die auch in *B. pertussis* und *B. parapertussis* im Genom zu finden sind (Akerley *et al.*, 1993). Im Weiteren weisen *B. bronchiseptica*-Stämme ein TypIII-Sekretionssystem auf, welches für die im Labor verwendeten *B. pertussis*-Stämmen nicht nachgewiesen werden konnte. Dieses TypIII-Sekretionssystem ist für die Aggregation des eukaryontischen Transkriptionsfaktors NF- κ B im Cytosol von infizierten Epithelzellen und für die Modulation der Immunantwort des Wirtes verantwortlich (Yuk *et al.*, 2000).

2.2 Virulenzfaktoren der „neuen“ *Bordetella*-Arten

Über die Virulenzfaktoren der „neuen“ *Bordetella*-Arten ist noch relativ wenig bekannt. Für *B. avium* konnte schon seit längerem eine dermonekrotische und hämagglutinierende Aktivität, sowie die Produktion eines trachealen Cytotoxins nachgewiesen werden (Gentry-Weeks *et al.*, 1988; Temple *et al.*, 1998). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass *B. avium* orthologe Gene zu *bvgA*, *bvgS*, *fhaB*, *fhaC* und *fimC* besitzt. Die Inaktivierung dieser Gene führte zu einem Verlust der Virulenzeigenschaften im Tiermodell (Spears *et al.*, 2003).

Die Identifizierung der Genomsequenz von *B. avium* 197N ermöglichte den Nachweis weiterer putativer Virulenzfaktoren in dieser Art (Sebahia *et al.*, 2006). So wurden neben *fhaL* und *fhaS* weitere sechs neue Gene identifiziert, von denen vier für FHA-ähnliche Proteine kodieren, wohingegen die beiden anderen Pseudogene darstellen. Weiterhin konnten zwei Adhäsion-ähnliche Proteine identifiziert werden, die Adhäsionsproteinen aus *E. coli* und

S. aureus ähneln. Eine mögliche Beteiligung dieser identifizierten Gene an der Virulenz von *B. avium* ist noch unbekannt.

Im Zuge der Genomanalyse von *B. petrii* (<https://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/gendb>) konnten mehrere Gene gefunden werden, die homolog zu bekannten Virulenzfaktoren der „klassischen“ Bordetellen sind. Neben mehreren Genloci, die möglicherweise für die Fimbrienbiosynthese verantwortlich sind, konnten auch *fhaB*, *fhaC*, *brk*, *fim* und *bvgAS* verwandte Faktoren identifiziert werden (Roy Gross, persönliche Mitteilung).

Auch im Falle von *B. holmesii* konnten Gene identifiziert werden, die Homologien zu bekannten Virulenzfaktoren aufzeigen. So konnte kürzlich eine dem BvgAS-System (siehe Abschnitt 5) homologe Gensequenz (Gerlach *et al.*, 2004) und ein dem *fhaB* verwandter Faktor (Stefanie Link, persönliche Mitteilung) identifiziert werden. Die Tabelle 3 zeigt zusammenfassend die bekannten Virulenzfaktoren der Gattung *Bordetella*.

Tab. 3: Virulenzfaktoren einzelner *Bordetella*-Arten.

Virulenzfaktoren	Funktion	Expression in							
		<i>B.p.</i>	<i>B.b.</i>	<i>B.pp.</i>	<i>B.a.</i>	<i>B.tr.</i>	<i>B.h.</i>	<i>B.hi.</i>	<i>B.pe.</i>
BvgAS	Zwei-Komponentensystem	+	+	+	+	(-)	+	+	+
FHA	Adhäsion	+	+	+	+	?	+	?	(-)
PRN	Adhäsion	+	+	+	?	?	?	?	?
Fimbrien	Adhäsion, Kolonisierung	+	+	+	(-)	?	?	?	(-)
PTX	AB-Toxin, Adhäsion	+	-	-	?	?	?	?	?
CYA	Hämolyse, Adenylatcyclase	+	+	+	?	?	?	?	?
DNT	Modifikation monomerer GTPasen?	+	+	+	(-)	?	?	?	?
BrkA	Serumresistenz, Adhäsion, Invasion?	+	+*	+/-	-	?	?	?	(-)
TCF	Kolonisierung	+	-	-	?	?	?	?	?
TypIII-Sekretionssystem	persistierende Kolonisierung	-	+	+/-	?	?	?	?	?
TCT	Toxin	+*	+*	+*	+*	?	?	?	?

B.p. *B. pertussis*

B.b. *B. bronchiseptica*

B.p.p. *B. parapertussis*

B.a. *B. avium*

B.tr. *B. trematum*

B.h. *B. holmesii*

B.hi. *B. hinzii*

B.pe. *B. petrii*

+

(-)

-

?

*

3. Regulation der Virulenzgen-Expression durch das BvgAS-Zwei-Komponentensystem

3.1. Phasenvariation und phänotypische Modulation

Bordetellen sind in der Lage, zwischen der virulenten und der avirulenten Form zu wechseln, wobei die Phasenvariation ein genotypisches und die Modulation ein phänotypisches Ereignis ist. Schon im Jahre 1931 stellten Leslie und Gardner fest, dass *B. pertussis*-Stämme *in vitro* mit einer stammabhängigen Frequenz von 10^{-3} bis 10^{-6} spontan ihre Virulenzeigenschaften verlieren. Dieser irreversible Vorgang, der als Phasenvariation bezeichnet wurde (Leslie & Gardner, 1931), konnte später auch für *B. bronchiseptica*-Isolaten beobachtet werden. Phasenvariante Stämme zeichnen sich durch eine fehlende Expression der Virulenzfaktoren und dem daraus resultierenden avirulenten Phänotyp aus. Sie können leicht durch die nicht vorhandene β -Hämolyse, die erhöhte Erythromycin-Resistenz und die größere Kolonimorphologie von den wildtypischen Stämmen unterschieden werden (Weiss & Falkow, 1984). Vermehrt treten variante Stämme während der *in vitro*-Passage auf. Unklar ist jedoch, ob dieses Phänomen eine *in vivo*-Relevanz besitzt, oder ob es sich hierbei lediglich um ein Laborartefakt ohne Bedeutung für den Lebenszyklus von Bordetellen handelt. Für die Phasenvariation werden einzelne Mutationen innerhalb des *bvgAS*-Lokus verantwortlich gemacht (Monack *et al.*, 1989; Stibitz *et al.*, 1989). Als phänotypische Modulation beschrieb einige Jahre später Lacey ein weiteres Phänomen, bei dem durch unterschiedliche Wachstumsbedingungen reversibel avirulente *Bordetella*-Stämme beobachtet wurden (Lacey, 1960). Die Modulation der Virulenzeigenschaften kann durch Zugabe von Sulfationen, Nikotinsäure oder Kultivierung bei Raumtemperatur, anstatt der sonst üblichen 37°C, induziert werden. Genetische Analysen zeigten, dass das BvgAS-System (siehe Abschnitt 4.2) für beide regulatorische Phänomene verantwortlich ist. In Bezug auf die phänotypische Modulation konnte gezeigt werden, dass sie in *bvg*-Mutanten, die zur Inaktivierung des Systems führen, nicht vorkommt, während andere Mutationen in *BvgS* eine konstitutive Expression der Virulenzfaktoren verursachen (Gross & Rappuoli, 1989; Miller *et al.*, 1992).

3.2 Das BvgAS-Zwei-Komponentensystem

Pathogene wie auch apathogene Keime erschließen verschiedenartige Lebensräume und sind in der Lage, sich an veränderte Umweltbedingungen, wie zum Beispiel Temperaturschwankungen, Veränderungen im pH-Wert, Unterschiede im Nährstoffangebot oder der Osmolarität anzupassen. Mit Hilfe von Zwei-Komponentensysteme können Bakterien extra- oder intrazelluläre Signale wahrnehmen, die Transkription der für das Überleben oder die Pathogenität benötigten Gene anpassen und sich somit an die veränderten Umweltbedingungen angleichen (Gross *et al.*, 1989a; Stock *et al.*, 1990; Arico *et al.*, 1989; Perraud *et al.*, 1999). So sind Zwei-Komponentensysteme in der Natur weit verbreitet und kommen in den meisten Eubakterien, Archaeobakterien, aber auch einigen Eukaryoten, wie zum Beispiel Pilzen und Pflanzen vor (Loomis *et al.*, 1988; Perraud *et al.*, 1999). Ein klassisches Zwei-Komponentensystem besteht aus zwei Proteinen, ein in der Zellmembran lokalisiertes Sensorprotein und ein cytoplasmatisches Response-Regulator-Protein. Das Sensorprotein weist eine Kinaseaktivität auf und phosphoryliert sich als Antwort auf Umweltsignale an einem spezifischen Histidinrest, der im cytoplasmatischen Teil des Proteins lokalisiert ist, selbst. Die umweltgesteuerte Expression der unter 2.1 beschriebenen Virulenzgene wird bei Vertretern des *B. bronchiseptica*-Clusters mit Ausnahme des TCT auf transkriptioneller Ebene durch das BvgAS-Zwei-Komponentensystem (*bordetella virulence*

gene) reguliert. Das BvgAS-System (Abb.2) gehört zu den unorthodoxen Zwei-Komponentensystemen, die im Gegensatz zu den klassischen Zwei-Komponentensystemen strukturell komplexer aufgebaut und durch einen vierstufigen His-Asp-His-Asp-Phosphorelay gekennzeichnet sind (Uhl & Miller, 1994; Uhl & Miller, 1996a; Perraud *et al.*, 1999). Abbildung 2 zeigt einen schematischen Aufbau des BvgAS-Systems.

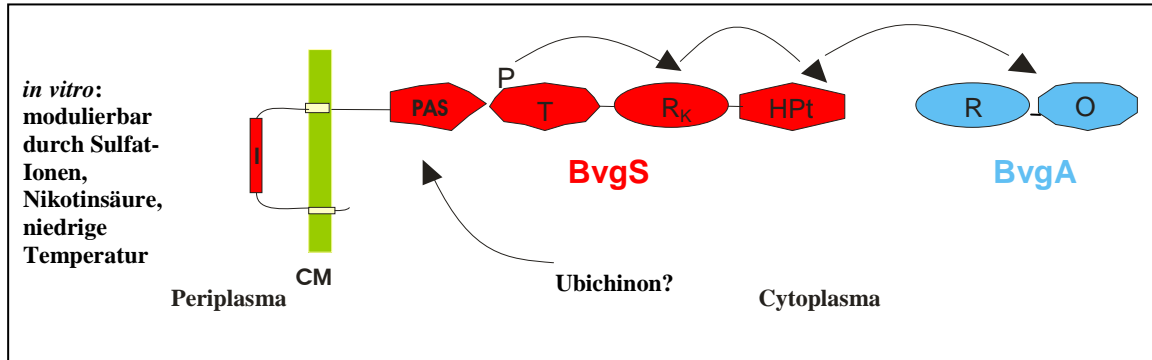
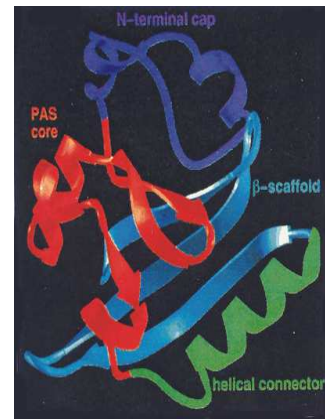


Abb. 2: Struktur und Phosphorelay des BvgAS-Zwei-Komponentensystems (Bock & Gross, 2001).
 CM: Cytoplasmamembran, PAS: PAS-Domäne, T: Transmitter, R_K: Receiver-Kinase, HPt: Histidin-enthaltende Phosphotransfer-Domäne, R: Receiver Regulator, O: Output-Domäne.

BvgS ist eine 134 kDa große Histidin-Kinase, die über zwei Transmembran-Domänen in der Cytoplasma-Membran verankert ist. Sie setzt sich aus einer periplasmatischen und mehreren cytoplasmatischen Domänen zusammen (Stibitz & Yang, 1991), welche über eine Linker-Region miteinander verbunden sind. Die 514 Aminosäure große periplasmatische Domäne von BvgS besitzt eine signifikante Ähnlichkeit mit dem TonB-Protein aus *E. coli*, welches mit Rezeptoren der äußeren Membran interagiert und den aktiven Transport von Eisensiderophoren energetisiert (Braun, 2001). Im Allgemeinen stellen periplasmatische Domänen von Histidin-Kinasen oft große N-terminale Bereiche dar, die direkt oder indirekt an der Signalwahrnehmung beteiligt sind. Untereinander weisen sie auf Aminosäureebene wenige Sequenzhomologien auf, was auf eine hohe Diversität der wahrgenommenen Reize schließen lässt.

Durch Sequenzanalysen wurde im Linker-Bereich zwischen der zweiten Transmembran-Domäne und dem Transmitter eine putative PAS-Domäne identifiziert (Taylor & Zhulin, 1999). Die Bezeichnung PAS-Domäne leitet sich von den Proteinen ab, in denen sie ursprünglich identifiziert wurden: *Drosophila* period clock protein (PER), vertebrate aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT) und *Drosophila* single-minded protein (SIM) (Nambu *et al.*, 1991). PAS-Domänen sind wichtige cytosolische Signaldomänen, die auf Reize wie Licht, Redoxpotential, Sauerstoff, kleine Liganden und Veränderungen im Energiehaushalt der Zelle reagieren können (Taylor & Zhulin, 1999). Man findet diese Signaldomänen ubiquitär bei Eubacteria, Archaea und Eukarya. PAS-Domänen können in Assoziation mit unterschiedlichen Liganden, wie ATP und FAD auftreten. In Eukaryoten stellt die PAS-Domäne eine 270 Aminosäure große Domäne mit zwei strukturell konservierten Bereichen dar, die als PAS-A und PAS-B bezeichnet werden (Crews *et al.*, 1998; Hoffman *et al.* 1991) und in Transkriptionsfaktoren als Paar auftreten. Man findet sie nicht nur in Histidin-Kinasen, sondern auch in Serin/Threonin-Kinasen, Chemorezeptoren, Photorezeptoren und spannungs-abhängigen Ionenkanälen. In prokaryotischen Proteinen können bis zu sechs PAS-Domänen nachgewiesen werden, wobei sie häufig in der Sensorregion von Zwei-Komponentensystemen zu finden sind und eine Länge von etwa 100 bis 120 Aminosäuren besitzen. Sie zeichnen sich durch wenige konservierte Aminosäuren aus und definieren sich somit vorwiegend über die Tertiärstruktur (Abb.3; zur Übersicht: Taylor & Zhulin, 1999).

Abb. 3: Struktur der PAS-Domäne von PYP aus *Ectothiorhodospira halophila* (aus Pellequer *et al.*, 1998). Gezeigt ist die Struktur der PAS-Domäne von PYP aus *Ectothiorhodospira halophila*. Sie besteht aus einem N-terminalen cap (dunkelblau), dem PAS-core (rot), einem helikalen Konnektor (grün) und einem Gerüst aus drei β -Faltblättern (hellblau).



Im Anschluss an die PAS-Domäne folgt die Transmitter-Domäne, welche durch eine ATP-Bindestelle und einen konservierten Histidinrest (H^{729}) gekennzeichnet ist. Nach Autophosphorylierung von H^{729} wird die Phosphorylgruppe zunächst auf einen konservierten Aspartat-Rest (D^{1023}) innerhalb der Receiver-Domäne und danach auf das Histidin (H^{1172}) der HPt-Domäne (Histidin-beinhaltende Phosphotransfer-Domäne) übertragen. Der sich anschließende Phosphotransfer auf den Response-Regulator von BvgA führt letztendlich zu dessen Aktivierung. Die Receiver-Domäne könnte bei der beschriebenen Übertragung des Phosphatrestes auch eine entscheidende regulatorische Aufgabe übernehmen, da sie den Phosphotransfer durch Hydrolyse und Freisetzung von Orthophosphat unterbinden kann (Uhl & Miller, 1996b). Interessanterweise kann die Phosphorylierung von BvgA nur durch die HPt-Domäne vermittelt werden und nicht direkt durch den Transmitter, was den intramolekularen Phosphorelay obligat macht. Zudem ist die HPt-Domäne für die Spezifität des Systems verantwortlich (Uhl & Miller, 1996a; Perraud *et al.*, 1998, 1999). HPt-Domänen können sowohl als Teil hybrider Kinasen aber auch als eigenständige Proteine vorkommen und besitzen eine Größe von ca. 120 Aminosäuren. Da sie weder Kinase- noch Phosphataseaktivität besitzen, funktionieren sie nur als „Phosphorylgruppen-Shuttle“ zwischen verschiedenen Proteinen. Trotz einiger struktureller Unterschiede und dem Fehlen ausgeprägter Homologien auf Aminosäureebene weisen HPt-Domänen als ein gemeinsames Merkmal ein Bündel aus vier α -Helices auf (Abb. 4). Diese Struktur ähnelt der Dimerisierungsdomäne von EnvZ und beinhaltet ebenfalls den konservierten Histidinrest. Weitere bestimmte Aminosäurereste sind für den spezifischen Phosphotransfer von der HPt-Domäne zum korrespondierenden Response Regulator verantwortlich (Hoch & Varughese, 2001).

BvgS liegt wie die meisten Histidin-Kinasen als Dimer vor, wobei die Dimerisierung an der Transmitter-Domäne erfolgt (Beier *et al.*, 1995).

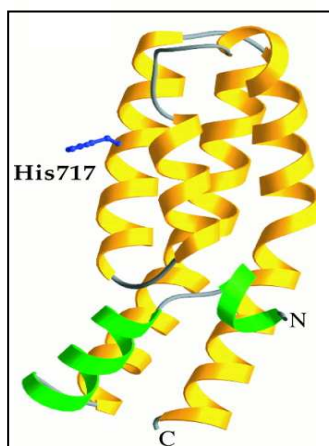


Abb. 4: Struktur der HPt-Domäne von ArcB (Stock *et al.*, 2000).

Das Bündel aus vier α -Helices ist in gelb dargestellt, der phosphorylierbare Histidinrest ist gekennzeichnet. Die Asymmetrie der Domänen bildet zusammen mit weiteren Strukturelementen (grün) eine Proteinoberfläche, die in spezifischer Art und Weise mit dem entsprechenden Partner interagieren kann.

BvgA ist ein 23 kDa großer Response-Regulator, bestehend aus einer N-terminalen Receiver-Domäne und einer C-terminalen Output-Domäne (Abb. 2) mit Helix-Turn-Helix-Motiv (Arico *et al.*, 1989). Bei diesem Protein handelt es sich um einen DNA-bindenden Transkriptionsfaktor, der zur Familie der FixJ-Familie der Response Regulatoren gehört (Roy *et al.*, 1989; Boucher *et al.*, 1994; Pao & Saier Jr., 1995; Parkinson & Kofoid, 1992) und nach Phosphorylierung an einem konservierten Aspartatrest (D54) in der Receiver-Domäne mit erhöhter Affinität kooperativ an seine DNA-Zielsequenz binden kann (Boucher *et al.*, 1994; Marques & Carbonetti, 1997; Boucher *et al.*, 2001; Bock, 2002). Studien zeigten, dass BvgA unabhängig vom Phosphorylierungsgrad als 46 kDa Dimer vorliegt (Scarlato *et al.*, 1993; Perraud *et al.*, 2000).

Um die Funktionsweise von Response Regulatoren näher zu untersuchen, wurden die biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften hybrider Proteine charakterisiert, die sowohl Anteile von BvgA aus *B. pertussis* als auch dem nah verwandten EvgA-Protein aus *E. coli* besitzen. So konnten nach der Identifikation der Domänengrenzen und Linkerregion mit Hilfe limitierter Proteolyse und massenspektrometrischer Methoden (Bantscheff *et al.*, 2000) die EvgA/BvgA-Hybride HA und HB konstruiert werden (Bock, 2002). HA, das aus der Receiver-Domäne von EvgA und der Output-Domäne von BvgA besteht und im zentralen Teil der Linkersequenz der parentalen Proteine fusioniert wurde, zeigte nahezu unveränderte Phosphorylierungs- und Dimerisierungseigenschaften im Vergleich zu BvgA und EvgA. Jedoch unterschied es sich von BvgA hinsichtlich seiner DNA-Bindeeigenschaften am BvgA-abhängigen *fha*-Promotor (siehe Abb. 7) und war zudem nicht in der Lage, kooperativ an die DNA zu binden. HB, fusioniert innerhalb des EvgA-Receiver, besitzt somit einen hybriden Receiver sowie den Linkerbereich und die Output-Domäne von BvgA. Nach der strukturellen Charakterisierung des Proteins konnte eine weniger kompakte Faltung des Receivers im Vergleich zu BvgA und EvgA festgestellt werden. Zudem war HB hinsichtlich seiner Dimerisierungseigenschaften gestört. HA wie auch HB waren nicht in der Lage, als Transkriptionsfaktoren zu wirken und den *fha*-Promotor weder *in vivo* noch *in vitro* zu aktivieren (Bock, 2002). Dies ließ u.a. vermuten, dass für eine erfolgreiche phosphorylierungsabhängige Aktivierung des Response Regulators BvgA zum einen spezifische Interaktionen zwischen Receiver- und Output-Domäne verlangen und zum anderen die Dimerisierung des Proteins für eine effiziente DNA-Bindung der Output-Domäne von BvgA erforderlich ist (Bock, 2002).

Das BvgAS-System weist bei *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* einen sehr hohen Konservierungsgrad auf. So beträgt die Übereinstimmung der *bvgAS*-Nukleotidsequenzen über 95 %. Zum anderen stimmen die Proteinsequenzen der Response Regulatoren zu 100% und die der BvgS-Proteine zwischen 95 - 99 % überein. Die größte Sequenzvariabilität findet sich im Bereich der periplasmatischen Domänen, die für einen Teil der Signalwahrnehmung verantwortlich gemacht werden (Arico *et al.*, 1991; Scarlato *et al.*, 1991a; Heininger *et al.*, 2002). Durch Komplementations-Experimente konnte des Weiteren auch eine funktionelle Konservierung des BvgAS-Zwei-Komponentensystems gezeigt werden. So sind phasenvariante *B. bronchiseptica*-Stämme, welche durch den *bvgAS*-Lokus von *B. pertussis* *in trans* komplementiert werden, wieder in der Lage, ihre Virulenzgene zu exprimieren (Mc Gillivray *et al.*, 1989). Die wieder erlangte Expression der Virulenzgene kann ähnlich wie beim wildtypischen *B. bronchiseptica*-Stamm phänotypisch moduliert werden, jedoch mit dem Unterschied, dass dafür *in vitro* eine höhere Konzentration an Nikotinsäure oder Magnesiumsulfat benötigt wird als im Vergleich zum Wildtyp (Martinez de Tejada *et al.*, 1996). Diese Beobachtungen deuten auf eine unterschiedliche Signalsensitivität der BvgS-Proteine von *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* hinsichtlich der Signalwahrnehmung *in vitro* hin.

3.3 Charakterisierung der *bvgAS*-Loci der „neuen“ *Bordetella*-Arten

Neben der hohen Sequenzkonservierung und der funktionellen Übereinstimmung (Martinez de Tejada *et al.*, 1996; McGillivray *et al.*, 1989) zeigt auch die chromosomale Lokalisation der *bvgAS*-Loci der Vertreter des *B. bronchiseptica*-Clusters große Ähnlichkeiten auf. So grenzt an das *bvgAS*-Operon stromaufwärts das *fhaB*-Gen, welches für das filamentöse Hämagglutinin kodiert. Stromabwärts vom *bvgAS*-Lokus ist das *bvgR*-Gen lokalisiert, das für das BvgR-Protein kodiert, den Repressor der *vrg*-Gene (siehe 3.4.2). Die Transkription von *fhaB* und *bvgR* erfolgt in die zum *bvgAS*-Operon entgegengesetzte Richtung. Mit Hilfe von degenerierten Oligonukleotiden, die aus der BvgA-Proteinsequenz abgeleitet wurden und anschließendem Genome-Walking konnten Teile des *bvgAS*-Lokus für *B. trematum*, *B. hinzii*, sowie der komplette Sequenzbereich des BvgAS-Systems aus *B. holmesii* (Gerlach *et al.*, 2004) und *B. avium* (Spears *et al.*, 2003) kloniert und dadurch ein dem BvgAS-Zweikomponentensystem orthologes System auch in den „neuen“ *Bordetella*-Arten nachgewiesen werden. Zudem war es möglich, die upstream und downstream von *bvgAS* liegenden Genombereiche näher zu charakterisieren (Spears *et al.*, 2003; Gerlach *et al.*, 2004). Im Falle von *B. hinzii*, *B. trematum* und *B. holmesii* wurde ein Gen (*orfX*) ca. 400 bp upstream von *bvgA* detektiert, das für einen putativen Response Regulator kodiert und in dieselbe Transkriptionsrichtung weist. Im Gegensatz dazu ist bei den Vertretern des *B. bronchiseptica*-Clusters an dieser Position das *fhaB*-Gen lokalisiert, das für das filamentöse Hämagglutinin (FhaB) (siehe Abschnitt 2.1) kodiert (Parkhill *et al.*, 2003). Upstream von *bvgA* konnte bei *B. avium* ein open reading frame (ORF) identifiziert werden, der ebenfalls für einen putativen Response Regulator kodiert und ein Homolog zu dem Response Regulator Protein VieA aus *Vibrio cholerae* darstellt (Spears *et al.*, 2003). Weiterhin konnte für *B. holmesii* und *B. avium* kein dem *bvgR* orthologes Gen stromabwärts von *bvgAS* detektiert werden (Parkhill *et al.*, 2003; Spears *et al.*, 2003). Dies lässt die Vermutung zu, dass die Genomorganisation des *bvgAS*-Lokus innerhalb der „neuen“ *Bordetella*-Arten konserviert ist, sich jedoch von der des *B. bronchiseptica*-Clusters unterscheidet (Gerlach *et al.*, 2004) (Abb. 5).

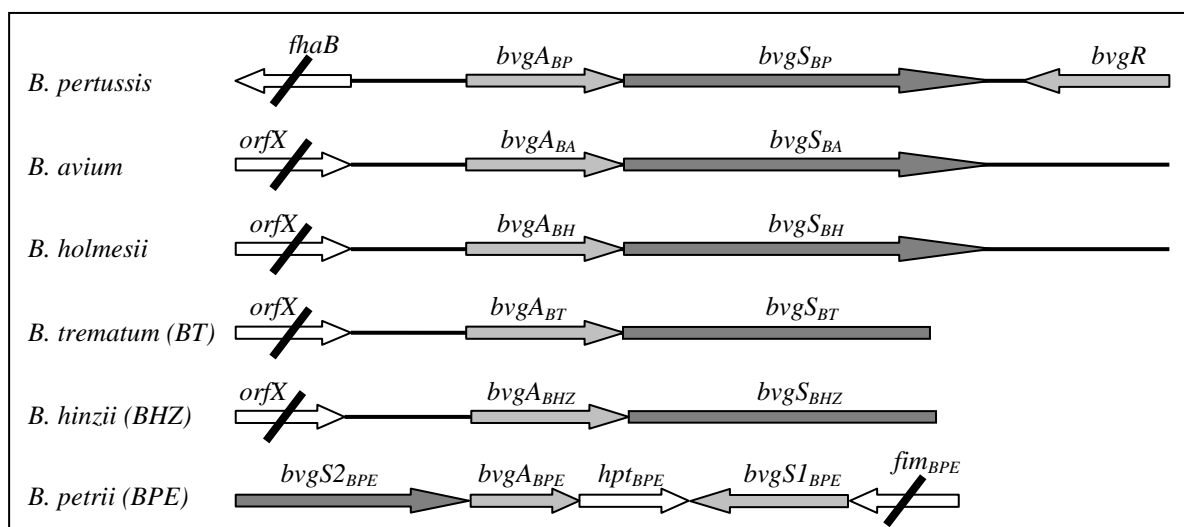


Abb. 5: Schematische Darstellung der Genomorganisation der *bvgAS*-Loci von *B. pertussis*, *B. avium*, *B. holmesii*, *B. trematum*, *B. hinzii* und *B. petrii* (verändert nach Gerlach *et al.*, 2004).

Die Pfeile repräsentieren kodierende Sequenzen; nicht-kodierende Bereiche sind durch dünne Linien dargestellt. Rechtecke zeigen unvollständige Sequenzbereiche der Gene *bvgS* und *bvgA* aus *B. trematum* und *B. hinzii*. Die Sequenz von *orfX* wurde nicht vollständig bestimmt. Die komplette Genomsequenz von *B. pertussis* und *B. avium* wurde bereitgestellt durch das Sanger Center (Parkhill *et al.*, 2003; http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_avium).

Im Gegensatz zu dem hohen Konservierungsgrad innerhalb des *B. bronchiseptica*-Clusters bzw. zwischen den „neuen“ Arten besitzen die *bvgAS*-Nukleotidsequenzen von *B. holmesii*, *B. avium*, *B. hinzii* und *B. trematum* nur geringe Übereinstimmungen mit denen der „klassischen“ Arten. So beträgt beispielsweise die Identität zwischen den *bvgA*- und *bvgS*-Sequenzen aus *B. holmesii* und den orthologen Genen aus *B. pertussis* lediglich 72,7 bzw. 59,9 % (Gerlach *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu sind die Aminosäuresequenzen der einzelnen BvgA-Proteine vor allem im Bereich der Receiver- und Output-Domänen hoch konserviert (74,8 und 86,1%), wobei die BvgA-Linkerstrukturen nur eine Identität von 34,5% besitzen (Gerlach *et al.*, 2004). Ebenso zeigen die orthologen BvgS-Proteine von *B. holmesii* und *B. pertussis* im Bereich des Transmitters, der Receiver- und der HPT-Domäne eine Identität von 52,9%, wohingegen die Konservierung im periplasmatischen Teil der Kinase lediglich 39,5% beträgt, was wohlmöglich auf eine unterschiedliche Signalwahrnehmung durch das BvgAS-System schließen lässt (Gerlach *et al.*, 2004). Demnach deuten diese Sequenzanalysen auf einen höheren Verwandtschaftsgrad der BvgAS Proteine der „neuen“ Arten zueinander als zu den orthologen Proteinen der Vertreter des *B. bronchiseptica*-Clusters hin.

3.4 Das BvgAS-Regulon des *B. bronchiseptica*-Clusters

Das BvgAS-System übt sowohl eine positive als auch negative Kontrolle auf die Virulenzgen-Expression aus und kontrolliert mindestens drei unterschiedliche phänotypische Phasen.

3.4.1 Die *bvg*-aktivierten Gene; die Bvg⁺-Phase

Einer positiven Regulation unterliegen die sog. *vag*-Gene (virulence-activated genes), die in der Bvg⁺-Phase exprimiert werden. Zu den *vag*-Genen gehören die unter 3.1 beschriebenen Virulenzfaktoren PTX, CYA, FHA, FIM, PRN, BRK, das Typ III-Sekretionssystem und das BvgAS-System selbst, das demnach einer positiven Autoregulation unterliegt (Scarlatto *et al.*, 1991). Zu den Faktoren, die in der Bvg⁺-Phase exprimiert werden, gehören auch einige Haushaltsgene wie das Cytochrom *d*₆₂₉, das Porin Q sowie BvgR, welches möglicherweise an der Repression der *vrg*-Gene (virulence repressed genes) beteiligt ist (Beattie *et al.*, 1993; Merkel *et al.*, 1998; Antoine *et al.*, 2000; Ezzel *et al.*, 1981; Finn *et al.*, 1995). Kürzlich konnten mittels Genom-Hybridisierungsstudien und Microarray-Analysen für den *B. pertussis*-Stamm GMT-1 weitere *vag*-Gene identifiziert werden, die zum einen für ein Porin (BP 0267) und einen TonB-abhängigen Eisentransporter kodieren (Cummings *et al.*, 2006). Die *vag*-Gene lassen sich nach ihrer zeitlichen Expression in zwei Gruppen einteilen, die „frühen“ und die „späten“ Gene. Beispiele für frühe Faktoren sind das FHA und das BvgAS-System selbst, deren Transkription schon wenige Minuten nach einem Übergang von modulierenden zu nicht-modulierenden Bedingungen induziert wird. Im Gegensatz dazu kann die Transkription von *ptx* oder *cya* erst einige Stunden später nachgewiesen werden (Gross & Rappuoli, 1989; Scarlatto *et al.*, 1991). Als molekulare Grundlage für diese unterschiedliche Induktionskinetik wird die unterschiedliche Affinität von phosphoryliertem BvgA (BvgA-P) zu den Promotorregionen der „frühen“ und „späten“ Gene verantwortlich gemacht. BvgA-P ist in der Lage, beide Genklassen zu aktivieren, doch bedarf es im Falle der „späten“ Gene einer etwa zehnfach höheren Konzentration des phosphorylierten Response Regulators (Steffen *et al.*, 1996; Zu *et al.*, 1996; Karimova *et al.*, 1996). Die Bindestellen von BvgA sind durch die Konsensussequenz 5'T/ATTCC/TTA oder Varianten davon gekennzeichnet und sind meist als „direct-“ oder „inverted repeats“ mit unterschiedlichen Abständen zwischen den beiden Halbseiten angeordnet (Roy & Falkow, 1991; Marques & Carbonetti, 1997; Karimova & Uhlmann, 1997). Die Gene des *bvgAS*-Lokus sind in einem Operon angeordnet und werden

als bicistronische RNA transkribiert (Arico *et al.*, 1989). Stromaufwärts wird dieses Operon durch das *fhaB*-Strukturgen begrenzt, wobei die *fhaB*- und *bvgAS*-Promotorregionen zum Teil miteinander überlappen. In Abbildung 6 ist eine schematische Darstellung der intergenischen Region zwischen den *vag*-Genen *fhaB* und *bvgAS* dargestellt. Deletionsanalysen, Bandshift- und DNaseI-Footprint-Experimente zeigten, dass sich innerhalb der 425 bp großen *fhaB*-*bvgAS*-intergenischen Region mehrere BvgA-Bindestellen befinden (Roy & Falkow, 1991).

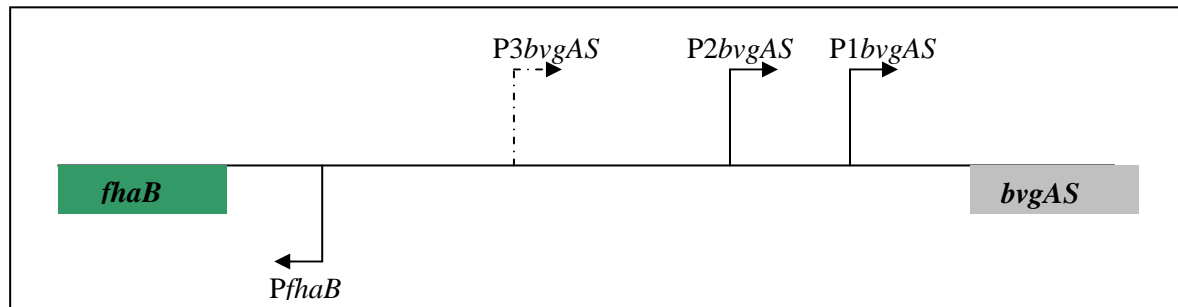


Abb. 6: Schematische Darstellung der intergenischen Region zwischen *fhaB* und *bvgAS*.

Die Pfeile kennzeichnen die Orientierung und Position der jeweiligen Transkriptionsstartpunkte. Der konstitutiv aktive Promotor P2*bvgAS* befindet sich 143 bp *upstream*, der *bvg*-abhängige Promotor P1*bvgAS* 93 bp vor dem *bvgAS*-Startcodon. Die Aktivität des Promotors P3*bvgAS* konnte bislang nur bei *B. pertussis* nachgewiesen werden. Der Promotor P*fhaB* befindet sich 70 bp vor dem *fhaB*-Startcodon.

Im Wesentlichen steuern zwei Promotoren P1*bvgAS* und P2*bvgAS* die Transkription des *bvgAS*-Operons (Roy *et al.*, 1990; Scarlato *et al.*, 1990). Die Aktivität eines dritten Promotors P3*bvgAS* konnte nur im Falle von *B. pertussis* nachgewiesen werden (Scarlato *et al.*, 1991a). Der konstitutiv aktive Promotor P2*bvgAS* befindet sich 143 bp *upstream* vor dem *bvgAS*-Startcodon und sorgt während der Bvg⁻-Phase (siehe 3.4.2) für eine basale Transkription und Expression von BvgAS. Unter nicht modulierenden Bedingungen ist der *bvg*-abhängige Promotor P1*bvgAS* aktiv, der 93 bp vor dem *bvgAS*-Startcodon lokalisiert ist (Scarlato *et al.*, 1990; Roy *et al.*, 1990). Durch die spezielle Anordnung der BvgA-Zielsequenzen innerhalb der *bvgAS*-Promotorregion kann phosphoryliertes BvgA binden und die Transkription von dem *bvg*-abhängigen Promotor P1*bvgAS* aus aktivieren, wobei die Aktivität des konstitutiven Promotors P2*bvgAS* inhibiert wird. Das Regulatorprotein besitzt hierbei also gleichzeitig aktivierende und reprimierende Funktionen. Die Transkription von *fhaB* erfolgt von dem Promotor P*fhaB*, der 70 bp *upstream* vor dem *fhaB*-Startcodon liegt (Abb.6). Durch neuere Untersuchungen konnten Anhaltspunkte für insgesamt fünf BvgA-Bindestellen innerhalb der *fhaB*-Promotorregion gewonnen werden. Hierzu zählen eine primäre (P), zwei sekundäre (S1 und S2) und zwei BvgA-Bindestellen (U1 und U2), die *upstream* vor der primären Bindestelle liegen (Boucher *et al.*, 2003). Die einzelnen Binderegionen sind dabei jeweils um 21 bp voneinander entfernt, was zwei Umwindungen der DNA entspricht und bedeutet, dass die BvgA-Dimere ausgehend von der primären Bindestelle bis zur -35 Region an einer Seite der DNA-Helix angeordnet sind (Boucher *et al.*, 2003). Abbildung 7 zeigt eine schematische Darstellung der multiplen BvgA-Bindestellen innerhalb der *fhaB*-Promotorregion.

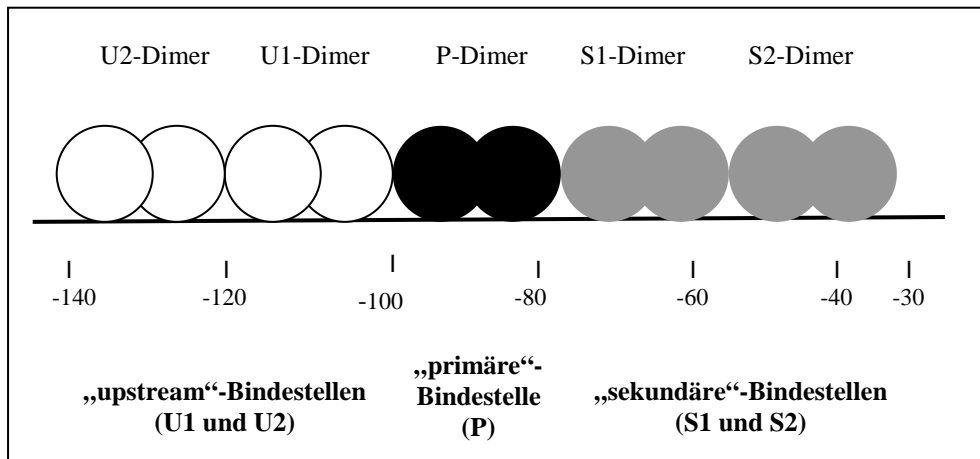


Abb. 7: Schematische Darstellung der multiplen BvgA-Bindestellen innerhalb der *fhaB*-Promotorregion (nach Boucher *et al.*, 2003).

Angegeben sind die Positionen der „primären“, „sekundären“, sowie der „upstream“ BvgA-Bindestellen, relativ zum Transkriptionsstartpunkt von *fhaB*. Die Bindestellen sind derart angeordnet, dass die BvgA-Dimere mit einem Abstand von 21 bp zueinander, jeweils auf einer Seite der DNA-Helix sitzen. Ein Kugelpaar stellt jeweils ein an die DNA gebundenes BvgA-Dimer dar.

Für die Spezifität der BvgA-Bindung wurde vor allem das Thymin an Position drei der BvgA-Konsensussequenz, das Cytosin an Position vier und das Adenin an Position sieben verantwortlich gemacht (Boucher *et al.*, 2001b). Durch Mutationsanalysen konnte zudem gezeigt werden, dass für die Aktivierung der *fhaB*-Transkription lediglich die Bindung der BvgA-Dimere an die P-, S1- und S2-Bindestellen nötig ist. Das Vorhandensein von mehreren BvgA-Bindestellen ist ein gemeinsames Merkmal von allen *bvg*-abhängigen Promotoren. Das Regulator Protein bindet zunächst mit hoher Affinität an eine primäre Bindestelle und erst im Anschluss an eine oder mehrere sekundäre Bindestellen. Durch kooperative Interaktion können weitere BvgA-Dimere allerdings mit geringerer Affinität und Spezifität binden wodurch es zur Akkumulation und Oligomerisierung von mehreren BvgA-Dimeren innerhalb der Promotorregion kommt (Boucher *et al.*, 2001a; Boucher & Stibitz, 1995; Karimova *et al.*, 1996; Kinnear *et al.*, 1999; Roy & Falkow, 1991). Dies führt letztendlich zur Interaktion mit der RNA-Polymerase (Carbonetti *et al.*, 1994; Boucher & Stibitz, 1995; Boucher *et al.*, 1997; Stibitz 1998; Boucher *et al.*, 2003).

Wie schon oben erwähnt, kommt es zur Expression der „späten“ Gene erst einige Stunden nach der Induktion der „frühen“ Genklasse. Im Falle des *ptx*-Promotors wird die primäre Bindestelle aus einem „inverted repeat“ gebildet, dessen Halbseiten im Vergleich zum *fhaB*-Promotor nur an fünf der sieben Positionen mit der Konsensussequenz übereinstimmen. Zudem sind sie 10 bp voneinander getrennt, was einer Umdrehung der DNA-Helix entspricht. Das Heptanukleotid ist außerdem an Position -136,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt angeordnet und ist demnach im Vergleich zu den „frühen“ Genen viel weiter upstream lokalisiert (Boucher & Stibitz, 1995). Der große Abstand zwischen der Primärbindestelle und dem *ptx*-Transkriptionsstartpunkt deutet daraufhin, dass für eine effektive Interaktion zwischen dem Regulatorprotein und der RNA-Polymerase eine Oligomerisierung von mehreren BvgA-Dimeren und folglich eine viel höhere intrazelluläre Konzentration an phosphoryliertem BvgA notwendig ist, die erst mehrere Stunden nach dem Shift von modulierenden zu nicht-modulierenden Bedingungen vorliegt (Marques & Carbonetti, 1997).

Weitere Faktoren, die an der effektiven Aktivierung und Expression der *vag*-Gene beteiligt sind, stellen die Baf- (Bvg accessory factor) und Tex (toxin expression)-Proteine dar, über deren Funktion allerdings noch wenig bekannt ist (DeShazer *et al.*, 1995; Fuchs *et al.*, 1996; Wood & Friedmann, 2000). Auch die DNA-Topologie scheint einen Einfluss auf das Virulenzregulon zu haben (Scarlato *et al.*, 1993; Graeff-Wohlleben *et al.*, 1995).

Eine Ausnahme zu den bisher beschriebenen *bvg*-aktivierten Promotoren stellt der *bvgR*-Promotor dar. *bvgR* zählt zu den „frühen“ Genen und kodiert für einen putativen Repressor, der unter nicht-modulierenden Bedingungen für die Repression der *vrg* (*virulence repressed genes*)-Gene verantwortlich gemacht wird (Merkel & Stibitz, 1995; Merkel *et al.*, 1998a). Die Unterschiede zu den Promotoren der anderen *vag*-Gene liegen in der Organisation und Symmetrie der drei BvgA-Bindestellen (Merkel *et al.*, 2003). Trotz dieser strukturellen Unterschiede ist die Aktivität des *bvgR*-Promotors höher als die des *fhaB*-Promotors. Die starke Aktivität ist vermutlich notwendig, um eine anhaltende Repression der *vrg*-Gene während der Bvg⁺-Phase sicher zu stellen. Die hohe Instabilität des *bvgR*-Transkriptes ist vermutlich notwendig, um eine schnelle Induktion der *vrg*-Gene (siehe 4.4.2) zu gewährleisten (Merkel *et al.*, 2003).

3.4.2 Die *bvg*-reprimierten Gene, die Bvg⁻-Phase

Durch Faktoren, wie Wachstum bei niedriger Temperatur, Anwesenheit von Sulfationen oder Nikotinsäure, wird die Autophosphorylierungsaktivität der Histidin-Kinase BvgS inhibiert und der Phosphotransfer auf den Response Regulator BvgA unterbunden. In dieser als Bvg⁻-Phase bezeichneten Wachstumsphase werden anstatt der *vag*-Gene die sog. *vrg*-Gene (*virulence repressed genes*) transkribiert, wobei das BvgAS-Zwei-Komponentensystem nur indirekt an deren Transkriptionsaktivierung beteiligt ist. Durch Transposonmutagenese konnten in *B. pertussis* einige *vrg*-Gene, *vrg6*, *vrg18*, *vrg24*, *vrg53* und *vrg73*, identifiziert werden, deren Funktion allerdings unbekannt ist (Knapp & Mekalanos, 1988). Für vier dieser Gene konnte eine putative Repressorbindestelle in Form eines 32 bp langen Sequenzmotives identifiziert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass Mutationen in diesem Bereich eine konstitutive Expression des entsprechenden Gens bewirken. Ob es sich bei dem postulierten Repressor um das BvgR-Protein handelt, konnte bislang nicht geklärt werden (Beattie *et al.*, 1990; 1993). Zusätzlich wurden mit Hilfe von 2D-Gelelektrophorese insgesamt 22 weitere vom BvgAS-System reprimierte Proteine identifiziert (Stenson & Pepler, 1995). Hierzu gehören u. a. die zwei Oberflächenproteine VraA und VraB. Über Microarray-Analysen wurden zudem zwei *vrg*-Gene mit Homologien zu einem Autotransporter bzw. einer Sensorkinase entdeckt (Hot *et al.*, 2003).

Die Expression der Gene der Bvg⁻-Phase in *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* sind im Gegensatz zu den *vag*-Genen sehr unterschiedlich. Im Vergleich zu dem *vrg*-Regulon aus *B. pertussis* sind bereits einige Details über die Funktion der *vrg*-Gene aus *B. bronchiseptica* bekannt. Ein besonderes Kennzeichen der Bvg⁻-Phase von *B. bronchiseptica* ist die Motilität. Deren Regulation erfolgt hierbei über Flagellin FlaA, das seinerseits ebenfalls einer hierarchischen Regulation unterliegt, an der auch das *frlAB*-Operon beteiligt ist. Der *frlAB*-Promotor besitzt mehrere BvgA-Bindestellen innerhalb der -10 und der -35 Region sowie in der kodierenden Sequenz, die womöglich für die Repression von *frlAB* während der Bvg⁺-Phase verantwortlich sind (Akerley *et al.*, 1992; 1993). Weiterhin konnten im Falle von *B. bronchiseptica* *vrg*-Gene identifiziert werden, die an wichtigen Vorgängen des Energiestoffwechsels, wie z.B. dem Elektronentransport, dem Fettsäure-Metabolismus, dem Glyoxylat-Zyklus oder dem Abbau von aromatischen Aminosäuren beteiligt sind (Cotter & Miller, 2000; Schneider *et al.*, 2002). Eine Beteiligung wird ihnen auch hinsichtlich der LPS-Variation (van den Akker, 1998; Cummings *et al.*, 2006), der Synthese eines

alternativen Adhäsins (Register & Ackerman, 1997), der Urease-Expression (McMillan *et al.*, 1996) und der Expression einer sauren Phosphatase (Chhatwal, 1997) während der Bvg⁻-Phase zugesprochen. Kürzlich konnten über Microarray-Analysen weitere *vrg*-Gene in *B. bronchiseptica* identifiziert werden, die für zwei Autotransporter, zwei Proteine für die Eisenaufnahme und das Protein BB1186 kodieren (Cummings *et al.*, 2006). Zusammenfassend ist in Abbildung 8 das BvgAS-Regulon des *B. bronchiseptica*-Clusters angegeben.

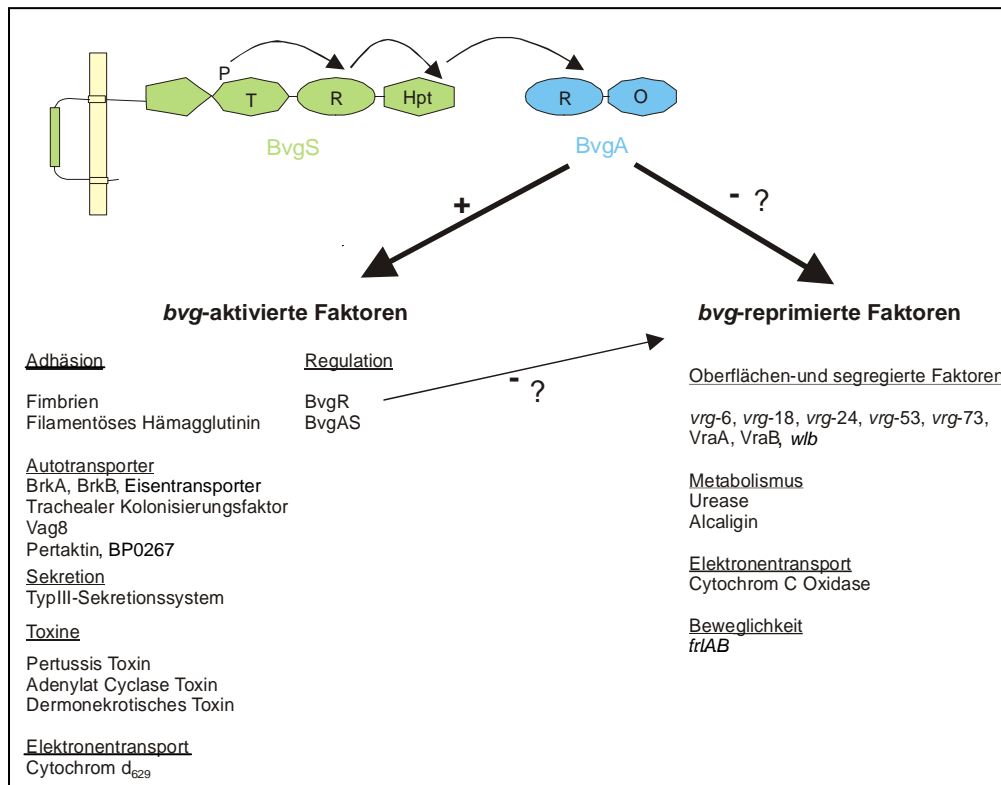


Abb. 8: Regulation der Transkription einiger *bvg* positiv- und negativ regulierter Gene (Bock & Gross, 2001).

3.4.3 Die Bvgⁱ-Phase

Die dritte phänotypische Phase (Bvgⁱ-Phase), welche durch das BvgAS-System kontrolliert wird und durch submodulierenden Bedingungen (0,4 - 2,0 mM Nikotinsäure) in *B. bronchiseptica* induziert werden kann, zeichnet sich durch mittlere Konzentrationen an phosphoryliertem BvgA-Protein (BvgA-P) aus.

In der Bvgⁱ-Phase werden die *vrg*-Gene reprimiert, während die frühen *vag*-Gene und die für diese Phase spezifischen Gene aktiviert werden (Cotter & Miller, 1997; Cotter & DiRita, 2000). Ein für die Bvgⁱ-Phase spezifisches Protein stellt das 1578 AS große BipA-Protein (*bvg*-intermediate phase protein *A*) dar, das Sequenzhomologien zum Intimin aus *E. coli* und zum Invasin aus *Yersinia* spp. besitzt, wobei dessen Funktion allerdings bislang unbekannt ist (Stockbauer *et al.*, 2001). In der Promotorregion von *bipA* wurden insgesamt fünf BvgA-Bindestellen identifiziert. Abgeleitet davon wurde ein Modell postuliert, nachdem niedrige Konzentrationen an phosphoryliertem BvgA die Transkription von *bipA* über hoch affine Bindestellen im Promotor aktivieren, während hohe Konzentrationen an BvgA-P über Bindung an niedrig affine Bindestellen innerhalb der kodierenden Region diese inhibiert (Deora *et al.*, 2001; Cotter & DiRita, 2000). Kürzlich konnte für *B. bronchiseptica* gezeigt werden, dass die Biofilmbildung *in vitro* vor allem in der Bvgⁱ-Phase zu beobachten ist.

Dieses durch das BvgAS-System nachweislich kontrollierte Phänomen scheint ebenso wie die differenzielle Expression des FHA und der Fimbrien eine entscheidende Rolle bei der initialen Kolonisierung des Wirtes zu spielen (Irie *et al.*, 2004). Über Microarray-Analysen konnten kürzlich für *B. bronchiseptica* 262 Gene identifiziert werden, die in der Bvgⁱ-Phase exprimiert werden und womöglich das Überleben des Bakteriums in verschiedenen Umweltischen durch die Aktivierung spezifischer Stoffwechsel- und Transportwege ermöglichen (Cummings *et al.*, 2006).

3.4.4 *In vivo* Relevanz der einzelnen Bvg-Phasen

Während einer Infektion gewährleistet das BvgAS-System nicht nur die koordinierte Expression der Virulenzfaktoren, sondern auch die gleichzeitige Repression der *vrg*-Gene (Akerley *et al.*, 1995). Die eigentliche Bedeutung der Bvgⁱ-Phase innerhalb des Infektionszyklus ist bislang noch weitestgehend ungeklärt, da Bakterien, die in der Bvg⁺-Phase blockiert sind, ebenfalls eine Infektion etablieren können. (Cotter & Miller, 1994; Martinez de Tejada *et al.*, 1998).

Hinweise auf die Relevanz der *vrg*-Gene können von einzelnen phänotypischen Merkmalen phasenvarianter *B. bronchiseptica*-Isolate abgeleitet werden. Im Gegensatz zu den wildtypischen Isolaten besitzen diese Varianten im Allgemeinen einen Wachstumsvorteil, reagieren sehr viel resistenter auf raue Umweltbedingungen und sind durch ihre Motilität gekennzeichnet (Goodnow, 1980; Akerley & Miller, 1993; Cotter & Miller, 1997; Banemann *et al.*, 1998). Diese Kennzeichen können ihnen die Persistenz innerhalb des Wirtes bzw. das Überleben außerhalb des Wirtes ermöglichen. Das BvgAS-System könnte hierbei als Sensor dienen, der es den Bordetellen ermöglicht, zwischen dem Aufenthalt in der Umwelt und im Wirt zu unterscheiden (Bock *et al.*, 2002). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass das BvgAS-System geringe Unterschiede der Wachstumsbedingungen innerhalb des Wirtes misst und entsprechend die Genaktivität reguliert (zur Übersicht: Cotter & DiRita, 2000; Bock & Gross, 2001). Für die obligat mit Wirtsorganismen vergesellschafteten Arten *B. pertussis* und *B. parapertussis* würde dies bedeuten, dass dieses System nur noch als evolutives Relikt vorliegt, welches lediglich die Expression der Virulenzgene und die Repression der *vrg*-Gene gewährleistet. Das Vorhandensein der Bvgⁱ-Phase bei *B. pertussis* deutet jedoch darauf hin, dass die feinregulierte Genexpression zum Beispiel in der späten Infektionsphase oder bei der Übertragung auf einen anderen Wirt, eine wichtige Rolle spielt (Cotter & DiRita, 2000; Stockbauer *et al.*, 2001). Vor allem der mehrstufige Phosphorelay des BvgAS-Systems deutet darauf hin, dass es möglicherweise weitere Ansatzpunkte für regulatorische Faktoren gibt, die eine Feinregulation des Systems und folglich der Genexpression ermöglichen könnte.

4. Signaltransduktion durch Zwei-Komponentensysteme

Über die Signalwahrnehmung durch Histidin-Kinasen *in vivo* ist noch sehr wenig bekannt. Dies trifft auch für die Histidin-Kinase BvgS zu, auch wenn hier die Temperatur ein möglicher Stimulus zur Unterscheidung zwischen dem Aufenthalt im Wirt und der Umwelt sein könnte, da z.B. die Temperatur im Nasopharynx geringer ist als in den Geweben, der tiefer gelegenen Atemwegen (Cotter & DiRita, 2000; Bock & Gross, 2001). BvgS besitzt zusätzliche Domänen, wie die periplasmatische-, die PAS- oder die HPT-Domäne, die möglicherweise für die Signalerkennung und dessen Weiterleitung innerhalb des BvgAS-Zwei-Komponentensystems eine Rolle spielen. Histidin-Kinasen anderer Organismen weisen einen dem BvgS ähnlichen modularen Aufbau auf, wobei in einigen Fällen eine Beteiligung dieser Domänen an der Signalwahrnehmung beobachtet werden konnte. In Tabelle 4 sind die im Folgenden aufgeführten Protein-Interaktionspartner und zugehörige Organismen zusammengefasst.

So konnte für die periplasmatische Domäne von CitA, einer Kinase, die an der Regulation der Citrat-Fermentation beteiligt ist, gezeigt werden, dass sie mit hoher Affinität und in einem Verhältnis von 1 zu 1 Citrat binden kann (Kasper *et al.*, 1999). Ebenfalls konnte in *Agrobacterium tumefaciens* beobachtet werden, dass das Zwei-Komponentensystem VirA/VirG die Expression der Virulenzgene in Abhängigkeit unterschiedlicher Signalmoleküle reguliert, welche von verletzten Pflanzen freigesetzt werden. Die Kinase nimmt dabei die Anwesenheit verschiedener induzierender Zucker durch eine Interaktion der periplasmatischen Domäne mit dem Glukose/Galactose-Bindeprotein ChvE wahr (Cangelosi *et al.*, 1990; Doty *et al.*, 1996). In *Mycobacterium tuberculosis* codiert *kdp* für Komponenten eines Signaltransduktionsweges, die als Antwort auf veränderte K⁺-Konzentrationen in der Umwelt und damit verbundenen osmotischen Stress exprimiert werden (Steyn *et al.*, 2003). Mittels YTH-Analysen konnte gezeigt werden, dass der N-terminale Bereich der Histidin-Kinase KdpD mit den Membranproteinen LprF und LprJ interagiert, wobei diesen Proteinen eine akzessorische oder Liganden-bindende Funktion und somit möglicherweise ein direkter Einfluss auf die *kdp*-Expression zugestanden wird (Steyn *et al.*, 2003). Der „tripartite tricarboxylate transporter“ BctCBA aus *B. pertussis* vermittelt die Aufnahme von Citrat im Zusammenwirken mit dem Zwei-Komponentensystem BctDE. So konnte über Yeast-Two Hybrid-Analysen eine mögliche Interaktion von BctC mit der periplasmatischen Domäne des Sensorproteins BctE gezeigt werden (Antoine *et al.*, 2005). Hingegen liegen die Mechanismen der periplasmatischen Domäne von BvgS hinsichtlich der Signalwahrnehmung und Signaltransduktion auf die cytoplasmatischen Domänen der Sensorkinase, noch weitgehend im Dunkeln (Bingmann *et al.*, 1999).

Auch ist noch ungeklärt, welche Rolle die PAS-Domäne von BvgS für die Signalwahrnehmung spielt. Schon seit längerem sind Punktmutationen im β -Faltblatt oder im helikalen Konnektor der PAS-Domäne bekannt (siehe Abb. 3), die zu einer konstitutiven Aktivierung der Histidin-Kinase führen (Beier *et al.*, 1996; Manetti *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1992; Goyard *et al.*, 1994). Zudem besitzt die BvgS Histidin-Kinase aus *B. pertussis* innerhalb der PAS-Domäne ein Walkerbox TypA-Nukleotidbindemotiv (Charles & Nester, 1993), das ebenso für die Funktionalität des BvgS-Proteins von Bedeutung zu sein scheint. So führt ein Austausch von Glycin (G⁶²⁴) zu Valin und Lysin (L⁶²⁵) zu Leucin im mutierten Stamm zu einem Verlust der Autophosphorylierungs-Aktivität von BvgS (Beier *et al.*, 1996). Das Vorhandensein einer ATP-Bindestelle innerhalb des WalkerA-Motivs lässt vermuten, dass die PAS-Domäne möglicherweise in der Lage ist, den energetischen Zustand der Zelle wahrzunehmen. Zudem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Autophosphorylierungs-Aktivität der BvgS Histidin-Kinase nach Inkubation mit Ubichinon inhibiert wird (Bock & Gross, 2002). Ein kürzlich entdecktes Chinonbindemotiv innerhalb der PAS-Domäne im Bereich des helikalen Konnektors von BvgS zeigte nach einer Mutationsanalyse jedoch keine eindeutige Beteiligung dieser Domäne an der Wahrnehmung des Redoxzustandes (Bock & Gross, 2002). Die Funktion der PAS-Domäne bleibt also in diesem Zusammenhang noch unklar. In anderen Organismen konnte eine Beteiligung der PAS-Domäne der Histidin-Kinase an der Signalwahrnehmung nachgewiesen werden. So wurde für das FixL Protein aus *Sinorhizobium meliloti* gezeigt, dass dessen PAS-Domäne über eine assoziierte Hämgruppe molekularen Sauerstoff wahrnehmen kann. Deshalb kontrolliert sie somit in Abhängigkeit der Sauerstoffverfügbarkeit die Autophosphorylierung des Systems und nimmt Einfluss auf die Genexpression des Bakteriums (Gilles-Gonzales *et al.*, 1991; Lois *et al.*, 1993). Das Aerotaxisprotein ArcB aus *E. coli* ist ein weiteres Beispiel für ein prokaryotisches Protein mit einer PAS-Domäne. Über eine assoziierte FAD-Gruppe können Veränderungen im zellulären Redoxpotential detektiert werden (Bibikov *et al.*, 2000; Repik *et al.*, 2000). Bei *B. subtilis* ist KinA, eine lösliche Kinase mit insgesamt drei PAS-Domänen, an der Sporulationsregulation beteiligt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die am weitesten N-terminal gelegene Domäne von KinA (PAS-A) eine katalytische ATP-Bindestelle aufweist (Stephenson &

Hoch, 2001). Mittels Yeast Two-Hybrid Analysen, die Hinweise auf die Signalwahrnehmung durch KinA und KinB geben sollten, konnte weiterhin eine Interaktion zwischen KinA und dem ABC-Transporter-Protein YheH identifiziert werden (Fukushima *et al.*, 2006). Die Überexpression des ABC-Transporters YheH/YheI hatte eine geringere Phosphorylierungseffizienz des Response Regulators Spo0A zur Folge, der am Ende der Phosphorylierungskaskade zur Initiation der Sporulation steht. Die veränderten Phosphorylierungseigenschaften von Spo0A werden möglicherweise durch eine unzureichende Aktivierung von KinA verursacht (Fukushima *et al.*, 2006). Weiterhin konnte für die Dimersierungs/Phosphotransfer-Domäne von KinA gezeigt werden, dass diese mit konservierten Aminosäureresten des Proteins Sda interagiert (Rowland *et al.*, 2004). Diese Interaktion stabilisiert das KinA-Dimer und führt zur Bildung eines ebenfalls stabilen Heterotetramers. Das Sda-Protein fungiert somit als Antikinase, die die Auto-phosphorylierungsaktivität von KinA inhibiert, indem sie eine produktive Interaktion zwischen der ATP-Bindeseite und dem phosphorylierbaren Histidin-Rest verhindert (Rowland *et al.*, 2004).

Die HPt-Domäne von BvgS stellt die Spezifität des Phosphorelays innerhalb des Zwei-Komponentensystems sicher (Perraud *et al.*, 1998, 1999). So werden Interaktionen bestimmter Aminosäuren für den spezifischen Phosphotransfer auf die Receiver-Domäne des Response Regulator Proteins BvgA verantwortlich gemacht (siehe Abb. 4). Weitere Funktionen dieser Domäne hinsichtlich der Signalerkennung oder -weiterleitung sind bislang nicht bekannt. Allerdings konnte eine regulatorische Funktion der HPt-Domäne hinsichtlich der Signaltransduktion im Falle der Interaktion des SixA-Proteins von *E. coli* mit der HPt-Domäne der Histidin-Kinase ArcB des Zwei-Komponentensystems ArcA/ArcB gezeigt werden. Unter bestimmten anaerobischen Wachstumsbedingungen findet ein mehrstufiger Phosphorelay innerhalb des ArcA/ArcB-Systems statt, woraufhin SixA eine Phosphatase-Aktivität hinsichtlich der HPt-Domäne von ArcB entwickelt, was letztendlich zu einer Hemmung des Phosphotransfers von ArcB zu ArcA führt (Matsubara & Mizuno, 2000). Das NtrBC-Zwei-Komponentensystem in *E. coli* reguliert σ_{54} -abhängige Transkription von Stickstoff-regulierten Genen (Ninfa *et al.*, 2000). Mittels YTH-Analysen konnten für die Histidin-Kinase NtrB die Proteine GlnB, GlnK und AspA als Interaktionspartner identifiziert werden, wobei AspA mit der Phosphotransfer-Domäne interagiert und so möglicherweise unter anaerobischen Bedingungen den Phosphotransfer auf den Response Regulator NtrC inhibiert (Salinas & Contreras, 2003).

Weiterhin konnte eine Beteiligung der C-terminalen Domänen von Histidin-Kinasen an Protein-Interaktionen und damit möglicherweise an der Signaltransduktion beispielsweise in *Synechococcus* sp. PCC7942 gezeigt werden (Espinosa *et al.*, 2005). Cyanobakterien antworten auf Nährstoffmangel mit dem Abbau von Licht-bündelnden Antennen, den Phycobilisomen, wobei dieser Prozess durch die Histidin-Kinase NblS reguliert wird (Collier & Grossmann, 1992). Mittels YTH-Analysen konnte eine Interaktion zwischen der ATP-Bindedomäne von NblS und dem SipA-Protein identifiziert werden (Espinosa *et al.*, 2005), der möglicherweise eine Rolle für die Anpassung an Stressbedingungen in Cyanobakterien zugesprochen wird.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Histidin-Kinase RpfC des RpfGC-Zwei-Komponentensystems aus *Xanthomonas campestris* zum einen die Expression einer Reihe von Virulenzgenen mittels des Phosphorelays reguliert (Dow *et al.*, 2003; Slater *et al.*, 2000; Barber *et al.*, 1997; Ryan *et al.*, 2006) und zum anderen durch eine Protein-Interaktion ihrer C-terminalen REC-Domäne mit dem RpfF-Protein die Biosynthese des „quorum sensing“-Signalfaktors DSF negativ beeinflusst (He *et al.*, 2006). Das so postulierte Modell zeigt eine Doppelfunktion von RpfC, die eine Anpassung der Bakterien an ihre Umwelt mittels kontrollierter Virulenzgen-Expression und DSF-Autoinduktion ermöglicht (He *et al.*, 2006).

In *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass die Bindung des Pflanzenhormons Zytokinin die Autophosphorylierung von drei Histidin-Kinasen induziert (Kakimoto, 2003; Hwang & Sheen, 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Histidin-Kinase CRE1 in Anwesenheit von Zytokinin nicht nur als Phosphatdonor für seine HPt-Domäne, sondern in Abwesenheit von Zytokinin ebenfalls als Dephosphatase fungiert und somit regulierend auf den Phosphorelay wirkt (Mähönen *et al.*, 2006).

Tabelle 4: Zusammenfassung einiger Protein-Interaktionen zwischen Histidin-Kinasen und identifizierten Proteinen. Für weitere Erläuterungen siehe Text.

Organismus	Histidin-Kinase	Interaktionspartner (gezeigte oder mögliche Funktion für die Signalaufnahme)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CitA	Citrat (Citrataufnahme)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	VirA	ChvE (Regulation der Virulenzgen-Expression)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	KdpD	LprF, LprJ (Einfluss auf <i>kdp</i> -Expression)
<i>Bordetella pertussis</i>	BctE	BctC (Citrat-Transport)
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	FixL	über assoziierte Hämgruppe Wahrnehmung von molekularem Sauerstoff
<i>Escherichia coli</i>	ArcB NtrB	über assoziierte FAD-Gruppe Wahrnehmung von verändertem Redoxpotential der Zelle, SixA (Phosphatase), GlnB, GlnK, AspA (Einfluss auf Phosphotransfer auf NtrC)
<i>Bacillus subtilis</i>	KinA	YheH (ABC-Transporter), Sda (Antikinase)
<i>Synechococcus</i> sp. PCC7942	NblS	SipA (Anpassung an Stressbedingungen)
<i>Xanthomonas campestris</i>	RpfC	RpfF (Modulation der DSF-Biosynthese)
<i>Arabidopsis</i>	CRE1	Zytokinin (Phosphodonor und Phosphatase)

5. Zielsetzung der Arbeit

Der Aufbau von Zwei-Komponentensystemen und deren Funktionsweise sind in den letzten Jahren gut charakterisiert worden. So sind die Grundprinzipien dieser Art der Signaltransduktion weitgehend bekannt, wie der modulare Aufbau der an der Signalweiterleitung beteiligten Proteine und die phosphorylierungsabhängige Aktivierung des Response Regulators. In wenigen Fällen sind die Signale bekannt, die durch die Histidin-Kinase wahrgenommen werden, so dass im Bereich der Signalwahrnehmung der *in vivo*-Relevanz der jeweiligen Signale noch viele Fragen offen bleiben. Bei der Histidin-Kinase BvgS des BvgAS-Zwei-Komponentensystems handelt es sich um eine unorthodoxe Histidin-Kinase, die im Gegensatz zu den klassischen Sensorkinasen durch eine komplexere Domänen-Struktur gekennzeichnet ist. Bislang ist weitgehend unklar, welche Bedeutung die periplasmatische-, PAS- bzw. HPt-Domäne für die Signalwahrnehmung besitzen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb nach Erstellung einer *B. bronchiseptica* spezifischen Genbank mit Hilfe des Yeast Two-Hybrid Systems Interaktionspartner der einzelnen BvgS-Domänen identifiziert werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit lag in der Struktur-Funktionsanalyse des Response Regulators BvgA aus *B. holmesii* (BvgA_{BH}). Durch limitierte Proteolyse und massenspektrometrische Methoden gelang es, die einzelnen Domänen und die Sequenz des Linker-Bereiches des Response Regulators BvgA aus *B. pertussis* (BvgA_{BP}) zu identifizieren (Bantscheff *et al.*, 2000). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass trotz der umfangreichen Sequenzkonservierung der BvgA-Proteine aus *B. holmesii* und *B. pertussis*, eine *B. pertussis* *bvgA*-Mutante nicht durch den *bvgA*-Lokus aus *B. holmesii* komplementiert werden konnte (Gerlach *et al.*, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die wenigen Abweichungen zwischen den Aminosäuresequenzen der Output-Domänen dafür verantwortlich sind, dass das BvgA_{BH}-Protein die Funktion von BvgA_{BP} *in vivo* und *in vitro* nicht übernehmen kann. Aus diesem Grunde sollte ein hybrider Response Regulator BvgA_{fus} konstruiert werden, der aus der Receiver- und Linker-Domäne des BvgA_{BH} Proteins und der Output-Domäne von BvgA_{BP} zusammengesetzt ist. Das hybride Protein sollte dann auf seine DNA-Bindeeigenschaften und seine Fähigkeit, die Expression von BvgA-abhängigen Genen *in vivo* zu induzieren, untersucht werden. Zudem sollte erforscht werden, ob die unterschiedlichen DNA-Binde- und transkriptionsaktivierenden Eigenschaften von BvgA_{BH} im Besonderen auf die Aminosäureunterschiede innerhalb des Helix-Turn-Helix Motivs (HTH) der Output-Domäne zurückzuführen sind. Deshalb sollte mittels ortsspezifischer Mutagenese die Aminosäuresequenz des HTH aus BvgA_{BH} an die *B. pertussis*-Sequenz angeglichen und das resultierende Protein BvgA_{BH}* hinsichtlich oben genannter Eigenschaften untersucht werden.

C Material

1 Geräte

ÄKTA Prime	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Autoklaven:	Webaeco
Blotkammer:	R. v. Keutz
Brutschrank:	Heraeus
Elektrophoresekammer:	institutseigene Werkstatt; Biorad
Festwinkelrotoren:	Heraeus Minifuge RF, Eppendorf 5417R
French- Press:	SLN- Amico
Geigerzähler:	Berthold; Herfurth
Geltrockner:	Biorad; Hölzel; Uniequip
Heizblöcke:	Eppendorf-Thermostat 5320; Liebisch 2099DA
Magnetrührer:	Gerhardt, TMA 2071
Mikrowelle:	AEG, AFK
Netzgerät:	Biorad Modell 1000/500; Consort E452; Pharmacia
PCR- Geräte:	Biomed, Thermocycler 60;
Peristaltikpumpe:	Pharmacia
pH-Meter:	Hartenstein, WTW Weilheim
Photometer:	Pharmacia, Gene Quant II, Ultrospec III; Klett Summerson; Zeiss, Spektralphotometer PM6, Spektralphotometer DM4
Pipetten:	Abimed Labmade
Proteinsäule (mit Stempel):	Biorad
Röntgenfilmentwickler:	Kodak X-Omat M35
Röntgenfilmkassette:	Dr. Goos Suprema
Schüttelinkubator:	IKA-Vibrax-VXR Electronic
Speed-Vac:	Eppendorf, Concentrator 5301; Uni Equip, Univapo
Sterilbank:	NuAire™; GelAire
Tischzentrifuge:	Heraeus Biofuge 13 und 15, Eppendorf 5417R
Taumler:	Heidolph, Mini RockerMR-1
UV-Leuchtkasten:	Vilber, Courmat
Vakuumpumpe:	Neuberger
Videoprinter:	Mitsubishi
Vortexer:	Heidolph Reax 2000
Waagen:	Sartorius; Mettler
Wasserbad-Inkubator:	Memmert, Kötter,ann; Infors
Zentrifugen: Kühlzentrifugen:	Beckmann J2-21 mit JA10 und JA20 Festwinkelrotoren Heraeus Minifuge RF Eppendorf 5417R
Tischzentrifugen:	Heraeus Biofuge 13 und 15, Eppendorf 5417R

2 Bakterienstämme

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 3 aufgeführt

Tab. 5: Die Summe aller in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Beschreibung/Genotyp	Referenz
<i>B. pertussis</i> Tohama I SN	Wildtypderivat;; Sm ^R , Kan ^R , Nal ^R	I.R.I.S,Siena, Italien Pizza <i>et al.</i> ,1989
<i>B. pertussis</i> 347	TI-Derivat; <i>bvgS</i> ::Tn5; Sm ^R ,Nal ^R ,Kan ^R	Weiss and Falkow,1983
<i>B. pertussis</i> 359	TI-Derivat; <i>bvgA</i> ::Tn5; Sm ^R ,Nal ^R ,Kan ^R	Weiss and Falkow,1984
<i>B. bronchiseptica</i> 7865	Wildtyp; Humanisolat; Sm ^R , Nal ^R	Arico & Rappuoli (1987) Gross & Rappuoli (1989)
<i>B. holmesii</i> ATCC51541	Referenzstamm; Blutisolat; stammt aus einem Patienten mit einer schwachen Leukozytose und Cardiomegalie	Weyant <i>et al.</i> , 1995
<i>B. holmesii</i> G7702	Blutisolat; stammt aus einem Patienten mit Hodgkin Lymphom	Weyant <i>et al.</i> , 1995
<i>E. coli</i> DH5 α	Wildtypisches Isolat (TypI)	Bethesda Research Laboratories (BRL)
<i>E.coli</i> BL21	<i>E.coli</i> -Stamm zur Überproduktion von GST-Fusionsproteinen; F ⁻ , ompT, <i>hsdS</i> (rB ⁻ , mB ⁻), <i>gal</i>	Amersham Pharmacia, Biotech
<i>E. coli</i> M15	<i>E. coli</i> -Stamm zur Klonierung in pQE-Vektoren und Überproduktion von „His- tag“-Proteinen	Qiagen
<i>E. coli</i> SM10	<i>lacY</i> , <i>tonA</i> , <i>recA</i> , <i>Muc</i> ⁺ , <i>thi</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>supE</i> ,RP4-2-Tc::Mu,Kan, λ pir	A.Pühler Simon <i>et al.</i> , 1983

3 Hefestämme

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme sind in Tabelle 6 aufgeführt

Tab. 6 : Die Summe aller in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme.

Hefestamm	Beschreibung	Referenz
<i>S. cerevisiae</i> AH 109	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-300, gal4., gal80., LYS2::GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -HIS3, MEL1, GAL2 _{UAS} -GAL2 _{TATA} -ADE2, URA3:: MEL1 _{UAS} -MEL1 _{TATA} -lacZ	James <i>et al.</i> , 1996
<i>S. cerevisiae</i> SFY526	MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, can ^f , gal4-524, gal80-538, URA::GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -lacZ	Harper <i>et al.</i> , 1993
<i>S. cerevisiae</i> HF7c	MATa, ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, LYS::GAL1-HIS3, URA::(GAL4 17-mers) ₃ -CYC1-lacZ	Feilotter <i>et al.</i> , 1994

4 Vektoren und rekombinante Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tab. 7: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Vektor/Plasmid	Beschreibung	Referenz
pSK	Phagemid, CoIE1-Replikation, pUC19-Derivat; Amp ^R	Stratagene
pQE30	Expressionsvektor zur Überproduktion von N-terminal "His-getaggten" Proteinen mit IPTG-induzierbarem Promotor; Amp ^R	Qiagen
pRep4	Regulations-Vektor für pQE-Vektoren; Kan ^R , lacR	Qiagen
pMMB208	pMMBHE-Derivat; "broad range" Klonierungsvektor; Cm ^R	Morales <i>et al.</i> , 1991
pDM20	pBR322-Derivat, enthält ein 5996 bp großes EcoRI/XhoI-DNA-Fragment mit den <i>bvgAS</i> -Genen aus <i>B. pertussis</i> ; Amp ^R	Miller <i>et al.</i> , 1989
pGEX-3X	Expressionsvektor zur Überproduktion von N-terminalen GST-Fusionsproteinen mit IPTG-induzierbarem Promotor, Amp ^R	Amersham Pharmacia, Biotech
pla57vir	pLAFR2-Derivat enthält den <i>bvgAS</i> -Genlocus aus <i>B. pertussis</i> ; Tc ^R	Arico <i>et al.</i> , 1987
pProm-67	pGEM3-Derivat; enthält ein 1250 bp großes PstI/PstI-DNA-Fragment mit den Promotorregionen des <i>bvgAS</i> -Locus und des <i>phaB</i> -Gens; Amp ^R	Scarlato <i>et al.</i> , 1990
pGBT9	Expressionsvektor in <i>S. cerevisiae</i> im YTH System, GAL4 ₍₁₋₁₄₇₎ DNA-BD, TRP1, Amp ^R	Clontech, USA
pGAD424	Expressionsvektor in <i>S. cerevisiae</i> AH109 im YTH System, GAL4 ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ AD, LEU2, Amp ^R	Clontech, USA
pVA3	enthält cDNA von murinem p53 ₍₇₂₋₃₉₀₎ im Expressionsvektor pGBT9, TRP1, Amp ^R , Kontrollvektor im YTH System	Matchmaker Clontech, USA
pTD1	enthält cDNA von SV40 T-Ag ₍₈₄₋₇₀₈₎ im Expressionsvektor pGAD3F, LEU2, Amp ^R , Kontrollvektor im YTH System	Matchmaker Clontech, USA
pLAM5'	enthält cDNA von humanem LaminC ₍₆₆₋₂₃₀₎ im Expressionsvektor pGBT9, Kontrollvektor im YTH System	Matchmaker Clontech, USA
pCL1	enthält wildtypisches GAL4 Gen in einem YCp50-Derivat, LEU2, Amp ^R , Kontrollvektor im YTH System	Matchmaker Clontech, USA
pGBT9- <i>bvgSPAS</i>	trägt ein 350 bp großes DNA-Fragment, das der Sequenz der PAS-Domäne von <i>bvgS</i> aus <i>B. bronchiseptica</i> 7865 entspricht	diese Arbeit
pGBT9- <i>bvgSPP</i>	trägt 1700 bp großes DNA-Fragment, das der Sequenz der periplasmatischen Domäne ohne Transmembran-Domänen von <i>bvgS</i> aus <i>B. bronchiseptica</i> 7865 entspricht	diese Arbeit
pGBT9- <i>bvgSHpt</i>	trägt 490 bp großes DNA-Fragment, das der Sequenz der Hpt-Domäne von <i>bvgS</i> aus <i>B. bronchiseptica</i> 7865 entspricht	diese Arbeit
pGAD424-GB- <i>B. bronchiseptica</i> 7865	trägt <i>B. bronchiseptica</i> 7865 Genbank mit 1000 bp großen Fragmenten chromosomaler DNA	diese Arbeit
pGEX-BB0602	pGEX-3X- Derivat zur Überexpression des GST::BB0602 Fusionsproteins, Genebank-Nummer: 887152	diese Arbeit
pGEX-BB2599	pGEX-3X- Derivat zur Überexpression des GST::BB2599 Fusionsproteins, Genebank-Nummer: 889136	diese Arbeit
pGEX-BB4594	pGEX-3X- Derivat zur Überexpression des GST::BB2599 Fusionsproteins, Genebank-Nummer: 891127	diese Arbeit
pGEX-BB1905	pGEX-3X- Derivat zur Überexpression des GST::BB2599 Fusionsproteins, Genebank-Nummer: 888450	diese Arbeit
pQE30- <i>bvgSPAS</i>	pQE30-Derivat zur Überexpression des His ₆ - <i>BvgSPAS</i> -Fusionsproteins	diese Arbeit

pSK- <i>bvgA_{fus}</i>	trägt 623 bp großes <i>Bam</i> HI/ <i>Kpn</i> I- Fragment, das zusammengesetzt ist aus der Outputdomäne des <i>bvgA</i> -Gens aus <i>B. pertussis</i> T1-SN und der Receiver - und Linkerdomäne des <i>bvgA</i> -Gens aus <i>B. holmesii</i> G7702	diese Arbeit
pQE30- <i>bvgA_{fus}</i>	pQE30-Derivat zur Überexpression des His ₆ - <i>BvgA_{fus}</i> -Fusionsproteins	diese Arbeit
pSK- <i>bvgA_{BPup}</i> - <i>bvgA_{fus}</i>	trägt ein 840 bp großes <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI-DNA-Fragment mit einer Fusion zwischen dem upstream Bereich von <i>bvgA</i> aus <i>B. pertussis</i> T1-SN und dem konstruierten <i>bvgA_{fus}</i>	diese Arbeit
pMMB208- <i>bvgA_{BPup}</i> - <i>bvgA_{fus}</i>	trägt 840 bp großes <i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI-DNA-Fragment mit einer Fusion zwischen dem upstream Bereich von <i>bvgA</i> aus <i>B. pertussis</i> T1-SN und <i>bvgA</i> aus <i>B. holmesii</i> G7702; Cm ^R	diese Arbeit
pSK- <i>bvgA_{BH}</i> *	trägt 623 bp großes DNA-Fragment, das der Sequenz von <i>bvgA_{BH}</i> bis auf vier Aminosäureaustausche (L124M, T125S, A139T, I140V) im HTH-Motiv entspricht	diese Arbeit
pQE- <i>bvgA_{BH}</i> *	pQE30-Derivat zur Überproduktion des His ₆ - <i>BvgA_{BH}</i> *-Fusionsproteins	diese Arbeit
pSK- <i>bvgA_{BPup}</i> - <i>bvgA_{BH}</i> *	trägt ein <i>Bam</i> HI/ <i>Sma</i> I-DNA-Fragment mit einer Fusion zwischen der upstream Region von <i>bvgA</i> aus <i>B. pertussis</i> T1-SN und der Sequenz von <i>bvgA_{BH}</i> * aus <i>B. holmesii</i> G7702, Amp ^R	diese Arbeit
pMMB208- <i>bvgA_{BPup}</i> - <i>bvgA_{BH}</i> *	trägt ein <i>Bam</i> HI/ <i>Sma</i> I-DNA-Fragment mit einer Fusion zwischen der upstream Region von <i>bvgA</i> aus <i>B. pertussis</i> T1-SN und der Sequenz von <i>bvgA_{BH}</i> * aus <i>B. holmesii</i> G7702, Cm ^R	diese Arbeit
pSL1180- <i>bvgAS_{BH}</i> G7702	trägt ein 4728 bp großes <i>Spe</i> I/ <i>Eco</i> RI-DNA-Fragment, mit dem <i>bvgAS</i> -Locus und der <i>bvgA_{BHup}</i> -Region aus <i>B. holmesii</i> G7702	Gerlach, 2004

5 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Genosys synthetisiert und geliefert.

M13 Universal:	5' - gta aaa cga cgg cca gt -3'
M13 Reverse:	5' - aac agc tat gac cat g - 3'
pQE-5:	5' - ccc gaa aag tgc cac ctg ac - 3'
pQE-3:	5' - tcc agt aat gac cta gat ag - 3'
pGEX-5:	5' - ggg ctg gca agc cac gtt tgg tg - 3'
pGEX-3:	5' - ccg gga gct gca tgt gtc aga gg - 3'
pMMB208/1:	5' - gtt gac aat taa tca tgc gct cgt at - 3'
pMMB208/2:	5' - ctg att taa tct gta tca ggc tga a - 3'
<i>bvgA_{BH}</i> BamHIfor:	5' - cta gcg gga tcc caa aag cta cta att att gat - 3'
<i>bvgA_{BH}</i> KpnIrev:	5' - gta ggc ggt acc tca ccc cag att att tcg ttt ggc - 3'
<i>bvgA_{BH}</i> EcoRIrev:	5' - gtc cgg gaa ttc cat cgc gtc gtc ctg gtt ttc gac - 3'
<i>bvgA_{BP}</i> -O-EcoRI:	5' - ggc tgc gaa ttc ctc atc agc gtg ttg tcc aac cgc - 3'
<i>bvgA_{BP}</i> -O-KpnI:	5' - cgg gtc ggt acc ggc gag att gtt gcg ttt ggc gag - 3'
<i>bvgA</i> EcoRIMutfor:	5' - cag gac gac gcg atg ctc atc agc gtg ttg tcc - 3'
<i>bvgA</i> EcoRIMutrev:	5' - cac gct gat gag cat cgc gtc gtc ctg gtt ttc - 3'
fhaBup5:	5' - cgc gga tcc gtt tga cta aga aat ttc cta - 3'
fhaBup3:	5' - aat ggt cc gca ctt cgt cag tca gt - 3'
KompBvgS5:	5' - ccc gcg cag gca agc cag gag ctg - 3'
KompBvgS3:	5' - ctt gcg ggc cag cca acg cca gtc - 3'
fhaB-PE:	5' - gtg caa tgc teg ctc acg gga aca - 3'
<i>bvgA_{up}</i> <i>A_{BP}</i> -PE:	5' - gat aag aag aat atg ctt tga - 3'
<i>bvgA_{BPup}</i> HindIII:	5' - ggc cag aag ctt cgt ata ggc gtg cgc cga caa cc - 3'
<i>bvgA_{BPup}</i> KpnI:	5' - gcg tgc ggt acc gat aag aag aat atg ctt - 3'
<i>bvgA_{fus}</i> KpnI:	5' - gcg tac ggt acc atg caa aag cta cta att att gat - 3'
<i>bvgA_{fus}</i> BamHI:	5' - gcg cta gga tcc cta ggc gag att gtt gcg ttt - 3'
<i>bvgA_{fus}</i> KpnIMutfor:	5' - aag cat att ctt ctt atc atg caa aag cta cta - 3'

bvgA _{fus} KpnIMutrev:	5' - atc aat aat tag tag ctt ttg cat gat aag aag - 3'
ScreenIfor:	5' - ttt gac gca tca atg aca tta cgc gtt - 3'
ScreenIrev:	5' - tcc tgc aac gcg taa tgt cat tga tgc gtc - 3'
bvgA _{BH} (LT)Mutfor:	5' - tta ttg gct caa ggc atg tcc aat aaa gat att - 3'
bvgA _{BH} (LT)Mutrev:	5' - ggc aat atc ttt att gga cat gcc ttg agc caa - 3'
bvgA _{BH} (AI)Mutfor:	5' - ttt ctg agc aat aaa acc gtc agt act tac aaa - 3'
bvgA _{BH} (AI)Mutrev:	5' - ggt ttt gta agt act gac ggt ttt att gct cag - 3'
bvgA _{BPup} BamHI:	5' - cag ccg gga tcc cgt ata ggc gtg cgc cga caa ccc - 3'
bvgA _{BH} *SmaI:	5' - cgc gtc ccc ggg tca ccc cag att att tcg ttt ggc cat - 3'
ScreenAfor:	5' - gag ctg ctc ccc aac ctg gtg att ctg gac - 3'
ScreenArev:	5' - gtc cag aat cac cag gtt ggg gag cag ctc - 3'
bvgSPPfor:	5' - agc cgg gaa ttc tgg ctg gcc cgc aag cgg - 3'
bvgSPPrev:	5' - gag gga tcc cgt tgc ggt agg cgt acc - 3'
bvgSPASfor:	5' - gga tgc gaa ttc ccc atc tat gtg cgc gat - 3'
bvgSPASrev:	5' - gtc cgg gga tcc tca ggc gcg ttc ggt gat gtc - 3'
bvgSHptfor:	5' - agc cgg gaa ttc ccc tcg ccc cag gct gcc - 3'
bvgSHptrev:	5' - gag ccg gga tcc ctg atc ttg atg cgg ccg - 3'
pGAD424for:	5' - tac cac tac aat gga tg - 3'
pGAD424rev:	5' - caa ctt cac ttg aac gcc cc - 3'
pGBT9for:	5' - tca tcg gaa gag agt ag - 3'
pGBT9rev:	5' - gca aaa ttt tgg att ctc agt g - 3'
pGEX-BB0602-BamHI:	5' - ctg gcc gga tcc gcg cct ctg aga ata cct tg - 3'
pGEX-BB0602-EcoRI:	5' - gct agc gaa ttc tca aag gcc cag ata cgc - 3'
pGEX-BB2599-BamHI:	5' - gcg cac gga tcc gca ccg gct tcg att tcg tcg tc - 3'
pGEX-BB2599-EcoRI:	5' - ttg agg gaa ttc tca gta agg cag cca cgt cgc - 3'
pGEX-BB4595-BamHI:	5' - ctg gcc gga tcc gcg caa atc ccc cga gca acg gc - 3'
pGEX-BB4594-EcoRI:	5' - gct agc gaa ttc tca tgt tcg tcg cgg gtc cag - 3'
pGEX-BB1905-SmaIfor:	5' - gtc cgc ccc ggg gcc ccc aac cat ttc cgc ctc - 3'
pGEX-BB1905-SmaIrev:	5' - gtc aga ccc ggg tca gaa cca cgc ctg cag ccc cac - 3'
pQE-bvgSPAS-BamHI:	5' - aat agg atc ccg gcg cca gat ccg cca gcg caa - 3'
pQE-bvgSPAS -HindIII:	5' - tac caa gct ttc agg cgc gtt cgg tga tgt cga tcc - 3'

6 Verbrauchsmaterialien

6.1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth, Bioproducts, Boehringer Mannheim, Serva, Aldrich, Fluka, Oxoid, Riedel de Haan und Sigma bezogen. Nährstoffe und Agar wurden von Difco und Gibco geliefert. Die Radiochemikalien wurden bei Amersham und ICN bestellt.

6.2 Enzyme

Die Enzyme wurden von Appligene, Boehringer Mannheim, New England Biolabs, Pharmacia-LKB, Gibco-BRL und Stratagene geliefert.

6.3 Sonstiges

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden die Kits von Qiagen bzw. Macherey & Nagel, zur Aufreinigung von PCR-Produkten die Säulen aus dem Qiagen-Kit verwendet. Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Hefen und zur DNA-Transformation mit geringerer Effizienz in Hefen wurden Kits der Firma MoBiTec verwendet. Zur DNA-Transformation mit hoher Effizienz wurde ein Kit von BD Bioscience verwendet.

7 Wachstumsmedien und Zusätze

Medien für Flüssigkulturen und Agarplatten wurden autoklaviert (120°C, 20min) und hitzelabile Substanzen sterilfiltriert und nach Abkühlen der Lösungen auf 37°C zugegeben.

7.1 Wachstumsmedien für Bakterien

<u>LB-Medium (Luria-Bertani):</u>	Bactotrypton	10 g
	Hefe-Ektrakt	5 g
	NaCl	10 g
	dH ₂ O	ad 1l
<u>LB-Agar:</u>	LB-Medium + Agar	15 g/l
LB-Agarplatten für blau/weiß-Selektion:	LB-Medium + Agar	15g/l

Nach dem Autoklavieren sterile Zugabe von 500µl IPTG (20%) und 1,2 ml X-Gal (2% in DMF).

<u>Bordet-Gengou-Platten (BG-Platten):</u>	Bordet-Gengou-Agar-Basis	30 g
	Glycerin	10 g
	dH ₂ O	ad 1,0 l

Nach dem Autoklavieren des und Abkühlen des BG-Agars auf ca. 45°C werden 200 ml defibriniertes Pferdeblut hinzugeben.

<u>5x Stainer Scholte Medium (5xSS):</u>	Na-Glutamat	53,6 g
	L-Prolin	1,2 g
	NaCl	12,5 g
	KH ₂ PO ₄	2,5 g
	KCl	1,0 g
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,5 g
	Tris-HCl	7,5 g
	dH ₂ O	ad 1,0 l
		pH 7,6

<u>1 x Stainer Scholte Medium (1xSS):</u>	CaCl ₂ (10 mg/ml)	2 ml
	5x SS	200 ml
	100x Supplement (s.u.)	10 ml
	Casaminoacids (100 mg/ml)	10 ml
	Cyclodextrin (50 mg/ml)	10 ml
	dH ₂ O	ad 1,0 l

1x SS ist bei 4-8°C nur ca. 3 Monate haltbar.

Casaminoacids: in H₂O lösen, sterilfiltrieren.

Cyclodextrin: in H₂O lösen, sterilfiltrieren.

100x Supplement:	L-Cystin	200 ml
	HCl	0,5 ml
	dH₂O	ad 4,5 ml
	FeSO ₄ x H ₂ O	50 mg

Ascorbinsäure	100 mg
Nicotinsäure	20 mg
Glutathion	500 mg
dH ₂ O	ad 45 ml

Beide Lösungen mischen und sterilfiltrieren.

7.1.1 Medienzusätze

<i>Antibiotika</i>	<i>Stammlösung</i>	<i>Endkonzentration</i>
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Chloramphenicol	30 mg/ml in 100% EtOH	20 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in dH ₂ O	50 µg/ml
Streptomycin	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Tetracyclin	12,5 mg/ml in 50% EtOH	12,5 µ/ml
IPTG	100 mM	1 mM; 0,1mM

7.2 Wachstumsmedien für Hefen

<u>YPD-Medium:</u>	Difco Pepton	20 g
	Hefeextrakt	10 g
	dH ₂ O	ad 1 L
<u>YPD-Platten:</u>	YPD-Medium	
	+ Agar	20 g/l
<u>YPDA-Medium:</u>	Difco Pepton	20 g
	Hefeextrakt	10 g
	dH ₂ O	ad 1L

Nach dem Autoklavieren mit 2% (w/v) Glukose und 0,003% Adenin-Hemisulfat supplementieren, für Agarplatten wurde 2% (w/v) Agar zugegeben .

<u>SD-Medium:</u>	Difco Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren	6,7 g
	dH ₂ O	ad 1L

Der pH-Wert wurde auf 5,8 eingestellt und das Medium autoklaviert. Zusätzlich werden nach dem Autoklavieren 100 ml der entsprechenden Dropout-Lösung und 50 ml einer 40%igen sterilfiltrierten Glucose-Lösung zugegeben.

10x Dropout-Lösung:

L-Adenin Hemisulfat	200 mg/L	L-Threonin	2000 mg/L
L-Arginin HCl	200 mg/L	L-Tryptophan	200 mg/L
L-Histidin HCl Monohydrat	200 mg/L	L-Tyrosin	300 mg/L
L-Isoleucin	300 mg/L	L-Tyrosin	300 mg/L
L-Leucin	1000 mg/L	L-Uracil	200 mg/L
L-Lysin HCl	300 mg/L	L-Valin	1500 mg/L
L-Methionin	200 mg/L		
L-Phenylalanin	500 mg/L		

7.2.1 Medienzusätze

40 % Glukose:	sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C
1M 3-Amino-1,2,4-triazole	sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C

8 Molekulargewichtsmarker

8.1 Molekulargewichtsmarker für die Agarosegelelektrophorese

DNA-Marker von MBI: GeneRuler™ 1 kbp-Leiter, hergestellt aus sechs verschiedenen Plasmiden, mit pUC-, λ- Phagen- und Hefe-Genom-Sequenzen.

Fragmentlängen: 10000 bp 4000 bp 2000 bp 500 bp
 8000 bp 3500 bp 1500 bp 250 bp
 6000 bp 3000 bp 1000 bp
 5000 bp 2500 bp 750 bp

8.2 Molekulargewichtsmarker für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

<u>BioRad Broad-Range-Marker:</u>	200 kDa	Myosin
	116,25 kDa	β-Galactosidase
	97,4 kDa	Phosphorylase b
	66,2 kDa	Serumalbumin
	45 kDa	Carboanhydrase
	21,5 kDa	Trypsininhibitor
	14,4 kDa	Lysozym
	6,5 kDa	Aprotinin

BioRad Precision Protein Standard, Prestained:

250 kDa
 150 kDa
 100 kDa
 75 kDa
 50 kDa
 37 kDa
 25 kDa
 15 kDa
 10 kDa

D Methoden

1 Molekularbiologische und genetische Techniken

1.1 Isolierung von DNA

1.1.1 Isolierung chromosomaler DNA

- Lösung 1 : 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
- Lösung 2 : 400 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0.5% SDS
- Lösung 3 : 1mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)

Die Isolation der chromosomalen DNA erfolgt aus Flüssigkulturen. Hierfür wird jeweils 50 ml einer logarithmischen Bakterienkultur für 15 min abzentrifugiert (6000 rpm, 4°C) und in 10 ml Lösung 1 resuspendiert. Danach werden die Bakterien geerntet und in 10 ml Lösung 1 resuspendiert. Die Zellsuspension wird dann für mindestens 30 min bei -20°C eingefroren und im Anschluss in ein Eisbad gestellt. Zu den gefrorenen Zellen gibt man 100 µl Lysozym-Lösung (100 mg/ml), lässt sie langsam auftauen und dann noch für etwa 45 min auf Eis stehen. Dann fügt man 6 ml Lösung 2 und 2 ml ProteinaseK (Endkonzentration 1 mg/ml) hinzu und inkubiert 60 min im 50°C Wasserbad. Anschließend wird 2x mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) extrahiert, wobei nur vorsichtig geschwenkt werden darf, um eine Zerstörung der DNA durch Scherkräfte zu vermeiden. Die Phasentrennung erreicht man jeweils durch eine 5 minütige Zentrifugation bei 4000 rpm. Die zähflüssige, wässrige Phase wird zur DNA-Fällung mit 0,1 Vol 5 M NaCl und 2 Vol eiskaltem Ethanol versetzt. Die durch behutsames Schwenken ausfallende DNA wird mit einer Pasteur-Pipette entnommen, in 5 ml Lösung 3 mit 150 µl RNase (10 mg/ml) resuspendiert und ÜN bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wird nochmals je einmal mit 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) und einmal mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) extrahiert. Die DNA wird schließlich wie oben beschrieben gefällt, 15 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert, getrocknet und in einem geeigneten Volumen dH₂O gelöst. Die gewonnene DNA wird bei 4°C aufbewahrt.

1.1.2 Plasmidpräparation im analytischen Maßstab (Minipräparation)

- Lösung 1: 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM Glukose, 10 mM Na-EDTA
- Lösung 2: 0,2 M NaOH, 1% SDS
- Lösung 3: 3 M Kaliumacetat (pH 4,8)
- Bindemix: 0,25% SiO₂, 5 M Guanidiniumchlorid, 4% (w/v) Triton X-100

Von einer Übernachtskultur werden 1,5 ml bei 14000 rpm abzentrifugiert, das Sediment in 100µl Lösung 1 aufgenommen und 3 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100µl Lösung 2 (Denaturierungslösung) wird der Ansatz gut gemischt, 3 min. bei Raumtemperatur inkubiert und mit 100µl Lösung 3 versehen. Nach weiteren 3 min. Inkubationszeit bei Raumtemperatur werden die Zelltrümmer und chromosomale DNA bei 3 min. bei 14000 rpm sedimentiert. Der plasmidhaltige Überstand wird mit 800µl Bindemix (Lagerung bei Raumtemperatur, vor Verwendung gut mischen) versetzt und gut gemischt. Nach dreiminütiger Inkubationszeit wird der Ansatz wieder gut gemischt und die Silikamatrix kurz abzentrifugiert, indem die Zentrifuge gestartet und bei Erreichen von ca. 8000 rpm wieder gestoppt wird. Längeres Zentrifugieren empfiehlt sich nicht, da dann das Pellet im darauffolgenden Schritt schwer zu resuspendieren ist. Der Überstand wird verworfen und das Pellet zweimal mit 1 ml Ethanol (50%) gewaschen, wobei kräftiges Vortexen von Nöten ist. Eine vollständige Resuspension des Pellets ist dabei nicht zu erreichen, da Silikagel und DNA „verkleben“ und kleine Klumpen bilden. Nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand abermals verworfen und das Pellet ca. 3 min in der unter Vakuum getrocknet. Die DNA wird dann in 25µl dH₂O durch Resuspendieren und anschließendem dreiminütigem Erhitzen auf 65°C von der Silika-Matrix gelöst. Die Glasmilch wird durch Zentrifugation pelletiert und die gelöste Plasmid-DNA für nachfolgende Schritte in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

1.1.3 Plasmidpräparation im analytischen Maßstab mittels GFX Micro Plasmid Prep Kit von Amersham Biosciences (Minipräparation)

1,5 ml einer ÜNK werden in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß für 30 Sekunden abzentrifugiert. Der Überstand wird abgezogen und das Pellet in 150 µl Lösung 1 gut resuspendiert. Nach der Zugabe von 150 µl Lösung 2 wird das Reaktionsgefäß 10-15mal vorsichtig geschwenkt. Nachdem die Suspension klar geworden ist, werden 300 µl Lösung 2 hinzugegeben und das Reaktionsgefäß weitere 10-20mal geschwenkt. Die Zelltrümmer werden durch eine 5 minütige Zentrifugation pelletiert und der Überstand auf eine GFX-Säule gegeben, die zuvor auf ein Sammelgefäß gesetzt wurde. Nach einer 1 minütigen Inkubation bei RT wird für 30 Sekunden zentrifugiert, der Durchfluss verworfen, und die Säule mit 400 µl Waschpuffer gewaschen, bevor sie dann auf ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt wird. Die Elution der DNA von der Matrix erfolgt mit 50 µl dH₂O.

1.1.4 Plasmidpräparation im präparativen Maßstab Nucleobond[®]-AX-Kit von Macherey & Nagel (Midipräparation)

Nucleobond AX-100 Säulen von Macherey & Nagel erlauben die Präparation von bis zu 100 µg DNA aus einer 10-100 ml Bakterienkultur.

50 ml einer Übernachtskultur werden abzentrifugiert (15 min 6000 rpm bei 4°C). Die sedimentierten Bakterien werden in 4 ml S1-Puffer (50 mM Tris-HCl) resuspendiert und zur alkalischen Lyse mit 4 ml S2-Puffer (200 mM NaOH, 1% SDS) versetzt. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei RT fügt man 4 ml S3-Puffer (2,8 M KOAc, pH 5,2) hinzu. Nach vorsichtigem Schwenken und weiteren 5-10 min auf Eis wird die Suspension durch ein Filterpapier gefiltert. Der klare Überstand wird im Anschluss auf eine zuvor mit 2 ml N2-Puffer (100 mM Tris-H₃PO₄ (pH 6,3), 15% EtOH, 900 mM KCl) äquilibrierte Nucleobond AX-100 Säule gegeben. Die Säule wird zweimal mit N3-Puffer (100 mM Tris-H₃PO₄ (pH 6,3), 15% EtOH, 1,3 M KCl) gewaschen, bevor durch Zugabe von 4 ml N5-Puffer (100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 15% EtOH, 1M KCl) die Elution der Plasmid-DNA erfolgt. Durch Zugabe von 0,7 Vol Isopropanol wird die Plasmid-DNA bei RT gefällt und 30 min bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 70% EtOH gewaschen und anschließend in einem geeigneten Volumen dH₂O aufgenommen.

1.2 Fällung von DNA

Um DNA zu fällen, gibt man 0,1 Vol 3 M NaOAc (pH 5,2) und 2,5 Vol 100% EtOH zu dem Ansatz, der die DNA enthält. Man mischt sorgfältig und zentrifugiert anschließend 20 min (14 000 rpm, 4°C). Um noch vorhandene Salzreste zu entfernen, wird die DNA mit 70% EtOH gewaschen. Das Pellet wird in der SpeedVac getrocknet und in einem geeigneten Volumen dH₂O aufgenommen.

1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Für eine Konzentrationsbestimmung wird die DNA-Probe 1:100 mit dH₂O verdünnt. Die Extinktion wird photometrisch bei 260 und 280 nm gemessen. Die Konzentration wird anhand der folgenden Formel berechnet:

$$\text{DNA-Konzentration (}\mu\text{g/ml)} = \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$$

Der Quotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ gibt dabei den Reinheitsgrad an und sollte zwischen 1,5 und 2 liegen.

1.4 Enzymatische Modifikation von DNA

1.4.1 Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme prokaryotischer Herkunft, die im DNA-Doppelstrang eine spezifische Nucleotidfolge, meistens eine Sequenz von vier bis sechs Basen erkennen und dort Schnittstellen erzeugen.

Für die Spaltung von 0,5-2 µg Plasmid-DNA werden 1-4 Units Enzym in einem Endvolumen von 10-100 µl eingesetzt. Das Enzymvolumen sollte 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da sich das im Lagerpuffer der Restriktionsendonukleasen enthaltene Glycerin negativ auf die Effizienz und Spezifität der Spaltreaktion auswirken kann. Die Zusammensetzung des Restriktionspuffers und die Reaktionsbedingungen werden wie vom Enzym-Hersteller empfohlen gewählt.

Bei Spaltung mit zwei Enzymen sind gelegentlich die Puffer- und Inkubationsbedingungen nicht vereinbar, so dass sukzessiv gespalten werden muss (zum Beispiel wenn Endonukleasen von zwei verschiedenen Firmen mit

ihrem jeweiligen optimierten Puffersystem verwendet werden müssen). Am effizientesten ist die Aufreinigung und Umpufferung der DNA zwischen zwei Spaltungen über die QIAquick-spin-Säule von Qiagen (1.3.2). Die Spaltungsreaktion kann durch Hitzeaktivierung, Phenolextraktion oder Zugabe von 2,5x HSE-Probenpuffer (1.3.1) gestoppt und das Restriktionsmuster durch elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel (1.3.1) analysiert werden. Für eine effiziente Spaltung chromosomaler DNA werden 20 - 30 Units Restriktionsendonuclease eingesetzt. Die Restriktion erfolgt über Nacht.

1.4.2 Ligation

• 5 x Ligase-Puffer	250 mM Tris-HCl (pH 7,5)
	50 mM MgCl ₂
	100 mM DTT
	5 mM ATP

Die T4-Ligase verknüpft unter ATP-Verbrauch freie 3'-Hydroxylenden mit 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA. Im Gegensatz zur *E.coli*-Ligase kann sie nicht nur kohäsive (sticky), sondern auch glatte (blunt) Enden verbinden.

Ein typischer Ligationsansatz besitzt ein Gesamtvolumen von 10µl und setzt sich wie folgt zusammen. Der Klonierungsvektor und das zu klonierende DNA-Fragment werden in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:5 eingesetzt und mit 0,2 Volumen 5x Ligase-Puffer sowie 1 µl T4- Ligase (1U/µl) gemischt. Bei der Ligation von Fragmenten mit kohäsiven Enden ist eine etwa zweistündige Inkubation bei 23-26 °C ausreichend. Eine Inkubationszeit von mindestens 16 Stunden bei 16°C ist bei der Ligation von glatten Enden aufgrund der geringen Effizienz der Ligasereaktion erforderlich.

1.4.3 Alkalische Phosphatase Reaktion von DNA-Fragmenten

Um bei einer Ligation zu verhindern, dass der Vektor mit sich selbst religiert, oder um eine DNA-Sonde für die Endmarkierung durch ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP vorzubereiten, wird durch eine alkalische Phosphatase (AP) die 5'-Phosphatgruppe am Fragmentende abgespalten. Der Reaktionsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

DNA-Pellet resuspendiert in H ₂ O	5 µl
10x AP-Puffer	1 µl
Alkalische Phosphatase (1U/µl)	1 µl
dH ₂ O	ad 10 µl

Die Inkubation erfolgt bei 37°C für 45 min. Soll die DNA für eine Endmarkierung durch ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP eingesetzt werden, muss der Reaktionsansatz zweimal mit 1 Vol Phenol extrahiert werden.

1.5 Isolierung von RNA

1.5.1 Isolierung von RNA aus *Bordetella*-Stämmen mittels RNeasy Kit von Qiagen (Minipräparation)

Wegen des hohen Risikos einer RNase Kontamination erfordern Versuche mit RNA besondere Vorkehrungen. So werden alle Lösungen- sofern sie keine aminohaltigen Puffersysteme wie Tris-HCl enthalten mit dem RNase-Hemmstoff Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Hierzu werden die Lösungen mit 0,1% DEPC bei 37°C über Nacht inkubiert und im Anschluss zweimal autoklaviert. Das Tragen von Handschuhen soll außerdem helfen, die RNA-Proben vor RNase-Kontaminationen durch den Experimentator zu schützen

DEPC-H₂O: 100µl DEPC
 ad 1L H₂O

TE-Puffer: 60 mg Tris
 18,6 mg Na₂EDTA
 ad 50 ml DEPC-H₂O
 pH mit HCl auf 7,5 einstellen

Alle sonstig erforderlichen Puffer sind dem Kit beigelegt.

10 ml einer Flüssigkultur werden bei einer OD_{600} von ca. 0,25 abzentrifugiert (5000 x g, 5 min, 4°C). Das Bakterienpellet wird in 200µl Lysispuffer (400 µg/ml Lysozym in TE-Puffer) resuspendiert. Nach der Zugabe von 350µl RLT-Puffer wird die Suspension durch einen 0,9 mm Nadelaufsatz mit Spritze homogenisiert, um die RNA-Ausbeute zu erhöhen. Der Suspension wird 250µl 100% EtOH zugegeben und gut vermischt. Die Probe wird auf eine RNeasy Mini-Säule gegeben und 15s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Die Säule wird durch Zugabe von 700µl RW1-Puffer gewaschen. Nach dem Transfer der Säule in ein neues Auffanggefäß, wird die Probe 2 x mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Die Elution der RNA erfolgt durch Zugabe von 30 - 50 µl DEPC-H₂O.

1.5.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung von RNA erfolgt wie für DNA (1.1.5), aber mit folgender Umrechnungsformel:

$$\text{RNA-Konzentration } (\mu\text{g/ml}) = OD_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$$

Der Quotient $OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}$ gibt hier ebenfalls den Reinheitsgrad an und sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen.

1.6 Auftrennung, Analyse und Aufreinigung von DNA-Molekülen

1.6.1 horizontale Agarose-Gelelektrophorese

- 10x TBE-Puffer:
 - 890 mM Tris-HCl
 - 890 mM Borsäure
 - 2 mM EDTA
- 2,5x HSE-Auftragungspuffer:
 - 4 mM Harnstoff
 - 50 mM EDTA
 - 50 % Saccharose
 - 0,1 % Bromphenolblau
 - 0,1 % Xylencyanolblau

DNA-Moleküle können mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese in Abhängigkeit von ihrer Größe aufgetrennt werden. Ein DNA-Molekül wandert im elektrischen Feld mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus seines Molekulargewichts ist. Der Auftrennungsbereich hängt vom Agarose-Gehalt des Gels ab. Bei einem 1%igen Agarose-Gel erreicht man die optimale Trennung von DNA-Molekülen mit einer Größe von 1-10 kb. Die geeignete Menge an Agarose wird mit 1x TBE-Puffer versetzt und unter mehrmaligem Aufkochen in der Mikrowelle vollständig gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 50°C wird Ethidiumbromid (Endkonzentration 3 µg/µl) hinzu gegeben, die flüssige Gel-Lösung in einen horizontalen Gel-Schlitten gegossen und ein Gel-Kamm eingesetzt. Nach dem Erstarren des Gels entfernt man den Kamm wieder, gibt den Schlitten in eine Gel-Kammer und bedeckt ihn mit 1x TBE-Puffer. Die DNA-Proben werden vor dem Auftragen mit 0,6 Vol 2,5x HSE-Auftragungspuffer versetzt. Gleichzeitig wird ein Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt dann bei 100-150 Volt. Die durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid gefärbten Nukleinsäuren können unter UV-Licht analysiert und fotografiert werden (Mitsubishi-Videoprinter).

1.6.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen mittels „QIAquick Gel Extraction Kit“ von Qiagen

Dieses Verfahren ermöglicht die Elution von DNA-Molekülen mit einer Größe von 70 bp-10 kbp. Das entsprechende DNA-Fragment wird unter UV-Licht aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten, gewogen, mit 3 Vol QG-Puffer versetzt und für ca. 10 min bei 50°C inkubiert. Nach vollständiger Auflösung des Agarose-Gel-Stücks gibt man 1 Vol Isopropanol hinzu. Der Ansatz wird gevortext und im Anschluss auf eine QIA-quick-spin- Säule gegeben. Man zentrifugiert für 1 min bei 14000 rpm, verwirft den Durchfluss und gibt zum Waschen 750µl PE-Puffer hinzu. Nach einem weiteren 1-minütigen Zentrifugationsschritt wird der Durchfluss abermals verworfen. Um das Säulenmaterial zu trocknen, wird die Säule noch einmal im leeren Zustand zentrifugiert. Die Elution der DNA erfolgt durch Zugabe von 30-50 µl Elutions-Puffer und einer 1-minütigen Zentrifugation bei 14000 rpm.

1.6.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mittels eiskalter Phenolextraktion

Diese Methode eignet sich besonders für die Isolierung von DNA-Fragmenten, die kleiner als 200 bp bzw. größer als 10 kbp sind. Das entsprechende DNA-Fragment wird unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten, gewogen und durch eine 1 ml Spritze mit großer Kanüle gedrückt. Dann wird ca. 1 Vol Phenol zugefügt und der Ansatz bei -80°C für mindestens eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubationszeit vortext man das Reaktionsgefäß und zentrifugiert bei 14 000 rpm für 5 min. Die wässrige Phase wird mit 0,1 Vol 2 M Natriumacetat (pH 5,5) und 2 Vol EtOH versetzt, 20 min bei -20°C inkubiert und die DNA durch Zentrifugation (20 min, 14 000 rpm, 4°C) gefällt. Das Pellet wird mit 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in dH_2O aufgenommen.

1.7 Transformation von DNA

1.7.1 Transformation von DNA in CaCl_2 -kompetente *E.coli*-Zellen

1.7.1.1 Herstellung CaCl_2 -kompetenter *E.coli*-Zellen

- Lösung 1: 0,1 M CaCl_2
- Lösung 2: 0,1 M CaCl_2 , 20% Glycerin

100 ml LB-Medium werden mit 500 μl einer *E. coli* Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wird bei 37°C inkubiert, bis sie eine optische Dichte (OD_{600}) von ca. 0,5 erreicht hat. Dann werden die Zellen für 15 min auf Eis gestellt und anschließend für 10 min zentrifugiert (4000 rpm, 4°C). Das Bakterienpellet wird in 0,2 Vol eiskalter Lösung 1 resuspendiert und dann 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren 10-minütigen Zentrifugation (4000 rpm, 4°C) wird das Pellet in 0,1 Vol eiskalter Lösung 2 resuspendiert und in Aliquots von 250 μl bei -80°C gelagert.

1.7.1.2 Transformation

Zu 100 μl kompetenten Zellen werden 1-2 μl Plasmid-DNA bzw. 10 μl Ligationsansatz gegeben. Der Suspension wird für 30 min auf Eis gestellt und im Anschluss für 45 sec bei 42°C inkubiert (Hitzeschock). Anschließend wird der Ansatz für 2 min auf Eis gestellt, mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach der Zwischenzüchtung werden die Zellen sedimentiert, das Pellet in 100 μl LB-Medium resuspendiert und auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

1.7.2 Transformation von DNA in elektrokompetente *E.coli*-Zellen

1.7.2.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

100 ml LB-Medium werden mit 500 μl einer *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wird bei 37°C inkubiert, bis sie eine optische Dichte ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) von ca. 0,5 erreicht hat. Die Zellen werden dann durch Zentrifugation (10 min, 6000 rpm, 4°C) sedimentiert und zweimal mit sterilem Wasser gewaschen. Nach einem erneuten Waschschrift mit 1/10 Volumen von 10% Glycerin werden die Zellen in 1/100 Volumen von 10% Glycerin resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

1.7.2.2 Elektroporation

Für die Elektroporation werden 100 μl der elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und 5-10 μl eines Ligationsansatzes hinzugegeben. Der Ansatz wird dann luftblasenfrei auf den Grund einer gekühlten und sterilen Elektroporationskammer gegeben. Dann wird bei 600 Ohm, 2,5 Thilovolt und 25 μFarad elektroporiert und sofort 1 ml BHI-Medium hinzugegeben. Zur phänotypischen Expression lässt man die Bakterien ein bis zwei Stunden bei 37°C inkubieren und kann sie anschließend auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattieren.

1.8 Anlegen von Glycerinkulturen

Von einer Übernachtskultur der zu konservierenden Bakterienzellen werden 800µl Bakteriensuspension mit 200µl sterilem Glycerin versetzt. Der Ansatz wird gründlich mit dem Vortexer gemischt und die Suspension bei -80°C gelagert. Bei einer Lagerung bei -20°C werden 500µl Bakterienkultur und 500µl steriles Glycerin vermischt.

1.9 Konjugation und Allelaustausch

Die Übertragung von vektoreller DNA in *Bordetella*-Stämme erfolgt mit hoher Effizienz durch Konjugation, d.h. das genetische Material wird von einem Donor-Stamm durch direkten Zellkontakt auf den Rezipienten-Stamm übertragen. Der Donor-Stamm *E.coli* SM10 trägt eine chromosomale Integration des IncP-artigen Plasmids pRP4 mit verschiedenen Transfer-Funktionen.

1.9.1 Allelaustausch

Mit einem speziell für die Gattung *Bordetella* entwickelten Klonierungsvektor (Stibitz *et al.*, 1986) ist die Möglichkeit gegeben, ortsspezifische Mutagenesen im *Bordetella*-Genom durchzuführen. Der Austausch des chromosomalen gegen das klonierte Allel („double crossover“) erfolgt durch die Selektion zweier aufeinanderfolgender Rekombinationsereignisse der homologen Genloci. Der hierfür eingesetzte Vektor pSORTP1 ist ein pRTP1-Derivat und besitzt zusätzlich ein Gentamycin-Resistenzgen. pRTP1 besteht aus einem Gen für eine Ampicillinresistenz, dem *oriT*-Element („origin for conjugative transfer“), und einem Gen für das ribosomale *E. coli* Protein S12. Dieses Protein wird in *Bordetella* effektiv exprimiert und in die Ribosomen eingebaut, so dass streptomycinresistente Stämme in Gegenwart dieses Locus streptomycinsensitiv werden. Sowohl pRTP1 als auch pSOTP1 können in *Bordetella* nicht replizieren. Der erste Selektionsschritt wird auf ampicillin- bzw. gentamycinhaltigen BG-Blutagarplatten durchgeführt, auf denen nur solche Bakterien wachsen, in denen das Plasmid aufgrund eines Rekombinationsvorganges („single allelic exchange“) im Chromosom integriert vorliegt. Das Wachstum des *E. coli*-Donorstammes wird durch ein geeignetes Antibiotikum, gegen das der verwendete *Bordetella*-Stamm resistent ist, unterdrückt. Enthält der *Bordetella*-Rezipient das zur Streptomycinresistenz führende Gen für das ribosomale Protein S12, enthält man durch den zweiten Selektionsschritt auf Agarplatten mit Streptomycin all jene Bakterien, die den Vektor pSOTRTP1 durch einen zweiten Rekombinationsvorgang innerhalb der klonierten Sequenz wieder verloren haben. Enthält das durch dieses „double crossover“ eingeführte Allel zusätzlich einen Selektionsmarker wie z.B. Kanamycin, kann durch entsprechende Selektion sichergestellt werden, dass alle Exkonjuganten die gewünschte Mutation eingebaut haben. Steht für den ersten Rekombinationsschritt keine geeignete Resistenz des Rezipientenstammes zur Selektion gegen den Donor zur Verfügung und besitzt das klonierte Allel einen geeigneten Marker, so kann nach der Konjugation direkt auf einen vollständigen Allelaustausch mit zwei gleichzeitig stattfindenden Rekombinationsereignissen selektioniert werden. Die Effizienz dieses Verfahrens ist allerdings sehr gering.

1.9.2 Durchführung der Konjugation

Drei Tage vor der Konjugation werden die jeweiligen *B. pertussis*- bzw. *B. holmesii*-Stämme großflächig ausgestrichen und bei 37°C inkubiert, der jeweilige *E. coli*-Donor-Stamm ein Tag vor der Konjugation. Zur Konjugation werden dann auf einer vorgewärmten BG-Blutagarplatte ohne Antibiotika eine Impföse voll Bordetellen und ca. 1/5 der Menge *E. coli* auf einem ca. 4 cm großen Areal gut miteinander vermischt und anschließend für ca. 5 h bei 37°C inkubiert. Danach wird nochmals kurz gemischt und ein Selektionsausstrich auf einer BG-Blutagarplatte durchgeführt. Die Antibiotika werden dabei so gewählt, dass lediglich Transkonjuganten wachsen können. Einzelkolonien können nach 3-7 Tagen isoliert und vermehrt oder aber zur Durchführung eines Allelaustausches zur weiteren Selektion eingesetzt werden.

1.10 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988)

1.10.1 Die PCR-Reaktion (Polymerase-chain-reaction)

Das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Die Oligonukleotid-Primer werden im Überschuss zu der DNA-Präparation gegeben. Eine automatische Wiederholung von DNA- Denaturierung (bei 94°C), Primer-Hybridisierung (bei einer Temperatur, die von den

verwendeten Primern abhängig ist) und Primer-Extension (bei 72°C) ermöglicht die exponentielle Amplifikation des DNA-Fragments.

Ein typischer PCR-Ansatz enthält:

10x PCR-Puffer	10 µl
dNTP's (je 20 mM)	1 µl
Primer I (0,5 µg/ml)	1 µl
Primer II (0,5 µg/ml)	1 µl
Template-DNA	x µl
thermostabile Polymerase (1 U/µl)	1 µl
dH ₂ O	ad 100 µl

Der Reaktionsansatz durchläuft 20 bis 40 Zyklen mit folgender Schrittabfolge:

Denaturierung:	60-90 sec. Bei 94°C
Hybridisierung:	1 min. bei 50-65°C (abhängig von den Oligonukleotiden)
DNA-Polymerisation	2 min./kb bei 72°C (abhängig von der Polymerase und der Länge des Fragments)

Als „first delay“ werden typischerweise 3 min. bei 94°C gewählt, als „last delay“ 10 min. bei 72°C (abhängig von der Polymerase). Ein Aliquot von 8-10µl des PCR-Ansatzes wird zur Überprüfung der Reaktion auf ein Agarosegel (1.3.1) aufgetragen. Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgt sehr effizient über ein Agarosegel mit anschließender Elution mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ von Quiagen (1.3.2) oder direkt mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ derselben Firma (1.5.2)

1.10.2 Reinigung von PCR-Produkten über QIAquick-Säulchen (Qiagen)

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten mit einer Größe zwischen 100 bp und 10 kbp wird der „QIAquick PCR Purification Kit“ von Quiagen verwendet. Der PCR-Ansatz wird mit 5 Vol PB-Puffer versetzt und auf ein QIAquick-Säulchen gegeben. Man zentrifugiert kurz (30 sec bei 14000 rpm), verwirft den Durchfluss und wäscht mit 750 µl PE-Puffer (30 sec bei 14000 rpm). Das Säulchen wird durch einen erneuten Zentrifugationsschritt getrocknet. Die Elution der DNA von der Matrix erfolgt mit 30-50 µl dH₂O.

1.11 DNA-Sequenzierung

1.11.1 Automatische DNA-Sequenzierung mit dem CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit (P/N 608120) von Beckman Coulter

- Quick Start Master Mix (QSM): wird im DTCS Quick Start Kit mitgeliefert.
- Stopp-Lösung:

1 Vol	3 M NaOAc (pH 5,2)
2 Vol	0,1 M EDTA
1 Vol	Glycogen (20 mg/ml)
1 Vol	HPLC-H ₂ O
- Sample Loading Solution (SLS): wird im DTCS Quick Start Kit mitgeliefert.

Die DNA für die Sequenzierung sollte frei von Verunreinigungen (RNA, Salzen, Phenol und Proteinen) und in HPLC-Wasser gelöst sein. Als Template zur Sequenzierung dienen ca. 1 µl einer „Midi“-Plasmid-Präparation (1.1.4), bzw. 4 µl einer „Mini“-Plasmid-Präparation (1.1.3). Plasmide, die eine Größe von >4 kbp besitzen müssen vor der eigentlichen Sequenzierungs-PCR für 3 min bei 96°C denaturiert werden.

Folgende Reagenzien werden für den PCR-Ansatz gemischt:

Template-DNA	1-4 µl
Oligonukleotid (5pmol/µl)	1 µl
QuickStartMix	4 µl
HPLC-H ₂ O	ad 20 µl

Die DNA wird in einem PCR-Gerät amplifiziert, das wie folgt programmiert ist:

Denaturierung der dsDNA	96°C;20sec
Hybridisierung des Primers an die ssDNA	50°C;20 sec
Primer-Elongation	60°C; 4 min

Der Zyklus wird 30mal wiederholt. Am Schluss wird auf 4°C abgekühlt, bis die Proben weiter verwendet werden. Die PCR-Reaktion wird dann in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit 5 µl Stopp-Lösung und 60 µl abs. EtOH versetzt. Der Ansatz wird gut gemischt und anschließend bei 14000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Danach wird der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet zweimal mit 200 µl 70% EtOH gewaschen, bevor es für ca. 15 min in der SpeedVac bei RT vollständig getrocknet wird. Anschließend wird das Pellet in 40 µl SLS-Lösung aufgenommen, und der Ansatz bei 4°C gelagert, bis er mit dem Sequenziergerät CEQ2000 von Beckmann Coulter analysiert wird.

1.11.2 DNA-Sequenzierung mit $\alpha^{33}\text{P}$ -dATP

Die Sequenzierung wurde mit dem „T7 Sequencing TM-Kit“ vom Pharmacia durchgeführt.

Zur alkalischen Denaturierung der doppelsträngigen Plasmid-DNA werden 2 µg Plasmid-DNA in einem Volumen von 32 µl mit 8 µl 2 M NaOH versetzt. Der Ansatz wird 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl dH₂O, 7 µl 3 M NaOAc-Lösung (pH 4,5) und 120 µl abs. Ethanol wird die DNA 30 min bis über Nacht bei -20°C präzipitiert. Die DNA wird durch Zentrifugation sedimentiert, mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 µl dH₂O aufgenommen.

Zur Hybridisierung des Sequenzierungsprimers wird die denaturierte DNA mit 2 µl Oligonukleotid-Lösung (5pmol/µl) und 2 µl Annealing-Buffer versetzt. Der Ansatz wird 5 min bei 65°C, 10 min bei 37°C und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Der „Annealing“-Ansatz wird mit 3 µl „Labelling-Mix“, 1 µl $\alpha^{33}\text{P}$ -dATP (10 µCi/µl; 3000 Ci/mmol) und 2 µl T7-DNA-Polymerase (2U/µl) versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Aliquots von 4,5 µl werden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, die 2,5 µl der jeweiligen Didesoxyribonucleosidtriphosphatpuffer (A-, C-, G-, T-Mix) enthalten. Man inkubiert 5 min bei 37°C und beendet die Reaktion durch die Zugabe von 5 µl Stopp-Puffer. Die Sequenzierungsansätze werden 3 min auf 80°C erhitzt. Anschließend werden Aliquots der Sequenzierungsansätze in benachbarte Taschen (Reihenfolge A, C, G, T) eines 6 % Polyacrylamid/Harnstoffgels (20 cm x 40 cm x 0,3 mm) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Spannung von 1500 V und ist beendet, wenn der Farbstoff Bromphenolblau aus dem Gel austritt. Das Gel wird auf ein Whatmanpapier aufgezogen, mit Klarsichtfolie bedeckt und für die Autoradiographie ein geeigneter Röntgenfilm aufgelegt.

1.12 Primer-Extension

Die Primer-Extension-Analyse dient der Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes eines Gens. Dabei wird ein am 5'-Ende radioaktiv markierter Oligonukleotidprimer an das entsprechende mRNA-Molekül hybridisiert und der Primer mittels des Enzyms Reverse-Transkriptase verlängert. Die reverse Transkription endet am 5'-Ende des jeweiligen Transkripts, so dass durch Gelelektrophorese der cDNA zusammen mit einem Sequenzierungsansatz eines Plasmids, in das ein DNA-Fragment kloniert wurde, das die zu untersuchende Promotorregion und das 5'-Ende des interessierenden Gens umfasst, der Transkriptionsstartpunkt exakt bestimmt wird. Die Sequenzierungsreaktion wird mit demselben Primer durchgeführt wie die reverse Transkription (siehe 1.8.2).

1.12.1. 5'-Markierung des Oligonukleotid-Primers

In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wird auf Eis folgender Ansatz zusammenpipettiert:

1 µl Oligonukleotid-Primer (5 pmol/µl)
3 µl $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (5000 Ci/mmol)
1 µl 10 x Kinase-Puffer (MBI)
4 µl dH ₂ O
1 µl T4 -PolyNukleotid-Kinase (30 U/µl; MBI)

Der Ansatz wird 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Abtrennung von nicht eingebautem $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP wird der QIAquick Nukleotide Removal Kit von QIAGEN verwendet. Die Markierungsreaktion wird mit DEPC-H₂O auf

50 µl aufgefüllt, mit 10 Volumen PN-Puffer versetzt und gut vermischt. Das Reaktionsgemisch wird auf eine QIAquick-spin-Säule aufgetragen und zur Bindung des Oligonukleotids an die Säulenmatrix 1 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen und verworfen. Die Säule wird zweimal mit 500 µl PE-Puffer gewaschen. Das markierte Oligonukleotid wird anschließend durch Zugabe von 50 µl DEPC-H₂O durch Zentrifugation (1 min, 14000 rpm) in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß eluiert.

1.12.2 Primer-Extension-Experiment

15-30 µg RNA werden zusammen mit 2000000- 3000000 cpm des 5'-markierten Oligonukleotid-Primers durch Zugabe von 1/10 Vol 3 M NaOAc (pH 5,5) und 2,5 Vol abs. Ethanol präzipitiert. Der Ansatz wird über Nacht bei -20°C inkubiert. RNA und Primer werden anschließend durch Zentrifugation sedimentiert (14000 rpm, 15 min, 4°C). Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 5 µl dH₂O aufgelöst. Nach Zugabe von 2 µl 5x Reverse-Transkriptase-Puffer (Roche) und 2 µl dNTPs (2 mM/µl) wird der Ansatz 2 min bei 100°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wird 1 µl Reverse-Transkriptase (30 U/µl; Roche) zugegeben und der Ansatz 45 min bei 45°C inkubiert. Anschließend fügt man nach erneuter kurzer Zentrifugation 1 µl RNaseA (10 mg/ml) hinzu und inkubiert 10 min bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 4 µl Probenpuffer (2.5.3.1) wird die Probe 3 min bei 80°C denaturiert und auf ein 6 %iges Polyacrylamid/Harnstoffgel (20 cm x 40 cm x 0,3 mm) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Spannung von 1500 V und ist beendet, sobald der Farbstoff Bromphenolblau aus dem Gel austritt. Das Gel wird auf ein Whatman-Papier aufgezogen, mit Klarsichtfolie bedeckt und für die Autoradiographie ein geeigneter Röntgenfilm aufgelegt.

1.13 Ortspezifische Mutagenese mit Hilfe des „Quick change“-Kits von Stratagene

Mit dem Mutagenese-Kit „Quick change Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene kann eine oder mehrere Punktmutationen in doppelsträngige Plasmid-DNA eingefügt werden. Außerdem kann die Insertion oder Deletion eines DNA-Bereiches erfolgen.

Für die Reaktion werden Oligonukleotidprimer gewählt, welche die gewünschte Sequenzänderung enthalten, zueinander komplementär sind und somit an beide Stränge des Plasmids hybridisieren. Ihre Größe sollte zwischen 25 und 45 Basen betragen und ihre Schmelztemperatur ca. 10°C über der Elongationstemperatur der *PfuTurbo*-Polymerase von 68°C liegen.

Die Mutationsstelle muss sich ungefähr in der Mitte der Primer befinden, so dass auf beiden Seiten etwa 10 bis 15 Basen mit der zur Ausgangs-DNA identischen Sequenz vorhanden sind. Der GC-Gehalt sollte mindestens 40% betragen.

In einem für das PCR-Gerät geeigneten Reaktionsgefäß werden folgende Lösungen zusammenpipettiert:

- 5 µl 10x Reaktionspuffer
- x µl (5-50 ng) ds DNA-Template
- x µl (125 ng) Oligonukleotid #1
- x µl (125 ng) Oligonukleotid #2
- 1 µl dNTP-Mix (je 25 mM dGTP, dATP, dCTP, dTTP)
- ad 50 µl dH₂O

Zu diesem Ansatz wird dann noch 1 µl *PfuTurbo*-Polymerase zugegeben.

Die Parameter für die Polymerase-Kettenreaktion sind in den Tabellen 8 und 9 aufgeführt.

Tab. 8: Parameter für die Polymerase-Kettenreaktion

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	30 sec.
2	12-18	95°C	30 sec.
		55°C	1 min.
		68°C	2 min. / kb Plasmid

Tab. 9: Auswahl der Anzahl der PCR-Zyklen

Art der gewünschten Mutation	Anzahl der Zyklen
Punktmutation	12
Austausch einer Aminosäure	16
Insertion bzw. Deletion multipler Aminosäuren	18

Nach Beendigung der PCR wird das Reaktionsgefäß 2 min. auf Eis gestellt. Anschließend gibt man 1 µl des Restriktionsenzym *DpnI* (10U/µl) hinzu, welches die methylierte, nicht die mutierte Ausgangs-DNA abbaut. Man inkubiert den Ansatz für eine Stunde bei 37°C. Die DNA der meisten *E.coli*-Stämme ist *dam*-methyliert und kann somit von *DpnI* abgebaut werden. Die *in vitro* neu synthetisierte DNA, welche die Mutation trägt, ist demgegenüber nicht methyliert und damit unempfindlich gegen *DpnI*. Für die Transformation der Plasmid-DNA wurden je 1µl des Reaktionsgemisches (bei geringer Ausbeute auch bis zu 3µl) zu je 50µl auf Eis aufgetauter, superkompetenter *Epicurian Coli*®-XL1-blue-Zellen pipettiert. Nach kurzem Mischen wird die Zellsuspension für 30 min. auf Eis inkubiert. Der Ansatz wird daraufhin 45 sec. auf 42°C erhitzt und danach im Eisbad wieder abgekühlt. Nach Zugabe von 0,5 ml vorgewärmtem LB-Medium wird das Gemisch für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird der Transformationsansatz auf geeignete Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2. Methoden im Yeast Two Hybrid System

2.1 Erstellen einer *Bordetella bronchiseptica* Genbank

2.1.1 Scheren chromosomaler *B. bronchiseptica*-DNA mittels Ultraschall

Ultraschall-Puffer:	Tris-HCl (pH 7,6)	0,03 g
	NaAc	6,2 g
	EDTA	0,09 g
	Glycerin	75 ml
	dH ₂ O	ad 250 ml

10 µg chromosomale DNA werden in 2 ml Ultraschall-Puffer aufgenommen und 3 x (4 x 30 sec) mit Ultraschall (50 W) beschallt. Zwischen den Intervallen wird die Probe 30 sec auf Eis inkubiert, um eine Überhitzung zu vermeiden. Danach wird die chromosomale DNA mittels 1/10 Vol 5 M NaCl und 2,5 Vol eiskaltem EtOH gefällt, 30 min bei 14 000 rpm, 4°C zentrifugiert und anschließend bei RT getrocknet. Die DNA wird in 50µl dH₂O aufgenommen und auf ein 0,7 %iges Agarosegel aufgetragen. Die DNA wird im Bereich von 1 kb ausgeschnitten und mittels eiskalter Phenolextraktion (1.6.3) aus dem Gel eluiert.

2.1.2 Auffüllen überhängender DNA-Enden

Um die durch das vorangegangene Scheren der chromosomalen DNA erzeugten 5'- bzw. 3'- überhängenden DNA-Enden zu glätten, werden die DNA-Stränge mit Hilfe der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) und der T7-DNA Polymerase mit Nukleotiden aufgefüllt bzw. Nukleotide werden abgespalten und so in glatte Enden überführt.

Der Reaktionsansatz sieht wie folgt aus:

- ~ 1µg gescherte chromosomale DNA
- 1,5 µl dNTP-Mix (1mM/Nukleotid)
- 2 U Klenow Fragment
- 2 U T7-Polymerase
- 1,5 µl 10 x Klenow-Puffer
- ad 15 µl dH₂O

Der Ansatz wird für 30 min bei 12°C inkubiert und anschließend die Reaktion 5 min bei 65°C inaktiviert.

2.1.3 Phosphorylierung aufgefüllter DNA-Enden

Um eine blunt-end-Ligation mit dem entsprechenden dephosphorylierten Vektor zu ermöglichen, werden die erhaltenen DNA-Fragmente mit Hilfe der Polynukleotid-Kinase (PNK) phosphoryliert.

Der Reaktionsansatz sieht wie folgt aus:

10 µl	aufgefüllte, gescherte chromosomale DNA
2 µl	10 mM rATP
2 µl	10 x PNK-Puffer A
5 U	PNK
ad 20 µl dH ₂ O	

Der Ansatz wird 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend das Enzym bei 65°C für 20 min inaktiviert.

2.2 Transformation in *S. cerevisiae* mit geringer Effizienz mittels Grow'n'Glow Fast & Easy Yeast Transformation Kit (MoBiTec)

500 µl -1 ml einer Übernachtskultur von *S. cerevisiae* werden abzentrifugiert (10 s, 8 000 rpm). Dem Pellet werden 1-5 µg Vektor-DNA, 5 µl Träger-DNA und 125 µl Transformationslösung zugesetzt, bei niedriger Intensität gevortext und über Nacht bei 30°C inkubiert. Während der Inkubationszeit setzen sich die Hefezellen am Boden des Reaktionsgefäßes ab und werden am nächsten Tag auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert. Hefekolonien werden nach ca. 2-3 Tagen Inkubation bei 30°C sichtbar.

2.3 Transformation in *S. cerevisiae* mit hoher Effizienz mittels YEASTMAKER™ Yeast Transformation System 2 (BD Bioscience)

Die Transformation von Plasmid-DNA in *S. cerevisiae* mit hoher Effizienz erfolgt nach dem Protokoll 1 des YEASTMAKER™ Yeast Transformation System 2. Hierbei wird die Plasmid-DNA mit einer Transformationsrate von $\geq 3 \times 10^5$ Transformanten pro µg Plasmid-DNA in kompetente Hefezellen eingebracht. Die erforderlichen Stocklösungen sind dem Kit beigelegt.

0,9 % (w/v) NaCl- Lösung: 0,9 g NaCl in 100 ml dH₂O lösen, sterilfiltrieren

2.4 Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae* mittels Grow'n'Glow Yeast Plasmid Isolation Kit (MoBiTec)

1,5 ml einer Übernachtskultur werden abzentrifugiert (30 s, 10 000 rpm). Das Pellet wird mit 250 µl Lysispuffer und der Lysismatrix 5 min auf dem Vortexer inkubiert. Der Suspension werden 250 µl Neutralisierungslösung zugegeben, kurz gevortext und für 2 min abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein Spin-Filter-Gefäß überführt und 250 µl Spin-Puffer zugegeben. Nach 1 minütiger Zentrifugation wird der Überstand verworfen und zweimal mit 500 µl Waschpuffer gewaschen. Die Plasmid-DNA wird mit 100 µl sterilem dH₂O eluiert.

2.5 β-Galaktosidase-Filter-Assay

Z-Puffer:	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	21,5 g/l
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5,5 g/l
	KCl	0,75 g/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.246 g/l
Z-Puffer/X-Gal:	Z-Puffer	2 ml
	β-MercaptoEtOH	5,4 µl
	2% X-gal-Lösung (7.1)	33,4 µl

Kolonien von transformierten Hefen wurden auf Agarplatten mit entsprechenden Selektionsmedien ausgestrichen und 2 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde jeweils ein steriler Filter auf jede Platte gegeben und die Kolonien auf diesen übertragen. Zur Lyse der Hefezellen wurden die Filter 10 Sekunden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Die Filter wurden mit den Kolonien nach oben auf ein in Z Puffer/X-Gal getränktes Whatman Filterpapier gelegt und bei 30°C bis zu 8 Stunden inkubiert, bis sich blau gefärbte Kolonien zeigten. Als Positivkontrolle einer Interaktion im β-Gal-Assay

dienten p53 und SV40 exprimiert von den Vektoren pVA3 und pTD1. Eine Blaufärbung von Kolonien mit diesen Vektoren erfolgte im Allgemeinen nach 2-4 Stunden.

2.6 Mating von *S. cerevisiae*

Bei diesem Test macht man sich die Tatsache zunutze, dass haploide Hefezellen als zwei verschiedene Paarungstypen vorliegen können. Diese beiden Paarungstypen können unter entsprechenden Bedingungen zu einer diploiden Zygote verschmelzen, die ihrerseits wieder diploide Tochterzellen produziert. Wenn die beiden Paarungstypen Träger unterschiedlicher Plasmide sind, enthält die diploide Zygote nach der Verschmelzung auch beide Plasmide der Ausgangszellen. Mit dieser Methode kann man prüfen, ob ein im 2-Hybridsystem gefundener Klon eine spezifische Interaktion mit dem getesteten Protein aufweist, oder ob das gefundene Protein bereits alleine in der Lage ist, die Reportergene im Hefegenom zu aktivieren. Der Hefestamm *S. cerevisiae* SFY 526 wurde mit vier verschiedenen Plasmiden transformiert: pGBT9-BvgS-PP, pGBT9-BvgS-HPt, pLAMS' und pVA3. Der Hefestamm AH109 wurde mit den im 2-Hybridsystem gefundenen Aktivator-domänen-Konstrukten transformiert. Anschließend wurden in einer 96-well Mikrotiterplatte 200 µl YPAD-Medium mit den beiden Hefestämmen beimpft und für 24 h unter leichtem Schütteln bei 30°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag werden die Hefen auf zwei verschiedene SD-Platten ausgestrichen. Zum einen verwendet man SD ohne Leucin und ohne Tryptophan (SD -LT); hier können Hefen wachsen, die beide Ausgangsplasmide enthalten. Zum anderen werden die Hefen auf SD-Medium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin plattiert. Auf diesen Platten sind nur Hefen zum Wachstum befähigt, die eine Interaktion der beiden exprimierten Hybridproteine zeigen. Nach drei bis sieben Tagen Inkubation bei 30°C sind die Hefen gewachsen.

3 Proteinbiochemische Methoden

3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese kann die Größe eines Proteins bestimmt werden. Die Porengröße des stark vernetzten Polyacrylamid-Gels kann so eingestellt werden, dass die Poren klein genug sind, um die Wanderung des gesuchten Proteins zu verzögern (z.B. liegt der optimale Trennungsbereich eines 15%igen Gels bei 12- 43 kDa). Die Elektrophorese findet unter denaturierenden Bedingungen statt, in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) und Mercaptoethanol. SDS bindet sich an hydrophobe Regionen des Proteinmoleküls und führt so zur Ausbildung eines SDS-Protein-Komplex, dessen negative Ladungen dem Molekulargewicht des Proteins etwa proportional ist. β-Mercaptoethanol ist eine reduzierende Substanz, die alle S-S Bindungen im Protein löst. Auf diese Weise können Proteine, unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung und Konformation, ihrer Größe nach im Spannungsfeld aufgetrennt werden. Die Zusammensetzung der Gele (8x11 cm, 1 bis 1,5 mm Dicke; siehe Tabelle 9) sowie die Versuchsdurchführung sind im Folgenden beschrieben.

Reagenzien	Trenngel (12 %, 25 ml)	Sammelgel (5 %, 6 ml)
dH ₂ O	8,2 ml	4,1 ml
30% Acrylamidlösung	10,0 ml	1,0 ml
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	-----	0,75 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	6,3 ml	-----
10% SDS	0,25 ml	0,06 ml
10% APS	0,25 ml	0,06 ml
TEMED	0,001 ml	0,006 ml

- 10x Laufpuffer: 144 g Glycin
30, 2 g Tris-HCl
10 g SDS
- Laemmli-Probenpuffer: 62,5 mM Tris- HCl (pH 8,0)
10% Glycin
2% SDS
5% β-Mercaptoethanol
0, 05% Bromphenolblau

Nach Zugabe des Radikalbildners TEMED wird die Trenngellösung sofort zwischen zwei, durch Spacer getrennte Glasplatten (8x11cm) bis ca. 3 cm unterhalb des Glasplattenrandes gegossen und zur Ausbildung einer geraden Front mit dH₂O überschichtet. Ist das Trenngel auspolymerisiert, kann das Sammelgel gegossen und ein Teflonkamm eingesetzt werden. Das fertige Gel wird in die mit 1x Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingeklemmt. Die pelletierten Bakterienzellen bzw. die Proteinlösung werden mit Laemmli-Probenpuffer versetzt, kurz gekocht und in die Geltaschen gegeben. Die Elektrophorese wird bei 150-200 Volt durchgeführt und beendet, nachdem die Farbstofffront aus dem Gel gelaufen ist. Als Molekulargewichtsstandard werden 10 µl „Broad-range-marker“ der Firma Biorad mit aufgetragen.

- Färbelösung: 45% Ethanol
 10% Eisessig
 0,25% Coomassie Brilliant Blue R250
- Entfärbelösung: 45% Ethanol
 10% Eisessig

Die Proteine können im Anschluss im Polyacrylamidgel durch Coomassie-Blau gefärbt werden. Hierzu wird das Gel 15-60 min in Färbelösung geschwenkt und anschließend nach Zugabe von Entfärbelösung weiter geschwenkt, bis die Proteinbanden sich deutlich vom Hintergrund absetzen. Das Gel kann in Einmachfolie zwischen zwei Lagen Whatman-Papier 90 min bei 80°C getrocknet werden.

3.2 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Proteine können mit Hilfe von Trichloressigsäure (TCA) gefällt werden. Das kann z.B. dann von Nutzen sein, wenn man größere Mengen an Proteinen auf ein Polyacrylamidgel auftragen möchte und es dadurch zu Problemen mit den Volumina kommt, oder aber wenn man Proteine auf ein Polyacrylamidgel auftragen möchte, die in Guanidiniumchlorid-haltigen Lösungen aufgenommen sind. Zur Fällung wird die Proteinlösung auf 10 bis 20 % TCA eingestellt und mindestens 60 min, maximal über Nacht auf Eis inkubiert. Ist die Menge an Protein sehr gering, kann die Zugabe von bovinem Serumalbumin (BSA) von Vorteil sein, weil dadurch die Effizienz der Fällung gesteigert werden kann.

Das gefällte Protein wird dann abzentrifugiert (15 min, 10 000 rpm, 4°C) und das Pellet ein- bis zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen. Anschließend wird das Pellet bei RT vorsichtig getrocknet und in Lämmli-Probenpuffer (3.1) aufgenommen.

3.3 Westernblot (Towbin *et al.*, 1979)

- Anodenpuffer I: 300 mM Tris-HCl
 20% Ethanol
- Anodenpuffer II: 25 mM Tris-HCl
 20% Ethanol
- Kathodenpuffer: 25 mM Tris-HCl
 40 mM ε-Aminocapronsäure
- 1x TBS/Tween: 20 mM Tris-HCl (pH 7,6)
 137 mM NaCl
 0, 05% Tween 20
- TBS/Tween/Magermilch: 1x TBS/Tween
 10% Magermilchpulver

Für die Durchführung eines Westernblots (Semidry Blot) nach Towbin *et al.* (1979) trennt man die Proteine im SDS-Polyacrylamidgel (2.1) auf. Kurz bevor die Blaufront aus dem Gel läuft spült man die Graphitplatten der Blottkammer mit destilliertem Wasser und legt auf die Anodenplatte sechs mit Anodenpuffer I getränkte Whatmanpapiere. Auf diese werden nun drei Whatman-Papiere gelegt, die mit Anodenpuffer II befeuchtet wurden. Die Nitrocellulosemembran wird auf die Größe des Trenngels zugeschnitten, mit Wasser angefeuchtet

und luftblasenfrei auf den Stapel gelegt. Hierauf legt man das Proteingel, von dem zuvor das Trenngel abtrennt wurde, und auf dieses sechs Lagen Whatman-Papiere, die mit Kathodenpuffer getränkt wurden. Luftblasen werden im Anschluss durch sanftes Rollen mit einem Glasstab entfernt. Abschließend wird die Kathodenplatte aufgesetzt und die Kammer an das Netzgerät angeschlossen. Der Transfer erfolgt mit ca. 0,89 mA/cm² der Nitrocellulosemembran für ca. 1 h bei RT.

Um freie Stellen auf der Nitrocellulosemembran abzusättigen, wird sie im Anschluss unter leichtem Schütteln 1 h bei RT bzw. ÜN bei 4°C mit TBS/Tween/Magermilch inkubiert. Anschließend wird die Membran mit dem ersten Antikörper, der gegen das Zielprotein gerichtet ist, in TBS/Tween/Magermilch mindestens 1 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Es folgen drei Waschschritte mit TBS/Tween für je 10-15 min. Ein zweiter, mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter, Antikörper, der gegen die FC-Region des ersten Antikörper gerichtet ist, wird mit TBS/Tween/Magermilch-Lösung hinzugegeben und der Blot eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Man wäscht die Nitrocellulosemembran wieder dreimal mit TBS/Tween und bereitet in der Zwischenzeit die ECL-Lösung (Amersham) frisch zu. Man benötigt 0,125 ml Lösung pro cm² Fläche der Membran. Die Färbung dauert 1 min und wird mit Autoradiographie sichtbar gemacht.

3.4 Überproduktion von Proteinen mit dem IPTG-induzierbaren pQE30-Vektor (QIAexpress system)

Der pQE30-Vektor ermöglicht die IPTG-induzierte Überexpression von Proteinen. Der entsprechende DNA-Abschnitt, der dem zu reinigenden Protein entspricht wird dabei im Leserahmen hinter einer für sechs Histidin-Reste kodierenden Sequenz kloniert. Das daraus resultierende Fusionsprotein trägt nun N-terminal ein „His-tag“ und kann mit Hilfe der Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA Agarose Säule gereinigt werden. Die Überexpression erfolgt im *E. coli* Stamm M15 (pRep4). pRep4 ist ein „high copy“-Plasmid und trägt neben dem Kanamycinresistenz-Gen auch das *lac* Gen, das für den *lac*-Repressor codiert und so die unkontrollierte Expression der in pQE30 klonierten DNA verhindert.

1 Liter LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin) wird mit 10 ml einer *E. coli* M15 Übernachtskultur, die das gewünschte pQE30-Derivat enthält angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Bakterien werden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Als nicht induzierte Kontrolle werden 1 ml der Bakteriensuspension entnommen, die ohne IPTG- Zugabe über den gleichen Zeitraum weiter inkubiert wird. Zur Induktion der Genexpression wird der *lac*-Repressor durch Zugabe von 1 mM IPTG inaktiviert und der Ansatz für weitere drei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wird erneut 1ml Aliquot entnommen, das gemeinsam mit der nicht-induzierten Probe abzentrifugiert wird. Die Bakterienpellets werden in 100 µl Laemmli-Puffer resuspendiert, bei 95°C gekocht und zur Überprüfung der Überexpression auf einem 15% Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bakterienkultur wird nach der Induktion 15 min abzentrifugiert (bei 6000 rpm und 4°C). Das Pellet wird zweimal mit 20 ml FP-Puffer (siehe 2.3.1) gewaschen und bei -20°C eingefroren.

3.5 Proteinreinigung

3.5.1 Zellaufschluss mittels French Press

French-Press (FP)-Puffer:	50 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	50 mM	KCl
	1 mM	DTT
	1 mM	PMSF

Ein für Proteine schonender und effizienter Zellaufschluß wird mit Hilfe der French-Press (FP) erreicht. Aufgrund der Proteaselabilität zahlreicher Proteine sollten alle Geräte, Lösungen und die Probe selbst immer kalt gehalten und zügig gearbeitet werden.

Hierzu wird das nach der Überproduktion eingefrorene Bakterienpellet (2.2) in 10 ml kaltem FP-Puffer aufgetaut. Die Bakteriensuspension wird in die gekühlte French-Press eingezogen und nach Anlegen eines Druckes von etwa 1000 bar aus der FP-Zelle in einen auf Eis stehenden JA 20-Zentrifugenbecher durch eine schmale Öffnung gequetscht, wodurch die Bakterienzellen mechanisch aufgebrochen werden. Um die lösliche Proteinfraktion von der unlöslichen zu trennen wird die Probe 30 min bei 15 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Ist noch nicht bekannt, ob das Protein sich nach der Überexpression in Einschlusskörperchen („inclusion bodies“) oder in der unlöslichen Fraktion befindet, sollte dies durch Auftragen eines Aliquots des Überstandes sowie des Pellets auf ein Polyacrylamidgel (2.1) überprüft werden.

3.5.2 Zellaufschluss mittels *N*-laurylsarcosin (Sarkosyl) und Ultraschall (Frangioni & Neel, 1993)

Befinden sich überproduzierte Proteine in der unlöslichen Fraktion, besteht die Möglichkeit diese unter nicht denaturierenden Bedingungen in eine lösliche Form zu bringen. Sarkosyl setzt durch seine Eigenschaft als anionisches Detergenz die in den sog. „inclusion bodies“ sitzenden Proteine frei. So werden im analytischen Maßstab 10 ml LB-Medium mit 800 µl einer *E. coli* BL21/M15-Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Bakterien werden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Als nicht induzierte Kontrolle wird 1 ml der Bakteriensuspension entnommen, die ohne IPTG- Zugabe über den gleichen Zeitraum weiter inkubiert wird. Zur Induktion der Genexpression wird der lac-Repressor durch Zugabe von 0,1/1 mM IPTG inaktiviert und der Ansatz für weitere drei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wird erneut 1ml Aliquot entnommen, das gemeinsam mit der nicht-induzierten Probe abzentrifugiert wird. Die Bakterienkultur wird in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und abzentrifugiert (3 min, 8 000 rpm). Die Bakterienpellets werden in 200 µl STE-Puffer (10mM Tris, pH8,0, 150 mM NaCl, 1mM EDTA) gewaschen und dann in 135 µl STE/Lysozym -Puffer (100 µg Lysozym/ml) resuspendiert. Die Suspension wird 15 min auf Eis inkubiert. Danach wird Dithiothreitol (DTT) in einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben. Die Bakterienlyse erfolgt durch Zugabe von Sarkosyl (10 % Stocklösung in STE-Puffer) in einer Endkonzentration von 1,5 %. Das Gemisch wird ca. 5 s gevortext und 1 min, bei 50 W mit Ultraschall behandelt bis sich die Lösung aufklart. Der Aufschluss der Zellen erfolgt auf Eis, um eine Zerstörung der Proteine durch Überhitzung zu vermeiden. Danach werden die Proteine von Zelltrümmern und chromosomaler DNA durch Zentrifugation (5 min, 14 000 rpm, 4°C) getrennt. Dem Überstand werden 2% Triton-Puffer (10 % Stocklösung in STE-Puffer) zugesetzt.

3.6 Proteinreinigung mittels Ni-NTA-Agarose (Affinitätschromatographie)

Die Strategie dieses entwickelten Proteinreinigungsverfahrens beruht auf der hohen Bindungsaffinität von Imidazolringen an zweiwertige Nickel-Ionen. Fusionsproteine, die ein N- oder C-terminalen His-tag besitzen können in einer Ein-Schritt-Reinigung über eine Ni-NTA-Agarose Säule aufgereinigt werden (Hochuli *et al.*, 1987). Der vierzählige Ligand NTA (*nitrilo-tri-acetic acid*) tritt in Wechselwirkung mit vier der sechs Koordinationsstellen eines Nickel-Ions, das an seinen zwei restlichen Koordinationsstellen die Imidazolringe der Histidinreste binden kann.

3.6.1 Reinigung von unlöslichen Proteinen über Ni-NTA-Agarose mittels der His-Trap™-Säulen der Äkta prime (Amersham Pharmacia Biotech)

- Basispuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
50 mM KCl
5 mM MgCl₂
10% Glycerin
1 mM DTT
1 mM PMSF
- Elutionspuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
50 mM KCl
5 mM MgCl₂
10% Glycerin
1 mM DTT
1 mM PMSF
250 mM Imidazol (basisch! pH-Wert muß auf 7,5 eingestellt werden)
- Denaturierungspuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
50 mM KCl
5 mM MgCl₂
10% Glycerin
1 mM DTT
1 mM PMSF
6 M Guanidiniumchlorid

- Dialysepuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
50 mM KCl
5 mM MgCl₂
20% Glycerin
1 mM DTT
1 mM PMSF

Liegt das überproduzierte Protein nach Zellaufschluss und Zentrifugationsschritt (3.5.1) im Pellet vor, ist dies auf die Bildung von Einschlusskörperchen zurückzuführen. Diese Lipidversikel können nur unter Einsatz hoher Konzentrationen an denaturierenden Substanzen aufgeschlossen werden.

Das Pellet wird zunächst in zwei Waschschrritten behandelt, um die hydrophoben Anteile, wie Membranproteine, aus dem Pellet zu lösen. Hierzu wird das Pellet 20 min auf Eis mit 20 ml Triton-Puffer (Basispuffer mit 1% Triton-100) gerührt und der Ansatz 15 min bei 15 000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Zum Aufschluss der Einschlusskörperchen wird das mit Triton behandelte Pellet mit 30 ml Denaturierungspuffer 30 min auf Eis gerührt und die Lösung abzentrifugiert (30 min, 18 000 rpm, 4°C). Der klare Überstand wird dann gefiltert und für das Refolding Programm der *Äkta prime* verwendet. Die Proteinaufreinigung erfolgt über die Bindung der His₆-Fusionsproteine an das HisTrapTM-Säulenmaterial. Durch Anlegen eines Imidazol-Gradienten, der „rückwärts“ verläuft, wird das Protein zurückgefaltet. Das Eluat wird in 1,5 ml Fraktionen aufgefangen und auf einem Polyacrylamidgel (2.1) analysiert. Die Aliquots, die das gereinigte Protein enthalten, werden vereinigt, gegen Dialysepuffer dialysiert und bei -80°C gelagert.

3.7 Proteinreinigung mittels Glutathion-Sepharose (Affinitätschromatographie)

Die Fusionsproteine werden mit Hilfe von pGEX-Vektoren kloniert, die Teil eines Expressionssystems sind. Diese Proteine besitzen am N-Terminus das Enzym GlutathionS-Transferase (GST). Es bindet an Glutathion-Sepharose, das Teil des Säulenmaterials ist, da die Struktur des Glutathions komplementär zur Bindungsstelle der GST ist. Die Moleküle bilden einen Komplex aus. Das Fusionsprotein kann durch Zugabe von Puffern, die freies Glutathion enthalten, von der Säule wieder eluiert werden. Über eine Erkennungssequenz für den Faktor Xa kann GST wieder abgespalten werden.

3.7.1 Überproduktion von GST-Fusionsproteinen

1 Liter LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) wird mit 10 ml einer *E. coli* BL21 Übernachtskultur, die das gewünschte pGEX-3X-Derivat enthält angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Bakterien werden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1 angezogen. Als nicht induzierte Kontrolle werden 1 ml der Bakteriensuspension entnommen, die ohne IPTG- Zugabe über den gleichen Zeitraum weiter inkubiert wird. Zur Induktion der Genexpression wird der lac-Repressor durch Zugabe von 0,1mM IPTG inaktiviert und der Ansatz für weitere drei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wird erneut 1ml Aliquot entnommen, das gemeinsam mit der nicht-induzierten Probe abzentrifugiert wird. Die Bakterienpellets werden in 50 µl Laemmli-Puffer resuspendiert, bei 95°C gekocht und zur Überprüfung der Überexpression auf einem 12% Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bakterienkultur wird nach der Induktion 15 min abzentrifugiert (bei 6000 rpm und 4°C). Das Pellet wird zweimal mit 20 ml FP-Puffer (2.3.1) gewaschen und bei -20°C eingefroren.

3.7.2 Vorbereitung der Glutathion-Sepharose-Säule

Man benötigt für 1 Liter Überproduktionskultur 7,5 ml Glutathion-Sepharose. Das Säulenmaterial wird vorsichtig in eine Säule (Biorad) gefüllt und viermal mit 1xPBS gewaschen. Nachdem sich das Säulenmaterial vollständig abgesetzt hat, wird luftblasenfrei ein Stempel aufgesetzt, der mit einer peristaltischen Pumpe verbunden ist. Die peristaltische Pumpe ermöglicht eine genaue Einstellung der Durchflussrate.

3.7.3 Reinigung von Proteinen über die Glutathion-Sepharose-Säule

- Elutionspuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
10 mM Glutathion

- Dialysepuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
50 mM KCl
5 mM MgCl₂
20% Glycerin
1 mM DTT
1 mM PMSF

Nach Aufschluss der Zellen durch Sarkosyl und Ultraschall (3.5.2), wird die Suspension anschließend auf die mit PBS äquilibrierte Glutathion-Sepharose-Säule aufgetragen und mit 75 ml PBS gewaschen. Bei dieser Affinitätschromatographie können nur lösliche Proteine verwendet werden. Die Elutions erfolgt mittels eines Glutathion-Gradienten (15 ml Elutionspuffer + 15 ml PBS), der mittels eines Gradientenmischers angelegt wird. Das Eluat wird in 1,5 ml Fraktionen aufgefangen und auf einem Polyacrylamidgel (3.1) analysiert. Die Aliquots, die das gereinigte Protein enthalten, werden vereinigt, gegen Dialysepuffer dialysiert und bei -80°C gelagert.

3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein Protein-Assay (Biorad) verwendet, der nach dem von Bradford entwickelten Prinzip modifiziert wurde. Dieses Messverfahren macht sich zu nutzen, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 mit Proteinen in saurer Lösung Komplexe bildet, deren Absorptionsmaximum bei 595 nm liegt. Zur Aufstellung einer Eichgeraden werden verschiedene Mengen BSA (1-10 µg) mit Wasser auf ein Endvolumen von 800 µl gebracht und mit 200 µl Farbstofflösung versetzt. Ebenso wird mit 1-15 µl der Proteinlösung verfahren. Nach dem Vermischen werden die Absorptionswerte der Ansätze bei 595 nm gemessen; über die Eichgerade kann dann auf die Proteinkonzentration der Lösung geschlossen werden.

3.9 *in vitro* Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen

3.9.1 GST-Pulldownassay

Um Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vitro* zu untersuchen, kann die Methode des GST-Pulldownassay herangezogen werden. Hierbei wird eine Proteinkomponente als GST-Fusionsprotein überproduziert und an Glutathion-Sepharose immobilisiert. Die zweite Proteinkomponente wird als His₆-Fusionsprotein überproduziert und im Zell-Lysat über Glutathion-Sepharose gegeben, an die das GST-Fusionsprotein gebunden hat. Nach mehrmaligem, gründlichem Waschen, kann der Protein-Protein-Komplex von der Glutathion-Sepharose koeluiert werden.

Die Überproduktion der Fusionsproteine erfolgt in einem 10 ml Volumen wie unter 3.4 und 3.7.1 beschrieben. Der Zellaufschluss erfolgt mit Sarkosyl (3.5.2). 250 µl Glutathion-Sepharose wird dreimal mit 1xPBS gewaschen und in 250 µl PBS aufgenommen. Der Überstand mit gelöstem GST-Fusionsprotein wird mit 250 µl Glutathion-Sepharose versetzt und für 1 h bei 4°C auf einem Überkopf-Rotor inkubiert und abzentrifugiert (5 000 rpm, 1 min). Der GST-Fusionsprotein-Glutathion-Sepharose-Komplex wird achtmal mit 1 ml PBS gewaschen und in 250 µl PBS aufgenommen. Danach wird der Überstand mit gelöstem His₆-Fusionsprotein der Suspension zugegeben und für 1 h bei 4°C auf einem Überkopf-Rotor inkubiert. Nach der Zentrifugation (5 000 rpm, 1 min) wird das Pellet achtmal mit 1xPBS gewaschen und in 50 µl Laemmli-Puffer aufgenommen. Nach Erhitzen auf 100 °C für 5 min erfolgt die Proteinanalyse auf einem 12%igen Polyacrylamidgel (3.1). Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgt mittels Western-Blot (3.3).

3.10 Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen

3.10.1 Gelretardations-Experiment

Gelretardations-Experimente dienen dem Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen. Dabei wird eine radioaktiv markierte DNA-Sonde, die ein bestimmtes Proteinbindungsmotiv aufweist, mit einem gereinigten Protein inkubiert. Die sich bildenden Protein-DNA-Komplexe werden anschließend elektrophoretisch in einem nativen Polyacrylamidgel aufgrund ihrer geringeren Mobilität von der ungebundenen DNA-Sonde abgetrennt und autoradiographisch ausgewertet.

3.10.2 Radioaktive Markierung der DNA-Sonde

- Radioaktive Markierung von PCR-Produkten

Das DNA-Fragment, das später bei den Gelretardations-Experimenten als Sonde verwendet wird, wird mit Hilfe einer PCR-Reaktion unter Verwendung der „deep Vent“-Polymerase amplifiziert. Nach der PCR-Reaktion wird der PCR-Ansatz auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen, das PCR-Produkt unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten, wie unter 1.5.2 bzw. 1.5.3 beschrieben aus dem Gel isoliert und in 30 µl H₂O aufgenommen. Die Sonden für die Gelretardationsexperimente werden dann mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase (PNK) radioaktiv markiert, welche die Übertragung des γ -³²P von (γ -³²P)-ATP auf freie 5'-Hydroxyl-Enden katalysiert. Ein Standardmarkierungsansatz, der für 30 min bei 37°C inkubiert wird, setzt sich wie folgt zusammen:

dephosphorylierte Vektor-DNA	2,5 pmol
10x Kinasepuffer	5 µl
T4-Polynukleotidkinase	1 µl
(γ - ³² P)-ATP (10 µCi/µl)	3 µl
d H ₂ O	ad 50 µl

Zur Abtrennung von nicht eingebautem (γ -³²P)-ATP wird der QIAquick Nukleotide Removal Kit von QIAGEN verwendet (1.12.1).

3.10.3 Bestimmung der spezifischen Aktivität

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wird 2 µl der DNA-Sonde auf einen Glasfaserfilter (GF/C-Filter, Whatman) pipettiert, kurz getrocknet und der Filter in ein Szintillationsröhrchen mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Roth) gegeben. Die Aktivität der Sonde wird in einem Szintillationszähler gemessen (cpm/µl).

3.10.4 Bindungsstudien mit gereinigtem Protein

- 10x Bindepuffer:

100 mM Tris-HCl (pH 8,0)
100 mM KCl
50 mM EDTA
10 mM DTT
10% Glycerin
- Verdünnungspuffer:

2 mM MgCl ₂
50 mM KCl
0,1% Igepal CA 630
10 mM DTT

Zunächst werden geeignete Verdünnungen von dem Protein in Verdünnungspuffer in einem Probenvolumen von 10 µl angesetzt. Ist eine *in vitro*-Phosphorylierung des Proteins erwünscht, wird zu den einzelnen Verdünnungsstufen jeweils 1 µl 500 mM Acetylphosphat gegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Für die Ausbildung des spezifischen Protein-DNA-Komplexes wird der Bindeansatz in folgender Reihenfolge zusammenpipettiert:

10x Bindepuffer	2 µl
Proteinverdünnung	2 µl
(³² P)-markierte Sonde	15000 cpm
dH ₂ O	ad 20 µl

Der Bindeansatz wird für 20 min bei RT inkubiert und im Anschluss elektrophoretisch aufgetrennt.

3.10.5 Elektrophoretische Auftrennung im nativen Polyacrylamidgel

- 4%iges Polyacrylamidgel:

dH ₂ O	80,9 ml
10x TBE	5 ml
30% Acrylamidlösungslsg.	13,3 ml
10% APS	0,7 ml
TEMED	0,1 ml

Die Lösung für das 4%ige native Polyacrylamidgel wird luftblasenfrei zwischen zwei gut gereinigte Glasplatten (20 cm x 30 cm x 1,5 mm) gegossen, die durch Spacer getrennt sind. Anschließend setzt man einen Kamm ein und läßt das Gel für ca. 2 h bei RT auspolymerisieren. Das Gel wird in die Elektrophoresekammer eingespannt und diese mit 0,5x TBE als Laufpuffer gefüllt. Nach Entfernen der Luftblasen und Spülen der Taschen lässt man das Gel für ca. 30 min bei 150 Volt vorlaufen. Anschließend werden die Taschen erneut gespült und die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt für 3 h bei 150 Volt. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Glasplatten voneinander getrennt. Das an einer Platte haftende Gel wird mit einem trockenen Whatman-Papier abgezogen, luftblasenfrei mit einer Frischhaltefolie bedeckt und auf 3 Lagen, bestehend aus Whatman-Papier/Einmachfolie/Whatman-Papier, gelegt. Nach Bedecken des Stapels mit einem Whatman-Papier trocknet man das Gel für 2,5 h bei 80°C unter Vakuum. Danach wird es in eine Röntgenkassette gegeben und mit einem Röntgenfilm sowie einer Verstärkerfolie bedeckt. Die Expositionszeit bei -20°C kann je nach Intensität des Signals zwischen 1 Stunde und 3 Tagen liegen.

3.10.6 Kompetitions-Experiment

Kompetitions-Experimente werden durchgeführt, um festzustellen, mit welcher Affinität und Sequenzspezifität ein Protein an die radioaktiv markierte DNA-Sonde bindet. Die Zugabe des spezifischen Kompetitors (d.h. der entsprechenden Sonde in unmarkierter Form) oder des unspezifischen Kompetitors (d.h. ein beliebiges, unmarkiertes DNA-Fragment) erfolgt unmittelbar vor Zugabe der markierten DNA-Sonde. Handelt es sich bei der Protein-DNA-Interaktion um eine sequenzspezifische Bindung, wird das Protein nur durch den spezifischen Kompetitor von der markierten DNA-Sonde verdrängt und die entsprechende Bande in ihrer Intensität abgeschwächt. Je nachdem, bei welcher Konzentration diese Abschwächung erfolgt, lassen sich Rückschlüsse auf die Bindungsaffinität ziehen. Je mehr spezifischer Kompetitor vor der Zugabe der radioaktiven Sonde zur Verdrängung der Bindung eingesetzt werden muss, desto schwächer ist die Bindung.

3.11 *In vitro*-Phosphorylierungsassay (nach Bock, 2002)

3.11.1 Autophosphorylierung von Histidinkinasen und Phosphotransfer auf Response-Regulatoren

- 5x Phosphorylierungspuffer:

250 mM Tris-HCl (pH 7,5)
250 mM KCl
50 mM MgCl ₂

Die Fähigkeit der Histidinkinasen zur ATP-abhängigen Autophosphorylierung kann ebenso wie der Transfer dieser Phosphorylgruppe auf einen Response-Regulator *in vitro* durch die Zugabe von $\gamma^{33}\text{P}$ -ATP bzw. $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP zu den gereinigten Proteinen untersucht werden. Diese werden danach in einem denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (2.1), anschließend autoradiographisch dargestellt und die Banden bei Bedarf densitometrisch ausgewertet. Unter Standardbedingungen werden folgende Ansätze zusammenpipettiert:

- ATP-Mix:

ATP (10 mM, Amersham Pharmacia):	10 μl
$(\gamma^{33}\text{P})$ -ATP bzw. $(\gamma^{32}\text{P})$ -ATP (Amersham Pharmacia: 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$;	
3000 bzw. > 50000 Ci/mmol):	25 μl
dH ₂ O	ad 40 μl

- Phosphorylierungsansatz (halber Ansatz):

5 x Phosphorylierungspuffer:	5 μ l
ATP-Mix:	5 μ l
Response-Regulator:	4 μ M
Histidinkinase:	1 μ M
dH ₂ O	ad 25 μ l

Die Kinase wird zuletzt in den Ansatz gegeben, da dadurch die Phosphorylierungsreaktion gestartet wird. Nach einer fünfminütiger Inkubation bei RT werden die Reaktionen durch Zugabe von 7,5 μ l Laemmli-Puffer (2.1) gestoppt und 15 bis 20 μ l der Ansätze über ein denaturierendes 15%iges Polyacrylamid-Minigel aufgetrennt (2.1). Die Elektrophorese erfolgt bei 160 V und wird kurz bevor die Bromphenolblaufront das Gel verlässt beendet, da sonst das „heiße“ ATP aus dem Gel in den Puffer läuft. Dies ist nach etwa 50 min der Fall. Am unteren Gelrand wird mit einem scharfen Skalpell ein ca. 1,5 cm breiter Streifen vorsichtig entfernt, um sicherzustellen, dass markierte Proteine nicht durch die freien, nicht eingebauten Nukleotide bei der Autoradiographie überstrahlt werden. Das Trenngel wird anschließend bei 80°C für 1,5 Stunden unter Vakuum getrocknet (von unten nach oben: trockenes Whatman-Papier, feuchtes Whatman-Papier, das Trenngel, Frischhaltefolie und abermals trockenes Whatman-Papier). Das getrocknete Gel kann dann in eine zuvor gelöschte PhosphorImager-Kassette (Molecular Dynamics) gelegt werden. In Abhängigkeit von der Strahlungsintensität können die radioaktiv markierten Proteinbanden am PhosphoImager nach 2 bis 16 Stunden dargestellt, wenn erwünscht densitometrisch ausgewertet und mit Hilfe eines Thermodruckers dokumentiert, werden. Alternativ können die Proteine auch auf eine PVDF-Membran (2.3) geblottet werden, die dann ebenfalls im getrockneten Zustand mit Hilfe des PhosphoImagers ausgewertet werden kann. Anschließend kann ein Röntgenfilm in Abhängigkeit von der Strahlungsintensität für zwei Stunden und bis zu 14 Tage bei -20°C oder -80°C exponiert werden.

Sollte die Phosphorylierungsintensität eines Proteins bei maximaler Gelbelastung sehr gering sein, so kann eventuell eine Vervielfachung der Ansätze und damit eine Vervielfachung der Proteinmenge Abhilfe schaffen. Da aber keine beliebigen Volumina auf ein Gel geladen werden können, muss dann nach der Phosphorylierungsreaktion eine TCA-Fällung erfolgen (2.2). Um annähernd quantitativ zu fällen, gibt man vor der TCA-Zugabe noch etwa 5 μ g BSA in den Ansatz und nimmt das Pellet nach der Fällung in 20 bis 30 μ l Laemmli-Puffer (2.1) auf.

3.11.2 Bestimmung der kinetischen Verläufe der Phosphorylierungsreaktionen

Um den kinetischen Verlauf unterschiedlicher Phosphorylierungsreaktionen verfolgen und miteinander vergleichen zu können, werden die Phosphorylierungsansätze (3.11.1) mit einem Gesamtvolumen von 100 μ l angesetzt. Nach Zugabe der Histidin-Kinase werden in bestimmten Zeitintervallen Aliquots von je 11 μ l entnommen und zur Abstopfung der Reaktion mit 4 μ l bereits vorgelegtem Laemmli-Puffer vermischt. Die Proben werden wie unter 3.11.1 beschrieben gelelektrophoretisch aufgetrennt und die radioaktiv markierten Phosphorylierungsintensitäten werden bestimmt, indem der Wert der jeweils stärksten Bande einer Zeitreihe auf 100% gesetzt wird und die relativen Phosphorylierungsintensitäten der anderen Banden in Relation zu diesem gerechnet werden. Die erhaltenen Werte können dann in Abhängigkeit von der Zeit graphisch dargestellt werden.

E Ergebnisse

1 Identifizierung von Interaktionspartnern der periplasmatischen-, der PAS- und der HPt-Domäne der Histidinkinase BvgS aus *B. bronchiseptica* im Yeast Two-Hybrid System

Die Expression der Virulenzgene wird bei den klassischen *Bordetella*-Arten durch das BvgAS-Zwei-Komponentensystem kontrolliert. Das Grundprinzip und die molekularen Details des Phosphorelays zwischen der sensorischen Histidin-Kinase BvgS und dem Response Regulator BvgA sind weitgehend bekannt. Im Gegensatz dazu sind die Mechanismen der Signalwahrnehmung *in vivo* über die Kinase und die Reizweiterleitung noch weitgehend unklar, obwohl zumindest *in vitro* gezeigt werden konnte, dass die Aktivität bzw. Autophosphorylierung der Histidin-Kinase durch MgSO₄, Nikotinsäure bzw. oxidiertem Ubichinon moduliert werden kann. Bei der Histidin-Kinase BvgS handelt es sich um eine unorthodoxe Histidin-Kinase, die im Gegensatz zu den klassischen Sensorkinasen durch eine komplexere Domänen-Struktur gekennzeichnet ist (siehe B 3.2). Bislang ist weitgehend unklar, welche Bedeutung die periplasmatische-, PAS- bzw. HPt-Domäne bei der Signalwahrnehmung besitzen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb nach Erstellung einer *B. bronchiseptica* spezifischen Genbank mit Hilfe des Yeast Two-Hybrid Systems Interaktionspartner der einzelnen BvgS-Domänen identifiziert werden.

1.1 Einführung in die Funktionsweise des Yeast Two-Hybrid Systems

Für die Identifizierung von Interaktionspartnern der Histidin-Kinase BvgS wurde das Matchmaker GAL4 Yeast Two-Hybrid System (YTH) von Clontech verwendet. Hierbei handelt es sich um ein genetisches System, das dem *in vivo*-Nachweis von Protein-Interaktionen dient. Grundlage dieses Systems ist die modulare Struktur des eukaryotischen Transkriptionsfaktors GAL4. GAL4 ist, wie viele andere Transkriptionsfaktoren, aus zwei funktionell und strukturell voneinander unabhängigen Domänen aufgebaut. Die DNA-Bindungsdomäne vermittelt die Bindung des Transkriptionsfaktors an definierte DNA-Konsensus-Sequenzen im Promotorbereich, während die Transaktivierungsdomäne die Interaktion mit den Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie ermöglicht (Keegan *et al.*, 1986). Beide Protein-Domänen sind in der Regel auch dann korrekt gefaltet, wenn sie unabhängig voneinander in eukaryotischen Zellen exprimiert werden. Werden beide Domänen jeweils an Proteine fusioniert, die miteinander interagieren, wird über diese Interaktion wieder ein funktionell aktiver Transkriptionsfaktor generiert und die Aktivierung von GAL4-abhängigen Promotoren mit der Erkennungssequenzen für GAL4 (GAL4 UAS: GAL4 Upstream Activating Sequences) ermöglicht (Abb. 9) (Ma & Ptashne, 1988; Fields & Song, 1989; Chien *et al.*, 1991).

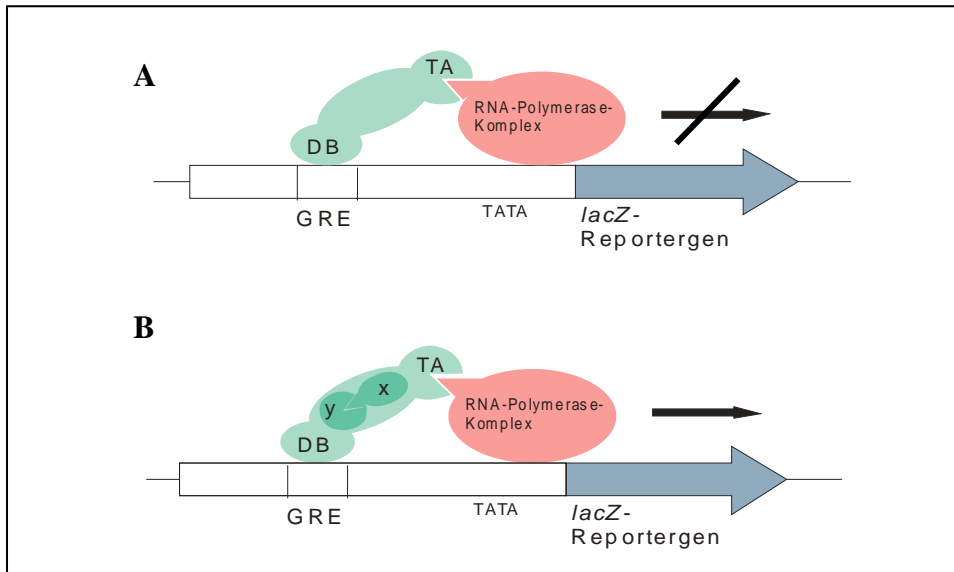


Abb. 9: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Yeast Two-Hybrid Systems.

A: Die Expression der isolierten GAL4-DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) und Transaktivierungsdomäne (TA) in *S. cerevisiae* führt nicht zur Aktivierung von GAL4-abhängigen Promotoren, da beide Domänen nicht in physischem Kontakt zueinander stehen.

B: Durch die Expression der DNA-Bindungsdomäne und der Transaktivierungsdomäne von GAL4 als Fusionsproteine mit zwei verschiedenen Proteinen, die miteinander interagieren, werden die beiden Domänen in räumliche Nähe gebracht. Die Expression von Reporter genen (hier: *lacZ*), die unter der Kontrolle von Promotoren mit der Erkennungssequenzen für GAL4 stehen, wird aktiviert. Die interagierenden Fusionsproteine sind hier am Beispiel der oben beschriebenen Domänen des BvgS-Proteins (Protein Y) und putativer Protein-Interaktionspartner (Protein X) dargestellt.

GRE: GAL4 responsables Element, DB: DNA-Bindungsdomäne, TA: Transaktivierungsdomäne.

Der im Matchmaker YTH-System verwendete *S. cerevisiae* Hefestamm AH109 besitzt drei verschiedene Reporter gen-Konstrukte, die unter der Kontrolle unterschiedlich stringenter GAL4-abhängigen Promotoren stehen. Die Verwendung von zwei Nährstoffmarkern (Komplementierung von Auxotrophien für Adenin und Histidin) und einem zusätzlichen Reporter genkonstrukt (β -Galaktosidase-Genexpression) ermöglicht eine stringente Selektion positiver Klone und reduziert die Wahrscheinlichkeit des Auftretens falsch positiver Klone.

1.1.1 Konstruktion der „Köder“- Plasmide pGBT9-BvgS-PAS, pGBT9-BvgS-PP und pGBT9-BvgS-HPt

Der entsprechende Sequenzbereich von *bvgS-PP* (Aminosäure 58-521), *bvgS-PAS*, (Aminosäure 574-680) und *bvgS-HPt* (Aminosäure 1084-1217) wurde mit Hilfe der Oligonukleotide *bvgS-PAS*for/rev, *bvgS-PP*for/rev und *bvgS-HPt*for/rev (siehe C 5) von chromosomaler DNA aus *B. bronchiseptica* 7865 mittels PCR-Reaktion amplifiziert, wodurch an das 5'-Ende der Sequenz jeweils eine *EcoRI*- und am 3'-Ende jeweils eine *BamHI*-Schnittstelle angefügt wurde. Nach entsprechendem Restriktionsverdau und Aufreinigung mittels des Qiaquick PCR Purification Kit (siehe D 1.10.2) wurden die PCR-Produkte über die *EcoRI*-/*BamHI*-Schnittstellen in in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors pGBT9 (Abb. 10) ligiert, wodurch eine *in frame* Fusion zwischen der GAL4 DNA-Bindedomäne und der jeweiligen BvgS-Domäne erreicht werden sollte.

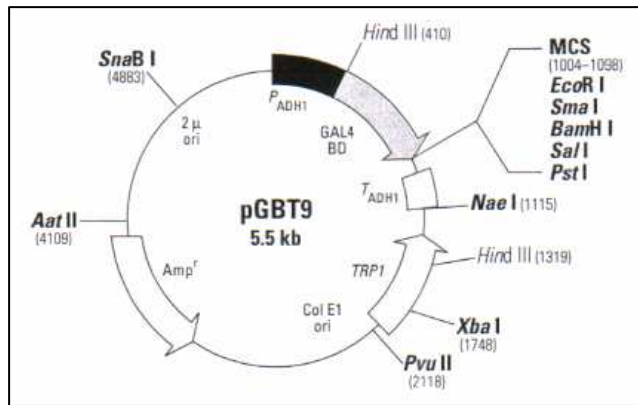


Abb. 10: Vektorkarte von pGBT9 mit Schnittstellen der Multiple Cloning Site (aus Clontech - Katalog 98/99).

T: transcription termination sequence

Der Ligationsansatz wurde anschließend in *E. coli* DH5a - Zellen transformiert und der Transformationsansatz auf LB/Amp50-Platten selektiert. Nach Analyse der hierüber gewonnenen Klone mittels PCR-Reaktion und den oben genannten Primern wurde von einigen positiven Klonen die Plasmid-DNA isoliert. Mit Hilfe der flankierenden Primern pGBT9for/rev wurde anschließend über Sequenzierungsreaktionen sichergestellt, dass die Sequenzbereiche von *bvgS-PAS*, *bvgS-PP* und *bvgS-HPt* ohne Mutation und im richtigen Leseraster C-terminal an die DNA-Bindedomäne von GAL4 kloniert wurden. Die Expression des Fusionsproteins wird durch den starken konstitutiv aktiven ADH (Alkohol-Dehydrogenase)-Promotor gewährleistet.

1.1.2 Konstruktion der *B. bronchiseptica* - Genbank im Vektor pGAD424

Die *B. bronchiseptica*-Genbank wurde unter Verwendung des pGAD424-Vektors, welcher die transkriptionsaktivierende Domäne trägt (Abb. 11), hergestellt. Um eine größtmögliche Abdeckung aller offenen Leserahmen von *B. bronchiseptica* zu erhalten, wurden DNA-Fragmente mit einer Größe von ca. 1000 bp in den Vektor pGAD424 kloniert.

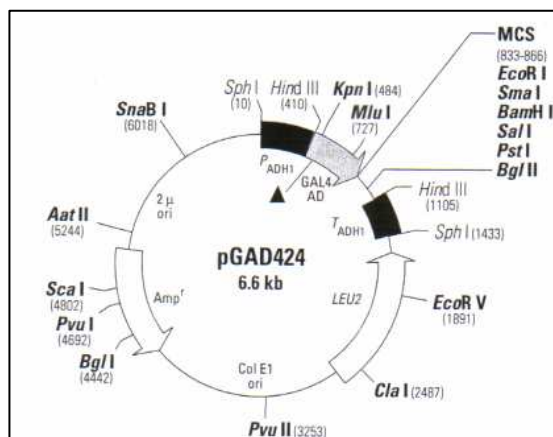


Abb. 11: Vektorkarte von pGAD424 mit Schnittstellen und Multiple Cloning Site (aus Clontech - Katalog 98/99).

Hierfür wurden 100 µg chromosomale DNA aus *B. bronchiseptica* in vier Intervallen à 3x30 Sekunden bei 50 Watt mittels Ultraschall geschert (siehe D 2.1.1). Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden über ein 0,7 %iges Agarosegel aufgetrennt und der Bereich um 1000 bp ausgeschnitten (Abb. 12). Nachdem die Enden der gescherten chromosomalen DNA-Fragmente mittels Klenow - und T7-Polymerase aufgefüllt wurden (siehe D 2.1.2), erfolgte die Phosphorylierung der geglätteten Enden (siehe D 2.1.3). Die DNA-Fragmente konnten so mittels „blunt-end“-Ligation über die *Sma*I-Schnittstelle in den dephosphorylierten

pGAD424-Vektor kloniert werden (siehe D 1.4.2-3). Die Plasmide wurden anschließend durch Elektroporation in kompetente *E. coli* DH5 α transformiert.

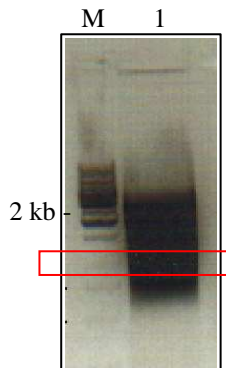


Abb. 12: Mittels Ultraschall gescherte chromosomale DNA von *B. bronchiseptica*. In Spur 1 ist die gescherte chromosomale *B. bronchiseptica* - DNA aufgetragen. Der Bereich um 1000 bp wurde aus einem 0,7 %igen Agarosegel eluiert. Das rote Rechteck markiert den Bereich der DNA-Elution.

Insgesamt wurden 7×10^4 unabhängige Klone detektiert. Anschließend wurde von 100 Klonen die Plasmid-DNA isoliert (siehe D 1.1.2). Über einen HindIII-Restriktionsverdau der einzelnen Plasmide wurde die Größe der klonierten chromosomalen Bereiche überprüft. Das Ergebnis einer HindIII-Restriktionsanalyse ist exemplarisch in Abb. 13 dargestellt. Anhand der Abbildung ist erkennbar, dass 75 % der getesteten Klone ein Plasmid mit inseriertem Genbankfragment enthielten.

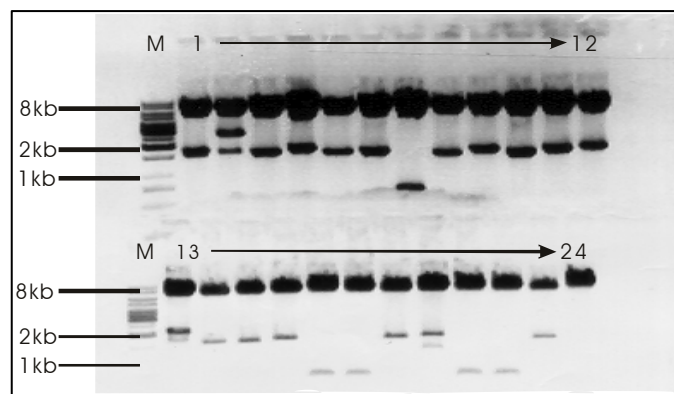


Abb. 13: Elektrophoretische Auftrennung der HindIII-Restriktionsansätze einzelner Klone aus der Genbank von *B. bronchiseptica*.

Das Bild zeigt ein 0,7 %-iges Agarosegel. Aufgetrennt wurde die mit HindIII geschnittene Plasmid-DNA von 24 *E. coli*-DH5 α -pGAD424-Genbank-Klonen. Bei 18 Klonen ist ein Insert der Größe zwischen 1,5 und 2 kb erkennbar. Der pGAD424-Vektor hat eine Größe von 8 kb. M: DNA-Längenmarker

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die meisten der untersuchten Klone nur ein Insert trugen. Die erforderliche Anzahl an Klonen für eine repräsentative Genbank wurde nach Clarke und Carbon (1976) ermittelt. Die Anzahl der Klone ergibt sich aus folgender Formel:

$$\text{Anzahl der Kolonien (N)} = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - x/y)}$$

P = Wahrscheinlichkeit für die Vollständigkeit der Genbank (0,99)

x = Minimale Fragmentgröße (800 bp)

y = Genomgröße von *B. bronchiseptica* ($5,4 \times 10^6$ bp)

Für eine repräsentative Genbank sind demnach ca. $3,1 \times 10^4$ Klone erforderlich. Da die erstellte Genbank aus ca. 7×10^4 unabhängigen Klonen bestand, sollte die Repräsentativität somit gewährleistet sein. Die erhaltenen Klone wurden mit 1 x PBS von den Selektionsplatten abgeschwemmt, gepoolt und bei -80°C als Glycerinkultur gelagert. Gleichzeitig wurde mit den gepoolten Klonen Kulturen angeimpft, von denen dann die Plasmid-DNA isoliert wurde (siehe D 1.1.4). Die gepoolte Plasmid-DNA wurde anschließend für die Transformation in den Hefestamm *S. cerevisiae* AH109 eingesetzt.

1.1.3 Suche nach Interaktionspartnern von BvgS-PAS, BvgS-PP und BvgS-HPt mit Hilfe des Yeast Two-Hybrid Systems

Die einzelnen „Köder“-Plasmide (pGBT9-BvgS-PAS, pGBT9-BvgS-PP und pGBT9-BvgS-HPt) wurden mit Hilfe des Grow'n' Glow Fast & Easy Transformation Kits von MoBiTec (siehe D 2.2) zuerst in AH109-Hefezellen transformiert und die Transformationsansätze auf SD-Selektionsplatten ohne Tryptophan ($\text{SD}\Delta\text{Trp}$) ausplattiert. Aus den daraus resultierenden Klonen wurde die Plasmid-DNA mittels des Grow'n'Glow Yeast Plasmid Isolation Kits (siehe D 2.4) präpariert und durch PCR-Analysen und Sequenzierungsreaktionen überprüft. Um eine hohe Transformationseffizienz der Genbank von *B. bronchiseptica* repräsentierenden pGAD424-Plasmids-Pools in den einzelnen AH109-Hefestämmen zu erreichen, wurde das Protokoll 1 des YEASTMAKER™ Yeast Transformation Systems 2 von BD Bioscience verwendet. Demnach wurden in 6 Transformationsrunden $3 \mu\text{g}$ des pGAD424-Genbank-Pools in frische kompetente, das jeweilige „Köder“-Plasmid tragende AH109 Hefestämmen transformiert und der Transformationsansatz auf Selektionsplatten ohne die Aminosäuren Leucin, Histidin und Tryptophan ($\text{SD}\Delta\text{Leu/His/Trp}$) ausplattiert. Nach ca. 3 Tagen Inkubationszeit wurden dann je 2500 Klone auf Selektionsplatten überstrichen, denen neben Leucin, Histidin und Tryptophan zusätzlich die Aminosäure Adenin ($\text{SD}\Delta\text{Leu/His/Trp/Ad}$) fehlte. Die hierüber isolierten Klone wurden auf ihre β -Galaktosidase-Aktivität hin untersucht (siehe D 2.5). Im Falle des „Köder“-Plasmids pGBT9-BvgS-PAS zeigten 105 Klone in Anwesenheit von X-Gal eine Blaufärbung (siehe D 2.5). Von den Hefeklonen, die das Plasmid pGBT9-BvgS-PP bzw. pGBT9-BvgS-HPt als Köder trugen wiesen 20 bzw. 7 Klone eine Blaufärbung auf. Die so identifizierten Klone wurden anschließend im folgenden Test auf die Spezifität ihrer Protein-Interaktion hin untersucht. Hierzu wurden alle Genbank-Plasmide aus den entsprechenden Hefeklonen isoliert und in *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert. Nach Aufreinigung der Plasmid-DNA aus den einzelnen *E. coli*-Klonen wurde diese erneut in *S. cerevisiae* AH109-Zellen retransformiert und diese auf ihre Wachstumsfähigkeit auf unterschiedlichen Selektionsplatten sowie deren β -Galaktosidase-Aktivität hin überprüft. Positive *S. cerevisiae* AH109-Klone wurden für weitere Untersuchungen herangezogen. Nach der Retransformation sollten sich die Selektionsmarker nicht verändert haben. Gleichzeitig wurde jeweils eines der Plasmide pGBT9-BvgS-PAS, pGBT9-BvgS-PP, pGBT9-BvgS-HPt, pLAM5' und pVA3 in *S. cerevisiae* SFY 526 transformiert. pLAM5' kodiert ein Fusionsprotein, welches sich aus dem humanen Lamin C und der GAL4-DNA-Bindedomäne zusammensetzt. pVA3 kodiert für ein hybrides Protein aus murinem p53 und der GAL4-DNA-Bindedomäne. Alle selektierten *S. cerevisiae* AH109- Klone wurden in einem „mating“ (siehe D 2.6) jeweils mit den drei verschiedenen *S. cerevisiae* SFY 526-Stämmen gepaart. Nach der Paarung wurden die Zellen auf verschiedene Selektionsplatten ausplattiert. Liegt eine spezifische Interaktion vor, so sollten nur die Stämme Wachstum zeigen, in denen Genbank-Protein und pGBT9-Bvg-Konstrukte gleichzeitig exprimiert werden. Zeigen aber auch Zellen Wachstum, in denen außer dem Genbankprotein nur die GAL4-Bindedomäne oder ein völlig anderes Protein (Lamin C) koexprimiert werden, wird die Interaktion als unspezifisch eingeschätzt. Diese

Genbankproteine interagieren mit der GAL4-BD bzw. dem LaminC und zeigen keine spezifische Interaktion mit den zu untersuchenden Domänen von BvgS. Anschließend wurden die Inserts der verbliebenen Genbank-Plasmide sequenziert und die erhaltenen Sequenzen in verschiedenen Datenbanken auf Homologien zu bekannten *B. bronchiseptica*-Proteinen untersucht. Als Datenbanken wurde die *B. bronchiseptica*-Datenbank des Sanger Center (<http://www.sanger.ac.uk>), die HUSAR-Datenbank des DKFZ in Heidelberg (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de>) und die Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verwendet. Für die *in silico*-Analysen wurde der BLAST-Algorithmus verwendet (Altschul *et al.*, 1997).

1.1.4 Ergebnisse des YTH-Screenings

Von den Proteinen, die nach den Analysen über das Yeast Two-Hybrid System als mögliche Interaktionspartner identifiziert wurden, konnten weitere Klone von folgenden Untersuchungen ausgeschlossen werden. Bei diesen Hefeklonen war das Genbank-Fragment relativ zur Transaktivierungsdomäne im falschen Leserahmen inseriert, d.h. das exprimierte Fusionsprotein war also artifiziell. So konnten für die BvgS-PAS-Domäne drei mögliche und für die periplasmatische Domäne der Histidin-Kinase ein möglicher Interaktionspartner identifiziert werden. Für die HPT-Domäne von BvgS konnten nach der Sequenzierung der im β -Galaktosidase-Assay positiv detektierten 7 Klone aufgrund des falschen Leserahmens des inserierten DNA-Fragmentes alle Klone ausgeschlossen werden. In Abb. 14 sind die im YTH-System identifizierten Interaktionspartner der einzelnen Domänen des BvgS aus *B. bronchiseptica* gezeigt.

Köderprotein	Bezeichnung der gefundenen Interaktionspartner, NP-Nummer
BvgS-PAS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Colicin V production protein BB2599, NP 889136 ▪ ABC transport system ATP binding protein, BB0602, NP 887152 ▪ putative binding-protein-dependent transport permease, BB4595, NP 891127
BvgS-PP	<ul style="list-style-type: none"> ▪ putative extracellular heme binding protein BB1905, NP 888450

Abb. 14: Ergebnisse der Yeast Two-Hybrid Analyse mit BvgS-PAS und BvgS-PP als „Köder“-Protein. Die Abbildung zeigt die identifizierten Interaktionspartner der PAS- und periplasmatischen Domäne von BvgS aus *B. bronchiseptica*. Das zur weiteren Untersuchung herangezogene Protein wurde farbig hervorgehoben. Angegeben wurde die putative oder experimentell nachgewiesene Funktion der gefundenen Proteine.

1.1.5 Verifizierung der im YTH-System identifizierten Proteininteraktionen zwischen BvgS-PAS und BB0602 mittels GST-Pulldown-Assay

Um die im YTH-System identifizierten Proteininteraktionen zwischen der BvgS-PAS-Domäne und der periplasmatischen Domäne von BvgS weiter biochemisch zu verifizieren, wurde versucht, die Proteine mit unterschiedlichen Affinitätstags zu überexprimieren und dann im GST-Pulldown-Assay auf ihre Interaktion zu testen.

1.1.5.1 Konstruktion von pGEX-3X-BB2599, pGEX-3X-BB1905, pGEX-3X-BB0602 und Überexpression des entsprechenden GST-Fusionsproteins

Die putativen Interaktionspartner der BvgS-PAS- und der BvgS-PP-Domäne BB2599, BB0602 und BB1905 wurden als GST-Fusionsproteine kloniert. So wurden die DNA-Fragmente, die dem kompletten Gen von BB2599, BB4595, BB0602 und BB1905 aus *B. bronchiseptica* entsprechen, von chromosomaler DNA aus *B. bronchiseptica* 7865 amplifiziert. Die DNA-Fragmente für BB2599, BB4594 und BB0602 wurden mit den Primerpaaren pGEX-BB2599-*Bam*HI/*Eco*RI, pGEX-BB4594-*Bam*HI/*Eco*RI und pGEX-BB0602-*Bam*HI/*Eco*RI mittels PCR-Reaktion amplifiziert und am 5'-Ende des PCR-Produkts eine *Eco*RI- und am 3'-Ende eine *Bam*HI-Schnittstelle angefügt. Das DNA-Fragment, das dem kompletten Gen BB1905 entspricht, wurde mit dem Primerpaar pGEX-BB1905-*Sma*Ifor/rev ebenfalls von chromosomaler DNA aus *B. bronchiseptica* 7865 amplifiziert und über die PCR-Reaktion am 5'-Ende und am 3'-Ende eine *Sma*I-Schnittstelle angefügt. Die PCR-Produkte wurden dann mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut, in den vorher ebenfalls entsprechend verdauten pGEX-3X-Vektor ligiert und jeweils der Ligationsansatz in kompetente *E. coli* BL21-Zellen transformiert. Von einem positivem Klon des jeweiligen Transformationsansatzes wurde das in pGEX-3X klonierte DNA-Fragment mit den Primern pGEX-5 und pGEX-3 sequenziert, um sicherzustellen, dass die Gensequenz keine durch die PCR-Reaktion bedingte Frameshift-Mutation aufweist. Im Anschluss wurde die Fähigkeit von *E. coli* BL21 (pGEX-3X-BB2599), (pGEX-3X-BB0602) und (pGEX-3X-BB1905)-Zellen zur Überproduktion des entsprechenden GST-Fusionsproteins überprüft. Nur für das BB0602-Protein konnte eine Überproduktion des GST-Fusionsproteins beobachtet werden. Die Abbildung 15 zeigt das Ergebnis der IPTG-Induktion von *E. coli* BL21 (pGEX-3X-BB0602)-Zellen, wobei die Überexpression des Fusionsproteins deutlich zu erkennen ist, und das Laufverhalten seiner theoretischen Größe von ca. 51 kDa entspricht.

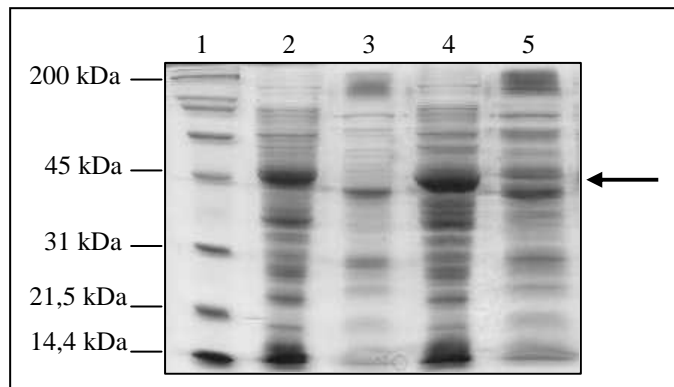


Abb. 15: Überproduktion des GST-BB0602 Fusionsproteins in *E. coli* BL21 (pGEX-3X-BB0602)-Zellen.

20 µl des jeweiligen Proteinlysats wurden auf einem 12 %igen Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteine wurden durch Coomassie-Färbung dargestellt. Proteinmarker „BioRad Precision Protein Standard“ (Spur1), *E. coli* BL21 (pGEX-3X-BB0602) durch 0,1 mM IPTG induziert (Spur 2 und 4), *E. coli* BL21 (pGEX-3X-BB0602) nicht induziert (Spur 3 und 5). Der Pfeil markiert die Bande, die dem ca. 51 kDa großen GST-BB0602-Fusionsprotein entspricht

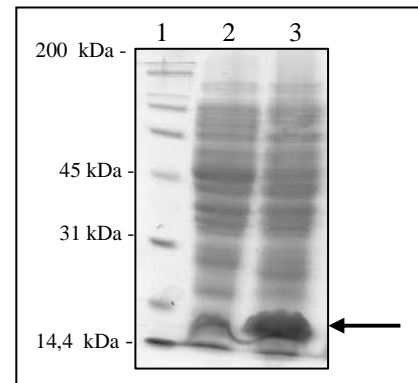
Da die IPTG-Induktion von *E. coli* BL21 (pGEX-3X-BB2599) und (pGEX-3X-BB1905) ohne Ergebnis blieb (Daten nicht gezeigt), konnte der unter 1.1.5.3 beschriebene biochemische Nachweis der im YTH-System beobachteten putativen Protein-Interaktion nur für das Protein BB0602 durchgeführt werden.

1.1.5.2 Konstruktion von pQE30-*bvgS*-PAS und Überexpression des entsprechenden His₆-Fusionsproteins

Die PAS-Domäne von BvgS wurde als His₆-Fusionsprotein aufgereinigt. Mittels PCR-Reaktion und den Oligonukleotiden pQE-*bvgS*-PAS-BamHI und pQE-*bvgS*-PAS-HindIII wurde ein DNA-Fragment, das der PAS-Domäne der Histidinkinase BvgS (Aminosäure 544-680) aus *B. bronchiseptica* entspricht von dem Plasmid pDM20, das die Sequenz des *bvgAS*-Gens trägt, amplifiziert. Über diese PCR-Reaktion wurde am 5'-Ende des PCR-Produktes eine BamHI- und am 3'-Ende eine HindIII-Schnittstelle angehängt. Das PCR-Produkt wurde dann über seine BamHI/HindIII-Schnittstellen in den pQE30-Vektor ligiert und der Ligationsansatz in kompetente *E. coli* M15 (pREP)-Zellen transformiert. Von einem positiven Klon wurde das in pQE30 klonierte DNA-Fragment mit den Primern pQE-5 und pQE-3 sequenziert, um sicherzustellen, dass es im richtigen Leserahmen mit dem Expressionsvektor pQE30 fusioniert war. Im Anschluss wurde die Fähigkeit von *E. coli* M15 (pREP) (pQE30-*BvgS*-PAS)-Zellen zur Überproduktion des His₆-BvgS-PAS-Fusionsproteins untersucht. Die Abbildung 16 zeigt das Ergebnis der IPTG-Induktion von *E. coli* M15 (pREP) (pQE30-*BvgS*-PAS)-Zellen, wobei die Überexpression des Fusionsproteins deutlich zu erkennen ist, und das Laufverhalten seiner theoretischen Größe von ca. 14 kDa entspricht.

Abb. 16: Überexpression des Fusionsproteins His₆-BvgS-PAS.

20 µl des jeweiligen Proteinlysats wurden auf einem 15 %igen Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteine wurden durch Coomassie-Färbung dargestellt. Proteinmarker „BioRad Precision Protein Standard“ (Spur 1), *E. coli* M15 (pREP) (pQE30-*BvgS*-PAS) nicht induziert (Spur 2), *E. coli* M15 (pREP) (pQE30-*BvgS*-PAS) durch 1 mM IPTG induziert (Spur 3). Der Pfeil markiert die Bande, die dem ca. 14 kDa großen His₆-BB0602-Fusionsprotein entspricht.



1.1.5.3 Untersuchung der Protein-Interaktion von His₆-BvgS-PAS und GST-BB0602 im GST-Pulldown-Assay

Um zu untersuchen, ob die über YTH-Analysen identifizierte Interaktion zwischen der PAS-Domäne von BvgS und dem BB0602-Protein auf eine spezifische Protein-Protein Interaktion zurückzuführen ist, wurde der GST-Pulldown-Assay verwendet. Glutathion S-Transferase (GST)-Fusionsproteine können über eine Bindung an Glutathion-Sepharose selektiv immobilisiert werden. Zunächst ergab sich das Problem, dass das überexprimierte GST-BB0602 Fusionsprotein nach Bakterienaufschluss in der unlöslichen Fraktion, in Einschlusskörperchen befand, in sog. *inclusion bodies*. Änderungen der Wachstumsbedingungen wie Erniedrigung der Temperatur und gleichzeitige Verlängerung der Induktionszeit, Erniedrigung der IPTG Konzentration bis zu 0,1 mM, Induktion bei einer höheren Zelldichte sowie Erhöhung der Belüftung hatten keinen Einfluss auf die Löslichkeit des Fusionsproteins. Die Aufarbeitung der Überexpressionskultur erfolgte schließlich nach Frangioni & Neel (1993), bei der die Struktur der *inclusion bodies* mit dem anionischen Detergens *N*-Laurylsarkosin unter nicht denaturierenden Bedingungen aufgelöst und das überproduzierte Protein freigesetzt wird (siehe D 3.5.2). Das GST-BB0602 Fusionsprotein konnte somit auf eine Glutathion-Sepharose Säule geladen werden. Nach einer einstündigen Inkubation der beladenen Säule auf einem Überkopf-Rotor bei 4°C wurde das Zellysate einer *E. coli* M15 (pREP) (pQE30-*BvgS*-PAS)-Überexpressionskultur auf das Säulenmaterial

gegeben und ebenfalls eine Stunde bei 4°C auf einem Überkopf-Rotor inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Säule mit dem 20-50 Säulenvolumen wurde der an das Affinitätsmaterial gebundene Proteinkomplex mittels Aufkochen der Glutathion-Sepharose in Lämmli-Puffer von der Säulenmatrix gelöst und über ein 12%iges Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Negativkontrolle diente zum einen das Säuleneluat des BB0602 Fusionsproteins allein und zum anderen das Eluat nach Beladung der GST-BB0602 Glutathion-Sepharose Säule mit einem His₆-Fusionsprotein aus *Wolinella succinogenes*. Die Abbildung 17 zeigt, dass nur im Falle des His₆-BvgS-PAS-Fusionsproteins eine Koelution von der Glutathion-Sepharose Säule beobachtet werden konnte. Das Koeluat des GST-BB0602-His₆-BvgS-PAS-Komplexes wurde parallel dazu zusammen mit einem Zelllysats aus *E. coli* M15 (pREP) (pQE30-*BvgS-PAS*)-Zellen über ein 15%iges Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. In anschließenden Western Blot-Analysen konnte unter Verwendung Penta-His-spezifischen Antiköpers (Qiagen) das His₆-BvgS-PAS-Fusionsprotein im Koeluat nachgewiesen werden (siehe Abb. 18).

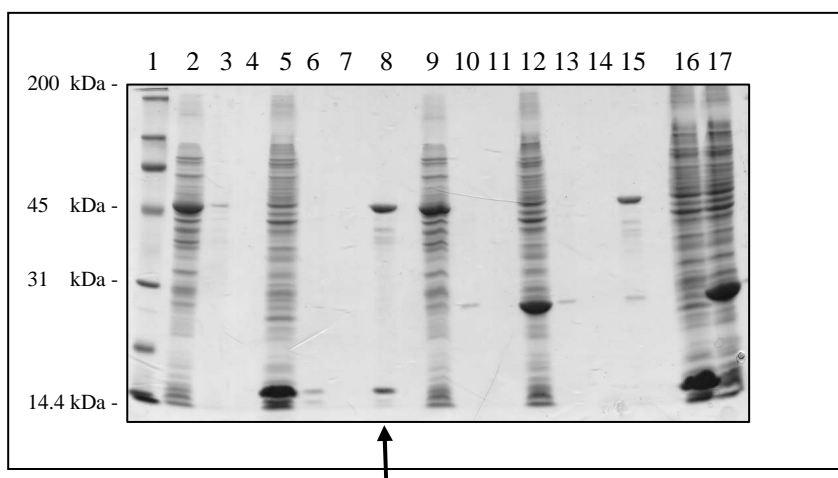


Abb. 17: Untersuchung der Proteininteraktion zwischen den Fusionsproteinen GST-BB0602 und His₆-BvgS-PAS im GST-Pulldown-Assay.

20 µl der jeweiligen Probe wurden auf einem 15 %igen Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteine wurden durch Coomassie-Färbung dargestellt. Proteinmarker „BioRad Precision Protein Standard“ (Spur 1), Zugabe des GST-BB0602 Fusionsproteins zum Säulenmaterial (Spur 2 und 9), Waschschrift 1-6 (Spur 3, 6, 10 und 13), Waschschrift 7-8 (Spur 4, 7, 11 und 14), Durchfluss nach Zugabe des Interaktionspartners His₆-BvgS-PAS zum GST-BB0602-Sepharose-Komplex (Spur 5), Durchfluss nach Zugabe der Negativkontrolle His₆-WS zum GST-BB0602-Sepharose-Komplex (Spur 12), Koeluat des GST-BB0602-His₆-BvgS-PAS-Komplexes (Spur 8), Koeluat des GST-BB0602-His₆WS-Komplexes (Spur 15), *E. coli* M15 (pREP) (pQE30-*bvgS-PAS*) durch 1mM IPTG induziert (Spur 16), *E. coli* BL21 (pGEX-3X-BB0602) durch 0,1 mM induziert (Spur 17). Der Pfeil markiert die Bande in Spur 8, die dem ca. 14 kDa großen koeluierten His₆-BvgS-PAS Fusionsprotein entspricht.

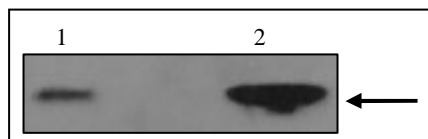


Abb. 18: Western-Blot Analyse zur Überprüfung des im GST-Pulldownassay koeluierten His₆-BvgS-PAS Fusionsproteins.

Das Koeluat des GST-BB0602-His₆-BvgS-PAS-Komplexes (Spur 1) wurde zusammen mit einem Zelllysats aus *E. coli* M15 (pREP) (pQE30-*bvgS-PAS*) induziert durch 1 mM IPTG (Spur 2) über ein 15%iges Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit Penta-His-spezifischem Antikörper inkubiert. Der Pfeil markiert die Bande, die dem His₆-BvgS-PAS-Fusionsprotein entspricht.

Im Falle der PAS-Domäne der Histidin-Kinase BvgS aus *B. bronchiseptica* konnte ein möglicher Interaktionspartner im Yeast Two-Hybrid System identifiziert werden, der Aufschluss über die Signalwahrnehmung *in vivo* geben kann. Für die anderen im Hefesystem detektierten putativen Protein-Protein-Interaktionen bleibt der biochemische Nachweis der Interaktion noch zu erbringen.

2 Versuche zur funktionellen und strukturellen Konservierung der Response Regulatoren BvgA aus *B. holmesii* (BvgA_{BH}) und BvgA aus *B. pertussis* (BvgA_{BP})

Das BvgAS-Zwei-Komponenten-System ist bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters sowohl in seiner Sequenz als auch in seiner Funktion hoch konserviert. *In silico*-Analysen der BvgA-Sequenzen aus *B. pertussis* und *B. holmesii* zeigten eine hohe Sequenzhomologie im Bereich der Receiver- und Output-Domäne (Abb. 19).

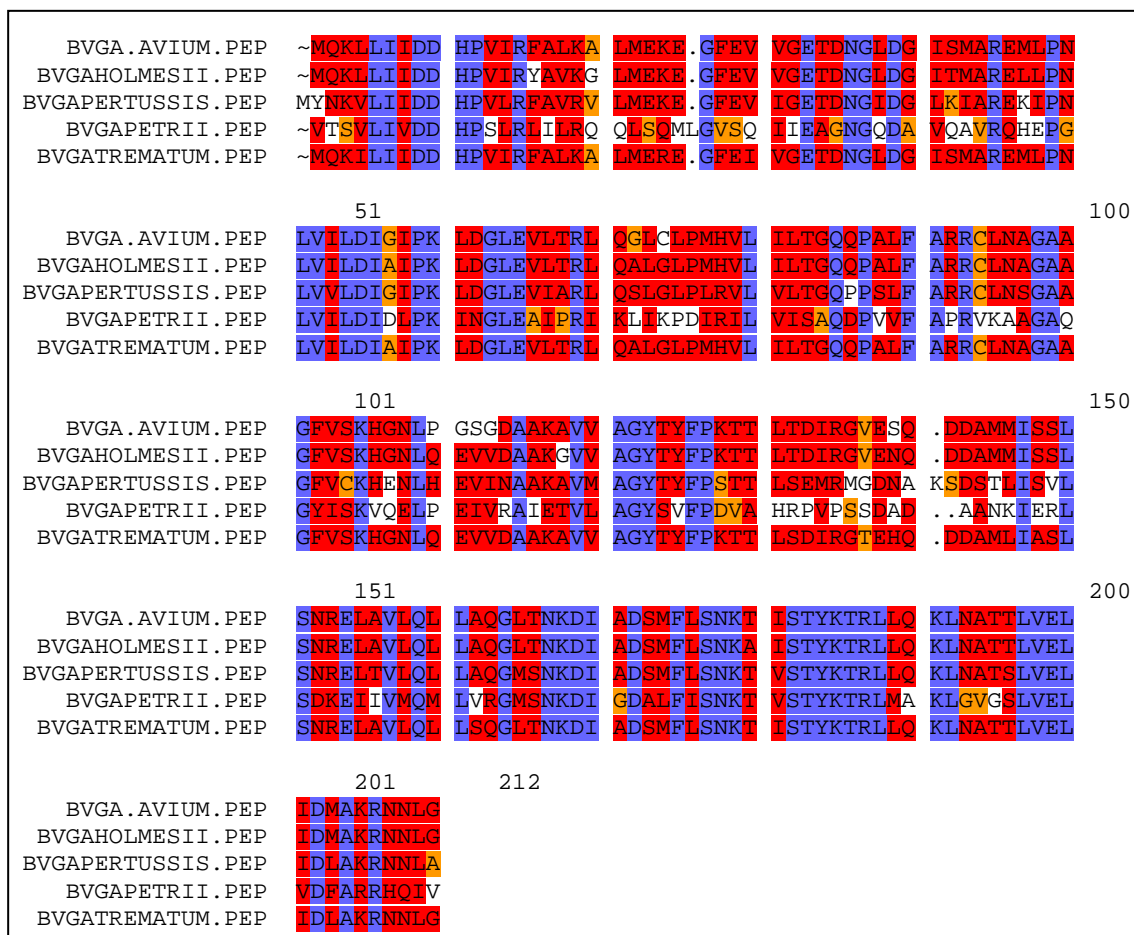


Abbildung 19: Alignment der Aminosäuresequenzen der von BvgA einzelner *Bordetella*-Arten.

Die BvgA Sequenzen von *B. pertussis* und *B. avium* beziehen sich auf die in den Datenbanken veröffentlichten Daten (<http://www.sanger.ac.uk>). Identische Aminosäuren sind blau hinterlegt, Aminosäuren mit identischen chemischen Eigenschaften sind rot gekennzeichnet. Nicht verwandte Aminosäuren sind in orange dargestellt.

Wie man aus dem Alignment entnehmen kann, sind die Proteinsequenzen im Bereich der Receiver- und Output-Domäne stark konserviert. So stimmen beispielsweise die Aminosäuresequenzen von BvgA aus *B. pertussis* und *B. holmesii* zu 76,0% überein. Im Gegensatz dazu zeigt der über Massenspektrometrie identifizierte, sogenannte Linkerbereich

(Bantscheff *et al.*, 2000) eine hohe Sequenzvariabilität. Überraschenderweise zeigt *B. holmesii* trotz der durch die 16S rDNA-Sequenz begründeten nahen Verwandtschaft zu *B. pertussis* eine erstaunlich hohe Übereinstimmung mit dem vor kurzem identifizierten BvgAS-System aus *B. avium* (Spears *et al.*, 2003). So scheint die Konservierung der BvgAS-Sequenzen zwischen den „neuen“ Arten besonders stark ausgeprägt zu sein, da ähnliche Ergebnisse auch für *B. hinzii* und *B. trematum* beobachtet werden konnten (Gerlach *et al.*, 2004).

Im Bereich der Output-Domäne mit ihrem DNA-bindenden Helix-Turn-Helix-Motiv zeigt sich bei allen Arten der höchste Konservierungsgrad hinsichtlich der Aminosäuresequenzen. Trotz der umfangreichen Sequenzkonservierung der BvgA-Proteine aus *B. holmesii* und *B. pertussis* konnte eine *B. pertussis* bvgA-Mutante nicht durch den bvgA-Lokus aus *B. holmesii* komplementiert werden (Gerlach *et al.*, 2004). Durch die Konstruktion eines hybriden BvgA-Proteins (BvgA_{fus}), welches aus der Receiver- und Linker-Domäne des BvgA_{BH}-Proteins und der Output-Domäne aus BvgA_{BP} zusammengesetzt ist (Abbildung 21), sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die wenigen Abweichungen zwischen den Aminosäuresequenzen der Output-Domänen dafür verantwortlich sind, dass BvgA aus *B. holmesii* die Funktion des Response Regulators in einer *B. pertussis* bvgA-Mutante *in vivo* und *in vitro* nicht übernehmen kann. Die Abbildung 20 zeigt das Alignment der Aminosäuresequenzen der Response Regulatoren aus *B. pertussis* und *B. holmesii*.

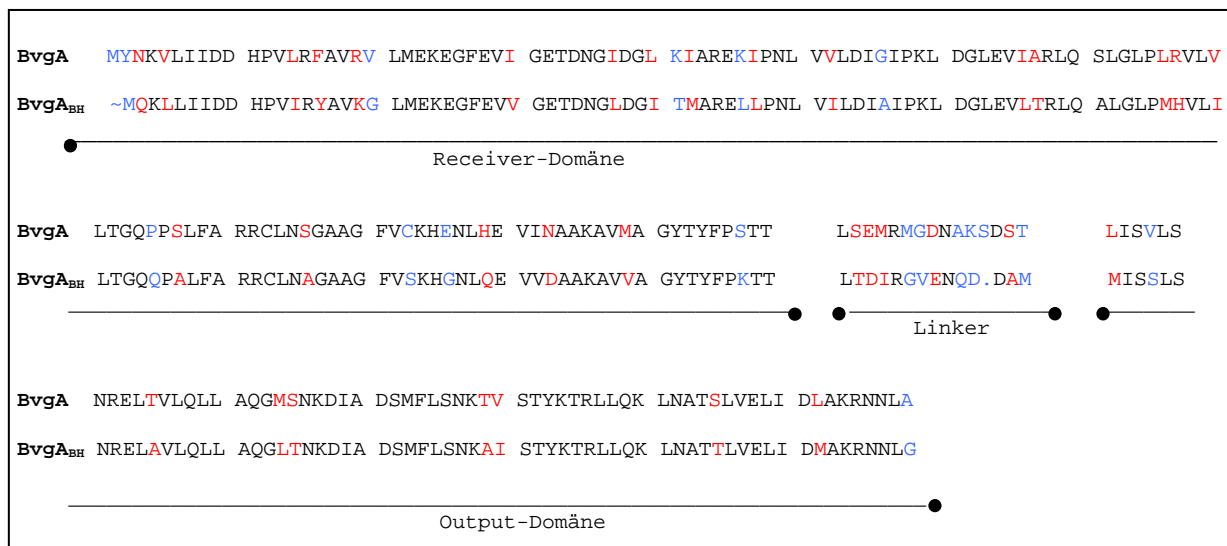


Abb. 20: Alignment der Aminosäuresequenzen und Domänenstruktur der Response Regulatoren aus *B. pertussis* (BvgA) und *B. holmesii* (BvgA_{BH}).

Identische Aminosäuren sind in schwarz dargestellt. Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften sind in rot gekennzeichnet. Blaue Buchstaben kennzeichnen nicht verwandte Aminosäuren (verändert nach Gerlach *et al.*, 2004)

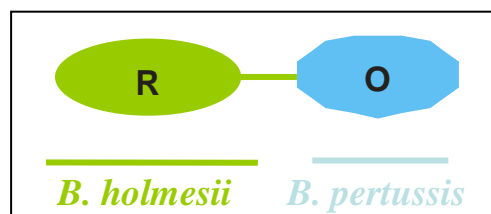


Abb. 21: Schematische Darstellung des hybriden Response Regulators BvgA_{fus}.

Die Receiver- und die Linker-Domäne des BvgA_{BH}-Proteins aus *B. holmesii* sind in grün dargestellt. Die Output-Domäne des BvgA_{BP}-Proteins aus *B. pertussis* ist in blau dargestellt.

2.1 Konstruktion von pQE30-*bvgA_{fus}* und Überexpression des entsprechenden hybriden Fusionsproteins His₆-BvgA_{fus}

Ein 425 bp großes DNA-Fragment, das der Sequenz der Receiver- und Linker-Domäne des Response Regulators aus *B. holmesii* entspricht, wurde mit den Oligonukleotiden *bvgA_{BH}*BamHIfor und *bvgA_{BH}*EcoRIrev von chromosomaler DNA des *B. holmesii*-Stammes G7702 mittels PCR-Reaktion amplifiziert, wodurch an das 5' Ende der Sequenz eine *Bam*HI- und an das 3' Ende eine *Eco*RI-Schnittstelle angefügt wurde. Für die Gewinnung des 197 bp großen DNA-Fragmentes, das der Sequenz der Output-Domäne des BvgA_{BP} entspricht, wurde mit den Oligonukleotiden *bvgA_{BP}*-O-EcoRI und *bvgA_{BP}*-O-KpnI eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA des *B. pertussis*-Stammes Tohama I Δ *tox* durchgeführt, wobei an das 5' Ende des PCR-Produktes eine *Eco*RI- und an das 3' Ende eine *Kpn*I-Schnittstelle angefügt wurde. Die beiden PCR-Produkte wurden jeweils mit *Eco*RI verdaut und miteinander ligiert. Mit dem Ligationsprodukt wurde nochmals eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden *bvgA_{BH}*BamHIfor und *bvgA_{BP}*-O-KpnI durchgeführt und das PCR-Produkt anschließend mit *Bam*HI und *Kpn*I verdaut. Das hierüber gewonnene 697 bp große DNA-Fragment wurde anschließend in den vorher mit *Bam*HI und *Kpn*I verdauten pSK-Vektor zwischenkloniert und im Anschluss die in die *bvgA_{fus}*-Sequenz eingefügte *Eco*RI-Schnittstelle mittels ortsspezifischer Mutagenese deletiert. Die erfolgreiche Deletion wurde durch eine Sequenzierungsreaktion mit den Primern M13-Universal und M13-Reverse überprüft. Die Plasmid-DNA wurde aus einem positiven *E. coli* (pSK-*bvgA_{fus}*)-Klon isoliert und mit den Enzymen *Bam*HI und *Kpn*I verdaut. Das *bvgA_{fus}*-DNA-Fragment konnte dann in den mit *Bam*HI und *Kpn*I verdauten pQE30-Vektor ligiert werden. Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* M15 (pREP)-Zellen transformiert. Von einem Klon wurde das in pQE30 klonierte DNA-Fragment mit den Primern pQE-5 und pQE-3 sequenziert und auf mögliche Mutationen überprüft. Im Anschluss wurde die Fähigkeit von *E. coli* M15 (pREP) (pQE30-*bvgA_{fus}*)-Zellen zur Überproduktion des His₆-BvgA_{fus}-Fusionsproteins untersucht. Abbildung 22 zeigt das Ergebnis der IPTG-Induktion von *E. coli* M15 (pREP) (pQE30-*bvgA_{fus}*)-Zellen, wobei die Überexpression des Fusionsproteins deutlich zu sehen ist, und das Laufverhalten des Fusionsproteins seiner theoretischen Größe von ca. 24 kDa entspricht.

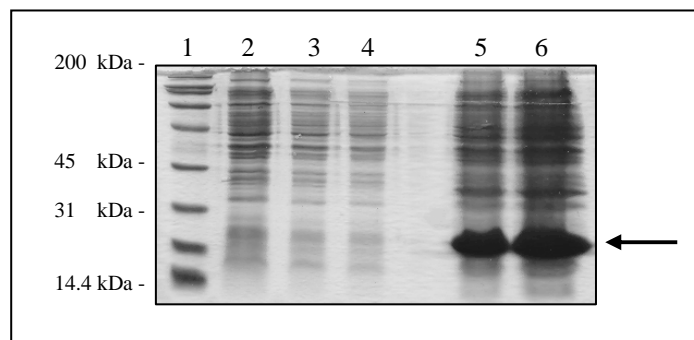


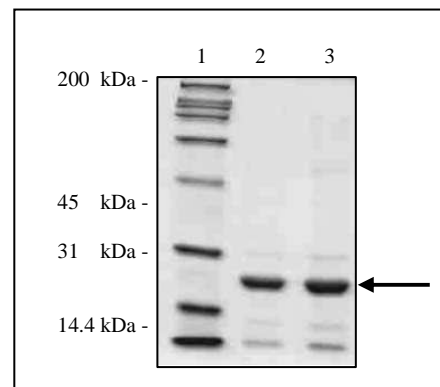
Abb. 22: Überproduktion des Fusionsproteins His₆-BvgA_{fus} in *E. coli* M15 (pREP) (pQE30-*bvgA_{fus}*)-Zellen.

20 μ l des jeweiligen Proteinlysats wurden auf ein 12 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteine wurden mittels Coomassie-Färbung dargestellt. Proteinmarker „BioRad Precision Standard“ (Spur 1), *E. coli* M15 (pREP) (pQE30-*bvgA_{fus}*) nicht induziert (Spur 2-4), *E. coli* M15 (pREP) (pQE30-*bvgA_{fus}*) durch 1 mM IPTG induziert (Spur 5-6). Der Pfeil markiert die Bande, die dem ca. 24 kDa großen His₆-BvgA_{fus}-Fusionsprotein entspricht.

2.2 Aufreinigung des Fusionsproteins His₆-BvgA_{fus}

Die Aufreinigung des Fusionsproteins His₆-BvgA_{fus} erfolgte über eine Ni-NTA-Agarosesäule unter der Verwendung der Aufreinigungsapparatur *Äkta prime* (Amersham Pharmacia Biotech) (siehe D 3.6.1). Für die Überexpression wurden 500 ml LB-Medium mit einer Übernachtskultur von *E. coli* M15 (pREP) (pQE30-*bvgA_{fus}*) im Verhältnis 1:20 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 angezogen. Die Induktion erfolgte durch die Zugabe von 1mM IPTG Endkonzentration zur Bakteriensuspension, die daraufhin weitere 3 h bei 37°C im Schüttler inkubiert und dann abzentrifugiert wurde. Nach dem Zellaufschluss mittels der French Press sowie einem Zentrifugationsschritt wurde untersucht, ob sich das Protein im Überstand (d.h. löslich) oder im Pellet (d.h. unlöslich) in sog. *inclusion bodies* befindet. Das Fusionsprotein His₆-BvgA_{fus} konnte im Bakterienpellet nachgewiesen werden und lag demnach in unlöslicher Form vor. Nach der Behandlung des Bakterienpellets mit Triton-Puffer und anschließendem Aufschluss der *inclusion bodies* durch die stark denaturierende Substanz Guanidinium-HCl wurde nach einem weiteren Zentrifugationsschritt der filtrierte Überstand auf die equilibrierte Ni-NTA-Säule der *Äkta prime* aufgetragen. Über das „Refolding Program“ der *Äkta prime* für denaturierte Proteine wurde das Fusionsprotein His₆-BvgA_{fus} auf der Säule renaturiert und anschließend über einen Imidazol-Gradienten von der Säule eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen von je 1ml gesammelt. Jede zweite Fraktion wurde dann auf einem 12 %igen Polyacrylamidgel aufgetragen, um die Fraktionen zu identifizieren, die das größte Volumen an eluiertem His₆-BvgA_{fus}-Protein aufzeigten und anschließend für die Dialyse vereinigt wurden. Nach der Dialyse wurde nach der Bradford-Methode eine Proteinkonzentration für das His₆-BvgA_{fus}-Fusionsprotein von 1,3 µg/µl bestimmt, bevor es in Aliquots von 500µl bei -80°C gelagert wurde. Abbildung 23 zeigt das dialysierte Fusionsprotein His₆-BvgA_{fus}.

Abb. 23: His₆-BvgA_{fus}-Fusionsprotein nach der Dialyse. Je 20µl des dialysierten His₆-BvgA_{fus}-Fusionsproteins wurden auf ein 12 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. „BioRad Precision Standard“ (Spur 1), His₆-BvgA_{fus}-Fusionsprotein (Spur 2-3). Der Pfeil markiert die Bande, die die dem ca. 24 kDa großen His₆-BvgA_{fus}-Fusionsprotein entspricht.



2.3 Untersuchung der *in vitro*-DNA-Bindeeigenschaft des hybriden Response Regulators BvgA_{fus} an die *fhaB*-Promotorregion aus *B. pertussis*

Bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters wird die Transkription des *fhaB*-Gens, das für den Virulenzfaktor FhaB (Filamentöses Hämagglutinin) kodiert, durch die Bindung des phosphorylierten Response Regulators BvgA an die *fhaB*-Promotorsequenz aktiviert. Für das wildtypische BvgA-Protein aus *B. holmesii* konnte trotz der hohen Sequenzhomologie mit dem BvgA-Protein aus *B. pertussis* keine Bindung an den *fhaB*-Promotor *in vitro* beobachtet werden (Gerlach *et al.*, 2004). Mit Hilfe von Gelretardations-Experimenten sollte untersucht werden, ob der hybride Response Regulator BvgA_{fus} in der Lage ist, an die *fhaB*-Promotorsequenz von *B. pertussis* zu binden. Hierfür wurde zunächst mit den Oligonukleotiden *fhaBup5* und *fhaBup3* und der „Pfu“-DNA-Polymerase ein 77 bp großes

DNA-Fragment von dem Plasmid pProm-67 amplifiziert. Das Plasmid pProm-67 enthält ein 1250 bp langes *PstI/PstI*-DNA-Fragment, das u.a. die *fhaB*-Promotorregion aus *B. pertussis* beinhaltet. Das gereinigte PCR-Produkt wurde anschließend mit Hilfe der T7-Polynucleotid-Kinase unter der Verwendung von γ^{32} -P-ATP radioaktiv markiert. Für die Gelretardations-Experimente wurden unterschiedliche Mengen an gereinigtem His₆-BvgA_{fus}-Fusionsprotein eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde der Response Regulator BvgA aus *B. pertussis* verwendet, der als natives Protein über eine Heparin-Sepharose-Säule von Andreas Bock aufgereinigt worden war (Bock, 2002). Die Negativkontrolle stellte das His₆-BvgA_{BH}-Fusionsprotein aus *B. holmesii* dar, dem keine Bindung an die *fhaB*-Promotorsequenz von *B. pertussis* nachgewiesen werden konnte (Gerlach *et al.*, 2004). Zur *in vitro*-Phosphorylierung der Response Regulatoren wurde ein Ansatz vor der Zugabe der Sonde mit 50 mM Acetylphosphat versetzt, während parallel dazu ein weiterer Ansatz ohne Acetylphosphat mit der Sonde inkubiert wurde. Die Auftrennung erfolgte im Anschluss elektrophoretisch über ein natives Polyacrylamidgel, das dann autoradiographisch ausgewertet wurde. Wie in Abbildung 24 zu erkennen ist, konnte für den hybriden Response Regulator BvgA_{fus} unabhängig vom Phosphorylierungsstatus bereits ab 100 ng eingesetztem His₆-BvgA_{fus}-Fusionsprotein ein Protein-DNA-Komplex nachgewiesen werden. Auch zu erkennen ist, dass ab einer Proteinkonzentration von 300 ng eingesetztem His₆-BvgA_{fus}-Fusionsprotein kein definierter Komplex mehr festzustellen ist, was auf eine Oligomerisierung des Response Regulator Proteins schließen lässt. Dieses Phänomen konnte auch für das BvgA-Protein aus *B. pertussis* beobachtet werden (Perraud *et al.*, 2000). Wie erwartet konnte für den Response Regulator BvgA_{BP} eine Bindung an die *fhaB*-Promotorsequenz von *B. pertussis* gezeigt werden. Entsprechend früheren Untersuchungen (Gerlach *et al.*, 2004) wurde für das BvgA_{BH}-Protein aus *B. holmesii* kein Protein-DNA-Komplex beobachtet.

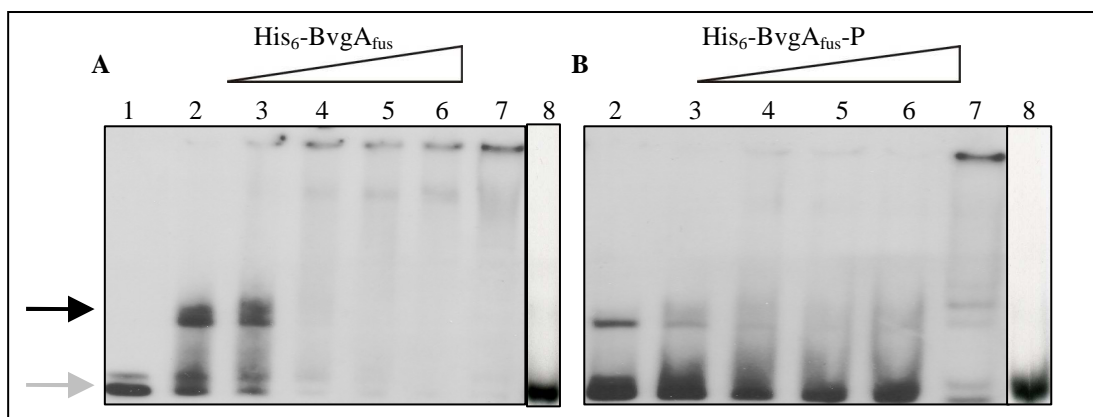


Abb. 24: Gelretardations-Experimente zur Überprüfung der DNA-Bindeeigenschaft des hybriden Response Regulators BvgA_{fus} (His₆-BvgA_{fus}), BvgA aus *B. pertussis* und BvgA aus *B. holmesii* an die *fhaB*-Promotorregion.

15000 cpm der Sonden -DNA (Spur 1) wurden jeweils mit 100, 200, 300, 500 und 650 ng His₆-BvgA_{fus} in Abwesenheit von Acetylphosphat (Abb. 26A, Spur 2-6) bzw. in Anwesenheit von Acetylphosphat (Abb. 26B, Spur 2-6) inkubiert. BvgA_{BP} wurde in einer Konzentration von 500 ng in Abwesenheit von Acetylphosphat (Abb. 26A, Spur 7) und in Anwesenheit von Acetylphosphat (Abb. 26B, Spur 7) aufgetragen. In der Spur 8 der Abb. 26A sind 240 ng des nicht-phosphorylierten Response Regulators BvgA von *B. holmesii* und in Abb. 26B 240 ng der phosphorylierten Form von BvgA_{BH} dargestellt. Die Auftrennung erfolgte auf einem 4 %igen nativen Polyacrylamidgel, das autoradiographisch ausgewertet wurde. Der schwarze Pfeil kennzeichnet den Protein-DNA-Komplex in Abb. 26A und Abb. 26B. Der graue Pfeil kennzeichnet das Laufverhalten der freien Sonde (Spur 1).

In anschließenden Kompetitions-Experimenten wurde untersucht, ob die Bindung von BvgA_{fus}-P an den *fhaB*-Promotorbereich von *B. pertussis* spezifisch erfolgt. Als spezifischer

Kompetitor wurde das unmarkierte 77 bp große *fhaB*-DNA-Fragment, welches zuvor aus pProm-67 amplifiziert wurde, eingesetzt. Als unspezifischer Kompetitor diente ein ebenfalls 77 bp großes DNA-Fragment, das aus dem *bvgS*-Gen von *B. bronchiseptica* mittels der Oligonukleotide KompBvgS5 und KompBvgS3 amplifiziert wurde. Die Kompetitoren wurden jeweils im Überschuss dem Reaktionsansatz, der 100 ng unphosphoryliertes BvgA_{fus}-Protein enthielt, zugesetzt. Aus Abbildung 25 geht hervor, dass die Zugabe des spezifischen Kompetitors zu einer Abnahme der Bandenintensität führt. Ab einem 30-fachen Überschuss an unmarkierter Sonde ist eine deutliche Abnahme des Protein-DNA-Komplexes zu beobachten. Im Gegensatz dazu kommt es selbst bei einem 1000-fachen Überschuss an unspezifischem Kompetitor nicht zu einer Verdrängung des hybriden Response Regulators BvgA_{fus} aus dem Protein-DNA-Komplex. Dies deutet daraufhin, dass es sich um eine spezifische Bindung des His₆-BvgA_{fus}-Fusionsproteins an die *fhaB*-Promotorregion aus *B. pertussis* handelt.

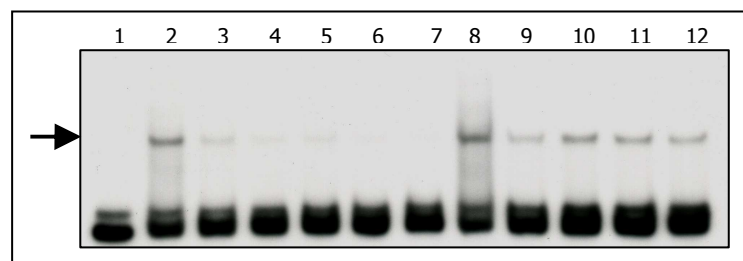


Abb. 25: Kompetitions-Experiment mit spezifischem und unspezifischem Kompetitor im Überschuss. 15000 cpm der Sonden-DNA (Spur1) wurden mit je 100 ng BvgA_{fus}-Protein in Anwesenheit von einem 10-, 30-, 50-, 100- und 150-fachen Überschuss (Spur 2-7) an spezifischem Kompetitor bzw. in Anwesenheit von einem 150-, 300-, 600- und 1000-fachem Überschuss an unspezifischem Kompetitor inkubiert. Der Pfeil markiert den Protein-DNA-Komplex.

2.4 Untersuchung der *in vitro*-Phosphorylierbarkeit des His₆-BvgA_{fus}-Fusionsproteins durch die Histidinkinase BvgS aus *B. pertussis*

Die Phosphorylierung des Response Regulators durch die zugehörige Histidinkinase führt zur Stimulation der DNA-Bindungs-Aktivität der C-terminalen Output-Domäne und somit zur Aktivierung bzw. Inaktivierung der Transkription von *bvg*-abhängigen Genen. Kürzlich konnte ein Phosphotransfer zwischen der Histidinkinase BvgS aus *B. pertussis* (BvgS_{BP}) und dem Response Regulator BvgA aus *B. holmesii* gezeigt werden (Gerlach *et al.*, 2004). Um die *in vitro*-Phosphorylierbarkeit des hybriden Response Regulators BvgA_{fus} näher zu untersuchen, wurde mit Hilfe von Phosphorylierungsassays der Phosphotransfer von BvgS_{BP} auf BvgA_{fus} untersucht. Für diese Experimente wurde die von Andreas Bock gereinigte, cytoplasmatische Domäne von BvgS verwendet (Bock & Gross, 2002). Hierbei handelt es sich um ein N-terminales His₆-Fusionsprotein, das die cytoplasmatischen BvgS-Anteile mit den Aminosäuren 583-1238 umfasst (Perraud *et al.*, 1998). Aufgrund des Fehlens der periplasmatischen Input-Domäne und der Transmembran-Region liegt das Protein in einer löslichen und die Kinase in einer konstitutiv aktiven Form vor. Als Positivkontrolle diente das von Gabriele Gerlach gereinigte His₆-BvgA_{BH}-Fusionsprotein aus *B. holmesii* G7702. Die Regulatoren und die Kinase wurden im Verhältnis 4:1 bzw. 8:1 mit einer Kinase-Endkonzentration von 1µM eingesetzt. In Abbildung 26 ist zu erkennen, dass der hybride Response Regulator BvgA_{fus}, wie auch die Positivkontrolle BvgA_{BH} aus *B. holmesii* durch die Histidinkinase BvgS aus *B. pertussis* phosphoryliert werden kann.

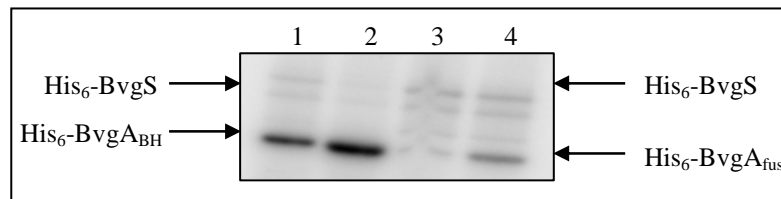


Abb. 26: Autophosphorylierung von His₆-BvgS aus *B. pertussis* und Phosphotransfer zu His₆-BvgA_{BH} (Spur 1-2) und His₆-BvgA_{fus} (Spur 3-4).

Die Response Regulatoren und die Kinase wurden im Verhältnis 4:1 (Spur 1 und 3) und im Verhältnis 8:1 (Spur 2 und 4) eingesetzt und 5 min in Anwesenheit von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm nach der Gelelektrophorese.

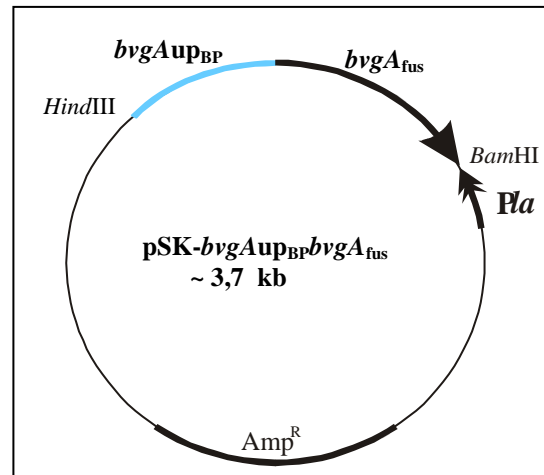
2.5 Konstruktion und Charakterisierung des hybriden *B. pertussis* (BP) - Stammes BP 359 (pMMB208-*bvgA*_{BP}*bvgA*_{fus})

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob der hybride Response Regulator BvgA_{fus} *in vivo* die Funktion des wildtypischen BvgA-Proteins aus *B. pertussis* übernehmen kann. Hierfür wurde der hybride *B. pertussis*-Stamm BP 359 (pMMB208-*bvgA*_{BP}*bvgA*_{fus}) konstruiert. Der Stamm BP 359 besitzt eine Tn5-Insertion innerhalb des *bvgA*-Gens, wodurch die Transkription und Expression des Response Regulators nicht mehr stattfinden kann. Aufgrund des polaren Effektes ist zudem die Expression der Histidinkinase BvgS stark beeinträchtigt. Wegen der fehlenden Expression des Adenylatcyclase-Toxins bildet der Stamm nicht-hämolytische Kolonien auf Blutagarplatten aus und ist deshalb leicht von wildtypischen Isolaten zu unterscheiden. Um zu untersuchen, ob der hybride Response Regulator BvgA_{fus} die Funktion des inaktiven *bvgA*-Lokus in BP 359 ersetzen kann, wurde der hybride Stamm BP 359 (pMMB208-*bvgA*_{BP}*bvgA*_{fus}) konstruiert.

Um die positive Autoregulation des *bvgA*_{fus}-Gens im hybriden BP 359 (pMMB208-*bvgA*_{BP}*bvgA*_{fus})-Stamm sicherzustellen, wurde der Upstreambereich des *bvgA*-Gens aus *B. pertussis* der *bvgA*_{fus}-Sequenz vorangestellt (Abb. 27). Ein 234 bp großes DNA-Fragment, welches dem Upstreambereich des *bvgA*-Gens aus *B. pertussis* entspricht, wurde mittels der Oligonukleotide *bvgA*_{BP}pHindIII und *bvgA*_{BP}pKpnI von chromosomaler DNA aus *B. pertussis* amplifiziert. Durch diese PCR-Reaktion wurde am 5'-Ende des PCR-Produktes eine HindIII-Schnittstelle und am 3'-Ende eine KpnI-Schnittstelle angefügt. Die *bvgA*_{fus}-Sequenz, wurde mittels der Primer *bvgA*_{fus}KpnI und *bvgA*_{fus}BamHI von dem Plasmid pSK-*bvgA*_{fus} amplifiziert, wodurch an das 5'-Ende eine KpnI-Schnittstelle und an das 3'-Ende eine BamHI-Schnittstelle angefügt wurde. Die beiden PCR-Produkte wurden nach einem KpnI-Verdau über die KpnI-Schnittstelle miteinander ligiert und das Ligationsprodukt mit dem Oligonukleotiden *bvgA*_{BP}pHindIII und *bvgA*_{fus}BamHI amplifiziert. Das daraus resultierenden PCR-Fragment wurde mit HindIII und BamHI verdaut und in den vorher mit BamHI und KpnI verdauten pSK-Vektor ligiert und der Ligationsansatz in kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert. Einzelne Klone wurden mittels Sequenzierung mit dem Primern M13-Universal und M13-Reverse auf die Einhaltung des korrekten Leserahmens hin überprüft. Die in die *bvgA*_{BP}p*bvgA*_{fus}-Sequenz eingefügte KpnI-Schnittstelle wurde anschließend bei einem positiven Klon mittels ortsspezifischer Mutagenese (siehe C 1.13) wieder deletiert, wodurch das Plasmid pSK-*bvgA*_{BP}p*bvgA*_{fus} entstand.

Abb. 27: Schematische Darstellung von pSK-*bvgAup_{BP}bvgA_{fus}*.

Der Upstream-Bereich des *bvgA*-Lokus aus *B. pertussis* ist in blau dargestellt. Der Pfeil gibt die Orientierung des vektoreigenen *lac*-Promotors an. Amp^R = Ampicillinresistenz.



Um den hybriden Response Regulator BvgA_{fus} in dem *B. pertussis*-Stamm BP 359 *in trans* exprimieren zu können, wurde das Plasmid pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{fus}* konstruiert. Der pMMB208-Vektor ist ein „broad host range“- Vektor mit vektoreigenem *tac*-Promotor, der auch in Bordetellen replizieren kann. Das *bvgA_{BP}upbvgA_{fus}*-DNA-Fragment wurde über einen *HindIII/BamHI*-Restriktionsverdau aus dem Plasmid pSK-*bvgA_{BP}upbvgA_{fus}* herausgeschnitten und mit *HindIII/BamHI* verdauten Vektor pMMB208 ligiert. Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 α -Zellen zwischenkloniert. Das Konstrukt wurde über eine Sequenzierungsreaktion mit den Oligonukleotiden pMMB208/1 und pMMB208/2 auf mögliche Mutationen überprüft. Da die Bordetellen keine natürliche Kompetenz besitzen, musste zur Konstruktion des hybriden *B. pertussis*-Stammes BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{fus}*) das entsprechende Plasmid zunächst in *E. coli* SM10-Zellen transformiert werden. Der resultierende *E. coli*-Donorstamm *E. coli* SM10 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{fus}*) wurde dann zur Konjugation mit dem Ausgangsstamm BP 359 eingesetzt. Der Konjugationsansatz wurde auf BG-Blutplatten mit Streptomycin, Kanamycin und Chloramphenicol selektioniert. Für die spätere Charakterisierung des BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{fus}*)-Stammes wurde parallel dazu auch das Plasmid *pla57vir*, welches das komplette *bvgAS*-Operon aus *B. pertussis* trägt, mit Hilfe von *E. coli* SM10 (*pla57vir*) in den Stamm BP 359 *in trans* konjugiert. Mit Hilfe von Western-Blots wurde die Expression des BvgA_{fus}-Proteins in dem Stamm BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{fus}*) überprüft. Hierfür wurden Zelllysate der untersuchten *B. pertussis*-Stämme hergestellt, über ein 12 %iges Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblotet. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit einem BvgA_{BH}-spezifischen polyklonalen Antiserum, das auch mit dem BvgA-Protein aus *B. pertussis* kreuzreagiert. In Abbildung 28 ist zu erkennen, dass der hybride Response Regulator BvgA_{fus} in dem *B. pertussis*-Stamm BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{fus}*) exprimiert wird.

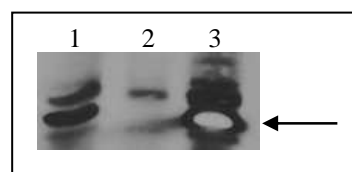


Abb. 28: Western-Blot Experiment zum Nachweis der BvgA_{BP}- und BvgA_{fus}-Expression.

SDS-PAGE-Proben der einzelnen *B. pertussis*-Stämme wurden auf eine Nitrocellulosemembran geblotet und mit einem BvgA_{BH}-spezifischen polyklonalen Antiserum inkubiert, das auch mit dem BvgA-Protein aus *B. pertussis* kreuzreagiert. *B. pertussis* BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{fus}*) (Spur 1), BP 359 (Spur 2) und *B. pertussis* T1-SN (Spur 3). Der Pfeil markiert die Bande, die dem BvgA-Protein entspricht.

Die aus der Konjugation hervorgegangenen *B. pertussis*-Stämme wurden zunächst auf ihre Fähigkeit hin untersucht, auf 1xSS-Blutplatten hämolytische Kolonien auszubilden. Hierbei zeigte sowohl der *B. pertussis*-Stamm BP 359, der mit dem wildtypischen *bvgAS*-Lokus *in trans* komplementiert wurde, als auch der *B. pertussis*-Stamm BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{fus}*) eine Komplementation zum hämolytischen Phänotyp.

Über Primer-Extension-Experimente wurde zudem die Aktivierung der *fhaB*-Transkription in dem *B. pertussis*-Stamm BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{fus}*) untersucht. Bei diesen Experimenten wurde gleichzeitig eine Sequenzierungsreaktion mit aufgetragen, die mit Hilfe des Plasmides pProm-67 und dem Oligonukleotid *fhaB*-PE durchgeführt wurde. Das Plasmid pProm-67 enthält ein 1250 bp langes *PstI/PstI*-DNA-Fragment, das u.a. die Promotorregion des *fhaB*-Gens aus *B. pertussis* enthält. Die Primer-Extension-Experimente sind zusammenfassend in Abbildung 29 dargestellt, wobei zu erkennen ist, dass sowohl für den wildtypischen *B. pertussis*-Stamm T1-SN als auch für den hybriden Stamm BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{fus}*) ein *fhaB*-Transkript nachgewiesen werden konnte. In beiden Fällen stimmt der ermittelte Transkriptionsstartpunkt mit dem publizierten *fhaB*-Transkriptionsstartpunkt überein (Scarlato *et al.*, 1991a). Weiterhin ist erkennbar, dass die beobachtete Aktivierung der *fhaB*-Transkription im Stamm BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{fus}*) im Vergleich zum wildtypischen *B. pertussis*-Stamm deutlich schwächer ausfällt. Im Gegensatz dazu konnte für den *B. pertussis*-Stamm BP 359, der die Transposon-Insertion innerhalb des *bvgA*-Gens trägt, kein *fhaB*-Transkript nachgewiesen werden.

Anders als der Response Regulator BvgA_{BH} aus *B. holmesii* ist das aus der BvgA_{BH}-Receiver-Domäne und der BvgA_{BP}-Output-Domäne zusammengesetzte BvgA_{fus}-Protein in der Lage, die Funktion eines Transkriptionsaktivators für die BvgA_{BP}-abhängigen Gene *fhaB* und *cya* auszuüben.

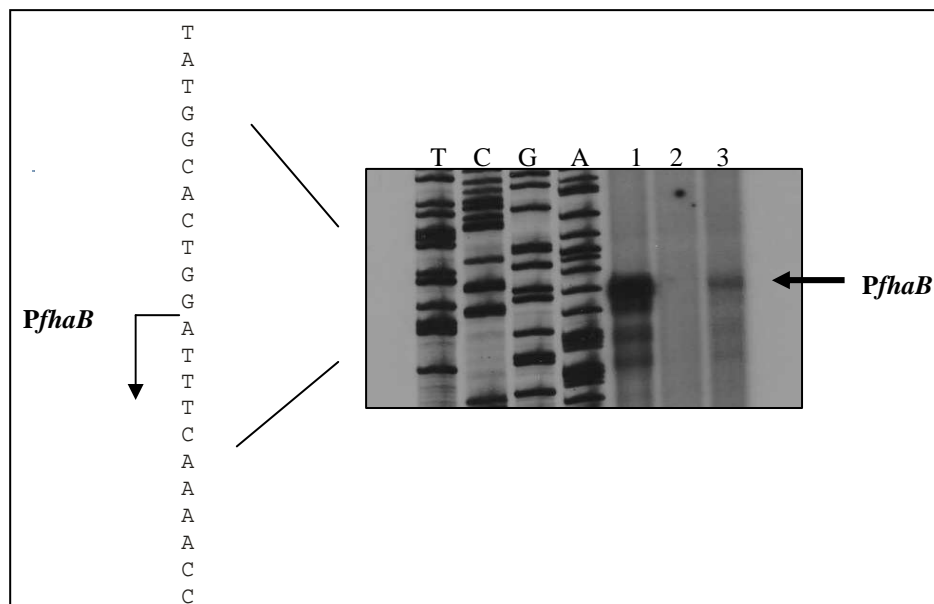


Abb. 29: Primer-Extension-Experiment zum Nachweis eines *fhaB*-Transkripts.

30 µg Gesamtzell-RNA wurde von den *B. pertussis*-Stämmen BP T1-SN (Spur 1), BP 359 (Spur 2) und BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{fus}*) (Spur 3) isoliert und mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid *fhaB*-PE hybridisiert. Das *fhaB*-Transkript und der Transkriptionsstartpunkt *PfhaB* ist durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem Oligonukleotid *fhaB*-PE und dem Plasmid pProm-67 durchgeführt. Teile der Promotorsequenz sind dargestellt, wobei die Position des Transkriptionsstartpunktes *PfhaB* durch einen schwarzen Pfeil angegeben ist.

2.6 Versuche zur Charakterisierung der unterschiedlichen DNA-Bindeeigenschaften der Output-Domänen von BvgA_{BH} und BvgA_{fus} an die *fhaB*-Promotorsequenz aus *B. pertussis*

Die Ergebnisse der unter 2.3 und 2.5 beschriebenen *in vitro*- bzw. *in vivo*-Analysen des hybriden Response Regulators BvgA_{fus} deuten darauf hin, dass möglicherweise die Sequenzunterschiede zwischen den BvgA-Output-Domänen und im speziellen die Unterschiede zwischen den Helix-Turn-Helix-Motiven (HTH) dafür verantwortlich sind, dass das BvgA_{BH}-Protein nicht in der Lage ist, an die *fhaB*- bzw. *cya*-Promotorsequenz von *B. pertussis* zu binden. *In silico*-Analysen zeigten, dass die Aminosäuresequenzen der HTH-Strukturen der Response Regulatoren von *B. pertussis* und *B. holmesii* sich in vier Aminosäuren unterscheiden (siehe Abb. 30). Um zu untersuchen, ob diese Sequenzvariation für die unterschiedlichen Bindeeigenschaften von BvgA_{BP} und BvgA_{BH} an die *fhaB*-Promotorsequenz von *B. pertussis* verantwortlich sind, wurde im Folgenden durch eine ortsspezifische Mutagenese das BvgA_{BH}*-Protein konstruiert. Im Gegensatz zum BvgA_{fus}-Protein wurde im Falle des BvgA_{BH}*-Proteins nicht die komplette Output-Domäne, sondern lediglich das HTH-Sequenzmotiv des BvgA_{BH}-Proteins an die des BvgA_{BP}-Proteins angeglichen. Der an der Position 164 von BvgA_{BH} befindliche Leucin-Rest wurde dabei durch einen Methionin-Rest ersetzt und Threonin 165 gegen einen Serin-Rest ausgetauscht. Im Weiteren erfolgte an Position 179 ein Austausch von Alanin gegen Theronin und ein Isoleucin wurde an Position 180 durch ein Valin ersetzt (L164M; T165S; A179T; I180V). In der Abbildung 30 sind die Aminosäuresequenzen des BvgA_{BH}*-Proteins, sowie die der wildtypischen BvgA_{BH}- bzw. BvgA_{BP}-Proteine und die des hybriden Response Regulators BvgA_{fus} dargestellt.

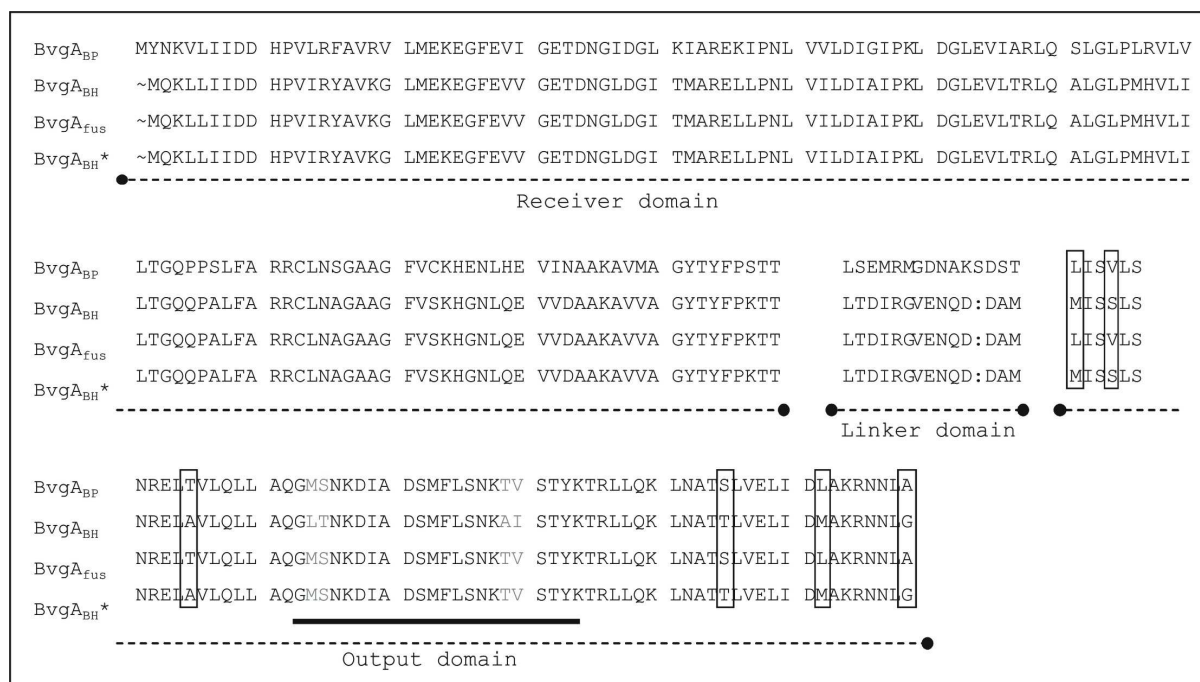


Abb. 30: Alignment der Aminosäuresequenz der Response Regulatoren aus *B. pertussis*, *B. holmesii*, des hybriden BvgA_{fus}- und des BvgA_{BH}*-Proteins.

Dargestellt sind Receiver-, Linker- und Output-Domäne der einzelnen BvgA-Proteine. Der Bereich des Helix-Turn-Helix-Motivs ist mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet, wobei die variablen Aminosäurereste im Fall des BvgA_{BP}-Proteins des BvgA_{BH}-Proteins durch graue Buchstaben dargestellt sind. Bei dem BvgA_{BH}*-Protein wurde das HTH-Sequenzmotiv des wildtypischen BvgA_{BH}-Proteins an die des BvgA_{BP}-Proteins angeglichen (L164M; T165S; A179T; I180V).

2.6.1 Ortspezifische Mutagenese zur Konstruktion des Response Regulators BvgA_{BH}*

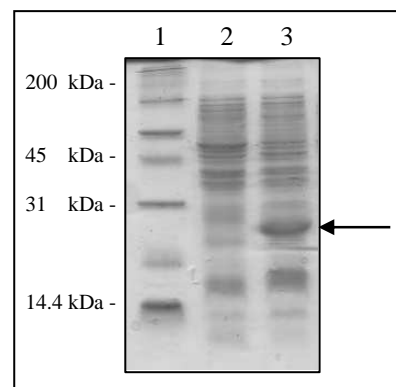
Das DNA-Fragment, das der Sequenz des Response Regulators von *B. holmesii* entspricht, wurde mit den Oligonukleotiden bvgA_{BH}BamHI_{for} und bvgA_{BH}KpnI_{rev} von chromosomaler DNA aus *B. holmesii* G7702 mittels PCR-Reaktion amplifiziert. Über diese PCR-Reaktion wurde am 5'-Ende der bvgA_{BH}-Sequenz eine BamHI- und am 3'-Ende eine KpnI-Schnittstelle angefügt. Das PCR-Produkt wurde dann über seine BamHI/KpnI-Schnittstellen in den vorher mit BamHI/KpnI verdauten Vektor pSK ligiert und der Ligationsansatz in kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert. Von einem positiven *E. coli* (pSK-bvgA_{BH})-Klon wurde das klonierte DNA-Fragment mit den Primern M13-Universal und M13-Reverse überprüft, um sicherzustellen, dass die Gensequenz keine durch die PCR-Reaktion bedingte Frameshift-Mutation aufweist. Der Austausch der vier Aminosäurereste innerhalb des HTH-Motivs erfolgte nacheinander über zwei PCR-Reaktionen mittels ortsspezifischer Mutagenese, wobei jeweils zwei benachbarte Aminosäuren gleichzeitig verändert wurden. Der Aminosäureaustausch L164M und T165S wurde mit den Oligonukleotiden bvgA_{BH}(LT)Mut_{for} und bvgA_{BH}(LT)Mut_{rev} durchgeführt (siehe D 1.13). Der zweite Aminosäureaustausch A179T und I180V erfolgte mit Hilfe der Primer bvgA_{BH}(AI)Mut_{for} und bvgA_{BH}(AI)Mut_{rev}. Die Sequenz des Zwischenproduktes sowie des Plasmids pSK-bvgA_{BH}* wurde nach der jeweiligen PCR-Reaktion durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden M13-Universal und M13-Reverse auf den erfolgreichen Austausch der Aminosäuren überprüft.

2.6.2. Überexpression und Reinigung des Response Regulators BvgA_{BH}*

Das bvgA_{BH}*-DNA-Fragment wurde durch Restriktionsverdau mit BamHI und KpnI aus dem Plasmid pSK-bvgA_{BH}* herausgeschnitten und mit dem vorher mit BamHI und KpnI verdauten Vektor pQE30 ligiert. Der Ligationsansatz wurde in kompetente *E. coli* M15 (pREP)-Zellen transformiert. Von einigen positiven Klonen wurde das klonierte DNA-Fragment mit den Oligonukleotiden pQE-5 und pQE-3 über eine Sequenzierungsreaktion auf mögliche Mutationen überprüft. Im Anschluss wurde die Fähigkeit von *E. coli* M15 (pREP) (pQE30-bvgA_{BH}*)-Zellen zur Überproduktion des His₆-BvgA_{BH}*-Fusionsproteins untersucht. Abbildung 31 zeigt das Ergebnis der IPTG-Induktion von *E. coli* M15 (pREP) (bvgA_{BH}*)-Zellen, wobei die Überexpression deutlich zu erkennen ist und das Laufverhalten des Fusionsproteins seiner theoretischen Größe von ca. 24 kDa entspricht.

Abb. 31: Überexpression des His₆-BvgA_{BH}*-Fusionsproteins in *E. coli* M15 (pREP) (pQE30-bvgA_{BH}*)-Zellen.

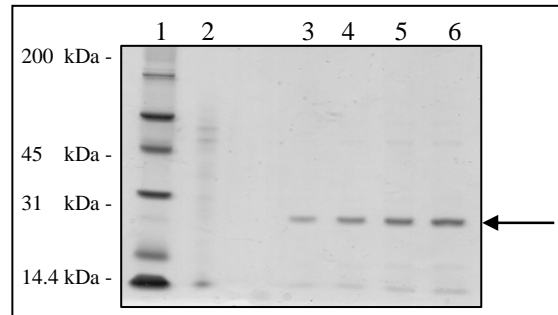
20 μ l des jeweiligen Proteinlysats wurden auf einem 12 %igen Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteine wurden durch Coomassie-Färbung dargestellt. Proteinmarker „BioRad Precision Standard“ (Spur 1), *E. coli* M15 (pREP) (pQE30-bvgA_{BH}*) nicht induziert (Spur 2), *E. coli* M15 (pREP) (pQE30-bvgA_{BH}*) durch 1mM IPTG induziert (Spur 3). Der Pfeil markiert die Bande, die dem ca. 24 kDa großen His₆-BvgA_{BH}*-Fusionsprotein entspricht.



Die Überexpression und Aufreinigung des His₆-BvgA_{BH}*-Fusionsproteins erfolgte entsprechend der Aufreinigung des His₆-BvgA_{fus}-Fusionsproteins und wird in Abschnitt 2.2 beschrieben. Die Abbildung 32 zeigt das gereinigte His₆-BvgA_{BH}*-Fusionsprotein nach der Dialyse und elektrophoretischer Auftrennung über ein 12 %iges Polyacrylamidgel.

Abb. 32: Das gereingte His₆-BvgA_{BH}*-Fusionsprotein.

Der Marker „BioRad Precision Standard“ (Spur 1) und der Durchfluss (Spur 2) sind aufgetragen. Gezeigt sind unterschiedliche Konzentrationen von 5, 10, 15 und 20 µl des gereinigten Fusionsproteins nach der Dialyse (Spur 3-6) und Auftrennung über ein 12 %iges Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden mit Coomassie-Färbung dargestellt. Der Pfeil markiert die Banden, die dem ca. 24 kDa großen His₆-BvgA_{BH}*-Fusionsprotein entsprechen



2.6.3 Untersuchung der *in vitro*-DNA-Bindeeigenschaft des Response Regulators BvgA_{BH}* an die *fhaB*-Promotorregion aus *B. pertussis*

Die DNA-Bindeeigenschaften des BvgA_{BH}*-Proteins wurden mit Hilfe von Gelretardations-Experimenten untersucht. Als Sonde wurde die bereits unter Abschnitt 2.3 beschriebene *fhaB*-Promotorregion verwendet, welche mittels der Oligonukleotide *fhaBup5* und *fhaBup3* von dem Plasmid pPROM-67 amplifiziert wurde. Für die Gelretardations-Experimente (siehe D 3.10.1) wurden unterschiedliche Mengen an gereinigtem His₆-BvgA_{BH}*-Fusionsprotein eingesetzt. Als Positivkontrolle diente das von Andreas Bock gereinigte BvgA-Protein aus *B. pertussis* (siehe 2.3). Die Negativkontrolle stellte das BvgA-Protein aus *B. holmesii* dar, dem keine Bindung an die *fhaB*-Promotorsequenz von *B. pertussis* nachgewiesen werden konnte (Gerlach *et al.*, 2004). Zur *in vitro*-Phosphorylierung der Response Regulatoren wurde ein Ansatz wurde vor der Zugabe der Sonde jeweils mit 50 mM Acetylphosphat versetzt, während parallel dazu ein weiterer Ansatz ohne Acetylphosphat mit der Sonde inkubiert wurde. Die Auftrennung erfolgte im Anschluss elektrophoretisch über ein natives Polyacrylamidgel, das dann autoradiographisch ausgewertet werden konnte. Wie in Abbildung 33 zu erkennen ist, konnte für das gereinigte His₆-BvgA_{BH}*-Fusionsprotein nach der *in vitro*-Phosphorylierung ein Protein-DNA-Komplex nachgewiesen werden. In anschließenden Kompetitions-Experimenten konnte jedoch diese DNA-Bindung nicht als spezifische Interaktion charakterisiert werden, da dieser Protein-DNA-Komplex sowohl in Anwesenheit des spezifischen als auch in Anwesenheit des unspezifischen Kompetitors keine Abnahme in seiner Bandenintensität zeigte (Daten nicht gezeigt). Im Falle des nicht-phosphorylierten BvgA_{BH}*-Proteins konnte kein definierter Komplex beobachtet werden, was möglicherweise für eine Oligomerisierung des Response Regulator Proteins spricht (siehe Abschnitt 2.3)

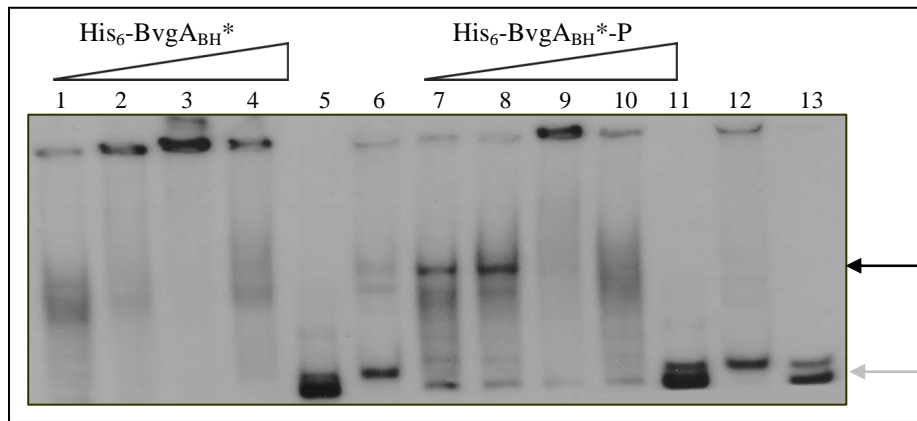


Abb. 33: Gelretardations-Experimente zur Überprüfung der DNA-Bindeeigenschaft des Response Regulators BvgA_{BH}* an die *fhaB*-Promotorregion.

15 000 cpm der Sonden-DNA (Spur 13) wurden jeweils mit 80, 160, 240 und 3000 ng His₆-BvgA_{BH}* in Abwesenheit von Acetylphosphat (Spur 1-4) und in Anwesenheit von Acetylphosphat (Spur 7-10) inkubiert, auf einem 4% igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch ausgewertet. Zur Kontrolle wurde ebenso 240 ng des nicht-phosphorylierten (Spur 5) bzw. des phosphorylierten BvgA_{BH}-Proteins (Spur 11) und 500ng des nicht-phosphorylierten (Spur 6) bzw. des phosphorylierten BvgA_{BP}-Proteins (Spur 12) verwendet. Der schwarze Pfeil kennzeichnet den Protein-DNA-Komplex. Der graue Pfeil kennzeichnet das Laufverhalten der freien Sonde.

2.6.4 Konstruktion und Charakterisierung des hybriden *B. pertussis*-Stammes (BP) BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{BH}**)

Neben den in Abschnitt 2.6.3 beschriebenen Gelretardations-Experimenten sollte im Weiteren untersucht werden, ob der Response Regulator BvgA_{BH}* im Gegensatz zu dem wildtypischen BvgA_{BH}-Protein aus *B. holmesii* *in vivo* die Funktion des BvgA-Proteins aus *B. pertussis* ersetzen kann. Hierfür wurde der hybride *B. pertussis* - Stamm BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{BH}**) konstruiert. Der Stamm BP 359 ist im Abschnitt 2.5 dieses Kapitels näher beschrieben.

Das 234 bp große DNA-Fragment, welches dem Upstreambereich des *bvgA*-Gens aus *B. pertussis* entspricht, wurde mittels der Oligonukleotide *bvgA_{BP}upBamHI* und ScreenArev und dem Plasmid pSK-*bvgAup_{BP}bvgA_{fus}* über eine PCR-Reaktion amplifiziert. Das DNA-Fragment, das der *bvgA_{BH}**-Sequenz entspricht, wurde mit Hilfe der Oligonukleotide ScreenAfor und *bvgA_{BH}*SmaI* von dem Plasmid pSK-*bvgA_{BH}** mittels PCR-Reaktion amplifiziert. In einer anschließenden, rekombinanten PCR-Reaktion wurden die aufgereinigten PCR-Produkte im Verhältnis 1:2 (*bvgAup_{BP}: bvgA_{BH}**) als Template eingesetzt und mittels der Oligonukleotide *bvgA_{BP}upBamHI* und *bvgA_{BH}*SmaI* das zusammenhängende DNA-Fragment *bvgAup_{BP}bvgA_{BH}** amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit *BamHI* und *SmaI* verdaut und in den vorher mit *BamHI* und *SmaI* geschnittenen Vektor pSK kloniert. Von einem positiven *E. coli* (pSK-*bvgAup_{BP}bvgA_{BH}**)-Klon wurde das klonierte DNA-Fragment mit den Primern M13-Universal und M13-Reverse überprüft, um sicherzustellen, dass die Gensequenz keine durch die PCR-Reaktion bedingte Frameshift-Mutation aufweist. Um den hybriden Response Regulator BvgA_{BH}* in dem *B. pertussis*-Stamm BP 359 exprimieren zu können, wurde das Plasmid pMMB208 (*bvgAup_{BP}bvgA_{BH}**) konstruiert. Bei dem pMMB208-Vektor handelt es sich um einen „broad host range“- Vektor mit vektoreigenem *tac*-Promotor, der auch in Bordetellen replizieren kann. Das *bvgAup_{BP}bvgA_{BH}**-DNA-Fragment wurde über einen *BamHI*- und *SmaI*-Restriktionsverdau aus pSK-*bvgAup_{BP}bvgA_{BH}** isoliert und in den vorher mit *BamHI* und *SmaI* verdauten Vektor pMMB208 kloniert. Das Konstrukt wurde anschließend mittels Sequenzierung mit den Oligonukleotiden pMMB208/1 und pMMB208/2 auf Mutationen überprüft. Wegen der

fehlenden natürlichen Kompetenz der Bordetellen musste zur Konstruktion des hybriden *B. pertussis*-Stammes BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{BH}**) das entsprechende Plasmid zunächst in *E. coli* SM10-Zellen transformiert werden. Der resultierende *E. coli*-Donorstamm *E. coli* SM10 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{BH}**) wurde dann zur Konjugation mit dem Ausgangsstamm BP 359 eingesetzt. Der Konjugationsansatz wurde auf BG-Blutplatten mit Streptomycin, Kanamycin und Chloramphenicol selektioniert. Für die spätere Charakterisierung des BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{BH}**)-Stammes wurde parallel dazu auch das Plasmid *pla57vir*, welches das komplette *bvgAS*-Operon aus *B. pertussis* trägt, mit Hilfe von *E. coli* SM10 (*pla57vir*) in den Stamm BP 359 *in trans* konjugiert. Mit Hilfe von Western-Blot-Experimenten wurde die Expression des BvgA_{BH}*-Proteins in dem Stamm BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{BH}**) überprüft. Hierfür wurden Zelllysate der einzelnen BP 359-Stämme und des wildtypischen *B. pertussis*-Stammes T1-SN hergestellt. Nach der Auftrennung über ein 12 %iges Polyacrylamidgel wurde diese auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit einem BvgA_{BH}-spezifischen polyklonalem Antiserum inkubiert, das auch mit dem BvgA-Protein aus *B. pertussis* kreuzreagiert. In der Abbildung 34 ist das Ergebnis des Western-Blots dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sowohl für den wildtypischen *B. pertussis*-Stamm T1-SN als auch für den Stamm BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{BH}**) eine BvgA-Expression detektiert werden konnte. Für den *B. pertussis*-Stamm BP 359 konnte keine BvgA-Expression nachgewiesen werden.

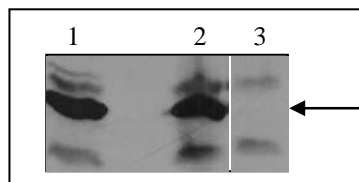


Abb. 34: Western-Blot Experiment zum Nachweis einer BvgA_{BP}- und BvgA_{BH}*-Expression.

SDS-Proben der einzelnen *B. pertussis*-Stämme wurden auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit BvgA_{BH}-spezifischem polyklonalem Antiserum inkubiert, das auch mit dem BvgA-Protein aus *B. pertussis* kreuzreagiert. *B. pertussis* BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{BH}**) (Spur 1), *B. pertussis* T1-SN (Spur 2) und BP 359 (Spur 3). Der Pfeil markiert die Bande, die dem BvgA-Protein entspricht.

Die aus einzelnen Konjugationsansätzen hervorgegangenen *B. pertussis*-Stämme wurden zunächst auf ihre Fähigkeit hin untersucht, nach dem Überstreichen auf 1xSS-Blutplatten hämolytische Kolonien auszubilden. Anders als das Ergebnis des Western Blots erwarten ließ, zeigte nur der Stamm BP 359, welcher den wildtypischen *bvgAS*-Lokus *in trans* trägt, eine Reversion zum hämolytischen Phänotyp, nicht jedoch der *B. pertussis*-Stamm BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{BH}**). Dies deutet darauf hin, dass das BvgA_{BH}*-Protein ähnlich wie das wildtypische BvgA_{BH}-Protein aus *B. holmesii* nicht in der Lage ist, die Expression des Virulenzfaktors Adenylatcyclase-Toxin zu aktivieren. Da die Charakterisierung des hämolytischen Phänotyps nicht immer zu eindeutigen Ergebnissen führt, wurde parallel dazu mit Hilfe von Primer-Extension-Experimenten die Aktivierung der *fhaB*-Transkription in dem Stamm BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{BH}**) untersucht. Um den Transkriptionsstartpunkt ermitteln zu können, wurde gleichzeitig eine Sequenzierungsreaktion mit aufgetragen, die mit Hilfe des Plasmides pProm-67 und dem Oligonukleotid *fhaB*-PE durchgeführt wurde (siehe 2.5). Wie in Abbildung 35 zu erkennen ist, konnte nur für den wildtypischen Stamm *B. pertussis* T1-SN ein *fhaB*-Transkript nachgewiesen werden, dessen Transkriptionsstartpunkt dem publizierten *fhaB*-Transkriptionsstartpunkt entspricht (siehe Abschnitt 2.3) (Scarlato *et al.*, 1991). Im Gegensatz dazu konnte weder für den *B. pertussis*-Stamm BP 359 noch für BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{BH}**) ein *fhaB*-Transkript nachgewiesen werden.

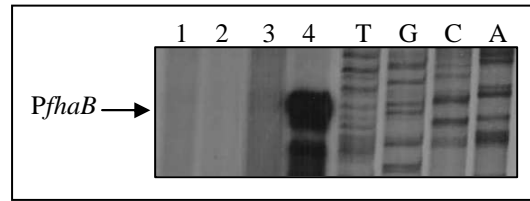


Abb. 35: Primer-Extension-Experimente zum Nachweis eines *fhaB*- und *bvgA*-Transkripts.

30 µg Gesamtzell-RNA wurde von *B. pertussis*-Stämmen BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{BH}**) (Spur 1 und 2), BP 359 (Spur 3) und BP T1-SN (Spur 4) isoliert und mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid *fhaB*-PE hybridisiert. Das *fhaB*-Transkript und der Transkriptionsstartpunkt *PfhaB* sind durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem Oligonukleotid *fhaB*-PE und dem Plasmid pProm-67 durchgeführt.

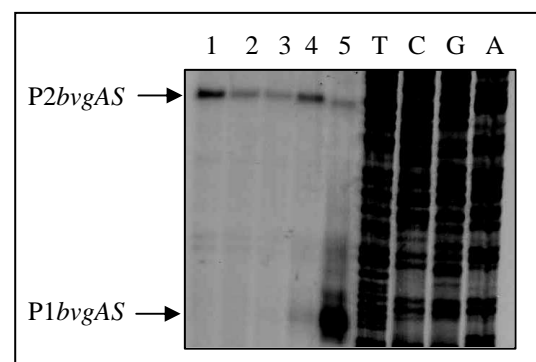
Die Ergebnisse der *in vitro*- bzw. *in vivo*-Experimente mit dem BvgA_{BH}*-Protein deuten demnach daraufhin, dass dieses Protein trotz der dem BvgA_{BP}-Protein angepasster HTH-Sequenz nicht in der Lage ist, die Funktion eines Transkriptionsaktivators für die BvgA_{BP}-abhängigen Gene *fhaB* und *cya* zu übernehmen.

2.6.5 Analyse der *bvgA_{BH}**-Transkription in BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{BH}**)

Da in Western-Blot-Analysen (siehe Abschnitt 2.7.4 und 2.5) für den hybriden *B. pertussis*-Stamm BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{BH}**) und BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{fus}*) eine BvgA-Expression nachgewiesen werden konnte, wurde mittels Primer-Extension-Experimenten untersucht, welcher für den *bvgAS_{BP}*-Lokus beschriebene Transkriptionsstartpunkt für die Transkription von *bvgA_{fus}* bzw. *bvgA_{BH}** verantwortlich ist. Auch hier wurde eine Sequenzierungsreaktion mit aufgetragen, die mit Hilfe des Plasmides pProm-67 und des Oligonukleotides *bvgAup_{BP}*-PE durchgeführt wurde. Hierfür wurde Gesamtzell-RNA aus dem wildtypischen *B. pertussis*-Stamm T1-SN, BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{fus}*), BP 359 und zwei BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{BH}**)-Stämmen wie unter C 1.5.1 beschrieben isoliert. In allen untersuchten Stämmen konnte, wie in der Abbildung 36 zu erkennen ist, der konstitutiv aktive Promotor P2*bvgAS* identifiziert werden, der während der Bvg⁻-Phase die Transkription und Expression eines Grundlevels an BvgAS ermöglicht (siehe B 4.4.1). Er befindet sich 143 bp upstream vor dem *bvgAS*-Startcodon (siehe E 3.4.1, Abb. 6). Nur für den wildtypischen *B. pertussis*-Stamm T1-SN und den hybriden Stamm BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{fus}*), die hier als Kontrollen aufgezeigt werden, konnte auch ein Transkriptionsstartpunkt P1*bvgAS* gezeigt werden, der unter nicht modulierenden Bedingungen (Bvg⁺-Phase) *bvg*-abhängig aktiv ist. Dieser befindet sich 93 bp upstream vor dem *bvgAS*-Startcodon (Scarlato *et al.*, 1990; Roy *et al.*, 1990).

Abb. 36: Primer-Extension-Experiment zum Nachweis eines *bvgA*-Transkripts.

30 µg Gesamtzell-RNA wurden aus *B. pertussis*-Stämmen BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{BH}**) (Spur 1 und 2), BP 359 (Spur 3), BP 359 (pMMB208-*bvgAup_{BP}bvgA_{fus}*) (Spur 4) und BP T1-SN (Spur 5) präpariert und mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid *bvgAup_{BP}*-PE hybridisiert. Das *bvgAS*-Transkript und die Transkriptionsstartpunkte P2*bvgAS* und P1*bvgAS* sind durch einen schwarzen Pfeil markiert. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem Oligonukleotid *bvgAup_{BP}*-PE und dem Plasmid pProm-67 durchgeführt.



Das Ergebnis deutet demnach darauf hin, dass im *B. pertussis*-Stamm BP 359 (pMMB208-*bvgA*_{BP}*bvgA*_{BH}^{*}) wie auch im Stamm BP 359, der die *bvgA*-Mutante darstellt, das BvgAS-System inaktiv ist und keine *bvg*-abhängigen Gene transkribiert werden.

2.7 Vergleichende Analyse der Phosphorylierungseffizienz der His₆-BvgA_{BH}^{*}- und His₆-BvgA_{fus}-Fusionsproteine durch die Histidin-Kinase BvgS aus *B. pertussis*

Die unter 2.6 eingehend dargestellten Ergebnisse deuten daraufhin, dass das BvgA_{BH}^{*}-Protein trotz des an die BvgA_{BP}-Sequenz angeglichenen HTH-Motivs nicht in der Lage ist, die Funktion eines Transkriptionsaktivators für die BvgA_{BP}-abhängigen Gene *fhaB* und *cya* zu übernehmen. Um zu untersuchen, ob dies möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass die *in vitro*-Phosphorylierung des His₆-BvgA_{BH}^{*}-Proteins durch die heterologe Histidin-Kinase BvgS aus *B. pertussis* und die damit verbundene Aktivierung der DNA-Bindeigenschaften im Vergleich zu BvgA_{fus} beeinträchtigt ist, wurde die Phosphorylierungseffizienz der Response Regulatoren in *in vitro*-Phosphorylierungsassays ermittelt. Für diese Experimente wurden die entsprechenden His₆-Fusionsproteine der BvgS-Kinase und der Response Regulatoren BvgA_{BH}^{*}, BvgA_{fus} und BvgA_{BH} im Verhältnis 4:1 und 8:1 mit einer Kinase-Endkonzentration von 1 μM verwendet. Die Reaktionen wurden in 1x Phosphorylierungspuffer (siehe D 3.11.1) durchgeführt, der mit γ³³P-ATP supplementiert wurde. Nach Start der Reaktion durch Zugabe der Kinase und anschließender 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proteine elektrophoretisch über ein 15% iges Polyacrylamidgel aufgetrennt und densitometrisch im PhosphorImager ausgewertet. In Abbildung 37 ist zu erkennen, dass der Response Regulator BvgA_{BH}^{*}, ebenso wie das BvgA_{BH}-Protein und der hybride Response Regulator BvgA_{fus} durch die Histidin-Kinase BvgS aus *B. pertussis* phosphoryliert werden können. Auffällig ist hierbei jedoch, dass die Phosphorylierungseffizienz des BvgA_{fus}-Proteins im Vergleich zu der der Response Regulatoren BvgA_{BH} und BvgA_{BH}^{*} geringer ist. BvgA_{BH}^{*} verhält sich im Hinblick auf die Effizienz des Phosphotransfers ähnlich wie der wildtypische Response Regulator BvgA_{BH} aus *B. holmesii*.

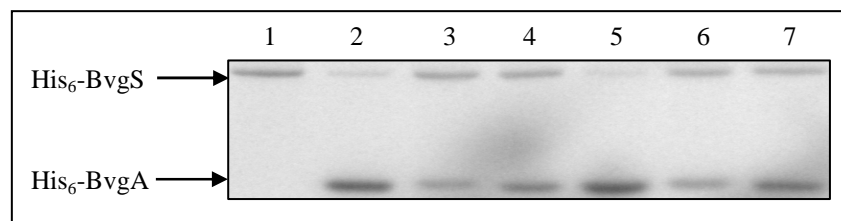


Abb. 37: Autophosphorylierung von His₆-BvgS aus *B. pertussis* (Spur 1) und Phosphotransfer zu His₆-BvgA_{BH} (Spur 2 und 5), His₆-BvgA_{fus} (Spur 3 und 6) und His₆-BvgA_{BH}^{*} (Spur 4 und 7).

Die Response Regulatoren und die Kinase wurden jeweils Verhältnis 1:4 (Spur 2-4) bzw. im Verhältnis (Spur 5-7) 1:8 eingesetzt und 10 min in Anwesenheit von γ³³P-ATP inkubiert. Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm nach der Gelelektrophorese.

Um eine quantitative Aussage über die Phosphorylierungseffizienz der einzelnen Regulatorproteine treffen zu können wurde jeweils der relative Phosphorylierungsgrad in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt (siehe D 3.11.2). Dazu wurde in definierten Zeitabständen nach Start der Reaktionen (zwischen 25 Sekunden und 30 Minuten) Aliquots von 11 μl aus den einzelnen Reaktionsansätzen entnommen. Die Aliquots wurden zum Abstoppen der Reaktion mit 4 μl Laemmli-Puffer versetzt und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden autoradiographisch dargestellt und densitometrisch am PhosphorImager ausgewertet. Die Intensität der stärksten Bande einer

Zeitreihe wurde auf 100% gesetzt und die relative Intensitäten der anderen Banden dementsprechend berechnet. Die Kinetik der einzelnen Phosphorylierungsreaktionen für die Response Regulatoren $BvgA_{BH}$, $BvgA_{fus}$ und $BvgA_{BH}^*$ ist in Abbildung 38 dargestellt. Zu erkennen ist, dass sich die Phosphorylierungskinetiken der Response Regulatoren $BvgA_{BH}$ und $BvgA_{BH}^*$ annähernd gleich verhalten. Im Gegensatz dazu erfolgt die Phosphorylierungsreaktion von $BvgA_{fus}$ signifikant langsamer, da der maximale Phosphorylierungsgrad von $BvgA_{fus}$ im Vergleich zu $BvgA_{BH}$ und $BvgA_{BH}^*$ erst 10 min später erreicht wird.

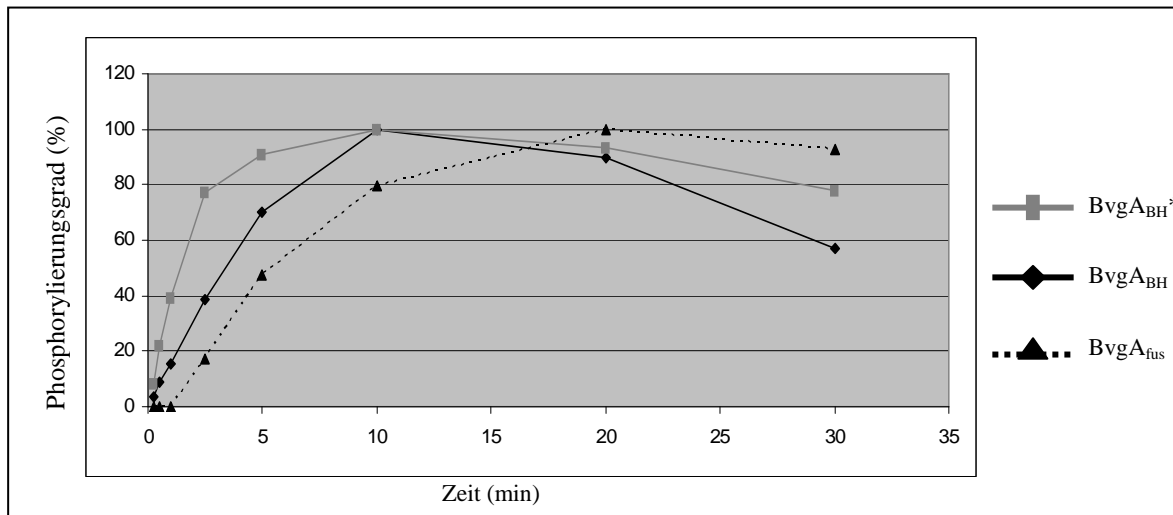


Abb. 38: Kinetischer Verlauf der *in vitro*-Phosphorylierung der Response Regulatoren Bvg_{BH} , $BvgA_{BH}^*$ und $BvgA_{fus}$.

Die einzelnen Response Regulatoren und die BvgS-Kinase wurden im Verhältnis 4:1 eingesetzt mit einer Kinase-Endkonzentration von $1\mu M$. Die einzelnen Phosphorylierungsreaktionen wurden in Anwesenheit von $\gamma^{33}P$ -ATP bei Raumtemperatur inkubiert und nach definierten Zeitabständen Aliquots entnommen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Laemmli-Puffer gestoppt und die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach densitometrischer Auswertung der Banden wurden die relativen Phosphorylierungsintensitäten bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen

F Diskussion

1. Signalwahrnehmung durch die unorthodoxe Histidin-Kinase BvgS

Zwei-Komponentensysteme sind Signaltransduktionswege, die an der Regulation von zellulären Vorgängen beteiligt sind. Sie bestehen im Allgemeinen aus einer membranständigen sensorisch aktiven Histidin-Kinase und einem cytoplasmatischen Response Regulator Protein. Seit ihrer Entdeckung vor ca. 20 Jahren waren Zwei-Komponentensysteme Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, welche zur Beschreibung des Aufbaus, der Funktionsweise und der strukturellen Vielfalt dieser Signaltransduktionsproteine beigetragen haben (Nixon *et al.*, 1986; Parkinson & Kofoid, 1992). Das Grundprinzip der Signaltransduktion von Zwei-Komponentensystemen liegt zu Beginn in der ATP-abhängigen Phosphorylierung eines konservierten Histidin-Restes in der Transmitter-Domäne der Sensorkinase und des sich daran anschließenden signalabhängigen Phosphotransfers auf einen konservierten Aspartat-Rest innerhalb der Receiver-Domäne des Response Regulators. Während dieses Grundprinzip gut untersucht ist, konnten die Signale, die über Histidin-Kinasen wahrgenommen werden, in sehr wenigen Fällen identifiziert werden.

Schon seit längerem ist bekannt, dass die Aktivität der Histidin-Kinase BvgS des BvgAS-Zwei-Komponentensystems unter Laborbedingungen durch bestimmte Faktoren moduliert werden kann. Niedrige Temperaturen oder die Anwesenheit von Sulfationen oder Nikotinsäure im Wachstumsmedium führen zu einer Inaktivierung der Autophosphorylierungs-Aktivität von BvgS und damit zur Inaktivierung des BvgAS-Zwei-Komponentensystems (Bock & Gross, 2001). Im Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass die BvgAS-abhängige Expression des Pertussis Toxins in *B. pertussis* durch den bakteriellen Cystein-Metabolismus beeinflusst wird. In Gegenwart von erhöhten Cystein-Konzentrationen kommt es in Folge des Cysteinabbaus zur vermehrten Freisetzung von Sulfationen. Deren intrazelluläre bzw. extrazelluläre Akkumulation könnte möglicherweise über die Inaktivierung der Histidin-Kinase letztendlich zur Reprimierung der Expression von *bvg*-aktivierten Genen führen (Bogdan *et al.*, 2001). Weitere Studien zeigten, dass diese Hemmung der Expression wahrscheinlich durch die Wahrnehmung von Sulfat mittels der cytoplasmatischen Anteile der Kinase erfolgt (Bock & Gross, 2002). Was die Hemmung durch Nikotinsäure angeht, zeigten Versuche mit den löslichen, cytoplasmatischen Bestandteilen des BvgS-Proteins, dass physiologisch relevante Konzentrationen an Nikotinsäure keinen Einfluss auf die Autophosphorylierungs-Aktivität der Sensorkinase haben. Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass die cytoplasmatischen Domänen der Histidin-Kinase nicht für die Wahrnehmung der Nikotinsäure verantwortlich sind (Bock & Gross, 2002). Auch kann ein Mitwirken akzessorischer Proteine an der Signalerkennung in beiden Fällen nicht ausgeschlossen werden. Die Mechanismen, die zur Wahrnehmung der modulierenden Signale durch die unorthodoxe Histidin-Kinase BvgS führen, konnten bislang nicht geklärt werden. Versuche, spezifisches Binden der modulierenden Substanzen an *B. pertussis*-Zellen zu zeigen, blieben ebenfalls erfolglos (Melton & Weiss, 1993). Wie einleitend schon erwähnt, besitzt die unorthodoxe Histidin-Kinase BvgS zusätzliche Domänen, wie die periplasmatische und die PAS-Domäne, die sehr wahrscheinlich an der Signalwahrnehmung beteiligt sind. So setzt sich der Input-Bereich von BvgS aus sog. periplasmatischen Bindeprotein-Domänen (PBP-Domänen) zusammen, die in ihrer Funktion an die hochaffinen periplasmatischen Substratbindeproteine von ABC-Transportern erinnern (Mascher *et al.*, 2006) und im BvgAS-System wahrscheinlich durch Substratbindung ebenfalls an der Signalaufnahme beteiligt sind. Auf der anderen Seite sind PAS-Domänen im Allgemeinen dafür bekannt, dass sie Veränderungen des Redoxpotentials, des

Sauerstoffpartialdrucks und des Energiezustandes einer Zelle wahrnehmen und kleine Liganden wie FAD und ATP binden können (Taylor & Zhulin, 1996; Bibikov *et al.*, 2000; Stephenson & Hoch, 2001). Die PAS-Domäne von BvgS besitzt ein Motiv, das Ähnlichkeit mit einem Chinonbindemotiv (Rich & Fisher, 1999) im Bereich des sog. helikalen Konnektors (siehe B, Abb. 3) zeigt. Chinone könnten aufgrund ihrer Funktion als Elektronencarrier und der Tatsache, dass sie sich frei in der Membran bewegen können, als Indikatoren für sensorische Proteine wie die membranständige Histidin-Kinase BvgS dienen, indem sie mit Bereichen des Proteins interagieren. Untersuchungen bezüglich der möglichen Beteiligung der PAS-Domäne von BvgS an der Redoxwahrnehmung führten allerdings zu keinen eindeutigen Ergebnissen. So bewirkte ein Austausch des zentralen Histidin-Restes, der über Wasserstoffbrückenbindungen mit einer Carbonylgruppe des Chinons interagieren soll (Fisher & Rich, 2000), gegen einen Alanin-Rest keine deutliche Verringerung der Sensitivität gegenüber oxidiertem Ubichinon (Bock & Gross, 2002). Auch die Deletion des gesamten Chinonbindemotivs zeigte keinen erkennbaren Einfluss auf die Sensitivität von BvgS gegenüber oxidiertem Ubichinon (Bock & Gross, 2002). Zudem konnte eine putative ATP-Bindestelle innerhalb der PAS-Domäne von BvgS identifiziert werden, die für die Aktivität der Histidin-Kinase eine Rolle spielt, da Mutationen innerhalb dieses Motivs BvgS inaktivieren können (Beier *et al.*, 1996). Experimente hinsichtlich einer möglichen ATP-Bindung durch gereinigtes BvgS-PAS-Protein ließen jedoch darauf schließen, dass die ATP-Bindedomäne von BvgS-PAS nicht in der Lage ist, ATP zu binden (Gross, persönliche Mitteilung). Allerdings bleibt nicht auszuschließen, dass alternative intrazelluläre Signale über die PAS-Domäne von BvgS wahrgenommen werden können (Abb. 39).

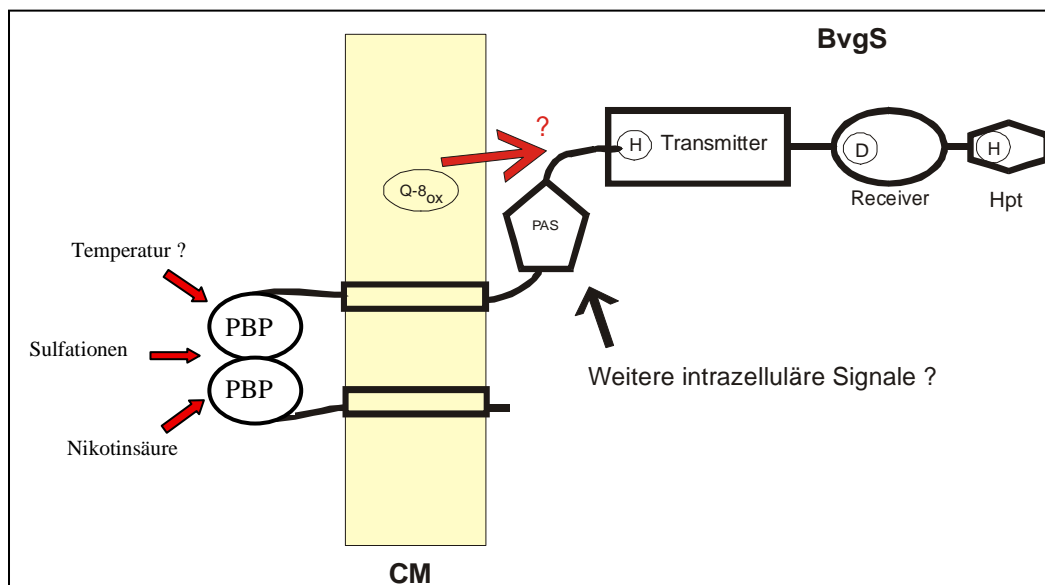


Abb. 39: Modell der Signalaufnahme von BvgS.

Gezeigt ist ein Modell der Signalaufnahme der unorthodoxen Histidin-Kinase BvgS. Das Protein ist über zwei Transmembrandomänen in der Cytoplasmamembran (CM) verankert. Umweltsignale, wie die Anwesenheit von Nikotinsäure, werden über den großen, periplasmatischen Input-Bereich direkt oder indirekt über die periplasmatischen Bindeprotein-Domänen (PBP) wahrgenommen. Auch ist es möglich, dass Temperaturunterschiede oder auch das Vorhandensein von Sulfationen durch die periplasmatische Domäne wahrgenommen werden. Zudem stellt oxidiertes Ubichinon ein Redoxsignal für BvgS dar, dass möglicherweise durch Chinonbindemotive in membran-nahen Bereichen der Histidin-Kinase wahrgenommen wird (Bock, 2002). Ebenfalls können eventuell weitere intrazelluläre Signale über die PAS-Domäne aufgenommen werden.

Wie einleitend schon erwähnt, weisen Histidin-Kinasen anderer Organismen einen dem BvgS ähnlichen modularen Aufbau auf, wobei in einigen Fällen eine Beteiligung der zusätzlichen Domänen der Kinasen an der Signalwahrnehmung gezeigt werden konnte (siehe B, Abschnitt

4). Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb die periplasmatische, die PAS-, und die HPT-Domäne von BvgS aus *B. bronchiseptica* auf Protein-Interaktionen mit einer *B. bronchiseptica*-spezifischen Genbank im Yeast Two-Hybrid System (YTH-System) untersucht. Die Identifizierung möglicher Protein-Interaktionspartner von BvgS sollte neue Erkenntnisse über die Mechanismen der Wahrnehmung von Signalen durch die Histidin-Kinase geben.

1.1 Identifizierung neuer Interaktionspartner der periplasmatischen, der PAS- und der HPT-Domäne von BvgS mittels des Yeast Two-Hybrid Systems

Um Faktoren zu identifizieren, welche die Aktivität des BvgAS-Systems und damit die Expression von *bvg*-abhängigen Genen beeinflussen, wurde das „GAL4-Yeast Two-Hybrid“-System der Firma Clontech eingesetzt. Dieses genetische System dient dem *in vivo*-Nachweis von Protein-Interaktionen, indem es sich die modulare Struktur des eukaryotischen Transkriptionsfaktors GAL4 zu nutze macht. Vergleichbar mit vielen anderen Transkriptionsfaktoren besitzt GAL4 zwei funktionell und strukturell voneinander unabhängige Domänen, wobei die DNA-Bindungsdomäne die Bindung an GAL4-abhängige Promotoren vermittelt, während die Transaktivierungsdomäne die Interaktion mit der Transkriptionsmaschinerie vermittelt. Beide Protein-Domänen weisen in der Regel auch dann eine korrekte Faltung auf, wenn sie isoliert in eukaryotischen Zellen exprimiert werden. Durch die Expression der DNA-Bindungsdomäne und der Transaktivierungsdomäne von GAL4 als Fusionsproteine mit zwei verschiedenen Proteinen, die miteinander interagieren, wird mittels dieser Interaktion wieder ein funktionell aktiver Transkriptionsfaktor generiert und die Aktivierung GAL4-abhängiger Promotoren ermöglicht (Ma & Ptashne, 1988; Fields & Song, 1989; Chien *et al.* 1991; Traven *et al.*, 2006). In Folge dessen kommt es zur Transkription des bakteriellen Reportergens *lacZ* (siehe Abschnitt E, Abb. 9). Mit Hilfe von Genmarkern hefespezifischer Auxotrophie wie *leu2* und *trp1* lassen sich im Vorfeld jene Hefezellen selektiv erfassen, die beide Hefepiasmide aufgenommen haben (Durfee *et al.*, 1993).

Von großer Bedeutung für eine erfolgreiche Anwendung des YTH-Systems ist die Transformationseffizienz, die sich in ausreichender Expression des jeweiligen Zielproteins und letztendlich in effizienter Ausnutzung der eingesetzten Genbank beim Durchmusterung von Fusionsbibliotheken nach potentiellen intrazellulären Interaktionspartnern äußert (Gietz *et al.*, 1992, 1995). Die Transformationsversuche wurden nach dem Protokoll 1 des YEASTMAKER™ Yeast Transformation Systems 2 von BD Bioscience durchgeführt. (siehe D 2.3). So ergaben intensive Vorversuche zur Optimierung der Wachstumsbedingungen und der Transformationseffizienz, dass der anfänglich verwendete Hefestamm HF7c keine ausreichenden Ergebnisse hinsichtlich dieser wichtigen Parameter lieferte und somit keine effiziente Transformation der *B. bronchiseptica*-Genbank garantiert werden konnte. Ebenfalls zeigten weitere Untersuchungen, dass der Hefestamm HF7c möglicherweise bedingt durch die jahrelange Lagerung bei -80°C und durch wiederholtes Auftauen der Glycerinkultur in seiner Wachstumsfähigkeit stark eingeschränkt war. Aus diesem Grunde wurde im weiteren Verlauf des YTH-Screenings der Hefestamm HF7c durch den Hefestamm AH109 ersetzt, bei dem eine deutlich höhere Transformationseffizienz beobachtet werden konnte, die bei ca. 3×10^5 Transformanten pro μg Plasmid-DNA lag und somit eine effiziente Ausnutzung der eingesetzten Genbank garantierte. Der Hefestamm AH109 besitzt drei verschiedene Reportergen-Konstrukte, die unter der Kontrolle von komplett heterologen, unterschiedlich stringenten Promotoren stehen. Die Verwendung von zwei Nährstoffmarkern, wie der Komplementierung von Auxotrophien für Adenin und Histidin, und einem zusätzlichen

genetischen Marker (β -Galaktosidase-Genexpression) ermöglicht eine stringente Selektion positiver Klone und reduziert die Wahrscheinlichkeit des Auftretens falsch positiver Klone. Das Vorkommen von falsch positiven Klonen stellt ein großes Problem der Methodik des Yeast Two-Hybrid Systems dar (Fields, 2005). Um das Auftreten solch unerwünschter Klone möglichst gering zu halten, werden die identifizierten putativen Protein-Interaktionen mittels unterschiedlicher Kontrollversuche verifiziert. Zum einen werden positive Klone über die Nährstoffselektion ohne Leucin/Histidin/Tryptophan und bei echter Interaktion der Proteine über Nährstoffselektion ohne Adenin überprüft. Zum anderen erfolgt die Kontrolle der putativen Interaktion durch den positiven Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität (siehe D, 2.5), die erst durch Expression eines rekonstruierten *gal1-lacZ*-Reportergens ermöglicht wird (Bartel *et al.*, 1993). Nach der Extraktion der Plasmid-DNA der über Nährstoffselektion und β -Galaktosidase-Aktivität positiv befundenen Klone ließ sich eine womöglich vorliegende Interaktion mit dem entsprechenden Zielprotein mittels Retransformation in *E. coli* DH5 α -Zellen bestätigen. So wurden die Retransformanten ebenfalls auf ihre Wachstumsfähigkeit auf den unterschiedlichen Selektionsplatten sowie deren β -Galaktosidase-Aktivität überprüft, wobei keine Änderung hinsichtlich der Selektionsmarker zu beobachten sein sollte (siehe E 1.1.4). Gleichzeitig wurden die „Köder“-Plasmide, die die DNA-Fragmente entsprechend der periplasmatischen, der PAS- und der HPt-Domäne von BvgS beinhalteten, in verschiedenen Kombinationen mit den Kontrollplasmiden pLAM5' und pVA3 und in den Hefestamm AH109 und den Kontroll-Hefestamm SFY 526 rücktransformiert, um eine unspezifische Protein-Protein-Interaktion auszuschließen (siehe E 1.1.4). Darüber hinaus wurden die verbliebenen reisolierten DNA-Fragmente der *B. bronchiseptica*-spezifischen Genbank sequenziert, um sicherzustellen, dass diese im korrekten Leserahmen mit der transkriptionsaktivierenden Domäne des GAL4-Proteins vorlagen. Nach dem Durchlauf der oben beschriebenen Kontrollversuche blieben nach anfänglich 2500 Klonen für jedes „Köder“-Plasmid insgesamt nur vier putative Interaktionspartner der BvgS-PAS- und der BvgS-PP-Domäne übrig. Im Falle der HPt-Domäne lag der Ausschluss der möglichen Interaktionspartner nach dem Sequenzieren der „Beute“-Plasmide, die DNA-Fragmente der *B. bronchiseptica*-spezifischen Genbank beinhalteten, bei 100 %, da alle Genbank-Fragmente nicht im korrekten Leserahmen vorlagen und somit die Fusionsproteine als artifiziell angesehen werden konnten (siehe E, 1.1.5). Die Tatsache, dass aus einer Vielzahl gescreenter Klone eine so geringe Anzahl an Klonen als Interaktionspartner im YTH-System gefunden wurde, lässt vermuten, dass es sich bei den vier identifizierten Protein-Interaktionen um spezifische Wechselwirkungen handeln könnte. Tabelle 10 zeigt zusammenfassend einen Überblick des Yeast Two-Hybrid-Screenings zur Identifizierung putativer Interaktionspartner der periplasmatischen, der PAS- und der HPt-Domäne von BvgS.

Tab. 10: Darstellung des Yeast Two-Hybrid-Screenings zur Identifizierung putativer Interaktionspartner der periplasmatischen, der PAS- und HPt-Domäne von BvgS.

	pGBT9-BvgSPP	pGBT9-BvgSPAS	pGBT9-BvgSHPt
Transformationsrunden auf SD (Δ LTH) mit Effizienz von ca. 3×10^5	6	6	6
Anzahl der auf SD (Δ LTHA) ausgestrichenen Klone	2500	2500	2500
Anzahl der nach β -Gal-Assay positiven Klone	20	105	7
Anzahl der Klone mit „in frame“-Proteinsequenz nach Sequenzierung	1	3	-

Wie schon erwähnt, konnten unter Verwendung der im Rahmen dieser Arbeit erstellten *B. bronchiseptica*-spezifischen Genbank somit insgesamt vier putative Interaktionspartner der

periplasmatischen sowie der PAS-Domäne von BvgS gefunden werden. Im Falle der periplasmatischen Domäne wurde als möglicher Interaktionspartner ein putatives Häm-Bindeprotein (BB1905) (siehe Abschnitt E 1.1.5, Abb. 16) gefunden, das möglicherweise an der Bindung und den Transport von Nährstoffen beteiligt ist. Interessanterweise handelt es sich ebenfalls um ein Protein, das im Periplasma der Zelle lokalisiert ist. Somit scheint aufgrund der räumlichen Anordnung der beiden Proteine eine Interaktion möglich, wobei letztendlich diese im YTH-System identifizierte Protein-Interaktion mittels biochemischer Methoden bestätigt werden muss (siehe D, 3.9.3). Für die PAS-Domäne von BvgS konnte ein „Colicin V production“-Protein (BB2599) mit unbekannter Funktion, ein „ABC transport system ATP binding“-Protein (BB0602) als Teil eines ABC-Transporters für verzweigte Aminosäuren und eine putative „binding-protein-dependent-transport“-Permease ebenfalls als Teil eines Transportsystems für Aminosäuren, Peptide und Amine (BB4595) identifiziert werden. Interessanterweise handelt es sich bei den möglichen Interaktionspartnern BvgS-PAS-Domäne ausschließlich um membranständige Proteine, weshalb eine Interaktion mit der ebenfalls an der Cytoplasma-Membran lokalisierten PAS-Domäne durchaus möglich scheint. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die im YTH-System identifizierte putative Interaktion zwischen der BvgS-PAS-Domäne und dem Protein BB0602 ebenfalls durch die Methode des GST-Pulldownassays (siehe D 3.9.1 und E 1.1.6, Abb.17) verifiziert werden, da es hier möglich war, die beteiligten Proteine als His₆- bzw. GST-Fusionsproteine in ihrer löslichen Form sowie in versuchsrelevanter Konzentration aufzureinigen. So konnte zum einen trotz mehrmaligem Waschen während des GST-Pulldownassays gewährleistet werden, dass die Proteine nicht dahingehend verdünnt wurden, dass sie weder durch Coomassiefärbung (siehe D 3.1) noch durch die Methode des Western Blots (siehe D 3.3) nachweisbar waren. Zum anderen war es aufgrund der unterschiedlichen Affinitätstags möglich, die Protein-Interaktion ebenfalls mit verschiedenen nicht kreuzreagierenden Antikörpern verlässlich nachzuweisen. Im Falle der übrigen gefundenen putativen Interaktionspartner sowohl der periplasmatischen als auch der PAS-Domäne konnten die beteiligten Proteine nicht als His₆- bzw. GST-Fusionsproteine überexprimiert und in ihrer löslichen Form aufgereinigt werden, so dass der Nachweis mittels alternativer biochemischer Methoden, wie beispielsweise der Verwendung alternativer Protein-Überexpressions-Systeme, noch zu erbringen bleibt. Aus diesem Grund konzentriert sich die vorliegende Arbeit auf die eingehende Charakterisierung der Interaktion zwischen der BvgS-PAS-Domäne und dem Protein BB0602.

Wie schon erwähnt, handelt es sich bei dem BB0602 Protein um ein ATP-Bindeprotein, welches als Bestandteil eines ABC-Transport-Systems für den Transport von verzweigten Aminosäuren verantwortlich gemacht wird. In Abbildung 40 ist der Aufbau eines typischen ABC-Transporters dargestellt.

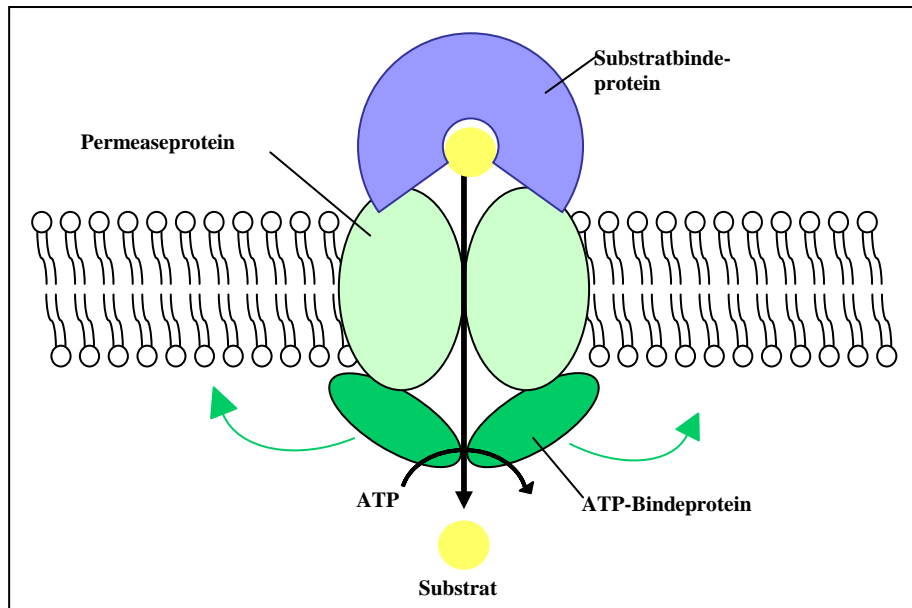


Abb. 40: Allgemeiner Aufbau eines prokaryotischen ABC-Transporters.

Die Permeaseproteine (hellgrün) sind membranständig lokalisiert. Das periplasmatische Substratbindeprotein (blau) garantiert durch seine charakteristische Funktion die Spezifität des ABC-Transporters. Die ATP-Bindeproteine (dunkelgrün) liefern die Energie für den Substrattransport durch die Membran und sind im Cytoplasma der Zelle anzutreffen.

Die für den Substrat-Transport durch die Membran verantwortlichen Permeaseproteine (BB0599-BB0600), sind in der Membran der Bakterienzelle lokalisiert und ragen zum Teil in das Periplasma. Im Periplasma befindet sich das Substratbindeprotein (BB0598), welches für die Spezifität des Transportes verantwortlich ist. Die für den Substrattransport energieliefernden ATP-Bindeproteine (BB0601-BB0602) sind cytoplasmatisch angeordnet, weshalb eine Interaktion zwischen BB0602 und der ebenfalls im Cytoplasma lokalisierten PAS-Domäne von BvgS im Hinblick auf die räumliche Anordnung als möglich erscheint. Ein funktioneller Transporter kann aus zwei Homodimeren oder aus einer Kombination von Homo- und Heterodimeren bestehen. Die Gene für die ABC-Transporter-Proteine sind nacheinander auf dem Chromosom von *B. bronchiseptica* wahrscheinlich in einem Operon angeordnet. In Abbildung 41 ist der Genomabschnitt, der die Sequenz für das Protein BB0602 beinhaltet, dargestellt.

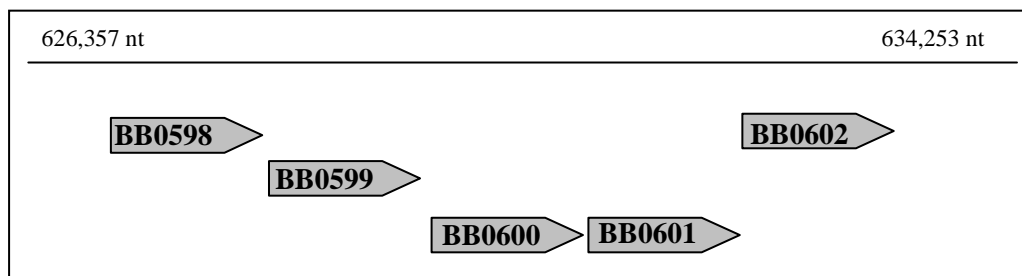


Abb. 41: Darstellung des Genomabschnittes, der die Sequenz für das Protein BB0602 beinhaltet.

Dargestellt sind die einzelnen Gene der ABC-Transporter-Dimere für verzweigte Aminosäuren. Die Sequenzbereiche, die für die Proteine BB0602 und BB0601 codieren, sind am weitesten stromabwärts gelegen und stellen die energieliefernden ATP-Bindeproteine der Transporter dar. Weiter stromaufwärts folgen dann die Sequenzbereiche, die für die Permeaseproteine BB0600 und BB0599 des ABC-Transporter-Dimers codieren. Am weitesten stromaufwärts liegt der Sequenzbereich, der für das periplasmatische Substratbindeprotein BB0598 codiert. Die Gene sind wahrscheinlich in einem Operon angeordnet.

Dieses Resultat deutet daraufhin, dass die Aktivität der BvgS Histidin-Kinase und damit die Virulenzgen-Expression durch die An- bzw. Abwesenheit von verzweigten Aminosäuren beeinflusst werden könnte. Abbildung 42 zeigt eine mögliche Interaktion der PAS-Domäne von BvgS mit dem BB0602-Protein.

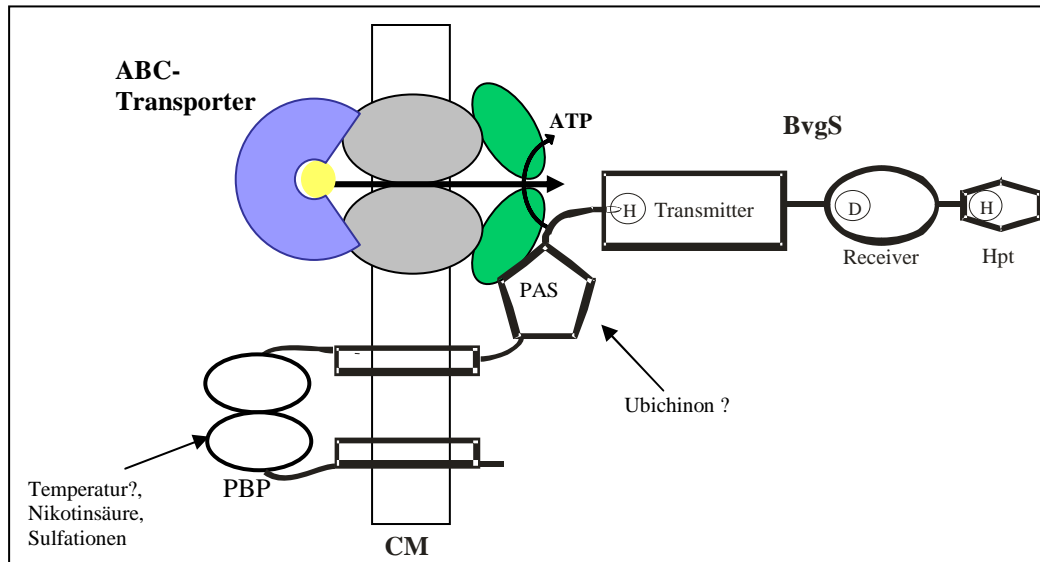


Abb. 42: Modell einer möglichen Interaktion der PAS-Domäne von BvgS mit dem BB0602-Protein.

Gezeigt ist der gesamte ABC-Transporter für verzweigte Aminosäuren. Das ATP-Bindeprotein BB0602 ist in grün dargestellt und interagiert im Cytoplasma der Zelle mit der BvgS-PAS-Domäne. Für weitere Erläuterungen siehe Abbildung 39.

Wie einleitend erwähnt (siehe B, Abschnitt 4) findet sich bei *Bacillus subtilis* ein Beispiel, in dem ein putativer ABC-Transporter YheH/YheI die Aktivierungsmechanismen der Histidin-Kinase KinA während der Initiation der Sporulation beeinflusst. Die Sporulationsinitiation in *B. subtilis* wird in erster Linie durch die Konzentration an phosphoryliertem Response Regulator Spo0A-P reguliert, das am Ende einer Phosphorylierungskaskade steht (Burbulys *et al.*, 1991; Trach & Hoch, 1993). Das Phosphat wird auf Spo0A mittels eines Phosphorelays übertragen, wobei die Kinasen KinA und KinB die Schlüsselproteine neben noch anderen beteiligten Kinasen in diesem System darstellen (Jiang *et al.*, 2000; LeDeaux *et al.*, 1995). Mittels Yeast Two-Hybrid Analysen, die Hinweise auf die Signalwahrnehmung durch KinA und KinB geben sollten, konnte eine Interaktion zwischen der Kinase KinA und dem ABC-Transporter-Protein YheH identifiziert werden. Weiterhin wiesen *B. subtilis*-Stämmen, die zum einen den ABC-Transporter YheH/YheI überexprimierten und zum anderen eine *lacZ*-Reporterfusion mit dem Promotorgen *spoIIIG* trugen, dessen Transkription unter der Kontrolle des phosphorylierten Response Regulators Spo0A steht, eine geringere Phosphorylierungseffizienz von Spo0A im Vergleich zum Wildtyp auf, was womöglich auf eine unzureichende KinA-Aktivierung schließen lässt (Fukushima *et al.*, 2006). Im Falle des ABC-Transporter-Proteins BB0602 wäre zu untersuchen, ob sich ein ähnlicher Einfluss auf die Phosphorylierungseffizienz von BvgA bzw. auf die Autophosphorylierung der Histidin-Kinase BvgS erkennen lässt. Hierbei könnte ebenfalls die Konstruktion eines Stammes von Interesse sein, in dem das BB0602-Protein überexprimiert wird. Zudem wären *in vivo*-Analysen mit Reporterfusionen des *bvgA*-Gens aus *B. bronchiseptica* denkbar, die Hinweise auf einen möglichen Einfluss auf die Phosphorylierungseffizienz des Response Regulators BvgA geben könnten. In beiden Fällen wäre hierbei von besonderer Bedeutung, zu untersuchen, inwieweit diese Interaktion eine Auswirkung auf die Expression von *bvg*-abhängigen Genen hat. Um die Relevanz der Interaktion zwischen der PAS-Domäne und dem

ATP-Bindeprotein BB0602 zudem näher charakterisieren zu können, ist in Zukunft ebenfalls die Konstruktion einer *B. bronchiseptica* *bb0602*-Deletionsmutante (BB765 Δ *bb0602*) geplant, um ebenfalls mögliche Auswirkungen auf die Expression von *bvg*-abhängigen Genen zu beobachten. Im Weiteren wäre über Wachstumsversuche in definiertem Medium zu untersuchen, inwieweit die Verfügbarkeit und der Metabolismus von einzelnen Aminosäuren die Expression von *bvg*-abhängigen Genen beeinflusst. Um die *in vivo* Relevanz dieser Substrate zu untersuchen, wäre es zudem auch denkbar, die *B. bronchiseptica* *bb0602*-Mutanten im Tiermodell auf ihre Virulenzeigenschaften zu überprüfen.

Wie schon erwähnt deutet die Interaktion zwischen der BvgS-PAS-Domäne und dem ATP-Bindeprotein BB0602 des ABC-Transporters für verzweigte Aminosäuren darauf hin, dass möglicherweise die Aktivität von BvgS und damit die Virulenzgen-Expression durch die An- bzw. Abwesenheit von verzweigten Aminosäuren beeinflusst werden könnte. Bereits seit längerem ist bekannt, dass die Akkumulation von Abbauprodukten verschiedener Stoffwechselwege einen Einfluss auf die Aktivität von Sensorkinasen besitzt. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Autophosphorylierung der unorthodoxen Sensorkinase ArcB aus *E. coli*, als auch die Transphosphorylierung auf den zugehörigen Response Regulator ArcA durch die Anwesenheit der fermentativen Stoffwechselprodukte D-Lactat, Acetat oder Pyruvat stimuliert wird (Georgellis *et al.*, 1999). Das ArcAB-Zweikomponentensystem ist in *E. coli* an der Regulation des aeroben Metabolismus beteiligt und kontrolliert dabei die Expression von Dehydrogenasen, Cytochrom-Komplexen und Enzymen, die am Fettsäurestoffwechsel oder dem Citratzyklus beteiligt sind (Unden & Bongaerts, 1997). Man vermutet, dass die PAS-Domäne von ArcB die Autophosphorylierungs-Aktivität der Kinase in Abhängigkeit des energetischen Zustandes der Zelle modifiziert (Matsushika & Mizuno, 2000). So konnte kürzlich gezeigt werden, dass für die Inaktivierung der Histidin-Kinase ArcB die Bildung von Disulfidbrücken zwischen dem Cysteinrest 180 innerhalb der PAS-Domäne zweier Monomere in Abhängigkeit des Oxidationszustandes von Chinonen verantwortlich ist (Malpica *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, ob der Cysteinrest 587 innerhalb der PAS-Domäne von BvgS eine ähnliche Funktion hinsichtlich der Disulfidbrückenbildung zwischen zwei Monomeren und der damit zusammenhängenden Inaktivierung von BvgS besitzt. Trotz der relativ geringen Übereinstimmung zwischen den beiden Proteinsequenzen gibt es einige interessante Gemeinsamkeiten zwischen dem ArcB- und dem BvgS-Protein. Die BvgS-Sensorkinase besitzt zum einen eine ähnliche Domänenstruktur wie das ArcB-Protein (Perraud *et al.*, 1999). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass das BvgAS-System von *B. bronchiseptica* neben den Virulenzfaktoren auch die Expression von „House-keeping“-Genen kontrolliert, welche in *E. coli* zu dem ArcAB-Regulon gehören (Unden & Bongaerts, 1997). Es ist bekannt, dass das BvgAS-System Einfluss auf die Cytochrom-Zusammensetzung der Atmungskette hat. So wird die Cytochrom d-Oxidase nur in der Bvg⁺-Phase exprimiert, wohingegen die Cytochrom c-Oxidase unter den gleichen Bedingungen reprimiert wird (Ezzell *et al.*, 1981; Cotter & DiRita, 2000). Auch konnte, wie schon erwähnt, über *in vitro*-Phosphorylierungsassays gezeigt werden, dass die Autophosphorylierungs-Aktivität beider Histidin-Kinasen durch das Vorhandensein von oxidiertem Ubichinon beeinflusst wird (Bock, 2002; Matsushika & Mizuno, 2000; Malpica *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu *E. coli* sind die Vertreter des *B. bronchiseptica*-Clusters auf die Veratmung von Aminosäuren spezialisiert und besitzen daher eine Vielzahl von Stoffwechselwegen, die ihnen den Abbau von Aminosäuren und die Verwertung der entstandenen Stoffwechselprodukte ermöglichen. Die Stoffwechselprodukte, die bei der Degradation von verzweigten Aminosäuren wie Valin, Leucin und Isoleucin entstehen, sind wiederum für die Bildung vieler wichtiger zellulärer Metaboliten essentiell wie z. B. verzweigte Fettsäuren, ATP und andere energiereiche Verbindungen. Unter der Annahme, dass *B. bronchiseptica* möglicherweise für einige Zeit

auch außerhalb des Wirtes in der Umwelt überleben kann (Porter & Wardlaw, 1993), müsste das Bakterium in der Lage sein, die Genexpression an ein wechselndes Nährstoffangebot anzupassen. Das BvgAS-System könnte hierbei über eine spezifische Interaktion mit einzelnen Komponenten eines Transportsystems die Anwesenheit von bestimmten Substraten registrieren.

Der evolutionäre Ursprung des BvgAS-Systems ist unbekannt. Sollten sich Bordetellen tatsächlich von Umweltkeimen über fakultativ pathogenen zu obligat pathogenen Erregern entwickelt haben, ist es wahrscheinlich anzunehmen, dass die ursprüngliche Funktion des BvgAS-Systems die Regulation zentraler Funktionen des Energiestoffwechsels war. Auch ist es möglich, dass das BvgAS-System über eine temperaturabhängige Regulation fakultativ pathogenen Vorläufern der heutigen Bordetellen eine Unterscheidung zwischen Wirt und Umwelt ermöglichte. Neben der Temperatur könnte auch der Redoxzustand der Zelle als ein mögliches Signal für die Regulation der Transkription der für die Kolonisierung notwendigen Faktoren gedient haben. Die Tatsache, dass BvgS über eine Interaktion mit Ubichinon Redoxsignale wahrnehmen kann, stellt, wie schon erwähnt, eine interessante Verbindung mit den von *bvg*-regulierten Haushalts-Funktionen dar. So wäre es möglich, dass das Vorhandensein von Sauerstoff ein Schlüsselsignal darstellt, da die Cytochrom d Oxidase eine hohe Affinität zum Sauerstoff besitzt und vor allem bei niedrigen Sauerstoffpartialdrücken exprimiert wird. Dies könnte über den Redoxzustand des Ubichinon-Pools in der Atmungskette wahrgenommen worden sein (Bock, 2002). Die Virulenzgene könnten erst im Laufe der Zeit durch horizontalen Gentransfer erworben und ebenfalls unter die Kontrolle dieses Systems gestellt worden sein. So wäre es denkbar, dass zu der Zeit, als die Bordetellen die Fähigkeit zur Kolonisierung von Wirtsorganismen entwickelten, ein Vorläufer des BvgAS-Systems auf unterschiedliche Nährstoffangebote, Verfügbarkeit von Sauerstoff und/oder Umgebungstemperaturen reagieren und so die Transkription der für eine Kolonisierung erforderlichen Faktoren induzieren konnte.

2. Struktur-Funktionsanalyse des Response Regulators BvgA aus *B. holmesii*

Die Vertreter der „neuen“ *Bordetella*-Arten werden in letzter Zeit immer häufiger mit Erkrankungen beim Menschen in Verbindung gebracht. *B. holmesii* scheint dabei von besonderem Interesse, da dieser Erreger u.a. mit Pertussis-ähnlichen Infektionen des respiratorischen Traktes beim Menschen assoziiert wurde (Mattoo & Cherry, 2005; Mazengia *et al.*, 2000) und damit zunehmend als humanpathogener Keim an Bedeutung zu gewinnen scheint. Aufgrund von 16S rDNA-Homologieanalysen wurde *B. holmesii* eine phylogenetische Stellung innerhalb des *B. bronchiseptica*-Clusters zugeordnet. Da andere phylogenetische Marker jedoch auf eine engere Verwandtschaft mit den tierpathogenen Vertretern der „neuen“ *Bordetella*-Arten, wie z.B. *B. avium* deuten (von Wintzingerode *et al.*, 2002), ist die systematische Stellung von *B. holmesii* innerhalb der Gattung *Bordetella* noch unklar. Der Vergleich anderer phylogenetischer Marker, wie die Sequenzierung von Haushaltsgenen, die Charakterisierung des *bvgAS*-Lokus von *B. holmesii* (siehe Abschnitt B 3.2) und die Analyse der zellulären Fettsäuren, zeigte eine eher engere Verwandtschaft von *B. holmesii* zu Vertretern der „neuen“ Arten wie *B. avium* bzw. *B. hinzii* (Gerlach *et al.*, 2004; Diavatopoulos *et al.*, 2006). Zudem lassen neueste Untersuchungen vermuten, dass *B. holmesii* seine 16 S rDNA-Gene durch horizontalen Gentransfer aus *B. pertussis* erhalten hat, und der Erwerb von DNA aus *B. pertussis* generell vermutlich eine wichtige Rolle für die Entstehung und Wirtsadaptation von *B. holmesii* spielte (Diavatopoulos *et al.*, 2006).

Obwohl längere Zeit über Southern- und Western Blot Experimente in *B. holmesii* keine für das *B. bronchiseptica*-Cluster bekannten Virulenzfaktoren nachgewiesen werden konnten (Njamkepo *et al.*, 2000), gelang es kürzlich jedoch ein dem *fhaB*-orthologes Gen mittels PCR-Analysen mit Oligonukleotiden aus konservierten Nukleotidbereichen der *fhaB*-Gene aus *B. pertussis* und *B. avium* zu identifizieren (Link, persönliche Mitteilung). Für das FHA-Ortholog aus *B. holmesii* konnte weiterhin in Adhäsionsstudien gezeigt werden, dass es für die Anlagerung an Zielzellen eine Rolle spielt und somit für die Pathogenität von *B. holmesii* von Bedeutung zu sein scheint (Link, persönliche Mitteilung). Zum anderen wurde mit der Hilfe von degenerierten Oligonukleotiden, die aus der BvgA-Aminosäuresequenz abgeleitet wurden, ein dem BvgAS-System (BvgAS_{BP}) der klassischen Arten orthologes Zwei-Komponentensystem (BvgAS_{BH}) in *B. holmesii* identifiziert (Gerlach *et al.*, 2004). Sequenzanalysen zwischen dem BvgAS_{BH}-System und dem BvgAS_{BP}-System zeigten, dass die cytoplasmatischen Domänen mit potentieller Kinase- (BvgS_{cyt}) und DNA-binde-Aktivität (BvgA_{out}), sowie die Receiver-Domänen der Response Regulatoren (BvgA_{rec}) einen hohen Konservierungsgrad aufweisen (Tab. 11). Gegenteilig dazu findet man im Bereich der Linker-Region der BvgA-Proteine (BvgA_{link}) und dem periplasmatischen Teil der Histidin-Kinasen (BvgS_{per}) ein hohes Maß an Variabilität. In Einklang mit der oben genannten Beobachtung, dass eine nähere Verwandtschaft zu den „neuen“ *Bordetella*-Arten postuliert wird (Gerlach *et al.*, 2004; Diavatopoulos *et al.*, 2006), zeigt *B. holmesii* eine erstaunlich hohe Übereinstimmung mit dem vor kurzem identifizierten BvgAS-System aus *B. avium* (Spears *et al.*, 2003), die auch eine funktionelle Konservierung des BvgAS-Systems innerhalb der Vertreter der Bordetellen vermuten lässt. So zeigten erste Ergebnisse, dass sowohl das BvgAS_{BH}-System als auch das BvgAS-System aus *B. avium* an der Regulation von putativen Virulenzfaktoren beteiligt ist, da Mutationen in *bvgS* zu einem avirulenten Phänotyp im Tiermodell führen (Spears *et al.*, 2003). Auch für *B. hinzii* und *B. trematum* als weitere Vertreter der „neuen“ *Bordetella*-Arten, konnte eine ähnlich stark ausgeprägte Konservierung im Hinblick auf identifizierte BvgAS-Systeme festgestellt werden (Gerlach *et al.*, 2004).

	BvgA _{rec}	BvgA _{out}	BvgA _{link}	BvgS _{cyt}	BvgS _{per}
<i>B. holmesii</i> vgl. <i>B. pertussis</i>	76,2 %	85,9 %	33,3 %	52,9 %	39,5 %
<i>B. avium</i> vgl. <i>B. pertussis</i>	74,6 %	87,5 %	30,8 %	51,7 %	35,2 %
<i>B. holmesii</i> vgl. <i>B. avium</i>	90,6 %	98,5 %	92,9 %	66,4 %	58,2 %

Tab. 11: Prozentuale Identität zwischen den Proteinsequenzen der BvgA-Receiver-Domäne (BvgA_{rec}), der BvgA-Output-Domäne (BvgA_{out}), der BvgA-Linker-Domäne (BvgA_{link}), der cytoplasmatischen Region von BvgS (BvgS_{cyt}) und der periplasmatischen Region von BvgS (BvgS_{per}) von *B. holmesii*, *B. pertussis* und *B. avium* (Gerlach *et al.*, 2004).

Eine erste Charakterisierung des BvgAS-Systems von *B. holmesii* zeigte, dass das orthologe *bvgS*-Gen von *B. holmesii* die Funktion von *bvgS* in *B. pertussis* übernehmen kann, wobei sich signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Organismen hinsichtlich der Signalwahrnehmung durch die Histidin-Kinase feststellen ließen. So wurde die Aktivität des BvgS_{BH} Proteins im Vergleich zu der Kinase aus *B. pertussis* nur im geringen Umfang durch Magnesiumsulfat moduliert, was möglicherweise durch Sequenzunterschiede innerhalb der Proteinsequenz der periplasmatischen sensorischen Domäne der ansonsten stark konservierten Histidin-Kinasen hervorgerufen wird (Gerlach *et al.*, 2004; Arico *et al.*, 1991; Martinez de Tejada *et al.*, 1996). Im Falle von BvgS_{BH} konnte bislang nicht geklärt werden, mit Hilfe welcher Signale seine Aktivität moduliert werden kann und ob evtl. höhere Konzentrationen von Magnesiumsulfat wirkungsvoll wären. Interessanterweise konnte die Expression des *fhaB*-homologen Genlokus in *B. avium* jedoch durch Magnesiumsulfat moduliert werden (Marr, 2002). Auch konnte für *B. avium* gezeigt werden, dass die Expression seines dermonekrotischen Toxins durch Magnesiumsulfat und Nikotinsäure moduliert werden kann

(Gentry-Weeks *et al.*, 1991). Im Hinblick auf die Response Regulatoren konnte gezeigt werden, dass das BvgA_{BH}-Protein durch die heterologe Histidin-Kinase BvgS aus *B. pertussis* phosphoryliert werden kann (Gerlach *et al.*, 2004). Trotz dieser Beobachtung und der großen prozentualen Übereinstimmung zwischen den Proteinsequenzen (Abb. 43), die sich vor allem im Bereich der Output-Domäne zeigt, ist überraschenderweise das BvgA_{BH} Protein nicht in der Lage, die Funktion des BvgA_{BP}-Proteins in einer *B. pertussis* bvgA Mutante zu ersetzen. Da auch in Gelretardations-Experimenten keine Bindung des BvgA_{BH}-Proteins an die *fhaB*-Promotorsequenz aus *B. pertussis* nachgewiesen werden konnte, wurde postuliert, dass die geringe Sequenzvariabilität zwischen den Output-Domänen für die unterschiedlichen DNA-Bindeeigenschaften verantwortlich sind (Gerlach *et al.*, 2004). Hier ist es interessant, zu erwähnen, dass für BvgA_{BH} eine Bindung an die *fhaB*-Promotorsequenz von *B. holmesii* beobachtet werden konnte, was auf eine BvgA_{BH}-abhängige Regulation von FHA schließen lässt (Link, persönliche Mitteilung).

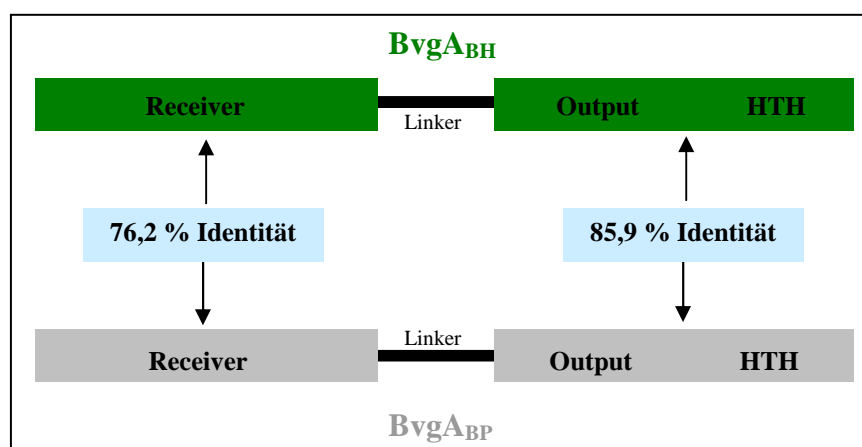


Abb. 43: Schematische Darstellung der prozentualen Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der einzelnen Domänen der Response Regulatoren von *B. pertussis* und *B. holmesii*.

Die Identität der Aminosäuren der Receiver-Domänen von *B. pertussis* und *B. holmesii* liegt bei 76,2 %, wohingegen die Identität der Aminosäuren der Output-Domänen 85,9 % beträgt.

2.1 Molekulare Charakterisierung der Response Regulatoren BvgA_{fus} und BvgA_{BH}*

Schon früher wurden Domänenaustauschexperimente unternommen, um Hinweise auf die Konservierung und Funktion von Multidomänenproteinen der Vertreter der Gattung *Bordetella* zu erhalten (Perraud *et al.*, 1998; Bock, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb unter Verwendung dieses experimentellen Ansatzes untersucht, welche Protein-Bereiche für die unterschiedlichen DNA-Bindeeigenschaften des BvgA_{BH}-Proteins verantwortlich sind.

Response Regulatoren von Zwei-Komponentensystemen besitzen, wie die Histidin-Kinasen, einen modularen Aufbau. Auf einen N-terminalen Receiver folgt meist eine C-terminale Output-Domäne. Verbunden sind diese beiden Domänen durch eine flexible Linker-Region (West & Stock, 2001). Aufgrund von strukturellen Unterschieden der Output-Domänen, unterschiedlichem Domänen-Aufbau und verschiedenen Kombinationen der einzelnen Domänen können Response Regulatoren in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden (Galperin, 2006). Der Receiver wird an einem konservierten Aspartatrest phosphoryliert und der Regulator dadurch in den meisten Fällen aktiviert, wobei die Aktivierung mit einer Konformationsänderung des Response Regulators einhergeht (Cho *et al.*, 2001). Strukturanalysen mehrerer un- bzw. phosphorylierter oder anderweitig, beispielsweise durch

Protein-Interaktionen, aktivierter Receiver-Domänen, die im Allgemeinen aus fünf parallelen β -Faltblättern und fünf α -Helices bestehen (Volz, 1993; Robinson *et al.*, 2000), gaben Aufschluss über die Existenz einer aktiven bzw. einer inaktiven Form des Proteins (Birck *et al.*, 1999; Cho *et al.*, 2000; Kern *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 1999). Einen Übergang der inaktiven zur aktiven Form beinhalten strukturelle Veränderungen der $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$ -Oberfläche, die entfernt der Phosphorylierungsseite stattfinden (Robinson *et al.*, 2000). Die Vorgänge, die nach der Phosphorylierung des Receivers stattfinden, sind in den letzten Jahren intensiv untersucht worden. So zeigten weitere Untersuchungen der Receiver-Domänen verschiedener Response Regulatoren, dass konservierte Aminosäurereste, wie Ser/Thr und Phe/Thr, zusammen mit der Konformation des $\beta 4$ - $\alpha 4$ -Loops als Schalter fungieren, wobei ihre Anordnung die aktive oder inaktive Form des Regulators bestimmt (Simonovic & Volz, 2001; Volkmann *et al.*, 2001; Roche *et al.*, 2002; Dyer & Dahlquist, 2006; Stock & Guhaniyogi, 2006). Neueste Strukturanalysen lassen vermuten, dass neben der aktiven und inaktiven Form des Regulators eine intermediäre Form des Proteins existiert, die nicht nur Einblicke in den Mechanismus, der dem Wechsel von inaktiver zu aktiver Form zugrunde liegt, gibt, sondern auch möglicherweise physiologische Relevanz für einige Response Regulatoren besitzt (Dyer & Dahlquist, 2006; Stock & Guhaniyogi, 2006). Es gibt unterschiedliche Modelle hinsichtlich der phosphorylierungs-abhängigen Aktivierung der Effektor-Domänen von Response Regulatoren, die einer positiven oder negativen Kontrolle der Output-Domäne durch den Receiver beinhaltet. So können unphosphorylierte Receiver die Funktion der Output-Domäne inhibieren. Röntgenkristallstrukturanalysen von NarL und CheB aus *E. coli* zeigten, dass die Effektor-Domäne von der Receiver-Domäne im nicht phosphorylierten Zustand umgeben ist. So blockiert die regulatorische Domäne von NarL die Erkennungshelix des HTH-Motives der Output-Domäne und somit die DNA-Bindung (Baikalov *et al.*, 1996). In CheB behindert sie den Zugang des Chemorezeptors zum aktiven Zentrum der Esterase (Djordjevic *et al.*, 1998). Die phosphorylierungsabhängige Aktivierung dieser Proteine muss also eine Repositionierung der beiden Domänen beinhalten. Diese Beobachtungen wurden anhand von biochemischen und biophysikalischen Methoden unterstützt (Anand *et al.*, 2000; Hughes *et al.*, 2001; Eldridge *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003). In anderen Fällen unterliegt die Aktivität der Effektor-Domäne einer positiven Kontrolle durch den Receiver. Seit längerem ist bekannt, dass die Phosphorylierung von PhoB aus *E. coli* zur Dimerisierung des Proteins führt (Fiedler & Weiss, 1995; McCleary, 1996) und im Falle von UhpA (Webber & Kadner, 1995; Wrights & Kadner, 2001) und NtrC (Weiss *et al.*, 1992; Rippe *et al.*, 1998) zur Oligomerisierung, wobei die Dimerisierung bzw. Oligomerisierung dieser Response Regulatoren die Regulation der Transkription abhängiger Gene beeinflusst. Die Mechanismen, die einer Regulation durch Dimerisierung zugrunde liegen, konnten kürzlich anhand von Kristall-Strukturanalysen des Response Regulators ArcA näher untersucht werden. So wurde gezeigt, dass die Receiver-Domäne von ArcA ein symmetrisches Dimer formt, dass durch die $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$ -Struktur im Zusammenspiel mit Aminosäureresten, die innerhalb der OmpR/PhoB-Subfamilie hochkonserviert sind, vermittelt wird (Toro-Roman *et al.*, 2005). Es wurde ebenfalls postuliert, dass die C-terminale DNA-Bindedomäne auch eine Rolle für die Oligomerisierung des Proteins spielt (Toro-Roman *et al.*, 2005).

Bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters wird der Response Regulator nach der Phosphorylierung durch die zugehörige Histidin-Kinase BvgS an einem konservierten Aspartatrestes in der Receiver-Domäne aktiviert und bindet mit Hilfe seines HTH-Motives und im Zusammenspiel mit der RNA-Polymerase mit einer erhöhten Affinität an Zielsequenzen in Promotorregionen entsprechender Gene, um somit ihre Transkription in der Bvg⁺-Phase zu induzieren (Boucher *et al.*, 1995; Steffen *et al.*, 1996). Abgeleitet aus den Ergebnissen der limitierten Proteolyse des Response Regulators BvgA_{BP} aus *B. pertussis* und der darüber ermittelten Domänengrenzen (Bock *et al.*, 2001) wurde der hybride Response

Regulator BvgA_{fus} konstruiert, welcher sich aus der Receiver- und Linker-Domäne des BvgA-Proteins aus *B. holmesii* und der Output-Domäne des BvgA-Proteins aus *B. pertussis* zusammensetzt (siehe E 2.1). Zudem wurde das Helix-Turn-Helix Motiv (HTH) des BvgA_{BH}-Proteins an die Aminosäuresequenz der HTH-Struktur von BvgA_{BP} angeglichen (siehe E 2.6). Die Abbildung 44 zeigt eine schematische Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Response Regulatoren BvgA_{fus} und BvgA_{BH}*.

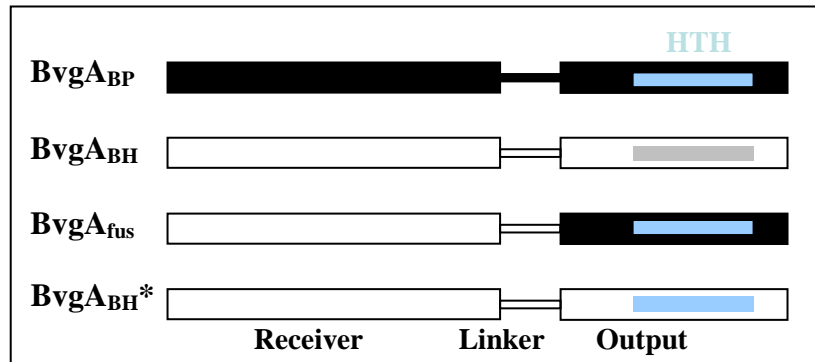


Abb. 44: Schematische Darstellung der Response Regulatoren BvgA aus *B. pertussis* (BvgA_{BP}), BvgA aus *B. holmesii* (BvgA_{BH}), BvgA_{fus} und dem im HTH Motiv veränderten BvgA_{BH}*.

Gezeigt ist der modulare Aufbau von BvgA_{BP}, BvgA_{BH}, BvgA_{fus} sowie BvgA_{BH}*. BvgA_{BP}-Anteile sind schwarz bzw. BvgA_{BH}-Anteile sind weiß dargestellt. Das HTH-Motiv aus *B. pertussis* ist durch einen blauen Balken, das HTH von *B. holmesii* ist durch einen grauen Balken gekennzeichnet.

2.1.1 Analyse der Phosphorylierungseffizienz der Response Regulatoren BvgA_{fus} und BvgA_{BH}*

Die Umwandlung eines Umweltsignals in ein zelluläres Signal erfolgt im Fall der Zwei-Komponentensysteme mittels hochspezifischer Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen. Der Response Regulator steht dabei im typischen Fall am Ende der Reaktionskette, wobei sein Phosphorylierungsstatus eine Art Schalter darstellt, der die zelluläre Antwort an- bzw. ausschaltet. Basierend auf Röntgenkristallstruktur-Analysen des dem BvgA-Protein verwandten Response Regulators NarL wurde vermutet, dass im unphosphorylierten Zustand die N- und C-terminalen Domänen so kondensiert sind, dass die Region um das HTH-Motiv von der N-terminalen Domäne maskiert ist (Baikalov *et al.*, 1996, 1998). Multidimensionale NMR-Studien unterstützen die Vermutung, dass sich durch die Phosphorylierung des N-terminalen Receivers beide Domänen voneinander weg bewegen, so dass die DNA-Bindung durch den C-terminalen Bereich erfolgen kann (Eldridge *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2005). Um die Funktionsfähigkeit von BvgA_{fus} und BvgA_{BH}* zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung der Response Regulatoren BvgA_{fus} und BvgA_{BH}* durch die heterologe Histidin-Kinase BvgS aus *B. pertussis* mittels *in vitro*-Phosphorylierungsassays untersucht. Hierüber konnte gezeigt werden, dass sowohl BvgA_{fus} als auch BvgA_{BH}* durch das BvgS Protein aus *B. pertussis* *in vitro* phosphoryliert werden können. Während das BvgA_{BH}*-Protein im Vergleich zu dem BvgA_{BP}-Protein annähernd gleich effektiv phosphoryliert werden kann, war die Phosphorylierungseffizienz des hybriden Response Regulators BvgA_{fus} anhand der Auswertung der Bandenintensität am PhosphoImager (siehe Abschnitt D 3.11.1) um ca. das dreifache reduziert und die Reaktionskinetik der BvgA_{fus}-Phosphorylierungs-Reaktion (siehe Abschnitt E 2.8, Abb. 38) deutlich verzögert. Auch konnte eine Erhöhung der Proteinmenge des Response Regulators das Ergebnis der Phosphorylierungseffizienz nicht beeinflussen. Der Einfluss veränderter Output-Domänen auf die Phosphorylierungseigenschaften der zugehörigen Receiver wird auch anhand weiterer

Beispiele deutlich. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass selbst ein einziger Aminosäureaustausch im C-terminalen Bereich (T194M) des BvgA-Proteins von *B. pertussis* zu einem Verlust der Phosphorylierbarkeit des Response Regulators sowohl durch die zugehörige Histidin-Kinase BvgS als auch durch Acetylphosphat führt (Jones *et al.*, 2005). Auch im Fall des Response Regulator Proteins OmpR aus *E. coli* konnte gezeigt werden, dass eine Punktmutation in der Output-Domäne die Phosphorylierungseigenschaften der Receiver-Domäne dramatisch verändert (Tran *et al.*, 2000). Auf diese Weise wird die konformationsabhängige Signalweiterleitung innerhalb der Domänen von Response Regulatoren deutlich, die eine geeignete Positionierung der Output-Domäne während des Aktivierungsprozesses erfordert. So muss man Response Regulatoren in ihrer Funktion nicht nur als aktivierte Effektor-Domänen, sondern als ganzes Protein betrachten

Das Grundprinzip der über ein Zwei-Komponentensystem vermittelten Signaltransduktion erfolgt wie bereits anfangs erwähnt über hochspezifische Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen. Für die Gewährleistung der Funktionalität des Response Regulators ist vor allem das aufeinander abgestimmte Zusammenspiel zwischen der Histidin-Kinase und dem zugehörigen Regulator Protein, aber auch das der einzelnen Domänen des Response Regulators selbst, von Bedeutung. Veränderungen innerhalb der Proteinsequenz, die zu einer Veränderung der räumlichen Struktur führen, könnten demnach einen Funktionsverlust des Proteins nach sich ziehen. Zudem wäre es denkbar, dass durch die Domänenfusion das korrekte Zusammenspiel und die Interaktion zwischen der N-terminalen Receiver-Domäne und der BvgS_{BP}-Histidin-Kinase verhindert werden, oder aber, dass dadurch die unphosphorylierte Form des BvgA_{fus} Proteins stabilisiert wird. Eine durch die Domänenfusion hervorgerufene veränderte Struktur der BvgA_{BH}-Receiver-Domäne und/oder der BvgA_{BP}-Output-Domäne könnte im Falle von BvgA_{fus} für die verminderte Phosphorylierungseffizienz der N-terminalen Receiver-Domäne verantwortlich sein.

Schon in früheren Domänenaustauschexperimenten zwischen dem Response Regulator BvgA aus *B. pertussis* und dem nah verwandten EvgA-Protein aus *E. coli* konnte, trotz einer korrekten Faltung der Domänen innerhalb des Hybrids, ein gestörtes Zusammenspiel des Receivers und der Output-Domäne beobachtet werden. Zwar zeigte der hybride Response Regulator HA, der aus der Receiver-Domäne von EvgA und der Output-Domäne von BvgA zusammengesetzt ist, im Gegensatz zu BvgA_{fus} nahezu unveränderte Phosphorylierungs- und Dimerisierungseigenschaften im Vergleich zu den parental Proteinen. Jedoch war HA nicht in der Lage, die Transkription BvgA-abhängiger Gene zu induzieren (Bock, 2002). Es wurde postuliert, dass die Oberflächen der Protein-Domänen von BvgA und EvgA nicht hundertprozentig zueinander passen und somit keine mit den wildtypischen Proteinen vergleichbare produktive Interaktion ermöglichen (Bock, 2002). Für BvgA_{fus} konnte aufgrund der genauen Kenntnisse der Domain-Grenzen der Receiver- und Linker-Domänen von BvgA_{BH} und der Output-Domäne von BvgA_{BP} sowie der Konstruktionen des hybriden Response Regulators HA mit ähnlicher Beschaffenheit (Bantscheff *et al.*, 2000; Bock *et al.*, 2001; Bock, 2002) mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass der hybride Response Regulator BvgA_{fus} ebenfalls eine korrekte Proteinfaltung aufweist. Dies lässt vermuten, dass für eine erfolgreiche phosphorylierungsabhängige Aktivierung des Response Regulators BvgA spezifische Interaktionen zwischen der Receiver- und Output-Domäne notwendig sind.

Auch kann eine aktive Beteiligung der Linker-Domäne an dem Zusammenspiel der N- und C-terminalen Domäne von BvgA_{fus} nicht ausgeschlossen werden. Der hybride Response Regulator besitzt den kompletten Linker-Bereich des BvgA-Proteins aus *B. holmesii*. Trotz der Annahme, dass dieser korrekt gefaltet vorliegt, könnte die Informationsübermittlung zwischen der Receiver-Domäne und der Output-Domäne innerhalb des Hybrids gestört sein. Während im Falle des Response Regulators OmpR aus *E. coli* gezeigt werden konnte, dass

die Phosphorylierung der N-terminalen Receiver Domäne ihren entsprechenden Linker erfordert (Walthers *et al.*, 2003), spricht der niedrige Konservierungsgrad der Linkerstruktur zwischen Response Regulatoren der selben Subfamilie (Martinez-Hackert & Stock, 1997) und die Tatsache, dass die künstliche Verlängerung der Linkerregion innerhalb des NtrC Proteins um mehrere Aminosäuren keinen Effekt auf die Funktion des Proteins hatte (Wootton *et al.*, 1989), gegen eine Beteiligung der Linkerstruktur an der Signalübermittlung. Allerdings wurde ebenfalls postuliert, dass die Linker-Domäne einen entscheidenden Einfluss auf die Kommunikation zwischen der Receiver- und Output-Domäne während ihrer Aktivierung besitzt (Mattison *et al.*, 2002). Diese Beobachtung und Hinweise auf konservierte Strukturen innerhalb der Linker-Domänen (Bock *et al.*, 2002) deuten auf eine Beteiligung des Linkers an der Signalübermittlung hin. Im Allgemeinen ist die Rolle des Linkers in Response Regulatoren noch sehr wenig verstanden und wird gerade im Falle von OmpR stark diskutiert (Ames *et al.*, 1999, Buckler *et al.*, 2000; Kenney *et al.*, 2000). So scheint sich die Meinung, dass Linker lediglich flexible Strukturen sind, die hauptsächlich der Verbindung interagierender Domänen dienen, grundlegend zu ändern.

2.1.2 Analyse der DNA-Bindeeigenschaften der Response Regulatoren BvgA_{fus} und BvgA_{BH}*

Durch die Phosphorylierung des Response Regulators BvgA kommt es zur Aktivierung der DNA-Bindeaktivität und zur Interaktion mit Zielsequenzen in entsprechenden Promotorregionen, wie des *phaB*-Promotors. Dies führt zur Transkription BvgA-abhängiger Gene (Boucher *et al.*, 1994; Steffen *et al.*, 1996). Trotz der hohen Sequenzübereinstimmung zwischen den Response Regulatoren BvgA_{BP} und BvgA_{BH}, vor allem im Bereich der Output-Domäne, konnte in vorausgegangenen DNA-Bindestudien keine Bindung des BvgA_{BH}-Proteins an die Promotorsequenz des *phaB*-Gens beobachtet werden.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Gelretardations-Experimente konnte gezeigt werden, dass BvgA_{fus} im Gegensatz zum BvgA_{BH}-Protein sowohl in der nicht-phosphorylierten als auch in der phosphorylierten Form (BvgA_{fus}-P) an die *phaB*-Promotorsequenz aus *B. pertussis* binden kann (siehe Abschnitt E 2.3, Abb. 24). Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit den schon beschriebenen DNA-Bindeeigenschaften für BvgA_{BP}, das ebenfalls in der Lage ist, in seiner phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Form an den *phaB*-Promotorbereich zu binden. Im Gegensatz zu BvgA_{fus} zeigt die phosphorylierte Form des Response Regulators aus *B. pertussis* BvgA_{BP}-P jedoch eine deutlich erhöhte Bindeaffinität (Bock *et al.*, 2001; Boucher *et al.*, 2001). Durch Kompetitions-Experimente konnte weiterhin gezeigt werden, dass es sich bei der Interaktion zwischen dem BvgA_{fus}-Protein und der *phaB*-Promotorregion um eine spezifische DNA-Bindung handelt, da selbst ein 1000-facher Überschuss an unspezifischer DNA-Sonde keinen Einfluss auf die DNA-Bindung von BvgA_{fus} zeigte (siehe E 2.3, Abb 25). Die Tatsache, dass die Phosphorylierungseffizienz des BvgA_{fus}-Proteins durch die Histidin-Kinase BvgS_{BP} im Vergleich zu BvgA_{BP} und BvgA_{BH} deutlich verringert ist, scheint zumindest, unter den *in vitro*-Bedingungen des Gelretardations-Experiments, die DNA-Bindeaktivität des hybriden Response Regulators nicht zu beeinflussen. Denn schon ab einer Proteinkonzentrationen von 100 ng ist ein DNA-Protein-Bindekomplex zu beobachten ist (siehe Abschnitt E 2.3, Abb. 24). Möglicherweise ist auch die Phosphorylierungseffizienz des hybriden Response Regulators unter Verwendung des Acetylphosphates, das im Versuchsansatz für die *in vitro*-Phosphorylierung eingesetzt wird, identisch mit der von BvgA_{BP}. Die Ergebnisse der oben beschriebenen Gelretardations-Experimente deuten daraufhin, dass die geringen Sequenzvariationen zwischen den Output-Domänen von BvgA_{BH} und BvgA_{BP} für die unterschiedlichen DNA-Bindeeigenschaften verantwortlich sind.

In silico-Analysen ergaben, dass im Vergleich zu der BvgA_{BP}-Proteinsequenz lediglich sechs, meist konservative Sequenzvariationen innerhalb der BvgA_{BH}-Output-Domäne vorkommen, und zusätzlich vier Abweichungen in dem Helix-Turn-Helix-Motiv (HTH) zu finden sind (siehe E 2.6, Abb. 30). Da die HTH-Struktur eines DNA-Bindeproteins für die DNA-Bindung verantwortlich ist, wurde durch ortsspezifische Mutagenese die Sequenz des BvgA_{BH}-HTH-Motivs an die des BvgA_{BP}-Proteins angeglichen (siehe E 2.6.1). Für das resultierende Protein BvgA_{BH}* (L164M, T165S, A179T und I180V) konnte zwar in Gelretardations-Experimenten eine Bindung an die *fhaB*-Promotorregion nachgewiesen werden (siehe E 2.3.6), jedoch konnte diese Interaktion in anschließenden Kompetitions-Experimenten nicht als spezifisch charakterisiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich hier möglicherweise um eine instabile bzw. unspezifische Bindung des BvgA_{BH}*-Proteins an die *fhaB*-Promotorregion aus *B. pertussis* handelt. Hier könnte die Bestimmung der Bindungsisothermen Aufschluss über die Stabilität der beobachteten Protein-DNA-Bindung geben, die möglicherweise aufgrund von Konformationsänderungen beeinträchtigt ist. Die oben gemachte Beobachtung deutet daraufhin, dass die HTH-Struktur des BvgA_{BH}-Proteins nicht allein dafür verantwortlich ist, dass der Response Regulator aus *B. holmesii* nicht an die *fhaB*-Promotorsequenz aus *B. pertussis* binden kann. Demnach scheinen weitere Sequenzvariationen zwischen der Output-Domäne von BvgA_{BH} und BvgA_{BP}, Einfluss auf die DNA-Bindeeigenschaften beider Proteine zu besitzen, die jedoch nicht mit den Phosphorylierungseigenschaften der Proteine in Zusammenhang stehen. Kürzlich konnte im Falle von BvgA aus *B. pertussis* eine ähnliche Beobachtung gemacht werden, wonach eine Punktmutation außerhalb des HTH-Motives an Aminosäureposition 152 (R152H), zwar keinen Effekt auf die Phosphorylierungseffizienz hatte, jedoch die DNA-Bindeaffinität des mutierten BvgA-Protein signifikant beeinträchtigt war (Jones *et al.*, 2005). Aufgrund der räumlichen Nähe des positiv geladenen Restes R152 zum negativ geladenen DNA-Rückgrat, wurde vermutet, dass dieser Arginin-Rest an der Stabilisierung der BvgA_{BP}-DNA-Interaktion beteiligt sein könnte (Abb. 45) (Jones *et al.*, 2005).

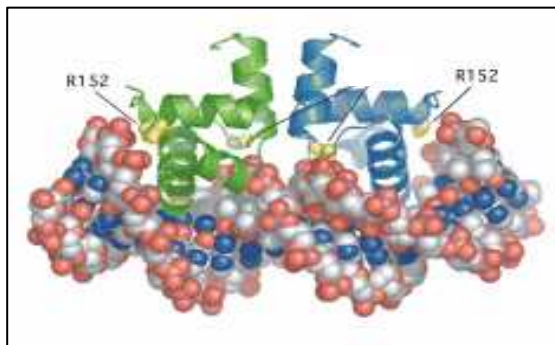


Abb. 45: Strukturvorhersage eines BvgA-Dimers gebunden an DNA (Jones *et al.*, 2005).
Der Argininrest R152 ist gezeigt.

Die Aktivierung von *bvg*-abhängigen Genen setzt sich aus mehreren Bereichen zusammen. Hierzu gehört zum einen die Dimerisierung von BvgA-Monomeren, die Erkennung und spezifische Bindung der BvgA-Dimere an die DNA-Zielsequenzen, sowie die Oligomerisierung von BvgA-Dimeren entlang des DNA-Moleküls und letzten Endes die erfolgreiche Interaktion mit der RNA-Polymerase (RNAP). Diese unterschiedlichen BvgA-P-vermittelten Vorgänge sind zwar konzeptionell leicht voneinander zu unterscheiden, bleiben allerdings aufgrund ihrer funktionellen Zusammenhänge genetisch und auf experimenteller Ebene kaum trennbar. Untersuchungen deuten daraufhin, dass die RNA-Polymerase eine wichtige Rolle bei der *bvg*-abhängigen Aktivierung von Genen spielt. So zeigten BvgA_{BP}-Proteine mit Punktmutationen innerhalb der Output-Domäne in DNaseI-Footprint-Experimenten signifikante Defekte hinsichtlich der Bindung an Zielsequenzen innerhalb des *fhaB*-Promotors. In Anwesenheit der RNA-Polymerase konnte jedoch wieder, ähnlich wie im

wildtypischen Fall, eine Bindung an den *fhaB*-Promotor beobachtet werden. (Jones *et al.*, 2005; Boucher *et al.*, 2001a). Mittels Affinitäts-Spaltungsstudien gelang es, eine Interaktionsstelle zwischen der RNAP und dem BvgA_{BP}-Protein zu identifizieren. Demnach kommt es zur Interaktion zwischen den BvgA-Dimeren und der C-terminalen Domäne der RNAP, welche wiederum an benachbarte Oberflächen der Promotor-DNA bindet (Boucher *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2005). So kann die Interaktion mit der RNA-Polymerase stabilisierend auf den zu bildenden Transkriptionskomplex wirken und die Bindung von BvgA an Promotorregionen verstärken. Hierbei kann nicht ausgeschlossen werden, dass noch zusätzliche Interaktionen zwischen weiteren benachbarten Oberflächen des RNAP-Moleküls eine festigende Wirkung auf den Transkriptionskomplex ausüben (Tran *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2000; Boucher *et al.*, 2001). In Abbildung 46 ist ein Modell für die BvgA-P-Aktivität an Zielsequenzen des *fhaB*-Promotors dargestellt. In diesem Zusammenhang wäre in der Zukunft über DNaseI-Footprint-Analysen zu untersuchen, ob die BvgA_{BH}*-Bindung an die *fhaB*-Promotorregion durch die Anwesenheit der RNA-Polymerase stabilisiert werden kann.

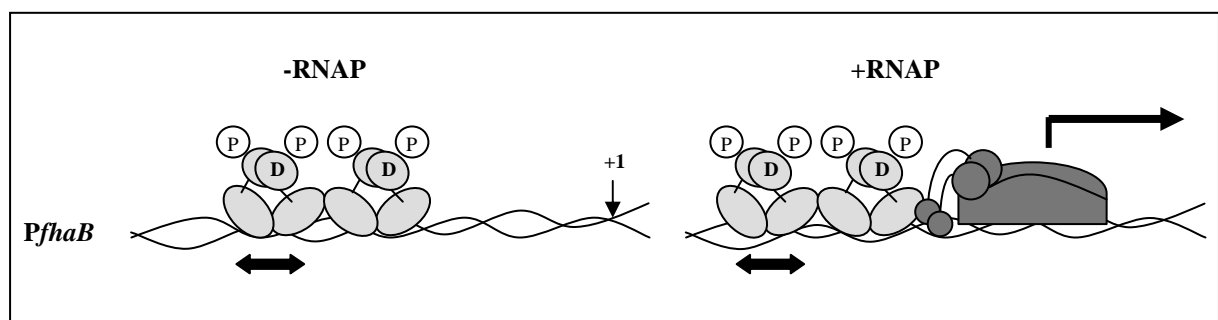


Abb. 46: Modell für BvgA-P-Aktivität an Zielsequenzen des *fhaB*-Promotors (nach Boucher *et al.*, 2001). Die stöchiometrische Bindung von BvgA-P in Abwesenheit und Anwesenheit von RNAP ist hier für den *fhaB*-Promotor gezeigt. Durch die Interaktion von BvgA-P-Dimeren mit der C-terminalen Domäne von RNAP erfolgt die Transkription von *fhaB*, die durch einen Pfeil dargestellt ist.

Eine weitere mögliche Erklärung für die fehlende bzw. möglicherweise zu schwache DNA-Bindeaffinität von BvgA_{BH}*, könnte in der richtigen Positionierung des HTH-Motives zur Bindung von DNA-Zielsequenzen durch die Output-Domäne des Response Regulator Proteins liegen, das durch das Zusammenspiel von Aminosäureresten außerhalb des HTH-Motives, aber auch innerhalb der DNA-Binderegion vermittelt werden kann.

Auch wäre es denkbar, dass Aminosäureaustausche innerhalb des C-terminalen Bereiches der Output-Domäne zu einer Konformationsänderung des HTH-Motives selbst führen, so dass Interaktionen mit Zielsequenzen gestört oder gänzlich nicht mehr möglich sind. Im Falle einer Mutante von OmpR aus *E. coli* (V203M), die eine Punktmutation innerhalb des C-terminalen Bereiches der Output-Domäne trägt, konnte gezeigt werden, dass aufgrund dieses Aminosäureaustausches die Mutante im Gegensatz zum wildtypischen OmpR zwischen unterschiedlich affinen DNA-Zielsequenzen unterscheiden konnte (Tran *et al.*, 2000). Die Unterscheidung von Bindestellen auf der DNA könnte aufgrund von Interaktionen mit der C- oder N-terminalen Region des DNA-Bindebereiches erfolgen (Tran *et al.*, 2000). Das daraufhin erstellte „sliding helix model“ zeigt somit eine Möglichkeit auf, wie die Konformationsänderung des HTH die Bindung von OmpR an unterschiedliche Bereiche der DNA veranlasst und so für die differentielle Expression von Porin-Genen verantwortlich ist (Abb. 47) (Tran *et al.*, 2000). Zudem könnten diese Variationen in der HTH-Konformation ebenfalls die Interaktion mit der RNAP beeinflussen, was sich folglich auch auf die Transkription entsprechender Gene auswirkt.

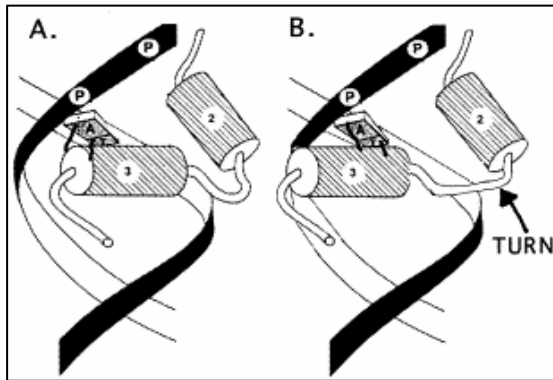


Abb. 47: „sliding helix model“ für die DNA-Bindung durch den Response Regulator OmpR (Tran et al., 2000).

A: Ein Typus von Bindestellen (evtl. primäre Bindestellen) wird mittels der C-terminalen Domäne des HTH gebunden.

B: Ein anderer Typus von Bindestellen (evtl. sekundäre Bindestellen) wird durch den N-terminalen Bereich der DNA-Bindedomäne erkannt. Durch den „turn“ werden Konformationsänderungen verursacht. Das HTH-Motiv ist innerhalb der Helices 2 und 3 lokalisiert

2.1.3 *in vivo*-Analyse zur Charakterisierung der transkriptionsaktivierenden Aktivität der Response Regulatoren BvgA_{fus} und BvgA_{BH}*

Um zu untersuchen ob der hybride Response Regulator BvgA_{fus} neben der *in vitro* beobachteten Bindung an die *fhaB*-Promotorsequenz auch in der Lage, ist als Transkriptionsaktivator von *bvgA*-abhängigen Genen zu wirken, wurden Komplementations-Experimente mit der *B. pertussis* *bvgA*-Mutante BP 359 durchgeführt. Ebenso sollte untersucht werden, ob das BvgA_{BH}*-Protein möglicherweise *in vivo* erst im Zusammenspiel mit der *B. pertussis* RNA-Polymerase, in der Lage ist, stabil an die BvgA-abhängigen Promotorsequenzen zu binden, um dadurch deren Transkription zu aktivieren. Nach der *in trans*-Komplementation von BP 359 mit dem *bvgA*_{fus}-Lokus bzw. dem *bvgA*_{BH}*-Lokus wies lediglich der Stamm BP 359 (pMMB-*bvgA*_{BP}pup*bvgA*_{fus}), nicht jedoch der Stamm BP 359 (pMMB-*bvgA*_{BP}pup*bvgA*_{BH}*), einen hämolytischen Phänotyp auf. Die Beurteilung des hämolytischen Phänotyps diente dabei als Indikation zur *bvgA*-abhängigen Expression des Adenylatzyklase Toxins (*cya*). Parallel dazu konnte über Primer-Extension Experimente lediglich für den *B. pertussis* Stamm BP 359 (pMMB-*bvgA*_{BP}pup*bvgA*_{fus}) ein *fhaB*-Transkript nachgewiesen werden, wobei dessen Transkriptionsstartpunkt dem publizierten *fhaB*-Transkriptionsstartpunkt von *B. pertussis* entspricht (Scarlato et al., 1991). Die Ergebnisse sprechen somit dafür, dass das BvgA_{fus}-Protein nicht nur *in vitro* an die *fhaB*-Promotorsequenz bindet, sondern auch dafür, dass der hybride Response Regulator in der Lage ist, im Zusammenwirken mit der RNA-Polymerase von *B. pertussis*, die Transkription von *bvgA*-abhängigen Genen in einer *B. pertussis* *bvgA*-Mutante zu aktivieren. Interessanterweise ist die über die Primer-Extension Experimente für BP 359 (pMMB-*bvgA*_{BP}pup*bvgA*_{fus}) ermittelte *fhaB*-Transkriptmenge signifikant geringer als bei dem Kontrollstamm BP T1. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die transkriptionsaktivierende Aktivität des hybriden Response Regulators BvgA_{fus} in Bezug auf *bvgA*-abhängige Gene im Vergleich zu dem wildtypischen BvgA_{BP}-Protein reduziert ist. Die verminderte Aktivität von BvgA_{fus} könnte möglicherweise auf seine geringere Phosphorylierungseffizienz zurückzuführen sein, die unter F 2.1.1 diskutiert wird.

Im Gegensatz zu dem hybriden BvgA_{fus}-Protein ist der lediglich in seiner HTH-Struktur dem BvgA_{BP}-Protein angepasste Response Regulator BvgA_{BH}* ähnlich wie das wildtypische BvgA_{BH}-Protein weder in der Lage, an die *fhaB*-Promotorsequenz zu binden, noch die Transkription der *bvgA*-abhängigen Gene *cya* und *fhaB* in einer *B. pertussis* *bvgA*-Mutante zu aktivieren. Dies lässt vermuten, dass nicht die Variationen zwischen den BvgA_{BH}- bzw. BvgA_{BP}-HTH-Motiven allein, sondern weitere Abweichungen innerhalb der Output-Domäne von der BvgA_{BP}-Sequenz dafür verantwortlich sind, dass der Response Regulator BvgA_{BH} aus *B. holmesii* nicht als Transkriptionsaktivator von *bvgA*-abhängigen Genen dienen kann. Anhand von Primer-Extension-Experimenten wurde die Bindung von BvgA_{BH}* an die

Upstreamregion von *bvgA* aus *B. pertussis* untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass nur im Falle des konstitutiven Promotors P2*bvgAS*, der während der Bvg⁻-Phase die Transkription und Expression eines Grundlevels an BvgAS ermöglicht, ein Transkriptionsstartpunkt detektiert werden konnte (siehe Abschnitt E 2.7.4, Abb. 35). Der mit dem *bvgA*_{BH}*-Lokus *in trans* komplementierte *B. pertussis*-Stamm BP 359 (pMMB208-*bvgA*_{BP}pup*bvgA*_{BH}*) verhielt sich in dem Fall ähnlich wie die *bvgA*-Mutante aus *B. pertussis* BP 359. Die Beobachtung, dass dennoch im Western Blot für den *B. pertussis*-Stamm BP 359 (pMMB208-*bvgA*_{BP}pup*bvgA*_{BH}*) im Gegensatz zu BP 359 eine BvgA-Expression nachweisbar war, könnte durch eine höhere Aktivität des konstitutiv aktiven Promotors P2*bvgAS* im *B. pertussis*-Stamm BP 359 (pMMB208-*bvgA*_{BP}pup*bvgA*_{BH}*) im Vergleich zu BP 359 erklärt werden. Dies könnte möglicherweise für einen höheren Grundlevel an *bvgAS*-Transkript sorgen, dessen Expression dann durch Antikörper detektiert werden kann. Der Vergleich der Transkriptmenge der *B. pertussis*-Stämme BP 359 und BP 359 (pMMB208-*bvgA*_{BP}pup*bvgA*_{BH}*) für den Promotor P2*bvgAS* unterstützt diese Vermutung (siehe Abschnitt E 2.7.5, Abb.37).

Die Bindung der BvgA-Proteine an Promotorregionen der Virulenzgene aus *B. pertussis* erfolgt an DNA-Bereiche mit der Konsensussequenz 5'-T/ATTCC/TTA-3' oder Varianten davon (Roy & Falkow, 1991; Karimova & Uhlmann, 1997; Marques & Carbonetti, 1997). Über *in silico*-Analysen, konnte für die Upstreamregion von *bvgA*_{BH} (Gerlach *et al.*, 2004) und *fhaB* aus *B. holmesii* (Link, persönliche Mitteilung) Sequenzmotive gefunden werden, die dieser BvgA-Konsensussequenz sehr ähnlich sind. Mit Hilfe von DNA-Binde- und Reporterfusionen-Studien konnte weiterhin gezeigt werden, dass BvgA_{BH} an diese Regionen binden kann (Gerlach *et al.*, 2004; Link, persönliche Mitteilung). Trotz einer fehlenden Bindung von BvgA_{BH} an *bvg*-abhängige Promotorsequenzen aus *B. pertussis in vivo* und *in vitro* ist es demnach eher unwahrscheinlich, dass der Response Regulator BvgA_{BH} an eine von der BvgA-Konsensussequenz vollständig abweichende Zielsequenz bindet (Gerlach *et al.*, 2004). Vielmehr deuten die Beobachtungen daraufhin, dass die ausbleibende DNA-Bindung und fehlende transkriptionsaktivierende Eigenschaften im Falle von BvgA_{BH} auf eine andere Symmetrie der Zielsequenzen des BvgA_{BH}-Response Regulators oder eine unterschiedliche relative Anordnung zueinander zurückzuführen ist. Es ist demnach sehr wahrscheinlich, dass diese Überlegung für BvgA_{BH}*, das lediglich vier Aminosäureunterschiede innerhalb des HTH-Motives aufweist und sich somit nicht allzu sehr vom wildtypischen BvgA_{BH}-Protein unterscheidet, immer noch zutreffend ist. Diese Unterschiede zu den eher „klassischen“ *bvg*-abhängigen Promotoren, wie z.B. dem des *fhaB*-, *cya*, *ptx* oder *prn*-Promotors aus *B. pertussis*, konnten schon für die Upstream-Region von *bvgA* aus *B. holmesii* beobachtet werden (Gerlach *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang ist es interessant zu erwähnen, dass kürzlich durchgeführte Promotorstudien von *fhaB* aus *B. holmesii* ebenfalls Unterschiede in den BvgA-Bindestellen hinsichtlich ihrer Anzahl und Struktur im Vergleich zum *fhaB*-Promotor aus *B. pertussis* aufzeigten (Link, persönliche Mitteilung). An dieser Stelle wäre es interessant zu untersuchen, ob BvgA_{BH}* in der Lage ist, an die *fhaB*-Promotorregion von *B. holmesii* zu binden und ob Unterschiede zu dem wildtypischen Response Regulator-Protein erkennbar werden. Zudem könnte eine mögliche Bindung von BvgA_{BP} an die *fhaB*-Region von *B. holmesii* untersucht werden und mit der Bindung des wildtypischen Proteins verglichen werden.

Wie in Abschnitt 2.1.1 schon erwähnt, wurden zuvor Domänenaustauschexperimente zwischen den Response Regulatoren BvgA aus *B. pertussis* und dem eng verwandten EvgA aus *E. coli* durchgeführt (Bock, 2002). Neben dem schon beschriebenen HA-Protein wurde zudem das HB-Protein konstruiert, das innerhalb der Receiver-Domäne fusioniert ist und demnach einen hybriden Receiver sowie den Linkerbereich und die Output-Domäne von

BvgA besitzt. Trotz einer sehr engen Verwandtschaft zwischen den Response Regulatoren EvgA und BvgA sowie der hohen Homologie zwischen den einzelnen Protein-Domänen waren die hybriden Response Regulatoren HA und HB nicht in der Lage, als Transkriptionsaktivatoren von *bvgA_{BP}*-abhängigen Genen zu fungieren.

Wie schon erwähnt, zeigte HA nahezu unveränderte Phosphorylierungs- und Dimerisierungseigenschaften im Vergleich zu BvgA und EvgA, unterschied sich jedoch von BvgA hinsichtlich seiner DNA-Bindeeigenschaften am BvgA-abhängigen *pha*-Promotor und war zudem nicht in der Lage, kooperativ an die DNA zu binden. So schienen strukturelle Veränderungen nach der Bindung an die DNA, die für kooperative Wechselwirkungen notwendig sind, im Hybrid HA nicht stattzufinden. Auch konnte eine fehlende oder fehlerhafte Interaktion mit der RNAP als Ursache nicht ausgeschlossen werden. Ebenfalls wurde angenommen, dass eine gestörte Kommunikation zwischen der Receiver- und Output-Domäne, für das Unvermögen von HA als Transkriptionsaktivator zu wirken, verantwortlich ist (Bock, 2002). Im Falle von BvgA_{BH}* könnte die fehlende transkriptionsaktivierende Eigenschaft deshalb daher rühren, dass eine stabile DNA-Bindung und möglicherweise auch eine stabile Interaktion mit der *B. pertussis* RNAP und damit die Ausbildung eines aktiven Transkriptionskomplexes nicht erreicht werden kann.

Das hybride Protein HB zeigte eine annähernd gleiche Phosphorylierungskinetik wie EvgA, unterschied sich jedoch hinsichtlich seiner Phosphorylierungseffizienz vom wildtypischen Protein. Ebenso konnten Unterschiede zu BvgA hinsichtlich der DNA-Bindung beobachtet werden. Nach der strukturellen Charakterisierung des HB-Proteins wurde eine fehlerhafte Faltung des Receivers im Vergleich zu BvgA und EvgA festgestellt. Zudem war HB hinsichtlich seiner Dimerisierungseigenschaften gestört. Dies ließ vermuten, dass die Dimerisierung des Response Regulators für eine effiziente DNA-Bindung der Output-Domäne von BvgA erforderlich ist (Bock, 2002). Für das BvgA_{BH}*-Protein scheint diese Ursache für das Ausbleiben von transkriptionsaktivierenden Eigenschaften allerdings eher unwahrscheinlich, da mittels GPC-Analysen mit den Produkten der limitierten Proteolyse von EvgA, das wie schon erwähnt, große Homologien zur Receiver- und Output-Domäne von BvgA_{BP} aufweist, gezeigt werden konnte, dass die Receiver-Domäne für eine Dimerisierung des Proteins ausreichend ist, während die Output-Domäne in Lösung als Monomer vorliegt (Bantscheff *et al.*, 2000). Da im Response Regulator BvgA_{BH}* die Receiver-Domäne aus *B. holmesii* dem kompletten Receiver des wildtypischen Proteins entspricht, liegt es nahe, dass die Dimerisierungsoberfläche nicht beeinträchtigt wurde. Betrachtet man die Phosphorylierungseffizienz von BvgA_{BH}*, die dem wildtypischen Protein entspricht, kann man ebenfalls davon ausgehen, dass die Dimerisierungseigenschaften des veränderten Response Regulators nicht beeinträchtigt sind.

Die im Rahmen dieser Arbeit dokumentierten Daten deuten daraufhin, dass es trotz des hohen Konservierungsgrades zwischen dem BvgA_{BH}- und BvgA_{BP}-Protein interessante Unterschiede hinsichtlich der Funktionsweise beider Response Regulatoren gibt. So konnte gezeigt werden, dass die Aminosäureaustausche innerhalb der Output-Domäne von BvgA aus *B. holmesii* dafür verantwortlich sind, dass dieser Response Regulator das BvgA-Protein aus *B. pertussis* *in vivo* und *in vitro* nicht substituieren kann. Auch resultierten Aminosäureaustausche innerhalb des HTH-Motives von BvgA aus *B. holmesii* und folglich die Anpassung an die Sequenz von *B. pertussis* in keinem Protein, das in der Lage war, BvgA_{BP}-Zielsequenzen zu erkennen und die Transkription BvgA-abhängiger Gene zu aktivieren. Eher scheint es möglich, dass die zusätzlichen Aminosäureaustausche außerhalb des HTH zwar keinen Einfluss auf die Phosphorylierungseffizienz des BvgA-Proteins nehmen, wohl aber in die DNA-Bindung involviert sind. Dabei könnte die richtige Positionierung des HTH-Motives durch strukturelle Veränderungen der Output-Domäne eine wichtige Rolle spielen, an der die variierenden Aminosäuren beteiligt sein könnten. Weitere Experimente in der Zukunft

könnten nicht nur klären, welche Bereiche des BvgA_{BP}-Proteins für die spezifische DNA-Bindung an die Zielsequenz von *bvgA_{BP}*-abhängigen Genen verantwortlich sind, sondern auch welche Strukturen für die Ausbildung eines aktiven Transkriptionskomplexes notwendig sind. Über die eingehende Analyse der Mechanismen der *bvgA_{BH}*-abhängigen Transkription in *B. holmesii* könnten prinzipielle Unterschiede zwischen der Funktionsweise der BvgA_{BH}- und BvgA_{BP}-Proteine aufgeklärt werden

G Literaturverzeichnis

- Akerley BJ, Monack DM, Falkow S, Miller JF.** (1992): The *bvgAS* locus negatively controls motility and synthesis of flagella in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol.* 1992 Feb;174(3):980-90.
- Akerley BJ, Miller JF.** (1993): Flagellin gene transcription in *Bordetella bronchiseptica* is regulated by the BvgAS virulence control system. *J Bacteriol.* 1993 Jun;175(11):3468-79.
- Akerley BJ, Cotter PA, Miller JF.** (1995): Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the *Bordetella*-host interaction. *Cell.* 1995 Feb 24;80(4):611-20.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** (1990): Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct 5;215(3):403-10.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997 Sep 1;25(17):3389-402.
- Amador C, Chiner E, Calpe JL, Ortiz de la Table V, Martinez C, Pasquau F.** (1991): Pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a patient with AIDS. *Rev Infect Dis.* 1991 Jul-Aug;13(4):771-2.
- Anand GA, Goudreau PN, Lewis JK, Stock AM.** (2000): Evidence for phosphorylation-dependent conformational changes in methylesterase CheB. *Protein Sci.* 2000; 9: 898-906.
- Andersson SG, Kurland CG.** (1998): Reductive evolution of resident genomes. *Trends Microbiol.* 1998 Jul;6(7):263-8. Review.
- Antoine R, Raze D, Loch C.** (2000a): Genomics of *Bordetella pertussis* toxins. *Int J Med Microbiol.* 2000 Oct;290(4-5):301-5. Review.
- Antoine R, Alonso S, Raze D, Coutte L, Lesjean S, Willery E, Loch C, Jacob-Dubuisson F.** (2000b): New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 2000 Oct;182(20):5902-5.
- Antoine R, Huvent I, Chemlal K, Derey I, Raze D, Loch C, Jacob-Dubuisson F.** (2005): The periplasmic binding protein of a tripartite tricarboxylate transporter is involved in signal transduction. *J Mol Biol.* 2005; 351: 799-809.
- Ames SK, Frankema N, Kenney LJ.** (1999): C-terminal DNA binding stimulates N-terminal phosphorylation of the outer membrane protein regulator OmpR from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Oct 12;96(21):11792-7.
- Arico B, Rappuoli R.** (1987): *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. *J Bacteriol.* 1987 Jun;169(6):2847-53.
- Arico B, Miller JF, Roy C, Stibitz S, Monack D, Falkow S, Gross R, Rappuoli R.** (1989): Sequences required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Sep;86(17):6671-5.
- Arico B, Scarlato V, Monack DM, Falkow S, Rappuoli R.** (1991): Structural and genetic analysis of the *bvg* locus in *Bordetella* species. *Mol Microbiol.* 1991 Oct;5(10):2481-91.
- Arico B, Nuti S, Scarlato V, Rappuoli R.** (1993): Adhesion of *Bordetella pertussis* to eukaryotic cells requires a time-dependent export and maturation of filamentous hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Oct 1;90(19):9204-8.
- Baikalov I, Schroder I, Kaczor-Grzeskowiak M, Grzeskowiak K, Gunsalus RP, Dickerson RE.** (1996): Structure of the *Escherichia coli* response regulator NarL. *Biochemistry.* 1996 Aug 27;35(34):11053-61.

- Baikalov I, Schroder I, Kaczor-Grzeskowiak M, Cascio D, Gunsalus RP, Dickerson RE.** (1998): NarL dimerization? Suggestive evidence from a new crystal form. *Biochemistry*. 1998 Mar 17;37(11):3665-76.
- Banemann A, Gross R.** (1998): The lipopolysaccharide of *Bordetella bronchiseptica* acts as a protective shield against antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* 1998; 66: 5607-5612 .
- Bantscheff M, Perraud AL, Bock A, Rippe K, Weiss V, Glocker M, Gross R.** (2000): Structure-function relationships in the Bvg and Evg two-component phosphorelay systems. *Int J Med Microbiol.* 2000 Oct;290(4-5):317-23.
- Barber CE, Tang JL, Feng JX, Pan MQ, Wilson TJ, Slater H, Dow JM, Williams P, Daniels MJ.** (1997): A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol Microbiol.* 1997 May;24(3):555-66.
- Bartel PL, Chien CT, Sternglanz R, Fields S.** (1993a): Using the two hybrid system to detect protein-protein interactions. In: *Cellular interactions in development: A practical approach* (Herausgeber: HARTLEY DA). 1993;153-179.
- Bartel PL, Chien CT, Sternglanz R, Fields S.** (1993b): Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid-system. *BioTechniques.* 1993;14: 920-924.
- Bauwens JE, Spach DH, Schacker TW, Mustafa MM, Bowden RA.** (1992): *Bordetella bronchiseptica* pneumonia and bacteremia following bone marrow transplantation. *J Clin Microbiol.* 1992 Sep;30(9):2474-5.
- Beattie DT, Knapp S, Mekalanos JJ.** (1990): Evidence that modulation requires sequences downstream of the promoters of two vir-repressed genes of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1990 Dec;172(12):6997-7004.
- Beattie DT, Mahan MJ, Mekalanos JJ.** (1993): Repressor binding to a regulatory site in the DNA coding sequence is sufficient to confer transcriptional regulation of the vir-repressed genes (vrg genes) in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1993 Jan;175(2):519-27
- Beier D, Schwarz B, Fuchs TM, Gross R.** (1995): *In vivo* characterization of the unorthodox BvgS two-component sensor protein of *Bordetella pertussis*. *J Mol Biol.* 1995 May 5;248(3):596-610.
- Beier D, Deppisch H, Gross R.** (1996): Conserved sequence motifs in the unorthodox BvgS two-component sensor protein of *Bordetella pertussis*. *Mol Gen Genet.* 1996 Aug 27;252(1-2):169-76.
- Bibikov SI, Barnes LA, Gitin Y, Parkinson JS.** (2001): Domain organization and dIavin adenine dinucleotide-binding determinants in the aerotaxis signal transducer Aer of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 97: 5830-5835.
- Bingmann C, Regelmann A, Reynold M, Stokes L, Hendrickson W, Waldburger C.** (1999): Structural analysis of the PhoQ extracellular sensor domain. Presented at the BLAST V: Bact Locomat Signal Transdukt. 1999; Cuernavaca, Mex.
- Birck C, Mourey L, Gouet P, Fabry B, Schumacher J, Rousseau P, Kahn D, Samama JP.** (1999): Conformational changes induced by phosphorylation of the FixJ receiver domain. *Structure.* 1999 Dec 15;7(12):1505-15.
- Bock A.** (2002): Unorthodoxe Zwei-Komponentensysteme: Signalwahrnehmung und Struktur-Funktionsanalysen am Beispiel der Bvg- und Evg-Systeme aus *Bordetella pertussis* und *Escherichia coli*. Doktorarbeit, Universität Würzburg.
- Bock A, Gross R.** (2001): The BvgAS two-component system of *Bordetella* spp.: a versatile modulator of virulence gene expression. *Int J. Med. Microbiol.* 2001; 291;119-130.
- Bock A, Bantscheff M, Perraud A L, Rippe K, Weiss V, Glockner M O, Gross R.** (2001): Rational design and molecular characterization of a chimaeric response regulator protein. *J. Mol. Biol.* 2001; 310: 283-290.
- Bock A, Gross R.** (2002): The unorthodox histidine kinases BvgS and EvgS are responsive to the oxidation status of a quinone electron carrier. *Eur J Biochem.* 2002 Jul; 269(14):3479-84.

- Bogdan JA, Nazario-Larrieu J, Sarwar J, Alexander P, Blake MS.** (2001): *Bordetella pertussis* autoregulates pertussis toxin production through the metabolism of cysteine. *Infect Immun.* 2001 Nov;69(11):6823-30.
- Borras Sans M, Bonal J, Bonet J, Arnal J, Roca F, Caralps A.** (1991): *Bordetella bronchiseptica* septicemia in a hemodialysis patient. *Nephron.* 1991;59(4):676. No abstract available.
- Boschwitz JS, van der Heide HG, Mooi FR, Relman DA.** (1997): *Bordetella bronchiseptica* expresses the fimbrial structural subunit gene *fimA*. *J Bacteriol.* 1997 Dec; 179(24):7882-5.
- Boucher PE, Menozzi FD, Loch C.** (1994): The modular architecture of bacterial response regulators. Insights into the activation mechanism of the BvgA transactivator of *Bordetella pertussis*. *J Mol Biol.* 1994 Aug 19; 241(3):363-77.
- Boucher PE, Stibitz S.** (1995): Synergistic binding of RNA polymerase and BvgA phosphate to the pertussis toxin promoter of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1995 Nov; 177(22):6486-91.
- Boucher PE, Murakami K, Ishihama A, Stibitz S.** (1997): Nature of DNA binding and RNA polymerase interaction of the *Bordetella pertussis* BvgA transcriptional activator at the *fha* promoter. *J Bacteriol.* 1997 Mar; 179(5):1755-63.
- Boucher PE, Yang MS, Schmidt DM, Stibitz S.** (2001a): Genetic and biochemical analyses of BvgA interaction with the secondary binding region of the *fha* promoter of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 2001 Jan; 183(2):536-44.
- Boucher PE, Yang MS, Stibitz S.** (2001b): Mutational analysis of the high-affinity BvgA binding site in the *fha* promoter of *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol.* 2001 May; 40(4):991-9.
- Boucher PE, Maris AE, Yang MS, Stibitz S.** (2003): The response regulator BvgA and RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain bind simultaneously to different faces of the same segment of promoter DNA. *Mol Cell.* 2003 Jan; 11(1):163-73.
- Braun V.** (2001): Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *Int J Med Microbiol.* 2001; 291: 67-79.
- Brickman TJ, Vanderpool CK, Armstrong SK.** (2006): Heme transport contributes to *in vivo* fitness of *Bordetella pertussis* during primary infection in mice. *Infect Immun.* 2006 Mar;74(3):1741-4.
- Buckler DR, Zhou Y, Stock AM.** (2002): Evidence of intradomain and interdomain flexibility in an OmpR/PhoB homolog from *Thermotoga maritima*. *Structure.* 2002 Feb;10(2):153-64.
- Burbulys D, Trach KA, Hoch JA.** (1991): Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell.* 1991. 64: 545-552.
- Cangelosi GA, Ankenbauer RG, Nester EW.** (1990): Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87: 6708-6712.
- Carbonetti NH, Fuchs TM, Patamawenu AA, Irish TJ, Deppisch H, Gross R.** (1994): Effect of mutations causing overexpression of RNA polymerase alpha subunit on regulation of virulence factors in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1994 Dec; 176(23):7267-73.
- Charles TC, Nester EW.** (1993): A chromosomally encoded two-component sensory transduction system is required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 1993; 175: 6614-6625.
- Charles H, Ishikawa H.** (1999): Physical and genetic map of the genome of *Buchnera*, the primary endosymbiont of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J Mol Evol.* 1999 Feb;48(2):142-50.
- Charles IG, Dougan G, Pickard D, Chatfield S, Smith M, Novotny P, Morrissey P, Fairweather NF.** (1989): Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 May; 86(10):3554-8.

- Chhatwal GS, Walker MJ, Yan H, Timmis KN, Guzman CA.** (1997): Temperature dependent expression of an acid phosphatase by *Bordetella bronchiseptica*: role in intracellular survival. *Microb Pathog.* 1997 May; 22(5):257-64.
- Cherry JD.** (1996): Historical review of pertussis and the classical vaccine. *J Infect Dis.* 1996 Nov; 174 Suppl 3:S259-63. Review.
- Cherry JD, Heininger.** (1999): Pertussis. In "Textbook of Pediatric Infection Disease" (Feigin RD and Cherry JD, eds). Saunders, Philadelphia.
- Cherry JD.** (1999a): Pertussis in the preantibiotic and prevaccine era, with emphasis on adult pertussis. *Clin Infect Dis.* 1999 Jun; 28 Suppl 2:S107-11.
- Cherry JD.** (1999b): Epidemiological, clinical, and laboratory aspects of pertussis in adults. *Clin Infect Dis.* 1999 Jun;28 Suppl 2:S112-7. Review.
- Chevalier N, Moser M, Koch HG, Schimz KL, Willery E, Loch C, et al.** (2004): Membrane targeting of a bacterial virulence factor harbouring an extended signal peptide. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2004; 8: 7-18.
- Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S.** (1991): The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A.* 1991; 88: 9578-9582.
- Cho HS, Lee SY, Yan D, Pan X, Parkinson JS, Kustu S, Wemmer DE, Pelton JG.** (2000): NMR structure of activated CheY. *J Mol. Biol.* 2000; 297:543-551.
- Cho HS, Pelton JG, Yan D, Kustu S, Wemmer DE.** (2001): Phosphoaspartates in bacterial signal transduction. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2001; 11: 679-684.
- Clarke L, Carbon J.** (1992): A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Biotechnology.* 1992; 24: 179-187.
- Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honore N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KA, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmons M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Tayler K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG** (2001): Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 2001; 409: 1007-1011.
- Collier JL, Grossman AR.** (1992): Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *J Bacteriol.* 1992 Jul;174(14):4718-26.
- Cookson BT, Tyler AN, Goldman WE.** (1989a): Primary structure of the peptidoglycan-derived tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Biochemistry.* 1989 Feb 21;28(4):1744-9.
- Cookson BT, Cho HL, Herwaldt LA, Goldman WE.** (1989b): Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1989 Jul;57(7):2223-9.
- Cookson BT, Vandamme P, Carlson LC, Larson AM, Sheffield JV, Kersters K, Spach DH.** (1994): Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, "*B. hinzii*". *J Clin Microbiol.* 1994 Oct;32(10):2569-71.
- Cotter PA, Miller JF.** (1994): BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model. *Infect Immun.* 1994 Aug;62(8):3381-90.
- Cotter PA, Miller JF.** (1997): A mutation in the *Bordetella bronchiseptica* *bvgS* gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation, and identifies a new class of Bvg-regulated antigens. *Mol Microbiol.* 1997 May;24(4):671-85.
- Cotter PA, Yuk MH, Mattoo S, Akerley BJ, Boschwitz J, Relman DA, Miller JF.** (1998): Filamentous hemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* is required for efficient establishment of tracheal colonization. *Infect Immun.* 1998 Dec;66(12):5921-9.

- Cotter PA, DiRita VJ.** (2000): Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:519-65. Review.
- Cotter PA, Miller JF.** (2000): Principles of Bacterial Pathogenesis. (E. Groisman, ed),ch.13,pp 619-674. Academic Press,London.
- Coutte L, Antoine R, Drobecq H, Loch C, Jacob-Dubuisson F.** (2001): Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *EMBO J* 2004; 20: 5040-5048.
- Crews ST, Thomas JB, Goodman CS.** (1998): The *Drosophila single-minded* gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the *per* gene product. *Cell.* 1998; 52, 143-151.
- Cummings CA, Brinig MM, Lepp PW, van de Pas S, and Relman DA.** (2004): Bordetella species are distinguished by patterns of substantial gene loss and host adaptation. *J Bacteriol* 2004; 186: 1484-1492.
- Cummings CA, Bootsma HJ, Relman DA, Miller JF.** (2006): Species- and strain-specific control of a complex, flexible regulon by *Bordetella* BvgAS. *J Bacteriol.* 2006; Mar:188(5): 1775-1785.
- Decker GR, Lavelle JP, Kumar PN, Pierce PF.** (1991): Pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a patient with AIDS. *Rev Infect Dis.* 1991 Nov-Dec;13(6):1250-1.
- Delisse-Gathoye AM, Loch C, Jacob F, Raaschou-Nielsen M, Heron I, Ruelle JL, de Wilde M, Cabezon T.** (1990): Cloning, partial sequence, expression, and antigenic analysis of the filamentous hemagglutinin gene of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1990 Sep;58(9):2895-905.
- Deora R, Bootsma HJ, Miller JF, Cotter PA.** (2001): Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Mol Microbiol.* 2001 May;40(3):669-83.
- Deora R.** (2002): Differential regulation of the *Bordetella bipA* gene: distinct roles for different BvgA binding sites. *J Bacteriol.* 2002 Dec;184(24):6942-51.
- DeShazer D, Wood GE, Friedman RL.** (1995): Identification of a *Bordetella pertussis* regulatory factor required for transcription of the pertussis toxin operon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1995 Jul;177(13):3801-7.
- Devill JG, Cherry JD, Christenson PD, Pineda E, Leach CT, Kuhls TI, Viker S.** (1995): Frequency of unrecognized *Bordetella pertussis* infections in adults. *Clin Infect Dis.* 1995 ; 21,639-642.
- Diavatopoulous DA, Cummings CA, Schouls LM, Brinig MM, Relman DA, et al.** (2005) : *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica*. *OloS Pathog.* 2005 ; 1(4) :e45.
- Diavatopoulous DA, Cummings CA, van der Heide HGJ, van Gent M, Liew S, Relman DA, Mooi FR.** (2006) : Characterization of a highly conserved island in the otherwise divergent *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis* genomes. *J Bacteriol.* 2006 Dec;188(24): 8385-8394.
- Djordjevic S, Goudreau PN, Xu Q, Stock AM, West AH.** (1998): Structural basis for methylesterase CheB regulation by a phosphorylation-activated domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Feb 17;95(4):1381-6.
- Dobrogosz WJ, Ezzel JW, Kloos WE, Manclark CR.** (1979) : Physiology of *Bordetella pertussis*. In: Proceedings of the third international Symposium on Pertussis. (Eds.: Manclark CR and Hill JC) U.S. Department of Health, Education and Welfare, National Institutes of Health, Bethesda, MD, pp86-93.
- Domenighini M, Relman D, Capiou C, Falkow S, Prugnola A, Scarlato V, Rappuoli R.** (1990): Genetic characterization of *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor. *Mol Microbiol.* 1990 May;4(5):787-800.
- Doty SL, Yu MC, Lundin JI, Health JD, Nester EW.** (1996): Mutational analysis of the input domain of the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol.* 1996; 178: 961-970.
- Dow JM, Crossman L, Findlay K, He YQ, Feng JX, Tang JL.** (2003): Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 Sep16;100(19):10995-10000.

- Drummond MH, Contreras A, Mitchenall LA.** (1990): The function of isolated domains and chimaeric proteins constructed from the transcriptional activators NifA and NtrC of *Klebsiella pneumoniae*. Mol Microbiol. 1990 Jan;4(1):29-37.
- Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang Y.** (1993): The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase Type I catalytic subunit. Genes Dev. 1993; 7: 555-569.
- Dyer CM, Dahlquist FW.** (2006): Switched or not? The structure of unphosphorylated CheY bound to the N terminus of FliM. J Bacteriol. 2006; 188: 7354-7363.
- Eldridge AM, Kang HS, Johnson E, Gunsalus R, Dahlquist FW.** (2002): Effect of phosphorylation on the interdomain interaction of the response regulator, NarL. Biochemistry. 2002 Dec 24;41(51):15173-80.
- Emsley P, Charles IG, Fairweather NF, Isaacs NW.** (1996): Role of the *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. Nature.1996; 381: 90-92.
- Endoh M, Nagai M, Burns DL, Manclark CR, Nakase Y.** (1990): Effects of exogenous agents on the action of *Bordetella parapertussis* heat-labile toxin on guinea pig skin. Infect Immun. 1990 May; 58(5):1456-60.
- Espinosa J, Fuentes I, Burillo S, Rodriguez-Mateos F, Contreras A.** (2006): SipA, a novel type of protein from *Synechococcus* sp. PCC 7942, binds to the kinase domain of NblS. FEMS Microbiol Lett. 2006 Jan;254(1):41-7.
- Everest P, Li J, Douce G, Charles I, De Azavedo J, Chatfield S, Dougan G, Roberts M.** (1996): Role of the *Bordetella pertussis* P.69/pertactin protein and the P.69/pertactin RGD motif in the adherence to and invasion of mammalian cells. Microbiology. 1996; 142: 3261-3268.
- Ezzel JW, Dobrogosz WJ, Kloos WE, Manclark CR.** (1981): Phase-shift markers in the genus *Bordetella*: loss of cytochrome d-629 in phase IV variants. Mol Microbiol. 1981; 31:171-181
- Farizo KM, Huang T, Burns DL.** (2000): Importance of holotoxin assembly in Ptl-mediated secretion of pertussis toxin from *Bordetella pertussis*. Infect Immun. 2000 Jul;68(7):4049-54.
- Feilotter HE, Hannon GJ, Ruddell CJ, Beach D.** (1994): Construction of an improved host strain for two hybrid screening. Nucleic Acids Res. 1994;22: 1502 - 1503.
- Fernandez RC, Weiss AA.** (1994): Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. Infect Immun. 1994 Nov;62(11):4727-38.
- Fernandez RC, Weiss AA.** (1998): Serum resistance in bvg-regulated mutants of *Bordetella pertussis*. FEMS Microbiol Lett. 1998 Jun 1;163(1):57-63.
- Fiedler U, Weiss V.** (1995): A common switch in activation of the response regulators NtrC and PhoB: phosphorylation induces dimerization of the receiver modules. EMBO J. 1995; 14:3696-3705.
- Fields S.** (2005): High-throughput two-hybrid analysis. The promise and the peril. FEBS J. 2005 Nov;272(21):5391-9
- Fields S, Song O.** (1989): A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature. 1989 Jul 20;340(6230):245-6.
- Finn TM, Stevens LA.** (1995a): Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. Mol Microbiol. 1995 May;16(4):625-34.
- Finn TM, Li Z, Kocsis E.** (1995b): Identification of a *Bordetella pertussis* bvg-regulated porin-like protein. J Bacteriol. 1995 Feb;177(3):805-9.
- Finn TM, Amsbaugh DF.** (1998): Vag 8, a *Bordetella pertussis* bvg-regulated protein. Infect. Immun. 1998; 66,3985-3989.

- Flak TA, Heiss LN, Engle JT, Goldman WE.** (2000): Synergistic epithelial responses to endotoxin and a naturally occurring muramyl peptide. *Infect Immun.* 2000 Mar;68(3):1235-42.
- Frangioni JV, Neel BG.** (1993): Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal Biochem.* 1993 Apr;210(1):179-87.
- Friedman LE, de Rossi BN, Messina MT, Franco MA.** (2001): Phenotype evaluation of *Bordetella bronchiseptica* cultures by urease activity and Congo red affinity. *Lett Appl Microbiol.* 2001 Oct;33(4):285-90.
- Fuchs TM, Deppisch H, Scarlato V, Gross R.** (1996): A new gene locus of *Bordetella pertussis* defines a novel family of prokaryotic transcriptional accessory proteins. *J Bacteriol.* 1996 Aug;178(15):4445-52.
- Fukushima S, Yoshimura M, Chibazakura T, Sato T, Yoshikawa H.** (2006): The putative ABC transporter YheH/YheI is involved in the signalling pathway that activates KinA during sporulation initiation. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 256: 90-97.
- Funke G, Hess T, von Graevenitz A, Vandamme P.** Characteristics of *Bordetella hinzii* strains isolated from a cystic fibrosis patient over a 3-year period. (1996): *J Clin Microbiol.* 1996 Apr;34(4):966-9. Review.
- Galperin MY.** (2006): Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol.* 2006; 188: 4169-4182.
- Gentry-Weeks CR, Cookson BT, Goldman WE, Rimler RB, Porter SB, Curtiss R 3rd.** (1988): Dermonecrotic toxin and tracheal cytotoxin, putative virulence factors of *Bordetella avium*. *Infect Immun.* 1988 Jul;56(7):1698-707.
- Gentry-Weeks CR, Provence DL, Keith JM, Curtiss R 3rd.** (1991): Isolation and characterization of *Bordetella avium* phase variants. *Infect Immun.* 1991 Nov;59(11):4026-33.
- Gerlach G, von Wintzingerode F, Middendorf B, Gross R.** (2001): Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. *Microbes Infect.* 2001 Jan;3(1):61-72. Review.
- Gerlach G, Janzen S, Beier D, Gross R.** (2004): Functional characterization of the BvgAS two-component system of *Bordetella holmesii*. *Microbiology.* 2004. 150: 3715-3729.
- Georgellis D, Kwon O, Lin EC.** (1999): Amplification of signaling activity of the arc two-component system of *Escherichia coli* by anaerobic metabolites. An *in vitro* study with different protein modules. *J Biol Chem.* 1999 Dec 10;274(50):35950-4.
- Georgellis D, Kwon O, Lin EC** (2001): Quinones as the redox signal for the Arc two-component system of bacteria. *Science.* 2001; 292: 2314-2316.
- Geuijen CA, Willems RJ, Bongaerts M, Top J, Gielen H, Mooi FR.** (1997): Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract. *Infect. Immun.* 1997; 65: 4222-4228.
- Gietz RD, St. Jean A, Woods RA, Schiestl RH.** (1992): Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20:1425.
- Gietz RD, Schiestl RH.** (1995): Transforming Yeast with DNA. *Methods in Molecular and Cellular Biology.* 1995;5:255-269.
- Gilles-Gonzalez MA, Ditta GS, Helsinki DR.** (1991): A hemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium melioli*. *Nature.* 1991; 350: 170-172.
- Glaser P, Danchin A, Ladant D, Barzu O, Ullmann A.** (1988): *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: the gene and the protein. *Tokai J Exp Clin Med.* 1988;13 Suppl:239-52.
- Goldman S, Hanski E, Fish F.** (1984): Spontaneous phase variation in *Bordetella pertussis* is a multistep non-random process. *EMBO J.* 1984; 3(6):1353-1365

- Goodnow RA.** (1980): Biology of *Bordetella bronchiseptica*. Microbiol Rev. 1980 Dec;44(4):722-38. Review.
- Goyard S, Bellalou J, Mireau H, Ullmann A.** (1994): Mutations in the *Bordetella pertussis* *bvgS* gene that confer altered expression of the *fhaB* gene in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1994; 176: 5163-5166.
- Goyard S, Mireau H, Ullmann A.** (1995): Mutations which result in constitutive expression of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin gene. Res. Microbiol. 1995; 146: 363-370 (1995).
- Graeff-Wohlleben H, Deppisch H, Gross R.** (1995): Global regulatory mechanisms affect virulence gene expression in *Bordetella pertussis*. Mol Gen Genet. 1995 Apr 10;247(1):86-94.
- Graeff-Wohlleben H, Killat S, Banemann A, Guiso N, Gross R.** (1997): Cloning and characterization of an Mn-containing superoxide dismutase (SodA) of *Bordetella pertussis*. J Bacteriol. 1997 Apr;179(7):2194-201.
- Grebe TW, Stock JB.** (1999): The histidine protein kinase superfamily. Adv Microb Physiol. 1999;41:139-227.
- Greco D, Salmaso S, Mastrantonio P, Giuliano M, Tozzi AE, Anemona A, Ciofi degli Atti ML, Giammanco A, Panei P, Blackwelder WC, Klein DL, Wassilak SG.** (1996): A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. Progetto Pertosse Working Group. N Engl J Med. 1996 Feb 8;334(6):341-8.
- Grimberg J, Maguire S, Belluscio L.** (1989): A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal *E. coli* DNA. Nucleic Acids Res. 1989 Nov 11;17(21):8893.
- Gross R, Rappuoli R.** (1988): Positive regulation of pertussis toxin expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Jun;85(11):3913-7.
- Gross R, Arico B, Rappuoli R.** (1989a): Families of bacterial signal-transducing proteins. Mol Microbiol. 1989 Nov;3(11):1661-7.Review.
- Gross R, Arico B, Rappuoli R.** (1989b): Genetics of pertussis toxin. Mol Microbiol. 1989 Jan;3(1):119-24.
- Gross R, Rappuoli R.** (1989): Pertussis toxin promoter sequences involved in modulation. J Bacteriol. 1989 Jul;171(7):4026-30.
- Gross MK, Au DC, Smith AL, Storm DR.** (1992): Targeted mutations that ablate either the adenylate cyclase or hemolysin function of the bifunctional *cyaA* toxin of *Bordetella pertussis* abolish virulence. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jun 1;89(11):4898-902.
- Gross R, Carbonetti NH.** (1993): Differential regulation of *Bordetella pertussis* virulence factors. Zentralbl Bakteriologie. 1993 Apr;278(2-3):177-86.
- Gueirard P, Weber C, Le Coustumier A, Guiso N.** (1995): Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. J Clin Microbiol. 1995 Aug;33(8):2002-6.
- Gueirard P, Le Blay K, Le Coustumier A, Chaby R, Guiso N.** (1998): Variation in *Bordetella bronchiseptica* lipopolysaccharide during human infection. FEMS Microbiol Lett. 1998 May 15;162(2):331-7.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K & Elledge SJ.** (1993): The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell. 1993; 75: 805 - 816.
- Hausman SZ, Cherry JD, Heininger U, Wirsing von Konig CH, Burns DL.** (1996): Analysis of proteins encoded by the *ptx* and *ptl* genes of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. Infect Immun. 1996 Oct;64(10):4020-6.
- He YW, Wang C, Zhou L, Song H, Dow JM, Zhang LH.** (2006): Dual signaling functions of the hybrid sensor kinase RpfC of *Xanthomonas campestris* involve either phosphorelay or receiver domain-protein interaction. J Biol Chem. 2006 Nov 3;281(44):33414-21.

- Heininger U, Stehr K, Schmitt-Grohe S, Lorenz C, Rost R, Christenson PD, Uberall M, Cherry JD.** (1994): Clinical characteristics of illness caused by *Bordetella parapertussis* compared with illness caused by *Bordetella pertussis*. *Pediatr Infect Dis J.* 1994 Apr;13(4):306-9.
- Heininger U, Cotter PA, Fescemyer HW, Martinez de Tejada G, Yuk MH, Miller JF, Harvill ET.** (2002): Comparative phenotypic analysis of the *Bordetella parapertussis* isolate chosen for genomic sequencing. *Infect Immun.* 2002 Jul;70(7):3777-84.
- Heiss LN, Lancaster JR Jr, Corbett JA, Goldman WE.** (1994): Epithelial autotoxicity of nitric oxide: role in the respiratory cytopathology of pertussis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jan 4;91(1):267-70.
- Hewlett EL, Cowell JL.** (1989): Evaluation of the mouse model for study of encephalopathy in pertussis vaccine recipients. *Infect Immun.* 1989 Mar;57(3):661-3. Review.
- Hewlett EL, Gray L, Allietta M, Ehrmann I, Gordon VM, Gray MC.** (1991): Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Conformational change associated with toxin activity. *J Biol Chem.* 1991 Sep 15;266(26):17503-8.
- Hewlett, E. L.** (1995): *Bordetella* species. In *Principles and practice of infectious diseases.* (Eds.: Douglas, R. G., Bennet, J. E.). Churchill Livingstone, New York, pp. 2078-2084.
- Hewlett EL.** (1997): Epidemiology of pertussis. *Pediatr Infect Dis J.* 1997 12:504-506.
- Hoch JA, Varughese KI.** (2001): Keeping signals straight in phosphorelay signal transduction. *J Bacteriol.* 2001; 183: 4941-4949.
- Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks AA, Hankinson O.** (1991): Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science.* 1991; 252: 954-958.
- Horiguchi Y, Inoue N, Masuda M, Kashimoto T, Katahira J, Sugimoto N, Matsuda M.** (1997): *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin induces reorganization of actin stress fibers through deamidation of Gln-63 of the GTP-binding protein Rho. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Oct 14;94(21):11623-6.
- Hot D, Antoine R, Renauld-Mongenie G, Caro V, Hennuy B, Levillain E, Huot L, Wittmann G, Poncet D, Jacob-Dubuisson F, Guyard C, Rimlinger F, Aujame L, Godfroid E, Guiso N, Quentin-Millet MJ, Lemoine Y, Loch C.** (2003): Differential modulation of *Bordetella pertussis* virulence genes as evidenced by DNA microarray analysis. *Mol Genet Genomics.* 2003 Jul;269(4):475-86.
- Hughes CA, Mandell JG, Anand GS, Stock AM, Komives EA.** (2001): Phosphorylation causes subtle changes in solvent accessibility at the interdomain interface of methyltransferase CheB. *J Mol Biol.* 2001; 307: 967-976.
- Hwang I, Sheen J.** (2001): Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature.* 2001 Sep 27;413(6854):383-9.
- Idigbe EO, Parton R, Wardlaw AC.** (1981): Rapidity of antigenic modulation of *Bordetella pertussis* in modified Hornbrook medium. *J Med Microbiol.* 1981 Nov;14(4):409-18.
- Imamura A, Hanaki N, Umeda H, Nakamura A, Suzuki T, Ueguchi C, Mizuno T.** (1998): Response regulators implicated in His-to-Asp phosphotransfer signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 3;95(5):2691-6.
- Irie Y, Mattoo S, Yuk MH.** (2004): The Bvg virulence control system regulates biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol.* 2004; 186: 5692-5698.
- James P, Halladay J, Craig EA.** (1996): Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two – hybrid selection in yeast. *Genetics.* 1996; 144: 1425 - 1436.
- Janda WM, Santos E, Stevens J, Celig D, Terrile L, Schreckenberger PC.** (1994): Unexpected isolation of *Bordetella pertussis* from a blood culture. *J Clin Microbiol.* 1994 Nov;32(11):2851-3.

- Jiang M, Shao W, Perego M, Hoch JA.** (2000): Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 2000; 38: 535-542.
- Jones AM, Boucher PE, Williams CL, Stibitz S, Cotter PA.** (2005): Role of BvgA phosphorylation and DNA binding affinity in control of Bvg-mediated phenotypic phase transition in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol.* 2005 Nov;58(3):700-13.
- Jungnitz H, West NP, Walker MJ, Chhatwal GS, Guzman CA.** (1998): A second two-component regulatory system of *Bordetella bronchiseptica* required for bacterial resistance to oxidative stress, production of acid phosphatase, and *in vivo* persistence. *Infect Immun.* 1998 Oct;66(10):4640-50.
- Kakimoto T.** (2003): Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu Rev Plant Biol.* 2003;54:605-27. Review.
- Kania SA, Rajeev S, Burns EH Jr, Odom TF, Holloway SM, Bemis DA.** (2000): Characterization of *fimN*, a new *Bordetella bronchiseptica* major fimbrial subunit gene. *Gene.* 2000 Oct 3;256(1-2):149-55.
- Karimova G, Bellalou J, Ullmann A.** (1996): Phosphorylation-dependent binding of BvgA to the upstream region of the *cyaA* gene of *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol.* 1996 May;20(3):489-96.
- Karimova G, Ullmann A.** (1997): Characterization of DNA binding sites for the BvgA protein of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1997 Jun;179(11):3790-2.
- Kaspar S, Perozzo R, Reinelt S, Meyer M, Pfister K, Scapozza L, Bott M.** (1999): The periplasmic domain of the histidine autokinase CitA functions as a highly specific citrate receptor. *Mol Microbiol.* 1999; 33: 858-872.
- Kasuga T, Nakase Y, Ukishima K, Takatsu K.** (1954): Studies on *Haemophilus pertussis*. V. Relation between the phase of bacilli and the progress of the whooping-cough. *Kitasato Arch Exp Med.* 1954 Sep;27(3):57-62.
- Katada T, Oinuma M, Ui M.** (1986): Mechanisms for inhibition of the catalytic activity of adenylate cyclase by the guanine nucleotide-binding proteins serving as the substrate of islet-activating protein, pertussis toxin. *J Biol Chem.* 1986 Apr 15;261(11):5215-21.
- Kattar MM, Chavez JF, Limaye AP, Rassoulian-Barrett SL, Yarfitz SL, Carlson LC, Houze Y, Swanzy S, Wood BL, Cookson BT.** (2000): Application of 16S rRNA gene sequencing to identify *Bordetella hinzii* as the causative agent of fatal septicemia. *J Clin Microbiol.* 2000 Feb;38(2):789-94.
- Katzenstein DA, Ciofalo L, Jordan MC.** *Bordetella bronchiseptica* bacteremia. (1984): *West J Med.* 1984 Jan;140(1):96-8.
- Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, Trollinger D.** (1988): Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene.* 1988 Oct 15;70(1):191-7.
- Kenney LJ, Bauer MD, Silhavy TJ.** (1995): Phosphorylation-dependent conformational changes in OmpR, an osmoregulatory DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Sep 12;92(19):8866-70.
- Kenney LJ.** (2000): Response-regulator phosphorylation and activation: a two-way street? *Trends Microbiol.* 2000; 8:155-156.
- Kern D, Volkman BF, Luginbuhl P, Nohaile MJ, Kustu S, Wemmer DE.** (1999): Structure of a transiently phosphorylated switch in bacterial signal transduction. *Nature.* 1999; 402:894-898.
- Khelef N, Sakamoto H, Guiso N.** (1992): Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. *Microb. Pathog.* 1992; 12: 227-235.
- Kinnear SM, Boucher PE, Stibitz S, Carbonetti NH.** (1999): Analysis of BvgA activation of the pertactin gene promoter in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1999 Sep;181(17):5234-41.

- Klein A.** (1999): Vergleichende genetische Charakterisierung verschiedener *Bordetella* Isolate. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Kloos, W. E., Dobrodosz, W. J., Ezzel, J. W., Kimbro, B. R., Manclark, C. R.** (1979): DNA-DNA hybridisation, plasmids, and genetic exchange in the genus *Bordetella*. In: Proceedings of the third international on pertussis (Eds.: Manclark, C. R., Hill, J. C.). U.S. Department of Health, Education and Welfare, National Institutes of Health, Bethesda, MD, pp. 70-80 .
- Knapp S, Mekalanos JJ.** (1988): Two *trans*-acting regulatory genes (*vir* and *mod*) control antigenic modulation in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1988; 170:5059-5066.
- Ko KS, Peck KR, Oh WS, Lee NY, Lee JH, Song JH.** (2005): New Species of *Bordetella*, *Bordetella ansorpii* sp. nov., Isolated from the Purulent Exudate of an Epidermal Cyst. *J Clin Microbiol.* 2005 May;43(5):2516-9.
- Kuhnert P, Heyberger-Meyer B, Burnens AP, Nicolet J, Frey J.** (1997): Detection of RTX toxin genes in gram-negative bacteria with a set of specific probes. *Appl Environ Microbiol.* 1997 Jun;63(6):2258-65.
- Lacey BW.** (1960): Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*. *J Hyg (Lond).* 1960 Mar;58:57-93.
- Ladant D, Ullmann A.** (1999): *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol.* 1999; 7: 172-176.
- LeBlay K, Gueirard P, Guiso N, Chaby R.** (1997): Antigenic polymorphism of the lipopolysaccharides from human and animal isolates of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology.* 1997 Apr;143 (Pt 4):1433-41.
- LeDeaux JR, Yu N, Grossmann AD.** (1995): Different roles for KinA, KinB and KinC in the inintiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 1995; 177: 166-175.
- Lee SY, Cho HS, Pelton JG, Yan D, Berry EA, Wemmer DE.** (2001): Crystal structure of activated CheY. Comparison with other activated receiver domains. *J Biol. Chem.* 2001; 276: 16425-16431.
- Leininger E, Roberts M, Kenimer JG, Charles IG, Fairweather N, Novotny P, Brennan MJ.** (1991): Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jan 15;88(2):345-9.
- Leininger E, Ewanowich CA, Bhargava A, Peppler MS, Kenimer JG, Brennan MJ.** (1992): Comparative roles of the Arg-Gly-Asp sequence present in the *Bordetella pertussis* adhesins pertctin and filamentous hemagglutinin. *Infect Immun.* 1992; 58: 352-357.
- Leslie PH , Gardner AD.** (1931): The phases of *Haemophilus pertussis*. *J. Hyg.* 31:423-455.
- Lewis RJ, Brannigan JA, Turkenburg JP, Muchova K, Barak I, Wilkinson AJ.** (1999): Phosphorylated aspartate in the structure of a response regulator protein. *J Mol Biol.* 1999; 294: 9-15.
- Lindquist SW, Weber DJ, Mangum ME, Hollis DG, Jordan J.** (1995): *Bordetella holmesii* sepsis in an asplenic adolescent. *Pediatr Infect Dis J.* 1995 Sep;14(9):813-5.
- Linnemann CC, Perry EB.** (1977): *Bordetella parapertussis*. Recent experience and a review of the literature. *Am J Dis Child.* 1977 May;131(5):560-3.
- Locht C, Bertin P, Menozzi FD, Renauld G.** (1993): The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent *Bordetella* spp. *Mol Microbiol.* 1993 Aug;9(4):653-60. Review.
- Lois AF, Weinstein M, Ditta GS, Helinski DR.** (1993): Autophosphorylation and phosphatase activities of the oxygen-sensing protein FixL of *Rhizobium meliloti* are coordinately regulated by oxygen. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 4370-4375.
- Loomis WF, Kuspa A, Shaulsky G.** (1998): Two-component signal transduction systems in eukaryotic microorganism. *Curr Opin Microbiol.* 1998; 1: 643-648.

- Lukat GS, McCleary WR, Stock AM, Stock JB.** (1992): Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jan 15;89(2):718-22.
- Luker KE, Tyler AN, Marshall GR, Goldman WE.** (1995): Tracheal cytotoxin structural requirements for respiratory epithelial damage in pertussis. *Mol Microbiol.* 1995 May;16(4):733-43.
- Ma J, Ptashne M.** (1988): Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell.* 1988 Nov 4;55(3):443-6.
- Mahonen AP, Higuchi M, Tormakangas K, Miyawaki K, Pischke MS, Sussman MR, Helariutta Y, Kakimoto T.** (2006): Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in *Arabidopsis*. *Curr Biol.* 2006 Jun 6;16(11):1116-22.
- Makhov AM, Hannah JH, Brennan MJ, Trus BL, Kocsis E, Conway JF, et al.** (1994): Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. A bacterial adhesion formed as a 50-nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat motif rich in beta strands and turns. *J Mol Biol.* 1994; 241: 110-124.
- Malpica R, Franco B, Rodriguez C, Kwon O, Georgellis D.** (2004): Identification of a quinone-sensitiv redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Sep7; 101(36): 13318-13323.
- Manetti R, Arico B, Rappuoli R, Scarlato V.** (1994): Mutations in the linker region of BvgS abolish response to environmental signals for the regulation of the virulence factors in *Bordetella pertussis*. *Gene.* 1994; 150: 123-127.
- Marques RR, Carbonetti NH.** (1997): Genetic analysis of pertussis toxin promoter activation in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol.* 1997 Jun;24(6):1215-24.
- Marr N.** (2002): Charakterisierung der BvgAS-Systeme und anderer Zwei-Komponenten-Systeme von *Bordetella* Arten. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Martinez-Hackert E, Stock AM.** (1997): The DNA-binding domain of OmpR: crystal structures of a winged helix transcription factor. *Structure.* 1997 Jan 15;5(1):109-24.
- Martinez de Tejada G, Miller JF, Cotter PA.** (1996): Comparative analysis of the virulence control systems of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Microbiol.* 1996 Dec;22(5):895-908.
- Martinez de Tejada G, Cotter PA, Heininger U, Camilli A, Akerley BJ, Mekalanos JJ, Miller JF.** (1998): Neither the Bvg- phase nor the vrg6 locus of *Bordetella pertussis* is required for respiratory infection in mice. *Infect Immun.* 1998 Jun;66(6):2762-8.
- Mascher T, Helmann JD, Unden G.** (2006): Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 2006 Dec; 70(4):910-938.
- Mastrantonio P, Stefanelli P, Giuliano M, Herrera Rojas Y, Ciofi degli Atti M, Anemona A, Tozzi AE.** (1998): *Bordetella parapertussis* infection in children: epidemiology, clinical symptoms, and molecular characteristics of isolates. *J Clin Microbiol.* 1998 Apr;36(4):999-1002.
- Matsubara M, Mizuno T.** (2000): The SixA phosphor-histidine phosphatase modulates the ArcB phosphorelay signal transduction in *Escherichia coli*. *FEBS Letters.* 2000; 470: 118-124.
- Matsushika A, Mizuno T.** (2000): Characterization of three putative sub-domains in the signal-input domain of the ArcB hybrid sensor in *Escherichia coli* (1). *J Biochem (Tokyo).* 2000 May;127(5):855-60.
- Mattison K, Oropeza R, Kenney LJ.** (2002): The linker region plays an important role in the interdomain communication of the response regulator OmpR. *J Biol Chem.* 2002 Sep 6;277(36):32714-21. Epub 2002 Jun 20.
- Mattoo S, Miller JF, Cotter PA.** (2000): Role of *Bordetella bronchiseptica* fimbriae in tracheal colonization and development of a humoral immune response. *Infect. Immun.* 2000; 68: 2024-2033.

- Mazengia E, Silva EA, Peppe JA, Timperi R, George H.** (2000): Recovery of *Bordetella holmesii* from patients with pertussis-like symptoms: use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize circulating strains. *J Clin Microbiol.* 2000 Jun;38(6):2330-3.
- McGillivray DM, Coote JG, Parton R.** (1989): Cloning of the virulence regulatory (*vir*) locus of *Bordetella pertussis* and its expression in *B. bronchiseptica*. *FEMS Microbiol Lett.* 1989 Dec;53(3):333-7.
- McCleary WR.** (1996): The activation of PhoB by acetylphosphate. *Mol Microbiol.* 1996;20:1155-1163.
- McMillan DJ, Shojaei M, Chhatwal GS, Guzman CA, Walker MJ.** (1996): Molecular analysis of the *bvg*-repressed urease of *Bordetella bronchiseptica*. *Microb Pathog.* 1996 Nov;21(5):379-94.
- McMillan DJ, Mau M, Walker MJ.** (1998): Characterisation of the urease gene cluster in *Bordetella bronchiseptica*. *Gene.* 1998 Feb 27;208(2):243-51.
- Melton AR, Weiss AA.** (1989): Environmental regulation of expression of virulence determinants in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1989 Nov;171(11):6206-12.
- Merkel TJ, Stibitz S.** (1995): Identification of a locus required for the regulation of *bvg*-repressed genes in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1995 May;177(10):2727-36.
- Merkel TJ, Barros C, Stibitz S.** (1998a): Characterization of the *bvgR* locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1998 Apr;180(7):1682-90.
- Merkel TJ, Stibitz S, Keith JM, Leef M, Shahin R.** (1998b): Contribution of regulation by the *bvg* locus to respiratory infection of mice by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1998 Sep;66(9):4367-73.
- Merkel TJ, Boucher PE, Stibitz S, Grippe VK.** (2003): Analysis of *bvgR* expression in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 2003 Dec;185(23):6902-12.
- Menozi FD, Boucher PE, Riveau G, Gantiez C, Locht C.** (1994): Surface-associated filamentous hemagglutinin induces autoagglutination of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1994 Oct;62(10):4261-9.
- Mertsola J.** (1985): Mixed outbreak of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infection in Finland. *Eur J Clin Microbiol.* 1985 Apr;4(2):123-8.
- Middendorf B, Gross R.** (1999): Representational difference analysis identifies a strain-specific LPS biosynthesis locus in *Bordetella* spp. *Mol Gen Genet.* 1999 Aug;262(1):189-98.
- Miller JF, Roy CR, Falkow S.** (1989): Analysis of *Bordetella pertussis* virulence gene regulation by use of transcriptional fusions in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1989 Nov;171(11):6345-8.
- Miller JF, Johnson SA, Black WJ, Beattie DT, Mekalanos JJ, Falkow S.** (1992): Isolation and analysis of constitutive sensory transduction mutations in the *Bordetella pertussis bvgS* gene. *J. Bacteriol.* 1992; 174: 970-979.
- Mira A, Ochman H, Moran NA.** (2001): Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. *Trends Genet.* 2001 Oct;17(10):589-96.
- Monack DM, Arico B, Rappuoli R, Falkow S.** (1989): Phase variants of *Bordetella bronchiseptica* arise by spontaneous deletions in the *vir* locus. *Mol Microbiol.* 1989 Dec;3(12):1719-28.
- Montaraz JA, Novotny P, Ivanyi J.** (1985): Identification of a 68-kilodalton protective protein antigen from *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun.* 1985 Mar;47(3):744-51.
- Mooi FR, Jansen WH, Brunings H, Gielen H, van der Heide HG, Walvoort HC, Guinee PA.** (1992): Construction and analysis of *Bordetella pertussis* mutants defective in the production of fimbriae. *Microb Pathog.* 1992 Feb;12(2):127-35.
- Morales VM, Backman A, Bagdasarjian M.** (1991): A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants. *Gene.* 1991 Jan 2;97(1):39-47.

- Morel-Deville, F., Ehrlich, S. D. & Morel, P. (1997).** Identification by PCR of genes encoding multiple response regulators. *Microbiology* **143**, 1513-20.
- Morris JT, Myers M. (1998):** Bacteremia due to *Bordetella holmesii*. *Clin Infect Dis.* 1998 Oct;27(4):912-3.
- Müller M, Hildebrandt A. (1993):** Nucleotide sequences of the 23S rRNA genes from *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* and *B. avium*, and their implications for phylogenetic analysis. *Nucleic Acids Res.* 1993 Jul 11;21(14):3320
- Mullis KB, Faloona FA. (1987):** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
- Nambu JR, Lewis JO, Wharton KAJ, Crews ST. (1991):** The *Drosophila single-minded* gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell.* 1991; 67:1157-1167.
- Ninfa AJ, Jiang P, Atkinson MR, Peliska JA. (2000):** Integration of antagonistic signals in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Curr Top Cell Regul.* 2000;36:31-75.
- Nixon BC, Ronson CW, Ausubel FM. (1986):** Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strong conserved domains with the nitrogen assimilation genes *ntxB* and *ntxC*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986; 83: 7850-7854.
- Njamkepo E, Delisle F, Hagege I, Gerbaud G, Guiso N. (2000):** *Bordetella holmesii* isolated from a patient with sickle cell anemia: analysis and comparison with other *Bordetella holmesii* isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2000 Mar;6(3):131-6.
- Pao GM, Saier MH Jr. (1995):** Response regulators of bacterial signal transduction systems: selective domain shuffling during evolution. *J Mol Evol.* 1995 Feb;40(2):136-54.
- Parkhill, J. (2001)** Genome Sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature.* 2001; 413:523-527.
- Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, Holden MT, Churcher CM, Bentley SD, Mungall KL, Cerdeno-Tarraga AM, Temple L, James K, Harris B, Quail MA, Achtman M, Atkin R, Baker S, Basham D, Bason N, Cherevach I, Chillingworth T, Collins M, Cronin A, Davis P, Doggett J, Feltwell T, Goble A, Hamlin N, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, Leather S, Moule S, Norberczak H, O'Neil S, Ormond D, Price C, Rabinowitsch E, Rutter S, Sanders M, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Unwin L, Whitehead S, Barrell BG, Maskell DJ. (2003):** Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet.* 2003 Sep;35(1):32-40. Epub 2003 Aug 10.
- Parkinson JS, Kofoid EC. (1992):** Communication modules in bacterial signalling proteins. *Annu Rev Genet.* 1992; 26: 71-112.
- Parton R. (1988):** Differentiation of phase I and variant strains of *Bordetella pertussis* on Congo red media. *J Med Microbiol.* 1988 Aug;26(4):301-6.
- Pellequer JL, Wager-Smith KA, Kay SA, Getzoff ED. (1998):** Photoactive yellow protein: a structural prototype for the three-dimensional fold of the PAS domain superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 5884-5890.
- Peppler MS. (1982):** Isolation and characterization of isogenic pairs of domed hemolytic and flat nonhemolytic colony types of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1982 Mar;35(3):840-51.
- Peppler MS, Schrumph ME. (1984):** Phenotypic variation and modulation in *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun.* 1984; 44(3):681-687.
- Perez Vidakovics ML, Lamberti Y, van der Pol WL, Yantoro O, Rodriguez ME. (2006):** Adanylate cyclase influences filamentous hemagglutinin-mediated attachment of *Bordetella pertussis* to epithelial alveolar cells. *FEMS Immun & Medic Microbiol.* 2006 Oct;48(1):140-7.

- Perraud AL, Kimmel B, Weiss V, Gross R.** (1998): Specificity of the BvgAS and EvgAS phosphorelay is mediated by the C-terminal Hpt domains of the sensor proteins. *Mol Microbiol.* 1998 Mar;27(5):875-87.
- Perraud AL, Weiss V, Gross R.** (1999): Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol.* 1999 Mar;7(3):115-20. Review.
- Perraud AL, Rippe K, Bantscheff M, Glocker M, Lucassen M, Jung K, Sebald W, Weiss V, Gross R.** (2000): Dimerization of signalling modules of the EvgAS and BvgAS phosphorelay systems. *Biochim Biophys Acta.* 2000 May 23;1478(2):341-54.
- Pizza M, Covacci A, Bartoloni A, Perugini M, Nencioni L, De Magistris MT, Villa L, Nucci D, Manetti R, Bugnoli M, et al.** (1989): Mutants of pertussis toxin suitable for vaccine development. *Science.* 1989 Oct 27;246(4929):497-500.
- Porter JF, Parton R, Wardlaw AC.** (1991): Growth and survival of *Bordetella bronchiseptica* in natural waters and in buffered saline without added nutrients. *Appl Environ Microbiol.* 1991 Apr;57(4):1202-6.
- Porter JF, Wardlaw AC.** (1993): Long-term survival of *Bordetella bronchiseptica* in lakewater and in buffered saline without added nutrients. *FEMS Microbiol Lett.* 1993 Jun 1;110(1):33-6.
- Porter, J. F., Connor, K., Donachie, W.** (1994): Isolation and characterization of *Bordetella parapertussis*-like bacteria from ovine lungs. *Microbiology.* 1994. 140:261-266.
- Preston A, Parkhill J, Maskell DJ.** (2004): The *bordetellae*: lessons from genomics. *Nat Rev Microbiol.* 2004 May;2(5):379-90.
- Qureshi MN, Lederman J, Neibart E, Bottone EJ.** (1992): *Bordetella bronchiseptica* recurrent bacteraemia in the setting of a patient with AIDS and indwelling Broviac catheter. *Int J STD AIDS.* 1992 Jul-Aug;3(4):291-3.
- Rambow AA, Fernandez RC, Weiss AA.** (1998): Characterization of BrkA expression in *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun.* 1998 Aug;66(8):3978-80.
- Register KB, Ackermann MR.** (1997): A highly adherent phenotype associated with virulent Bvg⁺-phase swine isolates of *Bordetella bronchiseptica* grown under modulating conditions. *Infect Immun.* 1997 Dec;65(12):5295-300.
- Reizer J, Saier MH Jr.** (1997): Modular multidomain phosphoryl transfer proteins of bacteria. *Curr Opin Struct Biol.* 1997 Jun;7(3):407-15.
- Relman DA, Domenighini M, Tuomanen E, Rappuoli R, Falkow S.** (1989): Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Apr;86(8):2637-41.
- Relman D, Tuomanen E, Falkow S, Golenbock DT, Saukkonen K, Wright SD.** (1990): Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell.* 1990 Jun 29;61(7):1375-82.
- Repik A, Rebbapragada A, Johnson M, Haznedar JO, Zhulin IB, Taylor BL.** (2000): PAS domain residues involved in signal transduction by the Aer redox sensor of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 2000; 36: 806-816.
- Rich P, Fisher N.** (1999): Generic features of quinone-binding sites. *Biochem Soc Trans.* 1999 Aug;27(4):561-5.
- Rickman L, Saldanha JW, Hunt DM, Hoar DN, Colston MJ, Millar JB, Buxton RS.** (2003): A two-component signal transduction system with a PAS domain-containing sensor is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jan 30;314(1):259-67.
- Rippe K, Mucke N, Schulz A.** (1998): Association states of the transcription activator protein NtrC from *E. coli* determined by analytical ultracentrifugation. *J Mol Biol.* 1998;278:915-933.

- Roberts M, Fairweather NF, Leininger E, Pickard D, Hewlett EL, Robinson A, Hayward C, Dougan G, Charles IG.** (1991): Construction and characterization of *Bordetella pertussis* mutants lacking the *vir*-regulate P.69 outer membrane protein. *Mol Microbiol.* 1991; 5: 1393-1404.
- Robinson VL, Buckler DR, Stock AM.** (2000): A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch. *Nat Struct Biol.* 2000; 7: 628-633.
- Roche P, Mouawad L, Perahia D, Samama JP, Kahn D.** (2002): Molecular dynamics of the FixJ receiver domain: movement of the β 4- α 4 loop correlates with the in and out flip of Phe 101. *Protein Sci.* 2002;11:2622-2630.
- Rogel A, Hanski E.** (1992): Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane. *J Biol Chem.* 1992 Nov 5;267(31):22599-605.
- Rosenthal RS, Nogami W, Cookson BT, Goldman WE, Folkening WJ.** (1987): Major fragment of soluble peptidoglycan released from growing *Bordetella pertussis* is tracheal cytotoxin. *Infect Immun.* 1987 Sep;55(9):2117-20.
- Roth JR.** (1974): Frameshift mutations. *Annu Rev Genet.* 1974;8:319-46. Review.
- Rowland SL, Burkholder WF, Cunningham KA, Maciejewski MW, Grossman AD, King GF.** (2004): Structure and mechanism of action of Sda, an inhibitor of the histidine kinases that regulate initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Cell.* 2004 Mar 12;13(5):689-701
- Roy CR, Miller JF, Falkow S.** (1989): The *bvgA* gene of *Bordetella pertussis* encodes a transcriptional activator required for coordinate regulation of several virulence genes. *J Bacteriol.* 1989 Nov;171(11):6338-44.
- Roy CR, Miller JF, Falkow S.** (1990): Autogenous regulation of the *Bordetella pertussis* *bvgABC* operon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 May;87(10):3763-7.
- Roy CR, Falkow S.** (1991): Identification of *Bordetella pertussis* regulatory sequences required for transcriptional activation of the *fhaB* gene and autoregulation of the *bvgAS* operon. *J Bacteriol.* 1991 Apr;173(7):2385-92.
- Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, Crossman LC, Spiro S, He YW, Zhang LH, Heeb S, Camara M, Williams P, Dow JM.** (2006): Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Apr 25;103(17):6712-7.
- Salinas P, Contreras A.** (2003): Identification and analysis of *Escherichia coli* proteins that interact with the histidine kinase NtrB in a yeast two-hybrid system. *Mol Genet Genomics.* 2003 Jul;269(4):574-81.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988 Jan 29;239(4839):487-91.
- Sato Y, Izumiya K, Sato H, Cowell JL, Manclark CR.** (1981): Role of antibody to leukocytosis-promoting factor hemagglutinin and to filamentous hemagglutinin in immunity to pertussis. *Infect Immun.* 1981 Mar;31(3):1223-31.
- Scarlato V, Prugnola A, Arico B, Rappuoli R.** (1990): Positive transcriptional feedback at the *bvg* locus controls expression of virulence factors in *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Dec;87(24):10067.
- Scarlato V, Prugnola A, Arico B, Rappuoli R.** (1991a): The *bvg*-dependent promoters show similar behaviour in different *Bordetella* species and share sequence homologies. *Mol Microbiol.* 1991 Oct;5(10):2493-8.
- Scarlato V, Rappuoli R.** (1991b): Differential response of the *bvg* virulence regulon of *Bordetella pertussis* to MgSO₄ modulation. *J Bacteriol.* 1991 Nov;173(22):7401-4.
- Scarlato V, Arico B, Prugnola A, Rappuoli R.** (1991c): Sequential activation and environment regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* 1991;10:3971-3975.

- Scarlato V, Arico B, Rappuoli R.** (1993): DNA topology affects transcriptional regulation of the pertussis toxin gene of *Bordetella pertussis* in *Escherichia coli* and *in vitro*. *J Bacteriol.* 1993 Aug;175(15):4764-71.
- Schmidt G, Goehring UM, Schirmer J, Lerm M, Aktories K.** (1999): Identification of the C-terminal part of *Bordetella* dermonecrotic toxin as a transglutaminase for rho GTPases. *J Biol Chem.* 1999 Nov 5;274(45):31875-81.
- Schneider B, Stubs D, Gross R.** (2002): Identification and genomic organization of gene loci negatively controlled by the virulence regulatory BvgAS two-component system in *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Genet Genomics.* 2002 Jun;267(4):526-35. Epub 2002 May 29.
- Seifert HS, So M.** (1988): Genetic mechanisms of bacterial antigenic variation. *Microbiol Rev.* 1988 Sep;52(3):327-36. Review.
- Shepard CW, Daneshvar MI, Kaiser RM, Ashford DA, Lonsway D, Patel JB, Morey RE, Jordan JG, Weyant RS, Fischer M.** (2004): *Bordetella holmesii* bacteremia: a newly recognized clinical entity among asplenic patients. *Clin Infect Dis.* 2004 Mar 15;38(6):799-804
- Simonovic M, Volz K.** (2001): A distinct meta-active conformation in the 1.1Å resolution structure of wild-type apoCheY. *J Biol Chem.* 2001; 276:28637-28640.
- Skeeles DW, Arp LH.** (1997): Diseases of poultry (Eds.: Clancik B.W., Barnes HJ, Beard CW, McDougal LR and Saif YM). Iowa State University Press, Ames: 275-288.
- Slater H, Alvarez-Morales A, Barber CE, Daniels MJ, Dow JM.** (2000): A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol.* 2000 Dec;38(5):986-1003.
- Sola M, Gomis-Ruth FX, Serrano L, Gonzalez A, Coll M.** (1999): Three-dimensional crystal structure of the transcription factor PhoB receiver domain. *J Mol Biol.* 1999 Jan 15;285(2):675-87.
- Spears PA, Temple LM, Miyamoto DM, Maskell DJ, Orndorff PE.** (2003): Unexpected similarities between *Bordetella avium* and other pathogenic *Bordetellae*. *Infect Immun.* 2003 May;71(5):2591-7.
- Stefanelli P, Mastrantonio P, Hausman SZ, Giuliano M, Burns DL.** (1997): Molecular characterization of two *Bordetella bronchiseptica* strains isolated from children with coughs. *J Clin Microbiol.* 1997 Jun;35(6):1550-5.
- Steffen P, Goyard S, Ullmann A.** (1996): Phosphorylated BvgA is sufficient for transcriptional activation of virulence-regulated genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* 1996 Jan 2;15(1):102-9.
- Stenson TH, Pepler MS.** (1995): Identification of two bvg-repressed surface proteins of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1995 Oct;63(10):3780-9.
- Stephenson K, Hoch JA.** (2001): PAS-A domain of phosphorelay sensor kinase A: a catalytic ATP-binding domain involved in the initiation of development in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98: 15251-15256.
- Steyn AJ, Joseph J, Bloom BR.** (2003): Interaction of the sensor module of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv KdpD with members of the Lpr family. *Mol Microbiol.* 2003 Feb;47(4):1075-89.
- Stibitz S, Black W, Falkow S.** (1986): The construction of a cloning vector designed for gene replacement in *Bordetella pertussis*. *Gene.* 1986;50(1-3):133-40.
- Stibitz S, Weiss AA, Falkow S.** (1988): Genetic analysis of a region of the *Bordetella pertussis* chromosome encoding filamentous hemagglutinin and the pleiotropic regulatory locus *vir*. *J Bacteriol.* 1988 Jul;170(7):2904-13.
- Stibitz S, Aaronson W, Monack D, Falkow S.** (1989): Phase variation in *Bordetella pertussis* by frameshift mutation in a gene for a novel two-component system. *Nature.* 1989 Mar 16;338(6212):266-9.

- Stibitz S.** (1998): Mutations affecting the alpha subunit of *Bordetella pertussis* RNA polymerase suppress growth inhibition conferred by short C-terminal deletions of the response regulator BvgA. *J Bacteriol.* 1998 May;180(9):2484-92.
- Stibitz S, Yang MS.** (1991): Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the *vir* locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1991 Jul;173(14):4288-96.
- Stibitz S.** (1994): Mutations in the *bvgA* gene of *Bordetella pertussis* that differentially affect regulation of virulence determinants. *J Bacteriol.* 1994 Sep;176(18):5615-21.
- Stibitz S, Yang MS.** (1999): Genomic plasticity in natural populations of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1999 Sep;181(17):5512-5.
- Stock AM, Guhaniyogi J.** (2006): A new perspective on response regulator activation. *J Bacteriol.* 2006 Nov;188(21):7328-7330.
- Stock JB, Stock AM, Mottonen JM.** (1990): Signal transduction in bacteria. *Nature.* 1990 Mar 29;344(6265):395-400. Review.
- Stockbauer KE, Fuchslocher B, Miller JF, Cotter PA.** (2001): Identification and characterization of BipA, a *Bordetella* Bvg-intermediate phase protein. *Mol Microbiol.* 2001 Jan;39(1):65-78.
- Tamura M, Nogimori K, Murai S, Yajima M, Ito K, Katada T, Ui M, Ishii S.** (1982a): Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry.* 1982 Oct 26;21(22):5516-22.
- Tamura M, Nogimori K, Yajima M, Ase K, Ui M.** (1982b): A role of the B-oligomer moiety of islet-activating protein, pertussis toxin, in development of the biological effects on intact cells. *J Biol Chem.* 1983 Jun 10;258(11):6756-61.
- Tanabe H, Masuda T, Yamasaki K, Katoh A, Yoshioka S, Utsumi R.** (1998): Molecular interaction between proteins involved in EvgAS signal transduction of *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998 Jan;62(1):78-82.
- Tang YW, Hopkins MK, Kolbert CP, Hartley PA, Severance PJ, Persing DH.** (1998): *Bordetella holmesii*-like organisms associated with septicemia, endocarditis, and respiratory failure. *Clin Infect Dis.* 1998 Feb;26(2):389-92.
- Taylor BL, Zhulin IB.** (1999): PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999 Jun;63(2):479-506. Review.
- Temple LM, Weiss AA, Walker KE, Barnes HJ, Christensen VL, Miyamoto DM, Shelton CB, Orndorff PE.** (1998): *Bordetella avium* virulence measured *in vivo* and *in vitro*. *Infect Immun.* 1998 Nov;66(11):5244-51.
- Toro-Roman A, Mack TR, Stock AM.** (2005): Structural analysis and solution studies of the activated regulatory domain of the response regulator ArcA: A symmetric dimer mediated by the $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$ face. *J Mol Biol.* 2005; 349:11-26.
- Trach KA, Hoch JA.** (1993): Multisensory activation of the phosphorelay initiating sporulation in *Bacillus subtilis*: identification and sequence of the protein kinase of the alternate pathway. *Mol Microbiol.* 1993; 8: 69-79.
- Tran VK, Oropeza R, Kenney LJ.** (2000): A single amino acid substitution in the C terminus of OmpR alters DNA recognition and phosphorylation. *J Mol Biol.* 2000 Jun 23;299(5):1257-70.
- Traven A, Jelcic B, Sopta M.** (2006): Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited. *EMBO Rep.* 2006 May;7(5):496-9.
- Tuomanen E, Weiss A.** (1985): Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory-epithelial cells. *J Infect Dis.* 1985 Jul;152(1):118-25.

- Tuomanen E.** (1986): Piracy of adhesins: attachment of superinfecting pathogens to respiratory cilia by secreted adhesins of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1986 Dec;54(3):905-8.
- Tuomanen E, Towbin H, Rosenfelder G, Braun D, Larson G, Hansson GC, Hill R.** (1988): Receptor analogs and monoclonal antibodies that inhibit adherence of *Bordetella pertussis* to human ciliated respiratory epithelial cells. *J Exp Med.* 1988 Jul 1;168(1):267-77.
- Uhl MA, Miller JF.** (1994): Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Feb 1;91(3):1163-7.
- Uhl MA, Miller JF.** (1995): BvgAS is sufficient for activation of the *Bordetella pertussis* *ptx* locus in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1995 Nov;177(22):6477-85.
- Uhl MA, Miller JF.** (1996a): Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J.* 1996 Mar 1;15(5):1028-36.
- Uhl MA, Miller JF.** (1996b): Central role of the BvgS receiver as a phosphorylated intermediate in a complex two-component phosphorelay. *J Biol Chem.* 1996 Dec 27;271(52):33176-80.
- Uden G, Bongaerts J.** (1997): Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta.* 1997 Jul 4;1320(3):217-34.
- Urisu A, Cowell JL, Manclark CR.** (1986): Filamentous hemagglutinin has a major role in mediating adherence of *Bordetella pertussis* to human WiDr cells. *Infect Immun.* 1986 Jun;52(3):695-701.
- Vandamme P, Hommez J, Vancanneyt M, Monsieurs M, Hoste B, Cookson B, Wirsing von König CH, Kewrster K, Blackall PJ.** (1995): *Bordetella hinzii*, sp. nov., isolated from poultry and humans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:37-45.
- Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J.** (1996a): Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.* 1996 Jun;60(2):407-38. Review.
- Vandamme P, Heyndrickx M, Vancanneyt M, Hoste B, De Vos P, Falsen E, Kersters K, Hinz KH.** (1996b): *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1983. *Int J Syst Bacteriol.* 1996 Oct;46(4):849-58.
- van den Akker WM.** (1998): Lipopolysaccharide expression within the genus *Bordetella*: influence of temperature and phase variation. *Microbiology.* 1998 Jun;144 (Pt 6):1527-35.
- van der Zee A, Groenendijk H, Peeters M, Mooi FR.** (1996): The differentiation of *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* from humans and animals as determined by DNA polymorphism mediated by two different insertion sequence elements suggests their phylogenetic relationship. *Int J Syst Bacteriol.* 1996 Jul;46(3):640-7.
- van der Zee A, Mooi F, Van Embden J, Musser J.** (1997): Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella* spp.: phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences. *J Bacteriol.* 1997 Nov;179(21):6609-17.
- van Loo IH, Heuvelman KJ, King AJ, Mooi FR.** (2002): Multilocus sequence typing of *Bordetella pertussis* based on surface protein genes. *J Clin Microbiol.* 2002 Jun;40(6):1994-2001.
- van't Wout J, Burnette WN, Mar VL, Rozdzinski E, Wright SD, Tuomanen EI.** (1992): Role of carbohydrate recognition domains of pertussis toxin in adherence of *Bordetella pertussis* to human macrophages. *Infect Immun.* 1992 Aug;60(8):3303-8.
- Volkman BF, Lipson D, Wemmer DE, Kern D.** (2001): Two-state allosteric behavior in a single domain signaling protein. *Science.* 2001; 291: 2429-2433.
- Volz K.** (1993): Structural conservation in the CheY superfamily. *Biochemistry.* 1993; 32:11742-11753.

- von Wintzingerode F, Schattke A, Siddiqui RA, Rosick U, Gobel UB, Gross R.** (2001): *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001 Jul;51(Pt 4):1257-65.
- von Wintzingerode F, Gerlach G, Schneider B, Gross R.** (2002): Phylogenetic relationships and virulence evolution in the genus *Bordetella*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2002;264(1):177-99. Review.
- Walthers D, Tran VK, Kenney LJ.** (2003): Interdomain linkers of homologous response regulators determine their mechanism of action. *J Bacteriol.* 2003 Jan;185(1):317-324.
- Webber CA, Kadner RJ.** (1995): Action of receiver and activator modules of UhpA in transcriptional control of the *Escherichia coli* sugar phosphate transport system. *Mol Microbiol.* 1995 Mar;15(5):883-93.
- Weingart CL, Weiss A A.** (2000): *Bordetella pertussis* virulence factors affect phagocytosis by human neutrophils. *Infect. Immun.* 2000; 68: 1735-1739.
- Weiss AA, Falkow S.** (1983): Tn5-induced mutations affecting virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1983; 42: 33-41.
- Weiss AA, Falkow S.** (1984): Genetic analysis of phase change in *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1984 Jan;43(1):263-9.
- Weiss AA, Hewlett EL, Myers GA, Falkow S.** (1984): Pertussis toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis.* 1984 Aug;150(2):219-22.
- Weiss AA, Goodwin MS.** (1989): Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model. *Infect Immun.* 1989 Dec;57(12):3757-64.
- Weiss AA.** (1997): Mucosal immune defenses and the response of *Bordetella pertussis*. *ASM News.* 1997; 63: 22-28.
- Weiss V, Claverie-Martin F, Magasanik B.** (1992): Phosphorylation of nitrogen regulator I of *Escherichia coli* induces strong cooperative binding to DNA essential for activation of transcription. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:5088-5092.
- Weitkamp JH, Tang YW, Haas DW, Midha NK, Crowe JE Jr.** (2000): Recurrent *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia associated with persistent lymph node infection in a patient with hyper-immunoglobulin M syndrome. *Clin Infect Dis.* 2000 Nov;31(5):1183-7. Epub 2000 Nov 06.
- West AH, Stock AM.** (2001): Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci.* 2001 Jun;26(6):369-76.
- Weyant RS, Hollis DG, Weaver RE, Amin MF, Steigerwalt AG, O'Connor SP, Whitney AM, Daneshvar MI, Moss CW, Brenner DJ.** (1995): *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J Clin Microbiol.* 1995 Jan;33(1):1-7.
- WHO** (2005): Estimated deaths occurring and prevented by immunization for selected diseases, 2005. Official Web site of the World Health Organization. URL: www.who.org.
- Willems RJ, Geuijen C, van der Heide HG, Renauld G, Bertin P, van den Akker WM, Locht C, Mooi FR.** (1994): Mutational analysis of the *Bordetella pertussis* *fim/fha* gene cluster: identification of a gene with sequence similarities to haemolysin accessory genes involved in export of FHA. *Mol Microbiol.* 1994 Jan;11(2):337-47.
- Williams SB, Stewart V.** (1999): Functional similarities among two-component sensors and methyl-accepting chemotaxis proteins suggest a role for linker region amphiphatic helices in transmembrane signal transduction. *Mol Microbiol.* 1999; 33: 1093-1102.
- Williams CL, Boucher PE, Stibitz S, Cotter PA.** (2005): BvgA functions as both an activator and a repressor to control Bvg phase expression of *bipA* in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol.* 2005 Apr;56(1):175-88.

- Wood GE, Friedman RL.** (2000): The Bvg accessory factor (Baf) enhances pertussis toxin expression in *Escherichia coli* and is essential for *Bordetella pertussis* viability. *FEMS Microbiol Lett.* 2000 Dec 1;193(1):25-30.
- Woolfrey BF, Moody JA.** (1991): Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin Microbiol Rev.* 1991 Jul;4(3):243-55. Review.
- Wootton JC, Drummond MH.** (1989): The Q-linker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory proteins. *Protein Eng.* 1989 May;2(7):535-43.
- Wright JS 3rd, Kadner RJ.** (2001): The phosphoryl transfer domain of UhpB interacts with the response regulator UhpA. *J Bacteriol.* 2001 May;183(10):3149-59.
- Wu LF, Tomich JM, Saier MH Jr.** (1990): Structure and evolution of a multidomain multiphosphoryl transfer protein. Nucleotide sequence of the fruB(HI) gene in *Rhodobacter capsulatus* and comparisons with homologous genes from other organisms. *J Mol Biol.* 1990 Jun 20;213(4):687-703.
- Yabuuchi E, Kawamura Y, Kosako Y, Ezaki T.** (1998): Emendation of genus *Achromobacter* and *Achromobacter xylosoxidans* (Yabuuchi and Yano) and proposal of *Achromobacter ruhlandii* (Packer and Vishniac) comb. nov., *Achromobacter piechaudii* (Kiredjian *et al.*) comb. nov., and *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* (Ruger and Tan) comb. nov. *Microbiol Immunol.* 1998;42(6):429-38.
- Yaku H, Kato M, Hakoshima T, Tsuzuki M, Mizuno T.** (1997): Interaction between the CheY response regulator and the histidine-containing phosphotransfer (HPt) domain of the ArcB sensory kinase in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 1997 May 26;408(3):337-40.
- Yhi WK, Silva EA, Ida J, Harrington N, Lett SM, George H.** (1999): *Bordetella holmesii*-like organisms isolated from Massachusetts patients with pertussis-like symptoms. *Emerg Infect Dis.* 1999 May-Jun;5(3):441-3.
- Yuk MH, Heininger U, Martinez de Tejada G, Miller JF.** (1998a): Human but not ovine isolates of *Bordetella parapertussis* are highly clonal as determined by PCR-based RAPD fingerprinting. *Infection.* 1998 Sep-Oct;26(5):270-3.
- Yuk MH, Harvill ET, Miller JF.** (1998b): The BvgAS virulence control system regulates type III secretion in *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Microbiol.* 1998 Jun;28(5):945-59.
- Yuk MH, Harvill ET, Cotter PA, Miller JF.** (2000): Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF-kappaB activation by the *Bordetella* type III secretion system. *Mol Microbiol.* 2000 Mar;35(5):991-1004.
- Zhang JH, Xiao G, Gunsalus RP, Hubbell WL.** (2003): Phosphorylation triggers domain separation in the DNA binding response regulator NarL. *Biochemistry.* 2003; 42:2552-2559.
- Zu T, Manetti R, Rappuoli R, Scarlato V.** (1996): Differential binding of BvgA to two classes of virulence genes of *Bordetella pertussis* directs promoter selectivity by RNA polymerase. *Mol Microbiol.* 1996 Aug;21(3):557-65.

H Anhang

1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ-	Mikro-
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
A	Adenin
A.	<i>Achromobacter</i>
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ADP	Adenosindiphosphat
Amp.	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
Asp	Aspartat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
A _x	Absorption bei einer Wellenlänge von x nm
B.	<i>Bordetella</i>
bp	Basenpaar(e)
BG	Bordet-Gengou
BH	<i>Bordetella holmesii</i>
BHI	Brain heart infusion
BP	<i>Bordetella pertussis</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
Cm	Chloramphenicol
Cm ^R	Chloramphenicolresistent
cm	Zentimeter
cpm	“counts per minute”
C-terminal	Carboxyterminal
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
ddH ₂ O	doppelt destiliertes Wasser, Millipore
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylmenadion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol

DTTP	2`-Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
EtOH	Ethanol
FAD	Flavinadenindinukleotid
FP	French Press
G	Guanin
g	Gramm
GC-Gehalt	Guanin/Cytosin-Gehalt
h	Stunde
His	Histidin
HPLC	“High performance liquid chromatography”
HTH	Helix-turn-helix-Motiv
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
k	Kilo-
Kan	Kanamycin
Kan ^R	Kanamycinresistent
kbp	kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
KOAc	Kaliumacetat
l	Liter
Lac	Lactose
LB	Luria-Bertani-Medium
Lsg.	Lösung
m	Milli-
M	Molar
mA	Milliampere
max.	maximal
mg	Miligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
mind.	Mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
n-	Nano-
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADH	reduziertes NAD
Nal	Nalidixinsäure
Nal ^R	Nalidixinsäureresistent
NaOAc	Natriumacetat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NTA	Nitrilotriacetic acid
N-terminal	Aminoterminal
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
P	Phosphat
p	Piko-
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotid-Kinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Ubichinon
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	“rounds per minute”
RT	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdedocylsulfat
sek	Sekunde(n)
SS	Steiner-Scholte
T	Thymin
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-Borat-Saline
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Temp	Temperatur
Tet	Tetracyclin
Tet ^R	Tetracyclinresistent
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	“unit”; Einheit
u.a.	unter anderem
ÜNK	Übernachtkultur
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
W	Watt
w/v	„weight per volume“
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

2 Lebenslauf

zur Person

Name	Aleksandra Horvat
Geboren am	06. März 1977
Geburtsort	Würzburg
Wohnhaft in	Scheffelstraße 3a 97072 Würzburg
Familienstand	nicht verheiratet
Nationalität	kroatisch

Schulbildung

1983-1987	Grundschule Carl-Orff, Würzburg
1987-1996	Mozart-Gymnasium Würzburg Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife

Studium

WS 1996-WS 2003	Studium der Biologie an der Julius-Maximilians Universität Würzburg Vordiplom (März 2000) Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Biochemie, Humangenetik Diplom (Dez. 2002) Thema der Diplomarbeit: „Molekulare Charakterisierung der PAS-Signaldomäne des BvgS- Sensorproteins von <i>Bordetella pertussis</i> “
-----------------	--

Promotion

ab WS 2003	Doktorarbeit an der Julius-Maximilians Universität Würzburg; am Lehrstuhl für Mikrobiologie von Prof. Dr. W. Goebel Betreuer der Doktorarbeit: Prof. Dr. R. Gross
------------	--

3 Publikationsliste

Originalarbeit:

Horvat A, Gross R. (2006): Comparative characterization of the BvgA response regulator of *Bordetella holmesii*. Microbiol. Res. Accepted.

Posterpräsentationen

Horvat A, Gross R.

Structural characterization of the hybrid Response Regulator protein BvgA_{fus}. Symposium of gene regulation, Blaubeuren (2005)

Horvat A, Gross R.

Comparative characterization of the BvgA response regulators of *Bordetella pertussis* and *B. holmesii*. VAAM Tagung, Jena (2006)

4. DNA- und Proteinsequenzen

Abbildung 48: DNA- Sequenz von BvgS aus *B. bronchiseptica* RB 50.

```

1  gaattcagaa ttttcctatt ttggtgtagg atactgttta gcagtactca
51  tgcccgtatc gtcgcttgct gacgtatagg agaatgtgaa atttcgcagc
101 cattcctttg acgcatcaat gcattatgcg ttgcaggatt tttttctcgc
151 cacgaaactt aaagcatatt cttcttatca tgtacaacaa agtcctcatc
201 attgacgatc accctgtact gagattcgcc gtccgggtcc tgatggaaaa
251 ggaaggattc gaagtcacgc gcgaaaccga taacggtatc gacgggctca
301 agatcgcccg cgagaaaatt cccaacctcg tcgtactcga catcggcatt
351 cccaagctgg acgggctgga agtcatcgcc cggctgcaat cgctggggtt
401 gccgctgcmc gttctggtgc tgaccggcca gccgccttcg ctgttcgccc
451 gccgctgcct gaactccggc gccgcaggct tcgtgtgcaa acacgagaac
501 ctgcacgagg tcatcaatgc cgccaaggcg gtgatggccg gctacaccta
551 cttccccagc accacgctca gcgagatgcg catggggcgac aacgccaaga
601 gcgacagtac gctcatcagc gtggtgtcca accgcgaact gaccgtccta
651 caactgctgg cgcaaggcat gtccaacaag gacatcgccg acagcatgtt
701 cctcagcaac aagaccgtca gcacctaaa gacgcgcctg ctgcagaagc
751 tgaacgccac gtcgctggtg gaactgatag acctcgccaa acgcaacaat
801 ctgccttagc gccgcgcagc cccgccccgc accgcctgta cccccgcagt
851 ctgatctgcc tggctcaggc gctattggca tgggctttgc tggcatgggc
901 gccgcgcagc gcaagccagg agctgaccct ggtcggcaag gctgccgttc
951 ccgacgtcga gatcacgctc gacggcgacg actggcgctg gctggcgcmc
1001 aagcgggtgc tgacgctggg cgtgtacgcm ccggacattc ccccgttcga
1051 cgtcacctat gacgagcgtc acgaaggcct gacggccgac tacatggcga
1101 tcatcgcgca caacctgggc gtccaggcaa aagtgctgcm ctaccccagc
1151 cgcgagcaag ccgtcggcmc actggaaagc ggacagatcm acctcatcgm
1201 caccgtcaat ggcacgagg gccggctgca gagcctgcmc ctgagtgctc
1251 cctacgcggc cgaccaccgc gtgctggtca tgcccacgcm cgcgcgcccgc
1301 gctccgcccg cggacctggc aggccagcgm ttggcggctg acgccaacta
1351 cttgcccagg gaaacgctgc agcaggccta tccccaggca acgctgcatt

```

1401 acttcccatc atccgaacag gcgctggccg cggcggccta tggacaagcc
1451 gacgtgttca tcggcgatgc gctgaccacc tcgcacctcg tttcgaaaag
1501 ctacttcaac gacgttcgcg tcgctgcccc ggcccagatc gtgacgggcg
1551 gggaatcctt cggcgtgcmc gccgacaata cccgcctgct gcgggtggtc
1601 aatgccgtgc tcgaagccat tccggcctcc gagcgcgcga gcctgatcta
1651 ccgctggggc ctgggcagca gcatttcgct cgatttcgcg cgccccgcct
1701 attcagcgcg cgagcagcag tggatggcaa accatccggt cgtcaagggtg
1751 gcggctctga acctgttcgc gcccttcacc ctgtttcgca ccgatgaaca
1801 gttcggcggc atcagtgccg ccgtgctgca actgctgcag ttgcmcaccg
1851 gcctggattt ccagatcatc ggcgtcgcga cggcgcagga gctgatcgcc
1901 aagctgcgct cgggcgaagc cgacatggcc ggcgcctgt tcgtcaatgc
1951 cgcgcgggaa tccgtcctca gcttcagccg gccgtatgtg cgcaatggtc
2001 tggatgatcgt cacgcgccag gaccccgcgc cggccgcga cgccgatcac
2051 ctcgacggcc gcacgattgc gatggtgcmc aacagcgcgc ccatcccgcct
2101 cctgcagcag cgctatcccc aggcgaaggt cgtgaccgcc gacaaccgca
2151 ccgaagccat gctgctggtg gccgatggcc aggcgcagcgc cgtcgtgcag
2201 acgcagatca gcgccagcta ctacgtcaac cgctacttcg ccggaaaact
2251 gcgcattgcc tcggcgtggt acctgccgcg gcccgagatc gcgctggcga
2301 cggcgcgcgc ccagaccgag ctgatatcca tcctgaacaa ggcgctctac
2351 agcatttcga acgacgaact cgctccatc gtcagccgct ggcgcggcag
2401 cgacggcgat ccgcgcacct ggtacgccta ccgcaacgaa atctacctgc
2451 tgatcgggct gggcctggtg tcggccctgc tgttcctgag ctggatcgtc
2501 tacctgcggc gccagatccg ccagcgcgaag cgggcccagc gggcgtgaa
2551 cgaccagctg gaattcatgc gcgtgctcat cgacggcacg cccaacccca
2601 tctatgtgcg cgataaggaa ggcgcgatgc tgttggtgcaa tgacgcctac
2651 ctcgacacct ttggcgtgac tgccgatgcg gtactgggca agaccatccc
2701 ggaggccaac gtggtgggcg acccggcgcct ggctcgcgag atgcacgagt
2751 tcctgctcac gcgcattggc gccgagcgcg agccgcgctt cgaggaccgc
2801 gatgtcacgc tgcacggccg caccgcctat gtctaccagt ggacggttcc
2851 gtacggcgac tcgctgggcg aactcaaggc catcatcggc ggctggatcg
2901 acattaccga acgcgcgcgag ctgctgcgcg agctgcacga cgccaaggaa

2951 agcgccgacg ccgccaaccg ggccaagacc acgttcctgg caacgatgag
3001 ccacgagatc cgcacgcca tgaacgcgat catcgccatg ctggagctgg
3051 cgctgctccg tccggccgac caggagccgg accgccagtc catccaggtc
3101 gcgtacgact cggcccgcag cctgctggag ctgataggcg acatcctgga
3151 cattgcgaag atcgaggcgg gaaaattcga cctggcgccg gtgcgcacgg
3201 cgctgcgcg cctgcccga ggggcgatcc gcgtcttcga cgggttgccg
3251 cgccagaaaag gcatagagct ggtattgaag accgacatcg tggcgctgga
3301 cgatgtattg atagaccct tgcgcatgaa gcaagtgtc tcgaacctg
3351 tgggcaacgc catcaagttc accaccgaag gccaggttg cttaccgta
3401 accgcgcgcc ccgacggcga ggccgcgcac gtgcagttca gcgtgagcga
3451 caccggctgc ggcacagcg aggccgacca acggcagctg ttcaaaccgt
3501 tctcgcaggt gggcggcagc gccgaggccg ggccggcgcc gggcactggc
3551 ctgggcctgt ccatcagccg ccgcctcgtc gaattgatgg ggggaacgct
3601 ggtcatgcbc agcgcgccag ggggtggcac aacggtttcg gtggacctga
3651 ggctgaccat ggtcgaaaaa tccgcgcagg ccacgccgcc cgctgcggcc
3701 gctcaggcca cgccatccaa gccgcaggta tcgctgcgcg tgctggtcgt
3751 cgatgaccac aagcccaacc tgatgctgct gcgccagcag ctggactacc
3801 tgggcccagc tgctcgtccc gccgactccg gcgaagcctc cctggccctg
3851 tggcacgagc atgcgttcga cgtcgtgatc accgattgca acatgcccgg
3901 tatcaacggc tacgaattgg cgcgccgat acgcgccgcc gaggccgcgc
3951 ccggttacgg acgtacgcgg tgcattctgt tcggcttcac ggcttcggcg
4001 cagatggacg aagcgcacgc ctgccgcgcc gccggcatgg acgactgcct
4051 gttcaagccg atcggcgtgg acgccttgcg gcaacgcttg aacgaagccg
4101 cggcacgggc cgcgctcccc acgccccctc cgccccaggc tgccgcgcgc
4151 gccacgcacg acgccacccc ggcggcgctc tcggccgagt cgattcttgc
4201 cctgacgcag aacgatgagg cgtgatccg gcaattgtc gaagaagtga
4251 ttcgcaccaa ccgggcggac gtcgaccaat tgcaaaagct gcaccagcag
4301 gccgattggc cgaaggctc ggacatggcg cacaggctgg ccggcggcgc
4351 gcgcgtggtc gatgccaaagg ccatgataga cactgcgctg gcgctggaga
4401 aaaaagcgc aaggccaggc ggcccctcgc ccgaaatcga cggcatggta
4451 cgtacgcttg cggcgcagtc cgcgcgcgtg gagacgcaac tacgcgcctg
4501 gctggagcaa cggccgcac aaggccagcc ctga

Abbildung 49: DNA-Sequenz von BB1905 (NP 888450).

1 atggccccca accatttccg cctcgcatcc cttgtcgttc cgtccagccg
51 gacgacgctc gccgcgctgt gctgctcgc aggcgtggcc gtcggcgcg
101 aagccgccac gagccgcgcg gatgtcgcgc tcgccgcaag ccgcgctcga
151 accgccggcg cagacagcgt gcacgatttc gacatcgccg ccgggccggt
201 ggatcaggcg cttgcggcct tcgccagcca gtccggcttg cgctggcga
251 tcgacgccac gctcaccgcg ggcttgagcg cgcccgcgct gcgaggccgc
301 catacggcac gcaccggctt gcggcgttta ctggccagca gtcacctca
351 ggcagtggtc cacgatgatg gcagccttgt cctgcgcccgc gatccgacat
401 tgcccacggt cgagttatcg ccggttcgtg tcctatcgga ccctgtccga
451 gatgtctacc tggcgccgcg ctcgtccgtc tatgtgtcgg cggtcgacat
501 cgctcgcttc ggcgtggtgt cgccggccga tctgctcaag ggccttccgg
551 gcgtgcaaac gggcgatagc cgcaatggcg gcggcctgga cgtcaacatc
601 cgccgcatac aagggcaaag ccgggtcgcg gtcaaggctc atggggcgga
651 gcaggcgctg gacgtctatc ggggtatgc cggcaccag cagcgcagct
701 acatcgatcc ggatcttgtc agcgatatcg tgatcgaaa ggggcccagc
751 ctgcgccccg ccgcggccgg cgcgattggc ggcacggtac ggatgcggac
801 cattggcgctg caggacatcc tgccgcgatg ccagagcgtg ggtctgcgcg
851 tgacgggcag cctgtggaac aacggcgat cgcccgaag ccgcgatcct
901 caccgcgccc accgcccga ggacgcccag ctgcggcgc cgccgcgat
951 ccagcgccgc aatctgttcg gctccgacgc ccaggccggc agcgtcgcgt
1001 tcgcctacag cgatgcgacg ttcgatgtcg tcgccgccta tgccgcggc
1051 tcccagggca actatttcac cggacggcac gggcatgata gctatcgtgt
1101 cttcgagggc aatgccgaac gcgccagcgt cgccaccgca taccggccgg
1151 gcgaggaagt gctgaatgct tccgcgcgga ccgaaagcgt gctgctcaag
1201 ggcgccttgc gcccgccga cggccactcc gtcgagttgg gctatcgccg
1251 cctggacggc agatacggtg aatcatgcc ctccgacata ttccgctacg
1301 ggaccgccgg catctggcaa tatccgctgg gcacggctct ggtcgacacc
1351 acgacggcgc gctatcgcta taccocgtcc ggcacggacc tggtcgacgc
1401 taccgtgaat ctgtggacga cccatgcgaa gaccgcccag ctcaataccg

1451 tgatcgcgcc ggcctcggag ttctatcgcg atgaccggaa ttgggtcagg
1501 gtcgccaacc ggcgcatcgg cggcgatttc ggcaatacgg ctcgctgtc
1551 gagcgcgat ggcgaattcc ggttggagct gggcggcgca ttccagtacg
1601 aggacatcgg gcctcaacgc ggcgtgcgga tcacgcagca tgaccgcaac
1651 ggcaatcgct acctgcgcga tgccgcgcgc cgcgagctcg gtctcaacgc
1701 aaagctgacc taccagccga ccgagcgggt cactgcatgg gcgggctcc
1751 gctacgcgcy gatgcytcac cgcgaccaca attcccatgc cacgcccgcy
1801 caggcgcaac gcttgatgcy ccgcatcgtc atcaccaatc ccgatgacga
1851 tggcatcatg tcctatggct acatggactg gtttcccgc acaaacgggc
1901 agttcacgga cgcacggat cccgcctgc acaacggcat cgtatacagg
1951 gacgcggagc tgccgtccga aggaattgcc ttcgacgact ttctcgtcaa
2001 tgcccggacc aacgtccgcy tgaccgatgc ctccgtccgg gacacgggtga
2051 tcggctacga tttttccccg ccacggatca accgcgacca gggcctggcg
2101 cccgcgcttg gcgtcgatta cgaaatcgcy cctgacatgc acgtctatgc
2151 ttcgtatacc caggggctgc gcatgccgtc gctgttcgag accagcctgg
2201 gcgtattgca gaccacgcct ggcgcggcc tgaggcctga gcgcgcgcac
2251 agttgggagg cgggcatcgg agcgatgcgg gacggtctgc tgcaggccgg
2301 agattcggcc gcctacaagc tggcgtactt ccgcaacgc acctcgaact
2351 acatcacccg ctattaccgc cccggcgcca atggccttat gacgttcagc
2401 aatgccgagc gctatcgcgt ccatggcctc gaattgcaga cccgctacga
2451 tgtcggccgc tacttcgccc acctgtccgc gacgtactac ctgaaaaccg
2501 aaacctgcga cccgccttc gccgcgcagt tgcgcgcgag cgcggcagg
2551 ggccgttcca cgcaggacac gccggactgc acgccaggca gtttcatggg
2601 gtcatatgcc aatacgcaga accccccag gctggccgtc aacgtgacgg
2651 cgggctgcy attgctcagc caggccctga cgtggggcgc gcgcatgacg
2701 cacacctcgg ggcccaccgc gagggccgat cgtccgtggc agcagggcgc
2751 gacgacggcy caattgctct accatccggt cacggtctac gacctgttc
2801 tcgcytatcy cgtgcacaag cgcgcggcgc tgaacatttc gctccagaac
2851 ctgaccgate gctattatct ggaccgcgtg gcacagagct acatgcccgc
2901 gccggggcgt acgctgcgcy tggggctgca ggcgtggttc tga

Abbildung 50: Proteinsequenz von BB1905 (NP 888450).

1 mapnhfrlas lvvpssrttl aalcllagva vgaqaatsra dvalaasarar
 51 tagadsvhdf diaagpldqa laafasqsgl rlaidatltr glsapalrgr
 101 htartglrrl lasshlqavv hddgslvlrr dptlptfels pvrvlsdpvr
 151 dvy laprsvv yvsavdiarf gvvspadllk glpgvqtgds rngggldvni
 201 rgiqqqsrrva kvvdgaeqal dvyrqyagtq qrsyidpdlv sdividkgps
 251 lapaaagaig gtvrmrtigv qdilrdgqsv glrvtgslnw ngvspasrdp
 301 hprhppedae laapprtqrg nlfgsdaqag svafaysdat fdvvaayarr
 351 sqgnyftgrh ghdryrvfeg naerasvata yrpgeevlna sartesvllk
 401 galrpadghs velgyrrldg rygeimpsdi frygtagiwq yplgtvlvdt
 451 ttaryrytps gtdlvdatvn lwttyaktrq lntviapase fyrddrnwvr
 501 vanrriaggdf gntarlssay gefrlelqga fqyedigpqr gvritqhdrn
 551 gnrylrdaar relglnaklt yqpterftaw agvryarmrh rdhnshatpr
 601 qaqlmrriv itnpdddgim sygyndwfpd angqftdatd prlhngtvyr
 651 daelpsegia fddflvnart nrvvtasvr dtvigydfsp prinrdqgla
 701 palgvdyeia pdmhvyasyt qglrmpslfe tslgvlqttp gaglrperah
 751 sweagigamr ddllqagdsa ayklayfrnd irnyitryyr pganglmtfs
 801 naeryrvhgl elqtrydvgr yfadlsatyy lktgtcdpaf aaqlrasagr
 851 grstqdtcdc tpgsfmgsya ntqnprrlav nvtaglrls qaltlgarmt
 901 htsgptarad rpwqqgatta qllyhpltv ydlflayrvhk rvalnislqn
 951 ltdryyldpl aqsympapgr tlrvgqawf

Abbildung 51: DNA-Sequenz von BB0602 (NP 887152).

1 atggcctctg agaatacctt gacggcgcc aagctgtcgg tcagctacgg
 51 aaccgttccc gccatcatcg acgtggacct ggaggtcaag ggcggcagca
 101 tcgtcagcct gatcggcgcc aatggcgccg gcaagtcgac gctgatcaag
 151 gccattaccg ggctgggtcaa ggtggccggg ggcgagatcc actatggcgg
 201 caagccgctt gcccaaccgag aaccaacgt cattctcggg cacggcgctc
 251 cgctgggtgcc cgaaggccgg cgctgttcg gcagcatgac ggtgcccag
 301 aacctcgaga tgggcgccta ccggatcgac gacgcgcgca ggagggccga
 351 gctgctggcg acctgcctgc attatttccc cgacctcgag gccaaagctgc

401 ccagcccggc gaacgcgctg tccggcggac agcagcaaat ggtggccgtc
 451 gcccgcgcgc tgatgagcgc gccagcatg ctgctgctgg acgagcccac
 501 gatcggcctt gcgccggcct tcgtcaatgt catcagcaaa gtggtgcgcg
 551 acatcaacca gcagggcgctg agcgtattgc tggaggagca gaacgccgag
 601 gtcgcgctgc gcgtgagcga ctacagctat gtgctggaat cggggacggt
 651 cgtcaagcac ggccccgccg aggtgttctt caacgaccgc gatatcaaga
 701 aggcgtatct gggcctttga

Abbildung 52: Proteinsequenz von BB0602 (NP 887152).

1 masentltvr klsvsygtvp aaidvdlevk ggsivsliga ngagkstlik
 51 aitglkvvag geihyggkpl anrepnvilg hgvalvpegr rlfgsmtvre
 101 nlemgayrid darrraella tclhyfpdle aklpspanal sggqqmnav
 151 aralmsapsm llldeptigl apafvnvisk vvrdingggv svllveqnae
 201 valrvsdysy vlesgtvvhk gpaevflndp dikkaylgl

Abbildung 53: DNA-Sequenz von BB2599 (NP 889136).

1 gtgaccggct tcgatttcgt cgtcctgacg atcctggccg tgcggccgct
 51 gctggggctg gtgcgaggac tgctcaagga aattctgtcg ctgcttgctt
 101 atctgctggc gttcgtcgcg gcgatctggt gggggcccac ggtctatgtc
 151 tggcttgaac cgtatatcga aaccgcgctg ctgcgcatgg gcatcgccta
 201 tgccgtggtg ttcacatcgc tgctgctggc cgtcggcctg gtcaacatga
 251 cgctcgccgc cctgatccgc accaccggcc tgacgccggc cgaccatggc
 301 ctgggcgcca tgttcggcct ggcgcgaggc ctggtgctgg tgctggtgct
 351 ggtggcgctg gcgggtttca cgccttgcc gcaggaagac tggggcgcg
 401 acgccatggt ctgcactcgc gccaccgagg ccgtccggca ggtcaagtcc
 451 tggctgcccgc cctcgtggc gacgtggctg ccttactga

Abbildung 54: Proteinsequenz von BB2599 (NP 889136).

1 mtgfdfvvlt ilavsavlgf vrgllkeils llayllafva aiwwgptvyv
 51 wlepyietal lrmgiayavv fiiivllavgl vnmtlaalir ttgltpadhg
 101 lgamfglarg lvlvlvlval agftplpqed wwrdfamfshs ateavrqvks
 151 wlppslatwl py

Abbildung 55: DNA-Sequenz von BB4594 (NP 891127)

1 atggcaaatc ccccgagcaa cggccgcacg cgcaccgtcc atcccctgtc
 51 ggagacgccg cgccgcgccc agatcctgaa gaagctgcac agccgccccca
 101 ccgtgcgcgg ttcggtcata gcgctgctgg cgctggtggc gctgatcctg
 151 ctggcgccgt acttcgcgcc gcagaatccc tacgacctcg ccagcctgaa
 201 cctgctcgac ggccgcctgc cgccgcgctc gccaccatg gacggcggct
 251 tctactggct gggcaccgac gaccaggggc gcgatatggt cagcgccatt
 301 ctgtacgggt tgcgcatcag cctgctggtg ggctgaccg cggtggtgct
 351 ggccaccgcc atcggcagcc tggtagggcct gctggccgcc tatgccggcg
 401 gcgtgatcga cgccgtcctg atgcgcatcg tcgatttcat cctcggtttt
 451 cccaccatcc tggtaggcgct ggtgctgctg gccatgatgg gccgcggcgt
 501 ggacaagggt atcctggcgc tggtaggtggt gcaatgggcg cactatgcgc
 551 gcatcatgcg cggccgcgcc ttgcaggagc gccgcaagga atatgtcgag
 601 gcggccgcca acctgggctt tcccgcctgg cgcacatgc tgttccactt
 651 gctgcccatt tgcattggcg cggtcatggt gtttgccacc atccagatcg
 701 ccaacgccat cgtgctggaa gccacgctgt cgttcctggg cgtgggcgtg
 751 ccggtcaccg agccttcgct gggcctgctc atcgccaatg gcttccagta
 801 cctgctgtcg ggcgactact ggatcaacct gttccccggc ctggcgctgc
 851 tgctgcttat cctctccatc aacatcgtgg gcgatcgctt ccgagaaaagc
 901 ctggaccgcg gacgagcatg a

Abbildung 56: Proteinsequenz von BB4594 (NP 891127).

1 MANPPSNGRT RTVHPLSETP RRAQILKKLH SRPTVRGSVI ALLLALVALIL
 51 LAPYFAPQNP YDLASLNLLD GRLPPRSPTM DGGFYWLGTD DQGRDMFSAI
 101 LYGLRISLLV GLTAVVLATA IGSLVGLLAA YAGGVIDAVL MRIVDFILGF
 151 PTILVALVLL AMMGRGVDKV ILALVVVQWA HYARIMRGRA LQERRKEYVE
 201 AAANLGFPAW RIMLFHLLPN CMAPVMVFAT IQIANAIVLE ATLSFLGVG
 251 PVTEPSLGLL IANGFQYLLS GDYWINLFPG LALLLLILSI NIVGDRLRES
 301 LDPRA*

Abbildung 57: DNA-Sequenz von BvgA aus *B. pertussis* Tohama I.

```

1  atgtacaaca aagtcctcat cattgacgat caccctgtac tgagattcgc
51  cgtccggggtc ctgatggaaa aggaaggatt cgaagtcatc ggcgaaaccg
101  ataacggcat tgacgggctc aagatcgccc gcgagaaaat tcccaacctc
151  gtcgtactcg acatcggcat tcccaagctg gacgggctgg aagtcatcgc
201  ccggctgcaa tcgctgggggt tgccgctacg cgtgctgggtg ctgaccggcc
251  agccgccttc gctgttcgcc cgccgctgcc tgaactccgg cgccgcaggc
301  ttcgtgtgca aacacgagaa cctgcacgag gtcatcaatg ccgccaaggc
351  ggtgatggcc ggctacacct acttccccag caccacgctc agcgagatgc
401  gcatggggcga caacgccaaag agcgacagta cgctcatcag cgtgttgtcc
451  aaccgcgaac tgaccgtcct gcaactgctg gcgcaaggca tgtccaacaa
501  ggacatcgct gacagcatgt tcctcagcaa caagaccgtc agcacctaca
551  agacgcgcct gctgcagaag ctgaacgcca cgtcgctgggt ggaactgata
601  gacctcgcca aacgcaacaa tctcgcctag

```

Abbildung 58: DNA-Sequenz von BvgA aus *B. holmesii* G7702.

```

1  ATGCAAAAGC TACTAATTAT TGATGATCAT CCCGTCATCC GGTATGCCGT
51  AAAGGGCTTG ATGGAGAAAG AGGGTTTCGA GGTCGTGGGC GAAACGGACA
101  ACGGCTTGGA CGGCATCACC ATGGCGCGGG AGCTGCTCCC CAACCTGGTG
151  ATTCTGGACA TCGCCATCCC GAAGCTCGAT GGCCTGGAGG TCCTGACCCG
201  CCTGCAGGCG CTGGGGCTGC CCATGCACGT GTCATCCTC ACTGGCCAAC
251  AGCCCGCCCT CTTTGCCAGG CGCTGTCTTA ACGCGGGCGC CGCGGGCTTT
301  GTCTCCAAGC ACGGTAACCT GCAAGAAGTG GTCGACGCCG CCAAGGCGGT
351  CGTGGCGGGC TACACCTATT TCCCGAAAAC CACGCTTACG GATATTCGCG
401  GAGTCGAAAA CCAGGACGAC GCGATGATGA TCTCCTCGCT GTCGAATCGC
451  GAGCTGGCCG TGCTGCAGTT ATTGGCTCAA GGCCTGACCA ATAAAGATAT
501  TGCCGACAGC ATGTTTCTGA GCAATAAAGC CATCAGTACT TACAAAACCC
551  GCCTGCTGCA GAAGCTTAAT GCAACCACAC TGGTGGAGCT GATAGACATG
601  GCCAAACGAA ATAATCTGGG GTGA

```

Abbildung 59. DNA-Sequenz von BvgA_{fus}.

Die DNA-Bereiche aus der BvgA-Sequenz aus *B. holmesii* sind in großen Buchstaben dargestellt. Die DNA-Bereiche aus der BvgA-Sequenz aus *B. pertussis* sind in kleinen Buchstaben dargestellt.

```

1  ATGCAAAAGC TACTAATTAT TGATGATCAT CCCGTCATCC GGTATGCCGT
51  AAAGGGCTTG ATGGAGAAAG AGGGTTTCGA GGTCGTGGGC GAAACGGACA
101 ACGGCTTGGA CGGCATCACC ATGGCGCGGG AGCTGCTCCC CAACCTGGTG
151 ATTCTGGACA TCGCCATCCC GAAGCTCGAT GGCCTGGAGG TCCTGACCCG
201 CCTGCAGGCG CTGGGGCTGC CCATGCACGT GCTCATCCTC ACTGGCCAAC
251 AGCCCGCCCT CTTTGCCAGG CGCTGTCTTA ACGCGGGCGC CGCGGGCTTT
301 GTCTCCAAGC ACGGTAACCT GCAAGAAGTG GTCGACGCCG CCAAGGCGGT
351 CGTGGCGGGC TACACCTATT TCCCGAAAAC CACGCTTACG GATATTCGCG
401 GAGTCGAAAA CCAGGACGAC GCGATGctca tcagcgtggt gtccaaccgc
451 gaactgaccg tcctgcaact gctggcgcaa ggcatgtcca acaaggacat
501 cgctgacagc atgttcctca gcaacaagac cgtcagcacc tacaagacgc
551 gcctgctgca gaagctgaac gccacgctgc tgggtggaact gatagacctc
601 gccaaacgca acaatctcgc ctag

```