

**Charakterisierung der initialen Aufnahme
des Kofaktors V (NAD) bei *Haemophilus influenzae***

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

vorgelegt von
Gabriele Kemmer
aus Aschaffenburg

Würzburg, 2001

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Goebel

Gutachter: Prof. Dr. J. Hacker

Gutachter: Prof. Dr. R. Gross

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Für Jochen

Die Experimente zu dieser Dissertation wurden in der Zeit von Januar 1999 bis Februar 2001 am Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg in der Gruppe von Herrn Dr. Joachim Reidl erstellt.

An dieser Stelle möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, meinen Dank aussprechen.

Bei Herrn Prof. Dr. J. Hacker und Herrn Prof. Dr. R. Gross bedanke ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Weiter danke ich Herrn Dr. Joachim Reidl für die Betreuung meiner Doktorarbeit, für die gute wissenschaftliche Anleitung und Unterstützung während meiner gesamten Arbeit.

Ich möchte mich bei denjenigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Zentrums für Infektionsforschung und des Instituts für molekulare Infektionsbiologie bedanken, die mir während meiner Doktorarbeit mit fachlichem Rat zur Seite standen, mich moralisch unterstützten und für viel gemeinsamen Spaß gesorgt haben. Mein Dank gilt auch allen, die mich immer wieder aufs Neue motiviert haben, meine Doktorarbeit zügig und konzentriert zu Ende zu bringen.

Großen Dank verdient mein Mann Jochen Kemmer, der mich während meiner Zeit am Zentrum für Infektionsforschung in jeglicher Hinsicht unterstützt und motiviert hat.

Inhaltsverzeichnis

A. Zusammenfassung	1
Summary	3
B. Einleitung	5
1. Taxonomie	5
2. Morphologie, Aufbau und Struktur	5
3. Pathogenität und Virulenz	7
4. Vakzine gegen <i>Haemophilus influenzae</i>	11
5. Biosynthese und Recycling von NAD	14
5.1 Die biologische Bedeutung von NAD	14
5.2 Die Synthese von NAD	16
5.3 Die Aufnahme von NAD	18
5.4 <i>Pasteurellaceae</i> und Faktor V	19
6. Zielsetzung dieser Arbeit	20
C. Material	21
1. Bakterienstämme	21
1.1 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	21
1.2 <i>H. influenzae</i> -Stämme	21
2. Plasmide, Oligonukleotide und Antikörper	22
2.1 Plasmide	22
2.2 Oligonukleotide	23
2.3 Antikörper	24
3. Chemikalien, Kits und Geräte	24
3.1 Laborkits	25
3.2 Geräteliste	25
4. Medien, Agar und Medienzusätze	26
4.1 Medien	26
4.2 Agar	27

4.3 Medienzusätze	28
D. Methoden	30
1. Kultivierung von <i>H. influenzae</i>	30
2. Erstellen einer Wachstumskurve	30
3. Molekulargenetische Methoden	30
3.1 Plasmidisolierung	30
3.2 Präparation von chromosomaler DNA	31
3.2.1 Präparation der chromosomalen DNA	31
3.2.2 Freisetzen der chromosomalen DNA durch Aufkochen	31
3.3 Spaltung der DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen	31
3.4 Horizontale Gelelektrophorese	32
3.5 Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen	32
3.6 Southern Blot Analysen	33
3.7 Ligation	34
3.8 Herstellung kompetenter Bakterienzellen zur DNA Transformation	34
3.8.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen für die Elektroporation	34
3.8.2 Herstellung kompetenter <i>H. influenzae</i> -Zellen	34
3.9 Transformation kompetenter Zellen mit chromosomaler und Plasmid-DNA	35
3.9.1 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	35
3.9.1 Transformation von <i>H. influenzae</i> -Zellen	35
3.9.2.1 Transformation von MIV-kompetenten <i>H. influenzae</i> -Zellen	35
3.9.2.2 Transformation von <i>H. influenzae</i> BRAD	36
3.10 PCR-Analysen	36
3.11 Sequenzierung von PCR-Fragmenten mit LI-COR	37
4. Proteinbiochemische Methoden	37
4.1 Gewinnung von Proteinextrakten	37
4.1.1 Präparation des Gesamtzellextrakt	37
4.1.2 Präparation von Außenmembranproteinen	38
4.1.2.1 Kleiner Maßstab	38
4.1.2.2 Großer Maßstab	38
4.1.3 Präparation des Periplasma-Extraktes	38

4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem D _C Protein Assay (BioRad)	39
4.3 Auftrennung der Proteine durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	39
4.4 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen	40
4.5 Trocknen von SDS-Polyacrylamidgelen	40
4.6 Immunoblot (Westernblot)	40
5. Phosphatase-Assays	41
5.1 Nachweis der Phosphatase-Reaktion mit pNPP	41
5.2 Der Malat-Enzym-Assay	41
6. Herstellung des radioaktiv markierten Faktor V	42
7. Transport-Assay	42
8. Dünnschicht-Chromatographien	42
9. Stammkonstruktionen	43
9.1 Konstruktion von <i>hel</i> -Deletionsmutanten in den <i>H. influenzae</i> -Stämmen REI1012(Δ <i>hel::kan</i>), REI1012b(Δ <i>hel::kan</i>), GK06(Δ <i>hel::kan</i>) und GK07(Δ <i>hel::kan</i>)	43
9.2 Konstruktion von <i>nadN</i> -Knockout-Mutanten in den <i>H. influenzae</i> -Stämmen REI1010(<i>nadN::cat</i>), REI1010b(<i>nadN::cat</i>), JSB02(<i>nadN::cat</i>) und JSB01(<i>nadN::cat</i>)	44
E. Ergebnisse	45
1. Die Rolle von <i>e</i> (P4) bei der Häminaufnahme	45
1.1 Konstruktion der <i>hel</i> -Deletionsmutante REI1012(Δ <i>hel::kan</i>)	45
1.2 Die Wachstumsphänotypen der <i>hel</i> -Deletionsmutante REI1012(Δ <i>hel::kan</i>)	46
2. Nachweis der Phosphatase-Funktion von <i>e</i> (P4)	47
2.1 Nachweis der Phosphatase-Aktivität von <i>e</i> (P4) auf Indikatorplatten	48
2.2 Nachweis der Phosphatase-Aktivität von <i>e</i> (P4) mit dem pNPP-Assay	49
2.3 Bestimmung des pH-Optimums von <i>e</i> (P4)	49
3. Identifizierung des physiologisch relevanten Substrats von <i>e</i> (P4)	50
3.1 Dephosphorylierung des Faktors V durch <i>e</i> (P4)	50
3.1.1 NAD, NMN und NR als Substrat für <i>e</i> (P4)	50
3.1.2 Nachweis der Dephosphorylierung von NADP mit dem Malat-Enzym-Assay	52

3.2 Die Wachstumsphänotypen der Mutante REI1012($\Delta hel::kan$)	53
3.3 Aufnahme von ^{14}C -NAD, ^{14}C -NMN und ^{14}C -NR in REI1012($\Delta hel::kan$)	55
4. Ist die Phosphatase-Funktion von $e(P4)$ an die Lokalisierung an der Außenmembran gekoppelt?	57
4.1 Konstruktion der Cystein-Mutanten GK08(hel_{C21G}) und GK09(hel_{C21G})	57
4.2 Nachweis der Phosphatase-Aktivität in den Mutanten GK08(hel_{C21G}) und GK09(hel_{C21G})	60
5. Identifizierung weiterer putativer Funktionen von $e(P4)$	60
5.1 Konstruktion der Phosphatase-Mutante GK02(hel_{D86L})	61
5.2 Nachweis des Verlusts der Phosphatase-Funktion von $e(P4)$ in den Mutanten GK02(hel_{D86L}) und GK03(hel_{D84A})	62
5.3 Die Wachstumsphänotypen der Mutanten GK02(hel_{D86L}) und GK03(hel_{D84A})	63
5.4 Aufnahme von ^{14}C -NAD, ^{14}C -NMN und ^{14}C -NR in GK02(hel_{D86L}) und GK03(hel_{D84A})	65
6. Weitere Proteine, die an der NAD-Aufnahme von <i>H. influenzae</i> beteiligt sind	66
6.1 Das periplasmatische Protein NadN von <i>H. influenzae</i>	66
6.1.1 Konstruktion der <i>nadN</i> -Knockout-Mutante REI1010(<i>nadN::cat</i>)	67
6.1.2 Nachweis der Spaltung von NAD und NMN durch NadN	68
6.1.3 Nachweis der Spaltung von NADP durch NadN mit dem Malat-Enzym-Assay	69
6.1.4 Die Wachstumsphänotypen der Mutante REI1010(<i>nadN::cat</i>)	70
6.1.5 Aufnahme von ^{14}C -NAD, ^{14}C -NMN und ^{14}C -NR in REI1010(<i>nadN::cat</i>)	72
6.2 Die Doppelmutante GK04(<i>nadN::cat</i> $\Delta hel::kan$)	74
6.2.1 Konstruktion der Doppelmutante GK04(<i>nadN::cat</i> $\Delta hel::kan$)	74
6.2.2 Die Wachstumsphänotypen der Doppelmutante	76
6.2.3 Aufnahme von ^{14}C -NAD, ^{14}C -NMN und ^{14}C -NR in GK04(<i>nadN::cat</i> $\Delta hel::kan$)	78
7. Inhibitoren der NAD-Aufnahme von <i>H. influenzae</i> Rd	79
8. Faktor V-Nutzung in pathogenen <i>H. influenzae</i> -Stämmen	79
8.1 Das Lipoprotein $e(P4)$ in pathogenen <i>H. influenzae</i> -Stämmen	80
8.2 NadN in pathogenen <i>H. influenzae</i> -Stämmen	81
9. Das Außenmembranprotein OmpP2	83

9.1 Konstruktion der <i>ompP2</i> -Deletionsmutante GK05($\Delta ompP2::cat$)	83
9.2 Die Wachstumsphänotypen der <i>ompP2</i> -Deletionsmutante GK05($\Delta ompP2::cat$)	86
9.3 Aufnahme von ^{14}C -NAD, ^{14}C -NMN und ^{14}C -NR in GK05($\Delta ompP2::cat$)	87
F. Diskussion	89
1. Die Rolle von <i>e(P4)</i> bei der Häminaufnahme	89
2. Die Relevanz von <i>e(P4)</i> bei der NAD-Nutzung von <i>H. influenzae</i>	90
3. Die Rolle von <i>e(P4)</i> bei der NAD-Nutzung von <i>H. influenzae</i>	91
4. Das Protein NadN und die Doppelmutante	94
5. Das Außenmembranprotein OmpP2	96
6. Die Nutzung von NAD bei <i>H. influenzae</i>	96
7. Die Verbreitung von <i>e(P4)</i> und NadN und deren Relevanz für die Pathogenität von <i>H. influenzae</i>	97
G. Literaturverzeichnis	101
Anhang	110
1. Sequenzhomologien	110
2. Abkürzungen	111
3. Erklärungen	113
4. Publikationen	114
5. Lebenslauf	115

A. Zusammenfassung

H. influenzae ist ein fakultativ anaerobes, Gram-negatives Bakterium und wird in die Familie der *Pasteurellaceae* eingeordnet. Das Bakterium zeigt Auxotrophien für Hämin unter aeroben Bedingungen und für Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) bei aeroben wie anaeroben Wachstum. Es können zwei Unterarten unterschieden werden: die bekapselten Stämme, die systemische Erkrankungen hervorrufen und die unbekapselten bzw. nicht-typisierbaren Stämme, die für Oberflächeninfektionen verantwortlich sind. Da bei *H. influenzae* bisher nur wenig über die NAD-Aufnahme bekannt war, sollten in dieser Arbeit Proteine identifiziert und charakterisiert werden, die an der NAD-Aufnahme beteiligt sind.

Das Außenmembranprotein *e(P4)*, kodiert von dem *hel*-Gen, wurde als eine Komponente des Häminaufnahmesystems beschrieben. In dieser Arbeit wurde eine *hel*-Deletionsmutante hergestellt, anhand der nachgewiesen wurde, daß *e(P4)* als saure Phosphatase nicht an der Hämin-, sondern an der NAD-Aufnahme beteiligt ist. Mit Hilfe von verschiedenen Phosphatase-Assays und dem Malat-Enzym-Assay konnten NADP und Nikotinamid-Mononukleotid (NMN) als physiologisch relevante Substrate identifiziert werden. Die biologische Relevanz von *e(P4)* für die NAD-Aufnahme wurde durch Mutantanalyse in Wachstumstests und Transport-Assays nachgewiesen. Es wurde gezeigt, daß die *hel*-Deletionsmutante mit NAD und NMN ein signifikantes Wachstumsdefizit hatte und nicht fähig war, beide Nikotinamid-Nukleotid-Quellen aufzunehmen, während die Nutzung von Nikotinamid-Ribosyl (NR) keinen Unterschied zum Wildtyp aufwies.

Um die Frage zu klären, ob die Lokalisation von *e(P4)* als Lipoprotein an der Außenmembran wichtig für die NMN-Spaltung ist, wurden zwei Mutanten hergestellt, bei denen im *hel*-Gen der Lipidanker Cystein durch ein Glycin ausgetauscht wurde, um das Protein im Periplasma zu exprimieren. Die Periplasma-Extrakte dieser Cystein-Mutanten zeigten in Phosphatase-Assays keine Aktivität.

Um zu untersuchen, ob die Phosphatase-Aktivität die einzige für die NAD-Aufnahme relevante Funktion von *e(P4)* ist, wurden Phosphatase-Mutanten hergestellt und charakterisiert. Sie exprimierten ein mutiertes *e(P4)*-Protein, das durch einen Aminosäureaustausch die Phosphatase-Aktivität verloren hatte. Es zeigte sich, daß die Phänotypen der Phosphatase-Mutanten in Bezug auf die Fähigkeit NMN zu spalten, NAD und NMN aufzunehmen und als Faktor V-Quelle zum

Wachstum zu nutzen, exakt mit den Phänotypen der Deletionsmutante korrelierten. Es konnten daher keine weiteren Funktionen von *e(P4)* festgestellt werden.

Das periplasmatische Protein NadN wurde als Pyrophosphatase beschrieben, die fähig ist, NAD zu NMN zu hydrolysieren. Weiter wurde eine 5'-Nukleotidase-Aktivität nachgewiesen, mit der NadN NMN zu NR dephosphorylieren kann. Die Relevanz von NadN für die NAD-Aufnahme wurde anhand einer *nadN*-Knockout-Mutante untersucht. In Wachstumskurven und Transport-Assays zeigte sich, daß die *nadN*-Mutante nicht fähig war, NAD aufzunehmen und zum Wachstum zu verwenden. Auch die Nutzung von NMN war bei der Mutante eingeschränkt, während mit NR als Faktor V-Substrat kein Unterschied zum Stamm Rd erkennbar war.

Durch die Charakterisierung einer *hel nadN*-Doppelmutante konnte nachgewiesen werden, daß keine weiteren Enzyme außer *e(P4)* und NadN an der Prozessierung von NAD zu NR beteiligt sind. Es zeigte sich auch, daß nur NR über einen putativen Transporter ins Zytoplasma aufgenommen wird.

Das Protein OmpP2 stellt ein Hauptporin der äußeren Membran dar. Durch eine *ompP2*-Deletionsmutante konnte mit Hilfe von Wachstumskurven und Transport-Assays nachgewiesen werden, daß NAD, NMN und NR durch diese Pore ins Periplasma diffundieren.

Summary

H. influenzae is a facultativ anaerobic, Gram-negative bacterium and belongs to the family of *Pasteurellaceae*. This bacterium shows auxotrophies for hemin under aerobic conditions and for nicotinamid adenine dinucleotide (NAD) at aerobic and anaerobic growth. Two subspecies are distinguishable: the encapsulated strains, the causative agents for systemic and invasive diseases and the unencapsulated or nontypeable strains, responsible for inflammation of the respiratory tract. In *H. influenzae* little is known about the utilization of NAD, therefore this work was aimed to identify and characterize gene products which are involved in the uptake of NAD.

The outer membrane protein *e(P4)*, encoded by the gene *hel*, was described as a component of the hemin uptake system. In this work a *hel* deletion mutant was constructed to proof that the acid phosphatase *e(P4)* is not involved in the uptake of hemin but in the uptake of NAD. With the aid of different phosphatase assays and the maleic enzyme assay NADP and NMN could be identified as the physiological relevant substrates. The biological relevance of *e(P4)* was proofed by mutant analysis in growth tests and transport assays. It was shown that the *hel* deletion mutant had a significant growth deficiency with NAD and NMN and was not able to take up both nicotinamide nucleotide sources, whereas the utilization of nicotinamide ribosyl (NR) showed no difference compared to the wildtype.

To address the question, whether the localization of the lipoprotein *e(P4)* at the outer membrane is important for the hydrolysis of NMN, two mutants were constructed which had a Cystein-Glycin replacement in the lipid anchor of the *hel* gene to express the protein in the periplasm. The periplasm extracts of these Cystein mutants showed no activity in phosphatase assays.

To investigate whether the phosphatase activity of *e(P4)* is the only relevant function for the uptake of NAD, phosphatase mutants were constructed and characterized. They expressed a mutated *e(P4)* protein which had lost the phosphatase activity by an amino acid replacement. The phenotypes of the phosphatase mutants correlated exactly with the phenotype of the deletion mutant concerning the ability to cleave NMN, to take up NAD and NMN and to use them as factor V sources.

The periplasmic protein NadN was described as a pyrophosphatase which is able to hydrolyse NAD to NMN. Further a 5'-nucleotidase function was identified enabling NadN to dephosphorylate NMN to NR. The relevance of NadN for the utilization of NAD was investigated with a *nadN* knockout mutant. Growth curves and transport assays revealed that the *nadN* mutant was not able to take up NAD and to use it for growth. The utilization of NMN was reduced, whereas the utilization of NR showed no difference compared to the wildtype.

By characterizing a *hel nadN* double mutant it was shown that no further enzymes than *e(P4)* and *NadN* are involved in the processing of NAD to NR and that only NR is taken up into the cytoplasm through a putativ transporter.

The protein *OmpP2* is the major porin of the outer membrane. Growth curves and transport assays with an *ompP2* deletion mutant revealed that NAD, NMN and NR diffuse through this porin into the periplasm.

B. Einleitung

Haemophilus influenzae

1. Taxonomie

Haemophilus influenzae ist ein fakultativ anaerobes Gram-negatives Stäbchen-Bakterium und wird in die Familie *Pasteurellaceae* eingeordnet. Von den insgesamt 15 Spezies der Gattung *Haemophilus* kommen 11 im Menschen vor und parasitieren hauptsächlich auf den respirativen Schleimhäuten. Der Name *Haemophilus* (*gr.* haima: Blut, *gr.* philos: Liebhaber) weist auf dessen Vorliebe für Blutkomponenten hin. So zeigt diese Bakterienart Auxotrophien für die Faktoren X und V. Faktor X steht für die prosthetische Gruppe Häm, wie sie in Hämin oder dessen Vorläufer Protoporphyrin vorkommt. Die Porphyrine sind als Kofaktoren von Cytochromen, Katalasen und Peroxidasen für ein Wachstum unter aeroben Bedingungen essentiell. Bei Faktor V handelt es sich um Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat (NADP) bzw. Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) und wird für aerobes, wie auch für anaerobes Wachstum benötigt. Die Biotypisierung von *H. influenzae* kann außer durch biochemische Differenzierung auch anhand von Lipooligosaccharid-Typisierung und Außenmembranprotein-Profilen erfolgen (Carlone et al., 1985). Die Außenmembranproteine sind stammspezifisch und können zur Klassifizierung von *Haemophilus*-Spezies herangezogen werden (siehe Review: Mutters und Reidl, 1998).

2. Morphologie, Aufbau und Struktur

H. influenzae ist ein kleines (1 x 0,3 µm) nicht-motiles und sporenloses Stäbchen. Man unterscheidet bekapselte von unbekapselten oder nicht-typisierbaren Unterarten (NTHI). Die unbekapselten Spezies bilden auf Blutagar kleine, glasig-transparente, glatte und scharfrandige Kolonien. Bei den bekapselten Arten können sechs Kapseltypen (a-f) unterschieden werden; diese erscheinen auf Agar mukoid und bilden größere Kolonien als die nicht-typisierbaren Arten.

Um die genetische und evolutionäre Verwandtschaft zwischen bekapselten und nicht-typisierbaren (NTHI) *H. influenzae*-Stämmen zu untersuchen, wurden Multilocus-Enzym-Elektrophoresen mit einer Vielzahl von Isolaten durchgeführt. Es wird angenommen, daß der „Ur-*H.*

influenzae“ nicht bekapselt gewesen ist und sich in zwei teilweise ineinander greifende Linien aufgetrennt hat. Die größere Gruppe erwarb unterschiedliche Gene für die Interaktion mit dem Wirt und blieb unbekapselt. NTHI-Stämme sind nicht klonal und weisen eine große Heterogenität auf. Die zweite Gruppe akquirierte andere Kolonisierungsfaktoren sowie die *cap*-Gene und wurde bekapselt. Bekapselte Stämme sind klonal und können auf zwei phylogenetische Hauptgruppen zurückgeführt werden: Gruppe I enthält die Typen a, b, c, d und e, während zur Gruppe II die Typen a, b, und f gehören. Durch Mutationen im *cap*-Locus verloren einige Stämme wieder ihre Kapsel und repräsentieren nun eine Untergruppe der nicht-typisierbaren *H. influenzae*-Stämme (siehe Hardy et al., 2001).

Das Genom von *H. influenzae* Rd war das erste Genom eines lebenden Organismus, das komplett sequenziert wurde (Fleischmann et al., 1995). Es ist 1,83 Megabasenpaare (Mbp) groß und kodiert für etwa 1700 offene Leseraster. Im Vergleich mit dem *E. coli* Genom (4,7 Mbp) fällt auf, daß einige Gene für in anderen Organismen wichtige Enzymreaktionen fehlen. Betroffen sind nicht nur die NAD- und Hämin-Synthese, sondern z.B. auch einige Gene, die für Enzyme des Tricarbonsäurezyklus kodieren, wie die Citrat-Synthase, Aconitase, Isocitrat-, und Succinat-Dehydrogenase. Es wird vermutet, daß auf wahrscheinlich Grund seines ausschließlichen Vorkommens auf den menschlichen Schleimhäuten dieser Organismus die entsprechenden Gene verloren hat, was zu einer Genomverkleinerung und dadurch möglicherweise zu einem Selektionsvorteil führte (Tatusov et al., 1996).

Die Zellhülle besteht, wie bei Gram-negativen Bakterien üblich, aus Zytoplasmamembran, Periplasma mit Murein und der äußeren Membran, die mit dem Murein verankert und mit eingelagerten Lipooligosacchariden (LOS) assoziiert ist. Im Gegensatz zu dem Lipopolysaccharid (LPS) der *Enterobacteriaceae* enthält das LOS von *Haemophilus* nur kurze O-Seitenketten (Roche und Moxon, 1995). Die LOS zeigen eine große Heterogenität, einerseits zwischen verschiedenen Stämmen, aber auch während des Wachstums eines individuellen Bakteriums. Die spontane reversible Phasenvariation der endständigen O-Seitengruppen wird durch Umwelteinflüsse reguliert (Roche und Moxon, 1995).

Die äußere Membran enthält ungefähr 36 Lipo- und Außenmembranproteine mit unterschiedlichster Funktion. Die 6 Hauptproteine werden bezeichnet als P1-P6. P1 hat ein Molekulargewicht von 49 kDa und ist hitzemodifizierbar. P2 (37 kDa) stellt das Hauptporin der äußeren Membran dar, wohingegen P5 (27 kDa) als Adhäsion fungiert. *e*(P4) (29 kDa) ist, wie in dieser Arbeit noch gezeigt wird, als Phosphomonoesterase an der NAD-Aufnahme beteiligt. *e*(P4) und P6 (16 kDa) sind Lipoproteine.

Die Kapselbildung wird vom *cap*-Locus kodiert und stellt einen wesentlichen Virulenzfaktor dar. Der Kapseltyp b beispielsweise besteht aus Polyribosyl-Ribitol-Phosphat (PRP) und ist assoziiert mit der hohen Virulenzfähigkeit der Hib-Stämme (siehe unten).

3. Pathogenität und Virulenz

Bisher konnte nur der Mensch als einziges Bioreservoir für *H. influenzae* beschrieben werden. Die Übertragung von *H. influenzae*-Infektionen erfolgt durch Tröpfchen oder direkten Kontakt von Trägern. Die Besiedlung der Schleimhäute, die bei ca. 80 % der Bevölkerung auftritt, muß nicht zwingend zu einem Krankheitsbild führen, doch können zwei unterschiedliche Erkrankungsformen auftreten: Oberflächeninfektionen und systemische Erkrankungen. Bei den Oberflächeninfektionen, ausgelöst durch NTHI-Stämme, breiten sich die Erreger nach der Besiedlung des Nasopharynx in die höher und tiefer gelegenen Bereiche des respiratorischen Traktes aus. Durch die Kolonisierung der entsprechenden Epithelien kann es zur Ausbildung von Otitis Media, Sinusitis, Epiglottitis, Pneumonie und Bakteriämie kommen. Die bekapselten Stämme sind für invasive Infektionen, wie Meningitis, Cellulitis und septische Arthritis verantwortlich (siehe Review Mutters und Reidl, 1998).

Die Pathogenität von *H. influenzae* wird durch verschiedene Virulenzfaktoren ermöglicht: Die Kolonisierung erfolgt vorwiegend an Schleimhäuten des oberen respiratorischen Trakts. Die hierfür nötige Adhärenzfähigkeit vermitteln die Lipooligosaccharide (LOS), die eine sehr heterogene Struktur aufweisen. Freigesetzt als Endotoxin sind sie ein wirksamer Entzündungsauslöser (Gu et al., 1996).

Weitere für die Kolonisierung benötigten Adhäsine sind in der Außenmembran von *H. influenzae* eingelagert, wie z. B. die hochmolekularen Rezeptorproteine (HMW1/2) (Barenkamp et al., 1994). HMW1 zeigt Bindungsspezifität für oropharyngale Zellen, während HMW2 mit höherer

Affinität an Zellen des Genitaltrakts adhärirt (Hultgren et al., 1993). Auch die Außenmembranproteine P2 und P5 haben die Fähigkeit an den Mukus im Nasopharynx zu binden und leiten so die Adhärenz der Zellen ein (Reddy et al., 1996). *H. influenzae* Typ b (Hib) besitzt zusätzlich ein Fimbrien-Genoperon aus acht Genen (*hif*-Operon), das u.a. für das Adhäsion HifA kodiert (van Ham et al., 1994). Es zeigt Bindungsaffinitäten zu Epithelzellen im Oropharyngbereich (van Ham et al., 1989) und zu dem menschlichen Blutgruppenantigen „Anton“ auf Erythrozyten (van Alphen et al., 1988).

Nach der erfolgreichen Adhäsion müssen die Bakterien auf den respiratorischen Schleimhäuten persistieren, das heißt fähig sein, das menschliche Immunsystem abzuwehren und Nahrungsstoffe aufzunehmen. Eine Strategie von *Haemophilus*, das Immunsystem zu umgehen, besteht in der Variation der Hauptkomponenten der Außenmembran, hauptsächlich der Außenmembranproteine und Lipooligosaccharide.

Einige Außenmembranproteine stellen dominante Antigene während der Infektion dar. Durch die Entwicklung von „antigenischer Drift“ in den immundominanten Epitopen von P2 kann das Antikörper-abhängige Abtöten der Bakterien vermieden werden. Diese Drift wird durch minimale Änderungen in der Aminosäuresequenz in den variablen Regionen des Proteins erreicht. Auch die Proteine P1, P5, HMW1/2 und andere zeigen die Fähigkeit, ihre Struktur zu verändern, und ermöglichen es so dem Bakterium, trotz Immunantwort zu überleben (Groeneveld et al., 1990).

Eine weitere Strategie, dem Immunsystem zu entkommen, ist die reversible Phasenvarianz, die auf der strukturellen Veränderung oder dem Vorhandensein bzw. Verlust von Oberflächenstrukturen beruht. Auch die Heterogenität des LOS ist auf spontane reversible Phasenvariation der endständigen O-Seitengruppen zurückzuführen und wird durch Umwelteinflüsse reguliert (Roche und Moxon, 1995). Auslösende Faktoren sind hierbei das Blutserum, veränderte Wachstumsraten und Cysteinmangel. Das LOS wird von den *lic*-Loci kodiert, die im 5'-Bereich Repeats von 4 Basenpaaren besitzen. Die Anzahl der Repeats unterläuft einer spontanen Variation durch „slipped-strand mispairing“, wodurch es zu translationellen Leserasterverschiebungen kommt. Das Ergebnis sind Proteine, die sich im N-Terminus unterscheiden oder ganz fehlen (Weiser et al., 1997). Ähnliche Mechanismen gelten auch für die Varianz der Pili, HMW-Adhäsine und Hämrezeptoren.

Ein weiterer Schutz vor dem Immunsystem stellt die Kapsel von *H. influenzae* dar. Sie bildet ein dichtes Netzwerk aus Polymeren, welche die Oberfläche des Bakteriums bedecken. Die PRP-Kapsel von *H. influenzae* Typ b ist ein wesentlicher Virulenzfaktor bei invasiven Hib-Erkrankungen (Moxon et al., 1984). Sie wirkt antiphagozytotisch und führt zu einer erhöhten Blutserumresistenz, da die Proteine des Komplementsystems nicht an das Bakterium binden können (Levine et al., 1983). Andererseits begünstigt der Verlust der Kapsel die Kolonisierung der respiratorischen Schleimhäute und die Invasion in Epithelzellen (Roche und Moxon, 1995). Die Kapselausprägung zeigt keine Serotypvariation (Roche und Moxon, 1995).

Der vorherrschende Antikörpertyp auf den Schleimhäuten ist IgA, ein Immunglobulin, das dazu dient, die Adhäsion von Bakterien zu verhindern und die Phagozytose zu unterstützen. Als Schutz davor produzieren bekapselte *Haemophilus*-Stämme Proteasen vom Typ IgA1. Sie spalten die IgA-Antikörper in der „hinge region“ in einen Fab- und einen Fc-Teil (Mulks et al., 1982). NTHI-Stämme sekretieren davon sogar 3 verschiedene Typen. Eine weitere Funktion der IgA-Proteasen ist die Adhäsion. Die Proteasen zeigen eine signifikante Homologie zu dem Produkt des *hap*-Gens von NTHI, das für das Anheften und die Invasion in Epithelzellen verantwortlich ist (St. Geme, 1994). Das menschliche Immunsystem versucht sich mit Antikörpern gegen die hochantigenen IgA-Proteasen zu schützen. Unter immunologischem Druck ist *H. influenzae* aber fähig, die Struktur der IgA-Proteasen so zu wandeln, daß sie nicht nur die Schnittstellen verändern, sondern auch ihre antigenischen Eigenschaften variieren (Lomholt et al., 1993).

NTHI-Stämme nutzen die Invasion in und zwischen Zellen dazu, sich in eine vor dem Immunsystem geschützten Nische zu etablieren. NTHI *H. influenzae*-Stämme sind fähig, zwischen die Epithelzellen zu migrieren und an der basolateralen Oberfläche der Zellen zu siedeln bzw. in den subepithelialen Raum einzudringen, ein Prozeß, der Parazytose genannt wird. Die Eintrittsorte ins Gewebe sind nekrotische Stellen oder Zell-Zell-Verbindungsstellen (tight junctions). Teilungsfähige NTHI-Zellen wurden auch in Makrophagen-ähnlichen Zellen im subepithelialen Raum gefunden. Der Mechanismus der Aufnahme in die Zelle ist noch unbekannt (siehe Schlör et al., 2001).

Bakterien müssen Eisenquellen erschließen, um sich vermehren zu können. Da im humanen Organismus fast nur gebundenes Eisen vorliegt, haben Bakterien hochaffine Chelatoren entwickelt,

die als Siderophore bezeichnet werden. Diese konkurrieren mit den menschlichen Eisenbindeproteinen um freies Eisen, komplexieren es und werden von den Bakterien internalisiert. Bei *H. influenzae* wurde nur in wenigen unbekapselten Stämmen Siderophore gefunden worden (Schryvers und Gray-Owen, 1992; Hardie et al., 1993). Ansonsten hat *H. influenzae* spezifische Rezeptoren für die Bindung von freiem und gebundenem Eisen (Transferrin, Hämin, Hämoglobin) entwickelt. Der Transferrinrezeptor (Transferrin-binding protein, Tbp) besteht aus zwei konservierten Proteinen Tbp1 (100 kDa) und Tbp2 (85 kDa). Die Expression beider Proteine ist durch Eisen reprimierbar und steht unter der Kontrolle des Fur-Proteins (ferric uptake regulator) (Schryvers, 1989). Zur Transferrinfamilie gehören auch die Proteine des *hit*-Locus (*hitA*, *hitB*, *hitC*). HitA bindet Eisen im Periplasma und HitB transportiert es als Permease ins Zytoplasma (Sanders et al., 1994).

Da *H. influenzae* die meisten Gene für die Häm-Synthese fehlen, ist das Bakterium auf verschiedene Häm-Aufnahmesysteme angewiesen. Es wurden ein Häm:Hämopexin-bindendes Protein (Häm:Hämopexin utilization protein, HxuA) und ein Häm:Hämopexin-Rezeptor bestehend aus drei Proteinen nachgewiesen (Cope et al., 1994; Wong et al., 1994). Für die Hämoglobin- und Häminaufnahme existieren ein Hämoglobinrezeptor (Hämoglobin-Haptoglobin utilization protein, HhuA) und ein Hämin-bindendes Protein (Hemin-binding protein A, HbpA) (Maciver et al., 1996; Hanson und Hansen, 1991). Die Aufnahme von Häm-Proteinen sichert *H. influenzae* ein Wachstum unter aeroben Bedingungen und trägt zur Sauerstofftoleranz bei, die vor allem bei der Kolonisierung eine wichtige Rolle spielt (D`Mello et al., 1997).

4. Vakzine gegen *Haemophilus influenzae*

In den letzten 50 Jahren wurde eine Zunahme an invasiven Erkrankungen bedingt durch *Haemophilus* registriert. Vor der Einführung der Impfprophylaxe 1985-1990 in industrialisierten Ländern (und bis heute in den Entwicklungsländern) ist *H. influenzae* Hib der häufigste Verursacher von Meningitis vor *Neisseria meningitidis* und *Streptococcus pneumoniae*. In nicht beimpften Bevölkerungen sind vor allem Kinder im Alter von 2 Monaten bis 5 Jahren betroffen. Die Abwesenheit von protektiven Antikörpern gegen die Typ b-Kapsel bei Säuglingen führte zu einer Mortalitätsrate von ca. 5 %. Nach der erfolgreichen Einführung der Schutzimpfung in den 80er

Jahren, sind Fälle von eitriger Meningitis, verursacht durch *H. influenzae* Typ b, seit 1995 kaum mehr erfaßbar.

Gegen NTHI *Haemophilus*-Stämme jedoch konnte bisher kein Impfstoff gefunden werden. NTHI-Stämme rufen nicht nur akute Atemwegserkrankungen und Mittelohrentzündungen hervor, sie sind auch für 30-40 % der chronischen Sinusitis-, Otitis media- und Bronchitis-Fälle verantwortlich. Im allgemeinen ist *H. influenzae* gut mit Antibiotika behandelbar. Durch die Aufnahme von konjugierbaren Plasmiden treten aber vermehrt Resistenzen auf, vor allem gegen Ampizillin, bedingt durch die Produktion von β -Laktamasen (Campos et al., 1986). Sogar bei einer erfolgreichen Therapie können Infektionen, die von NTHI-Stämmen herrühren, zu Langzeitkomplikationen führen: zum Beispiel kann Mittelohr-Ausfluß, der während einer akuten Mittelohrentzündung entstand, über Wochen und Monate andauern und dadurch bei Kleinkindern zu Defiziten in der Sprachentwicklung und cognitiven Funktionen führen. Die Pathogenität von NTHI-Stämmen zeigt also, daß die Entwicklung von Vakzinen auch in diesem Feld von großer Bedeutung ist.

Für die Entwicklung eines Impfstoffs gegen *H. influenzae* Typ b stellte das Kapselmaterial ein ideales Ziel dar, da keine Varianz in der Kapselstruktur von verschiedenen Hib-Stämmen besteht und Antikörper gegen das Polysaccharid der Hib-Kapsel, Polyribosyl-Ribitol-Phosphat (PRP), protektiv wirken (Hill, 1983).

Ein Problem bei der Impfstoffentwicklung war, daß PRP, wie andere Polysaccharide auch, ein T-Zell-unabhängiges Antigen darstellt (Smith et al., 1989) und nur die Bildung von Anti-PRP vom Serotyp IgM induziert. Da aber für eine beschleunigte Sekundärantwort mit hohem Antikörpergehalt (Boosterung) die Produktion von IgG sowie Gedächtniszellen nötig sind, wurde an das Immunogen PRP ein T-Zell-abhängiges Trägermolekül gekoppelt (Granoff et al., 1988).

Für die aktive Immunisierung gegen *H. influenzae* Typ b-Infektionen (Meningitis, Epiglottitis, Sepsis, Arthritis) wurden in der Zwischenzeit 4 Konjugat-Vakzine entwickelt. Sie bestehen aus nativem Kapselmaterial oder PRP-Oligosacchariden und variierenden Trägerproteinen. Der Impfstoff PRP-OMPC besitzt als Träger einen Außenmembran-Protein-Komplex von *Neisseria meningitidis* Serotyp B. Bei PRP-D stellt das detoxifizierte Diphtherie-Toxin den Träger dar, bei HbOC ein Derivat des Toxins von *Corynebacterium diphtheriae*. Das detoxifizierte Tetanus-Toxin ist der Träger für den Impfstoff PRP-T.

Der Impfverlauf ist bei allen 4 Präparaten gleich: sie erfolgen bei Säuglingen im zweiten Monat und im fünften Monat, mit einer letzten Boosterung im ersten bzw. zweiten Lebensjahr. Eine Impfung im höheren Alter ist nicht mehr sinnvoll. Hib-Konjugat-Vakzine haben sich als relativ sicher erwiesen, die Effizienz liegt bei nahezu 100 %. Als Nebenwirkungen können Fieber, Halsschmerzen, Schwellungen und Hautreizungen auftreten (Eskola et al., 1987).

Für die Impfstoffentwicklung gegen NTHI-Stämme wurden Oberflächenstrukturen auf ihre Fähigkeit, als Vakzin zu dienen untersucht: Außenmembranproteine, Fimbrien, Pili und LOS. Das LOS ist wegen seiner Heterogenität als Immunogen ungeeignet, kann aber als Träger eingesetzt werden.

Unter den integralen Membranproteinen sind alle Hauptproteine der äußeren Membran P1-P6 immunogen, die jeweiligen Antikörper haben bakterizide Wirkung. Da die Antikörper in natürlichen Immunantworten aber meist nur stammspezifisch sind, sucht man nach hochkonservierten Proteinen, die nicht nur bakterizide Antikörper induzieren, sondern auch eine breite Kreuzreaktivität unter klinischen NTHI-Isolaten aufweisen. Diese Bedingung erfüllen unter den Hauptproteinen nur *e*(P4) und P6, die anderen sind antigenisch sehr divers. *e*(P4) ist ein Lipoprotein von 29 kDa, das Antikörper induziert, die mit den *e*(P4)-Proteinen von vielen klinischen NTHI-Isolaten, wie auch bekapselten Stämmen kreuzreagieren und *in vivo* bakterizide Aktivität zeigen. Anti-*e*(P4) zusammen mit Antikörpern gegen das Lipoprotein PCP hatten einen synergistischen bakteriziden Effekt bei einer Vielzahl von klinischen NTHI-Isolaten (Green et al, 1991). Ähnliche synergistische Effekte wurden mit den Antikörpern gegen P6 und PCP erzielt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß ein Vakzin aus mehreren Membranproteinkomponenten effektiver ist und eine breitere Spezifität hat, als ein Außenmembranprotein alleine.

Unter den antigenisch konservierten Nebenproteinen der Außenmembran induzieren die Proteine Hpd, PCP und D15 bakterizide Antikörper, die zu einem partiellen Schutz in Tiermodellen führten (Akkoyunlu et al., 1997; Deich et al., 1990; Loosmore et al., 1997).

Auch nichtintegrale, Außenmembran-assoziierte Proteine wurden auf ihr Vakzinpotential untersucht. Aktive Immunisierung mit LKP-Pili oder passive Immunisierung mit anti-LKP-Pili-Serum konnte Chinchillas vor Otitis media, verursacht durch NTHI-Stämmen, die ähnliche Pili exprimierten, schützen (Brinton et al., 1989). Ähnliche Ergebnisse erzielte Barenkamp im Chinchilla-Modell mit

den Adhäsion-Proteinen HMW1 und HMW2 (Barenkamp, 1996). Da sie aber unter immunologischem Druck nieder reguliert werden, sind sie als Impfstoff eher ungeeignet. Ein potenzieller Vakzinkandidat ist das Außenmembran-assoziierte Protein NadN. Es hat ein Molekulargewicht von 63 kDa und ist unter bekapselten, wie auch in NTHI-Stämmen hoch konserviert. Zagursky konnte zeigen, daß das immunogene Protein die Produktion von kreuzreaktiven bakteriziden Antikörpern gegen homologe und heterologe NTHI induziert. Die passive Immunisierung von Rattenbabies mit rNadN-Antiserum führte zu einer 10fachen Reduktion der Bakteriämie (Zagursky et al, 2000).

Aussichtsreichste Kandidaten für ein Vakzin gegen nicht-typisierbare *H. influenzae* sind demnach die Proteine *e*(P4) und NadN, eventuell in Kombination mit dem Nebenprotein PCP.

5. Biosynthese und Recycling von NAD

5.1 Die biologische Bedeutung von NAD

NAD ist in allen lebenden Organismen ubiquitär und essentiell. Seine größte Bedeutung liegt in der Fähigkeit in vielen Redoxreaktionen als Cofaktor zu dienen. NAD gehört zur Gruppe der Nikotinamid-Nukleotide (= Pyridin-Nukleotide). Es besteht aus einem Pyridin-Ring, der mit Ribose über eine N-glykosidische Bindung verknüpft ist. Das Nikotinamid-Ribosyl ist mit Adenosin über eine Pyrophosphatbindung gekoppelt, so daß sich für NAD folgende Strukturformel ergibt:

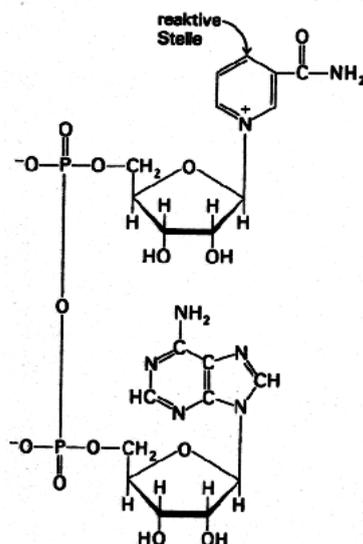
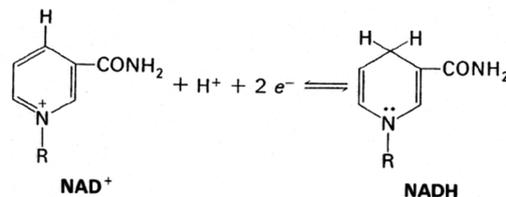


Abb. 1: Strukturformel von NAD.

NAD fungiert als Coenzym in einer großen Anzahl von Oxidoreduktasen (= pyridinabhängigen Dehydrogenasen). Während des katalytischen Prozesses ist das Coenzym locker an das Dehydrogenase-Protein gebunden. Der reaktive Teil des NAD-Moleküls ist das positiv geladene Nikotinamid-Ringsystem. Bei der Oxidation eines Substrats übertragen Dehydrogenasen ein Wasserstoffmolekül mit seinem Elektronenpaar (Hydridion) auf den Pyridinring, der zweite Wasserstoff geht als Proton in Lösung. Die reduzierte Form des Carriers, NADH, ist frei dissoziiierbar und verläßt das Dehydrogenase-Protein, um den Wasserstoff auf einen weiteren H-Akzeptor zu übertragen.

**Abb. 2: Reduktion von NAD zu NADH.**

Die vorherrschende Bedeutung von NAD im Organismus ist die Rolle im Energiemetabolismus. Chemotrophe Organismen sind auf ständige Energiezufuhr zur Erhaltung des Lebenszustandes sowie zur Neusynthese von Zellbestandteilen angewiesen. Die freie Energie wird aus der Oxidation von Nahrungsstoffen in der Glykolyse und anschließendem Citratzyklus und während der Fettsäureoxidation gewonnen. NAD nimmt die Elektronen und Protonen von den oxidierten Substraten auf und gibt sie in aerob wachsenden Zellen über eine Elektronentransportkette, eine Reihe von hintereinander geschalteten Proteinkomplexen über Cytochrome an Sauerstoff ab. Ziel dieser „biochemischen Knallgasreaktion“ ist die Bildung von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat (= oxidative Phosphorylierung). ATP stellt den universelle Überträger chemischer Energie zwischen Energie erzeugenden und Energie verbrauchenden Reaktionen dar. Unter anaeroben Bedingungen wird NAD regeneriert, indem es den Wasserstoff auf die Endprodukte der Gärung überträgt. Sie werden dadurch reduziert und ausgeschieden.

Neben der Funktion als Coenzym in Redoxreaktionen spielt NAD eine weitere Rolle als Substrat für die Synthese und Reparatur von DNA durch die prokaryotische DNA-Ligase und für die Modifikation von Proteinen durch ADP-Ribosyltransferasen als Regulationmechanismus (Rohrer et al., 1975). Ein Beispiel sind bakterielle Toxine, die die Übertragung einer ADP-Ribose von NAD auf eukaryotische Proteine katalysieren und somit den Organismus erheblich schädigen und auch töten können, wie etwa das Cholera-Toxin. Dies bakterielle Toxin wird in die eukaryotische Zelle aufgenommen und aktiviert dort die membrangebundene Adenylatcyclase durch ADP-Ribosylierung der α_s -Untereinheit des GTP-hydrolysierenden Protein ($G\alpha_s$). Die Folge ist ein permanent hoher cAMP-Spiegel, der zu Ionen-Imbalance im Darmlumen führt, die Auslösung von schwerer Diarrhoe.

Ein Intermediat der Biosynthese von NAD, das Nikotinsäure-Mononuklotid (NAMN) wird von Mikroorganismen benötigt, um unter anaeroben Bedingungen Vitamin B₁₂ (Cobalamin) zu synthetisieren, eine Fähigkeit, die höhere Organismen nicht besitzen (Jeter et al., 1984). Eine Rolle spielt es z. B. bei der Vergärung von Glutaminsäure zu Butyrat, Acetat, Ammonium und CO₂ durch *Clostridium tetanomorphum*.

Die große Bedeutung von NAD an vielen unterschiedlichen Einsatzorten in der Zelle führt dazu, daß schon kleinere Schwankungen in der Konzentration (0,8 mM) enorme Ausmaße auf die zelluläre Physiologie und das Wachstum haben können. In den folgenden Kapiteln wird die NAD-Synthese in Mikroorganismen und die Fähigkeit der Zelle, durch einen regulierten Umsatz die intrazelluläre NAD-Konzentration konstant zu halten, dargestellt (siehe Review Penfound und Foster, 1996).

5.2 Die Synthese von NAD

Da NAD von essentieller Bedeutung ist, sind die meisten Organismen in der Lage das Coenzym selbst zu synthetisieren (de novo Synthese) und aus Vorläufern zu regenerieren (Pyridin-Nukleotid-Zyklen, PNCs). Die de novo Synthese von NAD unterscheidet sich erheblich zwischen Prokaryonten und Eukaryonten. Während bei Eukaryonten die Synthese von Tryptophan ausgeht, konnte bei *E. coli* und *S. typhimurium* gezeigt werden, daß Bakterien Aspartat für die NAD-Synthese nutzen (Yanofsky, 1954). Aspartat wird durch den NadA-NadB-Enzymkomplex oxidiert und mit Dihydroxyl-Azetonphosphat zu Quinolinat aufgebaut (Suzuki et al., 1973). Die Aspartat-Oxidase NadB unterliegt hierbei einer Feedback-Inhibition durch NAD. Da die folgenden Enzyme

des de novo Wegs nicht reguliert sind, stellt NadB den Hauptregulationspunkt der NAD-Synthese dar (Nasu et al., 1982). Quinolinat wird anschließend decarboxyliert und mit Ribose-5-Phosphat aus Phosphoribosyl-Phosphat zu Nikotinsäure-Mononukleotid (NAMN) verknüpft (Hughes et al., 1991). NAMN ist ein wichtiges Intermediärprodukt, da auch die Pyridin-Nukleotid-Zyklen in diese Verbindung münden. Der weitere Verlauf der de novo Synthese ist mit den PNCs identisch. Das NAMN wird durch die Adenyltransferase NadD mit AMP zu Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid (NAAD) verestert. Die NAD-Synthetase NadE aminiert schließlich NAAD zu NAD (Spencer und Preiss, 1967).

Obwohl NAD-abhängige Redoxreaktionen kein NAD verbrauchen, ist in der Zelle ein permanenter NAD-Turnover zu beobachten: die Halbwertszeit von NAD liegt unter aeroben Bedingungen bei 90 Minuten (Park et al., 1989). NAD wird durch noch nicht vollständig geklärte Prozesse abgebaut, bzw. verbraucht und kann dann durch Recycling der Abbauprodukte wieder neu synthetisiert werden. Hierfür wurden in *E. coli* und *S. typhimurium* drei Hauptwege beschrieben, die Pyridin-Nukleotid-Zyklen (PNCs). Sie degradieren NAD enzymatisch, um dann über verschiedene Wege wieder NAMN aufzubauen. Aus NAMN wird durch den letzten Schritt der de novo Synthese NAD gebildet (Preiss und Handler, 1958). Der Vorteil der PNCs ist die Nutzung der energetisch günstigen Konservierung des Pyridin-Rings der Vorläuferprodukte, welchen die Zelle Vorrang gegenüber der de novo Synthese gibt.

Die Enzyme, die für den NAD-Verbrauch verantwortlich sind, konnten bis jetzt noch nicht identifiziert werden. Es ist bekannt, daß NAD für einige Enzymreaktionen als Substrat dient. Ein Beispiel ist die DNA-Ligase, die die Energie aus der Pyrophosphat-Bindung des NAD für Reparatur-, Rekombinations- und Replikationsprozesse nutzt. Ersetzt man aber die NAD-abhängige DNA-Ligase durch die ATP-abhängige DNA-Ligase aus dem T4-Phagen, so ist keine signifikante Abschwächung des NAD-Turnover zu beobachten (Park et al., 1989). Verantwortlich für den NAD-Verbrauch könnte auch die kovalente Modifizierung von Proteinen mit NAD sein. Da beobachtet wurde, daß der NAD-Umsatz unter aeroben Bedingungen drei- bis vierfach höher ist als unter anaerobem Wachstum, wäre es auch möglich, daß bis jetzt noch unbekannte NAD-abhängige Enzyme Sauerstoffschäden an Membran und DNA reparieren und so die Hauptursache des NAD-Verbrauchs darstellen (Park et al., 1989).

Von den drei beschriebenen PNCs sind zwei, PNC IV und PNC V, für die NAD-Bildung aus intrazellulären Pyridinen verantwortlich, während PNC VI NAD aus Pyridinen aus der Umwelt

synthetisiert. Der Pyridin-Nukleotid-Zyklus IV stellt den Hauptrecycling-Weg dar und besteht aus 4 Reaktionen. Der Abbau von NAD zu NAMN erfolgt durch die NAD-Pyrophosphatase, die NAD zu NMN spaltet, das anschließend zu NAMN desaminiert wird. NAMN ist das Zwischenprodukt von allen PNCs, aus dem in zwei Schritten dem de novo Weg folgend NAD gebildet wird (Hillyard et al., 1981). Der fünf-Schritte-Zyklus PNC V beginnt mit der von der NAD-Glykohydrolase katalysierten Spaltung von NAD zu Nikotinamid. Dieses wird zur Nikotinsäure desaminiert und durch die NA-Phosphoribosyl-Transferase zu NAMN aufgebaut (Foster und Holley, 1981). Der PNC VI braucht sechs Enzymreaktionen, um NAD zu degradieren und wieder aufzubauen. Er beginnt mit der Spaltung von NAD zu Nikotinamid-Mononukleotid (NMN), das durch die NMN-Glykohydrolase zu Nikotinamid (NA) abgebaut wird (Andreoli et al., 1972). Die Bildung von NAMN läuft dann analog zu der des Zyklus V ab.

Die NMN-Glykohydrolase unterliegt einer Feedback-Inhibition durch NAD, GTP, AMP und ADP-Ribose und stellt einen allgemeinen Kontrollpunkt dar, indem es den Pyridinfluß zwischen den Zyklen IV und VI reguliert (Foster, 1981). Eine weitere Regulationsstelle der Recycling-Zyklen ist die NA-Phosphoribosyl-Transferase. Sie wird durch Feedback-Inhibition durch NAD reguliert: ist der interne NAD-Level zu hoch, wird NA ausgeschieden, das später bei Bedarf wieder aufgenommen werden kann (Foster et al., 1979). Die NA-Phosphoribosyl-Transferase wird kodiert von dem Gen *pncB*, das mit den Genen der Quinolinat-Synthetase des de novo Wegs, *nadA* und *nadB*, das *nad*-Regulon bildet. Es unterliegt einer transkriptionellen Kontrolle durch den Repressor NadR, der mit NAD als Co-Repressor an die drei Gene binden kann. Es konnten für *nadA* und *nadB* je zwei NAD-Boxen als Bindungsstellen und für *pncB* eine NAD-Box identifiziert werden. Dies deutet darauf hin, daß die beiden Gene des de novo Wegs stringenter reprimiert werden, um aus energetischen Gründen den PNCs den Vorrang zu geben (Foster et al., 1987). Weiter wurde NadR auch als mögliches NAD-Syntheseenzym beschrieben (Raffaelli et al., 1999). Die dritte Funktion des bifunktionalen Regulators NadR wird im Zusammenhang mit den Nukleotidtransport-Mechanismen erläutert (siehe Review Penfound und Foster, 1996).

5.3 Die Aufnahme von NAD

E. coli und *S. typhimurium* können exogene Pyridine wie Nikotinsäure, Nikotinamid, Nikotinamid-Ribosyl, NMN und NAD aufnehmen (Liu et al., 1982 und McLaren et al., 1973).

Gekoppelt mit den PNCs bedeutet die bevorzugte Aufnahme von Pyridinen gegenüber der de novo Synthese ein signifikantes Einsparen von Energie. Aufgenommenes NAD wird aber nicht direkt inkorporiert, sondern vor dem Transport von der Membran gebundenen NAD-Pyrophosphatase, kodiert von *pnuE*, zu NMN und AMP degradiert (Falconer et al., 1984). NMN kann jetzt von dem NadR-PnuC-Transporter aufgenommen werden. Das Protein PnuC ist ein integrales Membranprotein, das als Permease für die Aufnahme von NMN essentiell ist (Spector et al., 1985). Der bifunktionelle Regulator NadR wurde schon als Transkriptions-Repressor beschrieben, fungiert hier aber als Transportaktivator. NadR ist für die Aufnahme von NMN zwar nicht essentiell, aktiviert aber PnuC bei niedrigen NAD-Konzentrationen (Zhu und Roth, 1991). Unter diesen Bedingungen bindet NadR ATP, erfährt dabei eine Konformationsänderung und wird zum Transport-Aktivator, während bei hohen NAD-Konzentrationen NadR dieses bindet und dadurch zum Transkriptions-Repressor für die de novo Synthese wird.

NMN kann aber auch von der membrangebundenen NMN-Glykohydrolase zu Nikotinamid degradiert werden, das über die Zytoplasmamembran aufgenommen wird. Für *E. coli* wurde hierfür ein NA-Bindeprotein beschrieben (Griffith und Leach, 1973). Die Aufnahme von Nikotinsäure ist ein Energie unabhängiger Diffusionsprozeß (McLaren et al., 1973), dabei kann die Nikotinsäure am effektivsten als protonierte Form den Lipidbilayer penetrieren (siehe Review Penfound und Foster, 1996).

5.4 *Pasteurellaceae* und Faktor V

Die Familie *Pasteurellaceae* zeichnet sich dadurch aus, daß ihr die meisten Enzyme für die NAD de novo Synthese und für die Pyridin-Nukleotid-Zyklen fehlen. Mitglieder dieser Familie müssen Pyridin-Nukleotide (Faktor V) aus ihrer Umwelt aufnehmen, entweder als NAD, oder in Form einer begrenzten Anzahl von Vorläufern (Niven und O'Reilly, 1990). Das Ausmaß dieser Pyridin-Nukleotid-Auxotrophie ist ein wichtiges Merkmal für die Klassifizierung der einzelnen *Pasteurellaceae* Spezies. NAD-abhängige Stämme benötigen den Faktor V als Zusatz im Wachstumsmedium, der eine intakte Pyridin-Ribosebindung mit einer aminierten Pyridin-Carbonylgruppe aufweisen muß. Daher können außer NAD noch NMN und Nikotinamid-Ribosyl (NR) als Faktor V-Quelle dienen, während Quinolinat, Nikotinsäure, Nikotinamid (NA) und NAMN nicht verwertet werden können (O'Reilly und Niven, 1986). Das aufgenommene NR wird

dann intrazellulär unter Verbrauch von ATP phosphoryliert zu NMN, das durch die NMN-Adenyltransferase mit AMP zu NAD verknüpft wird (Cynamon et al., 1988). Die NAD-unabhängigen Spezies der Gruppe *Pasteurellaceae* zeichnet die Fähigkeit aus, Nikotinamid, das in den meisten komplexen Medien vorhanden ist, als NAD-Vorläufer zu nutzen, (O'Reilly und Niven, 1986). Sie besitzen das Enzym NA-Phosphoribosyl-Transferase, das aus Phosphoribosyl-Pyrophosphat und Nikotinamid NMN bilden kann und so die Nutzung von NA als Faktor V-Quelle erlaubt. Innerhalb des Genus *Haemophilus* wurden *H. ducreyi*, *H. aphrophilus* und *H. haemoglobinophilus* als NAD-unabhängig beschrieben, während *H. influenzae* und *H. parainfluenzae* Faktor V-abhängig sind. Martin et al. konnte in *H. ducreyi* ein Plasmid identifizieren, das das Gen *nadV* trägt, das für die NA-Phosphoribosyl-Transferase kodiert. Durch Transformation des Plasmids in *H. influenzae* wurde gezeigt, daß das Plasmid fähig ist, NAD-Unabhängigkeit zu vermitteln, da der transformierte *H. influenzae*-Stamm ohne zusätzlichen Faktor V wachsen konnte. Bei anderen NAD-unabhängigen *Pasteurellaceae* Spezies wurde dieses Gen ebenfalls identifiziert, war aber meistens chromosomal kodiert. In NAD-abhängigen *Pasteurellaceae*, wie auch in Bakterienfamilien, die die Gene für die NAD de novo Synthese und für die PNCs besitzen (*Enterobacteriaceae* und *Bacillaceae*), konnte *nadV* nicht nachgewiesen werden (Martin et al., 2001).

6. Zielsetzung dieser Arbeit

Um den Umstand der NAD-Auxotrophie bei *H. influenzae* zu klären, sollten mögliche NAD-Aufnahmesysteme identifiziert werden. Bisher war bei *H. influenzae* nur bekannt, daß außer NAD auch NMN und NR als Faktor V-Quelle dienen können. Mit Blick auf die NAD-Aufnahme in *E. coli* und *S. typhimurium* wurde deshalb vermutet, daß auch bei *H. influenzae* der Aufnahme von NAD eine Prozessierung voraus geht. Ein Enzym, daß hierbei beteiligt sein könnte, ist das Außenmembranprotein *e(P4)*. Ziel dieser Arbeit war es daher, Proteine, die an der Prozessierung und Aufnahme von NAD beteiligt sind, zu identifizieren und zu charakterisieren. Das Verstehen der NAD-Aufnahme von *H. influenzae* stellt dann einen ersten Schritt zur Entwicklung alternativer antimikrobieller Therapien, z. B. in Form eines NAD-Analoges dar.

C. Material

1. Bakterienstämme

Die Bakterienstämme wurden als Glycerin-Kulturen bei -80 °C aufbewahrt. Zu 1 ml ÜN-Kultur wurden 500 µl 70 % Glycerin zugegeben und eingefroren. In den Tabellen 1 und 2 sind die verwendeten Bakterienstämme aufgelistet.

1.1 *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
XL1-Blue (S)	F' ::Tn10 <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lac</i> ^q D (<i>lacZ</i>)M15/ <i>recA1 endA1 gyrA96</i> (Nal ^r) <i>thi</i> <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>supE44 relA1 lac</i>	New England Biolabs
LE 392	F'e14(McrA ⁻) <i>hsdR514</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>supE44 supF58 lacY1</i> or D (<i>lacIZY</i>)6 <i>galK2 galT22 metB1 trpR55</i>	New England Biolabs

Tabelle 1: Stämme

1.2 *H. influenzae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
Rd KW 20	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd-f/F-Horgon, A. Wrights Isolat, ohne Kapsel	Wilcox
Hib	Typ b-Kapsel	Eagan, Isolat G. Siber
BRAD	Rd KW 20, <i>tfoX::strep</i> , Strp ^R	M. Rodenburg
REI1010	Rd KW 20, HI0206*, <i>nadN::cat</i> , Cm ^R	J. Reidl, 2000
REI1012	Rd KW 20, HI0693, <i>Δhel::kan</i> , Kan ^R	G. Kemmer, 2001

GK01	Rd KW 20, HI0693, <i>SwaI::cat</i> , Cm ^R	diese Arbeit
GK02	Rd KW 20, HI0693, <i>hel</i> _{D86L} , Cm ^R	diese Arbeit
GK03	Rd KW 20, HI0693, <i>hel</i> _{D84A} , Cm ^R	G. Kemmer, 2001
GK04	Rd KW 20, <i>nadN::cat Dhel::kan</i> , Cm ^R , Kan ^R	diese Arbeit
GK05	Rd KW 20, HI0139, <i>DompP2::cat</i> , Cm ^R	diese Arbeit
NTHI 01539	Klinisches Isolat	R. Mutters
NTHI 6418	Klinisches Isolat	E. Hartmann
GK06	NTHI 01539, HI0693, <i>Dhel::kan</i> , Kan ^R	diese Arbeit
GK07	NTHI 6418, HI0693, <i>Dhel::kan</i> , Kan ^R	diese Arbeit
JSB02	NTHI 01539, HI0206, <i>nadN::cat</i> , Cm ^R	J. Schmitt-Brauns
JSB03	NTHI 6418, HI0206, <i>nadN::cat</i> , Cm ^R	J. Schmitt-Brauns
GK08	Rd KW 20, HI0639, <i>hel</i> _{C21G} , Cm ^R	diese Arbeit
GK09	Rd KW 20, HI0639, <i>hel</i> _{C21G} , Cm ^R	diese Arbeit

Tabelle 2: **Stämme.** * *Haemophilus* Identifizierungsnummer (Fleischmann et al., 1995)

2. Plasmide, Oligonukleotide und Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide, Oligonukleotide und Antikörper sind in den Tabellen 1-3 beschrieben.

2.1 Plasmide

Plasmid	Vektor	Eigenschaften	Herkunft
pAKcat	pACYC177	Cm ^R , Kan ^R , <i>Tn10d-cat</i>	A. Kraiß, 1998
pJRP4	pACYC184	Cm ^R , <i>hel</i> -Gen	J. Reidl, 1996
pSEhel	pACYC184	Cm ^R , <i>hel</i> -Gen	G. Kemmer, 2001
pSEheldelkan	pSEhel	Cm ^R , Δ <i>hel::kan</i>	G. Kemmer, 2001
pGK01	pSEhel	Cm ^R , <i>SwaI::cat</i>	diese Arbeit
pSE1	pACYC177	Kan ^R , <i>nbpA</i> , <i>nadN</i>	J. Reidl, 2000
pSE2	pSE1	Kan ^R , Cm ^R , <i>nbpA</i> , <i>nadN::cat</i>	J. Reidl, 2000

Tabelle 3: **Plasmide**

2.2 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech AG und ARK hergestellt.

Oligonukleotide	Sequenz (5' - 3')
Für PCR-Amplifikation:	
P4CysKpnI5`	CGGGGTACCTCACACCAAATGAAATCAGAA
P4CysKpnI3`	CGGGGTACCGCCAGCTAAAACAAAAGCAGA
P4XhoI5`	TTACTCGAGACTATGTTAGACAACAGCCCT
P4XhoI3`	AGTCTCGAGTAAATCAGCCACAACCGCTTT
P4CAT3`	TGGTTTCATCCAACGACAACG
helBamHI	GGATTCATATGCACGCGGT
helEcoRV	TCGATATCACAAATGCGCTATTCTGACGG
P4delHpaI5`	CCGTTAACTTGAGGGGCTAAGCTCAGTT
P4delHpaI3`	GGGTTAACGGGTATAGTAAGTCTTTCTG
helScaI	TTGAGCTCTTGTTCCAGCTTTCACAGGCT
D84A-5`	AGCGGTTGTGGCTGCTTTAGATGAAACTATGTTAG
D84A-3`	CTAACATAGTTTCATCTAAAGCAGCCACAACCGCT
pACYCBamHI	TAAGGGGATGCGTCCGGCGTA
HI0206-R`	ACGCGCTATTTTTAGCCTAT
HI0206-L`	TAATCCCTTACCAATAGGAG
HI0206-5`	AAGATATCAACCACCCACGAATACCGTAG
HI0206-3`	AAGATATCTCGGTTGGCAAAGTGATGTCC
3`P2SnaBI-5`	AAATACGTAAAAGCAAGGGCGAATCGAAAGA
3`P2-3`	CCAGAACTAGAAAGTTTTAC
5`P2PstI-3`	AACTGCAGCTCCAATAGAATTGTCCAATCGCC
5`P2-5`	CACGCTTTATAGTGATAGCC

Für DNA-Sequenzierung:

P4seq1	GCCATCTATGATGAAAAACAC
P4seq2	GCGGTTGTGGCTGATTTAGA
P4seq3	GACAAATCAGCTAAAGCGGC
P4seq23`	TCTAAATCAGCCACAACCGC
CATseq5`	CAGGGACACCAGGATTTATT
CATseq3`	GTCGGCAGAATGCTTAATGA

Tabelle 4: Oligonukleotide

2.3 Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Herkunft
primäre Antikörper		
anti-P4	mAntikörper aus Hybridoma-Zelllinien	B. Green
anti-NucA	mAntikörper aus Hybridoma-Zelllinien	B. Green
sekundäre Antikörper		
anti-Maus	Serum aus Gans, gegen Maus-AK, alkalische Peroxidase konjugiert	Dianova

Tabelle 5: Antikörper

3. Chemikalien, Kits und Geräte

Die verwendeten Chemikalien, Enzyme und Materialien wurden von den Firmen Amersham, New England Biolabs, Boehringer, Difco, Fluka, Gibco-BRL, Merck, Oxoid, Pharmacia Biotech, Qiagen, Roth, Calbiochem Biotrend, Novagen Invitrogen, Applichem, BioRad, Eppendorf, Gilson, Greiner, MWG und Sigma bezogen. Die benutzten Laborkits und Geräte sind in den Tabellen 6 und 7 samt Hersteller aufgelistet.

3.1 Laborkits

Laborkit	Bezugsquelle
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
ECL-Hybridisierungskits	Amersham
Sequenzierkit	Amersham
Nucleobond AX Midi Kit	Macherey-Nagel
Elongase Enzyme Mix	Gibco BRL
PCR Supermix	Gibco BRL
Microcon PCR	Millipor
Ultrafree-DA	Millipor
D _c Protein Assay	BioRad

Tabelle 6: Laborkits

3.2 Geräteliste

Gerät	Hersteller
DNA-Sequencer	LI-COR Modell 4000
DNA-Elektrophoresekammer	MWG-Biotech
Elektroporationsgerät	EQUIBIO
French Press	SLM Aminco
Geldokumentationsanlage	BioRad
Hybridisierungssofen	Hybaid
Kühlzentrifuge	Sorvall RC5B
Netzgeräte	BioRad
PCR-Thermocycler	Eppendorf mastercycler gradient
Phosphoimager	Cyclone Storage Phosphor Screen, Packard
Protein-Elektrophoresekammer	BioRad
Schüttelinkubator	Celloshaker Renner
Schüttelwasserbad	GFL
Szintillationszähler	SL 6000SC, Beckman
Semi-Dry Transfer Cell	BioRad
Slab Gel Dryer	Hofer
Sonopuls	Bandelin Electronic

Tischzentrifuge	Heraeus Biofuge pico Heraeus Biofuge fresco
Transport-Assay-Gerät	Eigenbau Uni Konstanz
UV-Crosslinker	Pharmacia
Vakuumblotapparatur	Pharmacia

Tabelle 7: Geräte

4. Medien, Agar und Medienzusätze

Medien, Agar und Medienzusätze sind in den Tabellen 8, 9 und 10 angegeben. Medien für Flüssigkulturen und Agarplatten wurden 20 Minuten bei 120 °C autoklaviert. Alle Zusätze, die nicht hitzestabil sind, wurden sterilfiltriert und nach dem Abkühlen der Medien auf ca. 40 - 50 °C zugegeben. Wasser wurde immer in destillierter Form verwendet.

4.1 Medien

Medium (Firma)	Zusammensetzung
LB-Medium: (Gibco)	1 % Bactotrypton; 0,5 % NaCl; 0,5 % Hefeextrakt.
BHI-Medium: (Difco)	20 % Kalbshirminfusion; 25 % Rinderherzinfusion; 1 % Bacto Proteose Pepton; 0,2 % Bacto Dextrose; 0,5 % NaCl; 0,25 % Na ₂ PO ₄ .
MIV-Medium: (Barcack et al., 1999)	Lösung 21 (1 l): 4 g L-Asparaginsäure; 0,2 g L-Glutaminsäure; 1 g Fumarsäure; 4,7 g NaCl; 0,2 ml Tween 80; 0,87 g K ₂ HPO ₄ ; 0,67 g KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4. Lösung 22 (0,1 l): 0,04 g L-Cystin; 0,1 g L-Tyrosin; 0,06 g L-Citrullin; 0,2 g L-Phenylalanin; 0,3 g L-Serin; 0,2 g L-Alanin. Lösung 23 (0,1 l): 0,1 M CaCl ₂ . Lösung 24 (0,1 l): 0,1 M MgSO ₄ . Lösung 40 (0,1 l): 5 % (w/v) vitaminfreie Casaminosäuren. 100 ml MIV-Medium: 100 ml Lösung 21, 1 ml Lösung 22, 1 ml Lösung 23, 1 ml Lösung 40.

Minimalmedium (Mlc): (Herriott et al., 1970) **Lösung 1 (1 l):** 5,0 g L-Asparaginsäure; 13,0 g L-Glutaminsäure; 58,0 g NaCl; 10,0 g K₂SO₄; 4,0 g MgCl₂; 0,294 g CaCl₂; 0,037 g Na₂EDTA; 2,2 g NH₄Cl; pH 7,2. **Lösung 2:** Lsg. A), B) und C) im Verhältnis 1:1:1; A) 100 ml: 1 N HCl; 1,5 g L-Arginin; 0,15 g L-Glycin; 0,25 g L-Lysin; 0,5 g L-Methionin; 0,5 g L-Serin. B) 100 ml: 0,1 N HCl. C) 20 ml: 1 N HCl; 1,0 g Tyrosin. **Lösung 3 (0,1 l):** 0,1 % (v/v) Tween 80; 0,1 % (w/v) Polyvinylalkohol; 15 % (w/v) Glycerin; 4,0 g Natriumlaktat. **Lösung 4 (0,1 l):** 0,2 g Uracil; 0,04 g Hypoxanthin. **Lösung 5A (0,1 l):** 1,0 g Inosin; 1,74 g K₂HPO₃; 1,36 g KH₂PO₃. **Lösung 5B (0,1 l):** 1,0 g Inosin; 1,57 g Tris-HCl; 0,075 g KH₂PO₃; pH 7,4. **Lösung 6 (0,1 l):** 0,1 g Hämin; 0,1 g L-Histidin; 4 % Triethanolamin. **Lösung 7 (0,1 l):** 0,1 g NAD; 0,1 g Thiamin; 0,1 g Pantothersäure.

100 ml Mlc-Medium: 1 ml 1 N HCl; 20 mg L-Cystin; 10 ml Lösung 1; 6 ml Lösung 2; 2 ml Lösung 3; 5 ml Lösung 4; 20 ml Lösung 5A oder 5B; 1 ml Lösung 6; 40 µl Lösung 7; 55 ml H₂O; pH 7,2.

Tabelle 8: Medien

4.2 Agar

Medium (Firma)	Zusammensetzung
LB-Agar: (Gibco)	1 % Bactotrypton; 0,5 % NaCl; 0,5 % Hefeextrakt; 1,5 % Agar.
BHI-Agar: (Difco)	20 % Kalbshirminfusion; 25 % Rinderherzinfusion; 1 % Bacto Proteose Pepton; 0,2 % Bacto Dextrose; 0,5 % NaCl; 0,25 % Na ₂ PO ₄ ; 1,5 % Agar.
300 ml Schoko-Agar:	2,34 g Caseinpepton; 2,34 g Fleischpepton bzw. Bactopepton; 0,84 g Hefeextrakt; 1,68 g NaCl; 4,5 g Agar; 21 ml Vollblut; 300 µl NAD; 3 ml 10 % Glucose.
500 ml Mlc-Agar:	250 ml 2x Mlc-Medium; 3,4 % Agar; 250 ml H ₂ O.
500 ml Grüner Agar:	18,5 g BHI-Medium; pH 6,5; 1,5 % Agar; 0,8 mM Phenolphthalein-Diphosphat; 10 µg/ml Methylgrün.

Tabelle 9: Agar

4.3 Medienzusätze

Die Medienzusätze wurden von den Firmen Sigma und Fluka bezogen.

Zusätze	Endkonzentration	Stammlösung
NAD	15 μM	15 mM in H_2O
NMN	30 μM	30 mM in H_2O
NR*	15 μM	15 mM in H_2O
Hämin *	20 $\mu\text{g/ml}$	1 mg/ml Hämin 1 mg/ml L- Histidin 4 % Triethanolamin, H_2O
Hämoglobin *	10 $\mu\text{g/ml}$	2 mg/ml in 1 x PBS
Protoporphyrin IX (PPIX)*	20 $\mu\text{g/ml}$	1 mg/ml in 0,006 N NaOH
Ampicillin	6-50 $\mu\text{g/ml}$	50 bzw. 100 mg/ml in H_2O
Chloramphenicol	2-30 $\mu\text{g/ml}$	30 mg /ml in 100 % EtOH
Kanamycin	10-50 $\mu\text{g/ml}$	50 mg/ml in H_2O
Streptomycin	250 $\mu\text{g/ml}$	250 mg/ml in H_2O
Adenosin *	10-500 μM	500 μM
AMP*	20 mM	100 mM

Tabelle 10: **Medienzusätze*****Herstellungsprotokoll:**

Hämin: in Histidin, Triethanolamin und H_2O durch Erwärmen bei 65 °C für 30 Minuten lösen und sterilfiltrieren

Hämoglobin: in PBS lösen und durch einen 45 μm Filter bzw. durch einen 2 μm Filter sterilfiltrieren

Protoporphyrin: in NaOH durch leichtes Erwärmen lösen und sterilfiltrieren

NR: NMN wird mit Shrimp alkalischer Phosphatase und dem entsprechenden 10 x Puffer versetzen und für 1 h bei 37 °C inkubieren

Adenosin: in H₂O mit 5 M NaOH lösen, pH 6-7 mit HCl titrieren

AMP: siehe Adenosin

D. Methoden

Wenn nicht anders angegeben, sind allgemeine Methoden aus dem CSH Lab-Manual (Sambrook et al, 1989) und *H. influenzae* spezifische Methoden aus Barcak et al., 1991 entnommen.

1. Kultivierung von *H. influenzae*

Das BHI-Flüssigmedium und der BHI-Agar müssen mit dem Cofaktor NAD, NMN oder NR supplementiert werden. Als Protoporphyrinquelle können Hämin, Hämoglobin, Protoporphyrin IX (PPIX) oder 1 % Schafblut (Oxoid) dienen. Für anaerobes Wachstum in Flüssigkultur verwendet man einen Anaerocult, in dem man mit einem GasPak*Plus* ein sauerstoffarmes Milieu herstellt. Die Generationszeit für *H. influenzae* in BHI-Medium beträgt ca. 40 min. Die Zellen erreichen nach 2-4 h die log-Phase ($OD_{490\text{ nm}}$ 0,4 - 3).

2. Erstellen einer Wachstumskurve

Für eine Wachstumskurve werden 25 ml BHI_s oder Minimalmedium M1c-Medium von einer ÜN-Kultur auf $OD_{490\text{ nm}}$ 0,05 angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Man entnimmt der Kultur jede halbe Stunde ein Aliquot und mißt die optische Dichte. Die Kurve erstellt man, indem man die gemessenen Werte gegen die Zeit in ein Diagramm einträgt.

3. Molekulargenetische Methoden

3.1 Plasmidisolierung

Die Plasmidpräparationen wurden mit Hilfe der Plasmid-Kits der Firmen Qiagen und Macherey-Nagel durchgeführt (abgeleitet nach der Methode von Birnboim & Doly, 1979). In dieser Arbeit wurden nur Plasmidisolierungen nach großem Maßstab durchgeführt (Maxi-Präparation): 100-250 ml einer Übernachtskultur werden abzentrifugiert und das Pellet bei Raumtemperatur mit Resuspensions- und Lysierungspuffer versetzt. Nach 5 min gibt man den Neutralisationspuffer hinzu und inkubiert den Ansatz für 30 min auf Eis. Nach einem Zentrifugationsschritt für 30 min bei 4 °C

gibt man den Überstand auf eine equilibrierte Säule. Die gebundene DNA wird mit den entsprechenden Puffern gewaschen und eluiert. Man präzipitiert die Nukleinsäuren mit 0,7 Volumen Isopropanol, zentrifugiert sie ab und wäscht das Pellet mit 70 %igem Ethanol. Danach läßt man die DNA trocknen und nimmt sie in 100 - 200 µl H₂O auf.

3.2 Präparation von chromosomaler DNA

3.2.1 Präparation der chromsomalen DNA (Grimberg et al., 1989)

Hierbei wird 1 ml Übernachtskultur abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml TNE-Puffer (10 mM Tris pH 8; 10 mM NaCl; 10 mM EDTA) resuspendiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wird das Pellet in 270 µl TNEX-Puffer (TNE-Puffer, 1 % Triton X 100) aufgenommen, 30 µl Lysozym (5 mg/ml H₂O) zugefügt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend gibt man 15 µl Proteinase K (20 mg/ml H₂O) hinzu und inkubiert den Ansatz bei 65 °C. Wenn die Lösung klar ist, wird die DNA mit 100 %igem Ethanol gefällt, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 50-100 µl H₂O aufgenommen.

3.2.2 Freisetzen der chromosomalen DNA durch Aufkochen der Zellen

Es wird 1 ml Übernachtskultur 4 min bei 6000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl H₂O resuspendiert. Die Zellen werden dann für 2 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Zelltrümmer zentrifugiert man bei 13000 rpm für 3 min ab. Der Überstand enthält die freigesetzte DNA.

3.3 Spaltung der DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung von Plasmid- oder chromosomaler DNA wird die DNA mit einem Restriktionsenzym versetzt und mit einem für das verwendete Enzym geeignetem Reaktionspuffer für 1 h (Plasmid-DNA) bzw. 2-3 h (chromosomale DNA) bei 37 °C inkubiert. Für die vollständige Spaltung von 1 µg DNA wird im Reaktionsansatz 1 Enzymeinheit (Unit) der Restriktionsendonuklease eingesetzt. Das Enzymvolumen sollte maximal 1/10 des Gesamtvolumens betragen. Die genauen Reaktionsbedingungen sind den Herstellerangaben zu entnehmen. Die DNA-Fragmente werden anschließend durch eine Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

3.4 Horizontale Gelelektrophorese

Zur Herstellung des Gels wird 0,7 % Agarose in 1 x TAE aufgeköcht. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 50 °C gießt man sie luftblasenfrei in eine horizontale Elektrophorese-Kammer und setzt die Gelkämme ein. Sobald das Agarosegel polymerisiert ist, bedeckt man es mit Laufpuffer (1 x TAE) und entfernt die Kämme. Nun trägt man neben dem Größenstandard (1 kb-Leiter, Gibco) die DNA-Proben, versetzt mit 6 x Probenpuffer, auf das Gel auf. Nach Beendigung des Laufs wird das Agarosegel mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht fotografiert.

50 x TAE:	242 g Tris	6 x Proben	3 g Ficoll
	57,1 ml Eisessig	puffer:	50 mg Bromphenolblau
	100 ml 0,5 M EDTA (pH 8)		50 mg Xylencynol
	ad 1 l H ₂ O		ad 20 ml H ₂ O

3.5 Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Das gewünschte DNA-Fragment wird unter UV-Licht detektiert und der entsprechende Bereich aus dem Gel herausgeschnitten. Die Elution der DNA erfolgt nach Protokoll des QIAquick Gel-Extraktionkits (Qiagen) oder des Ultrafree-DA Kits (Millipor). Die Nukleinsäuren werden in 50 µl H₂O aufgenommen. Zur Überprüfung der DNA-Konzentration kann 1 µl auf ein Gel aufgetragen werden.

3.6 Southern Blot Analysen (Southern, 1975)

Die DNA wird mit geeigneten Restriktionsenzymen über Nacht gespalten und anschließend auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (2,5 h bei 110 V). Danach wird das angefärbte Gel mit einem fluoreszierenden Lineal photographiert, so daß später die Größen der Hybridisierungssignale bestimmt werden können. Das Gel wird erst 10 min in Hydrolysierungslösung (0,25 N HCl), dann 20 min in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) geschwenkt.

Zuletzt wird das Gel für 20-30 min in Neutralisierungslösung (0,5 M Tris/HCl; 1,5 M NaOH) geschüttelt. Dann wird die DNA mit einer Vakuumblot-Apparatur (VakuGeneBlotter) auf eine Nylonmembran (Hybond-N⁺) transferiert. Dazu legt man auf die Blotapparatur die Nylonmembran von der Größe des Gels und darüber eine Maske, die etwas kleiner als die Membran ist. Auf die Maske wird das Gel gelegt und mit 20 x SSC (17,53 % NaCl; 8,82 % Na-Citrat; pH 7,0) überschichtet. Durch Anlegen eines Unterdruckes von 50 mbar für eine Stunde wird die DNA auf die Membran transferiert. Nach dem Blotten wird sie kurz in 2 x SSC geschwenkt und auf Whatman-Papier getrocknet. Anschließend wird die DNA durch UV-Bestrahlung (UV-Crosslinker) kovalent an die Membran gebunden.

Die DNA-Sonden-Markierung und anschließende Hybridisierung wurde mit Hilfe des ECL-Kits der Firma Amersham durchgeführt (Enhanced Chemiluminescence). Dabei wird der positiv geladene Enzymkomplex der Meerrettich-Peroxidase mit Hilfe von Glutaraldehyd kovalent an die negativ geladene Sonden-DNA gebunden. Genauere Angaben zur Durchführung sind dem ECL-Protokoll zu entnehmen.

Die Vorhybridisierung erfolgt mit Hybridisierungsmix (ECL-Kit) für 1 h bei 42 °C. Er bewirkt das Blocken der Membran und verhindert unspezifische Signale. Zu diesem Mix wird anschließend die DNA-Sonde gegeben. Die markierten Oligonukleotide binden über Nacht bei 42 °C spezifisch an die einzelsträngige fixierte DNA. Nach der Hybridisierung wird die Membran mit der Waschlösung I (36 % Harnstoff; 17,53 % NaCl; 8,82 % Na-Citrat; 0,4 % SDS pH 7,0) bei 42 °C einmal für 20 min und zweimal für 10 min gewaschen. Anschließend folgt zweimaliges Waschen bei RT mit Lösung II (2 x SSC) für 5 min.

Für die Entwicklung des Blots wird die Membran in einem 1:1 Gemisch der beiden Detektionslösungen (ECL-Kit) bedeckt, für 1 min geschwenkt, in Cellophanfolie eingeschlagen und in eine Exponierkassette gelegt. Die Detektionslösungen enthalten Peroxidase und Luminol. Die Peroxidase reduziert das Wasserstoffperoxid zu Wasser und Superoxidionen. Diese oxidieren Luminol, das dadurch blaues Licht emittiert, welches einen auf die Membran gelegten Röntgenfilm schwärzt. Die Filme werden nach 1-5 min, bzw. nach 1 h entwickelt.

3.7 Ligation

Die Vektor- und Insert-DNA werden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten und aufgereinigt. Der Ligationsansatz enthält Vektor- und Insert-DNA im molaren Verhältnis von 1:3, 5 x Ligase-Puffer und T4-Ligase und wird über Nacht bei 14 °C im Wasserbad inkubiert.

3.8 Herstellung kompetenter Bakterienzellen zur DNA Transformation

3.8.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für die Elektroporation (Calvin und Hannawalt, 1988)

200 ml LB-Medium werden mit 10 ml einer *E. coli* Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,4-0,6 inkubiert. Danach zentrifugiert man die Zellen bei 5000 rpm für 5 min bei 4 °C ab. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 200 ml kaltem, sterilem H₂O resuspendiert und erneut pelletiert. Der Vorgang wird mit dem halben Volumen H₂O wiederholt. Das Pellet wird nun in 50 ml kalter, steriler 15 %iger Glycerinlösung resuspendiert und wieder abzentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstands nutzt man den im Zentrifugenröhrchen verbleibenden Glycerinrest für das Resuspendieren der Zellen. Die Bakterien werden in Aliquote von 70-100 µl bei -80 °C eingefroren.

3.8.2 Herstellung kompetenter *H. influenzae*-Zellen (Barcak et al., 1991)

35 ml vorgewärmtes BHI_s-Medium werden von Schokoplatte angeimpft. Die Kultur wird ohne Schütteln bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Danach schüttelt man die Zellen bei 37 °C, bis eine $OD_{490\text{ nm}}$ von 0,4-0,6 erreicht ist. Die Kultur wird bei 5000 rpm für 5 min abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 10 ml vorgewärmtem MIV-Medium resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt werden die Bakterien in 35 ml MIV-Medium (siehe Material 4.1) resuspendiert und für 90 min bei 37 °C langsam (100 rpm) geschüttelt. Die Zellen können nun direkt für die Transformation eingesetzt oder als Aliquote von 1,25 ml bei -80 °C gelagert werden.

3.9 Transformation kompetenter Zellen mit chromosomaler und Plasmid-DNA

3.9.1 Transformation von *E. coli*-Zellen (Calvin und Hannawalt, 1988)

Bei der Elektroporation werden die Zellen kurzzeitig einem elektrischen Feld (2,5 kV; 25 μ F; 200 Ω) ausgesetzt, das auf noch unbekannte Weise Poren in der Membran verursacht und somit die Aufnahme von chromosomaler und Plasmid-DNA erleichtert (Calvin & Hannawalt, 1988). Zu kompetenten Zellen auf Eis wird 0,5 μ g Plasmid-DNA pipettiert. Der Ansatz wird in gekühlten Elektroporationsküvetten elektroporiert (GenePulser). Die Zellen werden dann sofort in 1 ml LB-Medium überführt und für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend plattiert man die Bakterien auf Selektionsplatten aus.

3.9.2 Transformation von *H. influenzae*-Zellen

3.9.2.1 Transformation von MIV-kompetenten *H. influenzae*-Zellen (Barcak et al., 1991)

Es werden 250 μ l kompetente *H. influenzae*-Zellen bei 5000 rpm abzentrifugiert und mit 1 ml MIV-Medium gewaschen. Die Zellen werden dann in 250 μ l MIV-Medium resuspendiert und in ein kleines Reagenzglas überführt. Dazu gibt man 1-5 μ g chromosomale DNA oder 10-15 μ g Plasmid-DNA. Anschließend werden die Bakterien für 30-40 min bei 37 °C inkubiert und dann mit 1 ml vorgewärmten BHI_s-Medium versetzt. Danach inkubiert man den Ansatz für 90 min ohne Schütteln und für weitere 90 min mit Schütteln bei 37 °C. Anschließend plattiert man den Transformationsansatz auf Selektionsplatten aus.

3.9.2.2 Transformation von *H. influenzae* BRAD

Der Stamm *BRAD* ist eine konstitutiv kompetente *H. influenzae*-Mutante, die für Transformationen benutzt wird.

Es werden 10 ml BHI_s-Medium mit *H. influenzae* *BRAD* von einer Schokoplatte angeimpft. Die Kultur wird für 2-3 h bei 37 °C geschüttelt, bis sie eine OD_{490 nm} von 0,8-1,0 erreicht hat. Davon wird 1 ml in ein Reagenzglas pipettiert und DNA (Plasmid-DNA: 10 μ g; chrom. DNA: 1-5 μ g) zugegeben. Der Ansatz wird bei 37 °C für 30 min ohne Schütteln und für weitere 40 min mit Schütteln inkubiert und ausplattiert.

3.10 PCR-Analysen

Bei der PCR (polymerase chain reaction) nach Saiki et al, 1988, wird ein bestimmter DNA-Bereich gezielt amplifiziert. Dies geschieht durch die spezifische Bindung von zwei Oligo-nukleotiden (Primer) an die Matrizen-DNA, die von einer DNA-Polymerase aus thermophilen Bakterien am freien 3'-Ende verlängert werden. Die PCR beginnt mit der Denaturierung der DNA in Einzelstränge bei 95 °C. Anschließend folgt bei geeigneter Temperatur das Binden der Oligonukleotide (Annealing), von denen aus die Elongation der DNA bei 68-72 °C beginnt. Diese drei Schritte laufen zyklisch ab, so daß die Konzentration der kopierten DNA exponentiell ansteigt.

1. Elongase-Kit

1 µl dNTPs (10 mM)
 1 µl Primer 1 (0,5 µg/µl, 1:10)
 1 µl Primer 2 (0,5 µg/µl, 1:10)
 2 µl DNA-Template (10 ng/µl, 1:15)
 10 µl Puffer B
 1 µl Elongase Enzym Mix
 ad 50 µl H₂O

2. Supermix-Kit

46 µl Supermixlösung
 1 µl Primer 1 (0,5 µg/µl)
 1 µl Primer 2 (0,5 µg/µl)
 2 µl DNA-Template (10 ng/µl)

3.11 Sequenzierung von PCR-Fragmenten mit LI-COR

Bei dem automatischen Sequencer Modell 4000 (LI-COR) werden Fluoreszenz markierte Primer verwendet. Die entsprechend mit Fluoreszenzfarbstoff markierten DNA-Fragmente werden über ein Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und dabei mit einem Laserstrahl abgetastet. Dadurch wird der Fluoreszenzmarker zur Emittierung von Licht angeregt. Diese Signale werden detektiert, von einem Computer gespeichert und ausgewertet. Für die PCR-Reaktion werden zu jeweils 1 µl Terminationsmix A, C, G oder T (Sequenzier-Kit, Amersham) 3 µl DNA/Primer-Prämix (200 ng/kb DNA, 1 µl Primer (1 pmol), ad 12 µl H₂O) pipettiert. Die Ansätze werden gemischt, abzentrifugiert und mit einem Tropfen Paraffinöl überschichtet. Die Reaktion besteht aus 30 Zyklen zu folgenden Bedingungen: Denaturierung 15 s, 95 °C; Annealing 30 s; Elongation 15 s, 70 °C. Die Annealing-Temperatur liegt 2-3 °C über der Schmelztemperatur des Sequenzier-Primers.

Nach Beendigung der PCR wird zu jedem Ansatz 3 µl Stoppuffer pipettiert. Von den Proben werden jeweils 1,5 µl auf das Sequenziergel aufgetragen. Die Auswertung der Sequenzen erfolgt mit Hilfe der Computerprogramme „Blast-Search“ und „*Haemophilus influenzae* Rd Genome Sequence Search“ (Altschul et al, 1990).

4. Proteinbiochemische Methoden

4.1 Gewinnung von Proteinextrakten

4.1.1 Präparation des Gesamtzellextrakts

Die Zellen einer 1 ml Übernachtskultur werden bei 5000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und das Pellet in 60 µl PBS (0,8 % NaCl; 0,02 % KCl; 0,144 % Na₂HPO₄; 0,024 % KH₂PO₄; pH 7,4) resuspendiert. Dazu pipettiert man 15 µl 5 x Proben-Puffer und kocht den Ansatz für 10 min bei 95 °C auf. Nach dem Abzentrifugieren bei 13000 rpm für 5 min wird der Überstand bei -20 °C eingefroren.

4.1.2 Präparation von Außenmembranproteinen (Carlone et al., 1986)

4.1.2.1 Kleiner Maßstab

Eine 5 ml Übernachtskultur wird bei 4 °C für 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 1 ml gekühltem HEPES-Puffer (10 mM; pH 7,4) (Sigma) mit Proteaseinhibitor (Complete) gewaschen. Die Zellen werden wieder in HEPES-Puffer aufgenommen und für 6 x 10 Sekunden bei 40 Watt ultrabeschallt. Die ungeöffneten Zellen zentrifugiert man für 2 min bei 4 °C und 13000 rpm ab, davon den Überstand nochmals für 30 min bei 4 °C und 13000 rpm. Das Membranpellet resuspendiert man in 0,2 ml HEPES-Puffer und fügt 0,2 ml 2 % Sarcosyl (Sigma) in 10 mM HEPES-Puffer zu, um die Proteine herauszulösen. Dieser Ansatz wird bei RT unter mehrmaligem Mixen inkubiert. Nach 30 min zentrifugiert man bei 4 °C und 13000 rpm für 30 min ab und wäscht das Pellet mit 0,5 ml HEPES-Puffer. Die Proteine werden in 50 µl HEPES-Puffer aufgenommen und bei -20 °C eingefroren.

4.1.2.2 Großer Maßstab

Eine 1 l ÜN-Kultur zentrifugiert man für 10 min bei 5000 rpm ab und wäscht die Zellen in 500 ml NaCl (100 mM). Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen nimmt man das Pellet in 30 ml HEPES-Puffer (10 mM, pH 7,4) auf und lysiert die Zellen in einer French Press bei 1100 psi. Die ungeöffneten Zellen werden für 2 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Die Außenmembranproteine aus dem Überstand werden wie unter 4.2.1.1 beschrieben extrahiert und in HEPES-Puffer aufgenommen.

4.1.3 Präparation des Periplasma-Extrakt

Es werden 10 ml einer ÜN-Kultur bei 5000 rpm für 5 min abzentrifugiert und in geeignetem Puffer gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren zu gleichen Bedingungen nimmt man das Pellet in Polymyxin B (2 mg/ml in HEPES-Puffer) auf und inkubiert die Zellen für 10 min auf Eis. Danach zentrifugiert man die ungeöffneten Zellen bei 13000 rpm für 2 min ab. Der Überstand enthält nun die periplasmatischen Proteine und wird bei -20°C eingefroren.

4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem D_C Protein Assay (BioRad)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wird nach Anleitung des D_C Protein Assay Kits durchgeführt.

4.3 Auftrennung der Proteine durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Für die Auftrennung von Proteinen werden 12 %ige Gele verwendet. Die Gele bestehen aus einem Trenngel und einem Sammelgel. Sie werden nacheinander in eine vertikale Gelapparatur (BioRad) gegossen und mit einem Kamm für die Geltaschen versehen. Nach der Polymerisierung der Gele wird die Apparatur in eine Elektrophoresekammer eingesetzt. Die obere und untere Pufferkammer füllt man mit 1 x SDS-Laufpuffer. Die in 5 x Laemmli-Puffer gelösten Proteine werden bei 95°C für 10 min denaturiert und in die Geltaschen pipettiert. Für die Auftrennung legt man für ca. 45 min eine Stromstärke von 25 mA pro Gel an.

Trenngel		Sammelgel		5 x SDS-Laufpuffer	
Lsg B	2,5 ml	Lsg C	1,25 ml	Tris	15,1 g
Gelstock	4 ml	Gelstock	0,65 ml	Glycin	94 g
H ₂ O	3,45 ml	H ₂ O	3 ml	in 900 ml H ₂ O lösen	
10 % APS	50 µl	10 % APS	25 µl	SDS	50 ml
TEMED	5 µl	TEMED	5 µl	ad 1 l H ₂ O	
 Lösung B		 Lösung C		 Gelstock	
2 M Tris pH 8,875	ml	1 M Tris pH 6,85	ml	30 % Acrylamidstammllsg	
10 % SDS	4 ml	10 % SDS	4 ml	0,8 % Bisacrylamid	
H ₂ O	21 ml	H ₂ O	46 ml		

4.4 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen (Heukeshoven et al., 1987)

Die Silberfärbung ist eine hochsensitive Methode zur Sichtbarmachung von Proteinen. Sie beruht auf einer proteinspezifischen Reduktion von Silberionen zu elementarem Silber.

Nach der SDS-Gelelektrophorese wird das Gel für jeweils 30 min in den entsprechenden Lösungen fixiert und inkubiert. Danach wäscht man es dreimal in H₂O für 5 min. Anschließend wird das Gel für genau 20 min in Versilberungs-Lösung geschwenkt. Nach zweimaligem Waschen in H₂O badet man das Gel in Entwickler, bis die gewünschte Farbintensität erreicht ist. Die Reaktion wird mit der Stopplösung beendet.

4.5 Trocknen von SDS-Polyacrylamidgelen

Um ein SDS-Polyacrylamidgel haltbar zu machen, legt man es auf angefeuchtetes Whatman-Filterpapier und bedeckt es mit feuchter Klarsichtfolie. Das Gel wird dann auf dem Geltrockner (Hoefler) für 2,5 h bei 60 °C unter Vakuum getrocknet.

4.6 Immunoblot (Westernblot)

Für das Blotten der Proteine wird eine auf die Größe des Gels zurechtgeschnittene PVDF-Membran (Schleicher & Schuell) kurz mit Methanol benetzt und mit dem Polyacrylamid-Gel für 10 min in Towbin-Puffer (1,44 % Glycin; 0,3 % Tris; 20 % Methanol; pH 8,5) geschwenkt. Dann schneidet man 12 Stücke Whatman-Papier auf Gelgröße zu und befeuchtet sie ebenfalls mit Towbin-Puffer. Sechs dieser Papierstücke werden luftblasenfrei auf eine Semi-Dry Transfer Cell (Hoefer) gelegt, darauf die Membran, das Gel und die restlichen sechs Papiere. Die Blotkammer wird geschlossen und für 30 min eine Spannung von 15 V angelegt. Danach wird die PVDF-Membran mit den aufgetrennten Proteinen zunächst zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in TBS (0,8 % NaCl; 0,02 % KCl; 0,3 % Tris; pH 7,4) mit 2 % igem Milchpulver (BioRad) für 1 h bei RT geschwenkt. Anschließend gibt man den ersten Antikörper verdünnt in TBS/Milchpulver hinzu und schwenkt die Membran für eine weitere Stunde. Danach wäscht man sie dreimal für 5 min mit TBS. Den zweiten Antikörper verdünnt man in TBS/Milchpulver und gibt ihn auf die Membran, die man nach 1 h dreimal für 5 min mit TBS wäscht. Zur Detektion der Proteinbanden wird die Membran für 2-10 min in Detektionslösung (0,01 mg/ml X-Phos (AppliChem); 0,05 mg/ml Nitro-Blue-Tetrazolium (Sigma), 1M Tris pH 8,5) inkubiert, bis Proteinbanden sichtbar werden. Danach wäscht man die Membran kurz in H₂O und trocknet sie auf Whatman-Papier.

5. Phosphatase-Assays

5.1 Nachweis der Phosphatase-Reaktion mit pNPP (Malke, 1998)

Es werden 1 ml einer ÜN-Kultur bei 5000 rpm für 5 min abzentrifugiert, in 10 mM HEPES-Puffer (pH 6) gewaschen und erneut in 1 ml Puffer aufgenommen. Man stellt dann 250 µl Zellen auf OD_{490 nm} 1 ein und startet durch Zugabe von 25 µl pNPP (100 mM (Sigma) in 10 mM HEPES-Puffer) die Phosphatase-Reaktion. Nach leichter Gelbfärbung wird die Reaktion mit 1 ml NaOH (0,1 M) gestoppt und die Zeit Δt notiert. Anschließend zentrifugiert man die Zellen bei 5000 rpm für 5 min ab und mißt die Gelbfärbung des Überstands bei OD_{405 nm}. Die spezifische Aktivität errechnet man nach folgender Formel: $OD_{405\text{ nm}} / (18300 \times \Delta t)$ [1 µM pNPP/min x OD 1].

Der Assay kann auch mit Außenmembran-Proteinen unter gleichen Bedingungen durchgeführt werden.

5.2 Der Malat-Enzym-Assay (Geer et al., 1979)

Das Malat Enzym katalysiert die Umsetzung von Malat zu Pyruvat und reduziert dabei NADP zu NADPH. Für die Reaktion werden 900 µl Puffer (50 mM Tris-HCl; 0,34 mM NADP; 5 mM $MnCl_2$; pH 6) mit 60 µg OMP-Extrakt versetzt und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach zwei Stunden zentrifugiert man den Extrakt bei 13000 rpm für 5 min ab und gibt zu dem Überstand Malat (10 mM). Die Reaktion wird durch Zugabe von 5 µl Malat-Enzym (Sigma) gestartet und die Bildung von NADPH durch photometrische Messungen bei $OD_{340\text{ nm}}$ dokumentiert.

6. Herstellung des radioaktiv markierten Faktor V

Das (carbonyl- 14)NMN wird aus (carbonyl- 14)NAD (Amersham) hergestellt. Dazu inkubiert man (carbonyl- 14)NAD mit Schlangentoxin (Nukleotidpyrophosphatase, Sigma) in Shrimp alkalische Phosphatase Puffer für 1 h bei 37 °C. Das (carbonyl- 14)NR wird hergestellt, indem man einen Ansatz aus (carbonyl- 14)NAD, Schlangentoxin (Nukleotidpyrophosphatase), alkalischer Phosphatase aus *E. coli* und Shrimp alkalische Phosphatase Puffer für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach werden die Reaktionsansätze mit 100 %iger TCA gefällt, für 10 Minuten auf Eis inkubiert und bei 10000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Den pH-Wert des Überstands neutralisiert man mit NaOH.

7. Transport-Assay

Es werden 10 ml BHI_s von einer Vorkultur angeimpft und bei 37 °C inkubiert bis die Kultur $OD_{490\text{ nm}}$ 1 erreicht hat. Dann zentrifugiert man die Zellen bei 5000 rpm für 5 min ab und resuspendiert das Pellet in BHI. Man stellt 3 ml Kultur auf $OD_{490\text{ nm}}$ 2 ein und inkubiert sie auf einem Heizblock bei 37 °C. Es werden dann 1 µM radioaktiv markiertes Substrat zugegeben und alle 1, 3, 5, 7 und 9 min 500 µl Aliquote entnommen. Sie werden durch angefeuchtete ME 25 Membrane (0,45 µm; Schleicher & Schuell) durch Anlegen von Vakuum gefiltert. Nach anschließendem Waschen der Filter mit NaCl (0,1 M) gibt man sie in Vials, die 5 ml Szintillationsflüssigkeit enthalten (Emulsifier-Safe; Packard). Die Radioaktivität wird dann im Szintillationszähler (Beckman) gemessen.

8. Dünnschicht-Chromatographie

Es werden je 0,5 µl ^{14}C -NAD, ^{14}C -NMN und ^{14}C -NR als Referenz und je 2 µl einer radioaktiv markierten Probe auf eine Dünnschicht-Chromatographie-Platte (Cellulose F; Merck) aufgetragen und für 4 h in eine Laufkammer gestellt. Die Kammer enthält ein Laufmittel, bestehend aus Ammoniumacetat (1 M; pH 5) und Ethanol im Verhältnis 70:30. Nach der Auftrennung trocknet man die Platte und exponiert sie mehrere Tage einem radioaktiv sensitiven Film (Eastman Kodak).

9. Stammkonstruktionen

9.1 Konstruktion von *hel*-Deletionsmutanten in den *H. influenzae*-Stämmen

REI1012(*Dhel::kan*), REI1012b(*Dhel::kan*), GK06(*Dhel::kan*) und GK07(*Dhel::kan*)

Um das *hel*-Gen zu deletieren und durch eine Kanamycin-Kassette zu ersetzen, wurde das Gen mit den angrenzenden Bereichen via PCR amplifiziert. Als Matrize diente hierbei chromosomale DNA des Stamms Rd mit den Primern *hel*-5' und *helEcoRV*-3'. Das gereinigte PCR-Produkt enthielt am 3'-Ende eine *Bam*HI-Schnittstelle und wurde mit den Enzymen *EcoRV* und *Bam*HI gespalten. Das Plasmid pACYC184 (Rose, 1988) wurde ebenfalls *EcoRV* und *Bam*HI verdaut und mit dem PCR-Produkt ligiert. Das erhaltene Plasmid enthielt das Insert nicht den Schnittstellen entsprechend, sondern in umgekehrter Richtung und wurde pSE*hel* genannt. Die Deletion des *hel*-Gens wurde durch eine PCR-Reaktion mit pSE*hel* als Matrize erreicht, bei der die Primer Δ P4*Hpa*I-5' und Δ P4*Hpa*I-3' stromaufwärts und -abwärts des *hel*-Gens hybridisierten und so die *hel*-Gen-Region selbst bei der Amplifikation des Plasmids ausgespart. Das 6,35 kbp große PCR-Produkt wurde mit *Hpa*I gespalten und religiert zu dem Plasmid pSE Δ *hel*. Aus dem Plasmid pACYC177 (Rose, 1988) wurde mit *Hinc*II und *Stu*I das *kan*-Gen gespalten und in die *Hpa*I-Schnittstelle von pSE Δ *hel* ligiert. Das erhaltene Plasmid wurde pSE Δ *helkan* genannt und diente als Matrize für die Amplifikation der *Dhel::kan*-Region durch PCR mit den Oligonukleotiden *helSca*I-5' und pACYC184*Bam*HI. Das 3,5 kbp große DNA-Fragment wurde in die MIV-kompetenten Stämme Rd, Hib, NTHI 01539 und NTHI 6418 transformiert. Nach dem Cross-over des PCR-Produktes in das Chromosom der Stämme wurden Kan^R Zellen auf BHI-Agar mit Hämin (20 µg/ml), NMN (30 µM) und Kanamycin (10 µg/ml) selektiert. Die erhaltenen Stämme REI1012(Δ *hel::kan*), Hib REI12012b(Δ *hel::kan*), NTHI GK06(Δ *hel::kan*) und NTHI GK07(Δ *hel::kan*) wurden durch Southern Blot, PCR und Western Blot verifiziert (Kemmer et al., 2001).

9.2 Konstruktion von *nadN*-Knockout-Mutanten in den *H. influenzae*-Stämmen

REI1010(*nadN::cat*), REI1010b(*nadN::cat*), JSB02(*nadN::cat*) und JSB03(*nadN::cat*)

Das *nadN*-Gen wurde durch Insertion einer *cat*-Kassette in das ORF HI0206 zerstört. Dazu wurde in einer PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA des *H. influenzae* Stamms Rd und den Oligonukleotide HI0206-L` und HI0206-R` das *nadN*-Gen amplifiziert. Das gereinigte PCR-Produkt wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* gespalten und in das Plasmid pACYC177 ligiert, das zuvor mit *HincII* und *EcoRV* linearisiert wurde. Die mit *PstI* gespaltene *cat*-Kassette des Plasmids pAKcat wurde dann in die *PstI*-Schnittstelle des *nadN*-Gens des neu entstandenem Plasmid pSE1 ligiert. Das resultierende Plasmid pSE2 kodierte für das *nadN*-Gen, in das das *cat*-Gen in gleicher Orientierung inseriert wurde. Dieses Plasmid diente als Matrize in einer PCR-Reaktion für die Amplifizierung des Fragments HI0206::*cat* mit den oben genannten Oligonukleotiden. Das erhaltene 5 kbp große PCR-Produkt wurde dann in die MIV-kompetenten *H. influenzae* Stämme Rd, Hib, NTHI 01539 und NTHI 6418 transformiert. Nach dem „Cross-over“ des Fragmentes in das Chromosom der Stämme wurden die Zellen nach Chloramphenicolresistenz auf BHI-Agar mit Hämin (20 µg/ml), NMN (30 µM) und Chloramphenicol (2 µg/ml) selektiert. Die resultierende Stämme REI1010(*nadN::cat*), Hib REI1010b(*nadN::cat*), NTHI JSB02(*nadN::cat*) und NTHI JSB03(*nadN::cat*) wurden durch PCR und Southern Blot überprüft (Reidl et al., 2000).

E. Ergebnisse

1. Die Rolle von *e(P4)* bei der Häminaufnahme

Um die biologische Funktion von *e(P4)* zu untersuchen, wurde das *hel*-Gen im Stamm *H. influenzae* Rd durch Insertion eines Transposons ausgeknockt (Reidl et al., 1996). Es zeigte sich, daß die *hel*-Mutante nicht mehr fähig war, unter aeroben Bedingungen zu wachsen, wohingegen bei anaerobem Wachstum kein Unterschied zum Wildtyp festzustellen war. Das Wachstumsdefizit der Mutante konnte durch Zugabe von EDTA, ein Membran-destabilisierendes Agens, überkommen werden. Da *H. influenzae* unter aeroben Bedingungen Hämin-abhängig ist, wurde vermutet, daß *e(P4)* an der Aufnahme von Hämin oder dessen Vorläufer beteiligt ist. Um dies näher zu untersuchen, wurde das *hel*-Gen kloniert und in einem *E. coli hemA*-Stamm exprimiert. Diese *E. coli*-Mutante kann Hämin nicht mehr selbst synthetisieren, ist also darauf angewiesen, bei aeroben Wachstum Hämin oder Protoporphyrin aufzunehmen. Es wurde beobachtet, daß bei Anwesenheit von *e(P4)* der *hemA*-Stamm wieder aerob wachsen konnte. Daraus wurde abgeleitet, daß das Lipoprotein *e(P4)* an der Häminaufnahme beteiligt ist. Um diese These nachzuprüfen, wurde eine *hel*-Deletionsmutante hergestellt, die dann auf ihre Häminabhängigkeit getestet wurde.

1.1 Konstruktion der *hel*-Deletionsmutante REI1012($\Delta hel::kan$)

Da es sich bei der ursprünglichen *hel*-Mutante um eine *Tn10d-bla*-Insertionsmutante handelte, welche durch eine mögliche Exzision dieses Elementes instabil sein könnte, wurde das chromosomale Gen *hel* von *H. influenzae* komplett deletiert und anstelle eine Kanamycin-Kassette eingesetzt (siehe Methoden 10.1). Der erhaltene Stamm REI1012($\Delta hel::kan$) konnte hinsichtlich des *hel*-Phänotyps mit dem Plasmid pJRP4 komplementiert werden. pJRP4 ist ein Plasmid-Derivat des Klonierungsvektors pACYC184, in dessen *Bam*HI-Schnittstelle das *hel*-Gen kloniert wurde (Reidl et al., 1996). Die Stämme Rd, REI1012($\Delta hel::kan$) und die komplementierte Mutante wurden verifiziert durch PCR, Southern Blot Analysen (Kemmer et al., 2001) und wie in dieser Arbeit gezeigt durch Western Blot Analysen (Abb. 3).

Die Außenmembranprotein-Extrakte (OMPs) der Stämme *H. influenzae* Rd, REI1012($\Delta hel::kan$) und REI1012($\Delta hel::kan$), komplementiert mit pJRP4, wurden präpariert (siehe Methoden 4.1.2.1). Mit den Extrakten und dem gereinigten *e*(P4) (erhalten von B. Green, Wyeth-Lederle Vaccines, N. Y.) wurde ein Western Blot mit anti-*e*(P4)-Antikörpern angefertigt (siehe Methoden 4.7).

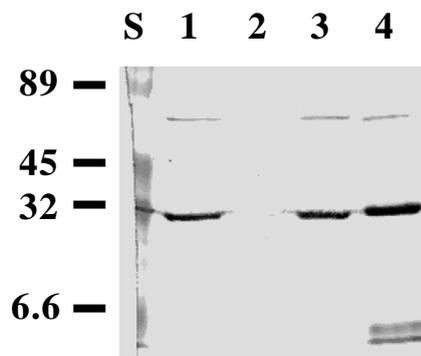


Abb. 3: Western Blot Analysen mit Außenmembranprotein-Extrakten (OMPs) (je 5 μ g) von den Stämmen *H. influenzae* Rd, REI1012($\Delta hel::kan$) mit Plasmid pACYC184 und REI1012($\Delta hel::kan$) mit pJRP4, und dem gereinigtem *e*(P4) (2 μ g). Spur S, BioRad Marker (No. 161-0324); Spur 1, OMPs von Rd; Spur 2, OMPs von REI1012($\Delta hel::kan$); Spur 3, OMPs von REI1012($\Delta hel::kan$) mit pJRP4; Spur 4, gereinigtes *e*(P4).

Der Western Blot zeigt in den Spuren 1 und 3 bei 29 kDa eine Bande, die das *e*(P4)-Protein des Stamms Rd und der Komplementante darstellt (Abb. 3). Ebenso ist auf gleicher Höhe das gereinigte *e*(P4) zu sehen (Spur 4). In Spur 2 fehlt durch die Deletion des *hel*-Gens im Stamm REI1010($\Delta hel::kan$) das Protein *e*(P4) (Abb. 3).

1.2 Die Wachstumsphänotypen der *hel*-Deletionsmutante REI1012($\Delta hel::kan$)

Um die Abhängigkeit der Hämin-Aufnahme von *e*(P4) nachzuprüfen, wurde der Wachstumsphänotyp der *hel*-Deletionsmutante bei hohen und niedrigen Konzentrationen von NAD und Hämin getestet. Dazu wurden die Stämme *H. influenzae* Rd, REI1012($\Delta hel::kan$) und die komplementierte Mutante auf BHI-Agarplatten ausgestrichen, die 1,5 μ M NAD und 100 μ g/ml Hämin bzw. 35 μ M NAD und 20 μ g/ml Hämin enthielten.

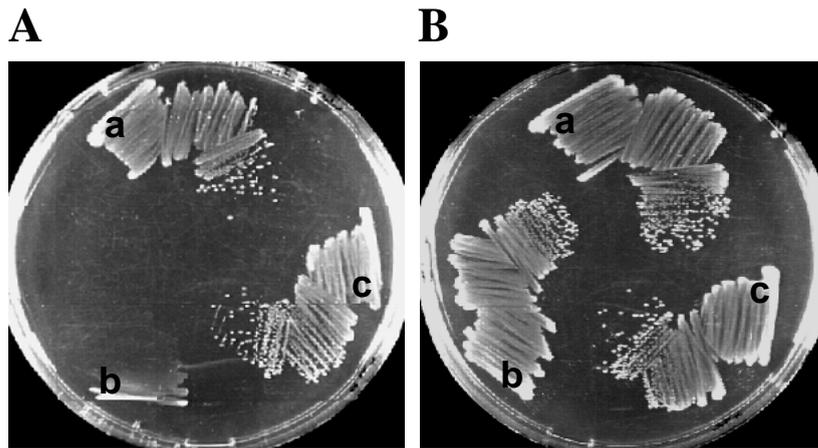


Abb. 4 Wachstumsphänotyp von *H. influenzae* Rd (a), REI1012($\Delta hel::kan$) mit Plasmid pACYC184 (b) und REI1012($\Delta hel::kan$) mit Plasmid pJRP4 (c) auf BHI-Agarplatten supplementiert mit verschiedenen Konzentrationen von NAD und Häm. **A)** Wachstum auf 1,5 μM NAD und 100 $\mu\text{g/ml}$ Häm; **B)** Wachstum auf 35 μM NAD und 20 $\mu\text{g/ml}$ Häm.

Der Stamm REI1012($\Delta hel::kan$) zeigt bei niedrigen Konzentrationen NAD ein signifikantes Wachstumsdefizit, das auch durch die erhöhte Häminkonzentration nicht überkommen werden konnte (Abb. 4/Ab). Die Komplementante wie auch der Stamm Rd waren fähig, unter diesen Bedingungen zu wachsen (Abb. 2/Aa,c). Erhöhte man aber die NAD-Konzentration, so konnte die *hel*-Mutante auch bei niedrigen Konzentrationen Häm zu wachsen (Abb. 4/Bb). Der Wachstumsphänotyp des Stamms REI1012($\Delta hel::kan$) ist daher von der NAD-Konzentration abhängig, Häm, wie ursprünglich vermutet, spielte hierbei keine Rolle.

2. Nachweis der Phosphatase-Funktion von *e*(P4)

Das Lipoprotein LppC von *Streptococcus equisimilis* ist an der Zytoplasmamembran lokalisiert, hat ein Molekulargewicht von 32,4 kDa, und wurde als saure Phosphatase beschrieben (Malke, 1998). Die Sequenz von LppC zeigt signifikante Homologien u. a. zu der sauren Phosphatase AphA in *E. coli* und zu *e*(P4) in *H. influenzae*. Um die Funktion des Lipoproteins *e*(P4) näher zu charakterisieren, wurden deshalb verschiedene Phosphatase-Assays durchgeführt.

2.1 Nachweis der Phosphatase-Aktivität von *e*(P4) auf Indikatorplatten

Da $e(P4)$ Homologien zu Phosphatasen in verschiedenen Organismen zeigt, wurde auf Indikatorplatten die Fähigkeit von $e(P4)$ getestet, das unspezifische Substrat Phenolphthalein-Diphosphat zu dephosphorylieren. Dazu wurden die *H. influenzae*-Stämme Rd, REI1012($\Delta hel::kan$) und die komplementierte Mutante auf Indikatoragarplatten, bestehend aus BHI-Agar, supplementiert mit Hämin (20 $\mu\text{g/ml}$), NMN (30 μM), Phenolphthalein-Diphosphat (0,8 mM) und Methylgrün (10 $\mu\text{g/ml}$) ausgestrichen. Durch die Dephosphorylierung des Substrats erscheinen die Bakterien grün.

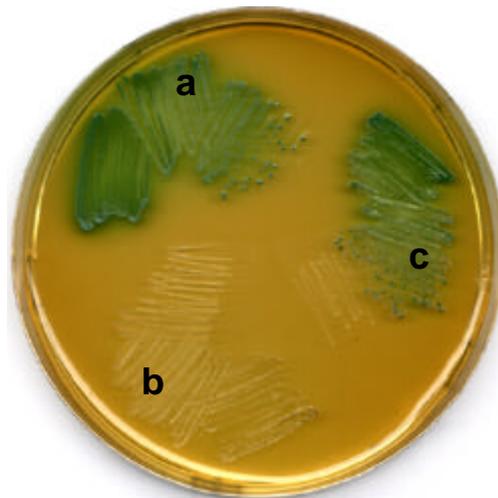


Abb. 5: Nachweis der Phosphatasefunktion von *H. influenzae* Rd (a), REI1012($\Delta hel::kan$) mit Plasmid pACYC184 (b) und REI1012($\Delta hel::kan$) mit Plasmid pJRP4 (c) auf einer Phosphatase-Indikatorplatte.

Die Grünfärbung von Rd und der Komplementante zeigte die Phosphatase-Aktivität der Stämme (Abb. 5a, c), während die *hel*-Deletionsmutante farblos blieb (Abb. 5b). Dies deutet darauf hin, daß die Phosphatase-Aktivität nur von $e(P4)$ abhängig ist, weitere Phosphatasen sind auf der Zelloberfläche nicht aktiv.

Der gleiche Versuch wurde mit Platten, die mit X-Phos supplementiert waren, durchgeführt. X-Phos ist ein unspezifisches Substrat für Phosphatasen, das durch Dephosphorylierung die Zellen blau färbt. X-Phos wurde aber nicht von $e(P4)$ erkannt, alle drei Stämme blieben farblos (Daten nicht gezeigt).

2.2 Nachweis der Phosphatase-Aktivität von $e(P4)$ mit dem pNPP-Assay

Um die Phosphatase-Aktivität von *e(P4)* nachzuweisen, wurden ein pNPP-Assay mit ÜN-Kultur-Zellen der *H. influenzae* Stämme Rd, REI1012($\Delta hel::kan$) mit Plasmid pACYC184 und REI1012($\Delta hel::kan$), komplementiert mit Plasmid pJRP4, durchgeführt. Die Zellen wurden in HEPES-Puffer (10 mM) mit pNPP (10 mM) inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion wurde dann die Gelbfärbung bei OD_{405 nm} photometrisch gemessen (siehe Methoden 6.1).

Es zeigte sich, daß sich die Reaktionsansätze der Stämme Rd und REI1012($\Delta hel::kan$), komplementiert mit Plasmid pJRP4, durch die Dephosphorylierung von pNPP zu pNP innerhalb von 5 Minuten gelb gefärbt hatten, während der Ansatz der *hel*-Mutante auch nach Inkubation von 40 Minuten bei 37 °C farblos blieb (Daten nicht gezeigt).

2.3 Bestimmung des pH-Optimums von *e(P4)*

Die Sequenz-Vergleiche von *e(P4)* mit LppC von *S. equisimilis* und AphA von *E. coli* deuten darauf hin, daß das Optimum der Phosphatase-Aktivität von *e(P4)* im sauren Milieu liegen könnte. Die genaue Bestimmung des pH-Optimums erfolgte durch pNPP-Assays mit dem Stamm Rd (siehe Methoden 6.1) in Reaktionspuffern mit verschiedenen pH-Werten.

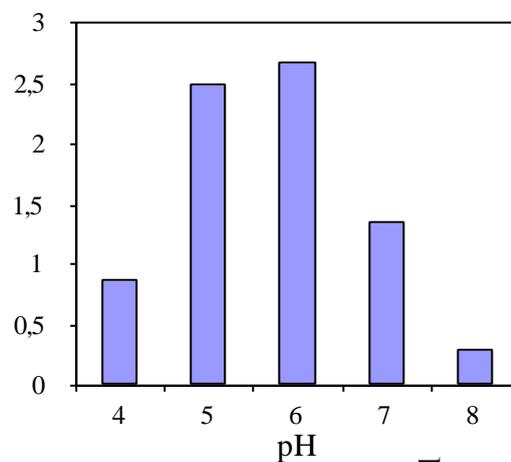


Abb. 6: Darstellung der pH-Abhängigkeit der Phosphatase-Aktivität von *e(P4)*. Die Säulen zeigen die durch pNPP-Assays ermittelte spezifische Aktivitäten bei pH 4, 5, 6, 7 und pH 8. Spez. Aktivität= $\Delta OD_{405}/(18300 \times \Delta t)$ [μM pNPP/min x OD 1].

Die Abbildung 6 zeigt, daß das pH-Optimum von *e(P4)* für die Phosphatase-Aktivität bei ca. pH 6 liegt.

3. Identifizierung des physiologisch relevanten Substrats von *e(P4)*

Da unter 1.3 festgestellt wurde, daß die Wachstumsfähigkeit der *hel*-Deletionsmutante von der NAD-Konzentration abhängt, wurde postuliert, daß *e*(P4) an der Aufnahme von NAD beteiligt ist. Um das physiologisch relevante Substrat von *e*(P4) zu identifizieren, wurde das Vermögen der *H. influenzae*-Stämme Rd, REI1012(Δ *hel::kan*) und REI1012(Δ *hel::kan*), komplementiert mit pJRP4, getestet, NAD und dessen Vorstufen NMN und NR zu spalten, aufzunehmen und als Faktor V-Quelle zu nutzen.

3.1 Dephosphorylierung des Faktors V durch *e*(P4)

Die Dephosphorylierung der 14 C-radioaktiv markierten Faktor V-Substrate NAD, Nikotinamid-Mononukleotid (NMN) und Nikotinamid-Ribosyl (NR) wurde anhand von Dünnschicht-Chromatographien getestet. Da es NADP nicht radioaktiv markiert zu kaufen gibt, konnte die Dephosphorylierung nur indirekt mit dem Malat-Enzym-Assay nachgewiesen werden.

3.1.1 NAD, NMN und NR als Substrat für *e*(P4)

Die OMPs der Stämme Rd, REI1012(Δ *hel::kan*) und REI1012(Δ *hel::kan*) mit pJRP4, wurden präpariert (siehe Methoden 4.1.2.2). Die Extrakte und das gereinigte *e*(P4) wurden mit 14 C-NAD, 14 C-NMN, 14 C-NR und 14 C-AMP versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden dann nach einer TCA-Fällung chromatographisch aufgetrennt, um anhand der Spaltprodukte das physiologisch relevante Substrat von *e*(P4) zu bestimmen (siehe Methoden 9).

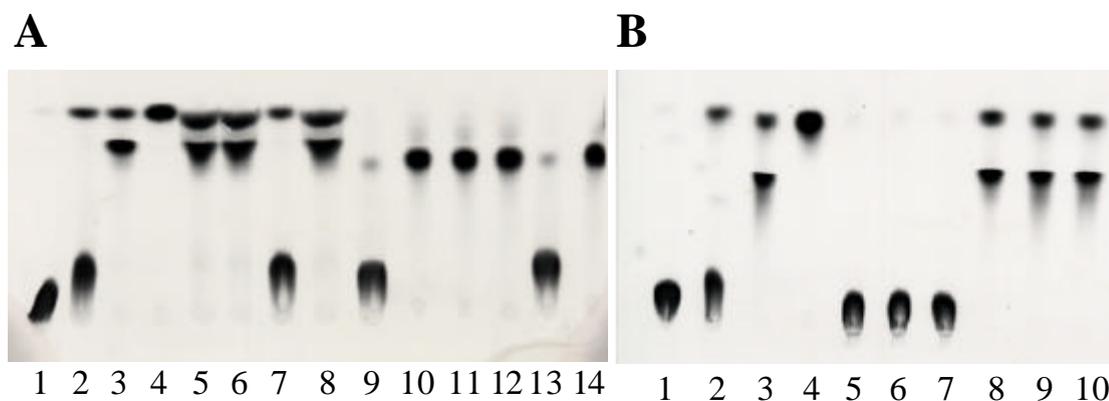


Abb. 7: Dünnschicht-Chromatographien von radioaktiv markiertem Faktor V und AMP als Substrat für *e*(P4). 14 C-NAD, 14 C-NMN, 14 C-NR und 14 C-AMP (je 10 nCi; 0,1 μ M) wurden inkubiert mit den Außenmembranprotein-Extrakten (OMPs) (je 10 μ g) von *H. influenzae* Rd, REI1012(Δ *hel::kan*) mit Plasmid pACYC184, REI1012(Δ *hel::kan*) mit pJRP4, und mit gereinigtem *e*(P4) (5 μ g).

A) ^{14}C -NMN und ^{14}C -AMP als Substrat für $e(\text{P4})$. Spur 1, ^{14}C -NAD; Spur 2, ^{14}C -NMN; Spur 3, ^{14}C -NR, Spur 4, ^{14}C -NA; Spur 5, ^{14}C -NMN inkubiert mit gereinigtem $e(\text{P4})$; Spur 6, ^{14}C -NMN inkubiert mit OMPs von Rd; Spur 7, ^{14}C -NMN inkubiert mit OMPs von REI1012($\Delta hel::kan$); Spur 8, ^{14}C -NMN inkubiert mit OMPs von REI1012($\Delta hel::kan$), pJRP4; Spur 9, ^{14}C -AMP; Spur 10, ^{14}C -Adenosin; Spur 11, ^{14}C -AMP inkubiert mit gereinigtem $e(\text{P4})$; Spur 12, ^{14}C -AMP inkubiert mit OMPs von Rd; Spur 13, ^{14}C -AMP inkubiert mit OMPs von REI1012($\Delta hel::kan$); Spur 14, ^{14}C -AMP inkubiert mit OMPs von REI1012($\Delta hel::kan$), pJRP4.

B) ^{14}C -NAD und ^{14}C -NR als Substrat für $e(\text{P4})$. Spur 1, ^{14}C -NAD; Spur 2, ^{14}C -NMN; Spur 3, ^{14}C -NR, Spur 4, ^{14}C -NA; Spur 5, ^{14}C -NAD inkubiert mit gereinigtem $e(\text{P4})$; Spur 6, ^{14}C -NAD inkubiert mit OMPs von Rd; Spur 7, ^{14}C -NAD inkubiert mit OMPs von REI1012($\Delta hel::kan$); Spur 8, ^{14}C -NR inkubiert mit gereinigtem $e(\text{P4})$; Spur 9, ^{14}C -NR inkubiert mit OMPs von Rd; Spur 10, ^{14}C -NR inkubiert mit OMPs von REI1012($\Delta hel::kan$).

In den Spuren 1, 2, 3, 4, 9 und 10 in Abbildung 7/A und in den Spuren 1, 2, 3 und 4 in Abbildung 7/B sind die verschiedenen Faktor V-Substrate als Kontrollen zu sehen. Wie die Spuren 5 und 6 der Abbildung 7A zeigen, wurde NMN von dem gereinigtem Protein und dem Rd-Extrakt zu NR dephosphoryliert. Der Extrakt von REI1012($\Delta hel::kan$) in Spur 7 hatte keine 5'-Nukleotidase-Aktivität, NMN blieb unverändert. Der Extrakt der komplementierten Mutante war wieder fähig NMN zu NR umzusetzen (Abb. 7/A, Spur 8). Auch AMP konnte als Substrat von $e(\text{P4})$ identifiziert werden, wie die Dephosphorylierung zu Adenosin durch das gereinigte $e(\text{P4})$ und durch die Extrakte von Rd und der Komplementante zeigten (Abb. 7/A, Spuren 11, 12 und 14). Die OMPs der *hel*-Mutante hatten auch hier keine Aktivität, es entstand kein Adenosin (Abb. 7/A, Spur 13). In Abbildung 7/B ist zu sehen, daß NAD und NR von $e(\text{P4})$, weder in gereinigter Form oder im Extrakt, als Substrat erkannt wurde. Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß $e(\text{P4})$ eine 5'-Nukleotidase-Aktivität mit NMN und AMP als Substrat nachgewiesen wurde, während NAD und NR als Substrat ausgeschlossen werden konnte.

3.1.2 Nachweis der Dephosphorylierung von NADP mit dem Malat-Enzym-Assay

Die Dephosphorylierung von NADP zu NAD durch $e(\text{P4})$ wurde mit dem Malat-Enzym-Assay nachgewiesen. Das Malat-Enzym setzt Malat zu Pyruvat um und reduziert dabei NADP zu NADPH. Die reduzierte Form NADPH hat im Gegensatz zum oxidierten NADP bei 340 nm ein Absorptionsmaximum. Die Reduktion von NADP läßt sich deshalb an der Veränderung der Lichtabsorption bei dieser Wellenlänge verfolgen (siehe Methoden 6.2). Für den Assay wurden die OMP-Extrakte der Stämme Rd und REI1012($\Delta hel::kan$) präpariert (siehe Methoden 4.1.2.2) und mit NADP (0.34 mM) bei 37 °C für 2 h vorinkubiert, damit das vorhandene NADP dephosphoryliert wird und somit für die Umsetzung des Malats zu Pyruvat nicht mehr zur Verfügung

steht. Nach zwei Stunden wurde dann dem Ansatz Malat (10 mM) zugefügt und die Reaktion durch Zugabe des Malat-Enzym gestartet. Um die Abhängigkeit der NADP-Dephosphorylierung von $e(P4)$ nachzuweisen, wurde in einem weiteren Ansatz die Phosphatase-Aktivität von $e(P4)$ durch AMP (20 mM) gehemmt.

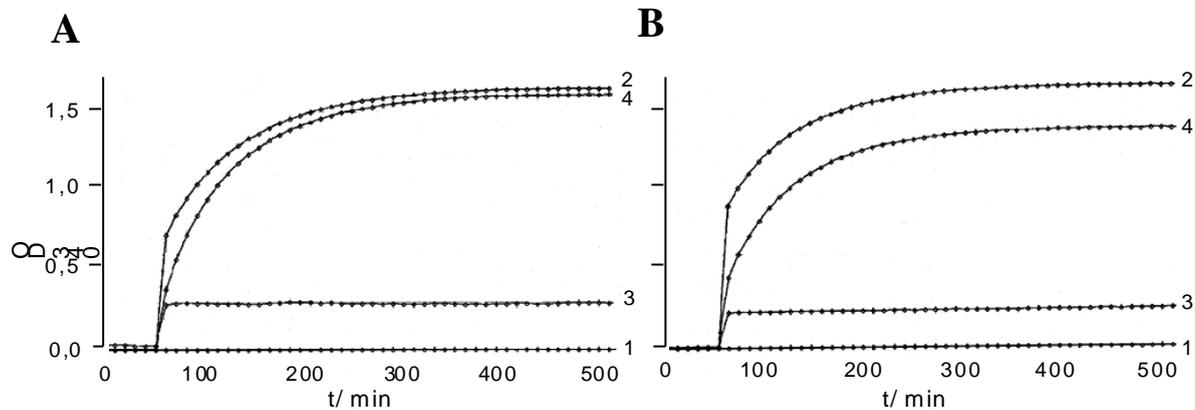


Abb. 8: Malat-Enzym-Assay zum Nachweis der NADP-Dephosphorylierung. A) Kurve 1: Reaktionsansatz mit NADP und Malat; Kurve 2: Reaktionsansatz mit NADP, Malat und Malat-Enzym; Kurve 3: Reaktionsansatz mit NADP, Rd-Extrakt, Malat und Malat-Enzym; Kurve 4: Reaktionsansatz mit NADP, REI1012($\Delta hel::kan$)-Extrakt, Malat und Malat-Enzym.

B) Kurve 1: Reaktionsansatz mit NADP, Malat und AMP; Kurve 2: Reaktionsansatz mit NADP, Malat, Malat-Enzym und AMP; Kurve 3: Reaktionsansatz mit NADP, Rd-Extrakt, Malat und Malat-Enzym; Kurve 4: Reaktionsansatz mit NADP, Rd-Extrakt, Malat, Malat-Enzym und AMP.

In Abbildung 8/A stellen die Kurven 1 und 2 die Negativ- und Positiv-Kontrollen dar. Kurve 3 zeigt eine starke Erniedrigung des Malatumsatzes, da das dazu benötigte NADP vorher durch den Rd-Extrakt zu NAD dephosphoryliert wurde und somit für die Bildung von Pyruvat nicht mehr zu Verfügung stand. Hingegen zeigte der REI1012($\Delta hel::kan$)-Extrakt keine Phosphatase-Aktivität, das NADP war deshalb noch intakt vorhanden und wurde von dem Malat-Enzym zu NADPH reduziert (Abb. 8/A, Kurve 4).

Die Hemmung der NADP-Dephosphorylierung durch AMP wird in Abbildung 8/B gezeigt. Während der Rd-Extrakt NADP effizient spalten konnte, hemmt in Ansatz 4 das AMP die Dephosphorylierung, so daß das eingesetzte NADP fast vollständig zu NADPH reduziert werden konnte.

3.2 Die Wachstumsphänotypen der Mutante REI1012($\Delta hel::kan$)

Da bisher nachgewiesen werden konnte, daß $e(P4)$ NMN und NADP dephosphorylieren kann und das Wachstum der *hel*-Mutante von hohen NAD-Konzentrationen abhängig ist, sollten die

Wachstumsphänotypen abhängig von Faktor V näher bestimmt werden. Dazu wurden die Stämme Rd, REI1012($\Delta hel::kan$) mit Plasmid pACYC184 und REI1012($\Delta hel::kan$), komplementiert mit pJRP4, auf BHI-Agarplatten mit Hämin (20 $\mu\text{g/ml}$) und verschiedenen Faktor V-Konzentrationen ausgestrichen.

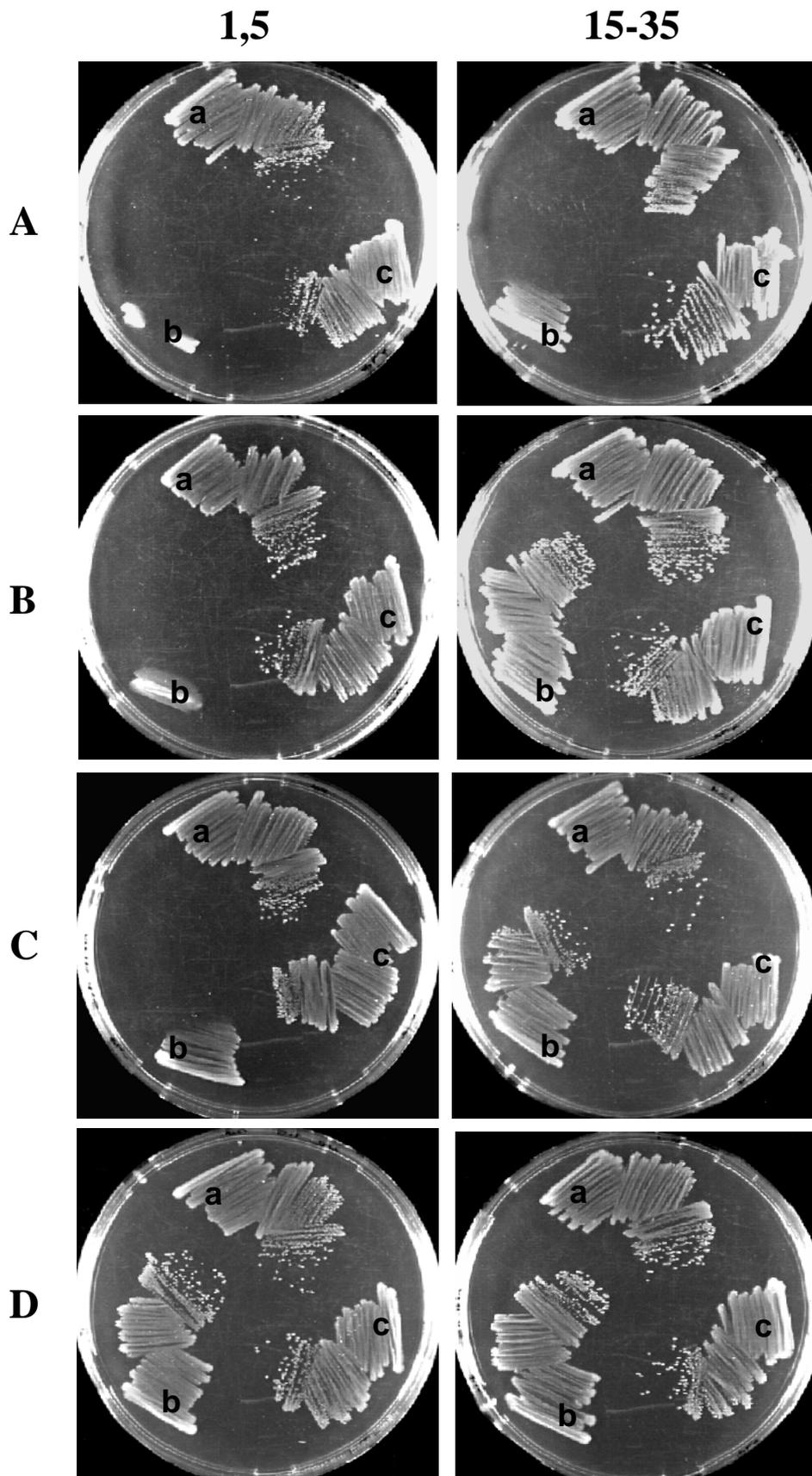


Abb. 9 Wachstumsphänotyp von *H. influenzae* Rd (a), REI1012(Δ hel::kan) mit Plasmid pACYC184 (b) und REI1012(Δ hel::kan), komplementiert Plasmid pJRP4 (c) auf BHI-Agarplatten supplementiert mit Hämin (20 μ g/ml) und verschiedenen Faktor V-Quellen. **A)** Wachstum mit 1,5 μ M und 35 μ M NADP. **B)** Wachstum mit 1,5 μ M und 35 μ M NAD; **C)** Wachstum mit 1,5 μ M und 15 μ M NMN; **D)** Wachstum mit 1,5 μ M und 15 μ M NR.

In Abbildung 9/A,B ist zu sehen, daß der *H. influenzae* Stamm Rd wie auch die Komplementante bei niedrigen Konzentrationen NADP, NAD und NMN (1,5 µM) fähig waren zu wachsen, wohingegen REI1012(Δ hel::kan) einen signifikanten Phänotyp zeigt (Abb. 9/A, B). Erst bei 35 µM NAD und 15 µM NMN konnte die Mutante wieder so gut wachsen, wie der Wildtyp. Mit NADP als Substrat führte auch die Erhöhung auf 35 µM nicht zum Wachstum der Deletions-Mutante (Abb. 9/C). Setzte man NR als Faktor V-Quelle zu, so war selbst bei niedrigen Konzentrationen kein Unterschied zwischen den Stämmen erkennbar (Abb. 9/D).

3.3 Aufnahme von ^{14}C -NAD, ^{14}C -NMN und ^{14}C -NR in REI1012(Δ hel::kan)

Um zu untersuchen, inwieweit die *e*(P4)-Mutante fähig ist, NAD und dessen Vorläufer aufzunehmen, wurden log-Phase-Zellen der Stämme *H. influenzae* Rd, REI1012(Δ hel::kan) mit Plasmid pACYC184 und REI1012(Δ hel::kan), komplementiert mit Plasmid pJRP4, mit ^{14}C -NAD, ^{14}C -NMN und ^{14}C -NR inkubiert. Nach 1, 3, 5, 7 und 9 Minuten wurden Proben entnommen, gefiltert und anschließend in einem Szintillationszähler gemessen (siehe Methoden 8).

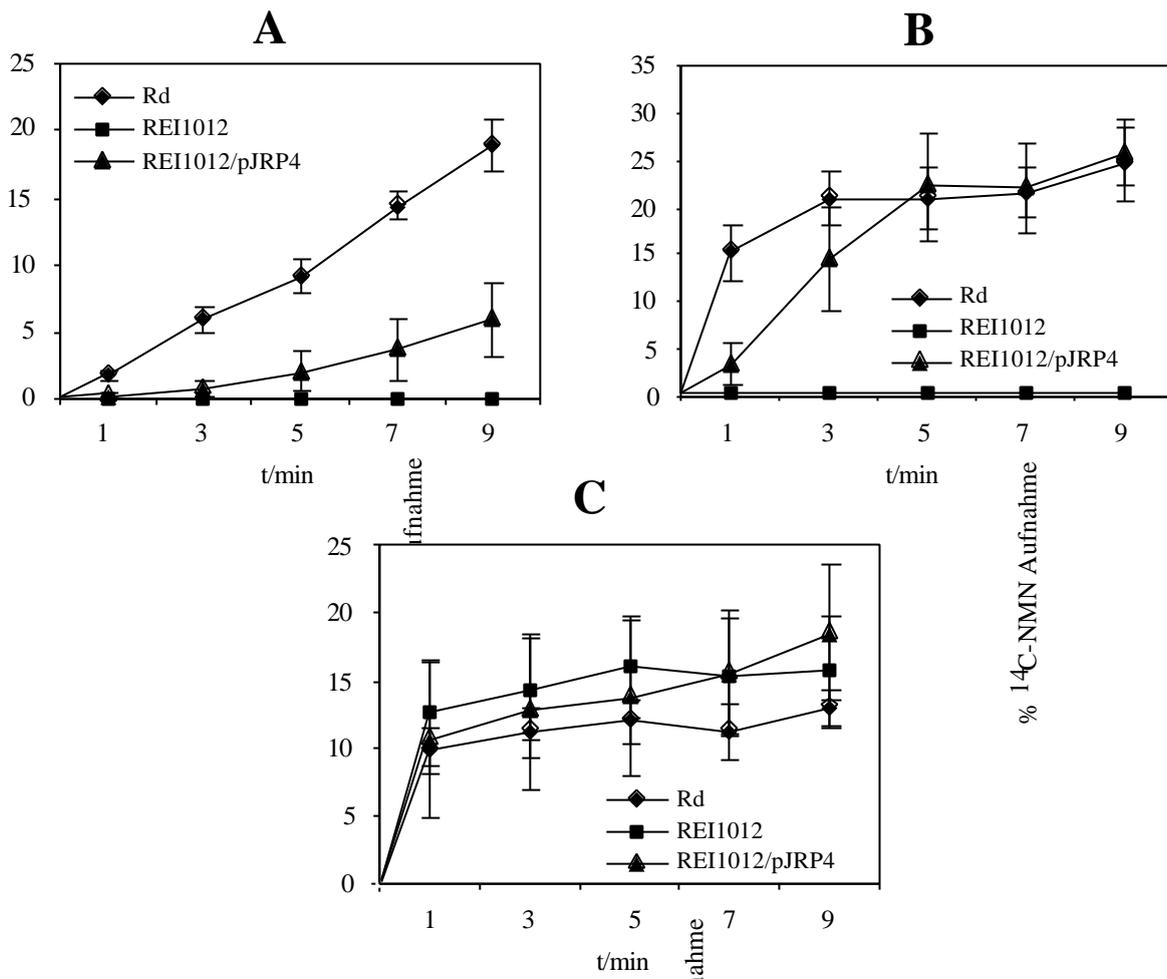


Abb. 10: Aufnahme von verschiedenen radioaktiv markierten Faktor V-Substraten von *H. influenzae* Rd, REI1012($\Delta hel::kan$) mit Plasmid pACYC184 und REI1012($\Delta hel::kan$) mit Plasmid pJRP4. Die Substratkonzentrationen betragen $1\ \mu\text{M}$ (spezifische Aktivität). Jeder Punkt repräsentiert den Durchschnittswert mit Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Messungen. Die Aufnahme des Faktor V ist angegeben als prozentualer Anteil Radioaktivität an der eingesetzten Menge von $1\ \mu\text{M}$ Substrat. **A)** Aufnahme von ^{14}C -NAD; **B)** Aufnahme von ^{14}C -NMN; **C)** Aufnahme von ^{14}C -NR.

Die Abbildungen 10/A zeigt, daß *H. influenzae* Rd ca. 20 % des eingesetzten ^{14}C -NADs in 9 Minuten aufnahm, jedoch die *hel*-Mutante nicht fähig war, NAD zu inkorporieren. Die Komplementante nahm 5 % auf. REI1012($\Delta hel::kan$) konnte auch kein ^{14}C -NMN aufnehmen, komplementiert mit dem Plasmid pJRP4 aber transportierte der Stamm ebenso wie der Wildtyp 25 % der eingesetzten Menge ins Zytoplasma (Abb. 10/B). Wurde ^{14}C -NR als Faktor V-Quelle eingesetzt, so nahmen alle Stämme gleichermaßen 13-17 % auf (Abb. 10/C).

Die essentielle Funktion von *e*(P4) für die Nutzung von NAD konnte anhand der *hel*-Deletionsmutante REI1012($\Delta hel::kan$) nachgewiesen werden. Der Verlust des Lipoproteins *e*(P4) ging einher mit dem Unvermögen NADP, NAD und NMN als Substrat zu erkennen und zu

dephosphorylieren, was dazu führte, daß NAD und NMN nicht mehr aufgenommen und als Faktor V-Quelle für Wachstum genutzt werden konnte.

4. Ist die Phosphatase-Funktion von *e(P4)* an die Lokalisierung an der Außenmembran gekoppelt?

Die Phosphomonoesterase-Aktivität von *e(P4)* konnte mit verschiedenen Methoden nachgewiesen und NADP bzw. NMN als physiologisch relevante Substrate identifiziert werden. Nun stellt sich die Frage, ob die Eigenschaft als Lipoprotein und dessen Lokalisation an der Außenmembran für die Dephosphorylierung der Faktor V-Substrate relevant ist, oder ob *e(P4)* als freies Protein im Periplasma dieselbe Aufgabe erfüllen könnte. Um dies nachzuprüfen, wurde eine Cystein-Mutante hergestellt, bei der der Lipidanker Cystein am 3'-Ende der Signalsequenz durch ein Glycin ersetzt wurde. Dadurch wird das native Protein über den allgemeinen Sec-Weg durch die innere Membran geschleust, von der Signalpeptidase I gespalten und verbleibt als freies Protein im Periplasma.

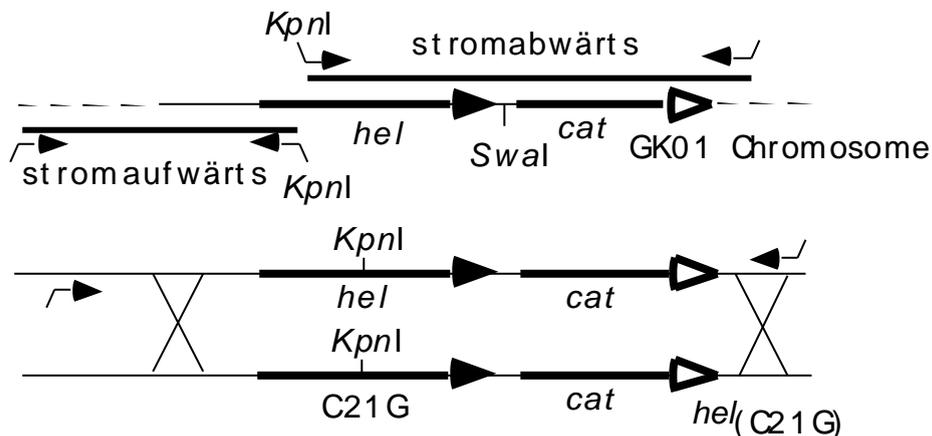
4.1 Konstruktion der Cystein-Mutanten GK08(*hel*_{C21G}) und GK09(*hel*_{C21G})

Für die Konstruktion der Cystein-Mutanten wurde aus dem Plasmid pAKcat (Kraiß et al., 1998) das *cat*-Gen mit *Sna*BI und *Fsp*I gespalten und in die *Swa*I-Schnittstelle von pSEhel, die sich 7 pb stromabwärts des *hel*-Stopkodons befindet, ligiert. Das resultierende Plasmid pGK01 wurde mit *Eco*RV und *Sna*BI gespalten. Das erhaltene 2,5 kbp große DNA-Fragment, das für das *cat*-Gen und für 393 bp des *hel*-Gens kodierte, wurde in den MIV-kompetenten Stamm Rd transformiert. Nach dem Cross-over des Fragments in das Chromosom wurde nach chloramphenicolresistenten Zellen auf BHI-Agar mit Hämin (20 µg/ml), NMN (30 µM) und Chloramphenicol (2 µg/ml) selektiert. Der erhaltene Stamm GK01 kodierte für das *cat*-Gen am 3'-Ende des *hel*-Gens in gleicher Orientierung (Abb. 11). Die chromosomale DNA von GK01 diente als Matrize in einer PCR-Reaktion für die Generierung von zwei Fragmenten des *hel*-Gens, die beide eine *Kpn*I-Restriktionsstelle am 5'- bzw 3'-Ende besaßen (Abb. 11). Ursprünglich ist im *hel*-Gen keine *Kpn*I-Schnittstelle zu finden, wenn man jedoch die Sequenz TGTGGT bei 61-66 bp in die *Kpn*I-Restriktionsstelle GGTACC ändert, wird das Cystein an Position 21 durch ein Glycin und das Glycin an Position 22 durch ein Threonin ausgetauscht. Für die Konstruktion des PCR-Produktes

„Stromaufwärts“ (1,35 kbp), das für die vermutete Promoter-Region und den N-Terminus des *hel*-Gens kodiert und mit einer *KpnI*-Schnittstelle endet, wurden die Primer *helBamHI* und *P4CysKpnI3'* benutzt. Das PCR-Produkt „Stromabwärts“ (1,8 kbp), das mit einer *KpnI*-Restriktionsstelle beginnt und stromabwärts der *cat*-Kassette endet, wurde mit Hilfe der Oligonukleotide *P4CysKpnI5'* und *P4CAT3'* hergestellt (Abb. 11). Beide PCR-Fragmente wurden mit *KpnI* gespalten und ligiert. Das erhaltene Ligationsprodukt wurde mit den Oligonukleotiden *helBamHI* und *P4cat3'* amplifiziert und in den MIV-kompetenten *H. influenzae*-Stamm BRAD transformiert. Nach dem Cross-over des PCR-Produktes in das Chromosom erfolgte die Selektion der chloramphenicolresistenten Zellen auf BHI-Agar mit Hämin (20 µg/ml), NMN (30 µM) und Chloramphenicol (2 µg/ml) (Abb. 9). Die chromosomale DNA des erhaltenen Stamms wurde isoliert und in den MIV-kompetenten Stamm Rd transformiert. Chloramphenicolresistente Zellen wurden wieder auf BHI-Agar mit Hämin (20 µg/ml), NMN (30 µM) und Chloramphenicol (2 µg/ml) selektiert. Die erhaltenen Stämme *GK08(hel_{C21G})* und *GK09(hel_{C21G})* und wurde mittels PCR, Sequenz-Analysen, Western Blot Analysen (Abb. 12) und Phosphatase-Assays überprüft.

Abb. 11: Konstruktionschema der *H. influenzae* Stämme *GK08(hel_{C21G})* und *GK09(hel_{C21G})*. Die eingezeichneten Restriktionsschnittstellen sind *SwaI* und *KpnI*. Die fettgedruckte Pfeile stehen für die Gene *hel* und *cat*. Die kleine Pfeile markieren die Oligonukleotide. Cross-over-Stellen sind durch Kreuze angegeben.

Bei den Sequenz-Analysen zeigte sich, daß in dem *hel*-Gen von Stamm *GK08(hel_{C13G})* an



Position 82 durch eine Punktmutation Valin durch Methionin ausgetauscht wurde. Auch bei Stamm *GK09(hel_{C21G})* wurden zwei weitere Punktmutationen entdeckt, die zu Aminosäureaustauschen führte: an Position 104 wurde Lysin durch Glutamat und an Position 119 Glutamin durch Glutamat ersetzt.

Um zu prüfen, ob das *e(P4)*-Protein beider Mutanten nicht mehr an der Außenmembran, sondern im Periplasma lokalisiert ist, wurden die Periplasma- und Außenmembranproteine präpariert (siehe

Methoden 4.1.2 und 4.1.2.1). Mit den Extrakten der *H. influenzae*-Stämme Rd, GK08(*hel*_{C21G}) und GK09(*hel*_{C21G}) wurden zwei Western Blots angefertigt, in denen das *e*(P4)-Protein mit anti-*e*(P4)-Antikörpern detektiert wurde (siehe Methoden 4.7).

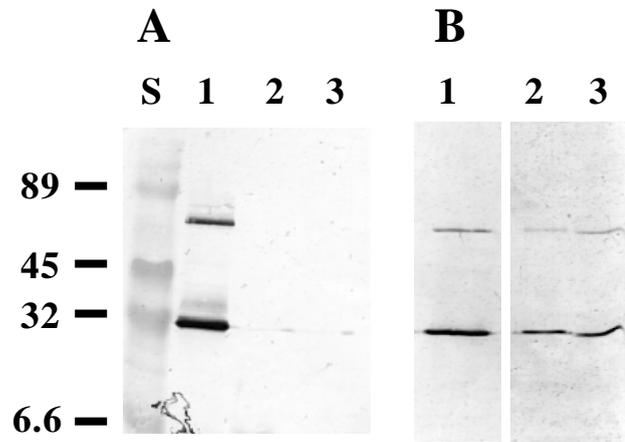


Abb. 12: Western Blot Analysen mit Außenmembranprotein- und Periplasma- Extrakten der Stämme *H. influenzae* Rd, GK08(*hel*_{C21G}) und GK09(*hel*_{C21G}). **A)** Western Blot mit Außenmembranprotein-Extrakten (je 5 µg). Spur S, BioRad Marker (No. 161-0324); Spur 1, Extrakt von Rd; Spur 2, Extrakt von GK08(*hel*_{C21G}); Spur 3, Extrakt von GK09(*hel*_{C21G}). **B)** Western Blot mit Periplasma-Extrakten (je 10 µg). Spur S, BioRad Marker (No. 161-0324); Spur 1, Extrakt von Rd; Spur 2, Extrakt von GK08(*hel*_{C21G}); Spur 3, Extrakt von GK09(*hel*_{C21G}).

Die Abbildung 12/A stellt die Außenmembranprotein-Extrakte der Stämme Rd, GK08(*hel*_{C21G}) und GK09(*hel*_{C21G}) dar. In den Spuren 1 ist das *e*(P4)-Protein von Rd als Positiv- Kontrollen zu sehen. In den OMP-Extrakten der beiden Mutanten fehlten durch den Cystein-Glyzin-Austausch die 29 kDa-Banden (Spuren 2 und 3). In den Periplasma-Extrakten konnte das Protein *e*(P4) bei GK08(*hel*_{C21G}) und GK09(*hel*_{C21G}), wie auch bei dem Stamms Rd detektiert werden (Abb. 12/B, Spuren 1, 2 und 3).

4.2 Nachweis der Phosphatase-Aktivität in den Mutanten GK08(*hel*_{C21G}) und GK09(*hel*_{C21G})

Um zu testen, ob die periplasmatischen *e(P4)*-Proteine in den Stämmen Rd, GK08(*hel*_{C21G}) und GK09(*hel*_{C21G}) noch Phosphatase-Aktivität besitzen, wurden mit ganzen Zellen und Proteinextrakten pNPP-Assays durchgeführt (siehe Methoden 6.1).

In den pNPP-Assays mit ÜN-Kultur-Zellen zeigte sich, daß nur die Zellen des Stamms Rd Phosphatase-Aktivität besaßen, die Reaktionsansätze der Mutanten blieben farblos (Daten nicht gezeigt). Derselbe Versuch wurde mit den OMP- und Periplasma-Extrakten der drei Stämme wiederholt. In den OMP-Extrakten konnte nur beim Extrakt des Stamms Rd eine Gelbfärbung detektiert werden, die Ansätze der beiden Mutanten blieben farblos. In den drei Periplasma-Extrakten der Stämmen Rd, GK08(*hel*_{C21G}) und GK09(*hel*_{C21G}) war auch nach Inkubation bei 37 °C für 40 Minuten keine Phosphatase-Aktivität nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Durch den Cystein-Glycin-Austausch in der Signalsequenz von *e(P4)* wurde das Protein nicht mehr an der Außenmembran mit Lipidanker exprimiert, sondern war im Periplasma zu finden, wo auch wildtypisches *e(P4)* detektiert werden konnte. Die verschiedenen pNPP-Assays zeigten jedoch, daß die mutierten Proteine als auch das wildtypische Protein dort nicht aktiv sind.

5. Identifizierung weiterer putativer Funktionen von *e(P4)*

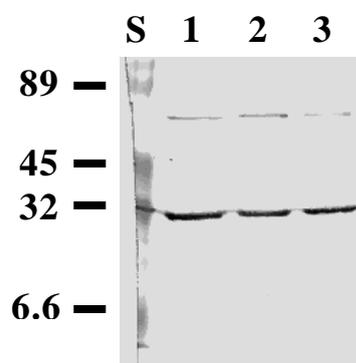
Bisher konnte nachgewiesen werden, daß *e(P4)* NMN dephosphoryliert zu NR und deshalb für die Aufnahme und das Wachstum auf NAD und NMN essentiell ist. Es sind aber noch weitere Funktionen von *e(P4)* denkbar: Bindungsfunktion für die Substrate NMN und NADP oder direkte Beteiligung am Transport von Faktor V-Substraten über die äußere Membran. Um diese möglichen Funktionen identifizieren zu können, sollte durch einen einzelnen Aminosäureaustausch gezielt die Phosphatase-Aktivität deletiert werden, wobei der Rest des Proteins mit putativen Bindestellen, aktiven Zentren, etc. intakt bleibt. Durch einen Vergleich der *e(P4)*-Sequenz mit homologen Phosphatasen wurden konservierte Bereiche mit identischer Aminosäuresequenz aufgedeckt (siehe Anhang Abb. 33). In einem dieser konservierten Bereiche wurde im *hel*-Gen des Stamms Rd an Position 86 ein Aspartat durch ein Leucin ersetzt. Zeitgleich wurde in den USA von unseren Kollaborationspartnern eine ähnliche Mutante hergestellt, die an Position 84 das Aspartat durch ein Alanin ausgetauscht hatte. Diese Mutante wurde uns für weitere Versuche zur Verfügung gestellt (Kemmer et al., 2001). Beide Phosphatase-Mutanten wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Faktor V-

Substrate zu spalten, aufzunehmen und zum Wachstum zu nutzen mit dem Verhalten der *e(P4)*-Deletionsmutante verglichen.

5.1 Konstruktion der Phosphatase-Mutante GK02(*hel*_{D86L})

Um die Phosphatase-Funktion des *e(P4)*-Proteins zu deletieren, wurde das Aspartat an Position 86 durch ein Leucin ersetzt. Für die Konstruktion der Mutante wurde das gleiche Prinzip wie für die Cystein-Mutanten angewandt. Grundlage ist wieder der Stamm GK01, der für das *cat*-Gen am 3'-Ende des *hel*-Gens kodiert. Die chromosomale DNA von GK01 diente als Matrize in einer PCR-Reaktion für die Generierung von zwei Fragmenten des *hel*-Gens, die beide eine *Xho*I-Restriktionsstelle am 5'- bzw 3'-Ende besaßen. Ursprünglich ist im *hel*-Gen keine *Xho*I-Schnittstelle zu finden, wenn man jedoch die Sequenz GATGAA bei 256-261 bp in die *Xho*I-Restriktionsstelle CTCGAG ändert, wird das Aspartat an Position 86 durch ein Leucin ausgetauscht. Für die Konstruktion des PCR-Produktes „Stromaufwärts“ (1,55 kbp), das für die vermutete Promoter-Region und den N-Terminus des *hel*-Gens kodiert und mit einer *Xho*I-Schnittstelle endet, wurden die Primer *hel*BamHI5' und P4*Xho*I3' benutzt. Das PCR-Produkt „Stromabwärts“ (1,8 kbp), das mit einer *Xho*I-Restriktionsstelle beginnt und stromabwärts der *cat*-Kassette endet, wurde mit Hilfe der Oligonukleotide P4*Xho*I5' und P4*cat*3' hergestellt. Beide PCR-Fragmente wurden mit *Xho*I gespalten und ligiert. Das erhaltene Ligationsprodukt wurde mit den Oligonukleotiden *hel*BamHI5' und P4*cat*3' amplifiziert und in den *H. influenzae* Stamm BRAD transformiert. Nach dem Cross-over des PCR-Produktes in das Chromosom erfolgte die Selektion der chloramphenicolresistenten Zellen auf BHI-Agar mit Hämin (20 µg/ml), NMN (30 µM) und Chloramphenicol (2 µg/ml). Die chromosomale DNA dieses Stamms wurde isoliert und in den MIV-kompetenten Stamm REI1012(Δ *hel::kan*) transformiert. Chloramphenicolresistente Zellen wurden wieder auf BHI-Agar mit Hämin (20 µg/ml), NMN (30 µM) und Chloramphenicol (2 µg/ml) selektiert und auf Kanamycin-Sensitivität geprüft. Der erhaltene Stamm GK02(*hel*_{D86L}) wurde mittels PCR, Sequenz-Analysen (Daten nicht gezeigt), Western Blot (Abb. 11) und Phosphatase-Assays (Abb. 14) überprüft.

Um die Expression des *hel*-Gens in den Phosphatase-Mutanten nachzuweisen, wurden die



Außenmembranproteine der Stämme *H. influenzae* Rd, GK02(*hel*_{D86L}) und GK03(*hel*_{D84A}) präpariert (siehe Methoden 4.1.2.2) und ein Western Blot mit anti-*e*(P4)-Antikörpern angefertigt (siehe Methoden 4.7).

Abb. 13: Western Blot Analysen mit Außenmembranprotein-Extrakten (OMPs) (je 5 µg) der Stämme *H. influenzae* Rd, GK02(*hel*_{D86L}) und GK03(*hel*_{D84A}). Spur S, BioRad Marker (No. 161-0324); Spur 1, OMPs von Rd; Spur 2, OMPs von GK03(*hel*_{D84A}); Spur 3, OMPs von GK02(*hel*_{D86L}).

Der Western Blot zeigt in den Spuren 1, 2 und 3 bei 29 kDa eine Bande, die das exprimierte *e*(P4)-Protein der Stämme Rd, GK02(*hel*_{D86L}) und GK03(*hel*_{D84A}) darstellt. Die Expression von *hel*_{D86L} war aber im Vergleich zu Rd und GK03(*hel*_{D84A}) um den Faktor 30 erniedrigt, die Proteinkonzentration wurde deshalb im Western Blot und in den folgenden Versuchen angepaßt.

5.2 Nachweis des Verlusts der Phosphatase-Funktion von *e*(P4) in den Mutanten

GK02(*hel*_{D86L}) und GK03(*hel*_{D84A})

Aus den Stämmen GK02(*hel*_{D86L}) und GK03(*hel*_{D84A}) wurden die Außenmembranproteine präpariert (siehe Methoden 4.1.2.2) und jeweils mit ¹⁴C-NMN bzw. ¹⁴C-AMP inkubiert, um zu testen, ob die Stämme durch den Aminosäureaustausch ihre Phosphatase-Aktivität verloren haben.

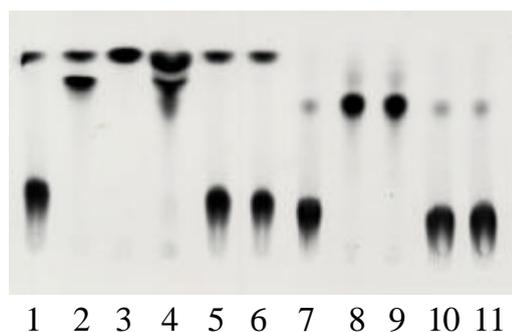


Abb. 14: Dünnschicht-Chromatographie mit ¹⁴C-NMN und ¹⁴C-AMP (je 10 nCi; 0,1 µM) nach Inkubation mit den Außenmembranprotein-Extrakten (OMPs) (je 10 µg) von *H. influenzae* Rd, GK02(*hel*_{D86L}) und GK03(*hel*_{D84A}). Spur 1, ¹⁴C-NMN; Spur 2, ¹⁴C-NR, Spur 3, ¹⁴C-NA; Spur 4, ¹⁴C-NMN inkubiert mit OMPs von Rd; Spur 5, ¹⁴C-NMN inkubiert mit OMPs von GK03(*hel*_{D84A}); Spur 6, ¹⁴C-NMN inkubiert mit OMPs von GK02(*hel*_{D86L}); Spur 7, ¹⁴C-AMP; Spur 8, ¹⁴C-Adenosin; Spur 9, ¹⁴C-AMP inkubiert mit OMPs von Rd; Spur 10, ¹⁴C-AMP inkubiert mit OMPs von GK03(*hel*_{D84A}); Spur 11, ¹⁴C-AMP inkubiert mit OMPs von GK02(*hel*_{D86L}).

In den Spuren 1, 2, 3, 7 und 8 in Abbildung 14 sind die Faktor V-Substrate als Standard dargestellt. In den Spuren 4 und 9 sind als Kontrolle die Dephosphorylierung von ¹⁴C-NMN zu ¹⁴C-NR bzw. von ¹⁴C-AMP zu ¹⁴C-Adenosin durch den Rd-Extrakt zu sehen. Die Spuren 5 und 6

belegen, daß die Phosphatase-Mutanten GK02(*hel*_{D86L}) und GK03(*hel*_{D84A}) nicht mehr fähig waren ¹⁴C-NMN zu spalten, ebenso blieb ¹⁴C-AMP unverändert (Spuren 10 und 11).

Auch im pNPP-Assay mit den ÜN-Kulturen der Stämme Rd, GK02(*hel*_{D86L}) und GK03(*hel*_{D84A}) wurde nur im Rd-Kontrollansatz eine Gelbfärbung als Reaktion auf die Dephosphorylierung von pNPP detektiert, die Ansätze der Stämme GK02(*hel*_{D86L}) und GK03(*hel*_{D84A}) blieben auch nach Inkubation von 40 Minuten bei 37 °C farblos (Daten nicht gezeigt).

5.3 Die Wachstumsphänotypen der Mutanten GK02(*hel*_{D86L}) und GK03(*hel*_{D84A})

Die Phosphatase-Mutanten GK02(*hel*_{D86L}) und GK03(*hel*_{D84A}) wurden mit der *e*(P4)-Deletions-Mutante hinsichtlich ihres Wachstumsvermögens mit von Faktor V-Substraten verglichen. Dazu wurden die *H. influenzae* Stämme Rd, REI1012(Δ *hel::kan*), GK02(*hel*_{D86L}) und GK03(*hel*_{D84A}) auf BHI-Agarplatten ausgestrichen, die mit Hämin (20 µg/ml) und verschiedene Konzentrationen von NAD, NMN oder NR supplementiert waren.

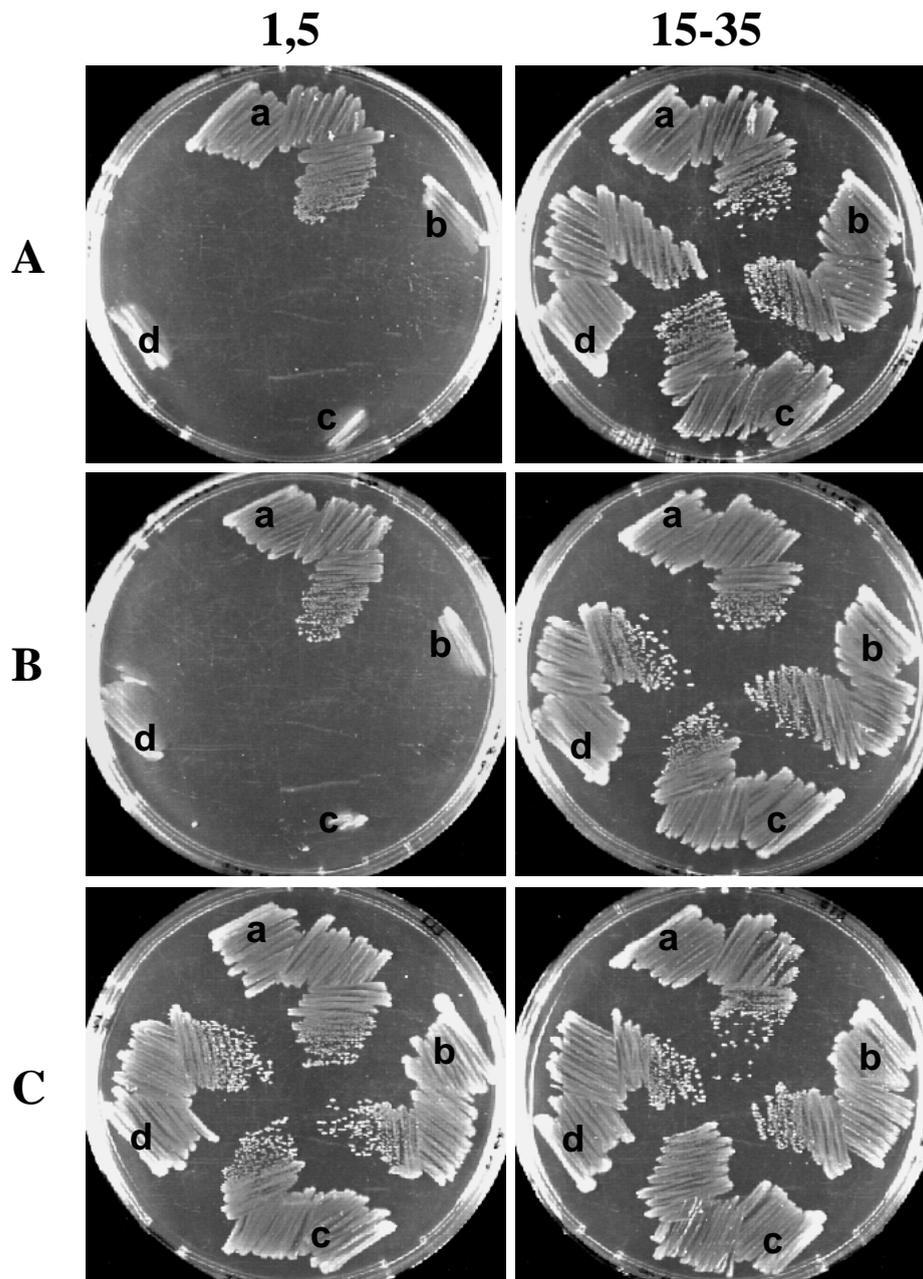


Abb. 15: Wachstumsphänotyp von *H. influenzae* Rd (a), REI1012($\Delta hel::kan$) (b), GK02(*hel*_{D86L}) (c) und GK03(*hel*_{D84A}) (d) auf BHI-Agarplatten supplementiert mit Hämin (20 µg/ml) und verschiedenen Faktor V Quellen. **A)** Wachstum mit 1,5 µM und 35 µM NAD. **B)** Wachstum mit 1,5 µM und 15 µM NMN. **C)** Wachstum mit 1,5 µM und 15 µM NR.

Wie schon gezeigt, konnte der Stamm Rd mit 1,5 µM NAD oder NMN gut wachsen (Abb. 15/Aa, Ba). Die Stämme GK02(*hel*_{D86L}) und GK03(*hel*_{D84A}) zeigten bei diesen Konzentrationen ein starkes Wachstumsdefizit (Abb. 15/Ac,d, Bc,d), wie es auch schon für REI1012($\Delta hel::kan$) bekannt war (Abb. 15/Ab, Bb). Erst bei 35 µM NAD und 15 µM NMN war ein mit dem Wildtyp vergleichbares Wachstum wieder möglich (Abb. 15A/B). Mit NR als Faktor V-Quelle wuchsen alle Stämme selbst bei niedrigen Konzentrationen gleich gut (Abb. 15/C).

5.4 Aufnahme von ^{14}C -NAD, ^{14}C -NMN und ^{14}C -NR in GK02(*hel*_{D86L}) und GK03(*hel*_{D84A})

Mit den *H. influenzae*-Stämmen Rd, REI1012(Δ *hel::kan*), GK02(*hel*_{D86L}) und GK03(*hel*_{D84A}) wurden Transport-Assays durchgeführt, um die Fähigkeit zu testen, NAD, NMN und NR aufzunehmen. Die Zellen wurden bis OD_{490 nm} 1 angezogen und mit den radioaktiv markierten Substraten inkubiert. Nach 1, 3, 5, 7 und 9 Minuten wurden Proben entnommen, gefiltert und anschließend gemessen (siehe Methoden 8).

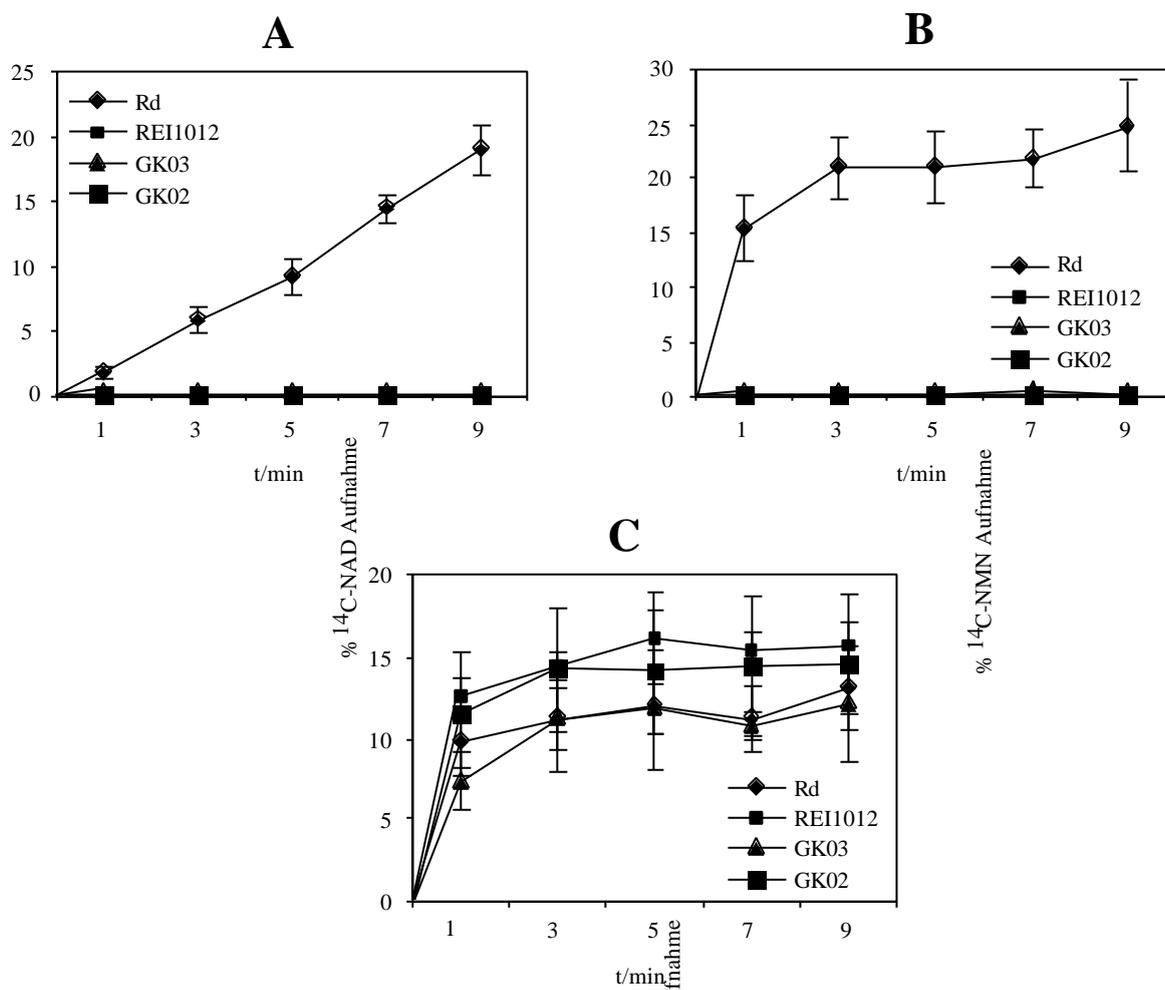


Abb. 16: Aufnahme von ^{14}C -NAD, ^{14}C -NMN und ^{14}C -NR von *H. influenzae* Rd, REI1012(Δ *hel::kan*), GK02(*hel*_{D86L}) und GK03(*hel*_{D84A}). Die Substratkonzentrationen betragen 1 μM (spezifische Aktivität). Jeder Punkt repräsentiert den Durchschnittswert mit Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Messungen. Die Aufnahme des Faktor V ist angegeben als prozentualer Anteil Radioaktivität an der eingesetzten Menge von 1 μM Substrat. **A)** Aufnahme ^{14}C -NAD; **B)** Aufnahme ^{14}C -NMN; **C)** Aufnahme von ^{14}C -NR.

Die Stämme GK02(*hel*_{D86L}) und GK03(*hel*_{D84A}) waren wie die *hel*-Deletionsmutante nicht fähig, ^{14}C -NAD und ^{14}C -NMN aufzunehmen (Abb. 14/A, B). Inkubierte man aber die Zellen mit ^{14}C -NR,

so wurden von den Mutanten, wie auch von dem Kontrollstamm Rd 12-15 % der eingesetzten Menge aufgenommen (Abb. 14/C).

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, daß die Phänotypen der Phosphatase-Mutanten GK02(*hel*_{D86L}) und GK03(*hel*_{D84A}) in Bezug auf Phosphatase-Aktivität, Faktor V-abhängiges Wachstum und Aufnahme von NAD, NMN und NR exakt mit dem Verhalten der *hel*-Deletions-Mutante REI1012(Δ *hel::kan*) korrelierten. Es liegen deshalb keine Hinweise auf zusätzliche Funktionen von *e*(P4) vor.

6. Weitere Proteine, die an der NAD-Aufnahme von *H. influenzae* beteiligt sind

Das Lipoprotein *e*(P4) wurde als Phosphomonoesterase charakterisiert, die für die Nutzung von NAD als Faktor V-Quelle essentiell ist, indem es NMN zu NR dephosphoryliert. An der Prozessierung und Aufnahme von NAD müssen aber noch weitere Proteine beteiligt sein: Poren, die die Faktor V-Substrate über die äußere und innere Membran transportieren können und weitere Enzyme zur eigentlichen Spaltung von NAD.

6.1 Das periplasmatische Protein NadN von *H. influenzae*

NadN ist ein konserviertes, periplasmatisches Protein von 63 kDa, das NAD-Pyrophosphatase-Aktivität besitzt (Reidl et al., 2000). Von Green wurde zeitgleich in NTHI-Stämmen eine 5'-Nukleotidase mit gleichem Molekulargewicht identifiziert, die fähig ist, monophosphorylierte Nukleotide zu dephosphorylieren. Dieses Protein wurde NucA genannt (Zagursky et al., 2000).

Um zu zeigen, daß NadN und NucA identisch sind und eine Rolle bei der Prozessierung und Aufnahme von NAD spielen, wurde eine *H. influenzae-nadN*-Knockout-Mutante hergestellt. Sie wurde näher charakterisiert, indem die Enzymaktivitäten des Periplasma-Extraktes bestimmt, das Wachstum mit verschiedenen Faktor V-Quellen und die Aufnahmefähigkeit von radioaktiv markierten NAD, NMN und NR untersucht wurden.

6.1.1. Konstruktion der *nadN*-Knockout-Mutante REI1010(*nadN::cat*)

Das *nadN*-Gen (HI0206) des Stamms *H. influenzae* Rd wurde durch die Insertion einer *cat*-Kassette ausgeknockt. Die Mutante wurde dann komplementiert mit dem Plasmid pSE1, das aus

dem Vektor pACYC177 besteht, in dessen *HincII*- und *EcoRV*-Schnittstellen die Gene HI0205 und HI0206 kloniert wurden (Reidl et al., 2000).

Zur Verifizierung der Knockout-Mutante REI1010(*nadN::cat*) wurden die Periplasma-Extrakte der Stämme *H. influenzae* Rd, REI1010(*nadN::cat*) mit Plasmid pACYC177 und REI1010(*nadN::cat*), komplementiert mit pSE1, präpariert (siehe Methoden 4.1.2). Mit den Extrakten und dem gereinigtem NadN (erhalten von B. Green, Wyeth-Lederle Vaccines, N. Y.) wurde ein Western Blot mit anti-NucA-Antikörpern angefertigt (siehe Methoden 4.7).

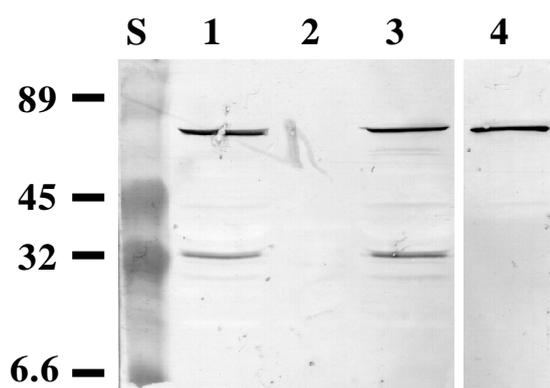


Abb. 17: Western Blot Analysen mit Periplasma-Extrakten (je 10 μg) von *H. influenzae* Rd, REI1010(*nadN::cat*) und des komplementierten REI1010(*nadN::cat*). Spur S, BioRad Marker (No. 161-0324); Spur 1, Periplasma-Extrakt von Rd; Spur 2, Periplasma-Extrakt von REI1010(*nadN::cat*) mit Plasmid pACYC177; Spur 3, Periplasma-Extrakt von REI1010(*nadN::cat*), komplementiert mit Plasmid pSE1; Spur 4, gereinigtes NadN (2 μg).

Der Western Blot zeigt in den Spuren 1 und 3 bei 63 kDa eine Bande, die das NadN-Protein des Stamms Rd und der Komplementante darstellen (Abb. 17). Ebenso ist in Spur 4 auf gleicher Höhe das gereinigte NadN zu sehen. In Spur 2 fehlt die Bande durch die Insertion der *cat*-Kassette in das ORF HI0206 des Stamms REI1010(*nadN::cat*). Die Antikörper sind also in der Lage, NadN im Periplasma-Extrakt zu erkennen. Daher wird NucA zukünftig als NadN benannt (Kemmer et al., 2001)

6.1.2 Nachweis der Spaltung von NAD und NMN durch NadN

Für das Protein NadN wurde aufgrund seiner Homologie zu Pyridin-Nukleotidasen eine NAD-Pyrophosphatase-Aktivität vorausgesagt. Um zu testen, ob NadN diese enzymatische Aktivitäten

besitzt und welches Substrat es erkennt, wurden die Periplasma-Extrakte der *H. influenzae*-Stämme Rd und REI1010(*nadN::cat*) und das gereinigte Protein mit ^{14}C -NAD, ^{14}C -NMN und ^{14}C -NR inkubiert und die Spaltprodukte in einer Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt. Für die Inkubation des NadN-Extraktes mit ^{14}C -NMN wurde eine *hel nadN*-Doppelmutante hergestellt (siehe Ergebnisse 6.2.1), um eine eventuelle Verunreinigung des Periplasma-Extraktes mit *e*(P4)-Proteinen auszuschließen, die fälschlicherweise zur Dephosphorylierung von NMN führen können.

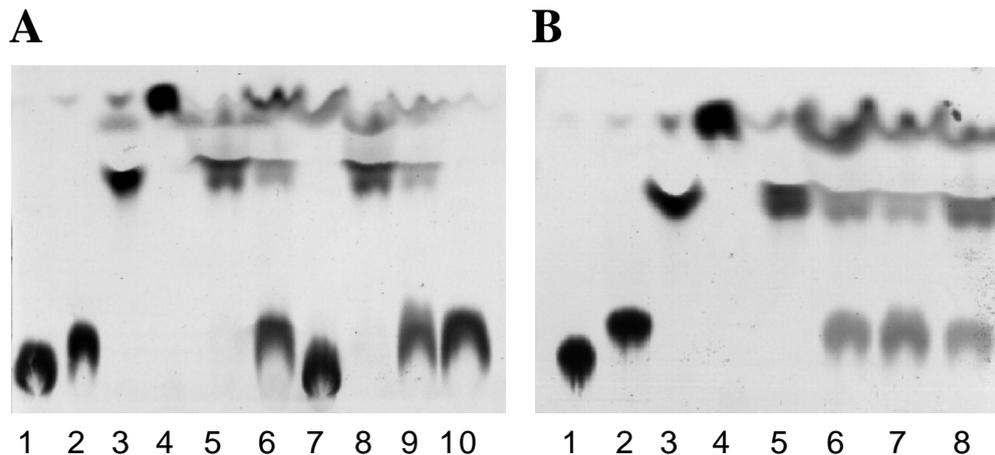


Abb. 18: Dünnschicht-Chromatographie von radioaktiv markiertem Faktor V als Substrat für NadN. ^{14}C -NAD, ^{14}C -NMN, ^{14}C -NR und ^{14}C -AMP (je 10 nCi; 0,1 μM) wurden inkubiert mit den Periplasma-Extrakten (je 10 μg) von *H. influenzae* Rd, REI1010(*nadN::cat*) und mit gereinigtem NadN (5 μg).

A) Spur 1, ^{14}C -NAD; Spur 2, ^{14}C -NMN; Spur 3, ^{14}C -NR, Spur 4, ^{14}C -NA; Spur 5, ^{14}C -NAD inkubiert mit gereinigtem NadN; Spur 6, ^{14}C -NAD inkubiert mit Extrakt von Rd; Spur 7, ^{14}C -NAD inkubiert mit Extrakt von REI1010(*nadN::cat*); Spur 8, ^{14}C -NMN inkubiert mit gereinigtem NadN; Spur 9, ^{14}C -NMN inkubiert mit Extrakt von Rd; Spur 10, ^{14}C -NMN inkubiert mit Extrakt von GK04(*nadN::cat* Δ *hel::kan*).

B) Spur 1, ^{14}C -NAD; Spur 2, ^{14}C -NMN; Spur 3, ^{14}C -NR, Spur 4, ^{14}C -NA; Spur 5, ^{14}C -NR inkubiert mit gereinigtem NadN; Spur 6, ^{14}C -NR inkubiert mit Extrakt von Rd; Spur 7, ^{14}C -NR inkubiert mit Extrakt von REI1010(*nadN::cat*).

Die Spuren 1 bis 4 in Abbildung 18/A und B zeigen die Kontrollen der verschiedenen Faktor V-Substrate. In Abbildung 18/A, Spur 5, ist zu sehen, daß das gereinigte NadN ^{14}C -NAD komplett zu ^{14}C -NR umgesetzt hat. Der Rd-Extrakt hingegen spaltete ^{14}C -NAD zu ^{14}C -NMN, das dann nur zu einem geringen Bruchteil zu ^{14}C -NR dephosphoryliert wurde (Spur 6). Der Extrakt der *nadN*-Mutante zeigte keine Enzymaktivität mehr (Spur 7). Wurde ^{14}C -NMN als Substrat eingesetzt, so entstand durch das gereinigte NadN ^{14}C -NR, eine Reaktion, zu der der Rd-Extrakt in nur sehr geringem Maße fähig war (Spuren 8 und 9). Der Extrakt von GK04(*nadN::cat* Δ *hel::kan*) hatte keine 5'-Nukleotidase-Aktivität mehr (Spur 10).

Abbildung 18/B zeigt, daß NR kein Substrat für NadN darstellt. Weder das gereinigte Protein, noch die Extrakte von Rd und REI1010(*nadN::cat*) konnten NR umsetzen (Spuren 5, 6 und 7). Die Periplasma-Extrakte der drei Stämme hatten aber Kinase-Aktivität, wie durch die Entstehung von

^{14}C -NMN aus ^{14}C -NR zu sehen ist. Es wird vermutet, daß die Periplasma-Extrakte mit einer zytoplasmatischen Nukleotid-Kinase verunreinigt sind (siehe Diskussion).

Es konnte damit gezeigt werden, daß NadN fähig ist, NAD zu NMN zu hydrolysieren, das dann zu NR dephosphoryliert wird.

6.1.3 Nachweis der Spaltung von NADP durch NadN mit dem Malat-Enzym-Assay

Die Spaltung von NADP zu NAD oder NMN durch NadN wurde mit dem Malat-Enzym-Assay nachgewiesen. Das Malat-Enzym setzt Malat zu Pyruvat um und reduziert dabei NADP zu NADPH (wie beschrieben für *e*(P4) unter 3.1.2). Für den Assay wurden die Periplasma-Extrakte der *H. influenzae*-Stämme Rd und REI1010(*nadN::cat*) präpariert (siehe Methoden 4.1.2.2) und mit NADP (0.34 mM) bei 37 °C für 2 h vorinkubiert, damit das vorhandene NADP gespalten wurde und somit für die Umsetzung des Malats zu Pyruvat nicht mehr zur Verfügung stand. Nach zwei Stunden wurde dann dem Ansatz Malat (10 mM) zugefügt und die Reaktion durch Zugabe des Malat-Enzym gestartet. In zwei weiteren Ansätzen wurden AMP und Ribose-5-Phosphat als Inhibitoren für die NADP-Spaltung durch NadN getestet.

Es zeigte sich, daß der Ansatz, der mit dem Rd-Extrakt vorinkubiert wurde, in der NADPH-Bildung stark erniedrigt war, da es zuvor gespalten wurde. Hingegen besaß der REI1010(*nadN::cat*)-Extrakt keine Aktivität mehr und deshalb wurde NADP im gleichen Maße reduziert wie im Kontrollansatz. Setzte man dem Reaktionsansatz bei der Vorinkubation AMP (20 mM) zu, so hemmte es das NadN-Enzym, die NADPH-Bildung erfolgte ungehindert. Ribose-5-Phosphat (20 mM) dagegen war kein Inhibitor von NadN (Daten nicht gezeigt).

6.1.4 Die Wachstumsphänotypen der Mutante REI1010(*nadN::cat*)

Es sollte untersucht werden, inwiefern die Pyrophosphatase- und 5'-Nukleotidase-Aktivität des Periplasmaproteins NadN einen Einfluß auf das Wachstum von *H. influenzae* mit verschiedenen Faktor V-Quellen hat. Dazu wurden Wachstumskurven mit den Stämmen Rd, REI1010(*nadN::cat*) und REI1010(*nadN::cat*), komplementiert mit Plasmid pSE1, in definiertem Minimalmedium mit verschiedenen Konzentrationen von NAD, NMN und NR erstellt.

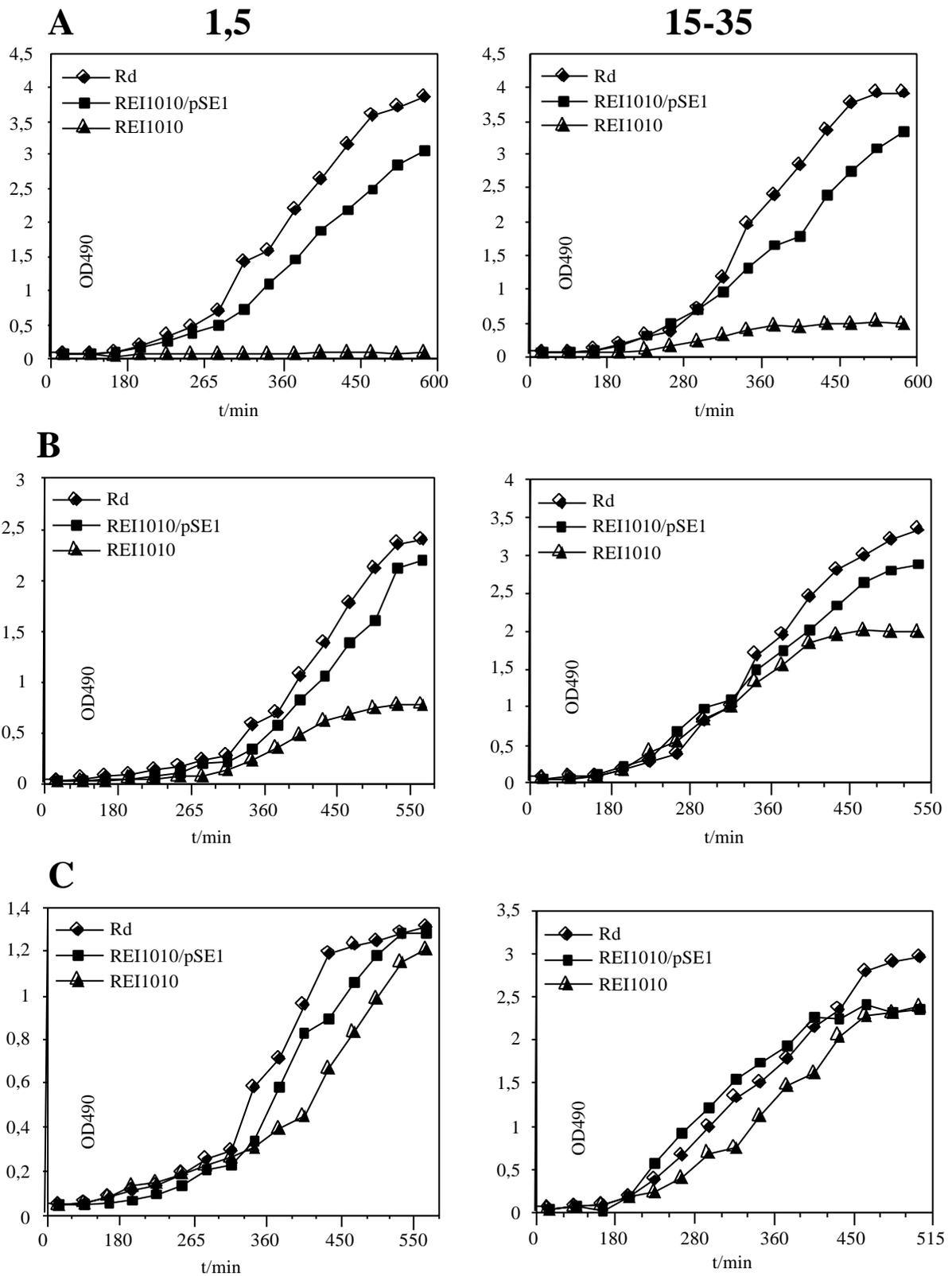


Abb. 19: Wachstumsphänotyp von *H. influenzae* Rd, REI1010(*nadN::cat*) mit Plasmid pACYC177 und REI1010(*nadN::cat*) mit Plasmid pSE1, in definiertem Minimalmedium supplementiert mit Hämin (20 $\mu\text{g/ml}$) und verschiedenen Faktor V- Quellen. **A)** Wachstum mit 1,5 μM und 35 μM NAD. **B)** Wachstum mit 1,5 μM und 15 μM NMN. **C)** Wachstum mit 1,5 μM und 15 μM NR.

In Abbildung 19/A ist zu sehen, daß die *nadN*-Mutante nicht fähig war, mit 1,5-35 μM NAD zu wachsen, während die Komplementante und der Stamm Rd schon bei 1,5 μM NAD wuchsen. Auch mit 1,5 μM NMN als Faktor V-Quelle war bei Stamm REI1010(*nadN::cat*) kaum Wachstum zu beobachten, mit 15 μM NMN erreichte die Mutante $\text{OD}_{490 \text{ nm}} 2$ (Abb. 19/B). Der Wildtyp und die Komplementante hatten auch bei niedrigen Konzentrationen NMN keine Probleme zu wachsen (Abb. 19/B). Abbildung 19/C zeigt, daß alle Stämme mit NR (1,5 μM und 15 μM) gleich gut wachsen konnten.

6.1.5 Aufnahme von ^{14}C -NAD, ^{14}C -NMN und ^{14}C -NR in REI1010(*nadN::cat*)

Mit den *H. influenzae*-Stämmen Rd, REI1010(*nadN::cat*) und REI1010(*nadN::cat*) mit Plasmid pSE1 wurden Transport-Assays durchgeführt, um die Fähigkeit der *nadN*-Mutante zu testen, NAD, NMN und NR aufzunehmen. Die Zellen wurden bis $\text{OD}_{490 \text{ nm}} 1$ angezogen und mit den radioaktiv markierten Substraten inkubiert. Nach 1, 3, 5, 7 und 9 Minuten wurden Proben entnommen, gefiltert und anschließend gemessen (siehe Methoden 8).

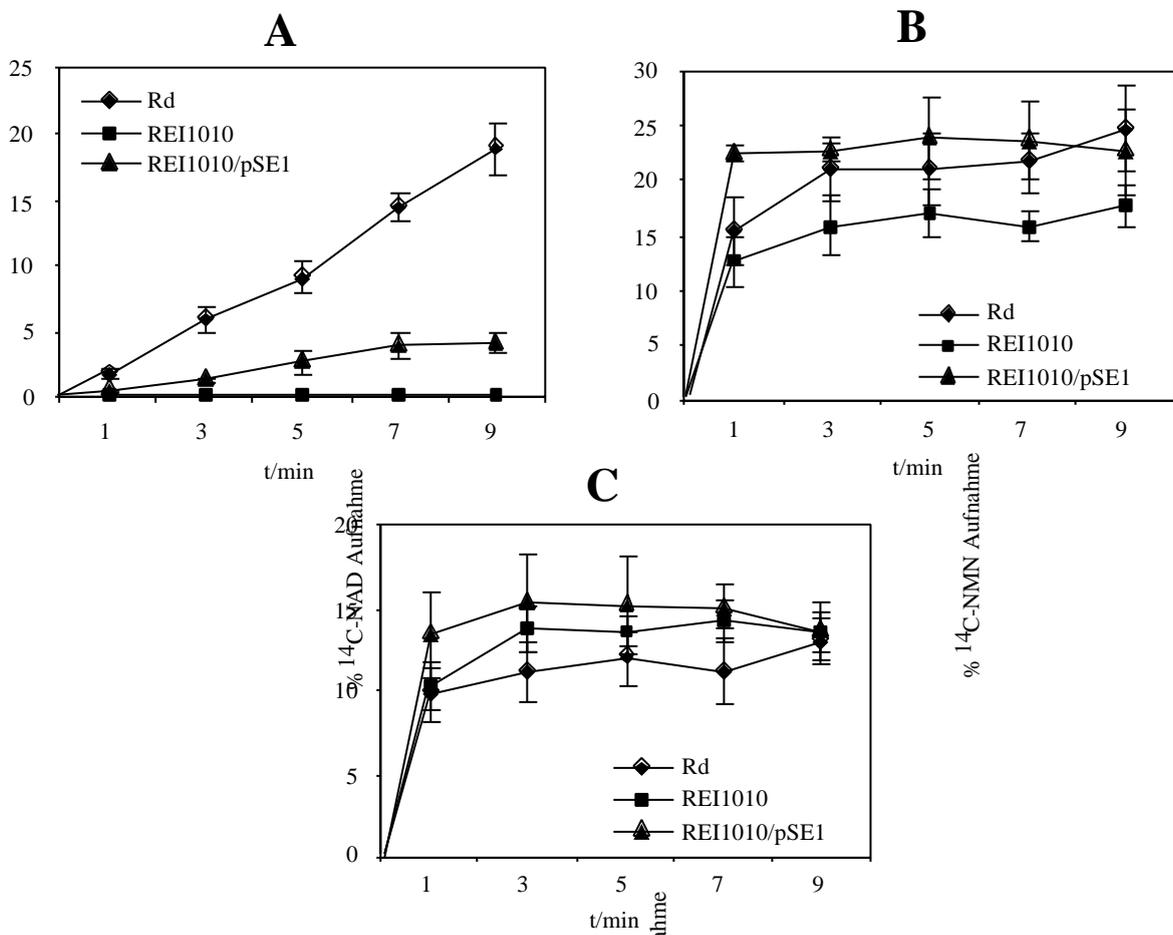


Abb. 20: Aufnahme von verschiedenen radioaktiv markierten Faktor V-Substraten von *H. influenzae* Rd, REI1010(*nadN::cat*) mit Plasmid pACYC177 und REI1010(*nadN::cat*) mit Plasmid pSE1. Die Substratkonzentrationen betragen 1 μ M (spezifische Aktivität). Jeder Punkt repräsentiert den Durchschnittswert mit Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Messungen. Die Aufnahme des Faktor V ist angegeben als prozentualer Anteil Radioaktivität an der eingesetzten Menge von 1 μ M Substrat. **A)** Aufnahme von 14 C-NAD; **B)** Aufnahme von 14 C-NMN; **C)** Aufnahme von 14 C-NR;

Die *nadN*-Mutante war nicht fähig NAD aufzunehmen und komplementiert mit pSE1 inkorporierte sie nur 5 %, während der Stamm Rd 20 % der eingesetzten Menge ins Zytoplasma transportieren konnte (Abb. 20/A). NMN als Faktor V-Quelle konnte von REI1010(*nadN::cat*) fast ebenso gut aufgenommen werden (17 %), wie vom Wildtyp und der Komplementante (ca. 23 %) (Abb. 20/B). Mit NR als Substrat war bei der Mutante kein Unterschied mehr zu erkennen, die Anteile des aufgenommenen NRs der drei Stämme lag bei 13-17 % (Abb. 20/C).

Die Wachstumskurven und die Transport-Assays belegen, daß *H. influenzae* NAD nur in Anwesenheit von NadN spalten, aufnehmen und als Faktor V-Quelle nutzen kann. Das eingeschränkte Wachstum der NadN-Mutante mit NMN zeigt, daß auch die 5'-Nukleotidase-Aktivität von NadN für optimales Wachstum relevant ist. Die Nutzung von NR dagegen war NadN-unabhängig.

6.2 Die Doppelmutante GK04(*nadN::cat Dhel::kan*)

Es konnte bisher nachgewiesen werden, daß NadN NAD zu NMN spaltet, das dann von *e*(P4) und NadN zu NR dephosphoryliert wird. Um zu testen, ob noch weitere Proteine an der Prozessierung von NAD beteiligt sind und welche NAD-Abbauprodukte die innere Membran passieren können, wurde eine Doppelmutante hergestellt, bei der *e*(P4) und NadN nicht mehr exprimiert werden.

6.2.1 Konstruktion der Doppelmutante GK04(*nadN::cat Dhel::kan*)

Für die Konstruktion der Doppelmutante GK04(*nadN::cat Dhel::kan*) diente das Plasmid pSE2 (Reidl et al., 2000) als Matrize für die Amplifikation eines DNA-Fragmentes, das für die Insertionsmutation *nadN::cat* kodierte. Die verwendeten Primer waren HI0206-L' und HI0206-R'. Das erhaltene 2,8 kbp große PCR-Produkt wurde in den MIV-kompetenten *H. influenzae*-Stamm

REI1012($\Delta hel::kan$) transformiert. Nach dem Cross-over des PCR-Fragmentes in das Chromosom erfolgte die Selektion auf BHI-Agar mit Hämin (20 $\mu\text{g/ml}$), NMN (30 μM) und Chloramphenicol (2 $\mu\text{g/ml}$). Die Doppelmutante GK04($nadN::cat \Delta hel::kan$) wurden mit PCR (Abb. 21) und Dünnschicht-Chromatographie (Abb. 22) überprüft.

Die chromosomale DNA der Stämme Rd und GK04($nadN::cat \Delta hel::kan$) wurde präpariert (siehe Methoden 3.2.1) und als Matrize in PCR-Reaktionen mit den Primern HI0206-L[`] und HI0206-R[`] bzw. $helBamHI5^{\text>`}}$ und P4CAT3[`] eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden dann in einen Agarosegel aufgetrennt.

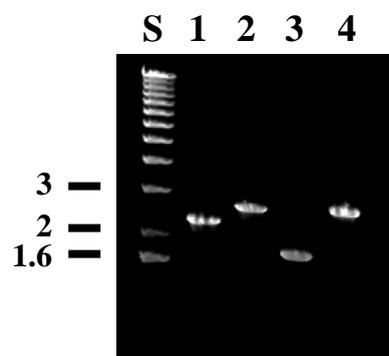


Abb. 21: Agarosegel mit PCR-Produkten. Spur S: Standard; Spur 1, *hel*-Gen von Rd; Spur 2, $\Delta hel::kan$ von GK04($nadN::cat \Delta hel::kan$); Spur 3, *nadN*-Gen von Rd; Spur 4, $nadN::cat$ von GK04($nadN::cat \Delta hel::kan$).

In Abbildung 21 sieht man in Spur 1 das 2,4 kbp große PCR-Fragment des *hel*-Gens von Rd. Durch den Austausch des Gens mit einer Kanamycin-Kassette im Stamm GK04($nadN::cat \Delta hel::kan$) entstand ein 2,8 kbp großes Fragment (Spur 2). Spur 3 stellt das 1,8 kbp große PCR-Produkt des *nadN*-Gens von Rd dar, in Spur 4 war das entsprechende Fragment des Stamms GK04($nadN::cat \Delta hel::kan$) durch die Insertion der Chloramphenicol-Kassette 1 kbp größer.

Den Verlust der Pyrophosphatase-Aktivität des Stamms GK04($nadN::cat \Delta hel::kan$) durch die Insertion der *cat*-Kassette in das *nadN*-Gen wurde durch eine Dünnschicht-Chromatographie nachgewiesen. Dazu wurde aus den Stämmen Rd und GK04($nadN::cat \Delta hel::kan$) Periplasma-Extrakte hergestellt, die mit ^{14}C -NAD inkubiert wurden (Methoden 4.1.2; 9).

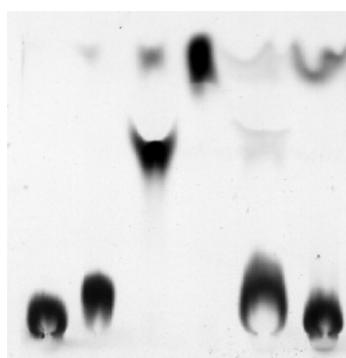


Abb. 22: Dünnschicht-Chromatographie mit ^{14}C -NAD als Nachweis des Knockout-Gens *nadN* im Stamm GK04(*nadN::cat Δhel::kan*). ^{14}C -NAD (10 nCi; 0,1 μM) wurde inkubiert mit den Periplasma-Extrakten (je 10 μg) von *H. influenzae* Rd und GK04(*nadN::cat Δhel::kan*). Spur 1, ^{14}C -NAD; Spur 2, ^{14}C -NMN; Spur 3, ^{14}C -NR, Spur 4, ^{14}C -NA; Spur 5, ^{14}C -NAD inkubiert mit Extrakt von Rd; Spur 6, ^{14}C -NAD inkubiert mit Extrakt von GK04(*nadN::cat Δhel::kan*).

In den ersten vier Spuren der Abbildung 22 sind die Kontroll-Substrate zu sehen. Spur 5 zeigt die Spaltung von NAD zu NMN durch den Rd-Extrakt. Der Extrakt von Stamm GK04(*nadN::cat Δhel::kan*) besitzt diese Aktivität nicht mehr, NAD bleibt unverändert (Spur 6).

6.2.2 Die Wachstumsphänotypen der Doppelmutante

Die *hel*-Deletionsmutante REI1012(*Δhel::kan*) zeigte bei Wachstum mit 1,5 μM NMN einen signifikanten Phänotyp, der durch Erhöhung der NMN-Konzentration auf 15 μM überwunden werden konnte. Man nimmt an, daß bei höheren Konzentrationen von NMN NadN die Funktion von *e(P4)* übernehmen kann. Um dies zu überprüfen und gleichzeitig zu testen und ob ein weiteres Protein existiert, das diese Fähigkeit besitzt, wurde der Stamm GK04(*nadN::cat Δhel::kan*) auf BHI-Agarplatten mit Hämin (20 $\mu\text{g/ml}$) und verschiedenen Konzentrationen von Faktor V-Quellen ausgestrichen.

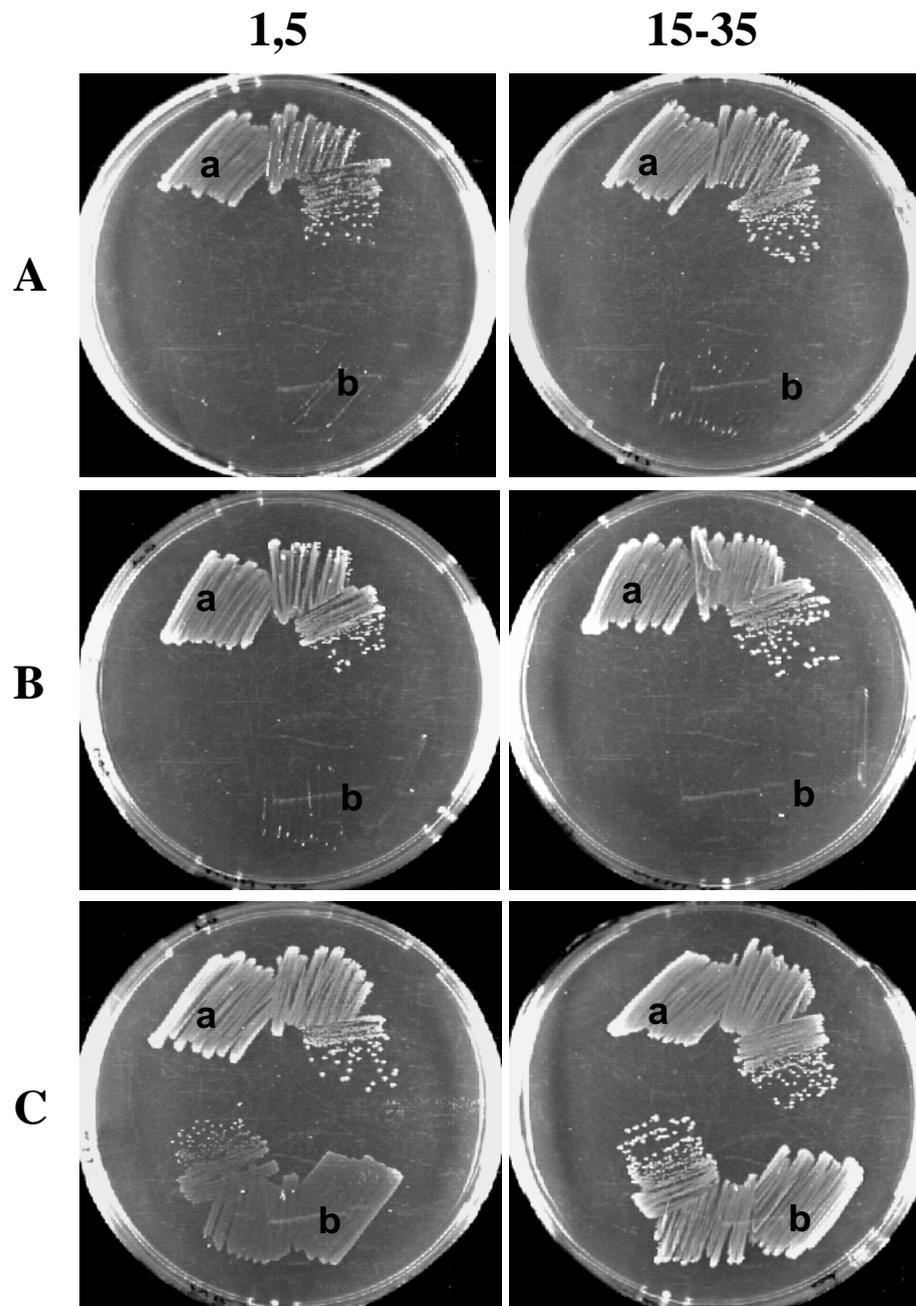


Abb. 23: Wachstumsphänotyp von *H. influenzae* Rd (a) und GK04(*nadN::cat Δhel::kan*) (b) auf BHI-Agarplatten supplementiert mit Hämin (20 µg/ml) und verschiedenen Faktor V Quellen. **A)** Wachstum auf 1,5 µM und 35 µM NAD. **B)** Wachstum auf 1,5 µM und 15 µM NMN. **C)** Wachstum auf 1,5 µM und 15 µM NR.

In Abbildung 21 ist zu sehen, daß die Doppelmutante mit NAD und NMN auch bei hohen Konzentrationen nicht wachsen konnte (Abb. 21/Ab, Bb). Mit NR als Faktor V-Quelle waren die Kolonien des Stamms GK04(*nadN::cat Δhel::kan*) bei niedrigen Konzentrationen (1,5 µM) kleiner als beim Kontrollstamm, bei 15 µM NR war kein Unterschied mehr erkennbar (Abb. 23/C). (Da das Vorkommen der kleinen Kolonien der Doppelmutante bei 1,5 µM NR ein Einzelfall war, kann man davon ausgehen, daß bei der Herstellung von NR das NMN nicht vollständig umgesetzt wurde.)

6.2.3 Aufnahme von ^{14}C -NAD, ^{14}C -NMN und ^{14}C -NR in GK04(*nadN::cat Dhel::kan*)

Um zu testen, welche Abbauprodukte von NAD die innere Membran passieren können, wurden mit dem Stamm GK04(*nadN::cat Δhel::kan*) Transport-Assays mit radioaktiv markiertem NAD, NMN und NR durchgeführt (siehe Methoden 8).

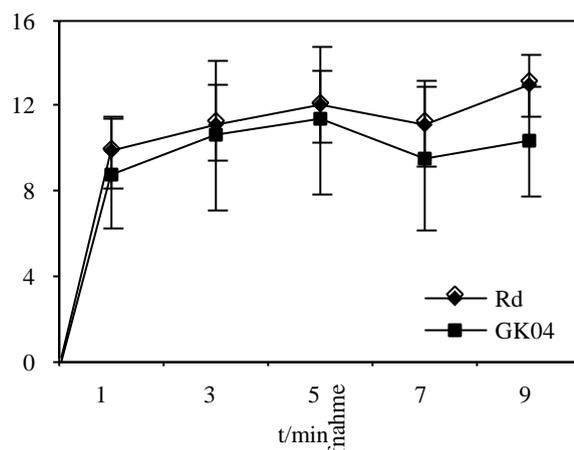


Abb. 24: Aufnahme von ^{14}C -NR von *H. influenzae* Rd und GK04(*nadN::cat Δhel::kan*). Die Substratkonzentrationen betragen $1\ \mu\text{M}$ (spezifische Aktivität). Jeder Punkt repräsentiert den Durchschnittswert mit Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Messungen. Die Aufnahme von ^{14}C -NR ist angegeben als prozentualer Anteil Radioaktivität an der eingesetzten Menge von $1\ \mu\text{M}$ Substrat.

Es zeigte sich, daß die Doppelmutante nicht fähig war, ^{14}C -NAD und ^{14}C -NMN aufzunehmen (Daten nicht gezeigt). Der Stamm GK04(*nadN::cat Δhel::kan*) konnte aber NR im gleichen Maße inkorporieren wie der Wildtyp Rd (Abb. 24).

Die Wachstumsphänotypen der Doppelmutante GK04(*nadN::cat Δhel::kan*) und das Unvermögen, NAD und NMN aufzunehmen, beweisen, daß kein weiteres Protein an der Prozessierung von NAD zu NR beteiligt ist und daß nur NR über die innere Membran ins Zytoplasma transportiert werden kann.

7. Inhibitoren der NAD-Aufnahme von *H. influenzae* Rd

Es sollten die Substanzen NMN, Adenosin, Hämin und pNPP auf ihre Fähigkeit geprüft werden, die Aufnahme von ^{14}C -NAD in den *H. influenzae* Stamm-Rd zu inhibieren. Hierfür wurden Transport-Assays durchgeführt (siehe Methoden 8), wobei das radioaktiv markierte NAD vor Zugabe zu den Zellen mit den zu testenden Substanzen gemischt wurde.

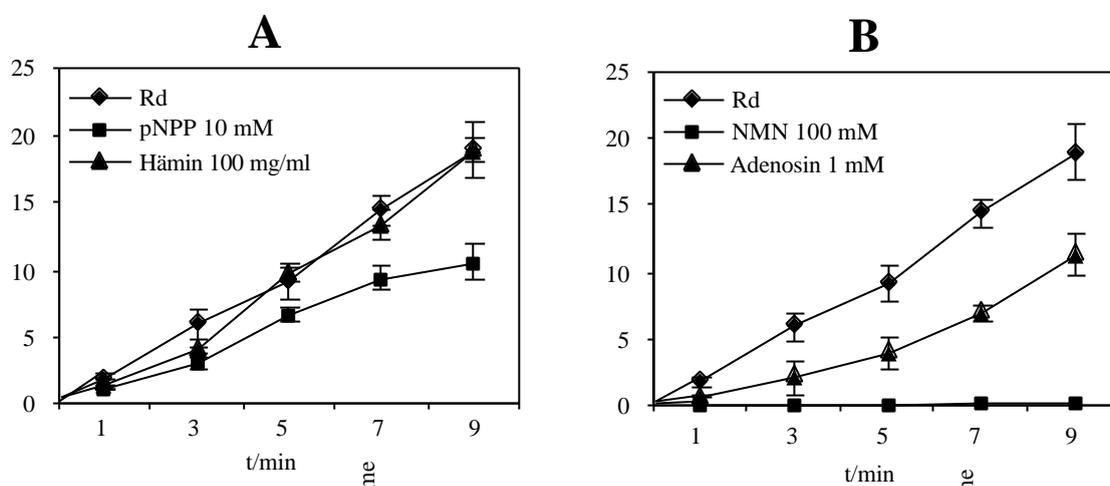


Abb. 25: Inhibition der ^{14}C -NAD-Aufnahme von *H. influenzae* Rd. Die Substratkonzentrationen betragen $1\ \mu\text{M}$ (spezifische Aktivität). Jeder Punkt repräsentiert den Durchschnittswert mit Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Messungen. Die Aufnahme von ^{14}C -NAD ist angegeben als prozentualer Anteil Radioaktivität an der eingesetzten Menge von $1\ \mu\text{M}$ Substrat. **A)** Inhibition der ^{14}C -NAD-Aufnahme mit Hämin ($100\ \mu\text{g/ml}$) und pNPP ($10\ \text{mM}$); **B)** Inhibition der ^{14}C -NAD-Aufnahme mit NMN ($100\ \mu\text{M}$) und Adenosin ($1\ \text{mM}$).

Die Abbildung 25/A zeigt, daß die Zugabe von $100\ \mu\text{g/ml}$ Hämin keinen Einfluß auf die Aufnahme von ^{14}C -NAD in *H. influenzae* Rd hat, setzt man jedoch $10\ \text{mM}$ pNPP zu, so inkorporiert der Stamm nur noch ca. $12\ \%$ ^{14}C -NAD. In Abbildung 25/B ist zu sehen, daß die Inhibition mit $1\ \text{mM}$ Adenosin den Transport auf $12\ \%$ verringert, während bei Anwesenheit von $100\ \mu\text{M}$ NMN der Stamm Rd kein ^{14}C -NAD mehr aufnehmen kann.

8. Faktor V-Nutzung in pathogenen *H. influenzae*-Stämmen

Die Proteine *e(P4)* und *NadN* wurden als hoch konserviert in verschiedenen bekapselten und nicht-typisierbaren *H. influenzae*-Stämmen beschrieben (Green et al., 1991). Um zu testen, ob beide Proteine auch in pathogenen Stämmen die gleiche Funktion erfüllen wie in dem Laborstamm Rd, wurden die Gene *hel* und *nadN* in je zwei nicht-typisierbaren Klinischen Isolaten und im Stamm Hib deletiert bzw. ausgeknockt und die Enzym-Aktivitäten der jeweiligen Protein-Extrakte untersucht.

8.1 Das Lipoprotein *e(P4)* in pathogenen *H. influenzae* Stämmen

Die Konstruktion der Deletionsmutanten Hib REI1012b($\Delta hel::kan$), NTHI 01539 GK06($\Delta hel::kan$) und NTHI 6418 GK07($\Delta hel::kan$) erfolgte wie unter Methoden 10.1 beschrieben. Die Phosphatase-Aktivität der $e(P4)$ -Proteine der pathogenen Stämmen Hib, NTHI 01539 und NTHI 6418 wurde anhand von Dünnschicht-Chromatographien getestet. Dazu wurden die Außenmembranprotein-Extrakte der Stämme Hib, REI1012b($\Delta hel::kan$), NTHI 01539, GK06($\Delta hel::kan$), NTHI 6418 und GK07($\Delta hel::kan$) präpariert (siehe Methoden 4.1.2.2), mit ^{14}C -NMN und ^{14}C -AMP inkubiert und die Spaltprodukte chromatographisch aufgetrennt (siehe Methoden 9).

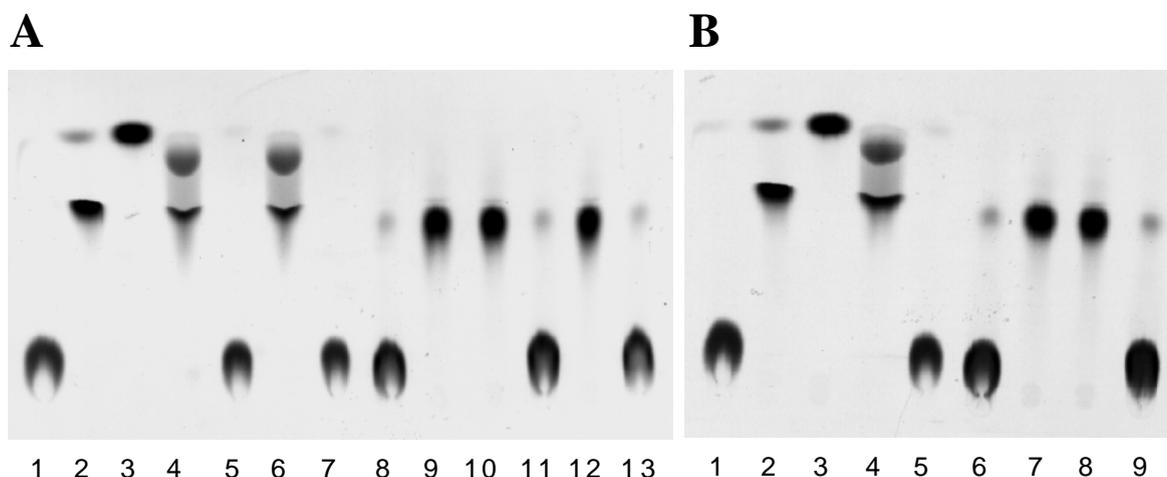


Abb. 26: Dünnschicht-Chromatographie von ^{14}C -NMN und ^{14}C -AMP als Substrat für $e(P4)$. ^{14}C -NMN und ^{14}C -AMP (je 10 nCi; 0,1 μ M) wurden inkubiert mit den Außenmembranprotein-Extrakten (OMPs) (je 10 μ g) von *H. influenzae* NTHI 01539, GK06($\Delta hel::kan$), NTHI 6418, GK07($\Delta hel::kan$), Hib und REI1012b($\Delta hel::kan$).
A) Spur 1, ^{14}C -NMN; Spur 2, ^{14}C -NR, Spur 3, ^{14}C -NA; Spur 4, ^{14}C -NMN inkubiert OMPs von NTHI 01539; Spur 5, ^{14}C -NMN inkubiert mit OMPs von GK06($\Delta hel::kan$); Spur 6, ^{14}C -NMN inkubiert OMPs von NTHI 6418; Spur 7, ^{14}C -NMN inkubiert mit OMPs von GK07($\Delta hel::kan$); Spur 8, ^{14}C -AMP; Spur 9, ^{14}C -Adenosin; Spur 10, ^{14}C -AMP inkubiert mit OMPs von NTHI 01539; Spur 11, ^{14}C -AMP inkubiert mit OMPs von GK06($\Delta hel::kan$); Spur 12, ^{14}C -AMP inkubiert mit OMPs von NTHI 6418; Spur 13, ^{14}C -AMP inkubiert mit OMPs von GK07($\Delta hel::kan$).
B) Spur 1, ^{14}C -NMN; Spur 2, ^{14}C -NR, Spur 3, ^{14}C -NA; Spur 4, ^{14}C -NMN inkubiert OMPs von Hib; Spur 5, ^{14}C -NMN inkubiert mit OMPs von REI1012b($\Delta hel::kan$); Spur 6, ^{14}C -AMP; Spur 7, ^{14}C -Adenosin; Spur 8, ^{14}C -AMP inkubiert mit OMPs von Hib; Spur 9, ^{14}C -AMP inkubiert mit OMPs von REI1012b($\Delta hel::kan$).

Die Spuren 1, 2, 3, 8 und 9 der Abbildung 26/A und die Spuren 1, 2, 3, 6 und 7 der Abbildung 26/B zeigen die Substrat-Kontrollen. In der Spuren 4 und 6 der Abbildung 26/A ist die Dephosphorylierung von ^{14}C -NMN zu ^{14}C -NR durch die Extrakte der klinischen Isolate NTHI 01539 und NTHI 6418 zu sehen. Die entsprechenden Extrakte der hel -Deletionsmutanten GK06($\Delta hel::kan$) und GK07($\Delta hel::kan$) konnten ^{14}C -NMN nicht mehr umsetzen (Abb. 26/A, Spuren 5 und 7). Ebenso waren die OMPs der klinischen Isolate NTHI 01539 und NTHI 6418 fähig, ^{14}C -AMP zu ^{14}C -Adenosin zu dephosphorylieren (Abb. 26/A, Spuren 10 und 12), die

Extrakte der *hel*-Deletionsmutanten GK06($\Delta hel::kan$) und GK07($\Delta hel::kan$) hatten keine Enzymaktivität mehr (Abb. 24/A, Spuren 11 und 13). Die Spuren 4 und 8 in Abbildung 26/B zeigen die Dephosphorylierung von ^{14}C -NMN und ^{14}C -AMP durch die Hib-Extrakte, eine Fähigkeit, die der Extrakt der *hel*-Deletionsmutante REI1012b($\Delta hel::kan$) nicht mehr besaß (Abb. 26/B, Spuren 5 und 9).

8.2 NadN in pathogenen *H. influenzae*-Stämmen

Die Konstruktionen der *nadN*-Knockout-Mutanten Hib REI1010b(*nadN::cat*), NTHI 01539 JSB02(*nadN::cat*) und NTHI 6418 JSB03(*nadN::cat*) erfolgten wie unter Methoden 10.2 beschrieben. Die Pyrophosphatase- und 5'-Nukleotidase-Aktivität der NadN-Proteine in den pathogenen Stämmen Hib, NTHI 01539 und NTHI 6418 wurde dann durch Dünnschicht-Chromatographien überprüft. Dazu wurden die Periplasma-Extrakte der Stämme *H. influenzae* NTHI 01539, JSB02(*nadN::cat*), NTHI 6418, JSB03(*nadN::cat*), Hib und REI1010b(*nadN::cat*) präpariert (siehe Methoden 4.1.2), mit ^{14}C -NAD und ^{14}C -NMN inkubiert und die Spaltprodukte anschließend chromatographisch aufgetrennt (siehe Methoden 9).

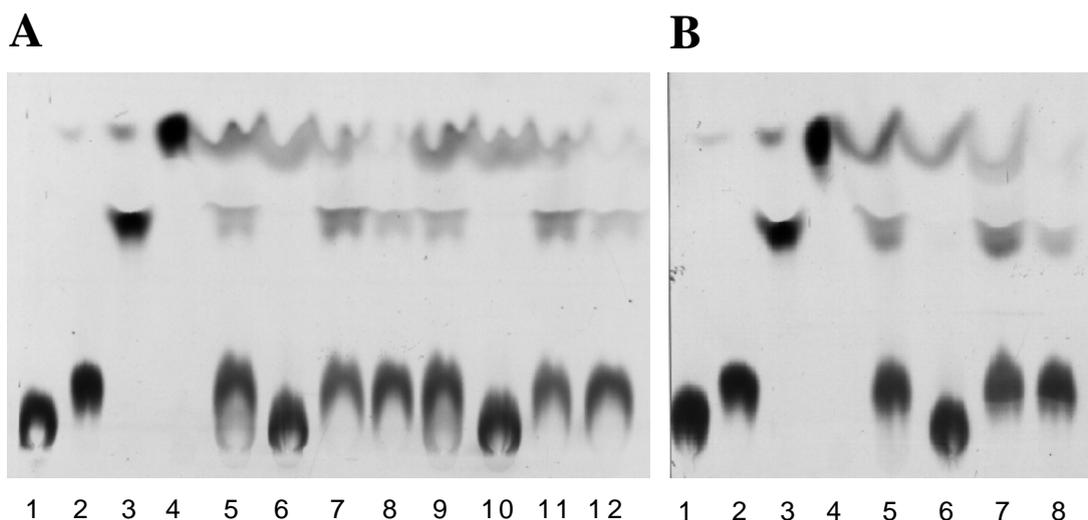


Abb. 27: Dünnschicht-Chromatographie von ^{14}C -NAD und ^{14}C -NMN als Substrat für NadN. ^{14}C -NAD und ^{14}C -NMN (je 10 nCi; 0,1 μM) wurden inkubiert mit den Periplasma-Extrakten (je 10 μg) von *H. influenzae* NTHI 01539, JSB02(*nadN::cat*), NTHI 6418, JSB03(*nadN::cat*), Hib und REI1010b(*nadN::cat*).

A) Spur 1, ^{14}C -NAD; Spur 2, ^{14}C -NMN; Spur 3, ^{14}C -NR, Spur 4, ^{14}C -NA; Spur 5, ^{14}C -NAD inkubiert mit Extrakt von NTHI 01539; Spur 6, ^{14}C -NAD inkubiert mit Extrakt von JSB02(*nadN::cat*); Spur 7, ^{14}C -NMN inkubiert mit Extrakt von NTHI 01539; Spur 8, ^{14}C -NMN inkubiert mit Extrakt von JSB02(*nadN::cat*); Spur 9, ^{14}C -NAD inkubiert mit Extrakt von NTHI 6418; Spur 10, ^{14}C -NAD inkubiert mit Extrakt von JSB03(*nadN::cat*); Spur 11, ^{14}C -NMN inkubiert mit Extrakt von NTHI 6418; Spur 12, ^{14}C -NMN inkubiert mit Extrakt von JSB03(*nadN::cat*).

B) Spur 1, ^{14}C -NAD; Spur 2, ^{14}C -NMN; Spur 3, ^{14}C -NR, Spur 4, ^{14}C -NA; Spur 5, ^{14}C -NAD inkubiert mit Extrakt von Hib; Spur 6, ^{14}C -NAD inkubiert mit Extrakt von REI1010b(*nadN::cat*); Spur 7, ^{14}C -NMN inkubiert mit Extrakt von Hib; Spur 8, ^{14}C -NMN inkubiert mit Extrakt von REI1010b(*nadN::cat*).

Die jeweils ersten vier Spuren der Abbildung 27 stellen die Substrat-Kontrollen dar. Die Spuren 5 und 9 (Abb. 27/A) zeigen die Spaltung von ^{14}C -NAD zu ^{14}C -NMN mit der partiellen Dephosphorylierung zu ^{14}C -NR durch die Periplasma-Extrakte der Stämme NTHI 01539 und NTHI 6418. Die Extrakte der entsprechenden *nadN*-Mutanten hatten keine Enzym-Aktivität mehr (Abb. 27/A, Spuren 6 und 10). Setzte man ^{14}C -NMN als Substrat ein, so wurde es von den Wildtyp-Extrakten teilweise zu ^{14}C -NR dephosphoryliert (Abb. 27/A, Spuren 7 und 11). Auch bei den Extrakten der Stämme JSB02(*nadN::cat*) und JSB03(*nadN::cat*) entstand in geringen Mengen ^{14}C -NR (Abb. 27/A, Spuren 8 und 12).

In Abbildung 27/B ist in Spur 5 die Spaltung von ^{14}C -NAD zu ^{14}C -NMN mit partieller Dephosphorylierung zu ^{14}C -NR durch den Hib-Extrakt zu sehen. Der Extrakt der *nadN*-Mutante war dazu nicht mehr fähig (Abb. 27/B Spur 6). Wurde ^{14}C -NMN als Substrat zugesetzt, so konnte der Hib-Extrakt es teilweise zu ^{14}C -NR dephosphorylieren. Bei dem Extrakt des Stamms REI1010b(*nadN::cat*) entstand nur in sehr geringen Mengen ^{14}C -NR (Abb. 27/B, Spuren 7 und 8).

Zusammenfassend wurde festgestellt, daß die konservierten Proteine *e*(P4) und NadN von *H. influenzae* in dem pathogenen Stamm Hib und den Klinischen Isolaten die gleichen Aktivitäten besaßen wie in dem Laborstamm Rd. In allen getesteten Stämmen hatten die OMPs die Fähigkeit,

NMN und AMP zu dephosphorylieren. Ebenso konnten die Periplasma-Extrakte aller pathogenen Stämme in Abhängigkeit von NAD NAD und NMN spalten. Darüberhinaus zeigten der Stamm Hib und die klinischen Isolate einen ähnlichen Wachstumsphänotyp auf BHI-Platten wie der Laborstamm Rd (Daten nicht gezeigt).

9. Das Außenmembranprotein P2

Das Protein OmpP2, auch genannt Protein b/c, hat ein Molekulargewicht von 39 kDa und bildet ein Trimer. Es stellt das Hauptporin der äußeren Membran für Substanzen bis 1,4 kDa dar (Hanson et al., 1988). OmpP2 ist stark immunogen und variiert unter nicht-typisierbaren *H. influenzae*-Stämmen in Größe und Aminosäuresequenz (Cope et al., 1990). Eine *ompP2*-Knockout-Mutante zeigte einen signifikanten Wachstumsphänotyp und war im Tiermodell nicht mehr virulent (Cope et al., 1990).

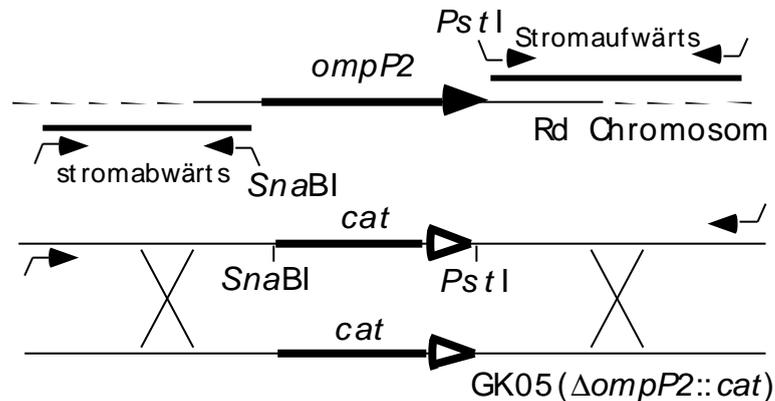
Da vermutlich die Nikotinamid-Nukleotide NAD, NMN und NR (Molekulargewicht 254,2 Da – 685,4 Da) auf Grund ihrer Größe und Ladung nicht frei über Membrane diffundieren können, wurde eine *ompP2*-Deletionsmutante hergestellt, um zu untersuchen, ob diese Substrate durch die Pore OmpP2 ins Periplasma diffundieren. Anschließend wurden die Wachstumsphänotypen und die Aufnahmefähigkeit dieser Mutante in Abhängigkeit von Nikotinamid-Nukleotid-Quellen bestimmt.

9.1. Konstruktion der *ompP2*-Deletionsmutante GK05(*DompP2::cat*)

Für die Deletion des Gens HI0139, das für das Außenmembranprotein OmpP2 kodiert, wurden zwei DNA-Fragmente generiert. Die 500 bp und 400 bp großen Fragmente, je stromaufwärts und stromabwärts angrenzend an ORF HI0139, erhielt man durch eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA des Stamms Rd als Matrize (Abb. 28). Die verwendeten Oligonukleotiden waren für das Fragment „Stromaufwärts“ 5`P25` und 5`P2PstI3`, welcher für eine *PstI*-Schnittstelle kodiert. Für das Fragment „Stromabwärts“ wurden die Primer 3`P23` und 3`P2SnaBI5` genutzt, der für eine *SnaBI*-Schnittstelle kodiert. Die gereinigten PCR-Produkte wurden mit *PstI* bzw. *SnaBI* geschnitten. Die *cat*-Kassette des Plasmids pAKcat (Kraiß et al., 1998) wurde ebenfalls mit *PstI* und *SnaBI* gespalten und zwischen die beiden PCR-Produkte ligiert. Das erhaltene 1,7 kbp große Fragment wurde dann mit den Primern 5`P25` und 3`P23` via PCR amplifiziert (Abb. 28). Das gereinigte PCR-Produkt wurde anschließend in den MIV-kompetenten Stamm *H. influenzae* Rd

transformiert (Abb. 28). Nach dem Cross-over des Fragmentes in das Chromosom von Rd wurden chloramphenicolresistente Zellen auf BHI-Agar mit Hämin (20 µg/ml), NMN (30 µM) und Chloramphenicol (2 µg/ml) selektiert (Abb. 28). Der erhaltene Stamm GK05($\Delta ompP2::cat$) wurde anhand von Sequenz-Analysen, PCR (Daten nicht gezeigt) und silbergefärbter SDS-Page (Abb. 29) überprüft.

Abb. 28: Konstruktionsschema des *H. influenzae* Stamms GK05($\Delta ompP2::cat$). Die eingezeichneten Restriktionsschnittstellen sind *Pst*I und *Sna*BI. Die fettgedruckte Pfeile stehen für die Gene *ompP2* und *cat*. Die kleine Pfeile markieren die Oligonukleotide. Cross-over-Stellen sind durch Kreuze angegeben.



Die Außenmembranproteine der Stämme Rd und GK05($\Delta ompP2::cat$) wurden präpariert (siehe Methoden 4.1.2.1), in einer SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt (siehe Methoden 4.5).

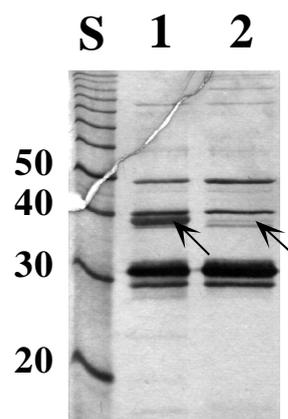


Abb. 29: Silbergefärbte SDS-PAGE mit Außenmembranprotein-Extrakten (je 1 µg) von *H. influenzae* Rd und GK05($\Delta ompP2::cat$). Spur S, Standard (Gibco); Spur 1, OMP-Profil von Rd; Spur 2, OMP-Profil von GK05($\Delta ompP2::cat$).

Die silbergefärbte SDS-PAGE (Abb. 29) zeigt in Spur 1 das Außenmembranprotein-Profil des Stamms *H. influenzae* Rd. Daneben in Spur 2 ist das Profil der P2-Deletionsmutante zu sehen, bei der auf der Höhe von 39 kDa die P2-Bande fehlt (siehe Pfeilmarkierung).

9.2 Die Wachstumsphänotypen der *ompP2*-Deletionsmutante GK05($\Delta ompP2::cat$)

Mit der *ompP2*-Deletionsmutante GK05($\Delta ompP2::cat$) wurden in Minimalmedium mit variierenden Konzentrationen von NAD, NMN und NR Wachstumskurven erstellt, um festzustellen, ob das Wachstum der Mutante Faktor V-abhängig ist.

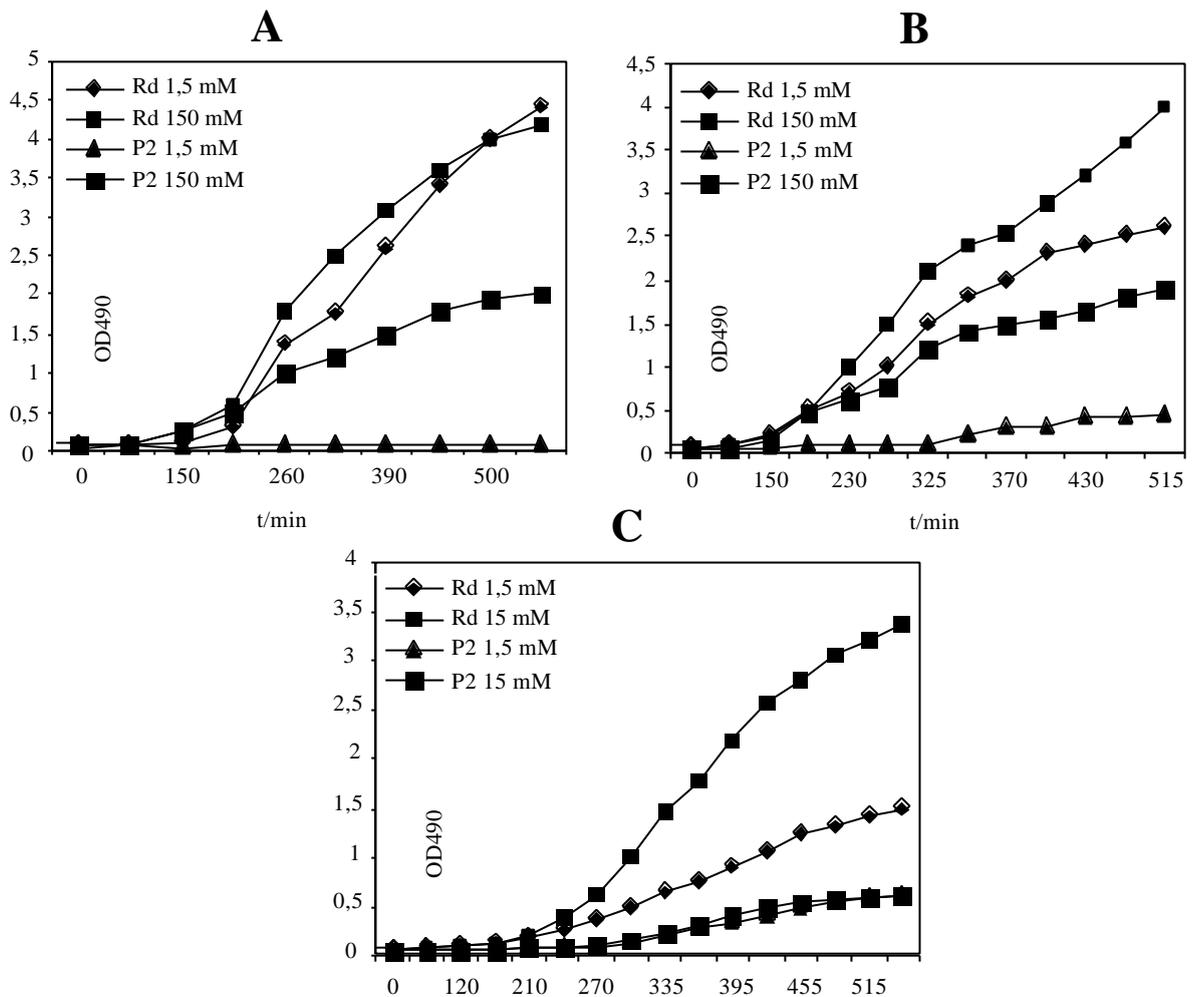


Abb. 30: Wachstumsphänotyp von *H. influenzae* Rd und GK05($\Delta ompP2::cat$) in Minimalmedium, supplementiert mit Hämin (20 $\mu\text{g/ml}$) und verschiedenen Faktor V-Quellen. **A)** Wachstum mit 1,5 μM und 150 μM NAD. **B)** Wachstum mit 1,5 μM und 150 μM NMN. **C)** Wachstum mit 1,5 μM und 15 μM NR.

Der Stamm GK05($\Delta ompP2::cat$) konnte mit 1,5 μM NAD nicht wachsen, auch bei einer Erhöhung der NAD-Konzentration auf 150 μM erreichte die Mutante nur $OD_{490 \text{ nm}} 2$. Dem Stamm Rd genügten schon 1,5 μM NAD, um bis $OD_{490 \text{ nm}} 4,5$ zu wachsen (Abb. 30/A). Mit 1,5 μM NMN war bei Stamm GK05($\Delta ompP2::cat$) kein Wachstum zu beobachten, mit 150 μM erreichte die Mutante $OD_{490 \text{ nm}} 2$. Der Wildtyp wuchs mit 1,5 μM NMN bis $OD_{490 \text{ nm}} 2,7$, mit 150 μM bis $OD_{490 \text{ nm}} 4$ (Abb. 30/B). Abbildung 30/C zeigt, daß der Stamm Rd mit 1,5 μM NR bis $OD_{490 \text{ nm}} 1,5$ wachsen konnte, mit 15 μM NR bis $OD_{490 \text{ nm}} 3,4$. Die P2-Deletionsmutante erreicht bei beiden Konzentrationen NR $OD_{490 \text{ nm}} 0,5$ (Abb. 30/C).

9.4 Aufnahme von ^{14}C -NAD, ^{14}C -NMN und ^{14}C -NR in GK05($\Delta ompP2::cat$)

Um die Aufnahmefähigkeit des Stamms GK05($\Delta ompP2::cat$) von Faktor V-Substraten zu testen, wurden mit ^{14}C -NAD, ^{14}C -NMN und ^{14}C -NR Transport-Assays durchgeführt. Die Zellen wurden bis $\text{OD}_{490 \text{ nm}} 1$ angezogen und mit den radioaktiv markierten Substraten inkubiert. Nach 1, 3, 5, 7 und 9 Minuten wurden Aliquote entnommen, gefiltert und anschließend gemessen (siehe Methoden 8).

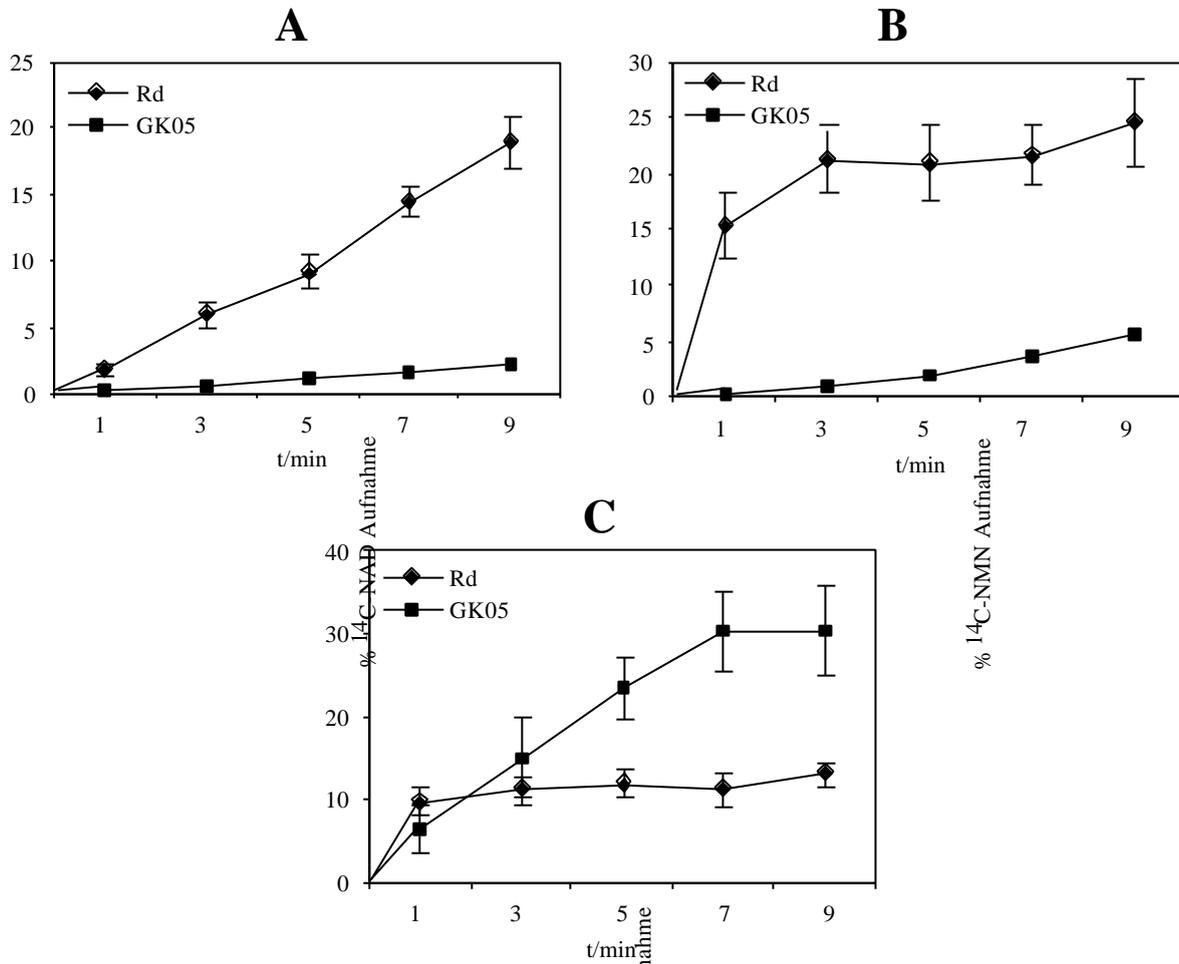


Abb. 31: Aufnahme von verschiedenen radioaktiv markierten Faktor V-Substraten von *H. influenzae* Rd und GK05($\Delta ompP2::cat$). Die Substratkonzentrationen betragen $1 \mu\text{M}$ (spezifische Aktivität). Jeder Punkt repräsentiert den Durchschnittswert mit Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Messungen. Die Aufnahme des Faktor V ist angegeben als prozentualer Anteil Radioaktivität an der eingesetzten Menge von $1 \mu\text{M}$ Substrat. **A)** Aufnahme von ^{14}C -NAD; **B)** Aufnahme von ^{14}C -NMN; **C)** Aufnahme von ^{14}C -NR.

Die *ompP2*-Deletionsmutante konnte nur 3 % der eingesetzten Menge an NAD aufnehmen, während der Stamm Rd 20 % NAD aufnahm (Abb. 31/A). Mit NMN als Faktor V-Substrat inkorporierte der Stamm GK05($\Delta ompP2::cat$) nur 5 % (Abb. 31/B). Wurde aber NR eingesetzt, so nahm der Stamm Rd nur 13 % der eingesetzten Menge auf, während die Mutante bis zu 30 % ins Zytoplasma transportieren konnte (Abb. 31/C).

Das Faktor V-abhängige Wachstumsdefizit sowie die stark verminderte Aufnahmefähigkeit von NAD und NMN der *ompP2*-Deletionsmutante zeigen, daß in *H. influenzae* NAD und NMN durch OmpP2 diffundieren.

F. Diskussion

Haemophilus influenzae ist auxotroph in Bezug auf NAD (Faktor V), da alle Enzyme für die de novo-Synthese von NAD fehlen. NAD kann unter Laborbedingungen durch NMN oder NR ersetzt werden, wohingegen Nikotinamid (NA), Quinolinsäure (QA) und NAMN nicht als Faktor V-Substrate dienen können. Unter Infektionsbedingungen ist jedoch über die Quelle und den Aufnahmemechanismus von Pyridin-Nukleotid-Substraten nur sehr wenig bekannt. Die Fähigkeit, auch NMN und NR als NAD-Substitute zu nutzen, deutet darauf hin, daß NAD nicht intakt in die Zelle inkorporiert wird, sondern daß der Aufnahme eine Prozessierung vorausgeht. In *H. influenzae* und in *H. parainfluenzae* konnte die Akkumulation von Nikotinamid-Nukleotiden aus NAD- und NR-Quellen nachgewiesen werden (Godek et al., 1990; Cynamon et al., 1988). Der K_M -Wert für die Aufnahme von NAD und NR in *H. parainfluenzae* liegt bei 0,55 μM und 0,14 μM (Cynamon et al., 1988). Intrazellulär kann dann NR ATP-abhängig wieder über NMN zu NAD resynthetisiert werden (Kahn und Anderson).

1. Die Rolle von *e(P4)* bei der Häminaufnahme

Vor einigen Jahren wurde eine *hel*-Insertionsmutante konstruiert, um die biologische Funktion von *e(P4)* zu untersuchen. Es stellte sich heraus, daß die *hel*-Mutante unter aeroben Bedingungen ein deutliches Wachstumsdefizit zeigte, während sie anaerob so gut wachsen konnte wie der Stamm Rd. Aus diesen und weiteren Befunden wurde geschlossen, daß *e(P4)* an der Häminaufnahme beteiligt sein muß, da *H. influenzae* Hämin nur unter aeroben Bedingungen benötigt (Reidl et al., 1996). Um die These zu prüfen, wurde eine *hel*-Deletionsmutante konstruiert und auf ihre Häminabhängigkeit getestet. Die Wachstumstests mit verschiedenen Konzentrationen von Hämin und NAD zeigten aber, daß das Wachstumsdefizit der Mutante durch hohe Konzentrationen von NAD ausgeglichen werden konnte. Der Phänotyp von REI1012 war daher nicht Hämin- sondern NAD-abhängig. Die Abhängigkeit von erhöhten NAD-Konzentrationen ist darauf zurückzuführen, daß unter aeroben Bedingungen mehr NAD zum Wachstum gebraucht wird als für anaerobes Wachstum.

Die Annahme, daß *e(P4)* eine Rolle bei der Häminaufnahme spielt, konnte durch die Wachstumstests widerlegt und stattdessen eine Abhängigkeit der NAD-Nutzung von *e(P4)* von *H. influenzae* nachgewiesen werden.

2. Die Relevanz von *e(P4)* bei der NAD-Nutzung von *H. influenzae*

Da nachgewiesen wurde, daß das Wachstum der *hel*-Deletionsmutante REI1012 NAD-abhängig ist, wurde die Mutante näher charakterisiert, indem die Wachstumsphänotypen mit weiteren Nikotinamid-Nukleotiden-Substraten untersucht wurden. Es zeigte sich, daß die Mutante mit niedrigen Konzentrationen von NADP und NMN nicht wachsen konnte. Das Wachstumsdefizit mit NMN und NADP konnte durch Konzentrationserhöhung überkommen werden. Das Wachstum mit NR als Faktor V-Substrat war dagegen *e(P4)*-unabhängig. Da das Wachstumsvermögen der *hel*-Mutante abhängig von der Konzentration von Faktor V-Quellen war, wurde untersucht, ob die Deletion von *hel* im Stamm REI1012 auch Auswirkungen auf die Aufnahmefähigkeit von NAD von *H. influenzae* hat. Die durchgeführten Transport-Assays zeigten tatsächlich, daß die *hel*-Deletionsmutante nicht fähig war, NAD und NMN aufzunehmen, aber NR akkumulieren konnte.

Die Beobachtung, daß die *hel*-Mutante einen signifikanten Wachstumsphänotyp mit NADP, NAD und NMN zeigte und darüberhinaus nicht fähig war, NAD und NMN aufzunehmen, führte zu der Frage, inwiefern das Protein *e(P4)* bei der Prozessierung und Aufnahme von NAD beteiligt sein könnte. Um dies beantworten zu können, wurden die Enzym-Aktivitäten von *e(P4)* charakterisiert. Durch verschiedene Tests mit den unspezifischen Phosphatase-Substraten pNPP und Phenolphthalein-Diphosphat konnte *e(P4)* als saure Phosphatase identifiziert werden, deren pH-Optimum bei ca. pH 6 liegt. Um die biologisch relevanten Substrate von *e(P4)* zu identifizieren, wurden verschiedene Phosphatase-Assays durchgeführt. NADP als mögliches Substrat wurde mit dem Malat-Enzym-Assay getestet, bei dem Malat zu Pyruvat umgesetzt, wobei NADP zu NADPH reduziert wird. Durch die Vorinkubation von NADP mit Außenmembranprotein-Extrakten der Stämme Rd und REI1012 konnte nachgewiesen werden, daß *e(P4)* NADP als Substrat erkennt und dephosphoryliert. In einem weiteren Assay wurden radioaktiv markiertes NAD, NMN und NR mit Außenmembranprotein-Extrakten der Stämme Rd und REI1012 inkubiert und anschließend die Spaltprodukte chromatographisch aufgetrennt. Es zeigte sich, daß *e(P4)*-abhängig NMN zu NR dephosphoryliert wurde, während NAD und NR von *e(P4)* nicht gespalten wurden. NMN konnte somit als das für die NAD-Nutzung relevante Substrat von *e(P4)* identifiziert werden.

3. Die Rolle von *e(P4)* bei der NAD-Nutzung von *H. influenzae*

Das Lipoprotein *e(P4)* wurde als Phosphatase charakterisiert, die bei der NAD-Aufnahme NMN zu NR spaltet. Um die Rolle von *e(P4)* bei der NAD-Aufnahme näher charakterisieren zu können, wurde untersucht, ob noch weitere Funktionen außer der Phosphatase-Aktivität vorliegen. Möglich wäre eine Bindungs-Funktion der Substrate NAD(P) und NMN und Beteiligung am Transport der Faktor V-Quellen über die äußere Membran. Dazu wurden Phosphatase-Mutanten hergestellt, bei denen im *hel*-Gen gezielt durch einen Aminosäure-Austausch die Phosphatase-Funktion deletiert wurden, während der Rest des Proteins erhalten blieb. So wurde bei der Mutante GK02 durch Einführung einer *XhoI*-Schnittstelle in einem konservierten Bereich des *hel*-Gens das Aspartat an Position 86 durch ein Leucin ausgetauscht. Eine ähnliche Mutante mit einem Aspartat-Alanin-Austausch an Position 84 wurde zeitgleich in den USA von unseren Kollaborationspartnern hergestellt (Kemmer et al., 2001). Beide Mutanten wurden getestet, ob die mutierten *e(P4)*-Proteine noch intakt exprimiert werden und die Phosphatase-Aktivität verloren hatten. Dazu wurde ein Western-Blot mit den Außenmembranprotein-Extrakten des Kontrollstamms Rd und beider Mutanten hergestellt, bei dem die mutierten Proteine mit anti-*e(P4)*-Antikörpern detektiert wurden. Dabei stellte sich heraus, daß die Expression des mutierten *e(P4)*-Proteins des Stamms GK02 im Vergleich zu den Stämmen Rd und GK03 um den Faktor 30 erniedrigt war. Dies könnte auf eine Instabilität oder ungenügende Translokation des mutierten Proteins zurückgeführt werden. In einem Phosphatase-Assay, bei dem die Außenmembranproteine mit ^{14}C -NMN inkubiert und anschließend die Spaltprodukte chromatographisch aufgetrennt wurden, konnte der Verlust der Phosphatase-Funktion nachgewiesen werden.

Die Phosphatase-Mutanten GK02 und GK03 wurden dann mit der *hel*-Deletionsmutante hinsichtlich ihrer Wachstumsphänotypen und Aufnahmefähigkeit von Faktor V-Substraten verglichen. Es stellte sich heraus, daß beide Phosphatase-Mutanten, wie auch die *hel*-Mutante, mit niedrigen Konzentrationen von NAD und NMN nicht wachsen konnten, während das Wachstum mit NR *e(P4)*-unabhängig war. Ebenso zeigten die Aufnahme-Assays, daß die Stämme GK02 und GK03 nicht fähig waren, ^{14}C -NAD und ^{14}C -NMN aufzunehmen. Die Versuche belegen, daß schon der Verlust der Phosphatase-Funktion durch eine Punktmutation genügt, um die Phänotypen der *hel*-Deletionsmutante in Bezug auf Wachstum und NAD-Aufnahme zu erreichen. Dies bedeutet, daß das Außenmembranprotein *e(P4)* nur mit der Phosphatase-Aktivität an der NAD-Prozessierung und -Aufnahme beteiligt ist.

Da *e*(P4) ein Lipoprotein an der Außenmembran ist, stellte sich die Frage, ob die Lokalisation an der Zelloberfläche essentiell für die NMN-Spaltung ist, oder ob *e*(P4) als freies Protein im Periplasma die gleiche Funktion erfüllen könnte.

Die periplasmatischen Proteine werden über das generelle Sekretionssystem transportiert. Diese Proteine zeichnen sich durch das Vorhandensein einer N-terminalen Signalsequenz aus. Diese Signalsequenz besteht aus einer N-Domäne mit positiv geladenen Aminosäuren, einer hydrophoben H-Region und einer unpolaren C-Region, die von der Erkennungssequenz der Signalpeptidase I gefolgt wird (Pugsley, 1989, 1993). Mittels des generellen Sekretionssystems werden die Proteine über die zytoplasmatische Membran transportiert, wo sie durch Abspaltung des Signalpeptids als freie Proteine erscheinen (Pugsley, 1993).

Eine besondere Klasse an transportierten Proteinen stellen Lipoproteine dar. Die Signalsequenz dieser Lipoproteine besteht aus einer positiv geladenen N-terminalen Region, gefolgt von hydrophoben Aminosäuren. Die C-terminale Region der Signalsequenz enthält die Lipobox mit der Schnittstelle für die Lipoprotein-spezifische Signalpeptidase II. Die Lipobox besteht aus der Konsensus-Sequenz Leu-Ala-Gly-Cys (Ichihara et al., 1981). Alle Prolipoproteine werden Sec-abhängig über die zytoplasmatische Membran transportiert. Dabei katalysiert die innenmembranständige Diazylglyceryl-Transferase die Bindung von Diacylglycerol über eine Thioetherbrücke an das Cystein des Vorläuferproteins (Sankaran und Wu, 1994). Die Signalpeptidase II ist ebenfalls in der Zytoplasmamembran verankert und erkennt das azylierte Cystein und spaltet das Signalpeptid ab (Dev und Ray, 1984). Anschließend knüpft eine Transacylase an die freigewordene Amidgruppe des Cysteins eine Fettsäure, abhängig von der Art des Lipoproteins (Gupta und Wu, 1991). Das Lipoprotein kann nun über sein Lipidanker am N-Terminus in die Innemmembran integriert werden (Zytoplasmatische Lipoproteine) oder zur Außenmembran transportiert werden (Matsuyama et al., 1995). Das Signal hierfür ist die Aminosäure an der +2-Stelle des Lipoproteins. Befindet sich an dieser Position ein Serin, bindet der Carrier LolA an das Lipoprotein und transportiert es als Komplex zu dem Rezeptor LolB an der Außenmembran, der das Lipoprotein dort integriert (Matsuyama et al., 1997). Der Proteinteil der Außenmembran-Lipoproteine kann dabei zur periplasmatischen Seite oder nach außen zeigen. Ob *e*(P4) sich auf beiden Seiten der Außenmembran befindet, ist noch unbekannt, experimentell

nachgewiesen wurde, daß *e(P4)* zumindest an der Zelloberfläche detektierbar ist (Reilly et al., 1999; Green et al., 1991).

Um zu untersuchen, ob rekombinantes *e(P4)* ohne Lipidanker im Periplasma ebenfalls NMN spalten kann, sollte die Azyklakzeptorstelle Cystein der *e(P4)*-Signalsequenz durch ein Glycin ausgetauscht werden.

Die Lokalisation der *e(P4)*-Proteine im Periplasma von zwei *H. influenzae*-Klonen, GK07 und GK08, wurden mit Hilfe von Western Blots nachgewiesen. Es zeigte sich, daß in den Extrakten der Außenmembran kein *e(P4)* mehr detektiert werden konnte, während im Periplasma-Extrakt beider Mutante, wie auch im Stamm Rd *e(P4)* zu sehen war. Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um *e(P4)* im Transportprozess zur Außenmembran. Mit den Außenmembranprotein- und Periplasma-Extrakten wurden pNPP-Assays durchgeführt, um die Phosphatase-Aktivität der Fraktionen zu testen. Es konnte aber weder in den OMP-Extrakten, noch in den Periplasma-Extrakten der Mutanten GK07 und GK08 und des Wildtyp-Stamms eine Aktivität festgestellt werden. Gründe für die Inaktivität der periplasmatischen *e(P4)*-Proteine könnten sein, daß der Cystein-Glycin-Austausch in der Signalsequenz nicht ausreicht, um einem Lipoprotein den Charakter eines periplasmatischen Proteins zu verleihen. Für die *e(P4)*-Proteine der Cysteinmutanten wäre folgendes Schicksal denkbar: Nach der Translokation der Proproteine über die Innenmembran unterbleibt auf Grund des fehlenden Cysteins die Verknüpfung des Lipidankers und die Erkennung der Lipoprotein-spezifische Signalpeptidase II. Ob allerdings die Signalpeptidase I die mutierte Lipobox als Schnittstelle erkennt und die Signalsequenz absplattet, ist fraglich. Die Freisetzung von der Innenmembran findet aber nach wie vor durch LolA statt, da der Carrier das Serin an der +2-Stelle des reifen Proteins erkennt. *e(P4)* befindet sich nun gebunden an LolA im Periplasma, wo es dann zu dem Rezeptor LolB an die Außenmembran transportiert wird. Da das Protein keinen Lipidanker besitzt, kann es aber nicht in die äußere Membran intergriert werden. Das *e(P4)* der Cysteinmutanten liegt daher im Periplasma wahrscheinlich nicht in seiner aktiven Form, sondern als LolA- oder LolB-Komplex vor.

Um das Protein *e(P4)* im Periplasma zu exprimieren, müßte man die Lipoprotein-spezifische Signalsequenz durch eine periplasmatische Signalsequenz austauschen. Dies wurde von Reilly durchgeführt, der das Genfragment, das für den reifen Teil des *e(P4)*-Proteins kodiert, hinter die Signalsequenz von PelB aus *E. chrysanthemi* in den Expressionsvektor pET20b klonierte (Reilly and Smith, 1999). Die Expression des rekombinanten Proteins stand dabei unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors. Nach Transformation des Plasmids in den *E. coli*-Stamm DH5 α konnte

dann aktives *e(P4)* im Periplasma detektieren werden. Dabei stellte sich aber heraus, daß das rekombinante *e(P4)* in *E. coli* toxisch wirkte (Reilly and Smith, 1999). Es könnte daher sein, daß aktives *e(P4)* auch im Periplasma von *H. influenzae* lethal ist, was erklären würde, daß trotz verschiedener Klonierungsstrategien zum Cystein-Glycin-Austausch immer nur Klone mit sekundären Mutationen im *hel*-Gen erhalten wurden.

Die Frage, ob für die Spaltung von NMN die Phosphatase an der Zelloberfläche lokalisiert sein muß, kann trotzdem indirekt verneint werden, da auch das Protein NadN im Periplasma fähig ist, NMN zu dephosphorylieren.

4. Das Protein NadN und die Doppelmutante

Das periplasmatische Protein NadN wurde als Pyrophosphatase beschrieben, die fähig ist, NAD zu Adenosin, Pi und NMN zu spalten (Reidl et al., 2000). Darüberhinaus wurde in NTHI ein Protein gereinigt, das 5'-Nukleotidase-Aktivität besitzt und NucA genannt wurde. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß beide Proteine identisch sind und NAD bzw. NMN als Substrate erkennen. Durch Dünnschicht-Chromatographien konnte nachgewiesen werden, daß NadN fähig ist, NAD zu NMN zu hydrolysieren, das dann zu NR dephosphoryliert wird. Als weiteres Substrat von NadN konnte NADP identifiziert werden, dessen Spaltung indirekt mit dem Malat-Enzym-Assay nachgewiesen wurde. Dabei konnte allerdings nicht unterschieden werden, ob die Spaltung von NADP zu NAD oder von NADP zu Adenosin und AMP erfolgte. Die biologische Relevanz der Enzymfunktionen von NadN für die NAD-Nutzung wurde anhand von Wachstumskurven und Transport-Assays gezeigt. Die *nadN*-Mutante war nicht fähig, NAD aufzunehmen oder es zum Wachstum zu nutzen. Mit NMN als Nikotinamid-Nukleotid-Quelle war Transport und bedingtes Wachstum möglich, da auch *e(P4)* NMN dephosphorylieren kann. Die Frage, welche Phosphatase nun für die NAD-Aufnahme von größerer Bedeutung ist, beantworten die Transport-Assays: während die *nadN*-Mutante fast den gleichen Prozentsatz an eingesetztem NMN aufnahm wie der Stamm Rd, war die *hel*-Mutante nicht mehr fähig, NMN zu akkumulieren. Die K_M -Werte für die NMN-Dephosphorylierung beider Proteine (durchgeführt innerhalb einer Zusammenarbeit mit B. Green und T. Reilly) bestätigen diese Befunde: K_M -Wert für *e(P4)* ist mit 0,318 mM niedriger als der K_M -Wert für NadN mit 1,26 mM (Kemmer et al., 2001). Es könnte daher sein, daß NMN das

unter *in vivo* Bedingungen relevante Pyridin-Nukleotid-Substrat darstellt und von *e(P4)* gleich an der Außenmembran als Substrat erkannt und gespalten wird.

Bisher wurden nur die Proteine *e(P4)* und *NadN* als relevante Enzyme für die NAD-Aufnahme identifiziert. Ob weitere Proteine an der Prozessierung von NAD beteiligt sind, wurde anhand einer *hel nadN*-Doppelmutante untersucht. Da die Doppelmutante auch mit hohen Konzentrationen von NAD und NMN nicht wachsen konnte, kann man davon ausgehen, daß in *H. influenzae* kein weiteres Enzym vorkommt, das fähig ist, NAD und NMN zu spalten. Gleichzeitig konnte die Frage, welches NAD-Abbauprodukt ins Zytoplasma gelangt, durch Transportversuche geklärt werden. Es wurde gezeigt, daß die Doppelmutante NAD oder NMN nicht akkumulieren konnte, während die Akkumulationsrate für NR der des Wildtyp-Stamms Rd entsprach. Es kann daher die Schlußfolgerung gezogen werden, daß NR das einzige Nikotinamid-Nukleotid-Substrat ist, das in *H. influenzae* durch ein Transportsystem der inneren Membran aufgenommen wird.

Das Transportsystem für NMN und NR in *E. coli* und *S. typhimurium* besteht aus dem Transporter *PnuC* und dem Transportaktivator *NadR*. Das Gen HI1077.1 aus *H. influenzae* ist zu *pnuC* aus *E. coli* zu 28 % identisch. Auch ein homologes Gen zu *nadR* konnte in *H. influenzae* identifiziert werden, das zu 75 % Ähnlichkeit besitzt. Ob beide Gene für das gesuchte Transportsystem kodieren, muß noch untersucht werden.

5. Das Außenmembranprotein OmpP2

Das Hauptporin in der Außenmembran für Substanzen bis 1,4 kDa von *H. influenzae* ist *OmpP2* (Hansen et al., 1988). Die Frage, ob auch NAD, NMN und NR durch *OmpP2* ins Periplasma diffundieren, wurde mit einer *ompP2*-Deletionsmutante untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, daß das von Hansen beschriebene Wachstumsdefizit der Mutante durch die Erhöhung der Faktor V-Konzentrationen verbessert werden konnte. Einen eindeutigen Hinweis auf die Diffusion von Pyridin-Nukleotiden durch *OmpP2* ergaben die Transport-Assays, mit deren Hilfe gezeigt wurde, daß die *ompP2*-Mutante NAD und NMN nur noch in sehr geringen Mengen akkumulieren konnte. Die im

Vergleich zum Stamm Rd signifikant erhöhte Aufnahme von NR der *ompP2*-Mutante kann bislang nicht erklärt werden.

6. Die Nutzung von NAD bei *H. influenzae*

Die Nutzung von NAD in Abhängigkeit der hier beschriebenen Komponenten bei *H. influenzae* kann in einem Modell veranschaulicht werden (Abb. 32). Die im Medium vorkommenden Nikotinamid-Nukleotid-Substrate NAD, NMN und NR diffundieren durch das Hauptporin OmpP2 ins Periplasma. NADP und NMN können auch schon durch *e*(P4) auf der Zelloberfläche zu NAD bzw. NR dephosphoryliert werden. Im Periplasma spaltet die Pyrophosphatase NadN NAD in NMN und Adenosin. Das NMN wird dann einerseits durch NadN und vor allem wiederum durch die Phosphatase *e*(P4) zu NR dephosphoryliert. Ebenso wird AMP zu Adenosin und Pi gespalten (Zagursky et al., 2000; Reidl et al., 2000) Anschließend wird das freigesetzte NR von einem putativen Transporter in der Zytoplasmamembran ins Zellinnere geschleust, wo die Resynthese von NAD erfolgt. NR wird unter ATP-Verbrauch vermutlich durch eine Nukleotid-Kinase zu NMN phosphoryliert. Aus NMN wird dann unter ATP-Verbrauch durch die NMN-Adenyltransferase NAD synthetisiert (Denicola-Seoane et al., 1990; Cynamon et al., 1988). Dieser NAD-Syntheseweg unterscheidet sich von dem Preiss-Handler-Weg und den Pyridin-Nukleotid-Zyklen und ist nur der Familie *Pasteurellaceae* eigen.

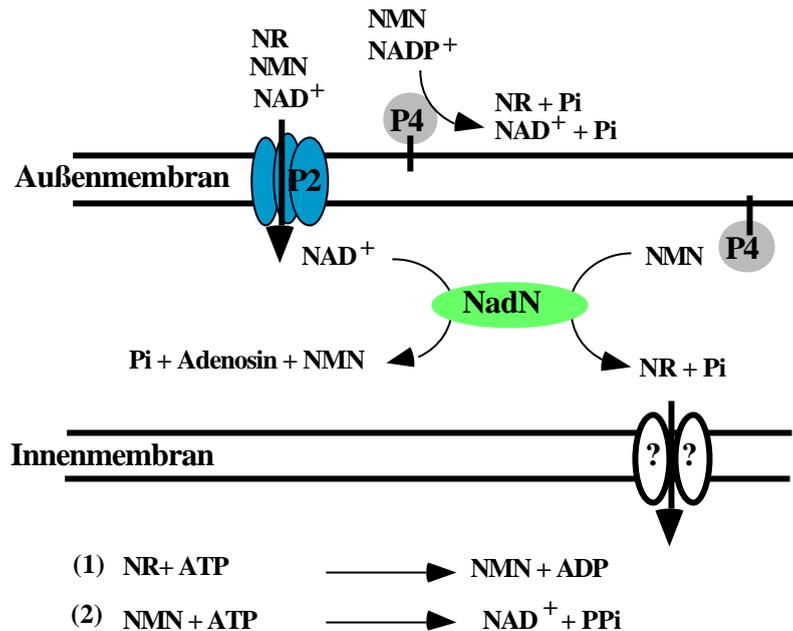


Abb. 32: Nikotinamid-Nukleotid-Aufnahmesystem in *H. influenzae*. Gezeigt sind die äußere Membran, das Periplasma und die innere Membran mit den Proteinen OmpP2, *e*(P4) und NadN mit deren Enzymaktivitäten und der putative NR-Transporter.

7. Die Verbreitung der Proteine *e*(P4) und NadN und deren Relevanz für die Pathogenität von *H. influenzae*

Die Proteine *e*(P4) und NadN wurden als hoch konserviert in bekapselten wie auch unbekapselten Stämmen beschrieben (Green et al., 1991; Zagursky et al., 2000). Um zu testen, ob die Proteine in verschiedenen *H. influenzae*-Spezies die gleiche Aktivitäten wie im Laborstamm Rd erfüllen, wurden die Außenmembranprotein- bzw. Periplasma-Extrakte von zwei klinischen NTHI-Isolaten, dem Hib-Stamm und deren Mutanten auf ihre Enzym-Aktivitäten getestet. Es zeigte sich, daß die Außenmembranprotein-Extrakte aller getesteten Stämme fähig waren, *e*(P4)-abhängig NMN zu NR zu dephosphorylieren. Ebenso waren die Periplasma-Extrakte der Stämme in der Lage, in Abhängigkeit von NadN, NAD zu NMN zu spalten und dieses zu dephosphorylieren.

Im größeren Maßstab testete Green und Mitarbeiter *e*(P4) und NadN hinsichtlich ihrer Vorkommen und antigenen Konservierung in bekapselten und unbekapselten Stämmen. Sie zeigten, daß *e*(P4) in allen Hib- und NTHI-Isolaten die gleiche Größe hatte und einen hohen Grad an antigener Konservierung aufwies (Green et al., 1991). Auch das periplasmatische Protein NadN wurde in allen getesteten Hib- und NTHI-Isolaten detektiert. Ein Aminosäuresequenz-Vergleich zeigte, daß die Homologien oft 100 % betragen bzw. einen Unterschied von 1-7 Aminosäuren nicht

überschritten. Die antigene Konservierung wurde mit anti-NadN-Serum gegen verschiedene homologe und heterologe *H. influenzae*-Stämmen nachgewiesen (Zagursky et al., 2000).

Da die Proteine *e*(P4) und NadN in allen bekapselten und unbekapselten *H. influenzae*-Isolaten mit der gleichen Funktion vorkommen, kann man davon ausgehen, daß sie für das Überleben und Wachstum von *H. influenzae* eine essentiellen Rolle spielen.

Die Inhibierbarkeit des NAD-Aufnahmesystems wurde mit den Substanzen NMN, AMP, Adenosin und Ribose-5-Phosphat getestet. Es zeigte sich, daß 100 µM NMN die NAD-Aufnahme in den Stamm Rd hemmen konnte und 20 mM AMP fähig war, die NADP-Dephosphorylierung durch *e*(P4) zu inhibieren. Da AMP wie auch NMN als Substrate der Phosphomonoesterase *e*(P4) beschrieben wurden, lag in beiden Fällen eine kompetitive Hemmung vor. Auch die Zugabe von 1 mM Adenosin konnte die NAD-Aufnahme in den Stamm Rd um 6 % reduzieren.

Mit dem Malat-Enzym-Assay wurden Ribose-5-Phosphat und AMP als mögliche Inhibitoren von NadN getestet. Dabei stellte sich heraus, daß AMP die NADP-Dephosphorylierung hemmen konnte, Ribose-5-Phosphat jedoch nicht. Man nimmt an, daß das Enzym eher den Adenin-Ring erkennt als den Ribose-Phosphatrest. Darüberhinaus wurden auch von Kahn und Anderson ADP und AMP als Inhibitoren des NAD-abhängigen Wachstums identifiziert, während NMN und Adenosin keinen Einfluß hatten (Kahn und Anderson, 1985).

Der wichtigste Ansatzpunkt für die Inhibierung der NAD-Aufnahme bei *H. influenzae* stellt nach Kenntnissen dieser Arbeit das bis jetzt noch nicht identifizierte Transportsystem in der inneren Membran dar, das NR als Endprodukt der NAD-Prozessierung ins Zellinnere schleust. Um mögliche Inhibitoren zu finden, wurden von Godek Faktor V-Analoga getestet, die von *H. influenzae* zum Wachstum genutzt werden können. Dabei zeigte sich, daß *H. influenzae* mit Analogon, die am Purin modifiziert waren, noch wachsen konnte, aber Substrate mit Veränderungen am Pyridinring, wie 3'-Aminopyridin-Ribosyl (3'-AmPR), nicht nutzen konnte. Anschließend wurde in Transport-Assays nachgewiesen, daß *H. influenzae* bei Anwesenheit von 3'-AmPR nicht fähig ist, NR aufzunehmen, wobei 3'-AmPR selbst internalisiert wird (Godek et al., 1990). Da 3'-AmPR in *E. coli* nicht das Wachstum hemmt, nimmt man an, daß es in die intrazelluläre NAD-Synthese, die spezifisch für die Familie *Pasteurellaceae* ist, eingreift. Es könnte sein, daß 3'-AmPR mit NR und NMN um die NAD-Synthese-Enzyme NR-Kinase und NMN-Adenyltransferase konkurriert und daß 3'-

Aminopyridin-Adenin-Dinukleotid (3'-AmPAD) gebildet wird, das dann kompetitiv die NAD-abhängigen Enzyme inhibiert. Obwohl 3'-AmPR einen sehr effektiven Inhibitor der NR-Aufnahme darstellt, ist die Substanz als Grundlage für ein Medikament eher kritisch zu sehen, da Aminopyridine neurotoxisch wirken (Godek et al., 1990).

Die Proteine *e(P4)* und *NadN* wurden als konservierte Genprodukte und dominante Antigene in bekapselten und NTHI-Stämmen beschrieben. Um zu prüfen, ob die Proteine essentiell für das Überleben von *H. influenzae* im Wirt sind, wurden in unserem Arbeitskreis in Zusammenarbeit mit M. Herbert (John Ratcliff Hospital, UK) die Virulenz der *hel-*, *nadN-* und Doppelmutante getestet. Dazu wurden in wenige Tage alten Ratten die Stämme intraperitoneal appliziert. Es zeigte sich jedoch, daß die Mutanten nahezu den gleichen Infektionsverlauf verursachten wie der Wildtyp. Als mögliche Ursache konnte hierzu gezeigt werden, daß im Blut NAD- und NMN-Nukleotidase-Aktivitäten vorkommen, die eventuell zu einer genügend hohen NR-Konzentration führen und die als NR-Quelle während eines invasiven Krankheitsverlaufs dient (Schmitt-Brauns et al., 2001). Tatsächlich ist bekannt, daß im menschlichen Blut ein gewisser NAD-Umsatz mit NMN und NR als Zwischenprodukte nachweisbar ist (Friedlos et al., 1992). Deshalb nimmt man an, daß NAD wahrscheinlich nicht als Hauptquelle während invasiven Erkrankungen dient. Eine wichtigere Rolle könnten NAD und NMN allerdings für das Persistieren von *H. influenzae* auf den respirativen Schleimhäuten spielen. Das Vorkommen und die Konzentration von Nikotinamid-Nukleotid-Substraten dort ist aber noch unbekannt.

Ein weiteres Problem bei der Untersuchung der *in vivo* Relevanz der Mutanten könnte sein, daß das Rattenmodell für solche Fragestellungen wenig geeignet ist. Ein besseres System sind Chinchillas, da ihr Immunsystem dem Menschen ähnlicher ist und sie ein weitaus besseres System zum Studium der Kolonisierung darstellen. Deshalb sollte man langfristig dieses Tiermodell heranziehen.

Die biologische Funktion der Proteine *e(P4)* und *NadN* und ihre Rolle bei der Nutzung von NAD bei *H. influenzae* wurde anhand von Mutantanalysen aufgeklärt. Das ubiquitäre Vorkommen beider Proteine in bekapselten und nicht-typisierbaren Stämmen weist auf ihre Bedeutung bei der Nutzung von Pyridin-Nukleotiden hin. Beide Proteine sind hochkonserviert und induzieren bakterizide Antikörper, die eine breite Kreuzreaktivität unter NTHI-Stämmen aufweisen. Deshalb, und auf Grund der hier gefundenen biologischen Relevanz dienen *e(P4)* und *NadN* als Grundlage für ein Vakzin gegen NTHI-Stämme, das zur Zeit von der Firma Wyeth-Lederle, N.Y., entwickelt wird.

G. Literaturverzeichnis

- Akkoyunlu, M., A. Melhus, C. Capiou, O. Van Opstal, and A. Forsgren.** 1997. The acylated form of protein D of *Haemophilus influenzae* is more immunogenic than the nonacylated form and elicits an adjuvant effect when it is used as a carrier conjugated to polyribosyl ribitol phosphate. *Infect. Immun.* **65**: 4904-4908.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Meyers, and D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Andreoli, A. J., T. W. Okita, R. Bloom, and T. A. Grover.** 1972. The pyridine nucleotide cycle: presence of a nicotinamide mononucleotide specific glycohydrolase in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49**: 264-269.
- Barcak, G. J., M. Chandler, R. J. Redfield, and J. H. Tomb.** 1991. Genetic Systems in *Haemophilus influenzae*. *Meth. Enzymol.* **204**: 321-342.
- Barenkamp, S. J.** 1996. Immunization with high-molecular-weight adhesion proteins of nontypable *Haemophilus influenzae* modifies experimental otitis media in chinchillas. *Infect. Immun.* **64**: 1246-1251.
- Barenkamp, S. J. and J. W. St. Geme.** 1994. Genes encoding high-molecular-weight adhesion proteins of nontypable *Haemophilus influenzae* are part of gene clusters. *Infect. Immun.* 3320-3328.
- Birnboim, H. C. and J. Doly.** 1979. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid-DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523
- Brinton, C. C. Jr., M. J. Carter, D. B. Derber, S. Kar, J. A. Kramarik, A. C. C. To, and S. W. Wood.** 1989. Design and development of plius vaccines for *Haemophilus influenzae* diseases. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **8S**:54-61.
- Calvin, A. C. Y. and P. C. Hannawalt.** 1988. High efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* **170**: 2796-2801.
- Campos J., S. Garcia-Tornel, J. M. Gairi, and I. Fabrigues.** 1986. Multiple resistant *Haemophilus influenzae* type b causing meningitis: comparative clinical and laboratory study. *J. Pediatr.* 897-902.
- Carlone, G. M., F. O. Sottnek, and B. D. Plikaytis.** 1985. Comparison of outer membrane proteins and biochemical profiles of *Haemophilus aegyptius* and *Haemophilus influenzae* biotyp III. *J. Clin. Microbiol.* 708-713.
- Carlone, G. M., L. T. Myrtle, H. S. Rumschlag, and F. O. Sottner.** 1986. Rapid microprocedure for isolating detergent-insoluble outer membrane proteins from *Haemophilus*-Spezies. *J. Clin. Microbiol.* **24**: 330-332.

- Cope, L. D., S. E. Pelzel, J. L. Latimer, and E. J. Hansen.** 1990. Characterization of a mutant of *Haemophilus influenzae* type b lacking the P2 major outer membrane protein. *Infect. Immun.* **58**: 3312-3318.
- Cope, L. D., S. E. Thomas, J. L. Latimer, C. A. Slaughter, U. Müller-Eberhard, and E. J. Hansen.** 1994. The 100 kDa hem:hempexin-binding protein of *Haemophilus influenzae*: structure and localization. *Mol. Microbiol.* **177**: 815-820.
- Cynamon, M. H., T. B. Sorg, and A. Patapow.** 1988. Utilization and Metabolism of NAD by *Haemophilus parainfluenzae*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 2789-2799.
- D'Mello, R. A., P. R. Langford, and J. S. Kroll.** 1997. Role of bacterial Mn-cofactored superoxide dismutase in oxidative stress responses, nasopharyngeal colonization, and sustained bacteremia caused by *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.* 2700-2706.
- Deich, R. A., A. Anilionis, J. Fulginiti, J. Metcalf, S. Quataert, T. Quinn-Dey, G. W. Zlotnick, and B. Green.** 1990. Antigenic conservation of the 15 000 Dalton outer membrane lipoprotein PCP of *Haemophilus influenzae* and biologic activity of anti-PCP antisera. *Infect. Immun.* **58**: 3388-3393.
- Denicola-Seoane, A. and B. M. Anderson.** 1990. Studies of NAD kinase and NMN:ATP adenylyltransferase in *Haemophilus influenzae*. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 425-430.
- Dev, I. K. and P. H. Ray.** 1984. Rapid assay and purification of a unique signal peptidase that processes the prolipoprotein from *Escherichia coli*. *B. J. Biol. Chem.* **259**: 11114-11120.
- Eskola, J., H. Peltola, and A. K. Takala** 1987. Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccine in infancy. *N. Engl. J. Med.* **317**: 717-722.
- Falconer, D. F., M. P. Spector, and J. W. Foster.** 1984. Membrane association of NAD pyrophosphatase in *Salmonella typhimurium*. *Curr. Microbiol.* **10**: 237-242-
- Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J.-F. Tomb, B. A. Dougherty, J. M. Merrick, K. McKenney, G. Sutton, W. FitzHugh, C. Fields, J. D. Gocayne, J. Scott, R. Shirley, L.-I. Liu, A. Glodek, J. M. Kelly, J. F. Weidman, C. A. Phillips, T. Spriggs, E. Hedblom, M. D. Cotton, R. C. Utterback, L. D. Fine, J. L. Frichman, J.L. Fuhrmann, N. S. M. Geoghagen, C. L. Gnehm, L. A. McDonald, K. V. Small, C. M. Fraser, H. O. Smith, and J. C. Venter.** 1995. Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science.* **269**: 496-512.
- Foster J. W., E. A. Holley-Guthrie, and F. Warren.** 1987. Regulation of NAD metabolism in *Salmonella typhimurium*: genetic analysis and cloning of the *nadR* repressor locus. *Mol. Gen. Genet.* **208**: 279-287.

- Foster, J. W.** 1981. Pyridine nucleotide cycle of *Salmonella typhimurium*: in vitro demonstration of nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase, nicotinamid mononucleotide glycohydrolase, and nicotinamide dinucleotide pyrophosphatase activities. *J. Bacteriol.* **145**: 1002-1009.
- Foster, J. W. and E. A. Holley.** 1981. Genetic mapping of the *pncB* locus of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **148**: 394-396.
- Foster, J. W., D. Kinney, and A. G. Moat.** 1979. Pyridine nucleotide cycle of *Salmonella typhimurium*: regulation of nicotinic acid phosphoribosyl transferase and nicotinamide deamidase. *J. Bacteriol.* **135**: 957-961.
- Foxwell, A. R., M. K. Jennelle, and A. W. Cripps.** 1998. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: Pathogenesis and Prevention. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews.* **62**: 294-308.
- Friedlos, F. and R. J. Knox.** 1992. Metabolism of NAD(P)H by blood components. Relevance to bioreductively activated prodrugs in a targeted enzyme therapy system. *Biochem. Pharmacol.* **18**: 631-635.
- Geer, B. W., D. Krochko, M. J. Oliver, V. K. Walker, and J. H. Williamson.** 1979. A comparative study of the NADP malic enzymes from *Drosophila* and chick liver. *Comp. Biochem. Physiol.* **65**: 25-34.
- Godek, C. P. and M. H. Cynamon.** 1990. In vitro evaluation of nicotinamid riboside analogs against *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **34**: 1473-1479.
- Granoff, D. M., G. A. Weinberg, and P. G. Shackelford.** 1988. IgG subclass response to immunization with *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-outer membrane protein conjugate vaccine. *Pedriatr. Res.* **24**: 180-184.
- Gray-Owen, S. D., S. Loosmore, and A. B. Schryvers.** 1995. Identification and characterization of Genes encoding the human Transferrin-binding proteins from *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **63**: 1201-1210.
- Green, B. A., J. E. Farley, T. Quinn-Dey, R. Deich, and G. W. Zlotnick.** 1991. The *e*(P4) outer membrane protein of *Haemophilus influenzae*: biological activity of anti-*e* serum and cloning and sequencing of the structural gene. *Infect. Immun.* **59**: 3191-3198.
- Griffith T. W. and F. R. Leach.** 1973. The effect of osmotic shock on vitamin transport in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **159**: 658-663.
- Grimberg, J., S. Maguire and L. Belluscio.** 1989. A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal DNA. *Nucleic Acids Res.* **21**: 8893.
- Groenefeld, K., P. P. Eijk, L. van Alphen, H. M. Jansen, and H. C. Zanen.** 1990. *Haemophilus influenzae* infections in patients with chronic obstructive pulmonary disease despite specific antibodies in serum and sputum. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **141**:1316-1321.

- Gu, X. X., C.-M. Tsai, T. Ueyama, S. J. Barenkamp, J. B. Robbins, and D. J. Lim.** 1996. Synthesis, characterization, and immunologic properties of detoxified lipooligosaccharides from nonetypeable *Haemophilus influenzae* conjugated to proteins. *Infect. Immun.* **64**: 4047-4053.
- Gupta, S. D. and H. C. Wu.** 1991. Identification and subcellular localization of apolipoprotein N-acyltransferase in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **78**: 37-42.
- Hanson, E. J., F. R. Gonzales, N. R. Chamberlain, M. V. Norgard, E. E. Miller, L. D. Cope, S. E. Pelzel, B. Gaddy, and A. Clausell.** 1988. Cloning of the gene encoding the major outer membrane protein of *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.* **56**: 2709-2716.
- Hanson, M. S. and E. J. Hansen.** 1991. Molecular cloning, partial purification and characterization of a hemin-binding lipoprotein from *Haemophilus influenzae* type b. *Mol. Microbiol.* **5**: 267-278.
- Hardie, K. R., R. A. Adams, and K. J. Towner.** 1993. Transferrin-binding ability of invasive and commensal isolates of *Haemophilus* ssp. *J. Med. Microbiol.* **39**:218-224.
- Hardy, G. G., S. M. Tudor, and J. W. St. Geme III.** 2001. The pathogenesis of disease due to nonetypeable *Haemophilus influenzae*. In R. Moxon, M. Herbert, D. Hood (ed), *Molecular methods for Haemophilus influenzae*. Humana Press, Totowa, N. Y., in press.
- Hasan, A. A., J. Holland, A. Smith, and P. Williams.** 1997. Elemental iron does repress transferrin, haemopexin and haemoglobin receptor expression in *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiol. Letters.* **150**: 19-26.
- Heidecker, G. J., J. M. Pozsgay, and T. L. Stull.** 1994. Construction of an *ori* cassette for adapting shuttle vectors for use in *Haemophilus influenzae*. *Gene.* **150**: 141-144.
- Heukeshoven, J. and R. Dernick.** 1987. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of Sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis.* **9(1)**: 60-61.
- Hill, J. C.** 1983. Summary of a workshop on *Haemophilus influenzae* type b vaccines. *J. Infect. Dis.* **148**: 167-175.
- Hillyard, D., M. Rechsteiner, P. Manlapaz-Ramos, J. S. Imperial, L. J. Cruz, and B. M. Olivera.** 1981. the pyridine nucleotide cycle. Studies in *Escherichia coli* and the human cell line D98/AH2. *J. Biol. Chem.* **256**: 8491-8497.
- Hughes, K. T, J. R. Roth, and B. M. Olivera.** 1991. A genetic characterization of the *nadC* gene of *Salmonella typhimurium*. *Genetics.* **127**: 657-670.
- Hultgren, S. J., S. Abraham, M. Caparon, P. Falk, J. W. St. Geme, and S. Normark.** 1993. Pilus and nonpilus bacterial adhesins; assembly and function in cell recognition. *Cell.* **73**: 887-901.

- Ichihara, S., M. Hussain, and S. Mizushima.** 1981. Characterization of new membrane lipoproteins and their precursors of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **256**: 3126-3129.
- Jeter, R. M., B. M. Olivera, and J. R. Roth.** 1984. *Salmonella typhimurium* synthesizes cobalamin (vitamin B₁₂) de novo under anaerobic growth conditions. J. Bacteriol. **159**: 206-213.
- Kahn, D. W. and B. M. Anderson.** 1986. Characterization of *Haemophilus influenzae* nucleotid pyrophosphatase. J. Chem. Biol. **261**: 6016-6025.
- Kemmer, G., T. Reilly, J. Schmitt-Brauns, G. W. Zlotnik, B. A. Green, M. Fiske, M. Herbert, A. Kraiß, S. Schlör, A. Smith, and J. Reidl.** 2001. NadN and e(P4) are essential for the utilization of NAD and NMN but not NR in *Haemophilus influenzae*. J. Bacteriol. in press.
- Kraiß, A., S. Schlör, and J. Reidl.** 1998. In vivo Transposon Mutagenesis in *Haemophilus influenzae*. Appl. Env. Microbiol. **64**: 4697-4702.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. **227**: 680-685.
- Levine, R. P., R. Finn, and R. Gross.** 1983. Interaction between C3b and cell surface molecules. Ann. NY Acad. Sci. **421**: 235-245.
- Liu, G., J. Foster, P. Manlapaz-Ramos, and B. M. Olivera.** 1982. Nucleoside salvage pathway for NAD biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **152**: 1111-1116.
- Lomholt, H., L. van Alphen, and M. Kilian.** 1993. Antigenic variation of immunoglobulin A1 proteases among sequential isolates of *Haemophilus influenzae* from healthy children and patients with chronic obstructive pulmonary disease. Infect. Immun. **61**: 4575-4581.
- Loosmore, S. M., Y. P. Yang, D. C. Coleman, J. M. Shortreed, D. M. England, and M. H. Klein.** 1997. Outer membrane protein D15 is conserved among *Haemophilus influenzae* species and may represent a universal protective antigen against invasive disease. Infect. Immun. **65**: 3701-3707.
- Maciver, I., J. L. Latimer, H. H. Liem, U. Müller-Eberhard, Z. Hrkal, and E. J. Hansen.** 1996. Identification of an outer membrane protein involved in utilization of hemoglobin-haptoglobin complexes by nontypeable *Haemophilus influenzae*. Infect. Immun. **64**: 3703-3712.
- Malke, H.** 1998. Cytoplasmic membrane lipoprotein LppC of *Streptococcus equisimilis* functions of an acid phosphatase. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 2439-2442.
- Martin, P. R., R. J. Shea, and M. H. Mulks.** 2001. Identification of a plasmid-encoded gene from *Haemophilus ducreyi* which confers NAD independence. J. Bacteriol. **183**: 1168-1174.
- Matsuyama, S., N. Yokota, and H. Tokuda.** 1997. A novel outer membrane lipoprotein, LolB (HemM), involved in the LolA (p20)-dependent localization of lipoproteins to the outer membrane of *Escherichia coli*. EMBO J. **16**: 6947-6955.

- Matsuyama, S., T. Taijama, and H. Tokuda.** 1995. A novel periplasmic carrier protein involved in the sorting and transport of *Escherichia coli* lipoproteins destined for the outer membrane. *EMBO J.* **14**: 3365-3372.
- McLaren, J. D., D. T. C. Ngo, and B. M. Olivera.** 1973. Pyridine nucleotide metabolism in *Escherichia coli*. III. Biosynthesis from alternative precursors in vivo. *J. Biol. Chem.* **248**: 5144-5159.
- Miller, J. H.** 1992. A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- Moxon, E. R., R. A. Deich, and C. J. Connelly.** 1984. Cloning of chromosomal DNA from *Haemophilus influenzae*: its use for studying the expression of type b capsule and virulence. *J. Clin. Invest.* 298-306.
- Moxon, R. E.** 1995. *Haemophilus influenzae*. In: Principles and Practice of Infectious Diseases. ed. G. L. Mandel, J. E. Bennet, R. Dolin. Fourth Edition. 2039-2045.
- Mulks, M. H., S. J. Kornfeld, B. Frangione, and A. G. Plaut.** 1982. Relationship between the specificity of IgA proteases and serotypes in *Haemophilus influenzae*. *J. Infect. Dis.* **146**: 266-273.
- Mutters, R. and J. Reidl.** 1998. *Haemophilus*. *J. Lab. Med.* **55**: 1-8.
- Nasu, S., F. D. Wicks, and R. K. Gholson.** 1982. L-Aspartate oxidase, a newly discovered enzyme in *Escherichia coli*, is the B protein of quinolinate synthetase. *J. Biol. Chem.* **257**: 626-632.
- Niven, D. F. and T. O'Reilly.** 1990. Significance of V-Factor dependency in the taxonomy of *Haemophilus* species and related organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**: 1-4.
- O'Reilly, T. and D. F. Niven.** 1986. Defining the metabolic and growth responses of porcine *haemophili* to exogenous pyridine nucleotides and precursors. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 807-818.
- Park, U. E., B. M. Olivera, K. T. Hughes, J. R. Roth, and D. Hillyard.** 1989. DNA ligase and the pyridine nucleotide cycle in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **171**: 2173-2180.
- Penfound, T. and J. W. Foster.** 1996. Biosynthesis and recycling of NAD, p. 721-730. In Vol. 1. F. C. Neidhard, R. Curtis III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed), *Escherichia coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology 2nd ed. American Society for Microbiology Washington, D. C.
- Preiss J. and P. Handler.** 1958. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. I. Identification of intermediates. *J. Biol. Chem.* **233**: 488-492.
- Preiss J. and P. Handler.** 1958. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. II. Enzymatic

aspects. J. Biol. Chem. **233**: 493-500.

Pugsley, A. P. 1989. Protein targeting. Academic press, San Diego, Calif.

Pugsley, A. P. 1993. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. Microbiol. Rev. **57**: 50-108.

Raffaelli, N., P. L. Lorenzi, M. Emanuelli, A. Amici, S. Ruggieri, and G. Magni. 1999. The *Escherichia coli* NadR regulator is endowed with nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase activity. J. Bacteriol. **181**: 5509-5511.

Reddy, M. S., J. M. Bernstein, T. F. Murphy, and H. S. Faden. 1996. Binding between outer membrane proteins of non-typeable *Haemophilus influenzae* and human nasopharyngeal mucin. Infect. Immun. **64**: 1477-1479.

Reidl, J. and J. J. Mekalanos. 1996. Lipoprotein *e*(P4) is essential for hemin uptake by *Haemophilus influenzae*. J. Exp. Med. **183**:621-629.

Reidl, J., S. Schlör, A. Kraiß, J. Schmitt-Brauns, G. Kemmer, and E. Soleva. 2000. NADP and NAD utilization in *Haemophilus influenzae*. Mol. Microbiol. **35**: 1573-1581.

Reilly, T. J. and A. L. Smith. 1999. Purification and characterization of a recombinant *Haemophilus influenzae* outer membrane phosphomonoesterase *e*(P4). Protein Expr. and Purific. **17**: 401-409.

Reilly, T. J., D. L. Chance, and A. L. Smith. 1999. Outer membrane protein *e*(P4) of *Haemophilus influenzae* is a novel phosphomonoesterase. J. Bacteriol. **181**: 6797-6805.

Roche, R. J. and E. R. Moxon. 1995. Phenotypic variation of carbohydrate surface antigens and the pathogenesis of *Haemophilus influenzae* infections. Trends Microbiol. 304-309.

Rohrer, H., W. Zellig, and R. Mailhammer. 1975. ADP-ribosylation of DANN-dependent RNA-polymerase of *Escherichia coli* by a NAD⁺: protein ADP ribosyltransferase from bacteriophage T4. Eur. J. Biochem. **60**: 227-238.

Sambrook, F., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour, New York.

Sanders, J. D., L. D. Cope, and E. J. Hansen. 1994. Identification of a locus involved in the utilization of iron by *Haemophilus influenzae*. Infect. Immun. **62**: 4515-4525.

Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **74**: 5463-5467.

Sankaran, K. and H. C. Wu. 1994. Lipid modification of bacterial lipoprotein: transfer of diacylglycerol moiety from phosphatidylglycerol. J. Biol. Chem. **269**: 19701-19706.

- Schlör, S., G. Kemmer, and J. Reidl.** 2001. Applied mini-transposon mutagenesis in *Haemophilus influenzae*. In R. Moxon, M. Herbert, D. Hood (ed), Molecular methods for *Haemophilus influenzae*. Humana Press, Totowa, N. Y., in press.
- Schmitt-Brauns, J., M. Herbert, G. Kemmer, A. Kraiß, S. Schlör and J. Reidl.** 2001. Is a NAD-pyrophosphatase activity necessary for *Haemophilus influenzae* type b multiplication in the blood stream? Int. J. Med. Microbiol. in press.
- Schryvers, A. B.** 1989. Identification of the transferrin- and lactoferrin-binding proteins in *Haemophilus influenzae*. J. Med. Microbiol. **29**: 121-130.
- Schryvers, A. B. and S. Gray-Owen.** 1992. Iron acquisition in *Haemophilus influenzae*: receptors for human transferrin. J. Infect. Dis. **165**: 103-104.
- Smith, D. H., D. V. Madore, and R. J. Eby.** 1989. *Haemophilus* b oligosaccharide-CRM197 and other *Haemophilus* b conjugate vaccines: a status report. Adv. Exp. Biol. Med. **251**: 65-81.
- Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by electrophoresis. J. Mol. Biol. **98**: 503-517.
- Spector, M. P., J. M. Hill, E. A. Holley, and J. W. Foster.** 1985. Genetic characterization of pyridine nucleotide uptake mutants of *Salmonella typhimurium*. J. Gen. Microbiol. **131**: 1313-1322.
- Spencer, R. L. and J. Preiss.** 1967. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. The purification and the properties of diphosphopyridine nucleotide synthetase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **242**: 385-392.
- St. Geme, J. W., III, M. L. de la Morena, and S. Farlow.** 1994. A *Haemophilus influenzae* IgA protease-like protein promotes intimate interaction with human epithelial cells. Mol. Microbiol. **14**: 217-233.
- Suzuki, N. J. Carlson, G. Griffith, and R. K. Gholson.** 1973. Studies on the de novo biosynthesis of NAD in *Escherichia coli*. Properties of the quinolinic acid synthetase system. Biochem. Biophys. Acta. **304**: 309-315.
- Tatusov, R. L., A. R. Mushegian, P. Bork, N. P. Brown, W. S. Hayes, M. Borodovsky, K. E. Rudd, and E. V. Koonin.** 1996. Metabolism and evolution of *Haemophilus influenzae* deduced from a whole-genome comparison with *Escherichia coli*. Curr. Biol. **6**: 279-291.
- van Alphen, L., N. van den Berghe, and L. G. van den Broek.** 1988. Interaction of *Haemophilus influenzae* with human erythrocytes and oropharyngeal epithelial cells is mediated by a common fimbrial epitop. Infect. Immun. 1800-1806.
- van Ham, S. M., F. R. Mooi, M. G. Sindhunata, W. R. Maris, and L. van Alphen.** 1989. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Haemophilus influenzae* fimbrial genes establishes adherence to oropharyngeal epithelial cells. EMBO J. 3535-3540.

- van Ham, S. M., L. van Alphen, F. R. Mooi, and J. P. van Putten.** 1994. The fimbrial gene cluster of *Haemophilus influenzae* type b. *Mol. Microbiol.* 673-684.
- Weiser, J. N., M. Shchepetov, and S. T. H. Chong.** 1997. Decoration of lipooligosaccharide with phosphorylcholine: a phase-variable characteristic of *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **65**: 943-950.
- Wong, J. C. Y., J. Holland, T. Parson, A. Smith, and P. Williams.** 1994. Identification and characterization of an iron-regulated hemopexin receptor in *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.* **62**: 48-59.
- Yanofsky, C.** 1954. The absence of tryptophan-niacin relationship in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **68**: 577-584.
- Zagursky, R. T., P. Ooi, K. F. Jones, M. J. Fiske, R. P. Smith, and B. A. Green.** 2000. Identification of a *Haemophilus influenzae* 5'-nucleotidase protein: Cloning of the *nucA* gene and immunogenicity and characterization of the NucA Protein. *Infect. Immun.* **68**: 2525-2534.
- Zhu, N. and J. R. Roth.** 1991. The *nadI* region of *Salmonella typhimurium* encodes a bifunctional regulatory protein. *J. Bacteriol.* **173**:1302-1310.

Anhang

1. Sequenzhomologien

<i>e(P4)H. i.</i>	-MKTTLKMTALAALSAFVLAGCGSHQMKSEEHANMQLQQQAVLG-----LNW	46
PhyA <i>E. cl.</i>	MMKTSAKLAASG-LVALLLTGCASSTHQT---AQQQLGQQSVLA-----VNW	43
LppC <i>S. d.</i>	MKTKQVASVISLALSFLVLTGCAQLDHKANVNSKETVKQTKVTYSDEQLRSNENTMSVLW	60
OlpA <i>Ch. m.</i>	--MKKILLTGGLILSFISCS-----AQKADHDTKDLVNAT-----AW	35
OlpA <i>P. g.</i>	MNSRHLTITIIAGLSLFLVLTGG--CSVTQQDPQWTLGGKLFST-----AW	44
<i>e(P4)H. i.</i>	MQDSGEYKALAYQAYNAAKVAFDHAKVAKG---KKKAVVADLIDETMLDNSPYAGVQVQNN	103
PhyA <i>E. cl.</i>	FQQSGEYQALTWQAFNTARMAFDQAPSLTG---KPKAVIVDLIDETMLDNSAYSAWQAKNG	100
LppC <i>S. d.</i>	YQRAAEAKALYLQGYQLATDRLKNQLGQAT--DKPYSIVLDDIDETVLDNSPYQAKNILEG	118
OlpA <i>Ch. m.</i>	MQNAGEYKALTIQAYQLAQIRLAQILTQEVSEKPRAIVLDIDETVLDNSPYQAYQIENK	94
OlpA <i>P. g.</i>	IQRSAEYQALCIQAYNIATERVDALPAERKQGDRPYAIVTDIDETILDNTPNVSYQALRG	104
<i>e(P4)H. i.</i>	KPFDGKDWRWVDARQR-AVPGAVEFNINYNSHNGKVFYVTNRKDSTEKSGTIDDMKRLG	162
PhyA <i>E. cl.</i>	QPFSSKTWSAWTQARQAKAVPGAVEFARHVTENGGTLFYVSNR-DQKDYAATVANMQQLG	159
LppC <i>S. d.</i>	TSFTPESDVWVQKKEAKPVAGAKEFLQFADQNGVQIYYISDR-AVSQVDATMENLQKEG	177
OlpA <i>Ch. m.</i>	KNFNQEDWSKWTRLAQAEP IAGALNLFNF TKNNGVEIFYVSNR-SEAERVPTLENLQKKN	153
OlpA <i>P. g.</i>	KDYDEETWGWCAQADADTLAGALSFFLHAANKGIEVFYVTNR-RDNLREQALQNLQRYG	163
<i>e(P4)H. i.</i>	FNGVEESAFYLKDKSAKAARFAEIEKQGYEIVLYVGDNLDDFGNTVYGKLNADRR-AFV	221
PhyA <i>E. cl.</i>	FPNVSDKTVRLNTDSSNKQARFDAIKNAGYNVVLVYVGDNLNDFGGATWHKGNQTRR-DFV	218
LppC <i>S. d.</i>	IPVQGRDHLLFLEEGVKSKEARRQKVETTNLIMLFGDNLVDFADF SSKSEEDRT--ALL	235
OlpA <i>Ch. m.</i>	FPYADNDHLILKTD-KSSKESRRQKLSEKYNIVLFFGDNLSDFSMDMYNNNEGKTSSEKV	212
OlpA <i>P. g.</i>	PPFADEEHLTTTHG-PSDKEPRRLKIQEQYEIVLLIGDNLGDFHHFFNTKEESGRK-QAL	221
<i>e(P4)H. i.</i>	DQNQKGFKGTIFIMLPNANYGGWEGGLAEGYFKKDTQGQIKARLDAVQAWDGK----	273
PhyA <i>E. cl.</i>	NLNHQQFGTQFIVLPNPLYGDWESGMAENYNKLTPEQQLSVRESRLQSWNGK----	270
LppC <i>S. d.</i>	SELQEEFGRQFIIFPNPMYGSWESAVYKGD-KLDASHQLKERRKALLESFEK-----	285
OlpA <i>Ch. m.</i>	LEHPELFGSKFIILPNAMYGDWESSMYKKN-TDKKLSNEQVKMKSLSRSFTTQINIQ	267
OlpA <i>P. g.</i>	GLTAGEFGRHFIMLPNPNYGSWEPAWYGG-----KYPPLPERDKALKQLRSQNSR-	271

Abb. 33: Sequenzhomologien von *e(P4)* aus *H. influenzae*, PhyA aus *Enterobacter cloacae*, LppC aus *Streptococcus dysgalactiae*, OlpA aus *Chryseobacterium meningosepticum* und OlpA aus *Porphyromonas gingivalis*.

2. Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Ab ^R	Antibiotika-resistent
AMP	Adenosin-Monophosphat
BHI	Brain-Heart-Infusion
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cm	Chloramphenicol
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethanol
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiaminintetraacetat
EtOH	Ethanol
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
min	Minuten
MOPS	3-N-Morpholino-Propansulfonsäure
N	Normal
NA	Nikotinamid
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NMN	Nikotinamid-Mononukleotid

NR	Nikotinamid-Ribosyl
OD _{x nm}	Optische Dichte bei x nm
OMP	outer membrane protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
psi	pressure standard industrial
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	rounds per minute
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Strep	Streptomycin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris/EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNE	Tris Natriumchlorid EDTA
TNEX	Tris Natriumchlorid EDTA Triton X 100
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
u. a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
w/v	weight per volume

3. Erklärungen

Ich versichere, daß ich diese Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Weiterhin versichere ich, daß die Dissertation bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat und ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, im April 2001

Gabriele Kemmer

4. Publikationen

1. **Reidl, J., S. Schlör, A. Kraiß, J. Schmitt-Brauns, G. Kemmer, and E. Soleva.** 2000. NADP and NAD utilization in *Haemophilus influenzae*. *Mol. Microbiol.* **35**: 1573-1581.
2. **Schlör, S., G. Kemmer, and J. Reidl.** 2001. Applied mini-transposon mutagenesis in *Haemophilus influenzae*. In R. Moxon, M. Herbert, D. Hood (ed), *Molecular methods for Haemophilus influenzae*. Humana Press, Totowa, N. Y., in press.
3. **Kemmer, G., T. Reilly, J. Schmitt-Brauns, G. W. Zlotnik, B. A. Green, M. Fiske, M. Herbert, A. Kraiß, S. Schlör, A. Smith, and J. Reidl.** 2001. NadN and *e(P4)* are essential for the utilization of NAD and NMN but not NR in *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* in press.
4. **Schmitt-Brauns, J., M. Herbert, G. Kemmer, A. Kraiß, S. Schlör, and J. Reidl.** 2001. Is a NAD-pyrophosphatase activity necessary for *Haemophilus influenzae* type b multiplication in the blood stream? *Int. J. Med. Microbiol.* in press.

5. Lebenslauf

Name:	Gabriele Kemmer, geb. Fuchsenberger	
Geburtsdatum:	17.07.1973	
Geburtsort:	Aschaffenburg	
Wissenschaftliche Anstellung:	seit Jan. 1999	Universität Würzburg: Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Zentrum für Infektionsforschung bei Dr. Joachim Reidl
Studium:	Nov. 1993 - Dez. 1998	Studium der Biologie an der Universität Würzburg: Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Biochemie und Zell- und Entwicklungsbiologie; Experimentelle Diplomarbeit am Zentrum für Infektionsforschung bei Dr. Joachim Reidl; Thema: „Charakterisierung von Außenmembranproteinen und der Blutserumresistenzfähigkeit von <i>Haemophilus influenzae</i> “
Schulbildung:	1984-1993	Friedrich-Dessauer-Gymnasium in Aschaffenburg; Abschluß: Abitur
	1980-1984	Strietwald-Grundschule in Aschaffenburg