

**Charakterisierung von NadR:
Das essentielle Enzym der NAD⁺-
Synthese bei *Haemophilus
influenzae***

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

vorgelegt von

Melisa Merdanović

aus Prijedor, Bosnien-Herzegowina

Würzburg, 2005

Eingereicht am: _____

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. J. Reidl

Gutachter: Prof. Dr. R. Benz

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Danksagung

So, wo fange ich jetzt an? Es sind eigentlich ziemlich viele Menschen, die mir dabei geholfen haben, die letzten paar Jahre gut zu überstehen, und mir trotz einiger Probleme, die mir meine Proteine (böse Dinger!) bereitet haben, zu guter Laune verholphen haben. Zunächst sind da Stefan, Elli und Dagmar zu erwähnen, die mir meine Anfangsphase in Wü leichter gemacht haben. Elli, meine Leidensgenossin im Haemophilus-Lager und der zweite Teil der Balkan-Fraktion, verhalf mir auch zu etwas mehr Mobilität (ich sage nur Quitsche-Ente), dann und wenn auch zu einem guten Abendessen und sorgte insgesamt dafür, dass ich mich in Wü etwas wohler fühlte. Stefan, tja, ohne ihn gäbe es wohl einige Male keine Polymerase, wenn man sie brauchte. Immer bereit mit Rat und Tat (vor allem mit Rat) anderen zu helfen und berühmt/berüchtigt für seine gigantische Reime. Vielen Dank auch für's Korrekturlesen. Der gute Anfang in Wü ist auch vielen Leuten am Röntgenring, wie z.B. den Morschi's, den Legionellen und vielen anderen zu verdanken. Ja, und dann gab es einen Umzug und unsere kleine Gruppe gewann an Größe und Lautstärke. Dies ist unter anderem auch unserem nicht-mehr Laborküken Anja zu verdanken, die nicht nur gigantische Brownies macht, sondern auch immer für gute Laune im Labor sorgte. Sie kann auch übrigens sehr gut mit der deutschen Sprache umgehen, so dass sie oft in den Genuß des Korrekturlesens kommt (Vielen Dank!!!). DoDo kam auch dazu (nicht der Vogel, sondern Thorsten) und beschäftigte Stefan mit „4 gewinnt“, so dass dieser weniger Zeit für andere hatte (was nicht immer schlimm war). Gabi und Paul erweiterten endlich das Haemophilus-Lager und sorgten dafür, dass ich mich nicht mehr alleine unter den vielen Vibrio-Menschen behaupten muß, nachdem Elli uns verließ. Und „last but definitely not least“ ist unser aller TA Super-Karina da. Ohne sie hätte ich nicht so oft länger ausschlafen können (ich liebe den Morgen fast so sehr wie Anja) und hätte jetzt noch viel mehr Augenringe. Auch einige der Massensequenzierung wären wahrscheinlich schief gegangen ohne Ihre Hilfe. Vielen Dank auch an alle im Hygiene Institut, v.a. aber an Ulla und Joanna, die für gute Laune und gute Musik im Labor sorgten. Spätestens seit Stefan's Doktorfeier kennt das ganze Labor jetzt wenigstens ein Wort auf Finnisch.

Meinem Doktorvater, Joachim Reidl, möchte ich für die Unterstützung während meiner gesamten Arbeit, guten Diskussionen und auch für die Motivationsschübe während der „Trockenzeit“ danken.

Beim Prof. Dr. Roland Benz möchte ich mich für die Gutachtung dieser Arbeit bedanken.

Meinen Eltern und meinem Freund Steffen, die immer, immer für mich da waren.

Inhaltsverzeichnis

I Zusammenfassung	1
I Summary	4
II Einleitung	7
1. Allgemeines	7
2. Morphologie, Struktur und Genom	8
3. Pathogenese und Virulenz	11
4. Vakzine gegen <i>H. influenzae</i>	18
5. Biosynthese und Recycling von NAD ⁺	20
5.1. Die biologische Bedeutung von NAD ⁺	20
5.2. NAD ⁺ Biosynthese und Turnover	22
5.3. Die Aufnahme von NAD ⁺	25
5.4. <i>Pasteurellaceae</i> und Faktor V (NAD ⁺)	26
6. Zielsetzung der Arbeit	32
III Material und Methoden	33
1. Radiochemikalien, Antikörper, Enzyme und Kits	33
2. Geräte und Chemikalien	34
3. Datenverarbeitung	36
4. Kulturmedien, Agar und Medienzusätze	36
5. Bakterienstämme und Plasmide	40
6. Synthetische Oligonukleotide	43
7. Puffer und Lösungen	46
8. Stammhaltung, Anzucht und Ernte von Bakterien	47
9. Zellaufschluss	48
10. Protein-biochemische Methoden	49
10.1. Zellfraktionierung: Lösliche Fraktion, Salzextrakt und Triton-Extrakt von Membranen	49
10.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	49
10.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
10.4. Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	50
10.5. Trocknen von SDS-Gelen	51
10.7. Aufreinigung der Proteine mit dem His-Tag	52
10.9. In vitro NadR-Aktivitäts- und Inhibitionsassay	54
10.10. NadR-Aktivität in intakten <i>H. influenzae</i> Zellen (whole cell labeling)	55
10.11. NadR-Aktivität in rohen <i>H. influenzae</i> Zellextrakten	55
10.12. NadR-Aktivität mit 3-Aminopyridin (AmPR) als Substrat	56
11. Molekulargenetische Methoden	56
11.1. Isolierung von Plasmid-DNS	56
11.2. Präparation von chromosomaler DNS	57
11.3. DNS-Sequenzierung	57
11.4. Klonierungstechniken	58
11.4.1. Restriktionsverdau von DNS	58
11.4.2. Dephosphorylierung von restriktionsverdauten Vektoren	58
11.4.3. Ligation	58
11.4.4. Elektrophorese von DNS in Agarose-Gelen	58
11.4.5. DNS-Isolierung aus Agarose-Gelen	59
11.5. Southernblot	59
11.6. Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	60
11.7. Polymerasekettenreaktion (PCR)	62
12. Sonstige Methoden	63

12.1. Herstellung des radioaktiv markierten Faktor V	63
12.2. Herstellung von AmPR	63
12.3. Transportassay	63
12.5. Radioaktivitätsmessungen	64
12.6. HPLC-Analyse der NadRHis ₆ -Reaktion mit AmPR als Substrat	64
13.1. Stammkonstruktionen	65
13.2. Isolation von AmPR spontanresistenten <i>H. influenzae</i> Zellen	67
14. Plasmid Konstruktionen	67
14.1. Plasmide für die Deletion der <i>H. influenzae</i> Gene	67
14.2. Expressionsplasmide	68
14.2.1. Expressionsplasmide mit dem His-Tag	69
14.2.2. Expressionsplasmide mit dem GST-Tag	69
14.2.3. „Site-directed“ Mutagenese	70
IV Ergebnisse	71
1. Konstruktion der <i>nadR</i> -RNK-Deletionsmutanten führt zu den Stämmen SE01ΔRNK und SE01ΔRNK58	71
1.1. Essentialität der RNK-Domäne	72
2. Charakterisierung der RNK-Deletionsmutante SE01ΔRNK	73
2.1. RNK-Deletion und Transport von NR	76
3. Spontan 3-Aminopyridin (AmPR) -resistente <i>H. influenzae</i> Isolate haben Mutationen im <i>nadR</i> -Gen... ..	77
4. Wie wirkt AmPR auf NadR?	79
4.1. Konstruktion und Reinigung des rekombinanten NadRHis ₆	79
4.2. <i>In vitro</i> Aktivität von NadRHis ₆ mit und ohne AmPR	80
5. Charakterisierung der NadR-RNK-Domäne	82
5.1. Konstruktion und Aufreinigung rekombinanter NadR-His ₆ Punktmutanten im P-Loop, Walker A-Motif und der LID-Domäne	83
5.2. <i>In vitro</i> Charakterisierung der NadRHis ₆ -Punktmutanten	84
5.3. <i>In vivo</i> Charakterisierung der NadRHis ₆ -RNK-Punktmutanten	85
6. Zelluläre Lokalisation der NadRHis ₆ -Proteinvarianten im SE01ΔRNK Hintergrund	87
6.1. Zelluläre Lokalisation von nativem NadR	89
6.2. Spielt PnuC eine Rolle bei der zellulären Lokalisation von NadR?	92
7. NadR „feedback“ Regulation und NR-Transport	93
7.1. <i>In vitro</i> Analyse der NAD ⁺ -abhängigen Inhibition von NadRHis ₆	93
7.2. <i>In vivo</i> Analyse der NAD ⁺ -Feedback Inhibition	96
7.3. Konstruktion von rekombinanten NadRHis ₆ Punktmutanten in der putativen NAD ⁺ -Bindestelle außerhalb des aktiven Zentrums der RNK-Domäne	98
7.4. <i>In vitro</i> Tests mit gereinigten NadRHis ₆ -Punktmutanten in der putativen NAD ⁺ -Bindestelle außerhalb des aktiven Zentrums der RNK-Domäne	99
7.5. <i>In vitro</i> Analyse der NAD ⁺ -abhängigen Inhibition von NadRHis ₆ W ²⁵⁶ F	101
8. Charakterisierung der AmPR-Resistenten <i>nadR</i> -Punktmutanten mit Mutationen außerhalb der Walker A und B Motifen und der LID-Domäne	103
9. Spielt HI0762 ORF eine Rolle im NAD ⁺ -Metabolismus von <i>H. influenzae</i> ?	108
V Diskussion	113
1. Charakterisierung der NadR-RNK-Domäne in <i>H. influenzae</i>	113
2. NadR und 3-Aminopyridin (AmPR)	116
3. Charakterisierung der RNK-Domäne und die subzelluläre Lokalisation von NadR	117
4. Feedback Inhibition durch NAD ⁺	121
5. Charakterisierung von <i>nadR</i> -Punktmutationen aus AmPR ^r - <i>H. influenzae</i> Isolaten	124
6. ORF HI0762 und seine Funktion in <i>H. influenzae</i>	126
7. Ausblick	127

VI Literaturverzeichnis	129
VII Anhang	139
1. Abkürzungen	139
2. Abbildungen	143
3. Erklärungen	144
4. Publikationsliste.....	145
5. Lebenslauf	146

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Bekapselter <i>H. influenzae</i> (Hib) und unbekapselter, nicht-typisierbarer (NTHi) Stamm auf Blutagar.....	8
Abb. 2: Strukturformel von NAD(P) ⁺	20
Abb. 3: NAD ⁺ -Stoffwechsel bei <i>E. coli</i> und <i>S. typhimurium</i>	25
Abb. 4: Modell für die Aufnahme und Verwertung des Faktor V (NAD ⁺) in <i>H. influenzae</i> und <i>Pasteurellaceae</i>	27
Abb. 5: Darstellung des <i>hi</i> NadR-Monomers.....	30
Abb. 6: Schematische Darstellung der Konstruktion von Deletionsmutanten in <i>H. influenzae</i>	65
Abb. 7: Schematische Darstellung der Insertion des Suizid-Plasmids pBADNadRHis ₆ ins Chromosom.....	66
Abb. 8: NadR-Aktivität in Rohextrakten (Gesamtzellextrakt).....	73
Abb. 9: NadR-Aktivität <i>in vivo</i> in SE01 (Wt), SE01ΔRNK und SE01ΔRNK _{compl} mit ¹⁴ C-Nam und ¹⁴ C-NR als Substrat.....	75
Abb. 10: Aufnahme des ¹⁴ C-Labels in SE01, SE01ΔRNK und SE01ΔRNK _{compl}	76
Abb. 11: Reinigungsschritte von NadRHis ₆	79
Abb. 12: <i>In vitro</i> Aktivität vom gereinigten NadRHis ₆ mit und ohne AmPR.....	80
Abb. 13: HPLC-Analyse der NadR-Aktivität mit AmPR als Substrat.....	81
Abb. 14: Reinigung von NadRHis ₆ G ²³⁸ N.....	83
Abb. 15: Analyse der rekombinanten NadR-His ₆ Proteine <i>in vitro</i>	84
Abb. 16: Aufnahme des ¹⁴ C-Labels in SE01ΔRNK-Stämmen mit chromosomalen pBADnadRHis ₆ -Konstrukten.....	86
Abb. 17: Zelluläre Lokalisation der NadRHis ₆ -Proteinvarianten im SE01ΔRNK Hintergrund.....	88
Abb. 18: Zelluläre Lokalisation von nativen NadR im SE01 Hintergrund.....	90
Abb. 19: NadR-Aktivität in den Zellfraktionen aus SE01.....	90
Abb. 20: Zelluläre Lokalisation vom NadR in SE01 (Wt), SE01ΔRNK, SE02 (Δ <i>pnuC</i>) und SE15 (ΔRNKΔ <i>pnuC</i>).....	92
Abb. 21: Konformation des an der „non-active-site“ gebundenen NAD ⁺ Moleküls in der RNK Domäne.....	93
Abb. 22: NAD ⁺ -bedingte Inhibition der NadRHis ₆ Aktivität.....	94
Abb. 23: Semiquantitative Auswertung der NAD ⁺ -bedingten Hemmung der NadR-Aktivität.....	95
Abb. 24: <i>In vivo</i> Analyse der Feedback-Hemmung durch NAD ⁺	97
Abb. 25: Immunoblot der dialysierten Proben nach der Elution mit 250 mM Imidazol.....	98
Abb. 26: Aktivitätsassays mit gereinigten NadRHis ₆ , NadRHis ₆ K ¹²⁶ A, NadRHis ₆ K ¹²⁶ T, NadRHis ₆ Y ²⁹² I und NadRHis ₆ W ²⁵⁶ F.....	99
Abb. 27: <i>In vitro</i> Analyse der NAD ⁺ -Feedback Inhibition von NadRHis ₆ und NadRHis ₆ W ²⁵⁶ F in der DC.....	101
Abb. 28: Immunoblot und DC-Analyse der Rohextrakten von AmPR ^r -NadR-Punktmutanten außerhalb der Walker A und B Motifen und der LID-Domäne.....	104
Abb. 29: Aufnahme des ¹⁴ C-Labels in AmPR-resistenten SE01- und SE02pSEpnuCHis ₆ -N ^r -Stämmen mit Punktmutationen im <i>nadR</i> -Gen.....	106
Abb. 30: DC-Analyse der NAD ⁺ -Synthese in Abhängigkeit vom <i>nadX</i> -Gen.....	110
Abb. 31: Gegenüberstellung verschiedener NadX-Homologer Proteine.....	143

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	34
Tabelle 2 : Medien und Agar.....	36
Tabelle 3: Medienzusätze.....	39
Tabelle 4: Bakterienstämme.....	40
Tabelle 5: Plasmide.....	41
Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide.....	43
Tabelle 7: Pipettierschema für Trenngele und Sammelgel.....	50
Tabelle 8: Mutationen im <i>nadR</i> -Gen, die zu Resistenz gegenüber AmPR führen.....	78

I Zusammenfassung

Haemophilus influenzae, ein Gram-negatives Bakterium der Familie *Pasteurellaceae*, kann beim Menschen eine Vielzahl an Erkrankungen auslösen: Die bekapselte Stämme, v. a. mit Typ b Kapsel können Cellulitis, septische Arthritis, Epiglottitis und Meningitis verursachen. Die nicht-bekapselte Stämme können Otitis media, Sinusitis, Pneumonie und in selteneren Fällen Bakteriämie verursachen. Ein besonderes Merkmal des Metabolismus von *H. influenzae* ist dessen Unfähigkeit Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD^+) *de novo* zu synthetisieren. Daher sind die Enzyme bzw. Transporter, die an NAD^+ Aufnahme- und Resynthese beteiligt sind, als putative antimikrobielle Ziele von Interesse. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass NAD^+ zu Nikotinamidribosyl degradiert werden muss, bevor es in die Zelle aufgenommen werden kann. Auch Proteine, die an der Degradation des exogenen NAD^+ zu Nikotinamidribosyl und dessen anschließender Aufnahme in die Zelle verantwortlich sind, konnten identifiziert und charakterisiert werden. Wie Nikotinamidribosyl im Cytoplasma wiederum zu NAD^+ synthetisiert wird, ist auch erst kürzlich geklärt worden: für NadR konnte sowohl eine Ribosyl-Nukleotid-Kinase (RNK) Aktivität als auch eine Nikotinamid-Mononukleotid-Adenylyltransferase (NMNAT) Aktivität *in vitro* gezeigt werden. Die Kristallstruktur von *hi*NadR im Komplex mit NAD^+ wurde auch aufgeklärt. In dieser Arbeit sollte NadR, insbesondere die RNK Domäne, *in vivo* und *in vitro* näher charakterisiert werden.

Um zu untersuchen, ob beide Domänen *in vivo* essentiell sind, wurden Deletionsmutanten erzeugt, bei welchen die komplette bzw. der C'-terminale Teil der RNK Domäne fehlten. Diese Deletionen konnten im *nadV*⁺ Hintergrund erzeugt werden. Durch die Expression des *nadV*, eines *H. ducreyi* Gens, das für eine Nikotinamid-Phosphoribosyltransferase kodiert, konnte das Fehlen der RNK Domäne kompensiert werden. Die Deletionen konnten in *H. influenzae* nur zusammen mit dem *nadV*-Gen transferiert werden oder alternativ nur in die Zellen, die mit pNadRkan Plasmid transformiert wurden. Dies verdeutlicht, dass nicht nur die NMNAT Domäne sondern auch die RNK Domäne bzw. sogar nur wenige C'-terminal fehlende Aminosäuren des NadR Proteins essentiell für die Lebensfähigkeit von *H. influenzae* sind. Gleichzeitig zeigen diese Experimente, dass die RNK-Domäne in Anwesenheit von NadV redundant ist. Ein weiterer Phänotyp der RNK-Deletionsmutante zeigte sich beim Nikotinamidribosyl-Transport. Im Gegensatz zum Wt, welcher ca. 60-80% des ¹⁴C-Nikotinamidribosyls aufnahm, konnte für die RNK-Deletionsmutante nur 2-

5% Aufnahme gemessen werden. Dies konnte durch das pNadRkan Plasmid komplementiert werden.

Für Aminopyridin wurde früher eine wachstumshemmende Wirkung auf *H. influenzae* gezeigt, aber der Mechanismus wurde nicht aufgeklärt. Wir konnten zeigen, dass Aminopyridin nur dann inhibierend wirkt, wenn es in die Zelle gelangt, da *pnuC*-Deletionsmutante resistent gegenüber Aminopyridin war. Weiterhin wurde festgestellt, dass spontan Aminopyridin-resistente *H. influenzae* Zellen Mutationen im *nadR* Gen haben, insbesondere im Walker A-Motif (P-Loop) der RNK Domäne. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass NadR aus 3-Aminopyridin und ATP 3-Aminopyridin-Adenin-Dinukleotid synthetisieren kann. Somit konnte gezeigt werden, dass die wachstumshemmende Wirkung eigentlich durch das aus 3-Aminopyridin synthetisierte 3-Aminopyridin-Adenin-Dinukleotid entsteht, welches NAD^+ in Redox-Reaktionen verdrängt, wodurch es letztendlich zum Stillstand des Metabolismus kommt.

Durch Einführen von gezielten Aminosäuren-Substitutionen im Walker A und B Motif und in der LID-Domäne von NadR, konnten einige Aminosäuren identifiziert werden, welche essentiell für die Aktivität der RNK Domäne sind. Alle Aminosäuren-Substitutionen führten zum Verlust der RNK Aktivität, die NMNAT Aktivität jedoch war nicht beeinträchtigt. Desweiteren wurden diese NadR Punktmutanten *in vivo* untersucht. Für alle konnte eine signifikante Defizienz in der Nikotinamidribosyl-Aufnahme beobachtet werden, die gemessene Aufnahme lag im Bereich der RNK-Deletionsmutante. Dadurch konnte eine direkte Korrelation zwischen der RNK Aktivität und der Nikotinamidribosyl-Aufnahme gezeigt werden.

Die Zellokalisations-Analysen zeigten, dass sich NadR sowohl in der löslichen als auch Membranfraktion befindet. In beiden Fraktionen konnte NadR Aktivität gezeigt werden. Ein Teil des membranassoziierten NadR konnte mit Salz solubilisiert werden. Dennoch verblieb ein erheblicher Anteil des Proteins in der Membranfraktion, welches auch mit Detergenzien nicht solubilisiert werden konnte. Weitere Lokalisationsstudien zeigten, dass weder eine funktionelle RNK Domäne noch das Vorhandensein von PnuC notwendig sind für eine membranassoziierte Lokalisation von NadR.

In weiteren *in vitro* Experimenten konnte für NadR eine Feedback-Inhibition durch das NAD^+ gezeigt werden, wobei NAD^+ in erster Linie die RNK Domäne von NadR inhibiert. Eine graduelle Erhöhung der NAD^+ Konzentration führte in den *in vitro* Assays zu einer graduellen Abnahme der RNK. Bei der NMNAT Aktivität jedoch zeigte sich keine signifikante Inhibition in Anwesenheit von NAD^+ . Begleitende *in vivo* Experimente,

zeigten eine 2/3 Reduktion der Nikotinamidribosyl-Aufnahme bei den Zellen, die mit NAD^+ inkubiert wurden, d. h. höhere intrazelluläre NAD^+ Konzentration hatten.

Für die genauere Analyse der Feedback-Inhibition durch NAD^+ wurden weitere Punktmutanten hergestellt. Bei zwei der Punktmutanten wurde eine Beeinträchtigung der NadR-Aktivität beobachtet, daher wurden diese Punktmutanten von weiteren Analysen im Bezug auf NAD^+ -Feedback Inhibition ausgeschlossen. Eine Mutante (NadRW²⁵⁶F) jedoch, zeigte ähnliche Aktivität wie das Wt-NadR. In Anwesenheit von NAD^+ wurde die RNK Aktivität dieser Punktmutante, im Gegensatz zum Wt-Protein, kaum gehemmt. Dadurch konnte W²⁵⁶ als eine der Aminosäuren identifiziert werden, die an der Vermittlung der NAD^+ -bedingten Inhibition der RNK-Domäne beteiligt ist.

Desweiteren sollte ebenfalls in dieser Arbeit das ORF HI0762 (hier *nadX* bezeichnet), das zusammen mit *nadR* ein Operon bildet hinsichtlich seiner Rolle im NAD^+ -Metabolismus untersucht werden. Die Suche nach den konservierten Domänen ergab für *nadX* eine Zuordnung zu der vorwiegend uncharakterisierten Gruppe der Metallophosphoesterasen. Die Deletion des *nadX* Gens hatte keine Auswirkung auf die Lebens- bzw. Wachstumsfähigkeit von *H. influenzae*. Auch in Transportassays konnten keine Unterschiede zum Wt festgestellt werden. Lediglich bei der NAD^+ -Synthese konnten leichte Unterschiede zwischen der *nadX*-Deletionsmutante und dem Wt beobachtet werden: Bei der *nadX*-Mutante war die NAD^+ -Synthese etwas stärker als bei dem Wt. Diese Beobachtungen reichen jedoch nicht aus, um eine eindeutige Aussage über die Beteiligung des NadX Proteins im NAD^+ -Metabolismus von *H. influenzae* treffen zu können. Die Versuche, NadX als GST-Fusionsprotein aufzureinigen und zu charakterisieren, schlugen aufgrund der Unlöslichkeit des GST-NadX Proteins fehl.

I Summary

Haemophilus influenzae, a Gram-negative human pathogen belonging to the family of Pasteurellaceae is a causative agent of several distinct diseases. Whereas capsulated strains, particularly those with type b capsule can cause severe invasive infections such as cellulitis, septic arthritis, epiglottitis and meningitis, non-capsulated strains generally tend to cause localized disease including otitis media, sinusitis, pneumonia and in rare cases bacteremia. The inability to synthesize NAD^+ *de novo* is one of the hallmarks of *H. influenzae* metabolism, therefore proteins involved in NAD^+ uptake and utilization represent interesting putative targets for development of novel antimicrobial treatment. In our laboratory we were able to show, that prior to uptake, NAD^+ has to be degraded to nicotinamide ribosyl. Several proteins involved in degradation of exogenous NAD^+ and nicotinamide ribosyl uptake were identified and characterized. An enzyme responsible for intracellular resynthesis of nicotinamide ribosyl to NAD^+ was recently found to be NadR: A bifunctional protein containing a nicotinamide ribosyl kinase (RNK) and a nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT) activity, both of which were confirmed *in vitro*. Also, the crystal structure of NadR complexed with NAD^+ was recently resolved. The aim of this work was to characterize NadR *in vivo* and *in vitro*, in particular this work was focusing on the characterization of the RNK domain.

To test if both domains of NadR are essential for survival, deletion mutants lacking the entire RNK domain and the C'-terminal part of the RNK domain were constructed. Initially, these mutants were made in a *nadV*⁺ background. By expressing *nadV*, a *H. ducreyi* gene coding for nicotinamide phosphoribosyltransferase, the lack of RNK activity could be compensated. In following experiments, transfer of the RNK deletion mutants to *H. influenzae* strain was always accompanied with an *nadV* transfer as well. Only in strain containing pNadRkan plasmid, no *nadV* transfer along with RNK deletions took place. Indirectly, this shows that not only the entire RNK domain is essential for *H. influenzae*, but also the last few amino acids as well. It also shows that in presence of NadV the RNK domain is redundant. RNK deletion mutant displayed a significant deficiency in nicotinamide ribosyl transport as well: whereas the Wt strain can accumulate up to 80% of ¹⁴C labeled nicotinamide ribosyl, RNK mutant is able to accumulate only 2-5%. Introduction of pNadRkan plasmid to RNK mutant restored transport efficiency to Wt level.

In earlier studies, inhibition of *H. influenzae* growth in presence of 3-aminopyridine was observed, but no detailed studies concerning the mechanism of inhibition were performed. In our laboratory we were able to show, that 3-aminopyridine acts inhibitory only if uptake in the cell takes place, since an *pnuC* mutant was resistant to 3-aminopyridine. Studies using spontaneous 3-aminopyridine resistant *H. influenzae* isolates, revealed that almost all of these isolates have mutations in the *nadR* gene. A clustering of mutations in Walker A motif of the RNK domain could be observed. Further studies represented in this work, show that 3-aminopyridine can act as a substrate for NadR, therefore in ATP consuming reactions 3-aminopyridine adenine dinucleotide can be synthesized. Intracellular 3-aminopyridine adenine dinucleotide replaces NAD^+ in redox reactions, which ultimately leads to inhibition of cell metabolism, thereby explaining the mechanism of 3-aminopyridine based growth inhibition.

Using site-directed mutagenesis to introduce amino acid substitutions in Walker A and B motif and in the LID domain, active sites of the RNK domain were revealed and amino acids essential for the RNK activity were identified. These defined amino acid exchanges resulted in loss of the RNK activity *in vitro*, but had no effect on the NMNAT activity, which remained intact in these mutant variants of NadR. Following *in vivo* studies showed that all mutant NadR proteins caused a severe nicotinamide ribosyl uptake deficiency, similar to the one observed in the RNK deletion mutant. Therefore, a direct correlation between the RNK activity and nicotinamide ribosyl uptake was shown.

Localisations studies showed that NadR can be found both in soluble and membrane fractions. Also, in both fractions NadR activity was observed. A partial solubilization of membrane associated NadR could be achieved with salt treatment. Nevertheless, a significant portion of NadR remained in the membrane fraction and could not be solubilized by further treatment with detergent, indicating protein aggregation. Following localisation studies indicated that neither a functional RNK domain nor the presence of PnuC were necessary for a membrane association of NadR.

Further *in vitro* studies revealed a feedback inhibition of NadR by NAD^+ , especially for the RNK domain. In case of RNK domain a gradual increase of NAD^+ concentration led to gradual decrease in RNK activity. In contrast, for NMNAT domain no significant inhibition in the presence of NAD^+ was observed. Also, in *in vivo* experiments a 3 fold reduction of nicotinamidribosyl uptake rate was observed when intracellular NAD^+ concentrations were higher.

To address the mechanism of NAD^+ feedback inhibition, once again, distinct amino acid exchanges were introduced. *In vitro*, two of the mutant proteins were impaired in their activity. Therefore, further tests concerning inhibition were not performed with these mutants. However, a $\text{NadRW}^{256\text{F}}$ protein displayed activity similar to that of the native protein and furthermore was not inhibited in the presence of NAD^+ . This indicates an involvement of the amino acid W^{256} in mediating the NAD^+ dependent feedback inhibition on NadR activity.

Together with *nadR* ORF HI0762 (here termed *nadX*) constitutes an operon. In this work, a possible role of *nadX* in NAD^+ metabolism was examined. A conserved domain search designated NadX as a member of metallophosphoesterase family. A BLAST search resulted in several homologs, all of which were designated as putative proteins. A deletion of the entire *nadX* gene had no effect on survival or growth of *H. influenzae*. Also, no effect on nicotinamidribosyl uptake could be observed. Only in studies where NAD^+ synthesis was examined, a slight difference between Wt and mutant was observed; in absence of *nadX* NAD^+ synthesis seemed a bit more effective than in Wt. However, these observations are not significant enough to allow a clear statement concerning the role of NadX in NAD^+ metabolism. An attempt to purify and characterize a GST- NadX fusion protein failed due to insolubility of the fusion protein.

II Einleitung

1. Allgemeines

Haemophilus influenzae ist ein kleines, Gram-negatives, fakultativ anaerobes, humanpathogenes und pleomorphes Stäbchen-Bakterium, das der Familie der *Pasteurellaceae* zugeordnet wird. Zu dieser Familie zählen auch die Gattungen *Pasteurella* und *Actinobacillus*. Alle Spezies der *Haemophilus* Gattung sind opportunistische Krankheitserreger, wobei die meisten für den Menschen relevant sind. Die zur Gattung *Haemophilus* zählenden Bakterienarten sind im Bezug auf den Faktor V und/oder den Faktor X auxotroph. Als Faktor V wird Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP) bzw. Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD^+) bezeichnet. NAD^+ ist einer der wichtigsten Kofaktoren im Metabolismus lebender Organismen, da es für die meisten Redoxreaktionen als H^+ -Akzeptor/Donor unerlässlich ist. NAD^+ wird bei *H. influenzae* sowohl für den aeroben als auch anaeroben Stoffwechsel benötigt. Als Faktor X bezeichnet man die prosthetische Gruppe Häm (Fe^{2+}), die in Hämin oder dessen Vorläufer Protoporphyrin vorkommt. Die Protoporphyrine funktionieren als Coenzyme in vielen Redoxenzymen, wie z. B. Katalasen, Peroxidasen und Cytochromen. Für das Wachstum von *H. influenzae* unter aeroben Bedingungen sind Protoporphyrine daher essentiell.

H. influenzae wurde erstmals 1888 von Richard Pfeiffer, einem Mitarbeiter Robert Kochs, entdeckt. Er isolierte das Bakterium aus dem Sputum der Patienten mit Influenza, und glaubte den Erreger der Influenza identifiziert zu haben. Daher wurde das Bakterium zunächst „Influenza-Bacillus“ genannt. Im Verlauf der schweren Influenza-Pandemie 1918 stellte sich allerdings heraus, dass die „Influenza-Bakterien“ nur in etwa 60% der Fälle aus der Lunge der verstorbenen Patienten isoliert werden konnten. Das zeigte, dass sie nicht die eigentlichen Erreger der Influenza sein konnten. Zu ungefähr gleicher Zeit (1890) isolierte Pfull dieselben Bakterien aus dem Nervengewebe des Hirns aus an Meningitis verstorbenen Kindern. Der Name *Haemophilus* wurde offiziell 1920 von Winslow et al. (Winslow et al., 1920) eingeführt, weil die im Blut vorhandenen Komponenten, Faktor V (NAD^+) und X (Hämin), essentiell für das aerobe Wachstum des Bakteriums sind (*gr. haima* = Blut; *gr. philos* = Liebhaber). Der zweite Teil des Namens blieb „*influenzae*“, auch als 1933 Smith et al. zeigten, dass Influenza-Erreger Viren sind. Bereits 1931 entdeckte Margaret Pittman, dass *H. influenzae* Stämme in zwei Gruppen aufgeteilt werden können: Die bekapselten (typisierbaren) und die nicht-bekapselten (nicht-typisierbaren,

NTHi) Stämme. Die bekapselten Stämme wurden von Pittman je nach Kapselart in 6 Typen (Kapseltyp a-f) klassifiziert. Sie beobachtete ebenfalls, dass fast alle Isolate, die aus Blut und cerebrospinaler Flüssigkeit (CSF) isoliert wurden, *H. influenzae* Bakterien vom Typ b (Hib) darstellten.

Auch in der Geschichte der molekularen Genetik spielte *H. influenzae* eine bedeutende Rolle: Als zweite Gattung nach den Streptokokken wurde 1950 *H. influenzae* als natürlich kompetentes Bakterium identifiziert; in den 60er Jahren untersuchte H. Smith die homologe Rekombination bei *H. influenzae* und entdeckte dabei die Typ II Restriktionsenzyme. Für diese Arbeit bekam er 1988 den Nobel-Preis. In den 80er Jahren wurden die ersten erfolgreichen konjugativen Vakzine, die Hib-Vakzine, entwickelt. Die seit 1989 in vielen Industrieländern eingesetzten Hib-Vakzine führten zu einem signifikanten Rückgang der invasiven Hib-Erkrankungen. 1995 wurde das *H. influenzae* Rd-Genom als erstes bakterielles Genom vollständig sequenziert (Fleischmann et al., 1995; www.tigr.com).

2. Morphologie, Struktur und Genom

Wie bereits erwähnt, ist *H. influenzae* ein Gram-negatives, nicht-bewegliches Bakterium, das keine Sporen ausbildet. Seine Morphologie kann stark variieren, von Kokkobacillen bis hin zu langen Filamenten. Als grobe Differenzierungsmerkmale können Kapseln und biochemische Reaktionen (Biotypisierung) benutzt werden. Die nicht-typisierbaren, unbekapselten Stämme (NTHi) bilden auf Blutagar kleine, glasig-transparente, glatte und scharfrandige Kolonien. Die bekapselten Stämme erscheinen auf Agar mukoid und bilden größere Kolonien als die NTHi-Stämme (s. Abb1).

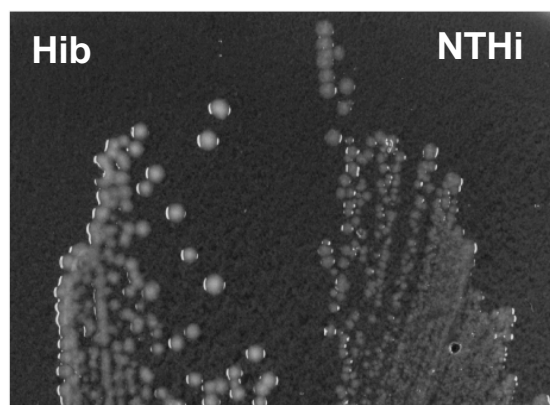


Abb. 1: Bekapselter *H. influenzae* (Hib) und unbekapselter, nicht-typisierbarer (NTHi) Stamm auf Blutagar

Durch drei biochemische Reaktionen (Indol-Reaktion, Urease-Produktion, Ornithin-Decarboxylase-Reaktion) werden innerhalb der *H. influenzae* 7 Biotypen unterschieden. Eine weitere und genauere Typisierung kann anhand von Lipooligosacchariden (LOS) und Außenmembranprotein-Profilen erfolgen, da diese stammspezifisch sind (Carlone et al., 1985).

Die Zellhülle besteht wie bei allen Gram-negativen aus einer inneren Membran (IM), die den cytoplasmatischen Raum umschließt, einem dünn-schichtigen Murein im periplasmatischen Raum und einer äußeren Membran (AM). Die äußere Membran ist aus Phospholipiden, Proteinen und Lipooligosacchariden (LOS) aufgebaut und über Lipoproteine an den Murein-Sacculus gebunden.

Das LOS der *Haemophilus* spp. hat im Gegensatz zu den meisten anderen Gram-negativen Bakterien keine lange O-Antigen-Seitenkette mit sich wiederholenden Polysaccharideinheiten, sondern nur kurze, nicht repetitive Oligosaccharide. Das Lipid A besteht aus einem β -(1,6) verknüpften D-Glucosamin-Disaccharid, das mit 2 Phosphatgruppen (C1-Atom des reduzierenden und C-4 Atom des nicht-reduzierenden Glucosamin) und 4 Tetradecanoinsäure-Molekülen (C 2/2' und C3/3') substituiert ist, wobei die zwei Tetradecanoinsäuren am nicht reduzierenden Glucosamin jeweils an ihrem Hydroxy-Ende eine weitere Tetradecanoinsäure tragen. Über eine phosphorylierte 2-Keto-3-Desoxyoctulonsäure (KDO) ist das Lipid A mit dem konservierten L-glycero-D-manno-Heptose-Trisaccharid (Kern Oligosaccharid-Einheit) verbunden (Helander et al., 1988). An jedes Heptose-Molekül werden weitere Oligosaccharide angehängt. Diese können aus verschiedenen Zuckern aufgebaut sein: z. B. aus Glucose, Galactose und N-Acetylglucosamin. (Preston et al., 1996; Masoud et al., 1997; Risberg et al., 1999). Zusätzlich können Phosphate (freies Phosphat, Phosphocholin, Phosphoethanolamin, Pyrophosphoethanolamin), Sialinsäure und O-Acylgruppen vorhanden sein. Die Anzahl und die Anordnung der Oligosaccharide und der anderen Substituenten ist hoch variabel, nicht nur zwischen den Stämmen, sondern auch, je nach Wachstumsphase und Umweltbedingungen, bei einzelnen Bakterien (Roche und Moxon, 1995).

Die äußere Membran enthält ungefähr 36 Lipo- und Außenmembranproteine mit unterschiedlichster Funktion. Die Hauptproteine der äußeren Membran (AM) werden P1-P6 genannt. P1 (oder Protein a) ist hitze-modifizierbar und obwohl es variabel in der primären Proteinstruktur ist, besitzt es 8 Epitope, die konservierte Bereiche zwischen typisierbaren und NTHi Stämmen aufweisen. OmpP2 (Protein b/c) bildet den größten Anteil der Außenmembranproteine. Seine funktionelle Form ist ein Trimer und als Porin

erleichtert es unter anderem den Transport von NAD^+ und NMN ins Periplasma (Andersen et al., 2003). Zudem ist es hoch-variabel und immunogen. P4 (e Protein) ist ein Lipoprotein mit Phosphomonoesterase-Aktivität, das NMN zu NR und NADP zu NAD^+ spaltet (Reidl et al., 2000; Zagursky et al., 2000). P5 (Protein d) ist ein hitze-modifizierbares Adhäsion. P6 (PAL-Protein) ist ein Lipoprotein und zwischen NTHi und typisierbaren Stämmen hoch konserviert und ebenfalls immunogen. Weitere bekannte Außenmembranproteine sind: PCP, D15 (hoch konserviert und immunogen), OMP 26 (ein starkes Antigen), Protein D (Lipoprotein, bindet IgG, hat Glycerophosphodiester Phosphodiesterase Aktivität), Tbp 1 und Tbp 2 (Transferrin-bindende Proteine), OapA (Oberflächen-assoziiertes Lipoprotein) und mehrere Häm-Bindeproteine (Hardy et al., 2003).

Die bei typisierbaren Stämmen vorhandene Kapsel wird vom *cap*-Genlocus kodiert, das in drei Regionen aufgeteilt wird. Region 1 enthält die *bex*-Gene (*bexA-D*), wobei *bexA* eine essentielle Rolle beim Export der Kapsel spielt. Region 2 besteht aus 4 Genen, die für die Polysaccharid-Biosynthese zuständig sind, diese Region ist spezifisch für den jeweiligen Kapsel-Typ. Region 3 hat zwei „open reading frames“ (ORF's), die vermutlich am Polysaccharid-Export beteiligt sind. Es können bis zu 5 *cap*-Loci im Genom vorhanden sein. Die Amplifikation des Locus wird von den flankierenden IS1016 Elementen erleichtert. Der Kapsel-Typ b besteht aus Polyribosyl-Ribitol-Phosphat (PRP) und Typ a aus Polyglucose-Ribitol-Phosphat. Die Typen c und f besitzen 2-Acetamido-2-Desoxyhexose als Grundeinheit und Typ d und e 2-Acetamid-2-Desoxy-D-Mannose Uronsäure (Aubray und Tang, 2003).

Die vollständige Sequenzierung des 1,8 Mb großen *H. influenzae* Rd Genoms (Fleischmann et al., 1995) offenbarte bzw. begründete mehrere physiologische Merkmale von *H. influenzae*, wie z. B. das Fehlen der Gene, die für die Enzyme der Protoporphyrin IX-Biosynthese kodieren, was die Faktor X-Abhängigkeit erklärt. Ebenfalls nicht vorhanden sind die Gene, die für drei Schlüsselenzyme des Tricarbonsäure-Zyklus kodieren: Citrat-Synthase, Isocitrate-Dehydrogenase und Aconitase. Die Gene, die für die Enzyme der NAD^+ -Biosynthese kodieren fehlen ebenso. Als eine weitere Besonderheit des Genoms sind die USS-Sequenzen zu erwähnen, die auf dem Genom verteilt ca. 1500x vorkommen (Smith et al., 1995). Mit Hilfe der USS-Sequenzen wird die Aufnahme der chromosomalen DNS in intakte Zellen erleichtert. Die „Zwei-Komponenten“ regulatorische Systeme scheinen bei *H. influenzae* nicht sonderlich ausgeprägt zu sein. Während bei *E. coli* ca. 40 Sensor-Regulator Paare vorhanden sind, besitzt *H. influenzae*

Rd nur 4 solcher Paare. Das Genom des Eagen Typ b Stammes (Hib) hat ca. 270 kb mehr als Rd. Zusätzlich vorhanden beim Eagen sind: *cap*-Locus (kodiert für die Kapsel-Biosynthese), *hif*-Gencluster (kodiert für Pilus-Adhäsine) und Tryptophanase-Gencluster. Die Sequenzierung weiterer NTHi-Stämme wird zur Zeit durchgeführt (www.microbial-pathogenesis.org).

Die genetische und evolutionäre Verwandtschaft zwischen den bekapselten und nicht bekapselten (NTHi) *H. influenzae* Stämmen wurde mit Hilfe verschiedener Methoden untersucht: Pulsed-field Gelelektrophorese, Multilocus-Enzym-Elektrophorese (MLEE), Multilocus-Sequence-Typing (MLST), Ribotyping und RNA-Sequenzierung. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass zwischen *H. influenzae* Stämmen eine signifikante genetische Diversität besteht. Dennoch geht man davon aus, dass das „Ur- *H. influenzae*-Bakterium“ nicht bekapselt war und sich in zwei teilweise ineinander übergreifende Linien aufteilte. Die bekapselten Stämme werden phylogenetisch in zwei Linien trennen: Zur Gruppe I gehören Typen a, b, c, d und e Stämme und zur Gruppe II die Typ a, b und f Stämme (Musser et al., 1988; 1990). Im Gegensatz zu bekapselten Stämmen weisen NTHi Stämme wesentlich mehr genetische Diversität auf. So stellten z. B. Meats et al. (Meats et al., 2003) bei der Genotypisierung von *H. influenzae* mit Hilfe von MLST fest, dass bei 26 NTHi-Stämmen 19 Sequenztypen und bei 50 untersuchten Typ b Isolaten nur 12 Sequenztypen auftraten. Einige unbekapselte Stämme besitzen jedoch *cap*-Gene und keinen von den bei NTHi üblichen HMW1/2 Adhäsinen. Allerdings haben sie das Hia-Adhäsine, ein Homolog des Hsf-Adhäsins, das bei bekapselten Stämmen vorkommt (St. Geme et al., 1994; Hardy et al., 2003). Daher wird angenommen, dass der „Ur- *H. influenzae*“ nicht bekapselt war und sich dann später in zwei teilweise ineinander übergreifende Linien aufteilte. Die größere Linie erwarb verschiedene Gene für die Interaktion mit dem Wirt und blieb unbekapselt, während die zweite Gruppe ein anderes Set an Genen, darunter auch die *cap*-Gene erwarb und dadurch bekapselt wurde. Durch die Mutation im *cap*-Locus verloren einige Stämme ihre Kapsel und repräsentieren nun eine Untergruppe der NTHi-Stämme.

3. Pathogenese und Virulenz

Der Mensch stellt bisher das einzige Bioreservoir für *H. influenzae* dar. Bei 30-80% der gesunden Bevölkerung (asymptomische Träger) ist *H. influenzae* im Nasopharynx als

kommensaler Keim zu finden. Die meisten dieser Isolate gehören zu den NTHi-Stämmen. Nur 0,5-3% der Isolate sind Hib-Stämme, wobei Hib in erster Linie bei Säuglingen und Kindern und seltener bei Erwachsenen zu finden ist. Im Alter von einem Jahr tragen 20% aller Kinder *H. influenzae* und im Alter von 6 Jahren sind es schon 50%. Während Kinder oft mehrere Stämme gleichzeitig tragen, kann bei Erwachsenen meist nur ein Stamm isoliert werden (Kuklinska et al., 1984). Meistens trägt man einen bestimmten Stamm für mehrere Wochen oder Monate, verliert diesen und aquiriert dann einen neuen *H. influenzae* Stamm. Die Übertragung von *H. influenzae* erfolgt durch Tröpfchen oder direkten Kontakt mit Trägern. Die Kolonisierung des Nasopharynx führt nicht zwingend zur Ausbildung einer Krankheit, es können jedoch zwei unterschiedliche Krankheitsformen auftreten: Oberflächeninfektionen und invasive, systemische Erkrankungen. Die Oberflächeninfektionen werden von den NTHi Stämmen ausgelöst, die sich nach der Besiedlung des Nasopharynx in die höhere und tiefere Regionen des Atmungstraktes ausbreiten. Nach der Kolonisierung der entsprechenden Epithelien kann es zur Ausbildung von Otitis Media, Sinusitis, Epiglottitis, Pneumonie und in selteneren Fällen zu Bakteriämie kommen. Die bekapselten Stämme, besonders die vom Typ b, verursachen invasive Infektionen wie Meningitis, Cellulitis und septische Arthritis.

Die Pathogenese von *H. influenzae* beginnt durch die Interaktion der Bakterien mit dem Mukus und dem darunter liegendem Epithelium. Die meisten Bakterien werden vom „Mucociliary escalator“ (unspezifische mukociliäre Abwehr) beseitigt, allerdings kann eine kleine Anzahl der Bakterien persistieren. Diese bilden Mikrokolonien innerhalb der Mukusschicht und setzen lösliche Faktoren frei, welche letztendlich Ciliostasis, Verlust der Cilien und Erosion der cilierten Zellen bewirken (Read et al., 1991). Die Bakterien adhäreren bevorzugt am Mukus, nicht cilierten Zellen und an Stellen, wo die Epithelzellen beschädigt sind. Eine Vielzahl der Oberflächenstrukturen ist am Prozess der Adhäsion beteiligt.

Zunächst müssen sich die Bakterien am Mukus etablieren. *H. influenzae* kann Mucin, die Hauptkomponente des Mukus binden. Der genaue Mechanismus, der diese Bindung ermöglicht ist unbekannt, aber man nimmt an, dass sowohl spezifische als auch nicht-spezifische Interaktionen eine Rolle spielen. Einige der Komponenten, die an Mucin binden, sind Pili (Kubiet et al., 2000) und die P2 und P5 Außenmembranproteine (Reddy et al., 1996).

Die Ciliostasis und Ciliotoxizität werden vom LOS vermittelt, wobei Lipid A den biologisch aktiven Anteil des LOS darstellt. Freigesetzt als Endotoxin ist es ein wirksamer Entzündungsauslöser (Johnson et al., 1986; Gu et al., 1995). LOS spielt auch eine Rolle bei der Adhäsion an die bronchialen Epithelzellen (Swords et al., 2000). Bei der Ciliostasis und der Zerstörung der ciliierten Zellen scheint auch das Protein D eine Rolle zu spielen (Janson et al., 1999). Diese Vorgänge erleichtern die weitere Adhärenz an das respiratorische Epithelium.

Die Pili stellen einen weiteren Kolonisierungsfaktor dar. Die Pili von *H. influenzae* kommen bei bekapselten und einigen NTHi Stämmen vor. Sie werden von dem *hif*-Gencluster kodiert. Dieser besteht aus 5 Genen: *hifA-hifE* (van Ham et al., 1993; Gilsdorf et al., 1997). *hifA* kodiert für die Hauptuntereinheit des Pilus, das HifA Protein, und *hifD* und *hifE* für Proteine, welche die Spitze des Pilus bilden. HifB ist ein periplasmatisches Chaperon, das die Pilus-Untereinheiten während des Transports von der inneren zu äußeren Membran stabilisiert und deren Zusammenbau erleichtert (St. Geme et al., 1996b; Krasan et al., 2000). HifC ist in der Außenmembran lokalisiert und spielt eine Rolle beim geordneten Einbau der Untereinheiten in den wachsenden Pilus (Watson et al., 1994). Die Pili sind peritrichial verteilt und zeigen Bindungsaffinität zu den oropharyngealen Epithelzellen und dem humanen Blutgruppenantigen AnWj (früher „Anton“ genannt), vermutlich, indem sie sialylierte Lactosylceramid-Derivate erkennen (Guerina et al., 1982; van Alphen et al., 1986; Read et al., 1991; van Alphen et al., 1991). Neuere Untersuchungen mit *H. influenzae* Typ b zeigten, dass die Pili auch die Interaktion mit den Heparin-bindenden extrazellulären Matrix-Proteinen, wie z.B. Fibronectin vermitteln (Virkola et al., 2000).

Desweiteren sind viele andere Faktoren an der Kolonisierung beteiligt, wie z.B. Hap, Hia/Hsf und die hochmolekularen Rezeptorproteine HMW1/2 (Barenkamp et al., 1994). Diese Proteine gehören zur Gruppe der Autotransporter (Henderson und Nataro, 2001). HMW1/2 Proteine kommen bei den meisten NTHi Stämmen vor, fehlen aber bei den bekapselten. HMW1 zeigt Bindungsaffinität für oropharyngeale Zellen, während HMW2 eine Präferenz für die Zellen des Genitaltraktes aufweist (St. Geme et al., 1993; Dawid et al., 1999). Das Hap-Protein ist sowohl bei den bekapselten, als auch NTHi Stämmen vorhanden. Es ist an der Kolonisierung und Invasion der Epithelzellen beteiligt und scheint auch die Aggregation der Bakterien und die Ausbildung der Mikrokolonien zu vermitteln (St. Geme et al., 1994; Hendrixson und St. Geme, 1998). Hia kommt bei NTHi Stämmen

vor, die keine HMW's exprimieren. Ein Hia-Homolog bei den bekapselten Stämmen ist das Hsf-Protein. Das Hia Protein zeigt Bindungsaffinität für ein breites Spektrum von Epithelzellen (St. Geme et al., 1996; Laarman et al., 2002).

Nach der erfolgreichen Adhäsion müssen die Bakterien auf den respiratorischen Schleimhäuten persistieren können, d. h. fähig sein das menschliche Immunsystem abzuwehren und Nahrungsstoffe aufzunehmen. Um dem Immunsystem ausweichen zu können, bedient sich *H. influenzae* mehrerer Strategien. Eine davon besteht darin, die Komponenten der Zellhülle, welche als antigene Determinanten agieren, zu variieren. Einige Außenmembranproteine stellen solche antigene Determinanten dar. Durch „antigenische Drift“ in den immundominanten Epitopen der Proteine kann das Antikörper-abhängige Abtöten von Bakterien (Opsonisierung) vermieden werden. Als „antigenische Drift“ wird ein irreversibler Prozess bezeichnet, bei welchem die immundominanten Regionen eines Proteins durch Substitution, Deletion oder das Anhängen weiterer Aminosäuren verändert wird. Bei *H. influenzae* konnte dies bei P2, P5, P1, IgA1 Protease, HxuA, HMW1 und 2 Adhäsinen, Hia Adhäsine und den HifA, HifD und HifE Pilus-Untereinheiten beobachtet werden (Hardy et al., 2003).

Die Phasenvarianz ist ein weiterer Mechanismus mit dem die Immunantwort umgangen werden kann. Sie ist ein reversibler Prozess, bei welchem die Bakterien bestimmte Oberflächenstrukturen verlieren bzw. bekommen. Die Phasenvarianz wie folgt zustande: Im 5'-kodierenden oder im Promotorbereich bestimmter Gene kommen tandemartige 2-7 bp lange Repeats vor. Die Anzahl der Repeats unterliegt einer spontanen Variation durch „slipped-strand-pairing“. Wird die Anzahl der Repeats im 5'-kodierenden Bereich verändert, so kommt es zu einer translationalen Leserasterverschiebung, dabei wird das Protein verändert bzw. gar nicht synthetisiert. Im Promotorbereich kann durch die Veränderung der „Repeat“-Anzahl die Bindung der Polymerase an den Promotor beeinflusst werden, was zum An- bzw. Abschalten der Genexpression führt. Der Phasenvarianz unterliegen die Synthesen der variablen Oligosaccharide des LOS, die Pili, HMW1/2 Adhäsine und Hämirezeptoren (Hardy et al., 2003).

Die Expression der IgA1-Protease hilft auch bei der Abwehr des menschlichen Immunsystems. Der vorherrschende Antikörper auf den Schleimhäuten ist IgA, wobei der IgA1-Typ ca. 90% der IgA-Antikörper ausmacht. Sie agglutinieren die Bakterien und verhindern deren Adhärenz, unterstützen die Phagozytose und können auch bakterielle Toxine binden. Die IgA1-Protease spaltet die IgA1-Antikörper in der „hinge region“ in

einen Fab- und Fc-Teil (Mulks et al., 1982). Dadurch wird die Agglutination und Elimination der Bakterien verhindert. Zusätzlich kann das freigesetzte Fab-Fragment sein Antigen binden und dadurch die Bakterien vor den intakten Immunglobulinen „maskieren“. Es sind 3 verschiedene IgA1-Protease Varianten bekannt, die unterschiedliche Schnittstellen in der „hinge region“ erkennen (Kilian et al., 1992).

Die Invasion der Epithelzellen und intrazelluläre Vermehrung stellt letztendlich auch eine Möglichkeit dar, dem Immunsystem des Wirts auszuweichen. *H. influenzae* kann über mindestens 3 verschiedene Mechanismen die Zellen penetrieren, wobei hier anzumerken ist, dass die meisten Analysen hinsichtlich der Invasion mit NTHi Stämmen durchgeführt wurden. Einer der Mechanismen ähnelt der Makropinozytose. Dabei findet bei den Wirtszellen eine Umordnung der Actinfilamente statt, was zur Ausbildung und Verlängerung der Lamellipodien führt, die wiederum die adhärierenden Bakterien umschließen und dabei eine membrangebundene Vakuole ausbilden (Ketterer et al., 1999). Im zweiten Mechanismus findet eine Interaktion der Cholin-LOS mit dem PAF-Rezeptor (PAF = platelet-activating factor) statt. Die darauf folgende Signalkaskade, die die bakterielle Invasion ermöglicht ist noch nicht genau geklärt. Jedoch scheinen Pertussis-Toxin sensitive G-Proteine und Ca^{2+} daran beteiligt zu sein (Swords et al., 2000; 2001). Beim dritten Mechanismus sind β -Glucan Rezeptoren beteiligt (Ahren et al., 2001). Außerdem sind NTHi Stämme in der Lage die Zell-Zell-Verbindungen (tight junctions) zu zerstören. Dadurch können sie zwischen den Epithelzellen migrieren und sich an der basolateralen Fläche der Epithelzellen ansiedeln bzw. in den subepithelialen Raum eindringen (Farley et al., 1986; 1990; van Schilfgaarde et al., 1995). Dieser Prozeß wird Parazytose genannt. Für die Parazytose scheint das HI0638 ORF, das für ein Lipoprotein kodiert, essentiell zu sein (van Schilfgaarde et al., 2000).

Die Kapsel der typisierbaren Stämme stellt einen weiteren Faktor im Immunsystem-Abwehrarsenal von *H. influenzae* dar. Sie bildet ein dichtes Netzwerk aus Polymeren, die die Oberfläche der Bakterien bedecken. Die Kapsel wirkt antiphagozytotisch und führt zu einer erhöhten Serumresistenz, da die Proteine des Komplementsystems nicht an das Bakterium binden können (Noel et al., 1990). Die Typ b Kapsel ist dabei besonders effektiv und stellt einen wesentlichen Virulenzfaktor bei der invasiven Hib Erkrankung dar (Moxon et al., 1984). Andererseits ist die Kapsel bei der Adhäsion und der Invasion der Epithelzellen eher hinderlich (Roche und Moxon, 1995).

Um sich vermehren zu können, müssen Bakterien Nahrungsstoffe aufnehmen. Einer der wichtigsten Elemente ist Eisen. Das Eisen kann zwei positive geladene Formen, Fe^{2+} und Fe^{3+} , annehmen. Je nach dem in welchem Molekül das Eisen gebunden ist, können deren Redoxpotentiale stark variieren, was Eisen zu einem der wichtigsten an Redox-Vorgängen beteiligten Elemente macht. Eisen allein oder in Eisen-Schwefel- bzw. Häm-Proteine integriert, funktioniert als katalytisches Zentrum vieler Redox-Enzyme. Diese Enzyme sind zentral bei Prozessen wie Elektronentransport (Atmungskette), Peroxid-Reduktion, Aminosäuren-, Nukleosid- und DNS-Synthese. Da aber in der Natur und auch beim Menschen fast kein freies Eisen vorkommt (oxidiertes Eisen ist unlöslich und die reduzierte Form toxisch für die meisten Makromoleküle) haben Bakterien eine Vielzahl an Mechanismen entwickelt, um an Eisen zu kommen. Diese kann man grob in zwei Gruppen aufteilen: Bei der ersten ist ein direkter Kontakt zwischen den Bakterien und der entsprechenden Eisen/Häm Quelle notwendig. Dies geschieht über spezifische Rezeptoren. Beim zweiten werden Substanzen synthetisiert, so genannte Siderophore bzw. Hämophore, und in das Medium freigesetzt, um das freie Eisen oder Häm zu binden. Sie chelatieren ihre Substrate und bringen sie dann an hochaffine Rezeptoren der Außenmembran, wo diese dann weiter in die Zelle transportiert werden. Beim Menschen, dem natürlichen Wirt von *H. influenzae*, liegt Eisen fast nur in gebundener Form vor. Daher ist es nicht verwunderlich, dass Siderophore nur bei wenigen Stämmen gefunden wurden (Schryvers und Gray-Owen, 1992; Hardie et al., 1993).

Da *H. influenzae* keine Enzyme für die Synthese von Protoporphyrin IX (PPIX) besitzt, ist für die Zellen nicht nur Eisen, sondern auch die Aufnahme von Häm für ein Wachstum unter aeroben Bedingungen essentiell. Allerdings haben die meisten Stämme das Gen, das für das Enzym Ferrochelatase kodiert. Ferrochelatase kann das Eisen-Atom in PPIX inserieren, wodurch Häm entsteht (Loeb, 1995; Schlör et al., 2000). Für *H. influenzae* dienen Transferrin und Lactoferrin als Eisenquelle. Transferrin kann über zwei Proteine Tbp1 und Tbp2 (Tbp = Transferrin-binding-protein) verwertet werden. Die Expression dieser Proteine ist durch Eisen reprimierbar und unterliegt der Kontrolle des Fur-Proteins (Fur = ferric uptake repressor protein)(Schryvers, 1989; Grey-Owen et al., 1995; Hasan et al., 1997). Tbp1 ist ein 95 kDa großes, intergales Außenmembranprotein und Tbp2 (68-85 kDa) ist vermutlich ein Lipoprotein. Tbp1 und Tbp2 interagieren zusammen mit dem Transferrin. Dabei wird das Eisen aus dem Transferrin entfernt und über einen TonB abhängigen Mechanismus vom Tbp1 ins Periplasma entlassen (Jarosik et al., 1994; 1995). Der Transport über die innere Membran ins Cytoplasma findet mit Hilfe von Hit

(*Haemophilus iron transport*)-Proteinen statt. Der *hit*-Locus besteht aus 3 Genen, die für die HitA, HitB und HitC Proteine kodieren. HitA ist ein periplasmatisches Eisen-Bindeprotein. HitB ist eine cytoplasmatische Permease und transportiert das Eisen vom Periplasma ins Cytoplasma. HitC ist ein Nukleotid-Bindeprotein und liefert die Energie für den HitB-abhängigen Transport von Eisen ins Cytoplasma (Sanders et al., 1994).

An der Aufnahme von Häm sind mehrere Systeme beteiligt. Freies Häm wird im Menschen von Hämopexin und freies Hämoglobin von Haptoglobin gebunden. Das *hxuCBA* Gencluster vermittelt die Aufnahme von freiem Häm, Häm-Hämopexin, Hämoglobin und auch Häm-Albumin. HxuB ist ein 60 kDa großes Außenmembranprotein, das die Sekretion von HxuA erleichtert. HxuA ist eine 100 kDa große Hämophore, die in das Medium freigesetzt wird, dort den Häm-Hämopexin-Komplex bindet und es weiter an den HxuC-Rezeptor leitet. HxuC weist Charakteristika eines TonB-abhängigen Außenmembranproteins auf und ist essentiell für die Verwertung von Häm-Hämopexin. Es ist der einzige Häm-Hämopexin-Rezeptor, allerdings ist HxuC auch an der Aufnahme von Häm und Häm-Hämoglobin-Komplexes beteiligt (Cope et al., 1995, 1998, 2001; Morton et al., 2004). Die Hämoglobin Verwertung wird durch mehrere Proteine ermöglicht: HgpA, ein 120 kDa großes Außenmembranporin (OMP), kann freies Häm und Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex binden. HgpB, ein 115 kDa großes, TonB-abhängiges OMP ist an der Bindung von Hämoglobin beteiligt. HgpC (120 kDa) ist auch ein TonB-abhängiger OMP, das an der Bindung von Hämoglobin-Haptoglobin beteiligt ist (Jin et al., 1996; 1999; Morton et al., 1999; Ren et al., 1998). Als weitere Rezeptoren sind HhuA und HbpA bekannt. HhuA bindet Hämoglobin-Haptoglobin und HbpA Hämin (Maciver et al., 1996; Hanson und Hansen, 1991). Ein weiteres Protein, das an der Häm-Verwertung beteiligt ist, das Hup, (*haem-utilization-protein*) wurde kürzlich identifiziert (Morton et al., 2004). Eine Hup-Deletion hat Auswirkung auf mehrere Aufnahmesysteme, daher wird spekuliert, dass Hup bei mehreren spezifischen Rezeptoren als Hilfsprotein bei der Entfernung des Häms aus den jeweiligen Bindeproteinen funktioniert und daher eine wichtige Rolle bei der Internalisierung von Häm spielt. Die Aufnahme von Häm 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 *H. influenzae*

Vor der Einführung der Impfpfrophylaxe 1985-1992 in industrialisierten Ländern war der *H. influenzae* Typ b (Hib) vor *Neisseria meningitidis* und *Streptococcus pneumoniae* der häufigste Verursacher von Meningitis, v. a. bei Neugeborenen und Kleinkindern. In den Entwicklungsländern ist dies bis heute noch der Fall. In der nicht geimpften Bevölkerung sind v. a. Kinder im Alter von 2 Monaten bis 5 Jahren betroffen. Das altersspezifische Auftreten invasiver Hib-Erkrankungen korreliert mit dem Titer von PRP (Typ b Kapsel)-Antikörper. Der relativ hohe Titer der transplacental vermittelten PRP-Antikörper nimmt in den ersten 2 Lebensmonaten schnell ab. In einem Alter von 6 Monaten ist die Anzahl der PRP-Antikörper sehr niedrig bzw. nicht vorhanden. Erst ab dem zweiten Lebensjahr steigt die Anzahl der PRP-Antikörper wieder an, vermutlich als Resultat der Hib-Exposition in dem nasopharyngialen Bereich. Das Fehlen protektiver Antikörper führte bei Säuglingen zu einer Mortalitätsrate von 5%. Nach der Einführung der Schutzimpfung in den 80er Jahren sind seit 1995 die Fälle der Hib bedingten Meningitis kaum mehr erfassbar.

Für die Entwicklung eines Impfstoffs gegen Hib stellte die Kapsel ein ideales Ziel dar, da bei verschiedenen Hib-Isolaten keine Varianz in der Kapselstruktur besteht und die Antikörper gegen das PRP protektiv wirken (Hill, 1983). Das Problem bei der Entwicklung der Vakzine war, dass PRP, wie andere Polysaccharide auch, ein T-Zellen unabhängiges Antigen ist (Smith et al., 1989) und nur die Bildung von IgM's induziert, die mit der Zeit schnell verloren gehen. Für eine beschleunigte Sekundärantwort mit hohem Antikörpergehalt ist aber die Produktion von IgG sowie Gedächtniszellen notwendig. Daher wurde das PRP an einem T-Zell-abhängigen Trägermolekül kovalent gekoppelt (Granoff et al., 1988; Weinberg et al., 1988). Zur Zeit sind 4 verschiedene Konjugat-Vakzine gegen Hib gebräuchlich. Bei PRP-D Vakzine dient das detoxifizierte Diphtherie-Toxin als Träger, bei PRP-OMPC ist es der Außenmembran-Protein-Komplex von *N. meningitidis* Serotyp B. Bei HibOC dient ein Derivat des Toxins von *Corynebacterium diphtheriae* und bei PRP-T das detoxifizierte Tetanus-Toxin als Träger. Das Impfprotokoll ist bei allen 4 Präparaten gleich: Impfungen erfolgen bei den Säuglingen im zweiten und im fünften Monat, mit einer letzten Boosterung im ersten bzw. zweiten Lebensjahr. Hib-Konjugat-Vakzine haben sich als relativ sicher erwiesen, als Nebenwirkungen können aber Fieber, Halsschmerzen, Schwellungen und Hautreizungen auftreten (Eskola et al., 1987). Allerdings wird in letzter Zeit ein Anstieg der nicht durch Hib hervorgerufenen *H.*

influenzae Infektionskrankheiten verzeichnet: In Deutschland stieg im Zeitraum von 1998-2001 die Anzahl der nicht-Hib Infektionen von 19,6% auf 68% (ESPED 1998-2001). Auch in Finnland konnte gezeigt werden, dass zeitgleich zum Rückgang schwerer Hib-Infektionen durch die Hib-Impfung, auch ein Anstieg schwerer Pneumokokken-Infektionen stattfand (Baer et al., 1995). Es ist umstritten, ob diese Phänomene mit der Verschiebung des Erregerspektrums durch die Impfung zusammenhängen.

Gegen NTHi Stämme ist bisher kein Impfstoff entwickelt worden. Die NTHi Stämme können im allgemeinen noch gut mit Antibiotika behandelt werden. Ampicillin und andere β -Lactam Antibiotika werden bevorzugt eingesetzt. Bei der zur Zeit immer öfter auftretender Ampicillin-Resistenz bei NHTi-Stämmen (Pichichero und Pichichero, 1995), kann die dritte Generation von Cephalosporinen, Chloramphenicol oder Tetracyclin eingesetzt werden. Allerdings können die NTHi-Infektionen auch nach erfolgreicher Therapie zu Langzeitkomplikationen führen: z.B. kann Mittelohrausfluss nach einer akuten Mittelohrentzündung mehrere Wochen oder Monate andauern und dadurch bei Kleinkindern zu Defizienz in der Sprachentwicklung und kognitiven Fähigkeiten führen. Daher ist die Entwicklung von Vakzinen auch in diesem Bereich von großer Bedeutung. Zur Zeit werden mehrere Oberflächenstrukturen als eventuelle Vakzin-Kandidaten untersucht: Außenmembranproteine, LOS und Pili. Das LOS ist wegen seiner Heterogenität nicht die ideale Wahl, kann aber als Träger eingesetzt werden. Viele der Außenmembranproteine besitzen stark immunogene Eigenschaften, aber die Tatsache, dass viele der Proteine einen starken „antigenischen drift“ aufweisen, erschwert die Suche nach den geeigneten Kandidaten. Als hochkonserviert und immunogen haben sich bisher P4, P6, PCP, D15 und Hpd erwiesen. Die von diesen Proteinen induzierten Antikörper weisen hohe Kreuzreaktivität nicht nur bei NTHi, sondern auch bei bekapselten Stämmen auf. Die P4/PCP und P6/PCP Kombinationen zeigen einen synergistischen bakteriziden Effekt, was darauf hindeutet, dass Vakzine mit mehreren Außenmembranproteinen effektiver sind und eine breitere Spezifität aufweisen (Green et al., 1991). Auch LKP-Pili (lange, dicke und haemagglutinierende Pili) und ebenso einige der Proteine, die mit der Außenmembran assoziiert sind, wie NadN und HMW1/2 werden als Vakzine-Kandidaten untersucht. Die anti-LKP und anti-HMW-Antikörper erwiesen sich als protektiv gegen NTHi im Chinchilla-Modell für Otitis Media, allerdings unterliegen diese der Phasenvariation, was sie zu ungeeigneten Vakzine-Kandidaten macht (Brinton et al., 1989; Barenkamp et al., 1996). NadN, ein hochkonserviertes, Außenmembran-assoziiertes, periplasmatisches Protein, induziert die Produktion von kreuzreaktiven, bakteriziden

Antikörpern gegen bekapselte und NTHi Stämme. Die passive Immunisierung der 5-6 Tagen alten Ratten mit NadN-Antiserum führte zu einer 10x Reduktion der Bakteriämie (Zagursky et al., 2000).

5. Biosynthese und Recycling von NAD^+

5.1. Die biologische Bedeutung von NAD^+

NAD^+ ist bei allen lebenden Organismen ubiquitär und essentiell. NAD^+ gehört zu der Gruppe der Nikotinamid-Nukleotiden (Pyridin-Nukleotiden). Es besteht aus einem Nikotinamid-Ring, der mit Ribose über eine N-glykosidische Bindung verknüpft ist, die wiederum über eine Pyrophosphatbindung mit Adenosin gekoppelt ist, so dass sich für NAD^+ folgende Strukturformel ergibt:

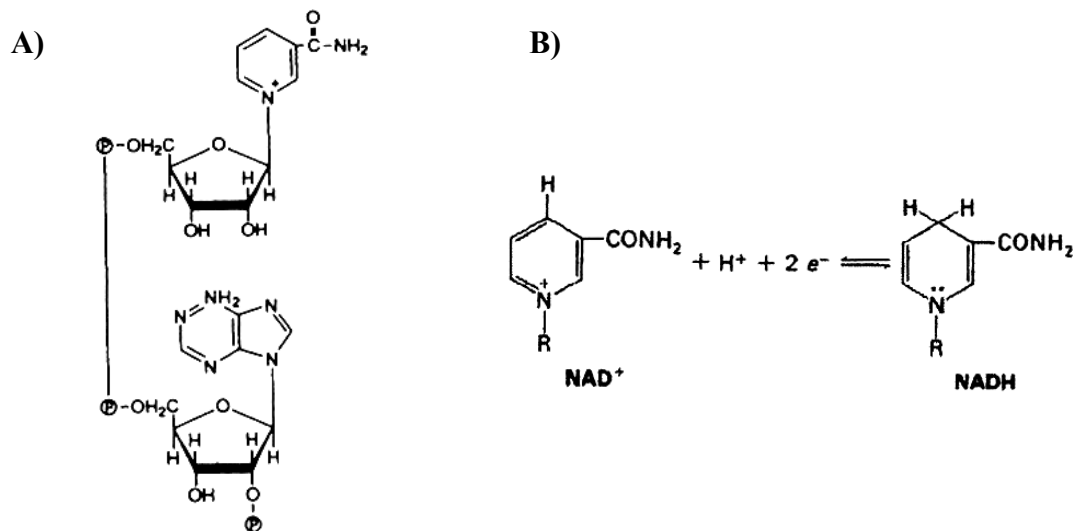


Abb. 2: (A) Strukturformel von NAD(P)^+ ; (B) Reduktion von NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$. Übernommen aus Zubay et al., 1998.

NAD^+ ist eine der zwei koenzymatischen Formen des Nikotinamids. Die andere ist NADP^+ , das sich vom NAD^+ durch die Anwesenheit einer Phosphatgruppe am C2-Atom des Adenosylrestes unterscheidet.

Die Bedeutung von NAD^+ für lebende Organismen liegt in seiner Funktion als zentraler Träger von Reduktionsäquivalenten (Elektronen). Um Zellbestandteile neu synthetisieren zu können sind chemotrophe Organismen auf ständige Energiezufuhr angewiesen. Diese Energie wird durch Oxidation von Nahrungsstoffen in der Glykolyse, dem anschließenden

Citratzyklus und durch die Oxidation von Fettsäuren gewonnen. Dabei nimmt der reaktive Nikotinamid-Ring des NAD^+ die Elektronen und Protonen von den zu oxidierenden Substraten auf und wird dabei zu NADH reduziert (Abb. 2B). NADH diffundiert oder wird an die Membran transportiert und gibt die Elektronen über die Elektronentransportkette, einer Reihe hintereinander geschalteten Proteinkomplexen, die aus Flavinen, Cytochromen und Ubiquinonen besteht, an einen endständigen Elektronenakzeptor weiter (Zubay et al., 1998). Bei aerober Atmung ist dies O_2 , bei anaerober Atmung sind es die Endprodukte der Gärung. Bei der Reoxidation von NADH wird Energie freigesetzt, die anschließend für die Ausbildung eines Protonengradienten an der Membran verwendet wird, was letztendlich die Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat möglich macht. Die Kopplung der ATP-Synthese an den Elektronentransport nennt man oxidative Phosphorylierung. ATP stellt den universellen Überträger chemischer Energie zwischen den katabolischen und anabolischen Reaktionen dar. Während NAD^+ bei den katabolischen (Abbau) Reaktionen als Elektronenträger funktioniert, wird in den anabolischen (synthetischen) Reaktionen diese Funktion von NADP^+ übernommen.

Bei einigen Enzymen (z. B. Epimerasen, Aldolasen) funktioniert NAD^+ auch als Coenzym. Das NAD^+ ist an das Enzym gebunden und oxidiert vorübergehend die Alkoholgruppe des Substrats zu einer Carbonylgruppe, wodurch neben NADH ein reaktives Zwischenprodukt entsteht, das weiter von dem eigentlichen Enzym verändert wird. Im letzten Schritt wird die Carbonylgruppe des Substrats durch das vorübergehend entstandene NADH wieder zur Hydroxylgruppe reduziert.

Im Metabolismus der Zelle spielt NAD^+ eine weitere Rolle als Substrat für die Synthese und Reparatur von DNS durch die prokaryotische DNS-Ligase und für die Modifikation von Proteinen durch ADP-Ribosyltransferasen. Die ADP-Ribosylierung von Proteinen wurde bei Phagen, Bakterien und eukaryotischen Zellen identifiziert, wo es eine wichtige regulatorische Rolle spielt. Durch die ADP-Ribosylierung verändert der T4 Phage die DNS-Polymerase so, dass sie eine Spezifität für die T4 Gene aufweist (Rohrer et al., 1975). Viele pathogene Bakterien setzen Toxine ein, die via ADP-Ribosylierung bestimmte regulatorische Wirtsproteine beeinflussen, wobei NAD^+ als ADP-Ribosyldonor fungiert. Ein Beispiel dafür ist das Cholera-Toxin. Das Toxin wird in die eukaryotische Zelle aufgenommen und aktiviert dort die membrangebundene Adenylatcyclase durch die ADP-Ribosylierung der α_s -Untereinheit des GTP-hydrolysierenden Proteins ($\text{G}\alpha_s$). Die Folge ist ein ständig erhöhter cAMP-Spiegel, der zu Ionen-Imbalance im Darmlumen führt, der Ursache von schwerer Diarrhoe.

Bei der Biosynthese von NAD^+ entsteht ein Zwischenprodukt, das Nikotinsäure-Mononukleotid (NAMN), das für die Synthese von Cobalamin (Vitamin B_{12}) unter anaeroben Bedingungen benötigt wird (Jeter et al., 1984).

Die Tatsache, dass NAD^+ und NADP^+ zusammengenommen einen direkten Einfluss auf fast alle Reaktionen im Metabolismus einer Zelle haben, führt dazu, dass auch kleinere Schwankungen in deren Konzentration (0,8 mM für NAD^+ ; 0,02 mM für NADH ; 0,05 mM für NADP^+ und 0,15 mM für NADPH) enorme Auswirkungen auf die Physiologie und Wachstumsfähigkeit der Zelle haben (Wimpenny et al., 1972; Bochner et al., 1982). Im nächsten Kapitel wird auf die Biosynthese von NAD^+ und die Regulationmechanismen in Bakterien am Beispiel von *E. coli* und *Salmonella typhimurium* (genaue Bezeichnung: *Salmonella enterica* sv. Typhimurium) eingegangen (siehe Penfound und Foster, 1996). Anschließend werden die Besonderheiten des NAD^+ -Stoffwechsels in *H. influenzae* vorgestellt.

5.2. NAD^+ Biosynthese und Turnover

Die meisten Organismen sind in der Lage NAD^+ selbst zu synthetisieren (*de novo* Synthese) oder Vorstufen aufzunehmen bzw. Abbauprodukte wiederzuverwerten (Pyridin-Nukleotid-Zyklen; PNC's). Bei Eukaryoten beginnt die NAD^+ *de novo* Synthese mit dem Abbau von Tryptophan zu Quinolinat, welches über 3 weitere enzymatische Schritte letztendlich zu NAD^+ wird. Als weitere Substrate für die NAD^+ Synthese können auch Nikotinamid (Nam) und Nikotinsäure (NA) dienen. Bis vor kurzem wurde davon ausgegangen, dass die *de novo* Synthese ausgehend vom Tryptophan bei Prokaryoten nicht vorhanden ist, aber kürzlich konnte in mehreren Bakterienspezies (*Streptomyces antibioticus*, *Cyanidium caldarium*, *Xanthomonas pruni*, *Karlingia rosea*) auch dieser NAD^+ -Syntheseweg nachgewiesen werden (Kurnasov et al., 2003). NAD^+ Biosynthese bei Bakterien wurde am detailliertesten an *E. coli* und *S. typhimurium* untersucht. Die *de novo* Biosynthese von NAD^+ beginnt bei diesen Bakterien mit L-Aspartat (Yanofsky et al., 1954), dass von dem „*nadA-nadB*“ Enzymkomplex zu Quinolinat (QA) umgewandelt wird. Das Genprodukt von *nadB*, eine Flavoprotein L-Aspartat Oxidase, oxidiert Aspartat zu einem instabilen Zwischenprodukt, das durch die Quinolinat-Synthase (*nadA*-Genprodukt) mit Hilfe von Dihydroxyacetonphosphat weiter zu Quinolinat kondensiert wird (Suzuki et al., 1973). Die *NadB*-Aspartatoxidase stellt einen der Hauptstellen in der Regulation des NAD^+ -Stoffwechsels dar. Es unterliegt einer Feedback-Inhibierung durch

NAD⁺ und zusätzlich wird die Transkription von *nadA* und *nadB* streng reguliert (Nasu et al., 1982; Foster et al., 1987).

Eine QA-Phosphoribosyltransferase (*nadC*-Genprodukt) decarboxyliert QA und überträgt den Ribose-5-Phosphat-Rest von PRPP auf QA, wodurch Nikotinsäure-Mononukleotid (NAMN) entsteht (Hughes et al., 1991). NAMN ist der Punkt im NAD⁺-Stoffwechsel, wo *de novo*-Biosynthese und Recyclingwege aufeinander treffen. Im weiteren Verlauf wird NAMN von der NadD-Adenylytransferase adenylyliert, so dass Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid entsteht, welches wiederum von NadE (NAD Synthase) zu NAD⁺ amidiert wird (Spencer und Preiss, 1967). Sowohl *nadD* als auch *nadE* sind essentiell für die Lebensfähigkeit der Zelle (siehe Abb. 3).

Obwohl NAD⁺ im Verlauf der Oxidationsreaktionen via Atmungskette neu regeneriert wird, ist in der Zelle ein ständiger NAD⁺-Turnover zu beobachten: seine Halbwertszeit unter aeroben Bedingungen liegt bei 90 min (Park et al., 1989). Die Prozesse, bei welchen NAD⁺ abgebaut wird sind noch nicht genau geklärt, aber die Wiederverwertung der dabei entstehender Abbauprodukte, vor allem derjenigen die den energetisch „teueren“ Nikotinamid-Ring besitzen, ist für die Zelle energetisch wesentlich günstiger als die *de novo* Synthese von NAD⁺. Bei *E. coli* und *S. typhimurium* sind drei Recycling-Wege, so genannte Pyridin-Nukleotid-Zyklen (PNCs) bekannt.

Das Recycling von NAD⁺ beginnt meistens mit dem enzymatischen Abbau von NAD⁺ zu NMN. Einer der Enzyme, die NAD⁺ zu NMN spalten können, ist die bakterielle NAD⁺-Ligase. Die Energie, die aus der Spaltung der NAD⁺-Pyrophosphat-Bindung freigesetzt wird, benutzt die Ligase um die Nicks in der doppelsträngigen DNS aufzufüllen. Diese Reaktion ist bei der Reparatur, Replikation und Rekombination von DNS wichtig. Allerdings kann die Aktivität der Ligase alleine nicht für den beobachteten NAD⁺-Turnover verantwortlich sein, da der Austausch der NAD⁺-Ligase durch die ATP-abhängige T4-Ligase den NAD⁺-Turnover in der Zelle nicht vermindert (Park et al., 1989). Auch die Deletion der membrangebundenen PnuE-NAD⁺-Pyrophosphatase, die an der Verwertung von extrazellulärem NAD⁺ beteiligt ist, hatte keine Auswirkung auf den NAD⁺-Turnover (Park et al., 1988). Eine Rolle beim Turnover könnten auch NAD⁺-abhängige Proteinmodifikationen spielen. Es wurde auch beobachtet, dass NAD⁺-Turnover unter aeroben Bedingungen 3-4 Mal höher ist als unter anaeroben. Daher ist es auch möglich, dass bisher unbekannte NAD⁺-abhängige Proteine, die die Membran oder DNS vor Schädigung durch Sauerstoff schützen, am Turnover beteiligt sind (Park et al., 1989).

Von den drei beschriebenen Recycling-Routen, sind PNC IV und V vorwiegend für die intrazelluläre Wiederverwertung und PNC VI für die Verwertung von Pyridinen aus der Umwelt zuständig. 80-90% der intrazellulären Pyridin-Wiederverwertung findet über den PNC IV (besteht aus 4 Reaktionsschritten, daher IV) statt. Nach der Spaltung von NAD^+ zu NMN durch die NAD^+ -Pyrophosphatase, wird NMN von der NMN-Aminohydrolase (*pncC*-Genprodukt) zu NAMN deamidiert, aus welchem letztendlich via NadD-NadE, die auch an der *de novo* Synthese beteiligt sind, NAD^+ synthetisiert wird (Hillyard et al., 1981). PNC V, das aus 5 Reaktionsschritten besteht, beginnt mit der durch eine NAD^+ -Glykohydrolase katalysierte Spaltung von NAD^+ zu Nam und ADP-Ribose. Das Nam wird durch die Nam-Aminohydrolase (*pncA*-Genprodukt) zu NA deamidiert und durch die NA-Phosphoribosyltransferase zu NAMN aufgebaut (Foster und Holley, 1981). Der PNC VI braucht 6 Reaktionen um NAD^+ zu degradieren und wieder aufzubauen. Dabei wird das durch die Spaltung von NAD^+ entstandene NMN mittels einer NMN-Glykohydrolase zu Nam abgebaut (Andreoli et al., 1972). Nam wird dann wieder wie im PNC V beschrieben zu NAMN aufgebaut.

Die NMN-Glykohydrolase wird durch $\text{NAD}^+(\text{H})$, GTP, GMP, AMP und ADP-Ribose feedback-inhibiert und stellt eventuell einen gemeinsamen Kontrollpunkt zwischen PNC IV und VI, dem intra- und extrazellulären Recyclingweg dar (Foster, 1981). Ein weiterer Regulationspunkt ist die NA-Phosphoribosyltransferase (*pncB*-Genprodukt), die PNC V und VI mit dem *de novo* Weg verbindet, indem es NAMN aus NA und Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) synthetisiert. Der *pncB*-Locus unterliegt einer Regulation durch das NAD^+ , so dass bei hohen NAD^+ -Konzentrationen in der Zelle das überschüssige NA ausgeschieden werden kann (Foster et al., 1979). *pncB* bildet zusammen mit *nadA* und *nadB*, Gene dessen Produkte die *de novo* Synthese einleiten, das so genannte *nad*-Regulon. Sie unterliegen einer transkriptionalen Kontrolle durch das NadR-Protein, das zusammen mit NAD^+ als Korepressor an die Promotorbereiche der drei Gene binden kann (Penfound und Foster, 1999). Der *nadA* und *nadB*-Promotor hat zwei so genannte NAD-Boxen an die NadR/ NAD^+ Komplex bindet. Diese überlappen sich mit der -10 Region der RNA-Bindestelle und Rbs („ribosome binding site“-)Region. *pncB* dagegen hat nur eine vollständige NAD-Box in der Rbs-Region, was mit der Beobachtung übereinstimmt, dass *pncB* im Vergleich mit *nadA/nadB* weniger streng reguliert wird (Penfound und Foster, 1999). Dadurch haben die energetisch günstigere PNCs Vorrang gegenüber der *de novo* Biosynthese.

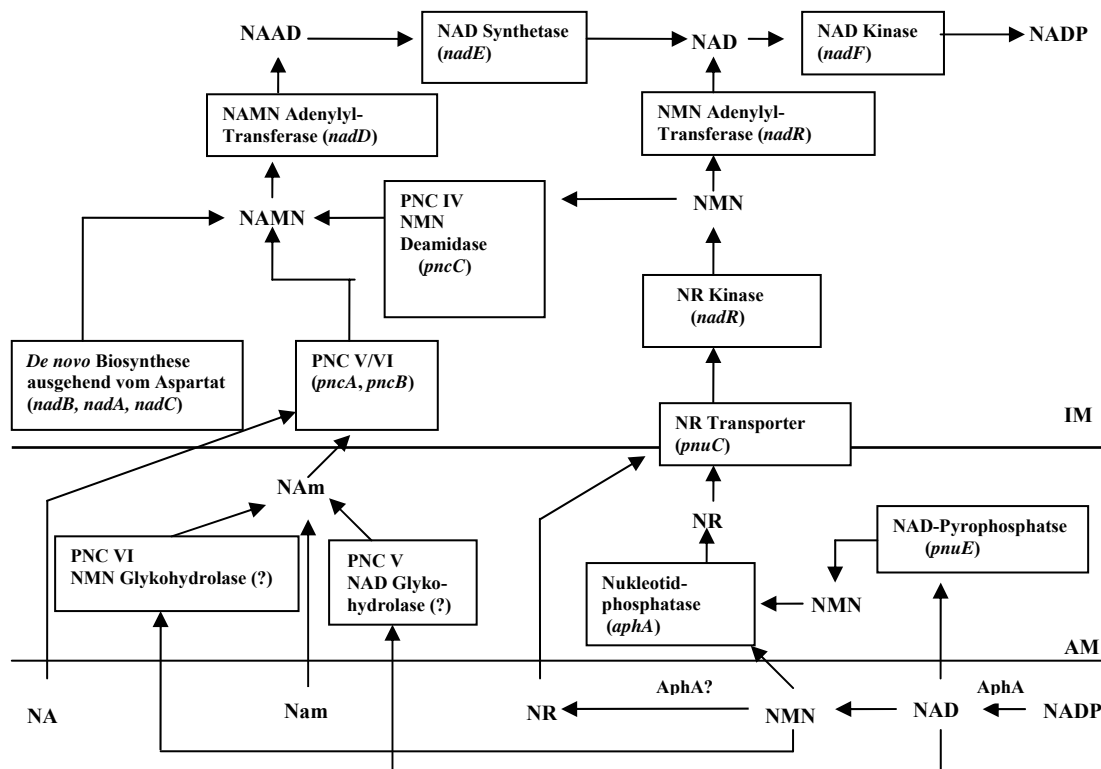


Abb. 3: NAD⁺-Stoffwechsel bei *E. coli* und *S. typhimurium*. Enzyme, für die das entsprechend kodierende Gen noch nicht identifiziert ist, sind mit (?) gekennzeichnet. IM: Innere Membran; AM: Äußere Membran.

5.3. Die Aufnahme von NAD⁺

E. coli und *S. typhimurium* können auch exogene Pyridine wie Quinolinat (QA), Nikotinsäure (NA), Nikotinamid (Nam), Nikotinamidribosid (NR), NMN und NAD⁺(P) verwerten. An die PNCs gekoppelte Aufnahme der exogenen Pyridine ist für die Zelle mit weniger Energieverbrauch verbunden als die *de novo* Biosynthese von NAD⁺. Das NAD⁺ wird aber nicht intakt in die Zelle aufgenommen, sondern muss vorher zu transportfähigen Vorstufen abgebaut werden. Dabei können zwei verschiedene Wege benutzt werden: in der ersten Route wird NAD⁺ durch die NAD⁺-Pyrophosphatase (*pnuE*-Genprodukt) zu NMN gespalten. NMN wird dann durch eine periplasmatische NMN-Glykohydrolase zu Nam abgebaut und dieses kann dann als freie Base in die Zelle aufgenommen werden.

In der zweiten Route wird das NAD⁺ auch via PnuE zu NMN gespalten. NMN wird dann durch AphA-Phosphatase zu NR dephosphoryliert (Grose et al., 2005), dessen Transport in die Zelle vom PnuC-Transporter vermittelt wird. Ursprünglich wurde PnuC als NMN-Transporter beschrieben, aber kürzlich konnte gezeigt werden, dass NR das eigentliche Substrat ist (Sauer et al., 2004). Das NadR Protein, das ursprünglich als Repressor beschrieben wurde, spielt auch eine Rolle beim Transport. Zusätzlich zu der

regulatorischen Funktion, besitzt dieses Protein zwei weitere enzymatische Funktionen: Nikotinamidribosid-Kinase (RNK) und NMN-Adenylyltransferase (NMNAT) (Raffaelli et al., 1999; Singh et al., 2002; Kurnasov et al., 2002). Auch die Rolle des NadR bei dem PnuC vermittelten Transport von NR wurde neulich revidiert: zunächst dachte man, dass bei niedrigen NAD^+ -Konzentrationen NadR mit ATP ein Komplex bildet und dann als PnuC-Aktivator funktioniert. Neuere Daten deuten darauf hin, dass NadR die PnuC-Aktivität nicht reguliert, sondern direkt am Transport teilnimmt, indem es NR zu NMN phosphoryliert und dadurch in der Zelle festhält. Auf die Struktur von NadR und dessen Funktion wird später im Detail eingegangen.

5.4. *Pasteurellaceae* und Faktor V (NAD^+)

Die Familie der *Pasteurellaceae* zeichnen sich unter anderem auch dadurch aus, dass ihr die meisten Gene für die NAD^+ *de novo* Biosynthese und PNC fehlen. Mitglieder dieser Familie müssen Pyridine aus der Umwelt aufnehmen und zu NAD^+ umwandeln (Niven und O'Reilly, 1990). Dabei werden zwei Gruppen von *Pasteurellaceae* unterschieden: die NAD^+ -abhängigen und die NAD^+ -unabhängigen. Die NAD^+ -unabhängigen *Pasteurellaceae* können neben $\text{NAD}^+(\text{P})$, NMN und NR zusätzlich auch Nam verwerten, das in den meisten komplexen Medien vorhanden ist. Sie besitzen eine Nam-Phosphoribosyltransferase, die aus Nam und Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) unter ATP Verbrauch NMN synthetisiert, welches dann zu NAD^+ adenylyliert wird. Innerhalb des Genus *Haemophilus* gehören *H. ducreyi*, *H. aphrophilus* und *H. haemoglobinophilus* zu den NAD^+ -unabhängigen. In *H. ducreyi* konnte ein Plasmid identifiziert werden, das das *nadV*-Gen trägt (Martin et al., 2001). *nadV* kodiert für eine Nam-Phosphoribosyltransferase. Die Übertragung dieses Gens bzw. Plasmids in *H. influenzae* vermittelte auch dieser Spezies die Fähigkeit auf Nam zu wachsen. Bei anderen NAD^+ -unabhängigen *Pasteurellaceae* konnte dieses Gen gefunden werden, allerdings eher auf dem Chromosom als auf Plasmiden. In NAD^+ -abhängigen *Pasteurellaceae* und in Bakterienfamilien, die die Gene für die *de novo* Synthese und PNC besitzen (*Enterobacteriaceae* und *Bacillaceae*), konnte über Sequenzvergleiche kein entsprechendes Homolog gefunden werden (Martin et al., 2001).

NAD^+ -abhängige *Pasteurellaceae*, zu welchen auch *H. influenzae* zählt, können $\text{NAD}^+(\text{P})$, NMN und NR verwerten, d. h. Substanzen, die eine intakte Nikotinamid-Ribose Verbindung haben (O'Reilly und Niven, 1986).

In unserer Arbeitsgruppe wurde kürzlich das NAD^+ -Aufnahmesystem in *H. influenzae* charakterisiert. Das aktuelle Modell ist in der Abb. 4 dargestellt.

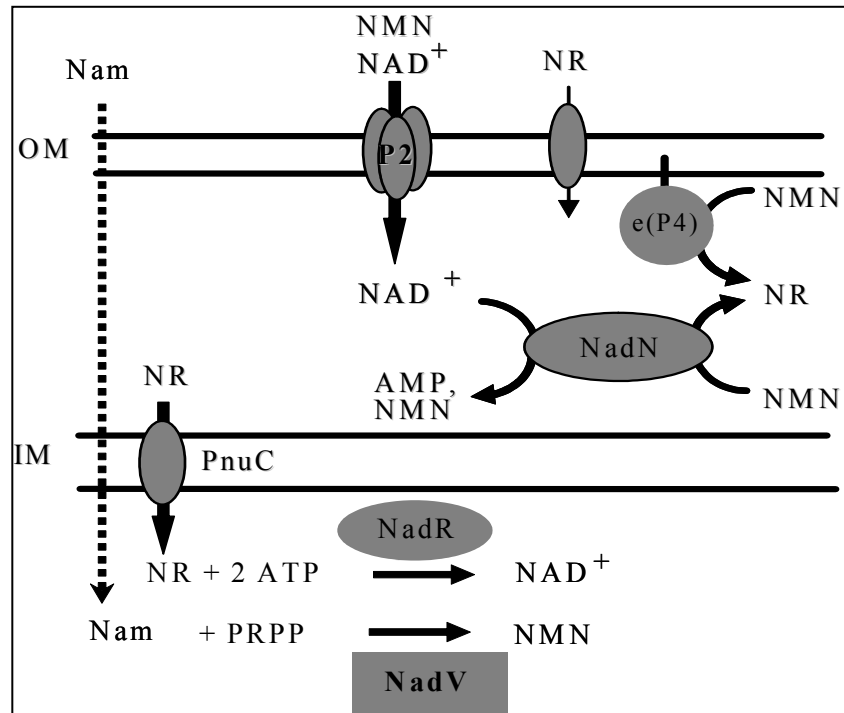


Abb. 4: Modell für die Aufnahme und Verwertung des Faktor V (NAD^+) in *H. influenzae* und *Pasteurellaceae*. Die NadV-abhängige NMN-Synthese aus Nam und PRPP (gestrichelte Linie) ist nur bei NAD^+ -unabhängigen *Pasteurellaceae* vorhanden. In *H. influenzae* fehlt dieser Weg.

Die eigentliche Substanz, die über die innere Membran ins Cytoplasma aufgenommen wird, ist das NR, d. h. alle anderen Faktor V Quellen müssen zuerst zu NR degradiert werden um aufgenommen werden zu können.

Im Medium bzw. in der Umwelt vorhandene Faktor V Quellen wie $\text{NAD}^+(\text{P})$, NMN und NR sind hydrophil, womit die einfache Diffusion als Aufnahmemöglichkeit über die Außenmembran eher unwahrscheinlich ist. In der Tat konnte für NAD^+ und NMN gezeigt werden, dass das OmpP2 den Transport ins Periplasma erleichtert. Obwohl ursprünglich das OmpP2 als allgemeines Porin mit ca. 1400 Da Durchlässigkeit beschrieben wurde, zeigt OmpP2 in „black lipid bilayer“ Experimenten eine Spezifität für NAD^+ und NMN ($K_s \sim 8 \text{ mM}$ bzw. 4 mM in $0,1 \text{ M KCl}$), aber nicht für NADH , NR, ATP, ADP, AMP, GTP und GMP. Die OmpP2 Knockout-Mutante weist eine signifikante Defizienz bei der Aufnahme von ^{14}C markiertem NAD^+ und NMN auf. Die Wachstumsfähigkeit ist generell stark beeinträchtigt, auch in Anwesenheit von NR, was darauf hindeutet, dass OmpP2 auch

beim Transport von anderen Substanzen beteiligt ist (Andersen et al., 2003). Ein Porin, das eine Spezifität für NR aufweist, ist bisher nicht identifiziert worden.

An der enzymatischen Degradation von $\text{NAD}^+(\text{P})$ und NMN zu NR sind zwei Proteine beteiligt: Außenmembranprotein e(P4) und das periplasmatische Protein NadN. e(P4), kodiert von dem *hel*-Gen, ist eine saure Phosphatase, die NADP^+ und NMN zu NAD^+ bzw. NR dephosphoryliert, wobei NMN das bevorzugte Substrat ist. Auch AMP stellt ein Substrat für e(P4) dar und wird dabei zu Adenosin und Pi gespalten. e(P4) ist durch Adenosin inhibierbar (Reilly et al., 1999; Reidl et al., 2000; Kemmer et al., 2001). Das e(P4) kann sowohl an der Zelloberfläche als auch im Periplasma NADP^+ und NMN dephosphorylieren. Im Periplasma kann NAD^+ von NadN, einer NAD^+ -Pyrophosphatase, zu NMN und Adenosin gespalten werden. NadN wird vom *nadN*-Gen kodiert. Bei den NTHi Stämmen wurde es zuerst als NucA-5'-Nukleotidase identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass beide Proteine identisch sind, d. h. NadN besitzt sowohl eine NAD^+ -Pyrophosphatase als auch eine NMN-5'-Nukleotidase Aktivität (Reidl et al., 2000; Zagursky et al., 2000; Kemmer et al., 2001). Die Deletion dieser zwei Proteine, e(P4) und NadN, führt zu verminderter Wachstumsfähigkeit mit NMN bzw. NAD^+ als Faktor V-Quelle, und eine Doppelmutante kann nur noch mit NR als Faktor V-Quelle wachsen.

NR wird vom Periplasma ins Cytoplasma via PnuC transportiert. PnuC ist ein integrales Membranprotein, mit 8 Transmembrandomänen, wobei sowohl der N- als auch C'-Terminus im Cytoplasma liegen. *hiPnuC* weist nur etwa 27% Homologie zu PnuC aus *E. coli* bzw. *S. typhimurium* auf. Obwohl PnuC bei *S. typhimurium* ursprünglich als NMN-Transporter beschrieben wurde, konnte kürzlich gezeigt werden, dass dies vermutlich eine Fehlinterpretation war, und dass auch *ec/stPnuC* ein NR spezifischer Transporter ist (Sauer et al., 2004). *pnuC*-Knockout Mutanten in *H. influenzae* zeigten verminderte Wachstumsfähigkeit bei niedrigen NR Konzentrationen (0,05 μM), allerdings nicht bei höheren (0,5 μM), was zu der Annahme führt, dass bei *H. influenzae* noch ein zweiter, eventuell niederaffiner NR-Transporter vorhanden ist. Die NR-Aufnahme (gemessen an der Akkumulation von ^{14}C -Label) betrug bei der *pnuC*-Deletionsmutante nur noch 1-2% des Wildtyps. Auch wenn unter Laborbedingungen PnuC-Deletionsmutanten lebensfähig waren, so erwies sich dieser Protein *in vivo* als essentiell. In Infektionsmodellen mit neugeborenen Ratten konnte *pnuC*-Deletionsmutante nicht überleben (Herbert et al., 2003). Das von PnuC transportierte NR wird dann im Cytoplasma von NadR zu NMN und anschließend NAD^+ synthetisiert. NadR (HI0763) ist bei *H. influenzae* ein essentielles Gen. Dies wurde von mehreren Gruppen indirekt gezeigt, indem keine

Transposoninsertionen im *nadR*-Locus erzeugt werden konnten (Akerley et al., 2002; Kurnasov et al., 2002). Erst kürzlich wurden sowohl Kristallstruktur von *hiNadR* als auch dessen Aktivitäten als NR-Kinase (RNK) und NMN-Adenylyltransferase (NMNAT) charakterisiert (Singh et al., 2002; Kurnasov et al., 2002). Kurnasov et al. haben auch *stNadR* biochemisch charakterisiert. Dabei zeigten sich Unterschiede zwischen *hiNadR* und *stNadR*. *stNadR* ist ein trifunktionelles Protein: seine Funktion als transkriptionaler Repressor der *de novo*-Synthese Genen wird durch eine Helix-Turn-Helix-Domäne im N'-terminalen Bereich ermöglicht. Zusätzlich hat es auch zwei weitere enzymatische Aktivitäten: im zentralen Bereich des Proteins befindet sich die Nikotinamid-Mononukleotid-Adenylyltransferase (NMNAT)-Aktivität und am C'-Terminus die Ribosyl-Nukleotid-Kinase (RNK)-Aktivität. Im Gegensatz zu *hiNadR* ist *NadR* bei *E. coli* und *S. typhimurium* nicht essentiell. *hiNadR* hat keine erkennbare HTH-Domäne, ist also ein bifunktionelles Protein, mit N'-terminaler NMNAT- und C'-terminaler RNK-Domäne.

Die NMNAT-Domäne beider Proteine besitzt eine konservierte ATP-Bindestelle, das sogenannte (H/T)IGH-Motif, das für die Proteine der Nukleotid-Transferasen-Familie charakteristisch ist. Punktmutationen in konservierten Histidin-Stellen des (H/T)IGH-Motifs führten zum vollständigen Verlust der NMN-Adenylyltransferase-Aktivität, hatten aber keine Auswirkung auf die RNK-Aktivität (Kurnasov et al., 2002). Die C'-terminale RNK-Domäne besitzt auch ATP-Bindestellen, die Walker A und B Motife, die charakteristisch für die P-Loop-Kinase-Familie sind.

Die spezifische NMNAT-Aktivität des *hiNadR* ist ca. 200 x höher als die des *stNadR* oder *ecNadR* (Raffaelli et al., 1999; Kurnasov et al., 2002), was der jeweiligen Stellung der Enzyme im NAD^+ -Metabolismus entspricht und auch erklärt, warum die *nadD/nadE*-Gene bei *E. coli* und *S. typhimurium* essentiell sind, d. h. nicht durch die *NadR*-Aktivität ersetzt werden können. Auch die katalytische Effizienz von *hiNadR* ist höher als die des *stNadR*: mit NR als Substrat konnte bei *stNadR* NMN als Zwischenprodukt in der HPLC beobachtet werden, während bei *hiNadR* nur NAD^+ als Endprodukt zu sehen war (Kurnasov et al., 2002). Allerdings ist die RNK-Aktivität bei *stNadR* höher als bei *hiNadR*. Beide Proteine zeigen eine deutliche Substratpräferenz für NR: für Nikotinsäure, Uracil, Cytosin und Thiazofurin konnte keine Phosphorylierung nachgewiesen werden.

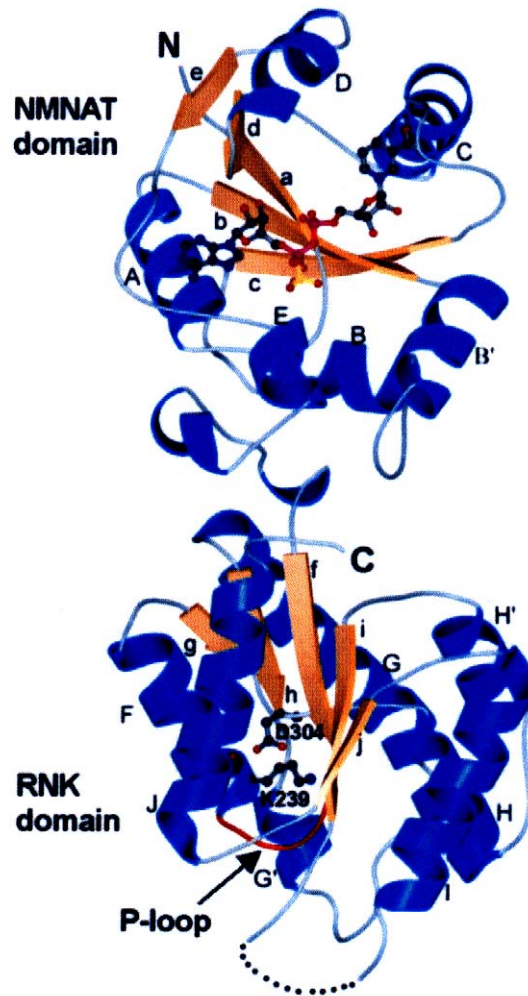


Abb. 5: Darstellung des *hiNadR*-Monomers (übernommen aus Singh et al., 2002). Die β -Stränge (a-j) sind orange und die Helices (A-J) sind blau. Die gebundenen NAD^+ - und Sulfatmoleküle sind im „ball-and-stick“ Modell dargestellt. Die AS der RNK-Domäne, die Teil des aktiven Zentrums sind, (Lys^{239} im Walker A Motif und D^{304} im Walker B Motif) sind auch hervorgehoben.

In der derzeitigen *hiNadR* Kristallstruktur sind die Stellen 57-345 und 357-411 aufgelöst, exprimiert wurde das Protein von dem Met 52, welches als eigentlicher Start-Codon vermutet wird (Singh et al., 2002).

Die ersten 5 AS, Loop zwischen den AS 346 und 356 und die letzten 10 AS am C'-Terminus sind in der Kristallstruktur nicht geordnet („disordered“). Es sind auch zwei NAD^+ - und 5 Sulfat-Molekülen im Modell vorhanden, allerdings obwohl 3 mM ATP in der Lösung vorhanden war, konnte kein ATP Molekül lokalisiert werden, so dass die derzeitige Struktur als *hiNadR*- NAD^+ Komplex betrachtet werden muß.

Die Kristallstruktur-Studien (Singh et al., 2002) zeigten beim *hiNadR*-Monomer zwei räumlich klar voneinander getrennte Domänen, die über ein Loop miteinander verbunden

sind (siehe Abb. 5). Es scheint, dass die zwei katalytischen Domänen keine direkte Interaktionen eingehen (cross-talk). Die aktive Form ist vermutlich ein Tetramer. Das NAD⁺-Molekül, das im aktiven Zentrum der NMNAT-Domäne zu finden ist, weist mehrere spezifische Interaktionen zwischen dem NAD⁺ und dem Protein auf. An der Erkennung und Bindung des Adenin-Nukleotids von NAD⁺ sind das (H/T)IGH-Motif, der Loop vor dem (H/T)IGH, das Ende des ersten β -Strangs, N'-Terminus der E-Helix und der Loop zwischen dem e- β -Strang und der E-Helix beteiligt. Der Nikotinamid-Teil des NAD⁺ wird von dem Loop das den c- β -Strang und die C-Helix verbindet erkannt, daher wird dieser Loop „nicotinamid recognition loop“ genannt. Auch an der RNK-Domäne konnte NAD⁺ Bindung beobachtet werden, allerdings außerhalb des aktiven Zentrums. Die an den spezifischen Interaktionen beteiligte AS sind: Tyr²⁹², W²⁵⁶ und Lys¹²⁶. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass diese Stelle eventuell der „Feedback“-Inhibition dient.

Obwohl die derzeitige *hiNadR* Kristallstruktur keine Liganden in dem aktiven Zentrum der RNK-Domäne hat, konnten durch die Vergleiche mit der Hefe-Thymidylat-Kinase (TMK)-P¹-(5'-Adenosyl) P⁵-(5'-Thymidyl) Pentaphosphat-Komplex (Lavie et al., 1998) die Lokalisation der aktiven Stellen abgeleitet werden. Die Walker A und B Motife der RNK von *hiNadR* haben ähnliche räumliche Anordnung wie bei der TMK. Die Position der konservierten AS Lys²³⁹ (Walker A) und Asp³⁰⁴ (Walker B) stimmt mit der Position der in der TMK-Struktur entsprechenden AS Lys¹⁸ und Asp⁹³ überein. Deren Position deutet auf die potentielle ATP und NR Bindestellen in der RNK-Domäne von *hiNadR* hin. Walker A und B Motife sind schon seit längerem beschrieben worden und sind an der Bindung und der Hydrolyse von ATP beteiligt (Walker et al., 1982). Ein drittes an der Substratbindung beteiligtes Motif, die sogenannte „LID“-Domäne, die bei der RNK strukturell verwandten Kinasen wie TMK, Uridylat-Kinase und Adenylat-Kinase vorkommen, konnte in der *hiNadR*-RNK Kristallstruktur nicht aufgelöst werden. Für die LID-Domäne konnte gezeigt werden, dass Substratbindung drastische Konformationsänderung bewirkt (Müller et al., 1996; Yan et al., 1999). Es wird angenommen, dass bei der TMK drei LID-Konformationen existieren: (i) eine offene Konformation in der Abwesenheit der Substrate, (ii) partiell geschlossener Zustand, wenn nur ein Substrat gebunden ist; und (iii) geschlossener Zustand, wenn beide Substrate gebunden sind. Zusammengefasst kann ein aktives Zentrum für die RNK-Domäne des *hiNadR* postuliert werden, dass aus den drei Motifen besteht: Walker A, Walker B und die LID-Domäne.

6. Zielsetzung der Arbeit

Obwohl die Faktor V-Abhängigkeit von *H. influenzae* schon seit langer Zeit bekannt ist, wurden die an der Aufnahme beteiligten Enzyme erst kürzlich identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass nur NR über die innere Membran ins Cytoplasma gelangt und dass alle anderen Faktor V-Quellen via e(P4) und NadN zu NR degradiert werden bevor sie aufgenommen werden können. Als NR-Transporter wurde das PnuC-Protein identifiziert. Wie NR im Cytoplasma zu NAD^+ synthetisiert wird, ist auch erst kürzlich geklärt worden: Kurnasov et al., konnten für NadR sowohl eine RNK-Aktivität als auch eine NMNAT-Aktivität *in vitro* nachweisen. Ziel dieser Arbeit war es NadR, insbesondere die RNK-Domäne näher *in vivo* zu charakterisieren.

Es sollte geklärt werden, ob beide NadR-Domänen (NMNAT und RNK) *in vivo* essentiell sind und welche Modifikationen in der RNK-Domäne zum Verlust der Kinase-Aktivität führen. Es sollte auch untersucht werden ob und wie der NR-Transport via PnuC an NadR gekoppelt ist, da für *E. coli* und *S. typhimurium* berichtet wurde, dass bestimmte NadR-Mutationen Effekt auf PnuC bedingten Transport haben.

Im weiteren Verlauf sollte auch der HI0762-Locus hinsichtlich der Beteiligung am NAD^+ -Stoffwechsel untersucht werden. HI0762 bildet bei *H. influenzae* zusammen mit *nadR* ein Operon, was vermuten lässt, dass dessen Genprodukt auch eine Rolle im NAD^+ -Metabolismus spielt.

III Material und Methoden

1. Radiochemikalien, Antikörper, Enzyme und Kits

Radiochemikalien

¹⁴ C-Nikotinamid (Nam)	Amersham Biosciences
¹⁴ C-Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD ⁺)	Amersham Biosciences
³² P-Adenosintriphosphat (ATP)	Amersham Biosciences

Enzyme

DNase I	Applichem
Lysozym aus Hühnereiweiß	Applichem
RNase A	Applichem
TripleMaster DNS Polymerase	Eppendorf
Restriktionsendonukleasen	Invitrogen, New England Biolabs (NEB)
Shrimp Alkaline Phosphatase	USB
Taq DNS Polymerase	NEB und PAN Systems

Molekularbiologische Kits

Nucleobond AX Plasmid purification	Macherey-Nagel
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen
ECL-Hybridisierungskits	Amersham
Roti-nanoquant Protein Assay	Roth
Protino Ni 1000 prepacked column Kit	Macherey-Nagel
QuikChange [®] site-directed mutagenesis Kit	Stratagene
pCR [®] T7 TOPO [®] TA Expression Kit	Invitrogen
pGEM [®] -T easy System	Promega

Antikörper

Maus-anti-Penta-His, monoklonal	Qiagen
Ziege-anti-Maus-HRP*-Konjugat, monoklonal	Dianova

Ziege-anti-Kaninchen-HRP*-Konjugat, monoklonal	Dianova
NadR-Antiserum, Kaninchen	diese Arbeit
Maus-anti-GST, monoklonal	Santa Cruz

*HRP : horse radish peroxidase = Merrettichperoxidase

Sonstige Materialien

Dialyseschläuche Spectra/Por	Spectrum Medical Industries
ECL-Hyperfilm	
Falcon 7104 Bottle Top Filter (0,45 µm)	Becton Dickinson
Filterpapier Whatman 3 MM	Millipore
Geltrocknungsfolie	Bio-Rad
Glasperlen (Ø 0,17-0,18 mm)	Braun
1,5 bzw. 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
15 bzw. 50 ml Gefäße	Greiner
Lysing Matrix B, Silikatkügelchen	Q BioGene
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell, Amersham
Nylonmembran	Amersham

2. Geräte und Chemikalien

Alle nicht explizit aufgeführten Chemikalien, Materialien und Geräte wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech, Applichem, BioRad, Eppendorf, Gibco, Oxoid, Greiner, Invitrogen, MWG, New England Biolabs (NEB), Roth und Sigma bezogen oder die Hersteller sind an entsprechender Stelle erwähnt.

Gerät	Hersteller/ Vertrieb
Analysenwaage	Ohaus Navigator, Sartorius
Autoklaven	Fedegari, MM Selectomat S2000
Automatikpipetten	Gilson, Eppendorf
Elektrophoresekammern für Agarose-Gele	BioRad; MWG Biotech
Elektrophoresekammern für PAA-Gele:	
Mini Protean III	BioRad
Protean II Xi Cell	BioRad

Elektroporationsgerät	EQUIBIO (Easyject prima), BioRad (Gene Pulser und Pulse Controller)
ELISA-Reader	BioRad (Microtiterplate Reader Model 450)
Entwickler	AGFA (Curix 60 und Curomix 60)
Feinwaage	Chyo, Sartorius (Kern 770)
Flüssigszintillationszähler TriCarb 1500	Packard
Geldokumentationsanlage	BioRad (GelDoc 2000), Herolab
Geltrockner	BioRad
Hybridisierungsöfen	Hybaid MWG Biotech, Biometra OV5
Inkubator	Heraeus
Kühlzentrifugen	Beckman, Sorvall RC5B und RC5B Plus
Magnetrührer	Jahnke & Kunkel, GLW, Heidolph
Mikrowelle	Privileg, Bauknecht (MW5 1820 Duo)
pH-Meter	WTW pH526 und pH530
Photometer	UNICAM, Pharmacia Biotech (Ultrospec 3000), Hitachi (U-2000)
Schüttler	Kika Labortechnik, Heidolph (Doumax 1030), Biotec-Fischer (Phero-Shaker)
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific (innova 4300), Braun Biotech International (Certomat R/ H)
Semidry-Blotgerät	BioRad (Trans Blot SD)
Sequenzierer (DNA)	Applied Biosystems ABI377
Spannungsgeräte	BioRad (Power Pac 300 und 2000; Power Supply Model 3000Xi und 500/1000), Consort
Tankblotgerät	BioRad
Thermoblock	Liebisch, FALC
Thermocycler	Eppendorf (Mastercycler Gradient), Hybaid (OMN-E), Biometra (T3)
Tischzentrifugen	Heraeus (Biofuge pico, fresco und R15; Megafuge 1,0 und 1,0R)
Transelectronenmikroskop	Zeiss (EM10)
Ultratischzentrifuge	Beckmann (TL-100)
Ultrazentrifuge	Beckmann (L7-65)
UV-Lampe	Herolab UVT 20 LP
UV-Stratalinker	Stratagene (Stratalinker 1800)
Vakuumblotgerät (Transfer DNA)	Pharmacia Biotech (VacuGene XL)
Vakuumverdampfer	Savant (SpeedVac Plus SC110A)
Vortexer	Scientific Industries (Vortex Genie 2), Hartenstein Mixer
Wasserbad	Memmert
Wasserbadinkubatoren	GFL GmbH

Wasserkühlung	Pharmacia Biotech (Multi Temp III)
Zellaufschluss	ThermoSavant (Fast Prep 120), SLM Instrumens/ Thermo Spectronic; French Pressure Cell Press, American Instrument Company

Tabelle 1: Geräte

3. Datenverarbeitung

Zur Analyse von Nukleotid- und Aminosäuren-Sequenzen wurden im allgemeinen Programme verwendet, welche über Expasy- und NCBI-Server (www.expasy.org; www.ncbi.nlm.nih.gov) zugänglich sind, z. B. CDD, Prosite, ClustalW, BLAST etc. Andere verwendete Programme sind unten aufgelistet:

Amplify	Engels, W., USA
DNASTAR	DNASTAR Ltd., London, UK
Operon Prediction	www.microbesonline.org
Oligo 2	

4. Kulturmedien, Agar und Medienzusätze

Für die Herstellung aller Lösungen und Medien wurde entweder Ampuwa (Fresenius Kabi) oder Wasser, welches über eine Filteranlage (Milli-Q-Plus, Millipore) entsalzt und filtriert wurde, verwendet. Medien für die Flüssigkulturen und Agarplatten wurden 20 min bei 120°C autoklaviert. Alle Zusätze, die nicht hitzestabil sind, wurden sterilfiltriert und nach dem Abkühlen der Medien auf ca. 42-50°C zugegeben.

Medien (Firma)	Zusammensetzung
LB (Luria-Bertani)-Medium (Difco), Miller et al., 1972	25 g, ad 1 l H ₂ O, autoklavieren (enthält: 1% Bactotrypton, 0,5% NaCl, 0,5% Hefeextrakt)
BHI (Brain-Heart-Infusion)-Medium (Difco)	44 g, ad 1 l H ₂ O, autoklavieren (enthält: 20% Kalbshirnininfusion, 25% Rinderherzinfusion, 1% Bacto Proteose Pepton, 0,2% Bacto Dextrose, 0,5% NaCl, 0,25% Na ₂ PO ₄)
MIV-Medium Barcak et al., 1999	Lösung 21: 4 g L-Asparaginsäure 0,2 g L-Glutaminsäure

	<p>1 g Fumarsäure 4,7 g NaCl 0,2 ml Tween 80 0,87 g K₂HPO₄ 0,67 g KH₂PO₄ auf pH 7,4 einstellen, ad 1l H₂O, autoklavieren</p> <p>Lösung 22: 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 ad 100 ml H₂O, sterilfiltrieren</p> <p>Lösung 23: 0,1 M CaCl₂, autoklaviert</p> <p>Lösung 24: 0,1 M MgSO₄, autoklaviert</p> <p>Lösung 40: 5% (w/v) vitaminfreie Casamino-säuren, sterilfiltriert</p> <p>MIV-Medium: 100 ml Lösung 21 1 ml Lösung 22 1 ml Lösung 23 1 ml Lösung 40</p>
<p>Mic-(Minimal)-Medium Herriot et al., 1970</p>	<p>Lösung 1: 5 g L-Asparaginsäure 13 g L-Glutaminsäure 58 g NaCl 10 g K₂SO₄ 4 g MgCl₂ 0,294 g CaCl₂ 0,037 g Na₂EDTA 2,2 g NH₄Cl auf pH 7,2 einstellen, autoklavieren</p> <p>Lösung 2: Lsg. 2A, 2B und 2C im Verhältnis 1:1:1 mischen</p> <p>Lösung 2A: 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 ad 100 ml 0,1 N HCl, sterilfiltrieren</p>

	<p>Lösung 2B: 1,5 g L-Leucin ad 100 ml 0,1 N HCl</p> <p>Lösung 2C: 1 g L-Tyrosin in 20 ml 1 N HCl lösen, ad 100 ml H₂O, sterilfiltrieren</p> <p>Lösung 3: 0,1% (v/v) Tween 80 0,1% (w/v) Polyvinylalkohol 15% (w/v) Glycerin 4 g Natriumlaktat ad 100 ml H₂O, sterilfiltrieren</p> <p>Lösung 4: 0,2 g Uracil 0,04 g Hypoxanthin ad 100 ml 0,1 N HCl, sterilfiltrieren</p> <p>Lösung 5A: 1 g Inosin 1,74 g K₂HPO₄ 1,36 g KH₂PO₄ ad 100 ml H₂O, sterilfiltrieren</p> <p>Lösung 5B: 1 g Inosin 1,57 g Tris-HCl 0,075 g KH₂PO₄ auf pH 7,4 einstellen, ad 100 ml H₂O, sterilfiltrieren</p> <p>Lösung 6: 0,1 g Hämin 0,1 g L-Histidin 4% (v/v) Triethanolamin ad 100 ml H₂O, 30 min bei 60°C erhitzen, sterilfiltrieren</p> <p>Lösung 7: 0,1 g NAD⁺ 0,1 g Thiamin 0,1 g Pantothersäure ad 100 ml H₂O, sterilfiltrieren, als 1 ml Aliquote bei -20°C lagern</p> <p>100 ml Mic-Medium: 1 ml 1 N HCl 20 mg L-Cystein</p>
--	---

	ad 49 ml H ₂ O 10 ml Lsg. 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 auf pH 7,2 einstellen, ad 100 ml H ₂ O, sterilfiltrieren
LB-Agar (Difco)	32 g/l, ad 1 l H ₂ O, autoklavieren (enthält: 1% Bactotrypton, 0,5% NaCl, 0,5% Hefeextrakt, 1,5% Agar)
BHI-Agar (Difco)	52 g/l, ad 1 l H ₂ O, autoklavieren (enthält: 20% Kalbshirnininfusion, 25% Rinderherzinfusion, 1% Bacto Proteose Pepton, 0,2% Bacto Dextrose, 0,5% NaCl, 0,25% Na ₂ PO ₄ , 1,5% Agar)
BHI _s -Agar (supplementiert)	BHI-Agar; nach dem autoklavieren erfolgt die Zugabe 10 µg/ml NAD ⁺ und 20 µg/ml Hämin
Mlc-Agar	3,4% Agar in H ₂ O autoklavieren, auf ca. 50°C abkühlen lassen und in 1:1 Verhältnis mit 2x Mlc-Medium mischen

Tabelle 2 : Medien und Agar

Zusätze	Endkonzentration	Stammlösung
Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD ⁺)	15 µM	15 mM in H ₂ O
Nikotinamid-Mononukleotid (NMN)	30 µM	30 mM in H ₂ O
Nikotinamid-Ribosyl (NR)*	15 µM	15 mM in H ₂ O
Hämin*	20 µg/ml	1 mg/ml Hämin, 1 mg/ml Histidin, 4% Triethanolamin in H ₂ O
Nikotinamid (NA)		
Isopropyl-β-Thiogalactopyranosid (IPTG)	1 mM	1 M in H ₂ O
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-D-Galactopyranosid (X-Gal)	80 µg/ml	250 mg/ml in DMSO
Ampicillin (Ap)	100 µg/ml für <i>E. coli</i> bzw. 6 µg/ml für <i>H. influenzae</i>	100 mg/ml bzw. 6 mg/ml in H ₂ O
Chloramphenicol (Cm)	30 µg/ml für <i>E. coli</i> bzw. 1-2 µg/ml für <i>H. influenzae</i>	30 mg/ml bzw. 2 mg/ml in 100% Ethanol
Kanamycin (Km)	50 µg/ml für <i>E. coli</i> bzw.	50 mg/ml in H ₂ O

	10 µg/ml für <i>H. influenzae</i>	
Streptomycin (Sm)	100 µg/ml für <i>E. coli</i> bzw. 250 µg/ml für <i>H. influenzae</i>	100 mg/ml in H ₂ O
Spectinomycin (Sp)	75 µg/ml für <i>E. coli</i> bzw. 20 µg/ml für <i>H. influenzae</i>	20 mg/ml in H ₂ O
Tetracyclin (Tc)	10-12 µg/ml für <i>E. coli</i> bzw. 0,7-2 µg/ml für <i>H. influenzae</i>	12 mg/ml bzw. 2 mg/ml in 50% Ethanol

Tabelle 3: Medienzusätze

***Herstellungsprotokoll:** NR: NMN wurde mit Shrimp alkalischer Phosphatase und dem entsprechenden 10x Puffer versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert

Hämin: Hämin, Histidin, Triethanolamin und H₂O 30 min bei 60°C inkubieren und anschließend sterilfiltrieren.

5. Bakterienstämme und Plasmide

Bakterienstamm	Beschreibung	Herkunft/ Referenz
<i>E. coli</i>		
BL21	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i>	Invitrogen
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3), pLysS (Cm ^r)	Invitrogen
DH5α	F ⁻ φ80 <i>dlacZΔM15</i> Δ(<i>argF lac</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>supE44 thi-1 gyrA69 relA1 λ</i>	Hanahan et al., 1993
ER2566	F ⁻ λ [<i>lon</i>] <i>ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11</i> Δ(<i>mcrC-mrr</i>)114 :: <i>IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1[dcm]</i>	New England Biolabs
GM2163	F ⁻ <i>ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 supF58 lacY1/Δ(lacIZY)6 galK2 galT22 metB1 trpR55</i>	New England Biolabs
TOP10F'	F ['] [<i>laq^q</i> , Tn10(Tc ^R)] <i>mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL</i> (Sm ^r) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
XL1-Blue	F ['] ::Tn10 <i>proA+B+ lac^q Δ(lacZ)M15/ recA1 endA1 gyrA46</i> (Nal ^r) <i>thi hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>supE44 relA1 lac</i>	New England Biolabs
<i>H. influenzae</i>		
Rd KW20	Rd-f/F-Horgon, A. Wrights Isolat, ohne Kapseln, Genom sequenziert	Fleischmann et al., 1995

Hib	Typ b-Kapsel	Eagan, Isolat G. Siber
AK01	Rd KW20, <i>sxy-1</i> , Strep ^r , konstitutiv kompetent	Herbert et al., 2003
SE01	AK01 <i>nadV</i> ⁺ , Nam ⁺	Sauer et al., 2004
SE01ΔRNK	SE01 <i>nadR</i> ΔRNK:: <i>cat</i> , Nam, Cm ^r	diese Arbeit
SE01ΔRNK58	SE01 <i>nadR</i> ΔC-term 58:: <i>cat</i> , Nam, Cm ^r	diese Arbeit
SE01ΔRNK compl	SE01 <i>nadR</i> ΔRNK:: <i>cat</i> , , pNadRKan, Nam, Cm ^r , Kan ^r	diese Arbeit
SE02ΔRNK	SE01ΔRNK <i>nadR</i> ::pBADnadR-His, Nam, Cm ^r , Kan ^r	diese Arbeit
SE03ΔRNK	SE01ΔRNK <i>nadR</i> ::pBADnadR-His (G ₂₃₈ N), Nam, Cm ^r , Kan ^r	diese Arbeit
SE04ΔRNK	SE01ΔRNK <i>nadR</i> ::pBADnadR-His (G ₂₃₈ S), Nam, Cm ^r , Kan ^r	diese Arbeit
SE05ΔRNK	SE01ΔRNK <i>nadR</i> ::pBADnadR-His (D ₂₃₈ C), Nam, Cm ^r , Kan ^r	diese Arbeit
SE06ΔRNK	SE01ΔRNK <i>nadR</i> ::pBADnadR-His (D ₂₃₈ N), Nam, Cm ^r , Kan ^r	diese Arbeit
SE07ΔRNK	SE01ΔRNK <i>nadR</i> ::pBADnadR-His (D ₂₃₈ S), Nam, Cm ^r , Kan ^r	diese Arbeit
SE08ΔRNK	SE01ΔRNK <i>nadR</i> ::pBADnadR-His (R ₃₅₂ C), Nam, Cm ^r , Kan ^r	diese Arbeit
SE09ΔRNK	SE01ΔRNK <i>nadR</i> ::pBADnadR-His (R ₃₅₂ M), Nam, Cm ^r , Kan ^r	diese Arbeit
SE10ΔRNK	SE01ΔRNK <i>nadR</i> ::pBADnadR-His (R ₃₅₂ N), Nam, Cm ^r , Kan ^r	diese Arbeit
SE11ΔRNK	SE01ΔRNK <i>nadR</i> ::pBADnadR-His (R ₃₅₂ A), Nam, Cm ^r , Kan ^r	diese Arbeit
SE12ΔRNK	SE01ΔRNK <i>nadR</i> ::pBADnadR-His (K ₁₂₆ A), Nam, Cm ^r , Kan ^r	diese Arbeit
SE13ΔRNK	SE01ΔRNK <i>nadR</i> ::pBADnadR-His (Y ₂₉₂ I), Nam, Cm ^r , Kan ^r	diese Arbeit
SE14ΔRNK	SE01ΔRNK <i>nadR</i> ::pBADnadR-His (W ₂₅₆ F), Nam, Cm ^r , Kan ^r	diese Arbeit
SE15	SE01 <i>nadR</i> ΔRNK:: <i>cat</i> , <i>pnuC</i> :: <i>kann</i> , Nam, Cm ^r , Kan ^r	E. Sauer
SE02	SE01 <i>pnuC</i> :: <i>kan</i> , Nam, Km ^r	Herbert et al., 2003
SE02pSEpnuCHis-N ^r	SE01 <i>pnuC</i> :: <i>kan</i> , pSEpnuCHis ₆ -N ^r , Nam, Km ^r , Tc ^r	Sauer et al., 2004
HibΔ <i>nadX</i>	Hib <i>nadX</i> *:: <i>cat</i> , Cm ^r ,(HI0762*)	diese Arbeit
AK01Δ <i>nadX</i>	AK01 <i>nadX</i> :: <i>cat</i> ,(HI0762*), Cm ^r	diese Arbeit
HibΔ <i>nadX</i> compl	Hib <i>nadX</i> :: <i>cat</i> , pNadXKan, Cm ^r , Km ^r ,(HI0763*)	diese Arbeit
AK01Δ <i>nadX</i> compl	AK01 <i>nadX</i> ,(HI0762*):: <i>cat</i> , pNadXKan, Cm ^r , Km ^r	diese Arbeit

Tabelle 4: Bakterienstämme; **H. influenzae* Identifizierungsnummer (Fleischmann et al., 1995)

Plasmide	Beschreibung	Referenz
pACYC 184	Klonierungsvektor, Cm ^r , Tc ^r	New England Biolabs
pACYC 177	Klonierungsvektor, Ap ^r , Km ^r	New England Biolabs
pUC19	Klonierungsvektor, Ap ^r	New England Biolabs
pBAD18 Kan	Expressionsvektor, Arabinose induzierbar, Km ^r	Guzman et al., 1995
pTrec99A	Expressionsvektor, IPTG induzierbar, Km ^r	Amann et al., 1988

pCR [®] T7/ CT-TOPO [®]	Expressionsvektor mit T7 Promotor und C'-terminalem His-Tag, IPTG induzierbar, Ap ^r	Invitrogen
pSSkan	Expressionsvektor, Anhydrotetracyclin induzierbar, Km ^r , C	S. Schild
pSSkanΔCm	Expressionsvektor, Anhydrotetracyclin induzierbar, Km ^r	diese Arbeit
pGEX-3X	Expressionsvektor, mit N ⁷ -terminalem GST-fusions Tag, <i>tac</i> -Promotor, IPTG induzierbar, Ap ^r	Stratagen
pGEM [®] -T easy	Expressionsvektor, IPTG induzierbar, Ap ^r	Promega
pUCΔRNK	' <i>nadRNMNAT::cat::nadX</i> ' in pUC19, Ap ^r , Cm ^r	diese Arbeit
pNadRkan	<i>nadR</i> in pSSkanΔCm, Km ^r	diese Arbeit
pMMnadR-His ₆	<i>nadR</i> -C' terminaler V5 Epitop/His ₆ Tag in pCR [®] T7/ CT-TOPO [®] , Ap ^r	diese Arbeit
pMMnadR(G ₂₃₈ N)-His ₆	<i>nadR</i> -(G ₂₃₈ N)- C' term. V5/His ₆ Tag in pCR [®] T7/ CT-TOPO, Ap ^r	diese Arbeit
pMMnadR(G ₂₃₈ S)-His ₆	<i>nadR</i> -(G ₂₃₈ S)- C' term. V5/His ₆ Tag in pCR [®] T7/ CT-TOPO, Ap ^r	diese Arbeit
pMMnadR(D ₃₀₄ C)-His ₆	<i>nadR</i> -(D ₃₀₄ C)- C' term. V5/His ₆ Tag in pCR [®] T7/ CT-TOPO, Ap ^r	diese Arbeit
pMMnadR(D ₃₀₄ N)-His ₆	<i>nadR</i> -(D ₃₀₄ N)- C' term. V5/His ₆ Tag in pCR [®] T7/ CT-TOPO, Ap ^r	diese Arbeit
pMMnadR(D ₃₀₄ S)-His ₆	<i>nadR</i> -(D ₃₀₄ S)- C' term. V5/His ₆ Tag in pCR [®] T7/ CT-TOPO, Ap ^r	diese Arbeit
pMMnadR(R ₃₅₂ A)-His ₆	<i>nadR</i> -(R ₃₅₂ A)- C' term. V5/His ₆ Tag in pCR [®] T7/ CT-TOPO, Ap ^r	diese Arbeit
pMMnadR(R ₃₅₂ C)-His ₆	<i>nadR</i> -(R ₃₅₂ C)- C' term. V5/His ₆ Tag in pCR [®] T7/ CT-TOPO, Ap ^r	diese Arbeit
pMMnadR(R ₃₅₂ M)-His ₆	<i>nadR</i> -(R ₃₅₂ M)- C' term. V5/His ₆ Tag in pCR [®] T7/ CT-TOPO, Ap ^r	diese Arbeit
pMMnadR(R ₃₅₂ N)-His ₆	<i>nadR</i> -(R ₃₅₂ N)- C' term. V5/His ₆ Tag in pCR [®] T7/ CT-TOPO, Ap ^r	diese Arbeit
pMMnadR(K ₁₂₆ A)-His ₆	<i>nadR</i> -(K ₁₂₆ A)- C' term. V5/His ₆ Tag in pCR [®] T7/ CT-TOPO, Ap ^r	diese Arbeit
pMMnadR(K ₁₂₆ T)-His ₆	<i>nadR</i> -(K ₁₂₆ T)- C' term. V5/His ₆ Tag in pCR [®] T7/ CT-TOPO, Ap ^r	diese Arbeit
pMMnadR(Y ₂₉₂ I)-His ₆	<i>nadR</i> -(Y ₂₉₂ I)- C' term. V5/His ₆ Tag in pCR [®] T7/ CT-TOPO, Ap ^r	diese Arbeit
pMMnadR(W ₂₅₆ F)-His ₆	<i>nadR</i> -(W ₂₅₆ F)- C' term. V5/His ₆ Tag in pCR [®] T7/ CT-TOPO, Ap ^r	diese Arbeit
pBADnadR-His	<i>nadR</i> -C-term V5/His ₆ Tag in pBAD18 Kan, Km ^r , ΔaraC	diese Arbeit
pBADnadR(G ₂₃₈ N)-His ₆	<i>nadR</i> (G ₂₃₈ N)-C-term V5/His ₆ Tag in pBAD18 Kan, Km ^r	diese Arbeit
pBADnadR(G ₂₃₈ S)-His ₆	<i>nadR</i> (G ₂₃₈ S)-C-term V5/His ₆ Tag in pBAD18 Kan, Km ^r	diese Arbeit
pBADnadR(D ₃₀₄ C)-His ₆	<i>nadR</i> (D ₃₀₄ C)-C-term V5/His ₆ Tag in pBAD18 Kan, Km ^r	diese Arbeit
pBADnadR(D ₃₀₄ N)-His ₆	<i>nadR</i> (D ₃₀₄ N)-C-term V5/His ₆ Tag in pBAD18 Kan, Km ^r	diese Arbeit

pBADnadR(D ₃₀₄ S)-His ₆	<i>nadR</i> (D ₃₀₄ S)-C-term V5/His ₆ Tag in pBAD18 Kan, Km ^r	diese Arbeit
pBADnadR(R ₃₅₂ A)-His ₆	<i>nadR</i> (R ₃₅₂ A)-C-term V5/His ₆ Tag in pBAD18 Kan, Km ^r	diese Arbeit
pBADnadR(R ₃₅₂ C)-His ₆	<i>nadR</i> (R ₃₅₂ C)-C-term V5/His ₆ Tag in pBAD18 Kan, Km ^r	diese Arbeit
pBADnadR(R ₃₅₂ M)-His ₆	<i>nadR</i> (R ₃₅₂ M)-C-term V5/His ₆ Tag in pBAD18 Kan, Km ^r	diese Arbeit
pBADnadR(R ₃₅₂ N)-His ₆	<i>nadR</i> (R ₃₅₂ N)-C-term V5/His ₆ Tag in pBAD18 Kan, Km ^r	diese Arbeit
pBADnadR(K ₁₂₆ A)-His ₆	<i>nadR</i> (K ₁₂₆ A)-C-term V5/His ₆ Tag in pBAD18 Kan, Km ^r	diese Arbeit
pBADnadR(K ₁₂₆ T)-His ₆	<i>nadR</i> (K ₁₂₆ T)-C-term V5/His ₆ Tag in pBAD18 Kan, Km ^r	diese Arbeit
pBADnadR(Y ₂₉₂ I)-His ₆	<i>nadR</i> (Y ₂₉₂ I)-C-term V5/His ₆ Tag in pBAD18 Kan, Km ^r	diese Arbeit
pBADnadR(W ₂₅₆ F)-His ₆	<i>nadR</i> (W ₂₅₆ F)-C-term V5/His ₆ Tag in pBAD18 Kan, Km ^r	diese Arbeit
pUCΔ <i>nadX</i>	' <i>nadX</i> :: <i>cat</i> :: <i>nadX</i> ' in pUC19, Ap ^r , Cm ^r	diese Arbeit
pNadXKan	<i>nadX</i> in pSSKanΔCm, Km ^r	diese Arbeit
pTrc99A- <i>nadX</i>	<i>nadX</i> in pTrc99AKan, Km ^r	diese Arbeit
pGST- <i>nadX</i>	<i>nadX</i> mit N-term. GST Fusion in pGEX-3X, Ap ^r	diese Arbeit
pSEpnuCHis ₆ -N'	<i>pnuC</i> mit N-term. His ₆ Fusion in pACYC184, Tc ^r	Sauer et al., 2004

Tabelle 5: Plasmide

6. Synthetische Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz
Oligos für <i>nadR</i>-RNK Knockout-Konstrukte und <i>nadR</i> Plasmidkonstruktionen	
RNKko1EcoRI	5'-AGATTGAATTCCGCATGCCAACCCTGCAAGATC-3'
RNKko2PstI	5'-AATCTGCAGCACCGTTTTGGCTTA GAAAGGACGAGC-3'
<i>nadR</i> 3PstIneu	5'-AATCTGCAGTACAAAACACAACCTTTCC-3'
<i>nadR</i> 4HindIII	5'-CAAAGCTTCGTGATGATGTCCGTGGAATAC-3'
<i>nadR</i> koC-term50 PstI	5'-TTTACTGCAGACGCAAGCCATCATCCACCCATTC-3'
NadRK <i>pni</i> 5' - II	GAAATGGTACCGTGGGCTTTACCACCGGTAG-3'
NadRK <i>pni</i> 3'	AATAAGGTACCGTGC GGATCACCAGCAAAT-3'
<i>nadR</i> Itopo5'	5'-GTGGGCTTTACCACCGGTAGGGAAT-3'

nadRIItopo5'	5'-ATGTCAAAAACAAAAGAGAAAAAAGTCGGT-3'
nadRtopo3'	5'-TTGAGATGTCCCTTTTATAGGAAAG-3'
Oligos für Aminosäuren (AS)-Austausch in NadR-His₆	
LIDnadRR352A5'	5'-AATAAAA <u>GCTAGCT</u> TAGGCTCACAAAAACAACGCCAA-3'
LIDnadRR352A3'	5'-AATTTGCT <u>AGCCA</u> AGCCATCATCCACCCATTTCAGTAT-3'
LIDnadRR352C5'	5'-ATTATCT <u>TGCAGCT</u> TAGGCTCACAAAAACAACGC-3'
LIDnadRR352C3'	5'-CTAAAGCT <u>TGCAG</u> AGGCCATCATCCACCCATTTC-3'
LIDnadRR352M5'	5'-ACTGAATGGGTGGATGAT <u>GGGCTCAT</u> GAGCTTA-3'
LIDnadRR352M3'	AGCCTAAGCTCAT <u>GAGCCC</u> ATCATCCACC-3'
LIDnadRR352N5'	5'-GAAGCTG <u>AATTC</u> ATTAGGCTCACAAAAACAACGC-3'
LIDnadRR352N3'	5'-AAATTG <u>AATTC</u> AGGCCATCATCCACCCATTTCAGTAT-3'
WalkerBnadRD304C5'	AATTTATCATAT <u>TGCAC</u> GGATTTTCATCACCACGCAAGCATTTC-3'
WalkerBnadRD304C3'	5'-TTTCG <u>CACATAT</u> GAAATGCAATTTTATGAGAATGGCGCAC-3'
WalkernadRD304N5'	5'-AAAATTTATA <u>AATAC</u> GGATTTTCATCACCACGCAA-3'
WalkerBnadR D304N3'	5'-AAAACGTATTTATA <u>AATGCA</u> ATTTTATGAGAATGGC-3'
WalkerBnadRD304S5'	5'-AAATTTTATA <u>AGCAC</u> GGATTTTCATCACCACGCAA-3'
WalkerBnadRD304S3'	5'-AAAACGTGCTTATA <u>AATGCA</u> ATTTTATGAGAATGGC-3'
WalkerAnadRG238N5'	5'-AAAAGAGAGCTCTA <u>ACAAA</u> AGCGTGCTAGTTAAT-3'
WalkerAnadRG238N3'	5'-AATTTGTTAGAGCTCTCTCCCCCTAAAATCGC-3'
WalkerAnadRG238S5'	5'-AAATGAGAGCTCTAGCAAAAGCGTGCTAGTTAAT-3'
WalkerAnadRG238S3'	5'-AAATTTGCTAGAGCTCTCTCCCCCTAAAATCGC-3'
nadRY292IEcoRV5'	5'-TTGATATCGCCGTGCGCCATTTCATAAAATTGC-3'
nadRY292IEcoRV3'	5'-GCGATATCAATGTATCGTTGATGACCAAGCGC-3'
nadRK126A5'	5'-GCGTTGGATGCAGCAAATTTTCGCATATCAAAAAAATCAGATTTTT-ATTCATC-3'
nadRK126A3'	5'-GATGAATAAAAATCTGATTTTTTTGATATGCGAAAATTTGCTGCA-TCCAACGC-3'
nadRW256F5'	5'-GTATTTAATACCACTTCTGCGTTTCGAATACGGGCGTGAATTG-3'
nadRW256F3'	5'-CAAATTCACGCCCGTATTCGAACGCAGAAGTGGTATTAATAAC-3'
ΔpBADchr1KpnI	5'-TTTGGTACCGTTTTTCGCCAGCGTCGCACAGCA-3'
ΔpBADchr2EcoRI	5'-AACGAATTCATGTGCCTGTCAAATGGACGAAGCAG-3'
N3EcoRI	5'-AAAGAATTCACAAAACACAACCTTTCC-3'

TetEcoRI5'	5'-TGTGAATTCCTCATGTTTGACAGCTTATCATCG-3'
TetEcoRI3'	5'-ATAGAATTCGCGTGCGGCTGCTGGAGATGGCG-3'
Primer für <i>nadX</i> (HI0762) Konstrukte	
HI0762-1EcoRI	5'-GATGAATTCCTGACTATCCGCAAATGGC-3'
HI0762-2PstIneu	5'-GTTCTGCAGTTCCTGATTTCTCTTC-3'
HI0762-3PstIneu	5'-AAACTGCAGGAAGGCTCTCGCTCATTGATAC-3'
HI0762-4HindIII	5'-TATAAGCTTTAATCAAAAATGCTCGCTGGC-3'
nadXupKpnI-2	5'-TTAGTGGTACCATGATTTTATTTGCTGGTGATCCGC-3'
NadXdownKpnI	5'-AATCTTGGTACCCTTAGTCGCTTGC GTTAAAC-3'
NadXTrc99AupNcoI	5'-GTTGCCATGGTTTTATTTGCTGGTGATCCGC-3'
NadXTrc99Adown BamHI	5'-TTTGGATCCAGATTTATTTTCACGATCATCGATGG-3'
nadX-GST5'	5'-ACATGGATCCTATTTGCTGGTGATCCGCACG-3'
nadX-GST3'	5'-TTAAGAATCTTATTTTTTCACGATCATCGATG-3'
Sequenzierprimer	
nadRseq1	5'-AATCAGGACAATTTTCGCAG-3'
nadRseq2	5'-TTCAAGGAACTCGCATTGC-3'
nadRseq3	5'-AGTAGCGAACCTCAAGAT-3'
nadRseq4	5'-TCATCACCACGCAAGCATTTC-3'
nadXseq2	5'-TTCAAGGAACTCGCATTGC-3'
nadXseq3	5'-GGTGTGCCTTTGCGTCATC-3'
nadXseq4	5'-CACATCCGATGGGTTTCC-3'
T7 forward	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
V5-C-term-reverse	5'-ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT-3'
pSSKanseq1	5'-TCTTACGTGCCGATCAAC-3'
pTrc99Aup	5'-TTGACAATTAATCATCCGGCTCG-3'
M13uni long	5'-ACGTTGTAAAACGACGGCCAGTG-3'
M13reverse	5'-ACAGGAAACAGCTATGACCATGATT-3'

¹Primerkonzentration: 100 pmol/μl, ²Schnittstellen für die Restriktionsenzyme sind unterstrichen;

³ Triplets; die für die ausgetauschten Aminosäuren kodieren; sind in Fett

Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide

7. Puffer und Lösungen

6x DNS-Ladepuffer: 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol, 30% (w/v) Glycerin, 50 mM EDTA

Plasmidpräparation P1-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8; nach dem autoklavieren erfolgte die Zugabe von RNase A, 100 µg/ml

Plasmidpräparation P2-Puffer: 200 mM NaOH, 1% SDS

Plasmidpräparation P3-Puffer: 2,8 M KAc, pH 5,1

SDS-PAGE Lösung B: 50 ml 1 M Tris/HCl pH 6,8, 4 ml 10% SDS, 46 ml H₂O

SDS-PAGE Lösung C: 75 ml 2 M Tris/HCl pH 8,8, 4 ml 10% SDS, 21 ml H₂O

SDS-PAGE-Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS (w/v)

SDS-PAGE-Probenpuffer 5x: 1,1 g SDS, 0,42 g EDTA, 0,17 g Na₂H₂PO₄ x H₂O, 1,1 ml β-Mercaptoethanol, auf pH 7,2 einstellen, ad 10 ml H₂O, 10 ml 50% Glycerin, 20 mg Bromphenolblau

Coomassie-Färbelösung: 0,5 g/l Coomassie Brilliant Blue R250 in 50% (v/v) Methanol, 40% (v/v) H₂O_{dest.}, 10% (v/v) Eisessig

Coomassie-Entfärber-Lösung: 60% (v/v) H₂O_{dest.}, 30% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Eisessig

LEW-Puffer: 50 mM Na₂HPO₄, pH 8,0, 300 mM NaCl, sterilfiltrieren

10x PBS: 8% NaCl, 0,2% KCl, 1,8% Na₂Hpo₄ . 2 H₂O, 0,24% KH₂PO₄, pH 7,4

TAE-Puffer für die DNS-Gelelektrophorese: 40 mM Tris, 40 mM Acetat, 1 mM EDTA pH 7,5

Transferpuffer für den Semi-dry-Blott: 25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10% (v7v) Methanol, sollte pH 8,3 ohne einstellen haben

Transferpuffer für den Tank-Blott: 25 mM Tris, 150 mM Glycin, 20% (v7v) Methanol, sollte pH 8,3 ohne einstellen haben

Southern-Blot Lösung I: 250 mM HCl

Southern-Blot Lösung II: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH

Southern-Blot Lösung III: 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris, einstellen auf pH 7,5; autoklavieren

20x SSC (Transferpuffer): 0,3 M NaCitrat, 3 M NaCl, einstellen auf pH 7

Southern-Blot Waschpuffer 1: 6 M Harnstoff, 0,4% SDS, 0,5 x SSC

Southern-Blot Waschpuffer 2: 2x SSC

TNE: 10 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 8, autoklavieren

TNEX: TNE-Lösung und 1% Triton X-100

TBS: 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl

TBS-Tween-Triton: 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20, 0,2% (v/v) Triton X-100

TE: 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8,0, autoklavieren

Zellaufschluss-Puffer (Grundpuffer)*:

- für NadR-Assay mit Rohextrakten: 50 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 50 mM NaCl
- für NadRHis₆-Aufreinigung: 50 mM Na₂HPO₄, pH 8,0, 300 mM NaCl, 2 mM Mercaptoethanol, 0,03% Brij 35
- Membranpräparation für die Reinigung des NadR-Antiserums: PBS
- für GST-NadX Aufreinigung wurden mehrere Zellaufschlußpuffer verwendet, um eventuell eine bessere Löslichkeit des GST-NadX Proteins zu erzielen:

1) PBS, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂

2) PBS, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂

3) PBS, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1% Triton X-100

4) 50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM Mercaptoethanol

5) 50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM Mercaptoethanol, 0,1% Brij 35

6) 50 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1% Triton X-100

* alle Grundpuffer enthielten standardmäßig Proteaseinhibitormix (Complete EDTA-free, Boehringer Ingelheim)

8. Stammhaltung, Anzucht und Ernte von Bakterien

Die langfristige Lagerung von Bakterien erfolgte in Glycerinkulturen. Dazu wurden 1 ml einer ü.N. Flüssigkultur mit 500 µl sterilem Glycerin (70%) versetzt und bei -76°C aufbewahrt. Mittelfristig wurden die *E. coli* Zellen auf Agar-Platten (mit den entsprechenden Zusätzen) ausgestrichen und bei 6°C aufbewahrt. Die Bakterien wurden alle 2-4 Wochen auf frische Platten übergeimpft. *H. influenzae* wurde maximal 3-4 Tage nach dem Ausstreichen auf den Agar-Platten bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die Anzucht der Zellen erfolgte in LB- bzw. TY- Medium für *E. coli* bzw. in BHI_s- bzw. M1c-Medium für *H. influenzae* mit den erforderlichen Zusätzen und Antibiotika.

Für *H. influenzae* wurde das BHI- Flüssigmedium und der BHI-Agar mit NAD⁺, NMN oder NR supplementiert. Diese Kofaktoren wurden nur bei dem SE01 Stamm ausgelassen, da dieser *nadV*-Gen besitzt und damit in der Lage ist, das im BHI-Medium vorhandene

Nikotinamid als Quelle für die NAD⁺-Synthese zu benutzen. Als Protoporphyrinquelle wurde standardmäßig Hämin zugegeben.

Sofern nicht anders angegeben, erfolgte nach dem Animpfen mit einer Übernachtskultur (1:100) eine Anzucht der Zellen bei 37°C unter aeroben Bedingungen. Kulturen bis zu 600 ml wurden in Erlenmeyer-Kolben auf Schüttlern angezogen. Das Wachstum der Zellen wurde photometrisch durch Messen der OD bei 600 nm (*E. coli*) bzw. 490 nm (*H. influenzae*) verfolgt. Dabei entspricht eine OD₆₀₀ von 0,5 einer Zelldichte von ca. 5x10⁸ Bakterien/ml bzw. OD₄₉₀ von 0,5 einer Zelldichte von ca. 3x10⁸. Die Ernte der Zellen erfolgte durch 10-minütige Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C in einer Tisch-Zentrifuge (Volumina bis 2 ml), einer Minifuge (2-50 ml) oder in der Sorvall-Zentrifuge für Volumina über 50 ml. Die Kulturen wurden vorher auf Eis abgekühlt. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1/100 seines Kulturvolumens in eiskaltem Grundpuffer (III.7) aufgenommen.

9. Zellaufschluss

Die Bakterien wurden entweder durch Schütteln mit Glasperlen (Mickeln), mit Hilfe der French-Press oder in einem Schredder (Fast Prep 120) aufgeschlossen.

Zum Zellaufschluss mit Glasperlen (Ø 0,17-0,18 mm) wurde das abzentrifugierte Zellpellet (10-50 ml Kultur) in 150-400 µl eiskalten Grundpuffer (III.7) aufgenommen und resuspendiert. Nach Zugabe von DNase und Proteasen-Inhibitor-Mixes wurde die Suspension auf 100-400 mg Glasperlen gegeben. Die Suspension wurde 20-60 min bei 6°C auf dem Vortexer mit max. Stärke geschüttelt.

Der Zellaufschluss in der French-Press wurde bei 12000 psi vorgenommen. Dazu wurde das Zellpellet in 1/100 seines Kulturvolumens in eiskaltem Grundpuffer aufgenommen. Nach Zugabe von DNase und Proteasen-Inhibitor-Mixes erfolgte eine 2- bzw. 3-malige Passage durch die French-Press.

Der Zellaufschluss im Fast Prep 120 – Schredder erfolgte bei höchster Einstellung (6.0) für 30-45 sec. Davor wurde das Zellpellet in 1/100 seines Kulturvolumens im Grundpuffer aufgenommen und jeweils 1 ml auf die Silikatkügelchen (Lysing Matrix B, Q BioGene) gegeben. Bei Bedarf wurde die Prozedur wiederholt. Zwischendurch wurde die Zellsuspension auf Eis abgekühlt.

Nach dem Schreddern bzw. der Passage durch die French-Press wurde der Zellaufschluss mikroskopisch kontrolliert und die noch verbliebenen intakten Zellen durch Zentrifugation (30 min; 10000 x g, 4°C) entfernt.

10. Protein-biochemische Methoden

10.1. Zellfraktionierung: Lösliche Fraktion, Salzextrakt und Triton-Extrakt von Membranen

Zur Trennung von Membranen und löslicher Fraktion wurden die Zellhomogenate 30 min bei 4°C und 90000 rpm (Rotor TLA 100) in einer Beckman Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Der lösliche Überstand enthielt die cytoplasmatische und periplasmatische Fraktion. Die als Pellet sichtbare Membranfraktion wurde in (1/100 des ursprünglichen Kulturvolumens) Grundpuffer (III.7) + 1 M NaCl resuspendiert. Nach der Extraktion (1 h; 6°C; unter Rühren) folgte eine zweite Ultrazentrifugation (Rotor TLA 100; 30 min; 4°C; 90000 rpm). Der Überstand enthielt die membranassoziierten Proteine (Salzfraktion). Das restliche Pellet wurde in 1/100 des Kulturvolumens in Grundpuffer + 2% Triton X-100 resuspendiert. Die Extraktion erfolgte für mind. 4 h (oder über Nacht) bei 6°C durch Rühren. Nach der dritten Ultrazentrifugation (UZ) enthielt der Überstand die solubilisierten Membranproteine (Membranfraktion). Sollten die lösliche und Salzfraktion vereinigt werden, wurden die Zellhomogenate in Grundpuffer + 1 M NaCl resuspendiert und 1 h bei 6°C durch Rühren extrahiert. Nach anschließender Ultrazentrifugation (Rotor TLA 100; 30 min; 4°C; 90000 rpm) enthielt der Überstand die lösliche und die Salzfraktion.

10.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte nach der modifizierten Vorschrift von Bradford (1976) mit Roti-nanoquat (Roth) und BSA als Standard für die Eichkurve. Die Messung der Proben wurde in einem Photometer bzw. Elisa-reader bei 590 nm und 450 nm durchgeführt. Danach wurde der OD_{590}/OD_{450} Quotient für jede Probe gegen die Standardkurve aufgetragen.

10.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch diskontinuierliche SDS-PAGE nach Vorschrift von Lutgenberg (1975). Die Konzentration des Acrylamids im Gel betrug 12,5% bzw. 15%. Die SDS-PAGE wurde in Protein-Gelapparaturen von BioRad (Mini Protean III für kleine Gele und Protean II Xi Cell für große Gele) durchgeführt. Die Stammlösungen wurden lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt. Die APS-Lösung wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert. Zum Luftabschluß (O₂ beeinträchtigt die Polymerisation) und zur Glättung der Geloberfläche wurden die Trenngele mit Isopropanol überschichtet. Die Polymerisation erfolgte für mind. 2 h bei RT oder ü.N. bei 6°C. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser abgesaugt und mit dem Sammelgel überschichtet. Die Polymerisation des Sammelgels erfolgte nach ca. 12 min. Der Probenkamm wurde entfernt und die Taschen mit Laufpuffer gefüllt. Die Proben wurden 1:5 mit dem 5x-SDS-Probenpuffer (III.7) gemischt, 5-7 min gekocht und nach dem Abkühlen auf RT auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 90 V.

Trenngele	12,5%	15%	Sammelgel	3%
H ₂ O	3,45 ml	2,85	H ₂ O	3 ml
Acrylamid-Lösung ¹⁾	4 ml	4,6 ml	Acrylamid-Lösung ¹⁾	0,65 ml
Lösung B ²⁾	2,5 ml	2,5 ml	Lösung C ³⁾	1,25 ml
TEMED ⁴⁾	5 µl	5 µl	TEMED ⁴⁾	5 µl
10% APS-Lösung ⁵⁾	50 µl	50 µl	10% APS-Lösung ⁵⁾	25 µl

¹⁾: 30% Acrylamid-/ 0,8% Bisacrylamid-Stammlösung (Roth); ²⁾ & ³⁾ siehe Puffer und Lösungen

⁴⁾: TEMED = N,N,N',N'-Tetramethyldiamin; ⁵⁾: APS = Ammoniumperoxidisulfat

Tabelle 7: Pipettierschema für Trenngele und Sammelgel (Volumina für 2 kleine Gele)

10.4. Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden nach der SDS-PAGE wurden die Gele nach Beendigung der Elektrophorese in Coomassie-Färbelösung (III.7) 15-30 min geschwenkt. Anschließend wurde die Coomassie-Färbelösung entfernt, die Gele kurz mit Wasser gespült und für ein paar Stunden bzw. über Nacht in Coomassie-Entfärbelösung (III.7)

geschwenkt bis der Hintergrund entfernt war und die Banden die gewünschte Intensität erreicht hatten.

10.5. Trocknen von SDS-Gelen

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden auf ein angefeuchtetes Whatman- Filterpapier gelegt und mit feuchter Klarsichtfolie bedeckt. Das Gel wurde dann auf dem Geltrockner für 2-4 h bei 60°C unter Vakuum getrocknet.

10.6. Immunoblot (Westernblot)

Der Immunoblot wurde zum immunologischen Nachweis der Proteine verwendet. Dabei wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennte Proteine auf eine Nitrocellulose- bzw. PVDF-Membran transferiert (Towbin et al., 1979). Für den Transfer wurde die Semi-Dry- oder die Tank-Blot-Apparatur (BioRad) nach der Anleitung des Herstellers verwendet. Die PVDF-Membran wurde vor dem Blotten kurz mit Methanol und die Nitrocellulose-Membran mit H₂O benetzt. Die jeweilige Membran wurde anschließend zusammen mit dem Gel für 10 min im Transferpuffer geschwenkt. Dann wurde das Whatman-Papier (Millipore) ebenfalls mit Transferpuffer befeuchtet, auf Semi-Dry-Apparat luftblasenfrei gelegt, darauf die Membran, das Gel und noch ein feuchtes Whatman-Papier, alles ebenfalls möglichst luftblasenfrei. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte in der Semi-Dry-Apparatur 30 min lang bei 15 V und in der Tank-Blot-Apparatur 1 h bei 350 mA unter Kühlen. Nach dem Transfer wurde die Membran 2x 10 min in TBS gewaschen. Anschließend wurde zur Absättigung unspezifischer Bindestellen die Membran in 3% BSA in TBS (für Maus-anti-His-Tag-Antikörper) bzw. 10% Magermilchpulver in TBS (für NadR-Antiserum) entweder für 1 h bei Raumtemperatur oder. ü.N. bei 4°C geschwenkt. Nach den jeweils 10 minütigen Waschschritten (2x TBS-Tween-Triton, danach 2x TBS) erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Maus-Anti-Penta-His-Antikörper, Qiagen, 1:4000 in TBS mit 3% BSA; Kaninchen-Anti-NadR-Antiserum, 1:100 in TBS mit 10% Magermilchpulver; Maus-Anti-GST-Antikörper, Santa Cruz, 1:1000 in TBS mit 5% Magermilchpulver) für 1 h bei RT. Nach dem Wiederholen der Waschschrritte mit TBS-Tween-Triton und TBS (je 2x 10 min), wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (Ziege-Anti-Maus-HRP-Konjugat, 1:5000 in TBS mit 10% Magermilchpulver; Ziege-Anti-Kaninchen-HRP-Konjugat, 1:7000 in TBS mit 10% Magermilchpulver) für 1 h bei RT

inkubiert. Vor dem Nachweis mit ECL-Reagenz, wurde die Membran 4x 10 min mit TBS-Tween-Triton gewaschen. Der Nachweis der Protein-Antikörper-Komplexe erfolgte mit dem ECL-Kit nach den Angaben des Herstellers. Dabei wird das ECL-Reagenz durch die HRP (horse radish peroxidase, Meerrettichperoxidase) enzymatisch gespalten, wodurch Lumineszenz entsteht. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurde ein Autoradiographfilm zwischen 20 sec und 1 h Stunde aufgelegt.

10.7. Aufreinigung der Proteine mit dem His-Tag

Das rekombinante His-Tag-NadR Protein wurde nach der leicht modifizierten Methode von Kurnasov et al. (Kurnasov et al., 2002) aufgereinigt. Die Expression des NadR-Proteins mit der C'-terminaler V5 Epitop/His₆-Fusion erfolgte in dem BL21(DE3)pLysS Stamm. Das pMmnadR-His₆-Plasmid wurde in BL21(DE3)pLysS transformiert und in 50 ml LB/Amp-Mediums ü.N. bei 37°C und 200 rpm Schütteln angezogen. Am nächsten Tag wurden 400 ml LB/Amp-Mediums mit 8 ml der ü.N.-Kultur angeimpft und bei 37°C und 200 rpm im Schüttler bis OD₆₀₀ von ca. 0,8-0,9 kultiviert. Danach wurde die Temperatur auf 16-18°C herabgesetzt und die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 0,8 mM IPTG induziert und die Bakterien ü.N. bei 16-18°C im Schüttler (200 rpm) inkubiert. Zur Aufreinigung wurden die Zellen bei 5000 rpm und 4°C pelletiert, in LEW-Puffer (50 mM Na₂HPO₄, pH 8, 300 mM NaCl) gewaschen und in 4 ml NadR-His₆ Grundpuffer (LEW-Puffer mit 2mM Mercaptoethanol, 0,03% Brij 35 und Proteaseinhibitormix (Complete EDTA-free, Boeringer-Ingelheim) resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte entweder in French-Press oder im Fast Prep 120-Schredder (s. III.9). Intakte Zellen und eventuell die Silikatkügelchen wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C vom Überstand getrennt. Um die restliche Zelldebris zu entfernen, wurde der Überstand noch mal bei 10000xg und 4°C für 30 min abzentrifugiert. Für die Aufreinigung des NadR-His₆ Proteins wurden die Protino Ni²⁺-1000 Säulchen verwendet (Macheray-Nagel). Die Säulen wurden mit dem Grundpuffer (LEW + 2mM Mercaptoethanol + 0,03% Brij 35) equilibriert und der Überstand auf die Säulen aufgetragen. Nach dem Durchlauf der Probe wurden die Säulen mit 3 x 2 ml Waschpuffer (LEW + 2 mM Mercaptoethanol + 0,3% Brij 35) gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit 3 x 1,5 ml Elutionspuffer (LEW + 2 mM Mercaptoethanol + 0,03% Brij 35 + 250 mM Imidazol) eluiert. Die Eluate wurden mit SDS-PAGE (12,5% Gele) analysiert und gegen 50 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 200 mM

NaCl, 1 mM DTT dialysiert. Aliquote der NadR-His₆ Proben wurden in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80°C gelagert.

Dieselbe Aufreinigungsmethode wurde auch für alle NadR-His₆-Punktmutanten verwendet.

10.8. Herstellung und Reinigung des NadR-Antiserums

Das NadR-Antiserum wurde von der Firma Biotrend Chemikalien (Köln) durch Immunisation der Kaninchen mit dem gereinigten NadR-His₆ (1 mg/ml) gewonnen. Da sowohl das Preimmun- als auch das Antiserum im Westernblot viele unspezifische Banden erkannten, wurde das NadR-Antiserum weiter gereinigt, um eine höhere Spezifität zu bekommen.

Für die Reinigung des NadR-Antiserums wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. In der ersten Methode wurde die Membran des SE01ΔRNK-Stammes verwendet. Dabei wurden unspezifische Antikörper des Serums an den Membranen adsorbiert und aus dem Serum entfernt.

SE01ΔRNK wurde bei 37°C im Schüttler in 2 x 500 ml BHI-Medium (10 µg/ml Hämmin, 0,5 µg/ml Chloramphenicol) bis zu einer OD₄₉₀ von ca. 1,0 gezüchtet. Die Zellernte und der Zellaufschluss (im PBS) in der French Press erfolgte wie in Kapitel III.8 und III.9 beschrieben. Vor der Ultrazentrifugation (UZ)(Rotor TLA 100, 90000 rpm, 30 min, 4°C) wurde das Zellhomogenat in drei gleich große Aliquots aufgeteilt. Die nach der Ultrazentrifugation erhaltenen Membranfraktionen wurden zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen und in jeweils 300 µl PBS resuspendiert. Zum ersten Aliquot wurden 400 µl des NadR-Antiserums gegeben und nach dem Mischen über Nacht auf Eis inkubiert. Nach erneuter UZ wurde der Überstand nacheinander mit dem 2. und 3. Aliquot der Membranpräparation inkubiert (6 h bzw. 5 h). Der nach letzten UZ erhaltene Überstand wurde in 50 µl Aliquots bei -20°C gelagert. Das gereinigte Serum detektierte bei der Entwicklung von Immunoblots mit der ECL-Methode nur die NadR-Bande in Zellextrakten von *H. influenzae* SE01, bzw. keine Banden in SE01ΔRNK Zellextrakten.

Um sicherzustellen, dass das Fehlen der NadRΔRNK Bande nicht vom Reinigungsverfahren herrührt, wurde eine zweite Methode zur Reinigung des NadR-Serums verwendet. Dabei wurde das gereinigte NadR-His₆ Protein (ca. 6 mg) im Koppelungspuffer (100 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, 250 mM NaCl, 0,1% Brij 35) nach der Anleitung des Herstellers an die Affigel 10-Matrix (BioRad) gekoppelt. Die Matrix

mit dem gekoppelten NadR-His₆ wurde 5x mit 10 ml Hochsalz-Waschpuffer (100 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, 1 M NaCl, 10 mM MgCl₂) und 3x mit 10 ml Niedrigsalz-Waschpuffer (100 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, 250 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) gewaschen. Die Matrix wurde dann für 2 h in 2 ml Blockingpuffer (10 mM Tris, pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1 mM Ethanolamin) inkubiert. Nach dem 3-maligen Waschen mit 10 ml Niedrigsalz-Waschpuffer, wurden 2 ml des NadR-Antiserums gegeben und ü.N. im Kühlraum inkubiert (über Kopf drehend). Danach erfolgten wieder 5 Waschschritte mit dem Hochsalz-Waschpuffer (je 10 ml) und 3 mit Niedrigsalz-Waschpuffer. Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgte mit 10x 1 ml Elutionspuffer (100 mM Glycin, pH 2,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂), wobei die Fraktionen in 2 ml Eppis mit 80 µl 1 M Tris aufgefangen wurden, um die Proben möglichst schnell umzupuffern. Das affinitätsgereinigte Serum erkannte neben NadR auch eine weitere Proteinbande, aber keine NadRΔRNK Bande.

10.9. *In vitro* NadR-Aktivitäts- und Inhibitionsassay

Die NMN-Adenylyltransferase (NMNAT)- und Ribonukleosidkinase (RNK)-Aktivität der aufgereinigten NadR-His₆ Proteine wurde in einem Assay unter Verwendung von radioaktiven Substraten ¹⁴C-NMN und ¹⁴C-NR untersucht. Der Assay wurde in 100 mM HEPES-NaOH pH 7,5 Puffer mit 10 mM MgCl₂ durchgeführt in einem Endvolumen von 40 µl. Der Reaktionsansatz enthielt ca. 0,04 mg/ml der gereinigten Proteinprobe, 2 mM ATP und ca. 45 µM ¹⁴C-NR bzw. ¹⁴C-NMN. Die Reaktion wurde für 40-80 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Kochen der Probe für 3 min bei 95°C beendet. Das im Reaktionsansatz vorhandene Protein wurde durch Zentrifugation entfernt (Tischfuge, 13000 rpm, 10 min).

Die NAD⁺-Inhibitionsstudien wurden ähnlich durchgeführt, dabei wurde allerdings die Proteinkonzentration auf 0,002 mg/ml erniedrigt, und in die jeweiligen Ansätze wurden unterschiedliche NAD⁺-Konzentrationen (0; 2,25 mM; 4,5 mM und 9 mM) gegeben.

10 µl des Ansatzes wurden auf die Dünnschicht-Folie aufgetropft und in der Dünnschicht getrennt (s.III.12.4). Zur Detektion der Radioaktivität wurde ein Röntgenfilm für 5-10 Tage aufgelegt.

10.10. NadR-Aktivität in intakten *H. influenzae* Zellen (whole cell labeling)

Die Zellen wurden in BHI-Medium mit 10 µg/ml Hämin für SE01-Stämme bzw. mit zusätzlich 15 µg/ml NAD⁺ für alle andere (*nadV*⁻) Stämme bis OD₄₉₀ von 2 bei 37°C im Schüttler (250 rpm) kultiviert. Nach der Ernte (s. III.8) wurden die Zellen mit BHI-Medium gewaschen und dann im BHI-Medium (ohne Hämin) vorsichtig resuspendiert, auf OD₄₉₀ von 2 eingestellt und 1 h bei RT inkubiert. 5 ml Aliquots wurden entnommen und mit je 1 µM ¹⁴C-Nam, ¹⁴C-NR und ¹⁴C-NAD⁺ versetzt. Bei definierten Zeitpunkt-Intervallen wurden jeweils 2 x 500 µl entnommen (zur Doppelbestimmung), vorsichtig 2 x gewaschen (100 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, 100 mM NaCl) und vorsichtig in 40 µl 100 mM HEPES-NaOH pH 7,5 resuspendiert. Die Proben wurden 5 min bei 100°C aufgeköcht und dann abzentrifugiert (13000 rpm, 10 min), um Zelldebris zu entfernen. 10 µl der jeweiligen Überstände wurden auf die Dünnschicht-Folien aufgetropft und in der DC analysiert (III.12.4).

10.11. NadR-Aktivität in rohen *H. influenzae* Zellextrakten

Die Zellen wurden in 50-100 ml BHI-Medium mit 10 µg/ml Hämin (*nadV*⁺-Stämme) bzw. mit zusätzlich 15 µg/ml NAD⁺ (*nadV*⁻ Stämme) bis OD₄₉₀ von 1 bei 37°C im Schüttler bei 250 rpm angezogen. Nach dem Waschschrift (50 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 50 mM NaCl) wurden die Zellen wie in III.8 und III.9 beschrieben mit Glasperlen bzw. im Fast-Prep-Gerät aufgeschlossen. Die Zellhomogenate (roher Zellextrakt) wurden nach der Bestimmung der Proteinkonzentration sofort für den Aktivitätsassay eingesetzt. Der Standardansatz setzte sich aus 2 mM ATP, 10 mM MgCl₂, ca. 2 mg/ml des rohen Zellextraktes in 100 mM HEPES-NaOH, pH 7,5 in 30 µl Endvolumen zusammen. Nach der Zugabe von ca. 1 µM des radioaktiven Substrats (¹⁴C-Nam, ¹⁴C-NR, ¹⁴C-NMN, ¹⁴C-NAD⁺) wurden die Reaktionsansätze bei 37°C für 40 min inkubiert. Damit die NAD⁺-Synthese auch in Abhängigkeit der Zeit beobachtet werden konnte, wurde je nach Bedarf das Volumen der Ansätze bis zu 150 µl erhöht und bei verschiedenen Zeitwerten Proben entnommen. Die Reaktionen wurden durch Kochen bei 95°C (5 min) gestoppt und abzentrifugiert, um Proteine zu entfernen (Tischfuge, 13000 rpm, 10 min). Je 10 µl des Überstandes wurde auf die Dünnschicht-Folie aufgetragen.

10.12. NadR-Aktivität mit 3-Aminopyridin (AmPR) als Substrat

Um zu untersuchen, ob NadRHis₆ mit AmPR als Substrat 3-Aminopyridin-Adenin-Dinukleotid (AAD) synthetisieren kann, wurden 2 mM AmPR mit 2 mM ATP, 10 mM MgCl₂ und 0,05 mg/ml NadRHis₆ in 100 mM HEPES-NaOH pH 7,5 (Endvolumen: 1 ml) bei 37°C ü. N. inkubiert. Als Kontrolle wurde ein zweiter Ansatz mit 2 mM AmPR, 2 mM ATP und 10 mM MgCl₂ in 100 mM HEPES-NaOH pH 7,5 ohne das NadRHis₆ bei 37°C ü. N. inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze für 3 min bei 95°C inkubiert, um die Reaktion zu stoppen und das Protein zu denaturieren. Die Ansätze wurden dann abzentrifugiert und 950 µl des jeweiligen Überstandes in der HPLC („high pressure liquid chromatography“) analysiert (siehe III.12.4)

11. Molekulargenetische Methoden

11.1. Isolierung von Plasmid-DNS

Die Isolierung der Plasmid-DNS in kleinem Maßstab (Miniprep) erfolgte nach der leicht modifizierten Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Dazu wurden 2 ml einer ü.N.-Kultur abzentrifugiert (5000 rpm, 5 min, RT) und das Pellet in 300 µl P1-Puffer (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0) resuspendiert. Für die Zell-Lyse wurde dann 300 µl Puffer P2 zugegeben (200 mM NaOH, 1% SDS). Die Mischung wurde durch invertieren gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 300 µl Puffer P3 (2,8 M KAc, pH 5,1) zugegeben, gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Zelldebris wurde durch Zentrifugation entfernt (13000 rpm, 15 min, RT), der Überstand in ein frisches Eppi überführt und die DNS durch Zugabe von 0,7 x Volumen Isopropanol und Zentrifugation (13000 rpm, 30 min, RT) gefällt. Das Pellet wurde mit kaltem 70% Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in ca. 30 µl H₂O aufgenommen. Die Isolierung der Plasmid-DNS in größerem und reinerem Maßstab erfolgte unter Verwendung des Nucleobond AX-Kits von Macheray-Nagel nach Anleitung des Herstellers.

11.2. Präparation von chromosomaler DNS

Um chromosomale DNA zu erhalten wurde die Methode von Grimberg et al. (Grimberg, 1989) angewendet. 2 ml einer ÜNK wurden abzentrifugiert (5 min, RT, 5000 rpm), 1 x in 1 ml TNE (10 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA) gewaschen und das Pellet schließlich in 270 µl TNEX (TNE mit 1% Triton X-100) resuspendiert. Nach Zugabe von 30 µl Lysozymlösung (5 mg/ml in H₂O) wurde der Ansatz für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 15 µl Proteinase K (20 mg/ml in H₂O) zugegeben, das Lysat durch invertieren gemischt und für mindestens 2 h bei 65°C inkubiert. Der Ansatz wurde in ein 2 ml „Phase lock gel“-Gefäß (Eppendorf) überführt, mit 400 µl Phenol (gesättigt in TE pH 8, Roth) versetzt und durch invertieren gemischt. Nach Zentrifugation (10 min, RT, 13000 rpm) wurden aus 300 µl der wäßrigen Phase die chromosomale DNA durch Ethanol-fällung gewonnen. Dazu wurden 30 µl 5 M NaCl und 750 µl 100% eiskaltem Ethanol zugegeben und der Ansatz vorsichtig durch Invertieren gemischt (Ausfällung der DNA). Nach Zentrifugation (30 min, 4°C, 13000 rpm) wurde das Pellet mit 70% eiskaltem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 75 µl H₂O oder TE aufgenommen.

11.3. DNS-Sequenzierung

Die Sequenzierung des Inserts basierte auf der „Kettenabbruch“-Methode von Sanger (Sanger, 1975). Die Sequenzreaktionen wurden unter Verwendung von BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kits (Applied Biosystems) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Als Template diente Insert-tragende (200-500 ng) Plasmid-DNS. Dazu wurden 10 pmol des jeweiligen Sequenzierprimers gegeben und mit H₂O auf ein Volumen von 8 µl aufgefüllt. Die Sequenzierung auf dem ABI Prism 377 DNA-Sequenzierungsgerät wurde freundlicherweise vom zentralen DNA-Labor des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie durchgeführt und die Sequenzen als Computerdateien zur Verfügung gestellt.

11.4. Klonierungstechniken

11.4.1. Restriktionsverdau von DNS

Der Verdau von DNS mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach der Anleitung des Herstellers (Puffer und Reaktionsbedingungen). Für analytische Zwecke wurde ca. 1 µg DNS in einem Volumen von 30 µl mit 5 U des entsprechenden Enzyms für 1-3 h verdaut. Präparativ wurden die Mengen und die Volumina je nach Bedarf erhöht.

11.4.2. Dephosphorylierung von restriktionsverdauten Vektoren

Damit die durch Restriktionsendonukleasen verdaute Vektoren nicht religieren, wurde dem Restriktionsansatz 2 U alkalische Phosphatase (shrimp alkaline phosphatase) zugegeben und 30-60 min bei 37°C inkubiert.

11.4.3. Ligation

Ligation der DNS Fragmente erfolgte mit der T4 DNS Ligase (Invitrogen) nach Standard Vorschriften (Silhavy, 1984; Maniatis, 1982).

11.4.4. Elektrophorese von DNS in Agarose-Gelen

Für die präparativen und analytischen Zwecke wurde die DNS elektrophoretisch in 0.8%igen Agarose (Gibco)-Gelen aufgetrennt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V. Als Gel- und Laufpuffer diente TAE. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1/5 Volumen Ladepuffer vermischt. Als Größenstandard wurde die „1 kb DNA“ Leiter (New England Biolabs bzw. Gibco) oder die SmartLadderTM (Eurogentec) verwendet. Nach der Auftrennung wurden die Gele in Ethiumbromid-Bad ca. 20 min gefärbt. Die aufgetrennten DNS-Fragmente wurden auf einem Transilluminator (Appligene) im UV-Licht bei 260 nm detektiert.

11.4.5. DNS-Isolierung aus Agarose-Gelen

Die Isolierung von DNS aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem QIAquick-Kit (Qiagen). Die gewünschten Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Dabei wurde darauf geachtet, daß die UV-Exponierung möglichst kurz ist, um UV-bedingte Mutationen zu vermeiden. Die DNS-Fragmente wurden aus den Agarose-Stückchen mit dem QIAquick-Kit nach Anleitung des Herstellers eluiert und in 30 µl bzw. 50 µl sterilem H₂O aufgenommen.

11.5. Southernblot

Das Southernblot Verfahren (Southern, 1975) wurde angewandt, um DNA-Fragmente durch Hybridisierung zu identifizieren. Die chromosomale DNA (~15 µg) wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und auf einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt, wodurch unter UV-Licht die DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden konnten. Zudem wurde das Gel zusammen mit einem fluoreszierenden Lineal fotografiert, um später den Größenmarker bzw. den Größenstandard auf die Membran übertragen zu können. Dies ermöglichte die Bestimmung der ungefähren Größen der hybridisierten Fragmente.

Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mittels einer Vakuum-Blot-Apparatur aus dem Agarosegel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N⁺) transferiert. Um eine hohe Transfereffizienz zu erreichen, erfolgte zunächst eine Depurinierung der DNA für 15 min mit einer 250 mM HCl-Lösung (Lösung I), anschließend wurde die DNA für 20 min in Lösung II (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) denaturiert. Nach Neutralisierung für 30 min in Lösung III (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris, pH 7,5) erfolgte der eigentliche Transfer für 60 min mit 20 x SSC (0,3 M NaCitrat, 3 M NaCl, pH 7). Die DNS wurde durch Crosslinking mit UV-Strahlung kovalent an die Membran gebunden, welche anschließend in einer Hybridisierungslösung (enthalten im ECL-Kit, angesetzt mit 0,5 M NaCl) für 1 h bei 42°C vorhybridisiert wurde. Danach wurde die markierte Sonde, 200 ng eines gereinigten PCR-Produkts, zugegeben und ü.N. bei 42°C hybridisiert. Die Markierung der Sonde mit Peroxidase erfolgte nach Herstellerangaben (ECL-Kit, Amersham Pharmacia Biotech). Am nächsten Tag wurde die Membran 2 x für 20 min und 1 x für 10 min mit Waschlösung 1 (6 M Harnstoff, 0,4% SDS, 0,5 x SSC, vorgewärmt auf 42°C) bei 42°C und 2 x für 5 min bei RT in Waschlösung 2 (2 x SSC) gewaschen. Die Detektion der hybridisierten DNA-

Fragmente erfolgte nach Inkubation der Membran für 1 min in Detektionslösung (enthalten im ECL-Kit) und anschließender Visualisierung der Peroxidaseaktivität über einen, für zunächst 2 min, aufgelegten Röntgenfilm. Je nach Signalstärke wurde anschließend nochmals ein Film für kürzere oder längere Zeit aufgelegt. Zur erneuten Hybridisierung mit einer weiteren Sonde wurde die Membran mit kochender 0,5%ige SDS-Lösung übergossen und auf einem Schüttler bis zur Abkühlung auf RT inkubiert. Nach kurzem Waschen in 2 x SSC konnte die Prozedur, beginnend mit der Vorhybridisierung, erneut erfolgen.

11.6. Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

E. coli

Kompetente Zellen wurden entweder nach der Elektrotransformation (Elektroporation)- (Calvin, 1988) oder nach der CaCl₂-Methode (Dagert und Ehrlich, 1979) hergestellt.

Für die CaCl₂ (Hitzeschock)-Methode wurden 50 ml einer Kultur mit der OD₆₀₀ von ca. 0,3-0,5 abzentrifugiert (Tischfuge, 12000 Upm, 1 min) und das Zellpellet in 25 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (Tischfuge, 5-10 min, 4°C, 12000 Upm) wurde das Zellpellet in 5 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ resuspendiert und weitere 20 min auf Eis gestellt. Die kompetente Zellen wurden zu je 100 µl aliquotiert und entweder sofort für die Transformation eingesetzt oder bei -76°C eingefroren.

Für die Transformation wurden die bei RT aufgetauten kompetenten Zellen mit 2-5 µl Plasmidlösung (bzw. bis zu 15 µl Ligationansatzes) versetzt und 15 min auf Eis gestellt. Zur Erleichterung der DNS-Aufnahme durch Hitzeschock wurde der Ansatz 50 sec lang bei 42°C inkubiert und danach wieder für 20 min auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde mit 900 µl LB-Medium gemischt und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz kurz abzentrifugiert (Tischfuge, 2 min, 12000 Upm, RT) in 100 µl LB-Medium aufgenommen und auf Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

Zur Herstellung elektro-kompetenter Zellen wurden 500 ml LB-Medium in einen Erlenmeyerkolben gegeben, mit 5 ml ÜNK des jeweiligen Stammes beimpft und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von ca. 0,8-1 angezogen. Nun erfolgten zwei Waschschrte (Zentrifugation: 5 min, 5000 rpm, 4°C) mit zunächst 200 ml, dann 100 ml eiskaltem H₂O. Nachdem die Zellen in 50 ml eiskaltem 15% Glycerin gewaschen wurden,

wird nach erneuter Zentrifugation der Überstand verworfen und das Zellpellet in dem restlichen Volumen (ca. 1 ml) resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden anschließend zu je 60-100 µl Aliquots bei -80°C gelagert. Für die eigentliche Transformation wurden die Aliquots auf Eis langsam aufgetaut, mit 1-3 µl Plasmid-DNA bzw. 1-4 µl des Ligationsansatzes versetzt, in eine Elektroporationsküvette (2 mm, EQUIBIO) überführt und kurz auf Eis inkubiert. Im Elektroporationsgerät wurde eine Spannung von 2,5 kV zur eigentlichen Transformation angelegt. Die Zellen wurden dann sofort in 1 ml LB überführt und für 1 h im Schüttler inkubiert. 100 µl und 900 µl der Kultur wurden jeweils auf eine Selektionsplatte (LB mit entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert.

H. influenzae

Die Herstellung kompetenter *H. influenzae* Zellen erfolgte nach Barcak (Barcak et al., 1991). Es wurden 35 ml vorgewärmtes BHI_s-Medium von der Platte angeimpft und bei 37°C geschüttelt, bis eine OD_{490 nm} von 0,4-0,6 erreicht wurde. Die Kultur wurde geerntet (5000 rpm, 5 min), der Überstand dekantiert und das Pellet in 10 ml vorgewärmten MIV-Medium (siehe Tabelle 2) resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5000 rpm, 5 min) wurden die Zellen in 35 ml MIV-Medium resuspendiert und für 90 min bei 37°C langsam bei 100 rpm geschüttelt. Danach wurden die Zellen entweder direkt für die Transformation eingesetzt oder als 1,25 ml Aliquots bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden 250 µl kompetente *H. influenzae* Zellen abzentrifugiert und mit 1 ml MIV-Medium gewaschen und anschließend in 250 µl MIV-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden dann in ein kleines Reagenzglas überführt und mit 1-5 µg chromosomaler bzw. 10-15 µg Plasmid-DNS versetzt. Danach wurden die Zellen 90 min ohne Schütteln und 90 min mit Schütteln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf die entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

Transformation des *H. influenzae* AK01 (BRAD)-Stammes

Der Stamm AK01 (BRAD) ist eine konstitutiv kompetente *H. influenzae* Mutante, die für Transformation benutzt wurde.

10 ml vorgewärmtes BHI_s-Medium wurden mit Bakterien direkt von der Platte angeimpft und bei 37°C geschüttelt bis die Zellen eine OD_{490 nm} von 0,8-1,0 erreichten. 1 ml der Zellen wurde dann in ein kleines Reagenzglas überführt und DNS dazugegeben (1-5 µg

chrom. DNS bzw. 10-15 µg Plasmid-DNS). Der Ansatz wurde für 30 min ohne Schütteln und dann 40 min mit Schütteln bei 37°C inkubiert und anschließend auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

11.7. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Technik wurde sowohl für präparative (Amplifikation der DNS-Fragmente für Ligation) wie auch für analytische Zwecke (Überprüfung der Transformanten) eingesetzt. Ein Standardansatz hatte folgende Zusammensetzung: 5 µl 10x PCR-Reaktionspuffer; 1 µl 10 mM dNTP-Mixes; je 0,4 µl 100 pmol/µl Primer; 0,5 µl TripleMaster- (präparativ) bzw. 0,5 µl Taq DNS-Polymerase (analytisch). Der Ansatz wurde mit sterilem H₂O auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Für analytische Zwecke wurde mit Hilfe einer Impfnadel eine Bakterienkolonie in den Ansatz überführt, wobei unter PCR-Bedingungen freigesetzte DNS als Template diente. Für die präparative Zwecke wurden 2 µl chromosomaler DNS (1:25 verdünnt) bzw. Plasmid-DNS (1:100 verdünnt) als Template eingesetzt.

Die Annealing-Temperatur hängt von der Schmelztemperatur der ausgewählten Primer ab. Die Elongationszeit hängt von der Länge des gewünschten Fragmentes und der verwendeten Polymerasen ab (TripleMaster ca. 800-1000 bp/min, 68°C; Taq 1000 bp/min, 72°C).

Standard PCR-Programm:

a) 1 x	1 min, 96°C	Denaturierung
b) 29 x	30 sec, 94°C	Denaturierung
	40 sec, x°C	Annealing
	t _{Elongation} , 68 bzw. 72°C	Elongation
c) 1 x	10 min, 68°C bzw. 72°C	

12. Sonstige Methoden

12.1. Herstellung des radioaktiv markierten Faktor V

Das ^{14}C -NMN und ^{14}C -NR wurde aus ^{14}C -NAD⁺ (Amersham) hergestellt. Für die Herstellung von ^{14}C -NMN wurde ^{14}C -NAD⁺ mit Schlangentoxin (Nukleotidpyrophosphatase, Sigma) im Shrimp alkalischen Phosphatase-Puffer für 1 h bei 37°C inkubiert. Bei der Herstellung von ^{14}C -NR enthielt der Ansatz zusätzlich noch Shrimp alkalische Phosphatase. Die Reaktionen wurden durch Kochen bei 95°C (3-4 min) beendet. Die Proteine wurden durch Zentrifugation (13000 rpm, 10 min) getrennt und Überstände via Dünnschicht-Chromatographie überprüft und bei -20°C gelagert.

12.2. Herstellung von AmPR

Die Herstellung von AmPR erfolgte ähnlich wie die Herstellung von ^{14}C -NR. Für die Herstellung von AmPR wurde das AAD (Sigma) mit Schlangentoxin (Sigma) und Shrimp alkalischer Phosphatase im Shrimp alkalische Phosphatase-Puffer für eine 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 95°C (3-4 min) beendet. Die Proteine wurden durch Zentrifugation (13000 rpm, 10 min) getrennt. 10 µl des Überstandes wurde in der Dünnschicht-Chromatographie (III.12.4) getrennt und die Produkte unter UV-Licht visualisiert.

12.3. Transportassay

Die *H. influenzae* Stämme wurden in BHI-Medium mit 10 µg/ml Hämin (*nadV*⁺-Stämme) bzw. mit 20 µg/ml Hämin und 10 µg/ml NAD⁺ (*nadV*⁻-Stämme) bis OD₄₉₀ von 2 angezogen. Die Zellen wurden dann geerntet (III.8) und in BHI-Medium gewaschen. Dann wurden die Zellen im BHI-Medium (ohne Supplemente) resuspendiert, auf OD₄₉₀ von 2 eingestellt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Das radioaktive ^{14}C -NAD⁺ wurde zugegeben (Endkonzentration 1 µM) und bei definierten Zeitintervallen wurden 500 µl Aliquots entnommen. Die entnommenen Proben wurden dann durch die angefeuchtete ME 25 Membran (Schleicher & Schuell) durch Anlegen von Vakuum gefiltert. Anschließend wurden die Membranen mit 5 ml 0,1 M NaCl gewaschen und in Szintillationsgefäße mit 5

ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima-Gold, Packard) gegeben. Die Messung der Radioaktivität in c.p.m. erfolgte im TriCarb 1500 Szintillationszähler (Packard).

12.4. Dünnschicht-Chromatographie (DC)

Die ^{14}C -radioaktiv markierten Proben wurden in einer Dünnschicht-Chromatographie getrennt. Ca. 10 μl der radioaktiven Proben wurde auf eine Cellulose F-Dünnschicht-Folie (Merck) aufgetragen. Als Standard wurde jeweils 1 μl von ^{14}C -NAD⁺, ^{14}C -NMN und ^{14}C -NR aufgetragen. Die Trennung der Proben erfolgte in einer Glaskammer für 10-12 h mit einem Ammoniumacetat/Ethanol-Gemisch (30:70) als Laufmittel (Kasarov et al., 1972). Nach der Auftrennung wurden die Folien getrocknet und für mehrere Tage auf einem radioaktiv sensitiven Film (Röntgenfilm) exponiert.

12.5. Radioaktivitätsmessungen

Die Radioaktivität in flüssigen Proben wurde nach Zugabe von 5 ml Ultima Gold-Szintillationscocktails in dem 1500 Tri-Carb Flüssigkeitsszintillationszähler der Firma Packard gemessen.

12.6. HPLC-Analyse der NadRHis₆-Reaktion mit AmPR als Substrat

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und die Durchführung ist in Kapitel III.12.2 beschrieben. Die Auftrennung der Reaktionsbestandteile erfolgte auf einer Symmetry C₁₈ Säule (4,6 x 250 mm; 5 μm ; Waters). Bei einer Flüssiggeschwindigkeit von 1 ml/min wurde eine isokratische Elution mit Puffer A (50 mM NaH₂PO₄, 8 mM Tetrabutylammoniumbromid, 8% Methanol) durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 254 nm mit einem 200-500 nm Photodiode Arraydetektor. Die HPLC-Analyse der NadR Reaktion mit AmPR wurde freundlicherweise von Anne Price Mortimer am Institut für organische Chemie durchgeführt.

13.1. Stammkonstruktionen

Im folgendem wird kurz allgemein die Konstruktion der gezielten Deletionsmutanten und Insertionsmutanten in *H. influenzae* dargestellt (siehe Abb.6).

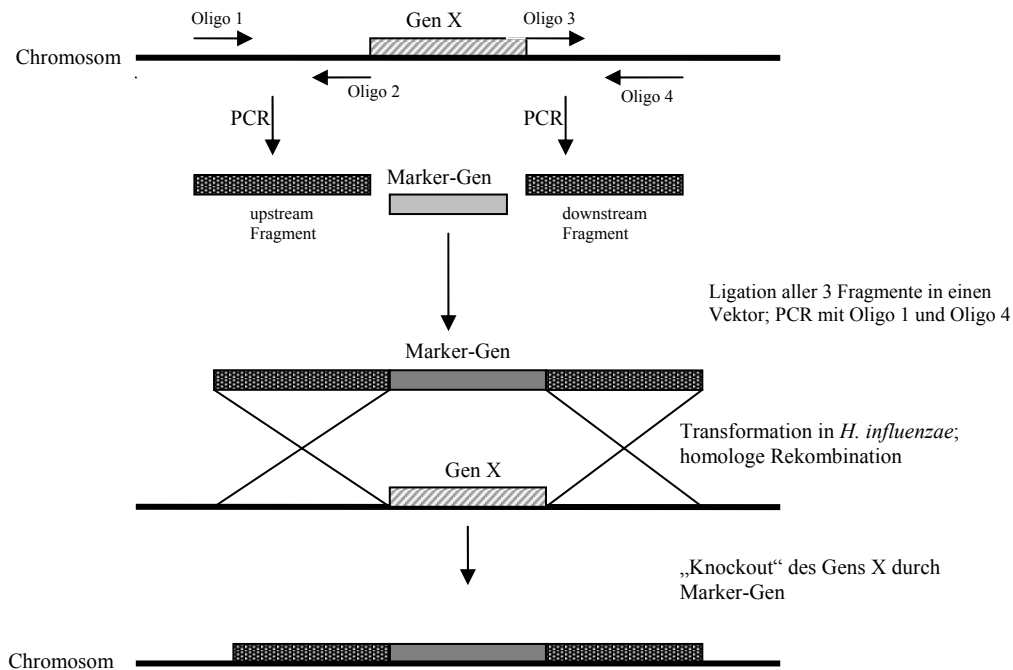


Abb. 6: Schematische Darstellung der Konstruktion von Deletionsmutanten in *H. influenzae*.

Für die gezielte Deletion eines Gens wurden ca. 300-600 bp lange Fragmente up- und downstream des Gen-kodierenden Bereichs mittels PCR amplifiziert. Als Template diente dabei die chromosomale DNS des Rd KW20 oder AK01 Stammes. Die up- und downstream Fragmente enthielten Restriktionsschnittstellen, welche zu denen des Marker-Gens bzw. des Vektors passten. Das Marker-Gen (meist kodierend für eine Antibiotika-Resistenz, z.B. *cat*-Gen) wurde entweder aus den entsprechenden Marker-tragenden Plasmiden herausgeschnitten oder mittels PCR amplifiziert. Die up- und downstream PCR-Fragmente wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und zusammen mit dem Marker-Gen in den pUC19 Vektor ligiert (III.11.4.3). Dieses pUCΔGenX-Plasmid diente dann als Template für die Amplifikation des „upstream-Marker-downstream“(Knock-out)-Fragments. Nach der PCR wurde das Knock-out Fragment in die kompetente *H. influenzae* Zellen transformiert (III.11.6). Die Marker tragende Klone (z.B.

Cm^r Klone) wurden dann auf entsprechenden Selektionsplatten isoliert und via Southern Blot und PCR überprüft.

Die Insertion der Suizid-Plasmide der pBADNadR-His₆-Reihe beruht auf dem gleichen Prinzip, nur dass hier ein cross-over Ereignis stattfindet, wodurch das ganze Plasmid ins Chromosom inseriert. Da pBADNadR-His₆ Plasmide den pUC-ori besitzen, können sie nicht in *H. influenzae* replizieren. Sie können nur dann erhalten bleiben, wenn sie ins Chromosom integriert werden. Dies ist wiederum nur dann möglich, wenn auf dem Plasmid Abschnitte vorhanden sind, die auch auf dem Chromosom vorhanden sind, so dass Rekombination stattfinden kann (siehe Abb.7). Diese Methode wurde benutzt, um *nadR*-His₆ Punktmutanten ins das Chromosom des SE01ΔRNK Stammes einzuführen. Dadurch steht das rekombinate *nadR*-His₆ unter Kontrolle des nativen Promotors und der nativen Rbs. Allerdings bleibt der Rest der nativen *nadR*-NMNAT Domäne auf dem Chromosom erhalten.

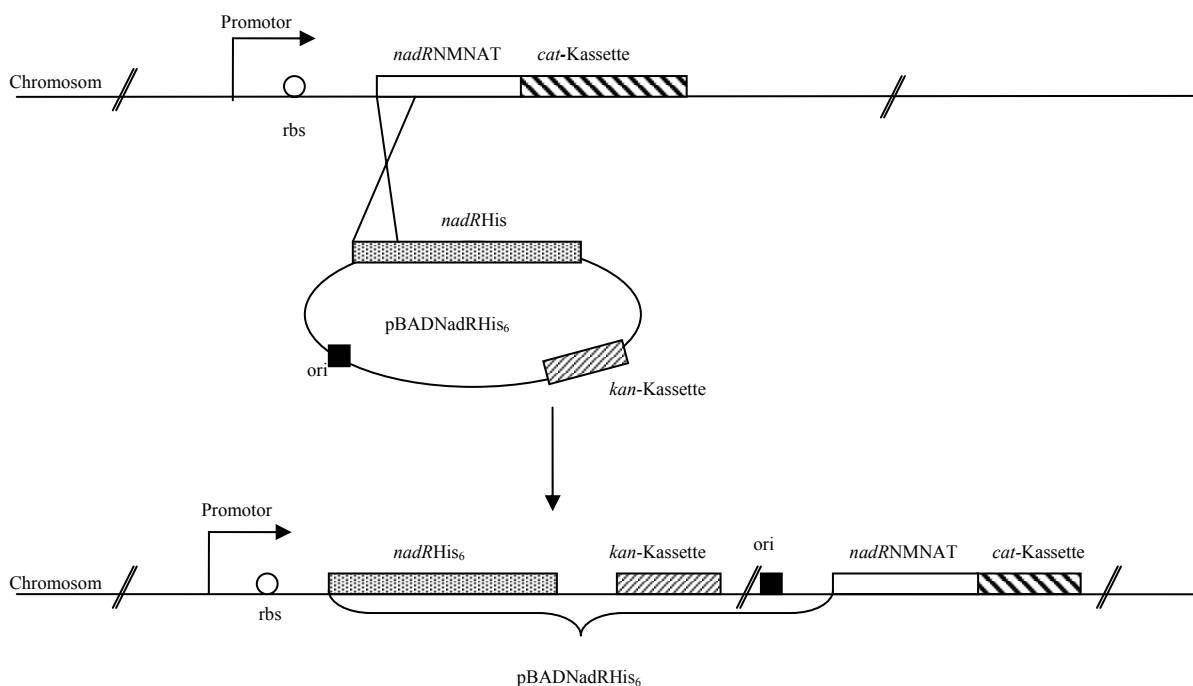


Abb. 7: Schematische Darstellung der Insertion des Suizid-Plasmids pBADNadRHis₆ ins Chromosom

13.2. Isolation von AmPR spontanresistenten *H. influenzae* Zellen

Für die Isolation von spontanresistenten AmPR-Mutanten wurden die Stämme SE01 (*nadV*⁺) und SE02pSEpnuCHis₆-N' (*nadV*⁺, Δ *pnuC*, *pnuCHis*₆⁺) verwendet, da sie sich in vorangegangenen Analysen (siehe Sauer et al., 2004) als AmPR-sensitiv erwiesen haben. Da diese Stämme jedoch die Fähigkeit haben Nam als Faktor V Quelle zu verwenden (*nadV*⁺ Hintergrund), können hier spontane Mutationen auftreten, die zwar die Aufnahme bzw. Verwertung von AmPR verhindern, aber dennoch über Nam NAD⁺ synthetisieren können. Die Selektion wurde auf BHI-Agar Platten, welche mit 65 μ M AmPR supplementiert wurden, durchgeführt. Die Stämme SE01 und SE02pSEpnuCHis₆-N' wurden auf diese Platten ausplattiert und mehrere einzeln wachsende Kolonien konnten erhalten werden. Diese wurden dann weiter durch mehrmaliges Ausstreichen auf AmPR-BHI-Agar Platten isoliert. Anschließend wurde chromosomale DNS aus AmPR-resistenten Klonen isoliert (III.11.2). Die *pnuC*- und *nadR*-kodierenden Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert. Die Fragmente wurden anschließend mindestens zweimal sequenziert, um eventuell auftretende Mutationen zu verifizieren.

14. Plasmid Konstruktionen

14.1. Plasmide für die Deletion der *H. influenzae* Gene

Für die Deletion der NadR RNK-Domäne wurden für die Amplifikation des upstream Bereichs die Oligos RNKko1EcoRI/RNKko2PstI verwendet. Das dabei entstandene Fragment war 374 bp lang. Für die Amplifikation des 701 bp langen downstream Bereichs wurden die Oligos nadR3PstIneu/nadR4HindIII (siehe Tabelle 6) verwendet. Nach der PCR wurden die gereinigten Fragmente mit *EcoRI/PstI* (upstream Bereich) bzw. *PstI/HindIII* (downstream Bereich) verdaut. Als Marker wurde die mit *PstI* verdaute *cat*-Gen Kasette verwendet. Die up- und downstream Fragmente wurden zusammen mit der *cat*-Kasette in den *EcoRI/HindIII* verdauten und dephosphorylierten pUC19 Vektor ligiert (III.12.4.3). Die Ligation wurde in den *E. coli* ER2566 Stamm transformiert. Cm^r Klone wurden dann isoliert und auf die Orientierung der *cat*-Kasette im pUC Δ RNK-Konstrukt

überprüft. Einer der Klone, bei welchen die *cat*-Kassette in der gleichen transkriptionellen Orientierung wie das *nadR*-Gen lag, wurde durch Sequenzierung überprüft und als Template für die Amplifizierung des „*nadR*-NMNAT-*cat*-HI0762“ Fragments mit den RNKko1EcoRI/*nadR*4HindIII Oligos verwendet.

Ähnlich wurden die pUC*nadR*Δ58C-term und pUCΔ*nadX* (HI0762) Plasmide hergestellt.

Das pUC*nadR*Δ58C-term Plasmid diente als Template für die Deletion der letzten 58 Aminosäuren im *NadR*-Protein. Oligos für das upstream-Fragment waren X1EcoRI/*nadR*Δ58-2PstI, und für den downstream Bereich *nadR*3PstI/*nadR*4HindIII. Als Marker wurde *PstI* verdaute *cat*-Kassette eingesetzt.

Das pUCΔ*nadX* Plasmid diente als Template für die Deletion des *nadX*-Gens (TIGR Annotation: HI0762). Für die Amplifikation des upstream Bereichs wurden die *nadX*1EcoRI/*nadX*2PstI Oligos und für den downstream Bereich die *nadX*3PstI/*nadX*4HindIII Oligos eingesetzt. Als Marker wurde auch hier die *PstI* verdaute *cat*-Kassette verwendet.

14.2. Expressionsplasmide

Expressionsplasmide dienten der Komplementation der inaktivierten Gene *in trans*. Es wurden dabei unterschiedliche Plasmide verwendet. Sofern nicht anderes angegeben, wurde die chromosomale DNS des *H. influenzae* Rd Stammes als Template für die PCR verwendet. Die PCR Reaktion wurde mit der TripleMaster „proof-reading“ Polymerase (Eppendorf) durchgeführt. Bei der Herstellung der Punktmutationen wurde die Pfu-Polymerase verwendet. Die Ligationsansätze wurden entweder in kompetente XL1 Zellen oder in TOP10F' Zellen transformiert. Klone, die entsprechende Plasmid-kodierte Resistenzen zeigten, wurden via Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

Im Fall von p*NadR*Kan wurde das *nadR*-Gen mit den Oligos *nadR*KpnIup2 und *nadR*KpnI-down amplifiziert. Das PCR-Fragment kodiert für das annotierte *nadR*-Gen, dessen Startkodon mit „gtg“ beginnt. Kurnasov et al., (2002) haben kürzlich das Methionin in der Position 52 als das eigentliche Startkodon vorgeschlagen. Das 1288 bp lange *nadR*-Fragment wurde aufgereinigt, mit *KpnI* verdaut und in den *KpnI* verdauten und dephosphorylierten Vektor pSSKanΔCm ligiert.

Ähnlich wurde das Komplementationsplasmid p*NadX*Kan hergestellt. Als Oligos wurden dabei *nadX*up*KpnI*-2 und *nadX*down*KpnI* verwendet. Das aufgereinigte und *KpnI* verdaute

PCR-Fragment wurde in den *KpnI* verdauten und dephosphorylierten Vektor pSSkan Δ Cm ligiert.

Für *nadX* wurde auch ein zweites Komplementationssystem hergestellt, pTrc99AnadX. Das *nadX*-Fragment wurde mit den Oligos nadXTrc99AupNcoI und nadXTrc99AdownBamHI amplifiziert. Dabei wurde die AS in der Position 2 von Valin zu Isoleucin verändert. Das PCR-Fragment wurde aufgereinigt, mit *NcoI* und *BamHI* verdaut und in den *NcoI/BamHI* verdauten und dephosphorylierten Vektor pTrc99A ligiert.

Für die Komplementation der RNK-Deletion mit dem rekombinanten NadR-His₆ wurde ein Suizidplasmid auf Basis von pBAD18Kan konstruiert. Dabei wurde das *nadRHis₆* aus dem pMMnadRHis₆ durch Verdau mit *XbaI* und *PmeI* ausgeschnitten. Das Fragment wurde dann anschließend in den *NheI* und *EcoRV* verdauten und dephosphorylierten pBAD18Kan ligiert (*XbaI* und *NheI* haben kompatible Überhänge und *EcoRV* und *PmeI* schneiden blunt). Dabei wurden aus dem pBAD18Kan der Arabinose-Promotor und ein Teil des *araC*-Gens entfernt. Das *nadRHis₆* hat somit auf dem pBAD18Kan Plasmid keinen Promotor und auch keine Rbs. Alle *nadRHis₆* Punktmutanten wurden auf die gleiche Weise in den pBAD18Kan kloniert.

14.2.1. Expressionsplasmide mit dem His-Tag

Die Konstruktion von pMMnadRHis₆ zur Expression von NadR mit C'-terminaler V5/His-Tag Fusion erfolgte mit dem pCR[®]T7 TOPO[®] TA Expression Kit (Invitrogen). Das *nadR*-Fragment wurde mit den Oligos nadRtopoI5' and nadRtopo3' amplifiziert. Nach der Aufreinigung wurde das PCR-Fragment nach der Anleitung des Herstellers in den pCR[®]T7 TOPO[®] Vektor ligiert und in die TOP10F' Zellen transformiert.

14.2.2. Expressionsplasmide mit dem GST-Tag

Für die Konstruktion von pGST-nadX zur Expression von NadX (HI0762) mit N'-terminaler GST- Fusion wurde das *nadX*-Fragment mit den Oligos nadX-GST5' und nadX-GST3' amplifiziert. Die Vektor bedingte Wahl der Restriktionsschnittstellen für das *nadX*-fragment führte zu Veränderung der ersten AS des NadX von Methionin zu Tryptophan. Das PCR-Fragment wurde aufgereinigt, mit *BamHI* und *EcoRI* verdaut und in den *BamHI/EcoRI* verdauten und dephosphorylierten pGEX-3X Vektor (Amersham) ligiert.

14.2.3. „Site-directed“ Mutagenese

Um gezielte AS-Substitutionen im NadR einzuführen, wurde der QuikChange[®] site-directed mutagenesis Kit (Stratagene) verwendet. Als Template wurde pMMnadRHis₆ verwendet. Die Oligos wurden so konstruiert, dass sie einen gezielten AS-Austausch ermöglichten, und falls möglich auch eine Restriktionsschnittstelle entweder direkt an der Austausch-AS oder in deren Nähe beinhalteten. Die jeweilige PCR wurde nach der Anleitung des Herstellers mit der Pfu-Polymerase durchgeführt. Die verwendeten Oligos sind in der Tabelle 6 aufgelistet. Durch den Verdau der PCR mit *DpnI* für 2 h bei 37°C wurde das Template-Plasmid abgebaut. Ca. 2-4 µl des Reaktionsansatzes wurden in die TOP10F' Zellen transformiert. Aus den Ap^r Klonen wurde das Plasmid isoliert und durch Sequenzierung auf AS-Austausch untersucht.

IV Ergebnisse

NadR von *H. influenzae* wurde kürzlich als bifunktionelles Protein charakterisiert, das zwei enzymatische Funktionen besitzt: die Ribosylnikotinamid-Kinase-(RNK) und NMN-Adenylyltransferase (NMNAT)-Aktivität (Kurnasov et al., 2002; Singh et al., 2002). Weiterhin wurde von mehreren Gruppen indirekt gezeigt, dass NadR für *H. influenzae* essentiell ist, da z. B. keine *nadR*-Knockout Mutationen erzeugt werden konnten. Da die NMNAT-Domäne alleine aufgereinigt und charakterisiert werden konnte (Kurnasov et al., 2002) wurde in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf die Charakterisierung der RNK-Domäne gelegt. Da NadR als essentiell galt, wurden die Versuche zunächst im Stamm SE01 durchgeführt, welches ein AK01 Derivat darstellt (Tabelle 4). SE01 besitzt eine chromosomale Kopie des *nadV*-Gens aus *H. ducreyi*, das für eine Nam-Phosphoribosyltransferase kodiert, welche aus PRPP und Nam NMN synthetisieren kann. Dadurch kann zumindest das Fehlen der NadR-RNK-Aktivität in *H. influenzae* kompensiert werden. Zusätzlich ist der SE01 Stamm konstitutiv kompetent, was genetische Manipulationen erleichtert.

1. Konstruktion der *nadR*-RNK-Deletionsmutanten führt zu den Stämmen SE01 Δ RNK und SE01 Δ RNK58

Die Konstruktion der RNK-Deletionsmutante SE01 Δ RNK, bei welcher die ganze RNK-Domäne deletiert wurde, und der SE01 Δ RNK58 Mutante, bei welcher nur die letzten 58 AS deletiert wurden, erfolgte wie in Kapitel III.13/III.14.1 beschrieben. Dabei wurde die gesamte RNK-Domäne bzw. die letzten 58 AS von NadR durch die *cat*-Kassette ersetzt. Im SE01 Δ RNK58 wurde die LID-Domäne deletiert, aber die Walker A und B-Motive blieben erhalten. Beide Stämme wurden anschließend mit dem Komplementationsplasmid pNadR_{Kan} (III.14.2) transformiert. pNadR_{Kan} hat eine Kanamycin-Resistenzkassette und die Expression von *nadR* steht unter der Kontrolle des *tet*-Promotors. Alle Konstruktionen wurden via Southernblot und Sequenzierung überprüft.

Es wurden Wachstumvergleiche sowohl auf Agar-Platten als auch im Flüssigmedium durchgeführt, dabei wurde BHI-Medium (nur mit Hämin supplementiert; Hämin mit verschiedenen NAD⁺ und NR-Konzentrationen) und Minimalmedium (Hämin + verschiedene NR und NAD⁺-Konzentrationen) verwendet. Die jeweiligen Deletionsmutanten zeigten keine signifikanten Wachstumsunterschiede im Vergleich zu

SE01 (Wt) und den Stämmen mit dem Komplementationsplasmid pNadR_{Kan} (Daten nicht gezeigt). Allerdings waren die Deletionsmutanten empfindlicher hinsichtlich der eingesetzten Antibiotika-Konzentrationen. Obwohl *H. influenzae* normalerweise bis zu 2 µg/ml Cm verträgt, musste für die Stämme SE01ΔRNK und SE01ΔRNK58 die Cm-Konzentration auf 0,5 µg/ml erniedrigt werden, um ein gutes Wachstum zu ermöglichen.

1.1. Essentialität der RNK-Domäne

Um zu untersuchen, ob die NMNAT-Domäne alleine für die Lebensfähigkeit von *H. influenzae* ausreichend ist, wurde die chromosomale DNS aus SE01ΔRNK isoliert (III.11.2) und in AK01 (*nadV*) und als Kontrolle parallel in AK01pNadR_{Kan} (*nadR*⁺) und SE01(*nadV*⁺) transformiert (III.11.6). *H. influenzae* kann ihre eigene DNS sehr effektiv aufnehmen und über homologe Rekombination in das Chromosom integrieren. Daher können Deletionen relativ einfach in einen neuen Stamm eingebracht werden, in dem man den Rezipienten-Stamm mit der chromosomalen DNS des Donor-Stammes transformiert. Falls die NMNAT-Domäne alleine für die Lebensfähigkeit der Zellen ausreichend ist, dann sollten die RNK-Deletionsmutanten (*nadR*ΔRNK::*cat* und *nadR*ΔRNK58::*cat*) in das AK01-Chromosom integriert werden können. Der AK01 Stamm mit den jeweiligen Deletionsmutanten wäre dann Cm^r und würde nicht auf Nam wachsen.

Das Verhältnis in der Anzahl der Cm^r-Klone AK01/SE01 bzw. AK01/AK01pNadR_{Kan} betrug ca. 1/400. Allerdings hatten alle AK01-Cm^r-Klone zusätzlich zu der RNK-Deletion auch *nadV* in das Chromosom integriert, da alle Cm^r-AK01-Klone auch auf Nam als einziger Faktor V Quelle wachsen konnten.

Die *nadR*ΔRNK58::*cat* Deletion konnte auch nur zusammen mit *nadV* ins AK01 Chromosom transferiert werden. Die Verhältnisse der Transformationshäufigkeit zwischen AK01/SE01 und AK01/AK01pnadR_{Kan} waren ähnlich (1/350) wie bei der *nadR*ΔRNK::*cat* Transformation.

Die Tatsache, dass RNK-Deletionen nur zusammen mit dem *nadV*- Gen ins AK01 Chromosom integriert werden konnten und die relativ hohe Häufigkeit dieser Doppelrekombination (1 von 400) zeigt indirekt, dass nicht nur die RNK-Domäne sondern auch die letzten 58 AS essentiell für die Lebensfähigkeit von *H. influenzae* sind.

2. Charakterisierung der RNK-Deletionsmutante SE01ΔRNK

In weiteren Versuchen sollte die NAD⁺-Synthese Fähigkeit der SE01ΔRNK Mutante untersucht werden. Dies wurde zunächst mit Rohextrakten aus SE01(Wt), SE01ΔRNK und SE01ΔRNK_{pnadR}Kan (SE01ΔRNK_{compl}) in einem Assay mit radioaktiven ¹⁴C-NR und ¹⁴C-NMN als Substraten untersucht (siehe III.10.11). Die Proteinkonzentration in den Proben betrug ca. 2 mg/ml. Die Proteinmenge war in allen Proben vergleichbar, was auch via SDS-PAGE überprüft wurde (Daten nicht gezeigt). Die entstandenen Produkte wurden in der Dünnschicht-Chromatographie (DC) aufgetrennt und auf einem Röntgenfilm nachgewiesen (III.12.4). Die Ergebnisse sind in der Abb. 8 dargestellt.

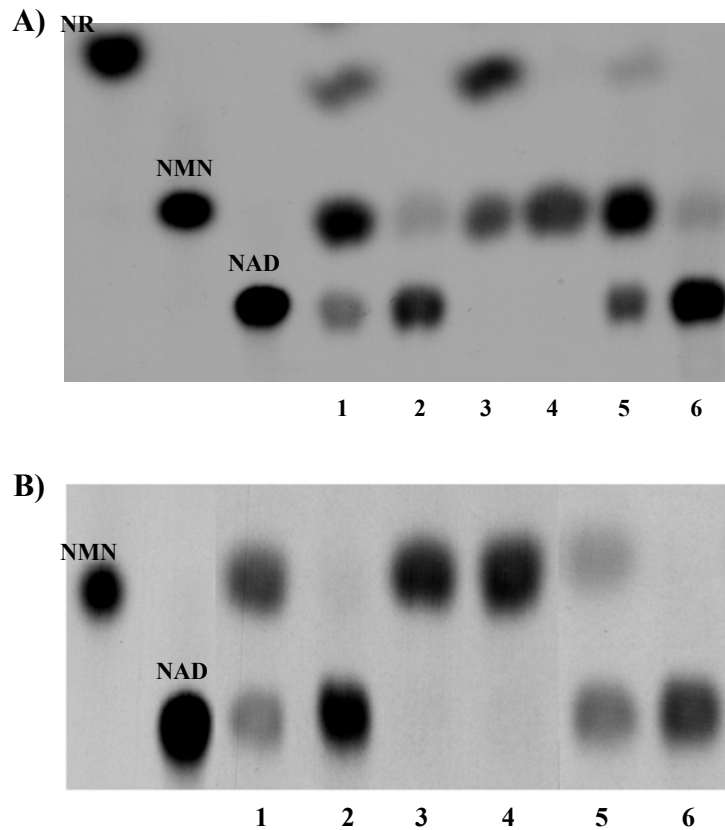


Abb. 8: NadR-Aktivität in Rohextrakten (Gesamtzellextrakt). Rohextrakte aus SE01(Wt, *nadV*⁺), SE01ΔRNK (*nadV*⁺, RNK⁻) und SE01ΔRNK_{compl} (*nadV*⁺, RNK⁻, *nadR*⁺) wurden mit ¹⁴C-NR (8/A) und ¹⁴C-NMN (8/B) inkubiert und in der Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt. Als Standard wurden jeweils 1 μl ¹⁴C-NR, ¹⁴C-NMN und ¹⁴C-NAD⁺ aufgetragen. Spuren 1-2 : Rohextrakt aus SE01 (Wt, *nadV*⁺) nach 2 min (1) und 30 min (2) Inkubation; Spuren 3-4: Rohextrakt aus SE01ΔRNK (*nadV*⁺, RNK⁻) nach 2 min (3) und 30 min (4) Inkubation; Spuren 5-6: Rohextrakt aus SE01ΔRNK_{compl} (*nadV*⁺, RNK⁻, *nadR*⁺) nach 2 min (5) und 30 min (6) Inkubation.

Sowohl SE01 (Wt) und SE01 Δ RNK_{compl} waren wie erwartet in der Lage aus ^{14}C -NR und aus ^{14}C -NMN NAD^+ zu synthetisieren. Überraschend aber waren die Ergebnisse für SE01 Δ RNK: erwartet wurde dass die NMNAT-Aktivität unbeeinträchtigt bleibt, aber die RNK-Aktivität sollte aufgrund der Deletion der RNK-Domäne nicht vorhanden sein. Die Ergebnisse waren aber genau umgekehrt: es konnte eine RNK-Aktivität beobachtet werden, aber keine NMNAT-Aktivität.

Um zu überprüfen, ob dies auch *in vivo* der Fall ist, wurde ein weiterer Versuch, diesmal mit intakten Zellen, durchgeführt („whole cell labeling“). Die intakte SE01, SE01 Δ RNK und SE01 Δ RNK_{compl} Zellen wurden mit radioaktiven ^{14}C -Nam und ^{14}C -NR inkubiert. Nach bestimmten Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und wie in Kapitel III.10.10 beschrieben behandelt und nach der Dünnschicht-Chromatographie auf dem Röntgenfilm detektiert. Sofern die NMNAT-Aktivität *in vivo* vorhanden ist, sollte aus dem über *nadV* synthetisiertem NMN das NAD^+ gebildet werden, dies sollte bei allen drei Stämmen nachzuweisen sein. Dagegen sollte in dem Ansatz mit NR als Substrat die NAD^+ Synthese nur bei SE01 und SE01 Δ RNK_{compl} zu sehen sein. Die Mutante SE01 Δ RNK sollte nicht fähig sein NR als Substrat zu nutzen. Die Ergebnisse sind in der Abb. 9 dargestellt.

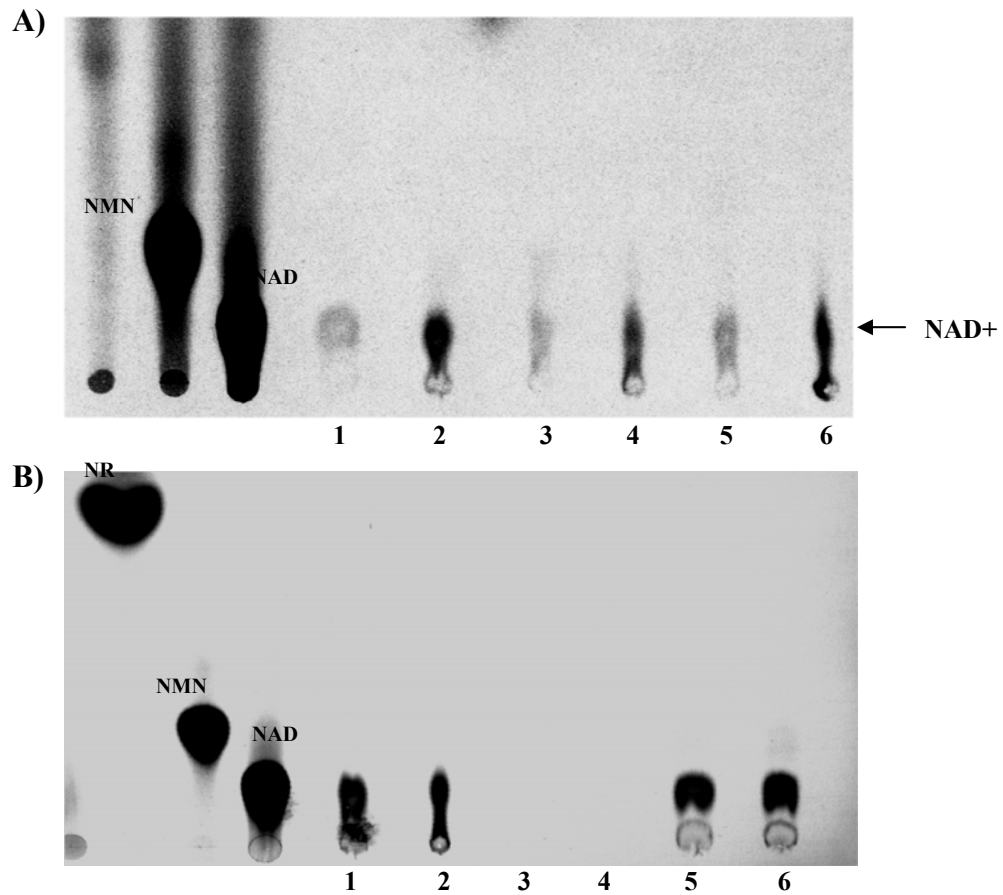


Abb. 9: NadR-Aktivität *in vivo* in SE01 (Wt), SE01 Δ RNK und SE01 Δ RNK $_{\text{compl}}$ mit ^{14}C -Nam (9/A) und ^{14}C -NR (9/B) als Substrat. Intakte Zellen wurden mit ca. $1\mu\text{M}$ ^{14}C -Nam (A) und ^{14}C -NR (B) inkubiert und anschließend aufgeschlossen. Die Zellysate wurden in der Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt. Als Standard wurden jeweils $1\mu\text{l}$ ^{14}C -NR, ^{14}C -NMN und ^{14}C -NAD $^{+}$ aufgetragen. Spuren 1-2 : Lysat aus SE01 (Wt, $nadV^{+}$) nach 2 min (1) und 30 min (2) Inkubation; Spuren 3-4: Lysat aus SE01 Δ RNK ($nadV^{+}$, RNK $^{-}$) nach 2 min (3) und 30 min (4) Inkubation; Spuren 5-6: Lysat aus SE01 Δ RNK $_{\text{compl}}$ ($nadV^{+}$, RNK $^{-}$, $nadR^{+}$) nach 2 min (5) und 30 min (6) Inkubation.

Die Versuche mit intakten Zellen zeigen, dass die NMNAT-Aktivität in der SE01 Δ RNK Mutante vorhanden ist, also ist davon auszugehen, dass das verkürzte NadR-Protein *in vivo* funktionsfähig ist. Das Fehlen der NMNAT-Aktivität in den Rohextrakten aus der SE01 Δ RNK Mutante könnte durch die Instabilität des verkürzten NadR-Proteins erklärt werden, so dass nach dem Zellaufschluss das NadR Δ RNK entweder nicht mehr aktiv ist oder sogar komplett abgebaut wird. Die NR-Kinase-Aktivität in den SE01 Δ RNK-Rohextrakten kommt vermutlich durch Aktivität anderer Nukleosid-Kinase, die zwar NR auch als Substrat erkennt, allerdings *in vivo* die RNK-Aktivität von NadR nicht kompensieren kann, da die SE01 Δ RNK NR nicht für NAD $^{+}$ -Synthese verwenden kann (Abb. 9/B), wie in späteren Versuchen noch ersichtlich wird.

2.1. RNK-Deletion und Transport von NR

Da bei *E. coli* und *S. typhimurium* NadR-Mutationen beschrieben wurden, bei welchen auch die Transportfähigkeit von NMN bzw. NR beeinträchtigt war, wurde die NR-Aufnahme bei SE01 Δ RNK und SE01 Δ RNK_{compl} im Vergleich zu SE01 untersucht. Als Faktor V-Quelle wurde in diesen Versuchen $^{14}\text{C-NAD}^+$ verwendet. Nach der Zugabe von $^{14}\text{C-NAD}^+$ (1 μM Endkonzentration) wurden nach 2, 5, 10 und 15 min Aliquots entnommen, gefiltert, gewaschen und in einem Szintillationscounter gemessen (siehe III.12.2). Ausgewertet wurde die Akkumulation des ^{14}C -Labels in den Zellen, dabei wurde die Gesamtmenge der zugegebenen Radioaktivität als 100% festgesetzt. Das Ergebnis ist in der Abb. 10 dargestellt.

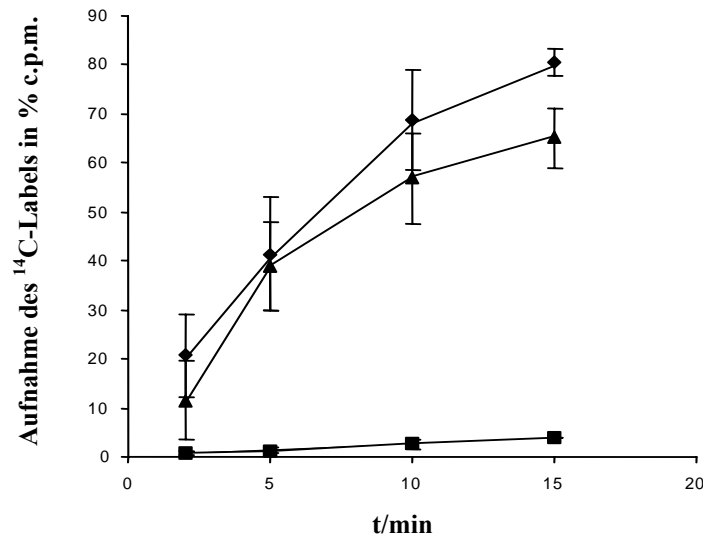


Abb. 10: Aufnahme des ^{14}C -Labels. Dargestellt ist die Akkumulation des ^{14}C -Labels ausgehend von $^{14}\text{C-NAD}$ als Faktor V-Quelle für SE01 (Wt, ♦), SE01 Δ RNK (■) und SE01 Δ RNK_{compl} (▲). Jeder Punkt präsentiert einen Durchschnittswert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen. Die Endkonzentration von $^{14}\text{C-NAD}^+$ betrug 1 μM .

Die Abb. 10 zeigt, dass der Wt (SE01) nach 15 min ca. 80% des eingesetzten radioaktiven Labels aufnahm, die SE01 Δ RNK Mutante jedoch nur 2-5% des Labels inkorporieren konnte. Dieser Phänotyp konnte durch das pNadR_{Kan}-Plasmid im SE01 Δ RNK_{compl}-Stamm komplementiert werden, das ähnlich wie der Wt ca. 70% des ^{14}C -Labels aufnahm. Das zeigt, dass die Transport-Defizienz durch das Fehlen der NadR-RNK-Domäne zustande kommt.

Ähnliche Defizienz in der Aufnahme konnte auch bei der Deletion des NR-Transporters *pnuC* beobachtet werden (Herbert et al., 2003). Diese Defizienz in der Aufnahme könnte auch der Grund sein, warum die unbekannte Kinase, dessen Aktivität in Rohextrakten der SE01 Δ RNK Mutante zu beobachten war, die RNK-Kinase *in vivo* nicht ersetzen kann. Da nur NadR den Transport von NR unterstützt, kann kein (bzw. kaum) NR in die Zelle gelangen und daher ist die beobachtete Aktivität der unbekanntenen Kinase *in vivo* nicht relevant.

3. Spontan 3-Aminopyridin (AmPR) -resistente *H. influenzae* Isolate haben Mutationen im *nadR*-Gen

Aus früheren Studien war bekannt, dass NAD⁺-Analog 3-Aminopyridin-Adenin-Dinukleotid (AAD) und seine Derivate 3-Aminopyridin-Mononukleotid (AMN) und 3-Aminopyridin (AmPR) wachstumshemmend auf *H. influenzae*, aber nicht auf *E. coli* und *S. aureus* wirken (Denicola-Seoane et al., 1990; Godek et al., 1990). Das AAD unterscheidet sich von NAD⁺ durch das Fehlen der Carbonylgruppe am Nikotin-Ring. Das AmPR wirkte beim molaren Verhältnis zu NR von 1:10 wachstumshemmend (Godek et al., 1990). Dieser Assay wurde von E. Sauer modifiziert (s. Sauer et al., 2004) und durch Verwendung von verschiedenen Mutanten (z. B. Δ hel, Δ *pnuC*, Δ OmpP2), konnte anhand der Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber AAD bzw. AmPR gezeigt werden, dass für diese NAD⁺ bzw. NR Analoga die gleiche Aufnahme-Route wie für das NAD⁺ verwendet wird (Sauer et al., 2004). Die Methode wurde dann weiter verwendet, um PnuC-Mutanten zu bekommen, die kein AmPR aufnehmen (s. III.13.2). Dafür wurden folgende Stämme verwendet: SE01(*nadV*⁺) und SE02pSEpnuCHis₆-N' (SE01 Δ *pnuC*, *nadV*⁺, *pnuCHis*₆-N'⁺); beide zeigten bei den ursprünglichen Analysen Sensitivität gegenüber dem AmPR (Sauer et al., 2004). Da sie jedoch das *nadV*-Gen besitzen, können diese Stämme auch Nam als Faktor V Quelle verwerten. Daher können in diesen Stämmen Mutanten erhalten werden die in der NR-Aufnahme und der NMN-Synthese beeinträchtigt sind, aber dennoch leben können, da sie aus Nam NAD⁺ synthetisieren können. Es konnten in der Tat spontan-resistente *H. influenzae* erhalten werden. Es zeigte sich bei der Sequenzierung dieser Mutanten jedoch, dass fast alle AmPR^r-Klone Mutationen im *nadR*-Gen besitzen. Bei keinem der sequenzierten AmPR^r-Klone wurden Mutationen im *pnuC* gefunden. Nur wenige der Klone hatten in beiden Genen keine Mutationen. Die Sequenzierung von *nadR* zeigte, dass die meisten Mutationen in der RNK-Domäne, insbesondere im Walker A

Motif clustern, allerdings konnten auch weitere Mutationen außerhalb der RNK Domäne beobachtet werden. Die Ergebnisse der *nadR*-Sequenzierung bei den AmPR-resistenten SE01/SE02pSEpnuCHis₆-N' sind in Tabelle 8 dargestellt.

Mutation	AS-Position	Mutationen 5'-3'	Motif/Domäne
AS-Austausch	52	ATG (Met)→ATC (Ile)	NMNAT (putativer Startcodon nach Kuransov et al., 2002)
	83	AGT (Ser)→CGT (Arg)	NMNAT
	161	CAT (His)→CCT (Pro)	NMNAT
	193	GAT (Asp)→TAT (Tyr)	NMNAT
	201	GTG (Val)→TTG (Leu)	NMNAT
	214	TGG (Trp)→TGT (Cys)	NMNAT
	222	CGT (Arg)→AGT (Ser)	NMNAT
	222	CGT (Arg)→CAT (His)	NMNAT
	232	TTA (Leu)→TGA (Stop)	Walker A/ RNK
	233	GGG (Gly)→GAG (Glu)	Walker A/ RNK
	234	GGA (Gly)→GAA (Glu)	Walker A/ RNK
	236	AGC (Ser)→AAC (Asn)	Walker A/ RNK
	255	GCG (Ala)→GAG (Glu)	RNK
	306	GAT (Asp)→AAT (Asn)	Walker B/ RNK
	311	CAA (Gln)→AAA (Lys)	RNK
	359	CAA (Gln)→TAA (Stop)	LID-Domäne/ RNK
	380	GAG (Glu)→TAG (Stop)	RNK
„frame shift“ Mutation (Insertion)	234	GGA→GGG A	Walker A/ RNK
	234	GGA→GGG GA	Walker A/ RNK
	372	GAT→GTG TTT AGAT	RNK
„frame shift“ Mutation (Duplikation)	394	AAA→ATC TTG ATC GCT ATA ACC AAG TTA AA	RNK
„frame shift“-Mutation (Deletion)	240	AGC→GC	Walker A/ RNK
	283/284	GCG CTT→GCT T	RNK
„In frame“ Deletion	235-238	GGA GAA AGC AGT GGT AAA→GGA AAA	Walker A/ RNK

Tabelle 8: Mutationen im *nadR*-Gen, die zu Resistenz gegenüber AmPR führen. Alle *nadR*-Mutanten wurden mindestens zweimal sequenziert. (Daten werden mit E. Sauer geteilt; siehe Sauer et al., 2004)

4. Wie wirkt AmPR auf NadR?

Die von uns durchgeführten Studien zeigten, dass AmPR-Derivate nur dann wachstumshemmend wirken, wenn das AmPR in die Zelle gelangt (Sauer et al., 2004). So war die *pnuC*-Deletionsmutante (NR-Transporter) resistent gegenüber AmPR und AAD, während die *hel*-Deletionsmutante (NMN-Phosphatase) resistent gegenüber AAD, aber sensitiv gegenüber AmPR war (siehe Sauer et al., 2004). Weitere Analyse von spontan-resistenten AmPR-Klonen in Stämmen, die normalerweise AmPR-sensitiv sind zeigte, dass die meisten dieser AmPR^r-Klone Mutationen im *nadR*-Gen haben (siehe Tabelle 8). Aufgrund dieser Ergebnisse könnte die wachstumshemmende Wirkung von AmPR aufgrund zweierlei Mechanismen zustande kommen: (i) Direkte Inhibition von NadR oder (ii) NadR könnte AmPR als Substrat erkennen und daraus AAD synthetisieren, welches dann NAD⁺ in Redoxreaktionen verdrängt. Dadurch kommt es zum Stillstand des Metabolismus und zum Tod der Zelle.

4.1. Konstruktion und Reinigung des rekombinanten NadRHis₆

Um zu untersuchen, ob NadR AmPR als Substrat erkennt, sollte zunächst NadR gereinigt werden. Um die Aufreinigung des NadR Proteins zu erleichtern, wurde das *nadR*-Gen in pCR[®]T7/CT-TOPO kloniert (III.14.2.1) und das entstandene Plasmid wurde pMMNadRHis₆ genannt. Dadurch war es möglich NadR als rekombinantes Protein mit C'-terminalen V5/His₆-Tag zu überexprimieren und über Ni²⁺-Matrix-Säulen aufzureinigen (s. III.10.7). In der Abb. 11 sind die Reinigungsschritte von NadRHis₆ dargestellt.

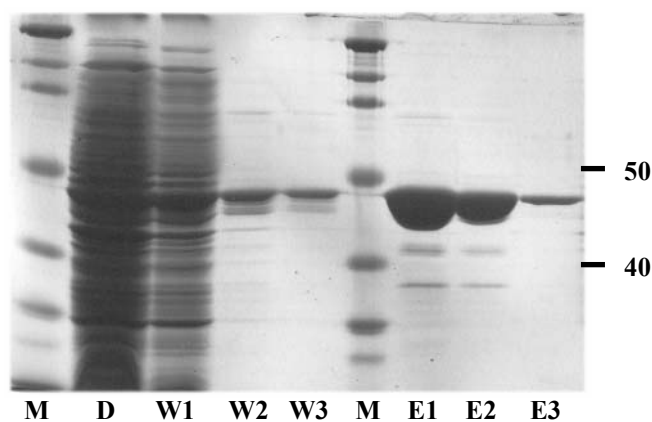


Abb. 11: Reinigungsschritte von NadRHis₆. D: Durchlauf; W1: Waschschrift 1; W2: Waschschrift 2; W3: Waschschrift 3; E1: Elutionsschrift 1; E2: Elutionsschrift 2; E3: Elutionsschrift 3; M: Größenstandard in kDa. Einzelne Reinigungsschritte wurden im 12,5 % Comassie-gefärbten PAA-Gel analysiert.

Die Eluate wurden auch im Immunoblot überprüft, dabei wurde nur eine Bande knapp unterhalb der 50 kDa Markerbande beobachtet, was der errechneten Größe von ca. 47 kDa entspricht (Daten nicht gezeigt). Die Proteinkonzentration im E1-Eluat, das für die späteren Versuche verwendet wurde, betrug ca. 3,5 mg/ml.

4.2. *In vitro* Aktivität von NadRHis₆ mit und ohne AmPR

Die Aktivität vom NadRHis₆ wurde im Assay mit radioaktiven Substraten ¹⁴C-NR und ¹⁴C-NMN (je ca. 40 μM) mit 2 mM ATP und 10 mM MgCl₂ in 100 mM HEPES-NaOH, pH 7,5 bei 37°C überprüft (III.10.9). Die Proteinkonzentration in den Ansätzen betrug ca. 0,04 mg/ml. Die Reaktionsprodukte wurden in der Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt und auf einem Röntgenfilm visualisiert (III.12.4). Um zu sehen, ob AmPR inhibierend auf NadR wirkt, wurden parallel auch Ansätze, die zusätzlich 1 mM AmPR (1:25) enthielten, getestet. In einer dritten Ansatzreihe sollte getestet werden, ob AmPR vom NadRHis₆ als Substrat angenommen wird, dafür wurde AmPR und als Kontrolle NR (jeweils 1 mM) mit ¹⁴C-ATP (75 μM) inkubiert. Die Ergebnisse sind in der Abb. 12 dargestellt.

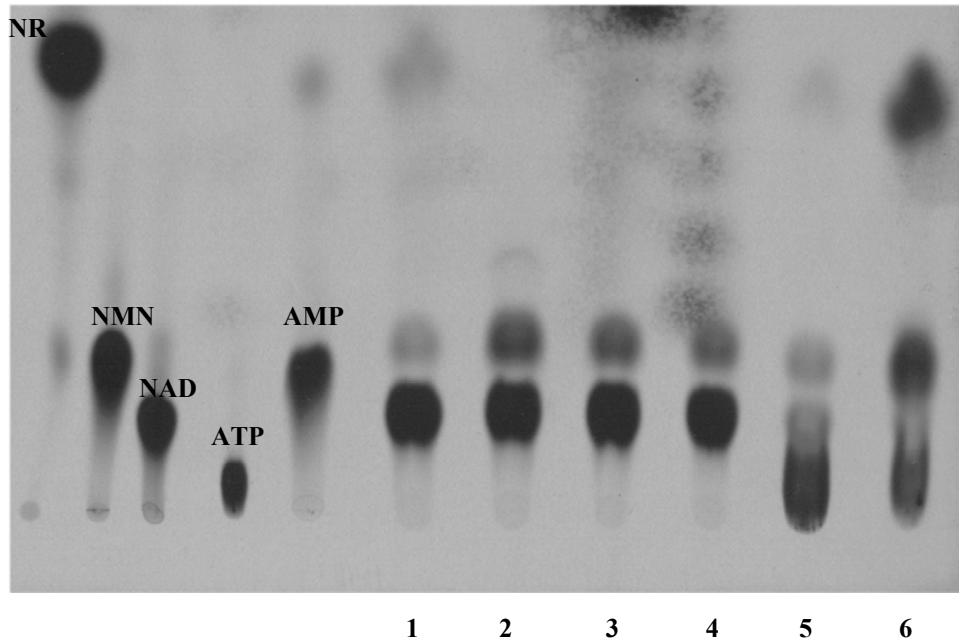


Abb. 12: *In vitro* Aktivität vom gereinigten NadRHis₆ mit und ohne AmPR. Der Standardansatz enthielt 0,04 mg/ml Protein, 2 mM ATP und 10 mM MgCl₂ in 100 mM HEPES-NaOH, pH 7,5. Als Standard wurden ¹⁴C-NR, ¹⁴C-NMN, ¹⁴C-NAD⁺, ¹⁴C-ATP und ¹⁴C-AMP aufgetragen. 1: ¹⁴C-NR als Substrat (40 μM) ; 2: ¹⁴C-NMN als Substrat; 3: ¹⁴C-NR mit 1 mM AmPR; 4: ¹⁴C-NMN mit 1 mM AmPR; 5: NR (1 mM) mit ¹⁴C-ATP (75 μM); 6: AmPR (1 mM) mit ¹⁴C-ATP (75 μM).

Die Synthese von $^{14}\text{C-NAD}^+$ aus $^{14}\text{C-NR}$ (Abb.12/ Spur 1) und $^{14}\text{C-NMN}$ (Abb.12/ Spur 2) zeigt, dass beim gereinigten NadRHis₆ beide Domänen, die RNK- und die NMNAT aktiv sind. Zugabe von 1 mM AmPR (molarer Verhältnis zu $^{14}\text{C-NR}$ bzw. $^{14}\text{C-NMN}$: 1:25) hatte keine signifikante Auswirkung weder auf die RNK-Aktivität (Abb.12/Spur 3) noch auf die NMNAT-Aktivität (Abb.12/Spur 4). In den Spuren 5 bzw. 6 wurde nicht radioaktiv markiertes NR bzw. AmPR mit $^{14}\text{C-ATP}$ inkubiert. Hier sollte getestet werden, ob AmPR als Substrat für NadR dient. In beiden Spuren konnte eine Abnahme des $^{14}\text{C-ATP}$ und Entstehung von $^{14}\text{C-AMP}$ beobachtet werden. Das in der Dünnschicht verwendete Laufmittel erlaubt jedoch keine genaue Trennung zwischen dem AMP und NMN und da zusätzlich auch kein $^{14}\text{C-ADP}$ als Marker zur Verfügung stand, ist es hier schwer zu sagen, ob $^{14}\text{C-NAD}^+$ entsteht oder nur $^{14}\text{C-ADP}$ zu sehen ist. Da allerdings keine Inhibierung der NadR-Aktivität in Anwesenheit von 1 mM AmPR zu sehen war, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass AmPR von NadR als Substrat erkannt werden kann.

Um dies nachweisen zu können, wurde eine HPLC-Analyse durchgeführt. Dafür wurde 2 mM AmPR mit 4 mM ATP, 10 mM MgCl₂ und 0,05 mg/ml NadRHis₆ bei 37°C über Nacht inkubiert (III.10.12). Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne das NadRHis₆ Protein parallel inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 5 min bei 95°C inkubiert, um die Reaktion zu stoppen, und dann für 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Überstände wurden mittels HPLC analysiert (s. III.12.6). Die Ergebnisse sind in der Abb. 13 dargestellt.

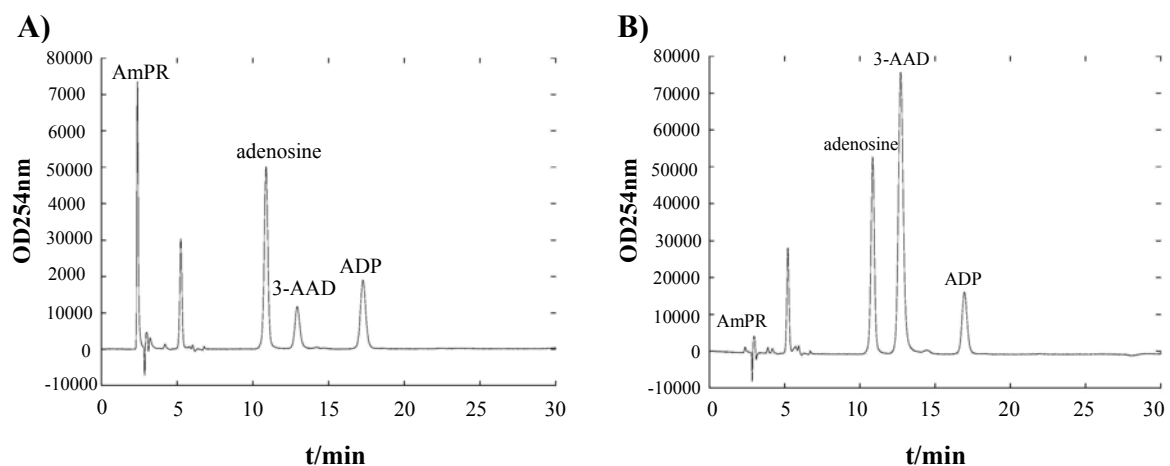


Abb. 13: HPLC-Analyse der NadR-Aktivität mit AmPR als Substrat. (A) HPLC-Profil des Kontrollansatzes mit 2 mM AmPR, 4 mM ATP, 10 mM MgCl₂ in 100 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, inkubiert ü. N. bei 37°C. (B) HPLC-Profil des Ansatzes mit 2 mM AmPR, 4 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 0,05 mg/ml NadRHis₆ in 100 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, inkubiert ü. N. bei 37°C. Die jeweiligen Substanzen wurden anhand der Standards bestimmt.

In der Abb.13/A ist das HPLC-Profil des Kontrollansatzes ohne NadRHis₆ und in der Abb.13/B das HPLC-Profil des Ansatzes mit NadRHis₆ dargestellt. Wie man sehen kann, ist in dem Ansatz mit NadRHis₆ eine deutliche Zunahme von AAD mit der Abnahme von AmPR gekoppelt. Die HPLC-Analysen zeigen deutlich, dass NadR aus AmPR in Anwesenheit von ATP AAD synthetisieren kann.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann man AmPR als einen reversiblen kompetitiven Inhibitor einstufen, weil es mit NR um das aktive Zentrum konkurriert, allerdings inhibiert es die NadR-Aktivität *per se* nicht. Die eigentliche wachstumshemmende Wirkung entsteht durch das AAD, welches aus AmPR via NadR synthetisiert wird, und in NAD⁺-abhängigen Redox-Reaktionen das NAD⁺ verdrängt bzw. seine Bindungsstellen besetzt, was letztendlich zum Stillstand des Metabolismus führt.

5. Charakterisierung der NadR-RNK-Domäne

Da die RNK-Deletionsmutante eine starke Defizienz in der NR-Aufnahme zeigte und die meisten AmPR-resistenten Klone eine Mutation in der RNK-Domäne von NadR hatten, sollten in weiteren Versuchen die Eigenschaften der RNK-Domäne genauer untersucht werden. Um dies zu bewerkstelligen, wurden gezielte AS-Substitutionen in der RNK-Domäne eingeführt. Ausgehend von der Analyse der AmPR-resistenten *nadR*-Mutanten (die meisten Mutationen waren im Walker A Motif) wurden die AS-Austausche zunächst in den Walker A, Walker B Motifen und der LID-Domäne vorgenommen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Walker A (P-Loop) und B-Motife essentiell sind für die Bindung und Hydrolyse von ATP. P-Loop (GxxxxGK(S/T)) bildet einen Loop um die β,γ -Phosphatgruppe des ATP oder GTP, dabei sind AS Glycin (G) und Lysin (K) (unterstrichen in der Motif-Sequenz) direkt an der Bindung der Phosphatgruppe beteiligt. AS-Substitutionen bei diesen zwei AS führen meistens zum Verlust der ATPase Aktivität. Im Walker B-Motif (BBBDB; B = hydrophobe AS), ist die hochkonservierte AS Aspartat (D) wichtig für die Koordinierung des divalenten Kations (meistens Mg²⁺), welches essentiell ist für die Hydrolyse der β,γ -Bindung des ATP oder GTP. Für die LID-Domäne ist bekannt, dass sie extensive Konformationsänderung eingeht, je nach dem ob keine Substrate gebunden sind (offene Konformation), ein Substrat gebunden (partiell geschlossen) oder beide Substrate gebunden haben (geschlossene Konformation). Für viele der ATP/GTP-Bindeproteine ist bekannt, dass auch ein konserviertes Arginin (R) eine katalytische Rolle bei der ATP-Hydrolyse spielt, indem es den Übergangszustand bei der Nukleotid-Hydrolyse stabilisiert („Arginin-Finger“ Hypothese, Ahmadian et al., 1996). Bei

einigen ATP-Bindeproteinen (z.B. *E. coli* Thymidylat-Kinase) befindet sich dieses katalytische R in der LID-Domäne.

Daher wurden bei der NadR-RNK Domäne zunächst folgende AS ausgetauscht: in dem P-Loop Motif: 233 GGESSGKS 240 wurde das hochkonservierte Glycin G 238 gegen Asparagin (N) und Serin (S) ausgetauscht; in dem Walker B-Motif 301 AFIDTD 306 das hochkonservierte Aspartat D 304 gegen Asparagin (N), Serin (S) und Cystein (C); und in der putativen LID-Domäne 343 NTEWVDDGLRSLGS 356 das Arginin R 352 gegen Alanin (A), Cystein (C), Asparagin (N) und Methionin (M).

5.1. Konstruktion und Aufreinigung rekombinanter NadR-His₆ Punktmutanten im P-Loop, Walker A-Motif und der LID-Domäne

Das pMMNadRHis₆ diente als Template für die Konstruktion der Punktmutanten NadRHis₆-G 238 N, -G 238 S, -D 304 C, -D 304 N, -D 304 S, -R 352 A, -R 352 C, -R 352 M und -R 352 N mit Hilfe des Quick-change „site-directed mutagenesis“ Kits (siehe III.14.2.3). Diese Mutanten Varianten des NadRHis₆ konnten auch überexprimiert und über Ni $^{2+}$ -Säulen aufgereinigt werden (III.10.7). In der Abb. 14 sind Reinigungsschritte von NadRHis₆G 238 N, repräsentativ für alle andere Punktmutante, im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel dargestellt. Für alle anderen Punktmutanten wurde nur das E1-Eluat gezeigt.

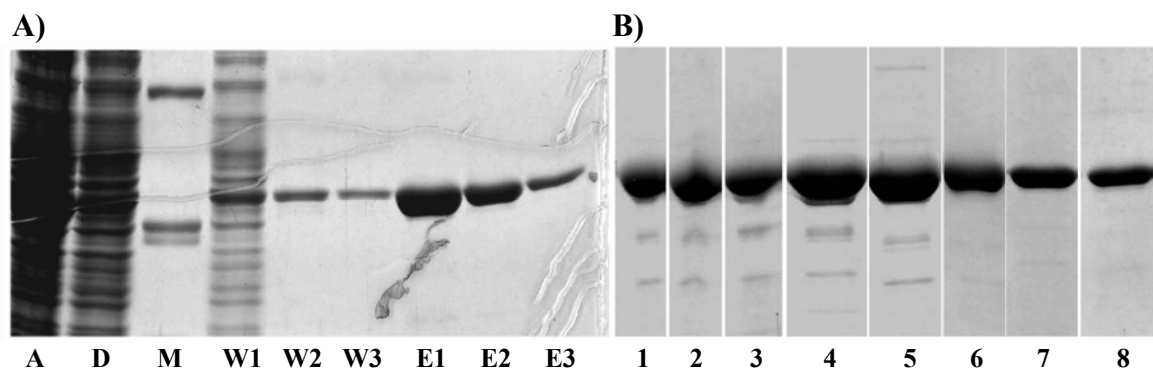


Abb. 14: Reinigung von NadRHis₆G 238 N (repräsentativ für alle andere Punktmutanten) über Ni $^{2+}$ -Säule (14/A). Für alle anderen Punktmutanten wurde nur das E1-Eluat gezeigt (14/B). (A)M: Marker (die Größenstandards sind seitlich in kDa angegeben); A: Auftrag (Lysat); D: Durchlauf; W1: Waschschrift 1; W2: Waschschrift 2; W3: Waschschrift 3; E1: Elutionsschritt 1; E2: Elutionsschritt 2; E3: Elutionsschritt 3. (B): E1-Eluate von der Reinigung von: 1: NadRHis₆R 352 A; 2: NadRHis₆R 352 C; 3: NadRHis₆R 352 M; 4: NadRHis₆R 352 N; 5: NadRHis₆D 352 C; 6: NadRHis₆D 352 N; 7: NadRHis₆D 352 S; 8: NadRHis₆G 238 S. Einzelne Reinigungsschritte wurden in Coomassie-gefärbten 12,5% PAA-Gelen analysiert.

5.2. *In vitro* Charakterisierung der NadRHis₆-Punktmutanten

Die RNK- bzw. NMNAT-Aktivität der gereinigten NadRHis₆ Proteine (NadRHis₆; NadRHis₆G²³⁸N; NadRHis₆G²³⁸S; NadRHis₆D³⁰⁴C; NadRHis₆D³⁰⁴N; NadRHis₆D³⁰⁴S; NadRHis₆R³⁵²A; NadRHis₆R³⁵²C; NadRHis₆R³⁵²M; NadRHis₆R³⁵²N) wurde in einem Assay mit radioaktiven Substraten ¹⁴C-NR bzw. ¹⁴C-NMN (Endkonzentration jeweils ca. 45 µM) und ATP (2 mM) und MgCl₂ (10 mM) untersucht (III.10.9). Die jeweilige Proteinkonzentration betrug im Assay ca. 0,04 mg/ml. Die im Assay entstandenen Produkte wurden via Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt und die Radioaktivität auf einem Röntgenfilm visualisiert (III.12.4). Die Ergebnisse sind in der Abb. 15 dargestellt.

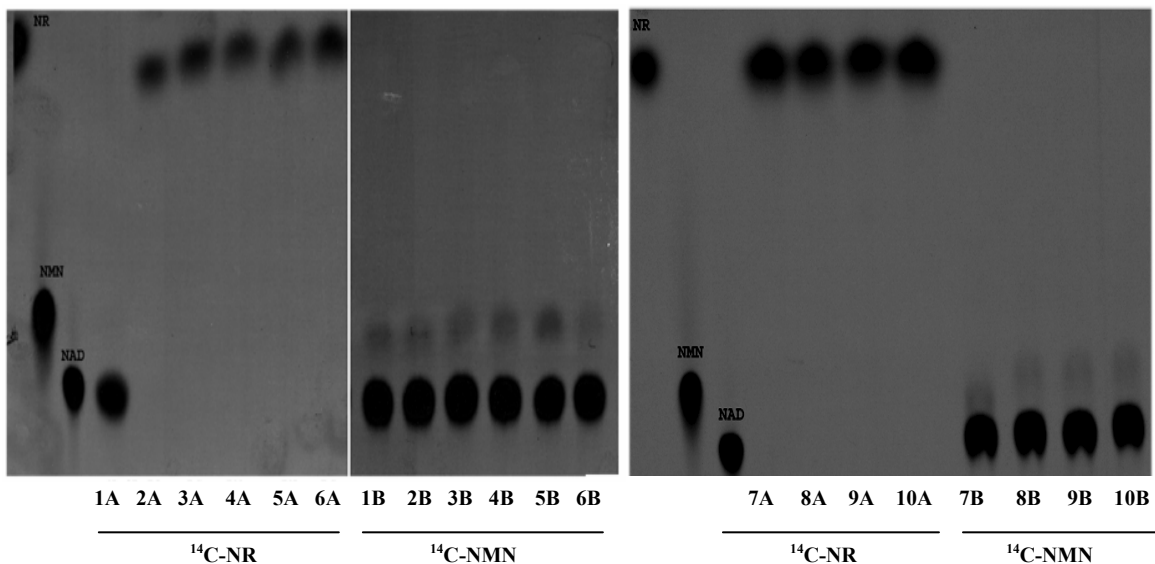


Abb. 15: Analyse der rekombinanten NadR-His₆ Proteine *in vitro*. Das gereinigte NadRHis₆ und die mit „site directed“ Mutagenese erzeugten NadRHis₆-Punktmutanten wurden auf die RNK- und NMNAT-Aktivität mit Dünnschicht-Chromatographie untersucht. In der Reihe (A) wurde ¹⁴C-NR und in der Reihe (B) ¹⁴C-NMN als Substrat (ca. 45 µM) verwendet. Die jeweilige Proteinkonzentration betrug ca. 0,04 mg/ml. Als Standard wurde bei jedem DC-Lauf ¹⁴C-NR, ¹⁴C-NMN und ¹⁴C-NAD⁺ aufgetragen.

1: NadRHis₆; 2: NadRHis₆R³⁵²A; 3: NadRHis₆R³⁵²C; 4: NadRHis₆R³⁵²M; 5: NadRHis₆R³⁵²N; 6: NadRHis₆D³⁰⁴C; 7: NadRHis₆D³⁰⁴N; 8: NadRHis₆D³⁰⁴S; 9: NadRHis₆G²³⁸N; 10: NadRHis₆G²³⁸S

Wie die Spuren 1A und 1B in der Abb. 15 zeigen, konnte das gereinigte NadRHis₆ NAD⁺ sowohl aus NR als auch aus NMN synthetisieren, d.h. beide Aktivitäten (RNK und NMNAT) waren nicht beeinträchtigt. Aminosäure-Austausche im P-Loop (Walker A-Motif; G²³⁸N/S; Abb. 15, Spuren 9 und 10) und im Walker B-Motif (D³⁰⁴C/N/S; Abb. 15,

Spuren 6, 7, 8) führten zur Inaktivierung der RNK-Domäne, da hier vermutlich keine NR-Phosphorylierung bzw. keine ATP-Hydrolyse stattfinden kann. Daher konnte auch keine NAD^+ -Synthese beobachtet werden (Abb.15; Reihe A, Spuren 6-8 ($\text{D}^{304}\text{C/N/S}$) und 9-10 ($\text{G}^{238}\text{N/S}$)). Die AS-Austausche in der putativen LID-Domäne ($\text{R}^{352}\text{A/C/M/N}$) führten auch zum Verlust der RNK-Aktivität (Abb.15; Reihe A, Spuren 2-5). Bei diesen Punktmutanten ist vermutlich die Fähigkeit ein Enzym-Substrat-Komplex zu bilden beeinträchtigt, bzw. durch Austausch von R^{352} kann der Übergangszustand bei der Hydrolyse von ATP nicht stabilisiert werden (Via et al., 2000; Li de la Sierra et al., 2001; Lavie et al., 1998; Rombel et al., 1999). Dadurch kann auch hier letztendlich keine NR-Phosphorylierung stattfinden. Die NMNAT-Aktivität war dagegen bei allen Mutanten nicht beeinträchtigt und vergleichbar mit der NMNAT-Aktivität von NadRHis_6 (Abb.15; Reihe B, Spuren 1-10). Dies bedeutet, dass Inaktivierung der RNK keine Auswirkung auf die NMNAT-Aktivität hat. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass zwischen den zwei NadR -Domänen kein „cross-talk“ stattfindet (Singh et al., 2002; Kurnasov et al., 2002), bzw. die zwei Domänen relativ unabhängig voneinander aktiv sein können.

5.3. *In vivo* Charakterisierung der NadRHis_6 -RNK-Punktmutanten

Um Punktmutanten auch *in vivo* untersuchen zu können, wurde das nadRHis_6 aus pMMnadRHis in pBAD18Kan kloniert. Dabei wurden aus dem pBAD -Vektor der Arabinose-Promotor und ein Teil des *araC*-Gens entfernt (III.14.2). Das entstandene Plasmid wurde pBADNadRHis_6 genannt. Die nadRHis_6 -Varianten mit AS-Substitutionen in dem P-Loop ($\text{G}^{238}\text{N/S}$), Walker B-Motif ($\text{D}^{304}\text{C/N/S}$) und der LID-Domäne ($\text{R}^{352}\text{A/C/M/N}$) wurden auf die gleiche Weise in pBAD18Kan kloniert. Da pBAD18Kan ein pUC-ori besitzt, kann es in *H. influenzae* nicht replizieren. Daher sind diese Plasmide Suizidplasmide in *H. influenzae* und können nur dann erhalten bleiben wenn sie in das Chromosom integrieren. Die pBADnadRHis_6 -Konstrukte wurden daher benutzt, um die nadRHis_6 -Punktmutanten in das Chromosom von $\text{SE01}\Delta\text{RNK}$ einzuführen. Da die Integration der pBADnadRHis_6 -Konstrukte über homologe Rekombination stattfindet, befinden sich die nadRHis_6 -Konstrukte unter der Kontrolle des nativen Promotors und der nativen Rbs (s. III.13.1; Abb. 7). Korrekte Insertion der pBADnadRHis_6 -Konstrukte in das $\text{SE01}\Delta\text{RNK}$ Chromosom wurde via Southernblot und Sequenzierung überprüft (Daten nicht gezeigt). Die $\text{SE01}\Delta\text{RNK}$ -Stämme mit chromosomaler Kopie von nadR-His_6 ($\text{SE02}\Delta\text{RNK}$), $\text{nadR-His}_6\text{G}^{238}\text{N}$ ($\text{SE03}\Delta\text{RNK}$), $\text{nadR-His}_6\text{G}^{238}\text{S}$ ($\text{SE04}\Delta\text{RNK}$), nadR-

His₆D³⁰⁴C (SE05ΔRNK), *nadR*-His₆D³⁰⁴N (SE06ΔRNK), *nadR*-His₆D³⁰⁴S (SE07ΔRNK), *nadR*-His₆R³⁵²C (SE08ΔRNK), *nadR*-His₆R³⁵²M (SE10ΔRNK) wurden auf ihre Fähigkeit NR aufzunehmen getestet (III.12.3). Die Zellen wurden mit ¹⁴C-NAD⁺ (1 μM) als Faktor V Quelle inkubiert. Nach 15 min wurden Proben entnommen, gefiltert und im Szintillationscounter gemessen. Die Akkumulation des ¹⁴C-Labels wurde als prozentualer Anteil zur eingesetzten Radioaktivität in % c.p.m. angegeben.

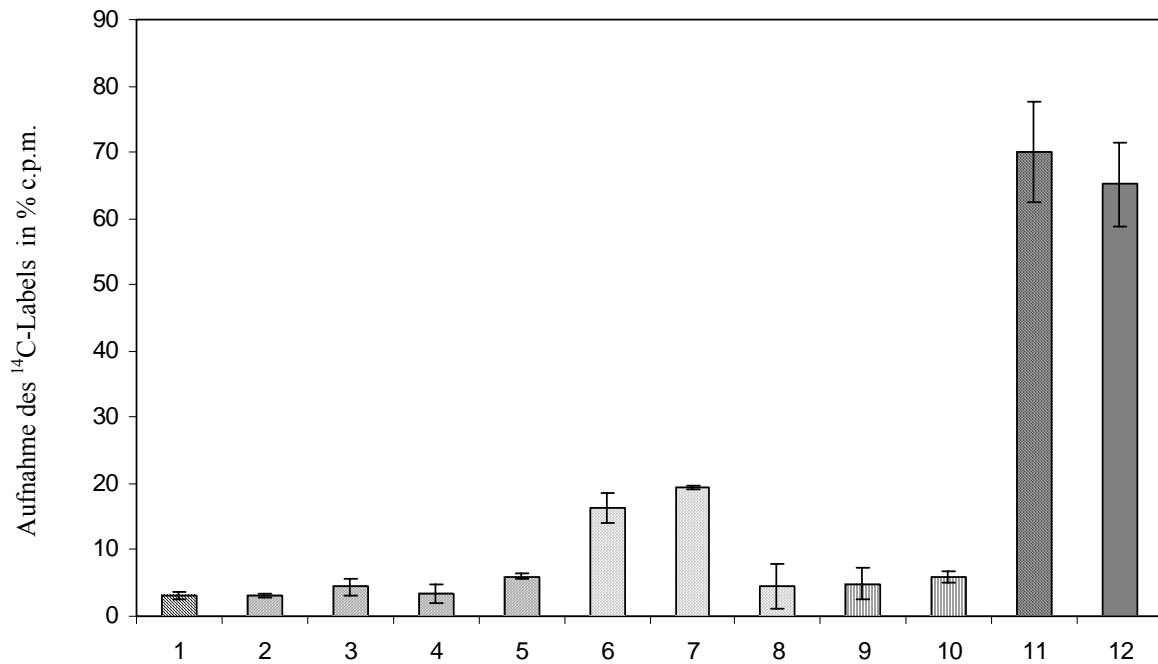


Abb. 16: Aufnahme des ¹⁴C-Labels in SE01ΔRNK-Stämmen mit chromosomalen pBADnadRHis₆-Konstrukten. Die Konzentration des ¹⁴C-NAD⁺ betrug 1 μM. Es wurde die Akkumulation nach 15 min Inkubation mit dem ¹⁴C-NAD⁺ gemessen. Die Akkumulation des von ¹⁴C-NAD⁺ stammenden Labels in den Zellen wurde als prozentualer Anteil zur eingesetzten Radioaktivität in c.p.m. angegeben. **1:** SE01ΔRNK; **2:** SE11ΔRNK (R³⁵²A); **3:** SE08ΔRNK (R³⁵²C); **4:** SE09ΔRNK (R³⁵²M); **5:** SE10ΔRNK (R³⁵²N); **6:** SE05ΔRNK (D³⁰⁴C); **7:** SE06ΔRNK (D³⁰⁴N); **8:** SE07ΔRNK (D³⁰⁴S); **9:** SE03ΔRNK (G²³⁸N); **10:** SE04ΔRNK (G²³⁸S); **11:** SE02ΔRNK (NadRHis₆); **12:** SE01 (Wt).

Nach 15 min konnte SE01 (Wt) ca. 65 % der eingesetzten Radioaktivität akkumulieren (Abb. 16; Spur 12). Die Aufnahmefähigkeit vom SE02ΔRNK-Stamm (RNK⁻, *nadRHis₆*⁺; Abb. 16, Spur 11) war mit ca. 70% Akkumulation vergleichbar mit dem Wt, was zeigt, dass die chromosomale Kopie von NadRHis₆ funktionsfähig ist und in der Lage ist die RNK-Aktivität *in vivo* zu komplementieren. Dagegen waren alle NadRHis₆ in ihrer Aufnahmefähigkeit stark beeinträchtigt. Mit der Ausnahme von SE05ΔRNK (NadRHis₆

D³⁰⁴C; Abb.16/Spur 6) und SE06ΔRNK (NadRHis₆ D³⁰⁴N; Abb.16/Spur 7), die ca.15% bzw. ca. 20% des ¹⁴C-Labels akkumulieren konnten, betrug die Akkumulation des ¹⁴C-Labels in den restlichen Punktmutanten 3-6% (Abb.16/Spur 2-5; 8-10), und damit vergleichbar mit der Akkumulation in der SE01ΔRNK-Mutante, die 2-4% betrug (Abb.16/Spur 1). Da bei allen Punktmutanten die RNK-Aktivität nicht nachweisbar ist (siehe IV.5.2), deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der NR-Transport via PnuC an die RNK-Aktivität von NadR gekoppelt ist.

Obwohl bei SE05ΔRNK (NadRHis₆ D³⁰⁴C) und SE06ΔRNK (NadRHis₆ D³⁰⁴N) *in vitro* keine RNK-Aktivität zu beobachten war, zeigten diese Punktmutanten dennoch ca. 1/5 bzw. 1/4 der Wt-Aufnahmefähigkeit. Da es sich hier um Punktmutanten im Walker B-Motif handelt, das an der Bindung und Koordination des ATP/Mg²⁺-Komplexes beteiligt ist, wäre es vorstellbar, dass die D³⁰⁴C/N Substitutionen die Bindefähigkeit nicht vollständig inaktivieren, aber die Koordination der Substrate nicht richtig abläuft, so dass die ATP-Hydrolyse dennoch nicht stattfinden kann. Dadurch könnte ein Teil des NR-Substrats vom PnuC abgezogen werden, allerdings nur so lange bis NadR gesättigt ist. Eine andere Erklärung wäre, dass *in vivo* eine RNK-Restaktivität vorhanden ist, die aber unter *in vitro* Bedingungen nicht zu sehen ist.

6. Zelluläre Lokalisation der NadRHis₆-Proteinvarianten im SE01ΔRNK

Hintergrund

Da die Tests bezüglich der Faktor V-Aufnahmefähigkeit von SE01ΔRNK-Stämmen mit chromosomalen pBADNadRHis₆-Konstrukten auf eine Interaktion von NadR mit PnuC hindeuten, wurde zunächst untersucht, ob sich die NadRHis₆-Varianten in ihrer zellulären Lokalisation im SE01ΔRNK Hintergrund unterscheiden. Aufgrund des His-Tags konnten diese Proteine im Western-Blot mit Anti-PentaHis-Antikörpern (Qiagen) nachgewiesen werden. Um die zelluläre Lokalisation zu untersuchen wurde eine Fraktionierung des Zellextraktes durchgeführt (III.10.1). Die lösliche Proteinfraction, welche die cytoplasmatischen und periplasmatischen Proteine enthielt, wurde durch eine Ultrazentrifugation (UZ) des Rohextrakts gewonnen. Das Pellet nach der ersten UZ (Membranpellet I) enthielt membranassoziierte und integrale Membranproteine. Membranassoziierten Proteine wurden mit 1 M NaCl aus dem Pellet extrahiert und waren nach einer weiteren UZ im Überstand zu finden (Salzextrakt). Das Pellet nach der zweiten UZ enthielt nun integrale Membranproteine. Ein Teil der Membranproteine konnte mit 2%

Triton X-100 extrahiert werden und war nach einer weiteren UZ im Überstand (Triton-Extrakt). Das Pellet nach der dritten UZ enthielt unlösliche Membranproteine (Membranpellet II). Die Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen wurde im Bradford-Assay bestimmt und ca. 60 μg von jeder Fraktion, mit Ausnahme der Salzfraktion (40 μg), in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Detektion der NadRHis₆-Varianten erfolgte mit Maus-anti-Penta-His-Antikörpern (Qiagen). Die Ergebnisse sind in der Abb. 17 dargestellt.

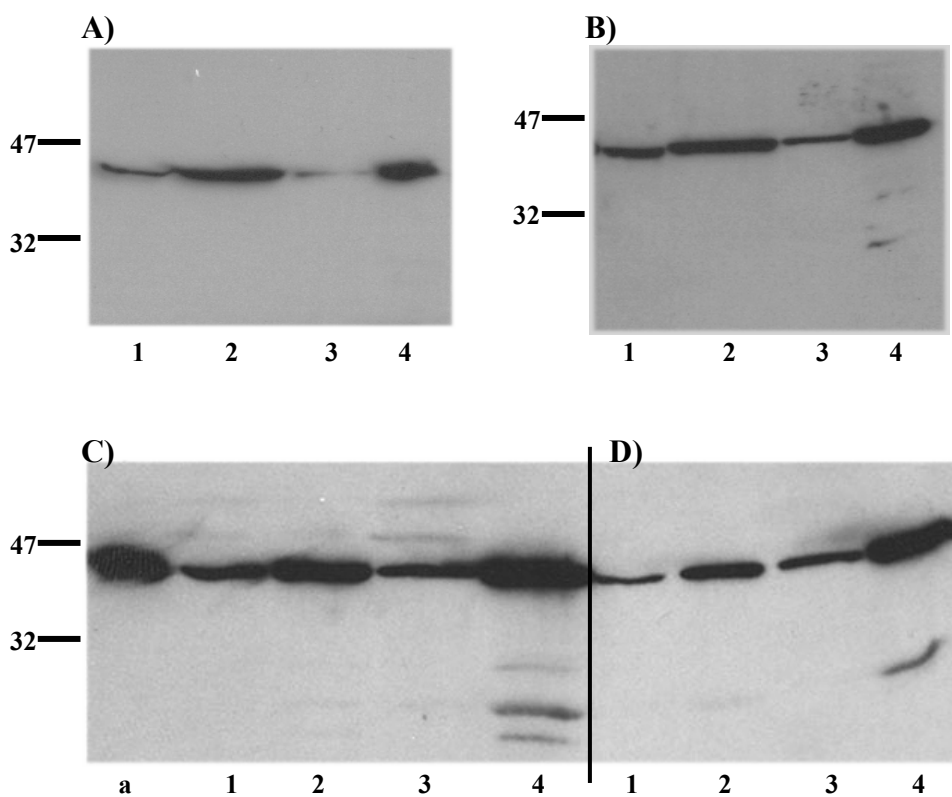


Abb. 17: Zelluläre Lokalisation der NadRHis₆-Proteinvarianten im SE01ΔRNK Hintergrund. Für die SDS-PAGE betrug die Proteinmenge in den jeweiligen Fraktionen 60 μg (bzw. 40 μg des Salzextraktes). Nachweis im Western-Blot erfolgte mit dem Maus-anti-Penta-His-Antikörper (Qiagen). **A:** Zellfraktionen aus SE02ΔRNK (NadRHis₆); **B:** Zellfraktionen aus SE10ΔRNK (NadRHis₆ R³⁵²N); **C:** Zellfraktionen aus SE06ΔRNK (NadRHis₆ D³⁰⁴N); **D:** Zellfraktionen aus SE03ΔRNK (NadRHis₆ G²³⁸N); **a:** gereinigtes NadRHis₆ als Kontrolle; **1:** lösliche Fraktion (cytoplasmatische und periplasmatische Proteine); **2:** Salzextrakt (membranassoziierte Proteine; Überstand nach der Extraktion mit 1 M NaCl); **3:** Tritonextrakt (integrale Membranproteine; Überstand nach der Extraktion mit 2% Triton X-100); **4:** unlösliche Membranproteine (Pellet nach der Salz- und Triton-Extraktion). Der Größenstandard (in kDa) ist seitlich angegeben.

Für jedes Motif (P-Loop, Walker B-Motif, LID-Domäne) wurde jeweils die Zellfraktionierung von nur einer Punktmutante gezeigt, da die zelluläre Verteilung der restlichen Punktmutanten vergleichbar war. Wie in der Abb.17 zu sehen ist, gab es zwischen NadRHis₆ und den jeweiligen Punktmutanten keinen signifikanten Unterschied in der zellulären Lokalisation, also ist davon auszugehen, dass RNK-Aktivität kein Einfluß auf die Lokalisation hat. Computeranalysen ergaben für NadR einen theoretischen pI Wert von 8,94, keine zum Proteintransport nötige Signalsequenz und keine hydrophoben Domänen. Daher wurde in Lokalisationsuntersuchungen erwartet, dass die NadR-Bande vorwiegend in der löslichen Fraktion zu sehen ist. Die NadR-Bande war zwar in der löslichen Fraktion zu sehen, aber auch in allen restlichen Fraktionen. Obwohl in der Salzfraktion die Proteinkonzentration niedriger war als in anderen Proben, war die Intensität der NadR-Bande stärker als in der löslichen Fraktion und dem Tritonextrakt. Dass NadR mit Membran assoziiert vorliegt, wäre im Einklang mit der Beobachtung, dass NadR Einfluss auf die NR-Aufnahme hat, insofern war die Lokalisation in der Salzfraktion nicht überraschend. Allerdings war die beobachtete NadR-Bande in der Membranfraktion (Pellet nach der Salz- und Tritonextraktion) überraschend, da für NadR keine hydrophobe Domänen in Computeranalysen vorhergesagt wurden.

6.1. Zelluläre Lokalisation von nativem NadR

Um zu untersuchen, ob die Lokalisation von NadRHis₆ im Membranpellet eventuell ein durch His-Tag verursachtes Artefakt ist, wurde anschließend auch die zelluläre Lokalisation von nativem NadR im SE01 untersucht. Die Zellfraktionierung wurde wie oben beschrieben durchgeführt (III.10.1). Für die Detektion von nativem NadR wurde mit gereinigtem NadRHis₆ im Kaninchen ein NadR-Antiserum hergestellt. Da das Antiserum viele unspezifische Banden detektierte, wurde es anschließend gereinigt. Die Herstellung und Reinigung des NadR-Antiserums ist in Kapitel III.10.8 beschrieben. Mit dem gereinigtem Kaninchen-NadR-Antiserum konnte im Immunoblot die native NadR-Bande detektiert werden. Die Lokalisation des nativen NadR ist in der Abb. 18 dargestellt. Gleichzeitig mit dem Immunoblot wurden die Zellfraktionen bezüglich der NadR-Aktivität in der Dünnschicht-Chromatographie untersucht (III.10.11/III.12.4). Für den Aktivitäts-Assay wurde die Salzfraktion gegen 50 mM Hepes, pH 7,5 mit 200 mM NaCl dialysiert, dabei präzipitierte ein Teil der extrahierten Proteine. Das Ergebnis ist in der Abb. 19 dargestellt.

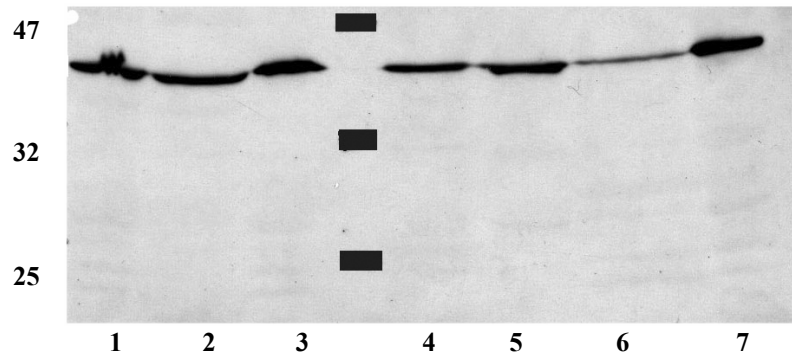


Abb. 18: Zelluläre Lokalisation von nativen NadR im SE01 Hintergrund. Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen wurde mit dem Bradford-Assay bestimmt und für die SDS-PAGE wurden jeweils 60 µg bzw. 40 µg für die Salzfraktion auf das PAA-Gel aufgetragen. Die Detektion der NadR-Bande im Immunoblot erfolgte mit gereinigtem Kaninchen-NadR-Antiserum (III.10.6/10.8).

1: Rohextrakt (Gesamtzellextrakt) aus SE01; **2:** lösliche Fraktion (cyto- und periplasmatische Proteine; Überstand nach der ersten UZ des Rohextrakts); **3:** Membranpellet I (Pellet nach der 1. UZ des Rohextraktes); **4:** Salzfraktion (membranassoziierte Proteine; Überstand nach der 2. UZ und anschließender Dialyse); **5:** Pellet nach der Dialyse der Salzfraktion; **6:** Tritonextrakt (integrale Membranproteine; Überstand nach der 3. UZ); **7:** Membranpellet II (Pellet nach der 3. UZ).

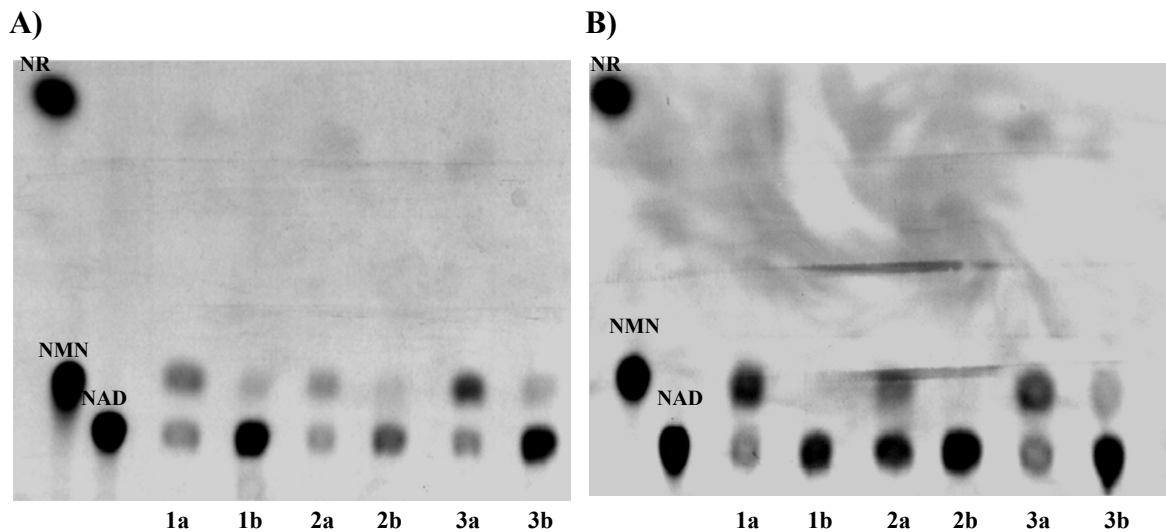


Abb. 19: NadR-Aktivität in den Zellfraktionen aus SE01. NadR-Aktivität in dem Rohextrakt, der löslichen Fraktion und dem Membranpellet I (Pellet nach der 1. UZ, membranassoziierte und integrale Membranproteine) analysiert in der DC. Als Substrat wurde ^{14}C -NR (**19/A**) und ^{14}C -NMN (**19/B**), jeweils mit ca. 45 µM Endkonzentration, und 2 mM ATP eingesetzt. Nach 2 min (**a**) und 30 min (**b**) Inkubation wurden die Proben auf die DC aufgetragen. Als Standard wurden ^{14}C -NR, ^{14}C -NMN und ^{14}C -NAD⁺ aufgetragen. Proteinkonzentration in den Ansätzen betrug ca. 2 mg/ml.

1: NadR-Aktivität im SE01 Rohextrakt; **2:** NadR-Aktivität in der löslichen Fraktion (Überstand nach der 1. UZ; enthält cyto- und periplasmatische Proteine); **3:** NadR-Aktivität im Membranpellet I (Pellet nach der 1. UZ; enthält membranassoziierte und integrale Membranproteine).

Die Zellfraktionierung vom SE01 zeigte für das native NadR ähnliche Verteilung wie bei den NadRHis₆-Proteinen. Auch hier war der relative Anteil von NadR im Salzextrakt am stärksten (Abb. 18/Spur 4/5) und in dem Tritonextrakt am niedrigsten. Das native NadR war auch im Membranpellet zu beobachten (Abb.18/Spur 7). Dies bedeutet, dass das His-Tag keine Auswirkung auf die zelluläre Lokalisation von NadR hat. Es ist dennoch nicht auszuschließen, dass die NadR-Bande in dem Membranpellet ein Artefakt ist, welches aufgrund der Zellaufschluss- und Fraktionierungsbedingungen zustande kommt.

Die in Abb. 19 getesteten Fraktionen entsprechen den Fraktionen 1, 2 und 3 aus der Abb. 18. Da in allen drei Fraktionen die NadR-Bande mit vergleichbarer Intensität auftrat, kann man davon ausgehen, dass die Unterschiede in der Aktivität nicht von der NadR-Menge in den jeweiligen Fraktionen herrühren. Wie man sehen kann, wurde im Rohextrakt (1), der löslichen Fraktion (2) und dem Membranpellet I (3) (Membranfraktion vor der Salz- und Tritonextraktion) sowohl die RNK (Abb.19A)- als auch die NMNAT-Aktivität (Abb. 19B) beobachtet. Es konnten leichte Unterschiede in der RNK-Aktivität und NMNAT-Aktivität in Abhängigkeit von der verwendeten Fraktion beobachtet werden. Während die RNK-Aktivität in der löslichen Fraktion etwas schwächer war als in der Membranfraktion I (Abb. 19A; Spuren 2a/b und 3a/b), war die Situation bei der NMNAT-Aktivität umgekehrt: hier war die NMNAT-Aktivität in löslichen Fraktion etwas stärker als in der Membranfraktion I (Abb. 19B; Spuren 2a/b und 3a/b). Da die RNK-Aktivität von NadR auch für den Transport von NR ins Cytoplasma eine essentielle Rolle spielt (siehe IV.5.3) wäre es vorstellbar, dass PnuC Interaktionen mit NadR eingeht, die die RNK-Aktivität etwas beeinflussen.

Die Fraktionen 4-7 in der Abb. 18 (4: Salzextrakt nach der Dialyse; 5: Präzipitāt nach der Dialyse des Salzextraktes; 6: Tritonextrakt; 7; Membranpellet II (nach Salz- und Tritonextraktion) wurden auch auf NadR-Aktivität getestet. In diesen Fraktionen konnte keine NadR-Aktivität beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Da allerdings im Membranpellet I NadR-Aktivität noch vorhanden war, ist es wahrscheinlich, dass in diesen Fraktionen die NadR-Aktivität aufgrund der Fraktionierungsprozedur verloren geht.

6.2. Spielt PnuC eine Rolle bei der zellulären Lokalisation von NadR?

Um zu untersuchen, ob das Vorhandensein von PnuC in der Membran Effekte auf die zelluläre Lokalisation von NadR hat, wurden Zellysate von SE01 (Wt), SE01 Δ RNK (Δ RNK), SE02 (Δ pnuC) und SE15 (Δ RNK Δ pnuC) wie beschrieben (III.10.1) in lösliche Fraktion, Salzextrakt, Tritonextrakt und Membranpellet II fraktioniert. Es wurde jeweils gleiche Proteinmenge (40 μ g) in einem 12,5% PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Detektion der NadR-Bande erfolgte mit dem Kaninchen-NadR-Antiserum. Die Ergebnisse sind in der Abb. 20 dargestellt.

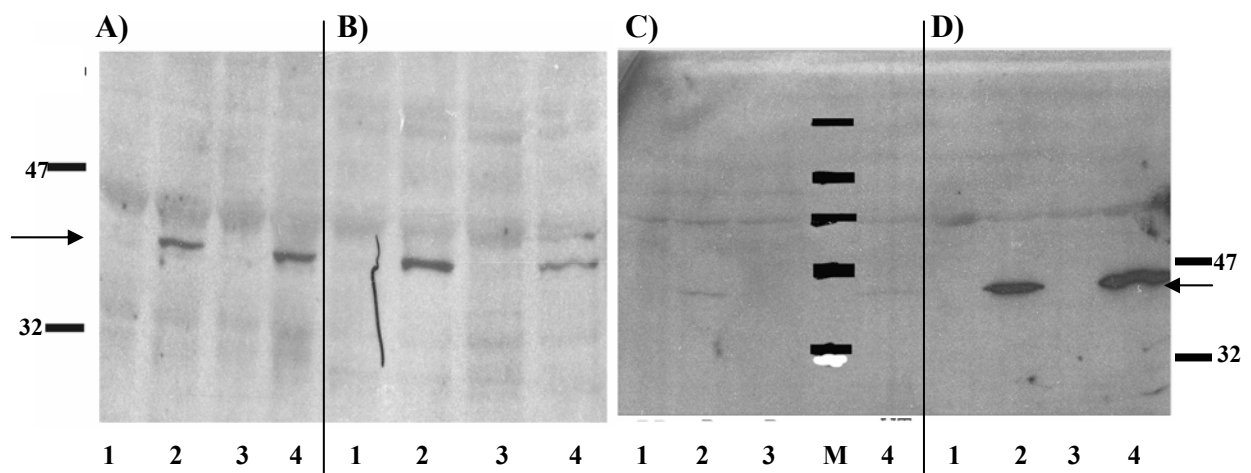


Abb. 20: Zelluläre Lokalisation vom NadR in SE01 (Wt), SE01 Δ RNK, SE02 (Δ pnuC) und SE15 (Δ RNK Δ pnuC). Dargestellt ist die Lokalisation von NadR in der löslichen Fraktion (20/A), Salzfraktion (20/B), Tritonextrakt (20/C) und der Membranfraktion II (20/D). 1: SE15 (Δ RNK Δ pnuC); 2: SE02 (Δ pnuC); 3: SE01 Δ RNK (Δ RNK); 4: SE01 (Wt); M: Größenstandard. Pfeil deutet auf NadR. Größenstandard (in kDa) ist seitlich angegeben.

In der Abb. 20 kann man sehen, dass es zwischen SE01 (Spuren 4; Wt) und SE02 (Spuren 2; Δ pnuC) keinen Unterschied in der zellulären Lokalisation von NadR gibt. Auch hier konnte die NadR-Bande in der löslichen (20/A), Salz (20/B)- und Membranfraktion (20/D) beobachtet werden. Die NadR-Bande ist im Tritonextrakt (20/C) kaum sichtbar, aber dennoch vorhanden. Allerdings konnte in SE01 Δ RNK (Spuren 1) und SE15 (Δ RNK Δ pnuC; Spuren 3) keine NadR Δ RNK-Bande beobachtet werden. Zusammen mit der Beobachtung, dass die RNK-Mutante im NadR-Assay mit Rohzellextrakten keine NMNAT-Aktivität aufweist (siehe IV.2; Abb. 8), bestätigt dies die Annahme, dass NadR Δ RNK instabil ist und nach Zellaufschluss vermutlich rasch abgebaut wird.

7. NadR „feedback“ Regulation und NR-Transport

Die Analyse der NadR-Kristallstruktur (Singh et al., 2002) zeigte Kokristallisation von NAD^+ innerhalb der RNK-Domäne an einer Stelle außerhalb des aktiven Zentrums („non-active-site“). Die Analyse des *hi*NadR-Tetramers zeigten mehrere spezifische Interaktionen zwischen dem NAD^+ -Molekül an der „non-active-site“ und dem *hi*NadR-Tetramer (s. Abb. 21). Die Adenin- und Nikotinamid-Reste vom NAD^+ befinden sich zwischen den Seitenketten von Tyrosin²⁹² (Y^{292}) und Tryptophan²⁵⁶ (W^{256}). Der Pyrophosphat-Rest vom NAD^+ zeigt nach außen und ist im Kontakt mit der Lysin¹²⁶ (K^{126})-Seitenkette des benachbarten Monomers.

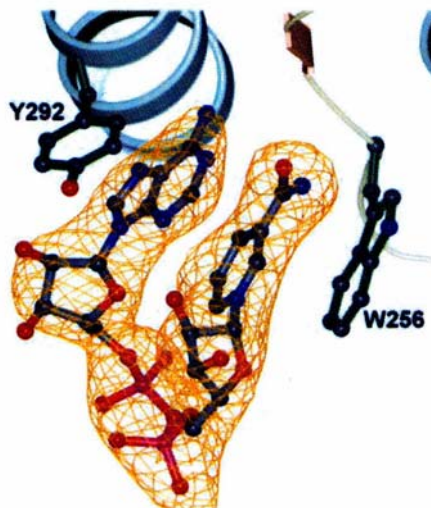


Abb. 21: Konformation des an der „non-active-site“ gebundenen NAD^+ Moleküls in der RNK Domäne (übernommen aus Singh et al., 2002)

7.1. *In vitro* Analyse der NAD^+ -abhängigen Inhibition von NadRHis₆

Um zu untersuchen, ob NadR durch sein Endprodukt NAD^+ feedback inhibiert wird, wurde zunächst das gereinigte NadRHis₆ (0,002 mg/ml) mit verschiedenen Konzentrationen von NAD^+ (2,25 mM: entspricht 50x Überschuss verglichen mit NR/NMN-Konzentration, 4,5 mM (100x Überschuss) und 9 mM (200x Überschuss)) zusammen mit 45 μM ¹⁴C-NR bzw. 45 μM ¹⁴C-NMN, 2 mM ATP und 10 mM MgCl_2 in 100 mM HEPES-NaOH, pH 7,5 bei 37°C inkubiert. Es wurden Aliquots zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen (0, 2³⁰, 5, 10, 20, 40 und 80 min), 3 min bei 95°C inkubiert, um die Reaktionen zu stoppen und

anschließend abzentrifugiert (13000 rpm, 5 min). 10 µl des jeweiligen Überstandes wurden in der DC aufgetrennt. Die Produkte wurden auf einem Röntgenfilm detektiert. Um eine Quantifizierung der NAD^+ -Synthese durchführen zu können, wurden anschließend die $^{14}\text{C-NAD}^+$ -Spots aus der DC-Folie ausgeschnitten und im Szintillationscounter gemessen. Die Ergebnisse und Quantifizierung sind in der Abb. 22 und Abb. 23 dargestellt.

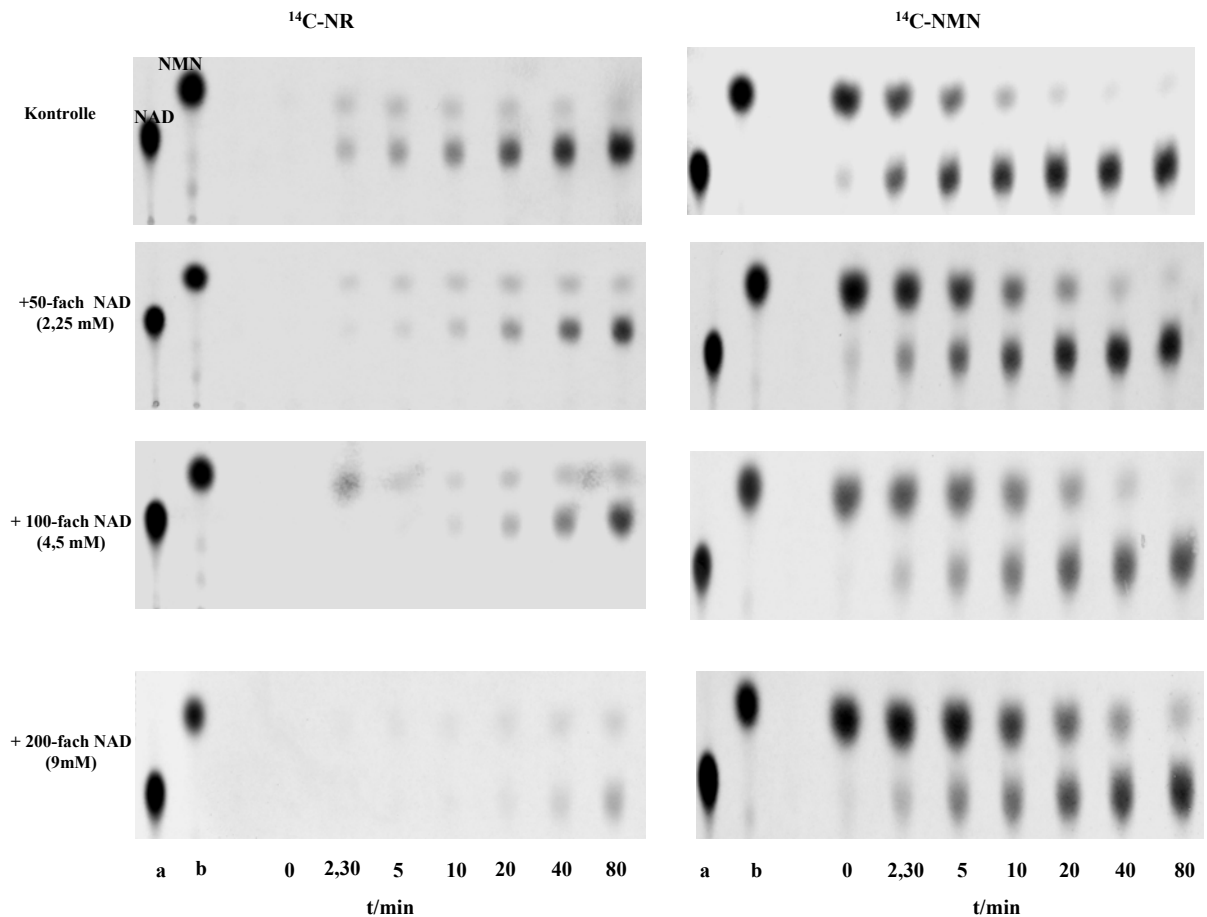


Abb. 22: NAD^+ -bedingte Inhibition der NadRHis_6 Aktivität. Als Substrate wurden $^{14}\text{C-NR}$ (links) und $^{14}\text{C-NMN}$ (rechts) verwendet. Der Kontrollansatz (oben links und rechts) enthielt kein NAD^+ . Die NAD^+ -Konzentration in den restlichen Ansätzen ist seitlich und die Zeitpunkte, zu welchen Proben entnommen wurden, unten angegeben. Standards mit $^{14}\text{C-NAD}^+$ und $^{14}\text{C-NMN}$ wurden auch aufgetragen. $^{14}\text{C-NR}$ ist hier nicht gezeigt.

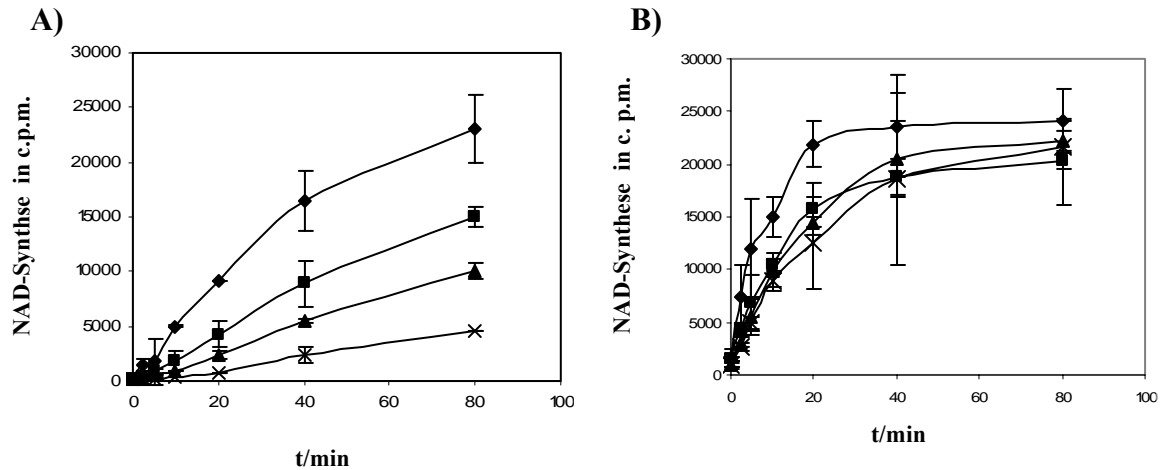


Abb. 23: Semiquantitative Auswertung der NAD⁺-bedingten Hemmung der NadR-Aktivität. Abb. 23/A: Hemmung der NadR-RNK-Aktivität (¹⁴C-NR als Substrat) in Abhängigkeit von der NAD⁺-Konzentration. **Abb. 23/B:** Hemmung der NadR-NMNAT-Aktivität (¹⁴C-NMN als Substrat) in Abhängigkeit von der NAD⁺-Konzentration. (♦) Kontrollreaktion: NadR mit ¹⁴C-NR (A) bzw. ¹⁴C-NMN (B) ohne NAD⁺; (■) Reaktion mit 2,25 mM NAD⁺ (50x Überschuß) im Ansatz; (▲) Reaktion mit 4,5 mM NAD⁺ im Ansatz (100x Überschuß); (x) Reaktion mit 9 mM NAD⁺ im Ansatz (200x Überschuß). Die NAD⁺-Spots wurden aus der DC-Folie ausgeschnitten und die c.p.m. im TriCarb 1500-Szintillationszähler gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung.

In den *in vitro* Analysen konnte eine deutliche Abnahme der NadRHis₆-RNK-Aktivität in Abhängigkeit von der NAD⁺-Konzentration beobachtet werden (Abb. 22/links; ¹⁴C-NR als Substrat). Eine semiquantitative Auswertung der NadRHis₆-RNK-Aktivität zeigt eine graduelle Abnahme der RNK-Aktivität bei steigenden NAD⁺-Konzentrationen (Abb.23/A). In Anwesenheit von 2,25 mM NAD⁺ (entspricht 50x Überschuß im Bezug auf die ¹⁴C-NR-Konzentration) ist nach 80 min nur ca. 60% der Aktivität der Kontrollreaktion vorhanden. Die Aktivität in dem Ansatz mit 4,5 mM NAD⁺ hat nach 80 min ca. 42% der Kontrollreaktion und der Ansatz mit 9 mM NAD⁺ hat ca. 20% der Aktivität.

Die NMNAT-Aktivität von NadRHis₆ dagegen war in der Anwesenheit von NAD⁺ nicht signifikant beeinträchtigt. (Abb. 22/rechts). Die semiquantitative Auswertung (Abb. 23/B) der Aktivität nach 80 min ergab für Ansätze mit NAD⁺, unabhängig von der NAD⁺-Konzentration, eine Aktivitätserniedrigung von ca. 8-15% verglichen mit der Kontrollreaktion ohne NAD⁺. Daher konnte hier für NadR eine Feedback-Inhibition durch das NAD⁺ gezeigt werden, wobei NAD⁺ in erster Linie die RNK-Aktivität von NadR beeinflusst.

7.2. *In vivo* Analyse der NAD⁺-Feedback Inhibierung

Die vorangegangene Untersuchungen zeigten eine deutliche Korrelation zwischen der RNK-Aktivität von NadR und dem Transport von NR (siehe IV.5.2/IV.5.3). Weitere *in vitro* Untersuchungen zeigten auch eine deutliche Feedback-Inhibition der NadR-RNK-Domäne durch das NAD⁺ (siehe IV.7.1). Um zu untersuchen, ob auch *in vivo* eine Feedback-Inhibition der RNK-Domäne stattfindet, wurde folgender Experiment durchgeführt: die AK01 (konstitutiv kompetenter Rd-Derivat; *sxy*-Mutation) und SE01 (AK01*nadV*⁺) wurden bis OD₄₉₀ von 1,0 bei 37°C im BHI-Medium mit 15 µM NAD und 20 µg/ml Hämin angezogen. AK01 wurde als Wt-Stamm verwendet. Um auszuschließen, dass Vorhandensein vom *nadV* eventuell eine Auswirkung auf Hemmung hat, wurde in diesen Versuchen auch SE01 getestet. Die Zellen wurden dann geerntet, mit BHI-Medium (ohne Zusätze) gewaschen und im BHI-Medium resuspendiert und auf OD₄₉₀ von 2,0 eingestellt. Anschließend wurden die Zellen in zwei gleiche Aliquots aufgeteilt. Eine der Aliquots wurde mit 15 µM NAD⁺ versetzt und der andere nicht. Danach wurden alle Ansätze für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze abzentrifugiert, mit BHI-Medium gewaschen und dann vorsichtig im BHI-Medium resuspendiert. Nach einer erneuten OD Messung (damit die Proben eine vergleichbare Zellzahl haben) wurde mit den Zellen ein Transport-Assay durchgeführt (III.12.3). Als Faktor V Quelle diente dabei ¹⁴C-NAD⁺. In den Ansätzen, die vor dem Assay mit NAD⁺ inkubiert waren, sollte eine Beeinträchtigung der RNK-Aktivität durch höhere intrazelluläre NAD⁺-Konzentration zu einer niedrigeren Aufnahme des ¹⁴C-Labels führen. Die Ansätze, die im Inkubationsschritt kein NAD⁺ enthielten, also im Prinzip ausgehungert wurden, sollten niedrigere intrazelluläre NAD⁺-Konzentrationen haben, die RNK-Aktivität wäre demnach nicht inhibiert und dadurch auch die Aufnahme des ¹⁴C-Labels höher. Die Ergebnisse sind in der Abb. 24 dargestellt.

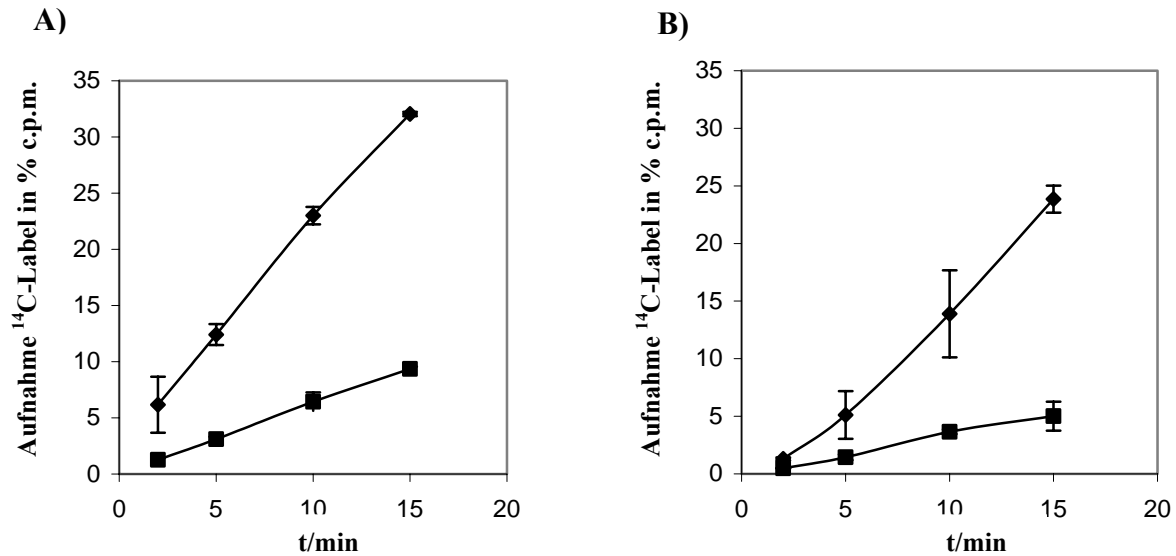


Abb. 24: *In vivo* Analyse der Feedback-Hemmung durch NAD⁺. Transportfähigkeit von AK01 (A) und SE01 (B; AK01*nadV*⁺) in Abhängigkeit von der Preinkubation mit NAD⁺. Dargestellt ist die Akkumulation des ¹⁴C-Labels ausgehend von ¹⁴C-NAD⁺ als Faktor V-Quelle für AK01 (A) und SE01 (B; AK01*nadV*⁺). Ein Aliquot der Zellen wurde vor der Transportmessung im BHI-Medium mit 15 μM NAD⁺ (♦) und einer nur im BHI-Medium (■) bei 37°C inkubiert. Nach anschließendem Waschschrift wurden die Zellen im frischen BHI-Medium (ohne NAD⁺) resuspendiert und mit 1 μM ¹⁴C-NAD⁺ versetzt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen, gefiltert und das in den Zellen inkorporierte ¹⁴C-Label gemessen. Jeder Punkt präsentiert einen Durchschnittswert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen.

Auch in *in vivo* Versuchen konnte eine Abnahme der Transportfähigkeit und damit auch wahrscheinlich der NadR-RNK-Aktivität in Anwesenheit von NAD⁺ beobachtet werden. In den Ansätzen, die mit NAD⁺ (15 μM; ♦) vorinkubiert wurden, war sowohl beim AK01-Stamm (Abb.24/A; Wt) als auch beim SE01 (Abb.24/B; AK01*nadV*⁺) die Aufnahmefähigkeit des ¹⁴C-Labels um ca. 2/3 niedriger als in Ansätzen, die ohne NAD⁺ preinkubiert wurden (Abb.24; kein NAD⁺; ■). Ausgehend von den *in vitro* und *in vivo* Analysen kann für NadR eine Feedback-Inhibierung der RNK-Domäne durch NAD⁺ postuliert werden.

7.3. Konstruktion von rekombinanten NadRHis₆ Punktmutanten in der putativen NAD⁺-Bindestelle außerhalb des aktiven Zentrums der RNK-Domäne

Wie schon vorher erwähnt, konnten Singh et al. spezifische Interaktionen zwischen dem *hi*NadR-Tetramer und NAD⁺ außerhalb der „active site“ der RNK-Domäne beobachten. Sie postulierten, dass es sich dabei vermutlich um eine Stelle handelt, die die Feedback-Inhibierung durch NAD⁺ vermittelt, allerdings wurde dies nicht experimentell nachgewiesen. Als AS des NadR-Tetramers, die mit dem „non-active site“ gebundenem NAD⁺ interagieren wurden Tyrosin (Y) 292, Tryptophan (W) 256 und Lysin (K) 126 identifiziert (Singh et al., 2002). Daher wurden diese AS mit Hilfe von Quick-change „site-directed mutagenesis“ Kits (siehe III.14.2.3) ausgetauscht: W²⁵⁶ gegen Phenylalanin (F), Y²⁹² gegen Isoleucin (I) und K¹²⁶ gegen Alanin (A) und Threonin (T). Als Template für das Einführen der AS-Substitutionen diente pMMnadRHis₆. Die entstandenen Plasmide mit AS-Substitutionen wurden durch Sequenzieren überprüft. Die rekombinanten Proteine NadRHis₆K¹²⁶A, NadRHis₆K¹²⁶T, NadRHis₆W²⁵⁶F und NadRHis₆Y¹²⁶I konnten überexprimiert und über Ni²⁺-Säulen aufgereinigt werden (III.10.7). Die Eluate wurden anschließend im Immunoblot überprüft, dabei erfolgte die Detektion der NadRHis₆-Punktmutanten mit den Maus-anti-Penta-His-Antikörpern. In der Abb. 25 ist der Immunoblot der jeweiligen Eluate gezeigt.

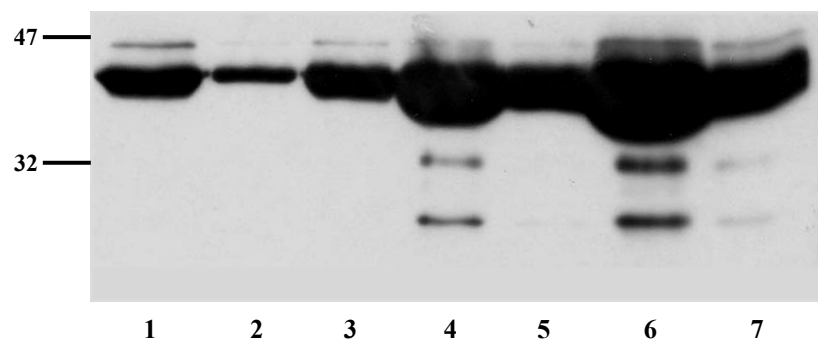


Abb. 25: Immunoblot der dialysierten Proben nach der Elution mit 250 mM Imidazol. **1, 2:** E1-Eluat (1) und E2-Eluat (2) bei der Reinigung von NadRHis₆K¹²⁶A; **3:** E1-Eluat bei der Reinigung von NadRHis₆K¹²⁶T; **4, 5:** E1-Eluat (4) und E2-Eluat (5) bei der Reinigung von NadRHis₆Y²⁹²I; **6, 7:** E1-Eluat (6) und E2-Eluat (7) bei der Reinigung von NadRHis₆W²⁵⁶F. Es wurden jeweils 5 µl der Eluate auf einem 12,5 % PAA-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose Membran transferiert und anschließend mit Maus-anti-Penta-His Antikörpern detektiert.

7.4. *In vitro* Tests mit gereinigten NadRHis₆-Punktmutanten in der putativen NAD⁺-Bindestelle außerhalb des aktiven Zentrums der RNK-Domäne

Die Konzentration der gereinigten Proteine wurde bestimmt (III.10.2), anschließend wurde ihre RNK- und NMNAT-Aktivität in der Dünnschicht-Chromatographie überprüft (III.10.9/III.12.4). Dabei wurden die Proben aus den E1-Eluaten verwendet. Die Aktivitätsassays wurden mit zwei verschiedenen Proteinkonzentrationen durchgeführt: einmal mit ca. 0,04 mg/ml und einmal mit ca. 0,002 mg/ml. Die Assays mit 0,04 mg/ml Protein wurden mit ¹⁴C-NR und ¹⁴C-NMN als Substrat durchgeführt. In dem Assay mit 0,002 mg/ml Protein wurde nur ¹⁴C-NR als Substrat verwendet, allerdings sollte auch gleichzeitig überprüft werden, ob sich die RNK-Aktivität dieser Punktmutanten durch NAD⁺ hemmen lässt. Die Ergebnisse sind in der Abb. 26 dargestellt.

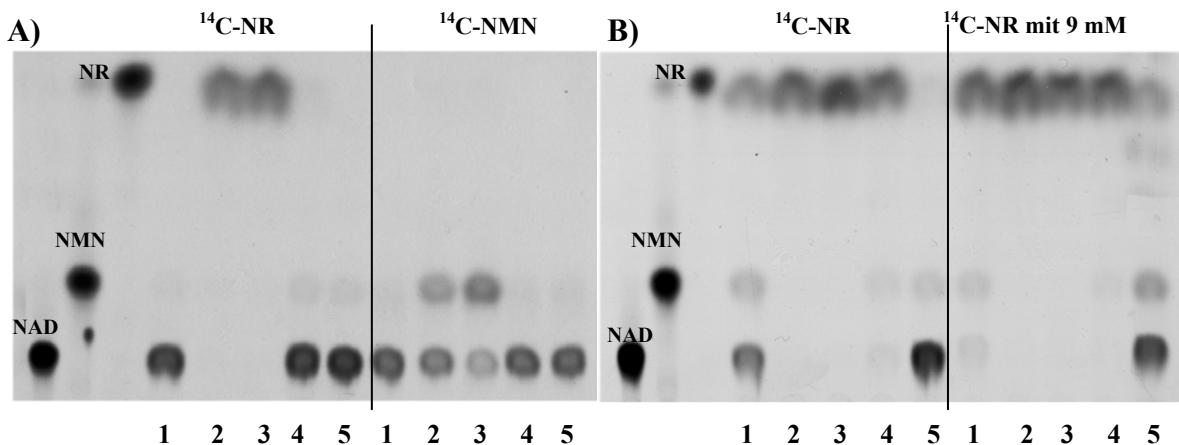


Abb. 26: Aktivitätsassays mit gereinigten NadRHis₆, NadRHis₆K¹²⁶A, NadRHis₆K¹²⁶T, NadRHis₆Y²⁹²I und NadRHis₆W²⁵⁶F. (A) Aktivitätsassay mit Proteinkonzentrationen von 0,04 mg/ml mit ¹⁴C-NR (A/links) und ¹⁴C-NMN (A/rechts) als Substrat. (B) Aktivitätsassays mit Proteinkonzentrationen von 0,002 mg/ml mit ¹⁴C-NR (B/links) als Substrat und mit ¹⁴C-NR in Anwesenheit von 9 mM (nicht radioaktiv-markiertem) NAD⁺ (B/rechts). Die jeweiligen Reaktionen wurden bei 37°C 40 min lang inkubiert. Die jeweiligen Produkte wurden in DC getrennt und auf einem Röntgenfilm visualisiert. Die Standards (¹⁴C-NAD⁺, ¹⁴C-NMN, ¹⁴C-NR) sind im Bild gekennzeichnet. 1: NadRHis₆; 2: NadRHis₆K¹²⁶A; 3: NadRHis₆K¹²⁶T; 4: NadRHis₆Y²⁹²I; 5: NadRHis₆W²⁵⁶F.

Wie man in der Abb. 26/A sehen kann, mit ¹⁴C-NR als Substrat zeigten NadRHis₆K¹²⁶A und NadRHis₆K¹²⁶T bei Proteinkonzentration von 0,04 mg/ml keine Aktivität, d. h. sie konnten kein NAD⁺ synthetisieren (Abb. 26/A links; Spuren 2 und 3). Auch mit ¹⁴C-NMN (Abb. 26/A rechts; Spuren 2 und 3) als Substrat war die Aktivität dieser Punktmutanten

niedriger als die von NadRHis₆ (Spur 1). Dagegen war die Aktivität von NadRHis₆Y²⁹²I (Spuren 4) und NadRHis₆W²⁵⁶F (Spuren 5) in diesem Assay sowohl mit ¹⁴C-NR als auch mit ¹⁴C- NMN vergleichbar mit der Aktivität von NadRHis₆ (Abb. 26/A; Spur 1). In weiteren Analysen sollte die Aktivität der Punktmutanten bei niedrigeren Proteinkonzentrationen mit ¹⁴C-NR als Substrat in An- bzw. Abwesenheit von 9 mM kaltem NAD⁺ untersucht werden (Abb. 26/B). Wie erwartet, war hier für die Punktmutanten NadRHis₆K¹²⁶A und NadRHis₆K¹²⁶T keine Aktivität zu sehen (Abb. 26/B; Spuren 2 und 3). Obwohl die Aktivität der Punktmutante NadRHis₆Y²⁹²I bei 0,04 mg/ml vergleichbar mit der Aktivität von NadRHis₆ war, war bei Proteinkonzentrationen von 0,002 mg/ml und ¹⁴C-NR als Substrat kaum noch Aktivität zu sehen (Abb. 26/B, links; Spur 4). Nur NadRHis₆W²⁵⁶F zeigte bei niedrigeren Proteinkonzentrationen Aktivität (Abb. 26/B, links; Spur 5) vergleichbar zu der von NadRHis₆. Zudem war bei NadRHis₆W²⁵⁶F keine Hemmung der Aktivität in Anwesenheit von 9 mM NAD⁺ zu sehen (Abb. 26/B, rechts; Spur 5), während bei NadRHis₆ eine Hemmung der Aktivität in Anwesenheit von NAD⁺ zu sehen war (Abb. 26/B, rechts; Spur 1). Da für NadRHis₆K¹²⁶A und NadRHis₆K¹²⁶T eine Beeinträchtigung sowohl der RNK- als auch der NMNAT-Aktivität zu beobachten war und dass schon bei Proteinkonzentrationen von 0,04 mg/ml wurden diese Punktmutanten von den weiteren Untersuchungen hinsichtlich der Inhibition durch NAD⁺ ausgeschlossen. Interessanterweise, obwohl K¹²⁶ eigentlich in der NMNAT-Domäne liegt, ist bei den durchgeführten Analysen die RNK-Aktivität mehr beeinträchtigt als die NMNAT-Aktivität. Auch wenn hier die Frage der Proteininstabilität nicht auszuschließen ist, könnte ebenso auch die Oligomerisierungsfähigkeit des Proteins durch diese AS-Substitutionen (K¹²⁶A/T) beeinträchtigt sein, was wiederum ein Effekt auf die Aktivität haben kann. Ähnliche Argumentation kann auch bei der Punktmutante NadRHis₆Y²⁹²I verwendet werden. Hier war bei höherer Proteinkonzentration die Aktivität vergleichbar mit der von NadRHis₆, allerdings war bei niedrigeren Proteinkonzentrationen die RNK-Aktivität wesentlich niedriger als bei NadRHis₆. Da es auch hier schwer zu sagen ist, ob dieses Phänomen durch die Proteininstabilität zustande kommt, oder ob es dafür andere Gründe gibt, wurde auch diese Proteinmutante von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

7.5. *In vitro* Analyse der NAD^+ -abhängigen Inhibition von $\text{NadRHis}_6\text{W}^{256}\text{F}$

Da $\text{NadHis}_6\text{W}^{256}\text{F}$ in den vorangegangenen Analysen (siehe IV.7.4) mit ^{14}C -NR bzw. ^{14}C -NMN als Substrat ähnliche Aktivität wie das NadRHis_6 bei beiden verwendeten Proteinkonzentrationen zeigte und da hier zudem keine Hemmung der RNK-Aktivität in Anwesenheit von NAD^+ zu beobachten war, wurde eine genauere Analyse mit dieser Punktmutante durchgeführt. Dabei wurde eine Proteinkonzentration von 0,002 mg/ml verwendet. Die Assays wurden mit 2 mM ATP, 10 mM MgCl_2 und ^{14}C -NR (ca. 45 μM) in 100 mM HEPES-NaOH pH 7,5 in An- und in Abwesenheit von 9 mM NAD^+ bei 37°C durchgeführt (III.10.9). Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und 5 min bei 95°C inkubiert um die Reaktion zu stoppen. Die Aliquots wurden anschließend abzentrifugiert und 10 μl des Überstandes wurden in der Dünnschicht-Chromatographie analysiert (III.12.4). Als Kontrolle wurden auch parallel gleiche Ansätze mit NadRHis_6 auf die gleiche Weise behandelt. Die Ergebnisse sind in der Abb. 27 dargestellt.

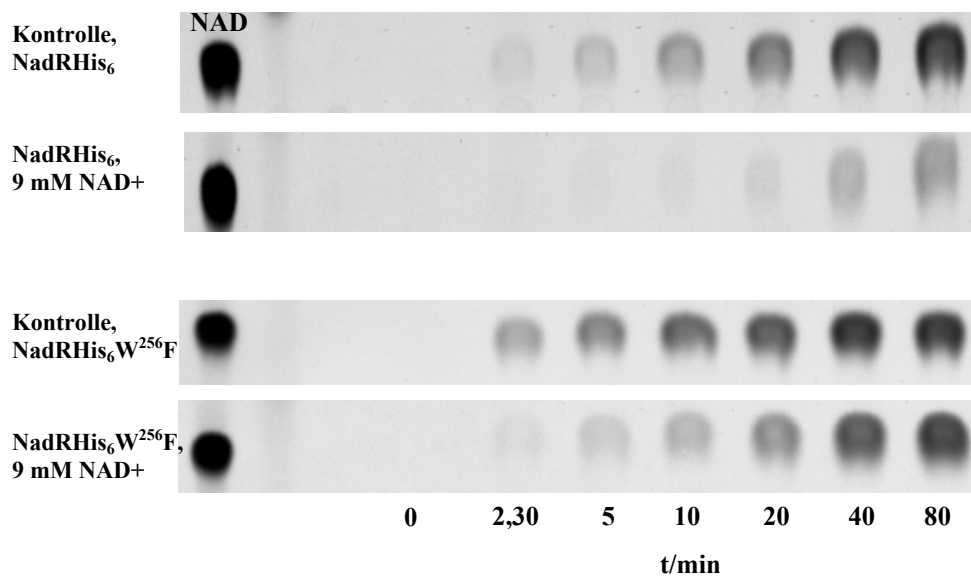


Abb. 27: *In vitro* Analyse der NAD^+ -Feedback Inhibition von NadRHis_6 und $\text{NadRHis}_6\text{W}^{256}\text{F}$ in der DC. Gezeigt ist die Synthese von NAD^+ in Anwesenheit von NAD^+ (9 mM) und in Abwesenheit von NAD^+ , wobei ^{14}C -NR als Substrat diente. Zu oben angegebenen Zeitpunkten (0, 2³⁰, 5, 10, 20, 40 und 80 min) wurden Proben entnommen und in der DC analysiert. In den oberen zwei Reihen sind die Reaktionen mit NadRHis_6 und in den unteren zwei Reihen die Reaktionen mit $\text{NadRHis}_6\text{W}^{256}\text{F}$ gezeigt. ^{14}C - NAD^+ als Standard ist auf jeder DC links gekennzeichnet.

Wie man in der Abb. 27 sehen kann, ist NadRHis₆W²⁵⁶F verglichen mit NadRHis₆ bei Anwesenheit von 9 mM NAD⁺ tatsächlich ersichtlich weniger inhibiert. In den ersten 20 min ist auch bei NadRHis₆W²⁵⁶F eine leichte Hemmung der Aktivität zu sehen, wobei diese nicht so ausgeprägt ist wie bei NadRHis₆. Nach 40 und 80 min allerdings ist bei NadRHis₆W²⁵⁶F optisch kaum ein Unterschied in Stärke des ¹⁴C-NAD⁺-Signals zwischen der Kontroll- und NAD⁺-Reaktion zu sehen. Um eine Quantifizierung der Reaktionen zu bekommen, wurde eine semiquantitative Auswertung der NAD⁺-Synthese in den oben gezeigten Reaktionen aus zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt: die NAD⁺-Spots wurden aus den DC-Folien ausgeschnitten und die c.p.m im Szintillationscounter gezählt. Inhibition bzw. Aktivitätsverlust wurde als Verhältnis der c.p.m.-Werte aus der NAD⁺-Reaktion und der Kontrollreaktion berechnet. Die Werte innerhalb der ersten 20 min bei der NadRHis-Reaktion mit NAD⁺ waren im Bereich der „Background“-Werte des Szintillators, daher war hier eine Auswertung nicht durchführbar. Nach 20 min hatte die Aktivität von NadRHis₆ im Ansatz mit NAD⁺ ca. 7% der Aktivität die im Kontrollansatz ohne NAD⁺ gemessen wurde, nach 40 min ca. 12% und nach 80 min ca. 25%. Dagegen betrug die Aktivität von NadRHis₆W²⁵⁶F im Ansatz mit NAD⁺ nach 20 min ca. 45%, nach 40 min ca. 80% und nach 80 min fast 100% der Aktivität des Kontrollansatzes.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann für die AS W²⁵⁶ eine Rolle bei der Vermittlung der Feedback-Inhibition durch NAD⁺ postuliert werden. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme von Singh et al., dass die Bindung von NAD⁺ an die „non-active site“ der RNK-Domäne von *hi*NadR einen inhibitorischen Effekt auf die RNK-Aktivität besitzt.

In weiteren Versuchen sollte anschließend überprüft werden, ob sich die *in vitro* Ergebnisse auch *in vivo* wiederholen lassen. Dafür wurden die Punktmutanten *nadRHis₆K¹²⁶A*, *nadRHis₆K¹²⁶T*, *nadRHis₆Y²⁹²I* und *nadRHis₆W²⁵⁶F* aus den entsprechenden pMM-Plasmiden in den pBAD18Kan Vektor kloniert (siehe III.14.2/IV.5.3) und in den SE01ΔRNK Stamm transformiert (III.11.6). Die Kan-resistenten Transformanten wurden durch Sequenzierung und Immunoblot mit Maus-anti-Penta-His Antikörper überprüft (Daten nicht gezeigt). Die SE01ΔRNK Stämme mit der chromosomalen Kopie von *nadRHis₆K¹²⁶A* (SE12ΔRNK), *nadRHis₆K¹²⁶T* (SE13ΔRNK), *nadRHis₆Y²⁹²I* (SE14ΔRNK) und *nadRHis₆W²⁵⁶F* (SE15ΔRNK) wurden anschließend auf ihre Fähigkeit ¹⁴C-Label zu akkumulieren in Abhängigkeit davon ob sie mit oder ohne NAD⁺ vorinkubiert wurden, überprüft (siehe IV.7.2). Als Faktor V-Quelle diente ¹⁴C-NAD⁺. Als Kontrollen wurden parallel SE01 und SE02ΔRNK(*nadRHis⁺*) getestet. Wie

schon in IV.7.2 beschrieben, in Ansätzen, die mit NAD^+ vorinkubiert wurden, war bei SE01 eine Reduktion der Akkumulationsfähigkeit um 50-60 % zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Bei SE02 Δ RNK (*nadRHis₆*), SE12 Δ RNK (*nadRHis₆K¹²⁶A*), SE13 Δ RNK (*nadRHis₆K¹²⁶T*), SE14 Δ RNK (*nadRHis₆Y²⁹²I*) und SE15 Δ RNK (*nadRHis₆W¹²⁶F*) dagegen war die Akkumulationsfähigkeit in den Ansätzen, die mit NAD^+ vorinkubiert wurden, vergleichbar mit den Ansätzen, die ohne NAD^+ inkubiert wurden (Daten nicht gezeigt). Da für *NadRHis₆* *in vitro* eine deutliche Hemmung der RNK-Aktivität in Anwesenheit von NAD^+ gezeigt werden konnte, war es überraschend, dass *in vivo* keine Reduktion der Akkumulationsfähigkeit bei der Vorinkubation mit NAD^+ zu sehen war. Da alle Stämme, die im SE01 Δ RNK Hintergrund konstruiert wurden, zu der jeweiligen *nadRHis₆*-Variante zusätzlich auch das ganze pBAD18Kan-Plasmid und eine weitere, native Kopie der NMNAT-Domäne haben (siehe III.13.1; Abb. 7) konnte dies ein Grund für dieses Phänomen sein. Daher wurden Versuche unternommen, das pBAD18Kan-Rest und die native NMNAT-Domäne aus dem Chromosom zu deletieren, so dass nur *nadRHis₆* (bzw. andere Punktmutanten) auf dem Chromosom verbleiben. Aus Zeitmangel konnten diese Versuche nicht zu Ende geführt werden, so dass hier keine eindeutigen Aussagen über das *in vivo* Verhalten von *NadRHis₆*-Punktmutanten W²⁵⁶F, Y²⁹²I, K¹²⁶A/T gemacht werden können.

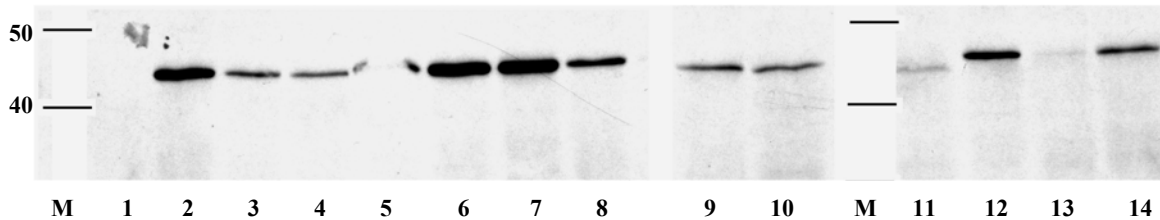
8. Charakterisierung der AmPR-Resistenten *nadR*-Punktmutanten mit Mutationen außerhalb der Walker A und B Motifen und der LID-Domäne

Bei der Analyse der AmPR-resistenten Mutanten, im SE01 und SE02pSEpnuCHis₆-N' Hintergrund, wurde die Mehrzahl der Mutationen im Walker A Motif identifiziert. Daher wurden gezielte AS-Substitutionen im Walker A und zusätzlich auch im Walker B Motif und in der LID-Domäne (da sie in der Literatur als Bestandteile des aktiven Zentrum von vielen Kinasen beschrieben sind) eingeführt und diese wurden dann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* analysiert (siehe IV.5.1-5.3). Allerdings wurden auch einige Punktmutationen außerhalb dieser Motife identifiziert (s. Tabelle 8). Die Auswirkung dieser Punktmutationen auf Transportfähigkeit und die NAD^+ -Synthese wurden ebenfalls untersucht.

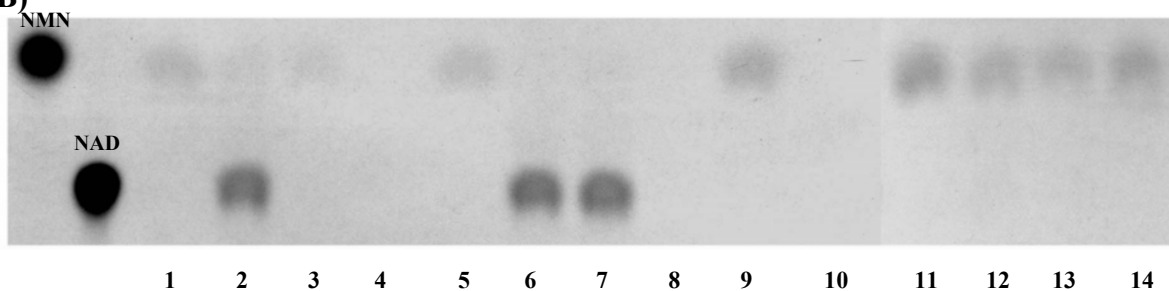
Zunächst wurde in einem Immunoblot mit gereinigtem *NadR*-Antiserum untersucht, ob diese *NadR*-Punktmutanten überhaupt exprimiert werden. Gleichzeitig wurden auch Aktivitätsassays mit Rohextrakten durchgeführt (III.10.11). Als Substrate dienten ¹⁴C-NR und ¹⁴C-NMN (ca. 45 μ M). Die jeweiligen Reaktionsansätze wurden anschließend in der

DC analysiert und auf einem Röntgenfilm nachgewiesen. Die Immunoblots und die entsprechende DC's sind in der Abb. 28 dargestellt.

A)



B)



C)

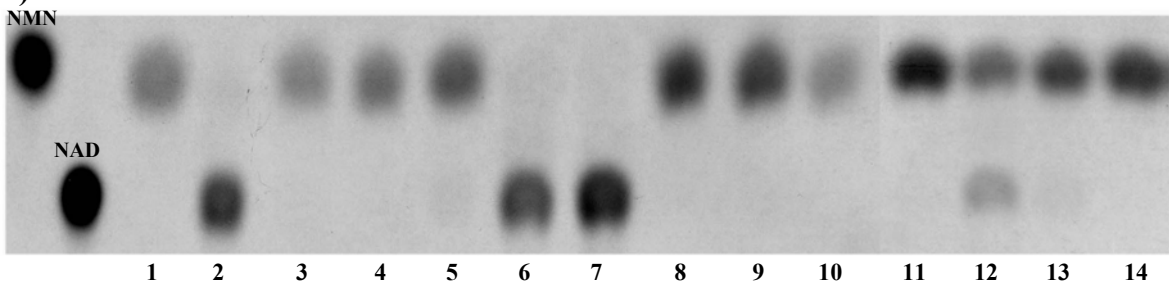


Abb. 28: Immunoblot und DC-Analyse der Rohextrakten von AmPR^r-NadR-Punktmutanten außerhalb der Walker A und B Motifen und der LID-Domäne. (A) Immunoblot mit Rohextrakten. Es wurden jeweils ca. 60 µg des Rohextraktes im 12,5 % PAA-Gel getrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrocellulose Membran, erfolgte die Detektion der NadR-Banden mit gereinigtem NadR-Antiserum. Größenstandard ist seitlich in kDa angegeben. **(B)** DC-Analyse der NadR-Aktivität in den jeweiligen Rohextrakten mit ¹⁴C-NR als Substrat. **(C)** DC-Analyse der NadR-Aktivität in den jeweiligen Rohextrakten mit ¹⁴C-NMN als Substrat. Standards (NMN und NAD⁺) sind links im Bild gekennzeichnet.

1: SE01ΔRNK; **2:** SE01 (Wt); **3:** SE01*nadRQ*³¹¹K; **4:** SE01*nadRR*²²²H; **5:** SE01*nadRS*⁸³A; **6:** SE02pSEpnuC-His₆N'*(ΔpnuC, nadV^r, His₆pnuC⁺)*; **7:** SE02pSEpnuC-His₆N'*nadRH*¹⁶¹P; **8:** SE02pSEpnuC-His₆N'*nadRA*²⁵⁵E; **9:** SE02pSEpnuC-His₆N'*nadRG*²³³E; **10:** SE02pSEpnuC-His₆N'*nadRR*²²²S; **11:** SE02pSEpnuC-His₆N'*nadRE*³⁸⁰Stop; **12:** SE02pSEpnuC-His₆N'*nadRV*²⁰¹A; **13:** SE02pSEpnuC-His₆N'*nadRM*⁵²I; **14:** SE02pSEpnuC-His₆N'*nadRW*²¹⁴C.

Im Immunoblot (Abb. 28/A) konnten alle NadR-Banden mit der Ausnahme der NadR Δ RNK-Bande detektiert werden, auch wenn die Intensität der Banden unterschiedlich war, obwohl in der Coomassie-gefärbten SDS-PAGE die Proteinmenge in den jeweiligen Spuren vergleichbar war (Daten nicht gezeigt). So z. B. war die NadRE³⁸⁰Stop-Mutante (Abb. 28/A; Spur 11) in der Tat etwas kürzer (es fehlen die letzten 41 AS) als andere NadR-Banden und gleichzeitig war diese Bande sehr schwach im Immunoblot. Da bei der NadR Δ RNK-Variante gar keine Bande zu sehen ist (Abb. 28/A; Spur 1), kann der Grund für die schwache Bandenintensität Instabilität der Proteinvariante NadRE³⁸⁰Stop sein. Eine andere Punktmutante, NadRM⁵²I (Abb. 28/A; Spur 13), war auch im Immunoblot sehr schwach zu sehen. Singh et al. und Kurnasov et al., haben M⁵² als das eigentliche Startcodon vorgeschlagen, daher wäre es hier möglich, dass das veränderte Startcodon zu Veränderung bzw. Erniedrigung der Proteinexpression führt. Da noch niemand eine N'-terminale Sequenzierung des NadR-Proteins durchgeführt hat, gibt es keine eindeutige Bestätigung der Annahme, dass NadR bei M⁵² anfängt. Mit Ausnahme der NadRH¹⁶¹P-Variante (Abb. 28/A; Spur 7) war die Intensität der NadR-Punktmutanten niedriger als die Intensität der NadR-Banden in Kontrollen SE01 (Wt; Abb. 28/A; Spur 2) und SE02pSEpnuCHis₆-N' (Abb. 28/A; Spur 6; SE01 Δ pnuC mit plasmidkodiertem His₆-pnuC). In der DC-Analyse der NadR-Aktivität in den jeweiligen Rohextrakten mit ¹⁴C-NR als Substrat war NAD⁺-Synthese nur bei den Kontrollen SE01 und SE02pSEpnuCHis₆-N' (Abb. 28/B; Spur 2 und 6) und der Mutante NadRH¹⁶¹P (Abb. 28/B; Spur 7) zu sehen. Bei allen anderen Punktmutanten war keine NAD⁺-Synthese zu sehen. In der DC-Analyse mit ¹⁴C-NMN als Substrat konnte NAD⁺-Synthese in den Kontrollen SE01 und SE02pSEpnuCHis₆-N' (Abb. 28/C; Spur 2 und 6), bei der NadRH¹⁶¹P-Mutante (Abb. 28/C; Spur 7) und eine schwache NAD⁺-Synthese bei NadRV²⁰¹A-Mutante (Abb. 28/C; Spur 12) beobachtet werden. Bei der NadRM⁵²I-Mutante ist der NAD⁺-Spot kaum sichtbar (Abb. 28/C; Spur 13). Im Prinzip kann man sagen, dass die Intensität der NadR-Banden im Immunoblot mit der NAD⁺-Synthesefähigkeit korreliert. Da die Proteininstabilität nach Zellaufschluss als mögliche Ursache der fehlender NadR-Aktivität bei den meisten Mutanten nicht ausgeschlossen werden kann, können hier keine eindeutigen Aussagen über die Auswirkung dieser Punktmutationen auf die RNK- und NMNAT-Aktivität getroffen werden.

In einem weiteren Versuch wurde die Fähigkeit der NadR-Punktmutanten NR aufzunehmen getestet (III.12.3). Die Zellen wurden mit ¹⁴C-NAD⁺ (1 μ M) als Faktor V

Quelle inkubiert. Nach 15 min wurden Proben entnommen, gefiltert und im Szintillationscounter gemessen. Die Akkumulation des ^{14}C -Labels wurde prozentualer Anteil der eingesetzten Radioaktivität in % c.p.m. angegeben. Die Ergebnisse sind in der Abb. 29 dargestellt.

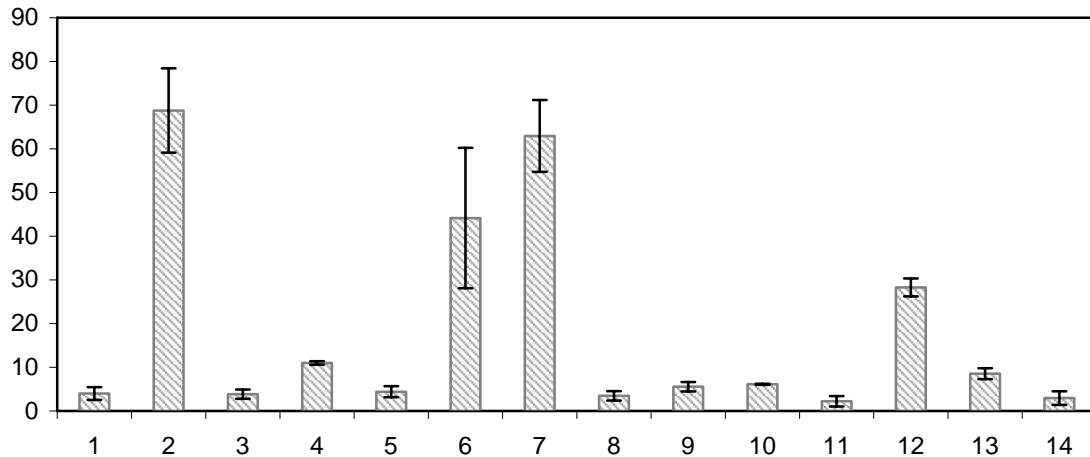


Abb. 29: Aufnahme des ^{14}C -Labels in AmPR-resistenten SE01- und SE02pSEpnuCHis₆-N'-Stämmen mit Punktmutationen im *nadR*-Gen. Die Konzentration des ^{14}C -NAD⁺ betrug 1 μM. Es wurde die Akkumulation nach 15 min Inkubation mit dem ^{14}C -NAD⁺ gemessen. Die Akkumulation des von ^{14}C -NAD⁺ stammenden Labels in den Zellen wurde als prozentualer Anteil der eingesetzten Radioaktivität in c.p.m. angegeben. **1:** SE01ΔRNK; **2:** SE01 (Wt); **3:** SE01*nadRQ*^{311K}; **4:** SE01*nadRR*^{222H}; **5:** SE01*nadRS*^{83A}; **6:** SE02pSEpnuC-His₆N' (Δ*pnuC*, *nadV*⁺, His₆*pnuC*⁺; II); **7:** SE02pSEpnuC-His₆N'*nadRH*^{161P}; **8:** SE02pSEpnuC-His₆N'*nadRA*^{255E}; **9:** SE02pSEpnuC-His₆N'*nadRG*^{233E}; **10:** SE02pSEpnuC-His₆N'*nadRR*^{222S}; **11:** SE02pSEpnuC-His₆N'*nadRE*^{380Stop}; **12:** SE02pSEpnuC-His₆N'*nadRV*^{201A}; **13:** SE02pSEpnuC-His₆N'*nadRM*^{52I}; **14:** SE02pSEpnuC-His₆N'*nadRW*^{214C}.

Als Positivkontrollen wurden die Stämme SE01 (Wt; *nadV*⁺; Abb. 29, Spur 2) und SE02pSEpnuCHis₆-N' (Δ*pnuC*, *nadV*⁺, His₆*pnuC*⁺; Abb. 29, Spur 6) verwendet. Der Stamm SE02pSEpnuCHis₆-N' akkumuliert ca. 50 % des ^{14}C -Labels und der SE01 (Wt) ca. 70 %, d. h. die Komplementation des Δ*pnuC*-Phänotyps durch plasmidkodierten PnuC mit N'-terminalem His₆-Tag erreicht ca. 2/3 des Wildtyps. Da die meisten AmPR^r *nadR*-Punktmutanten im SE02pSEpnuCHis₆-N' Hintergrund gemacht wurden ist es wichtig zu wissen, dass ein Teil der Transportdefizits von der Deletion des *pnuC*-Gens bzw. unvollständige Komplementation durch PnuC-His₆ herrührt. Die SE01ΔRNK-Mutante (Abb. 29, Spur 1) diente als negative Kontrolle und konnte wie schon gezeigt ca. 2-5 % des ^{14}C -Labels akkumulieren. Mit Ausnahme der *NadRH*^{161P} (Spur 7)- und der *NadRV*^{201A} (Spur 12), beide im SE02pSEpnuCHis₆-N' Hintergrund, konnten alle andere

Punktmutanten weniger als 10% des ^{14}C -Labels akkumulieren. Die NadRH¹⁶¹P-Punktmutante war eine der wenigen, die in der DC-Analyse sowohl aus ^{14}C -NR als auch ^{14}C -NMN NAD^+ synthetisieren konnte. Sie war auch die einzige dessen Banden-Intensität im Immunoblot vergleichbar war mit der Intensität der Kontrollen (NadR-Banden im SE01 und SE02pSEpnuCHis₆-N[']). Im Transport Assay konnte diese Punktmutante ca. 62% des ^{14}C -Labels akkumulieren, also etwas mehr als die entsprechende Kontrolle SE02pSEpnuCHis₆-N[']. Da bei dieser Mutante weder die NR-Transportfähigkeit noch die RNK- und NMNAT-Aktivität beeinträchtigt ist, stellt sich die Frage, wodurch die AmPR^f vermittelt wird. Als eine Möglichkeit wäre vorstellbar, dass diese Punktmutation eine Veränderung der Substraterkennung im Bezug auf AmPR bewirkt, so dass AmPR nicht mehr als Substrat erkannt wird. Die NadRV²⁰¹A-Punktmutante kann ca. 30% des ^{14}C -Labels akkumulieren, also ca. 40% weniger als die Kontrolle SE02pSEpnuCHis₆-N[']. In der DC-Analyse konnte eine schwächere NAD^+ -Synthese aus ^{14}C -NMN beobachtet werden, aber keine aus ^{14}C -NR.

Auch hier kann insgesamt eine Korrelation zwischen der Fähigkeit NAD^+ zu synthetisieren und der Transportfähigkeit festgestellt werden, da nämlich alle NadR-Mutanten, die in der DC-Analyse eine verminderte bzw. keine NAD^+ -Synthese zeigten, auch im Transport Assay eine verminderte Fähigkeit ^{14}C -Label zu akkumulieren aufwiesen.

Da bei diesen Analysen nicht ausgeschlossen werden kann, dass auf dem Chromosom auch andere Mutationen vorhanden sind, die zusammen mit *nadR*-Punktmutationen AmPR^f vermitteln, sind weitere und genauere Analysen erforderlich, um eindeutige Aussagen über die Wirkung dieser Punktmutanten auf NAD^+ -Synthese und NR-Transport machen zu können. Aus diesem Grund sind die oben genannten *nadR*-Punktmutationen in den pCR[®]T7 TOPO-Vektor kloniert worden. Dadurch sollte die Aufreinigung der rekombinanter NadR-Punktmutanten mit C'-terminalem His₆-Tag über die Ni²⁺-Säulen und eine anschließende *in vitro* und auch *in vivo* Analyse dieser Punktmutanten ermöglicht werden. Die jeweiligen Konstrukte mit dem His₆-Tag werden zur Zeit sequenziert. Aus Mangel an Zeit konnten keine Aufreinigungen und weitere Analysen durchgeführt werden.

9. Spielt HI0762 ORF eine Rolle im NAD⁺-Metabolismus von *H. influenzae* ?

Das *nadR*-Gen in *H. influenzae* bildet laut bioinformatischen Analysen (Operon Prediction; www.microbesonline.org) zusammen mit einem weiteren, bisher nicht charakterisierten, ORF, welches in der TIGR-Datenbank als HI0762- Locus (Fleischmann et al., 1995; www.tigr.org) gekennzeichnet ist, ein Operon. Die kodierten Sequenzen von *nadR* und HI0762 überlappen sich teilweise, d. h. Startkodon von HI0762-ORF befindet sich im kodierenden Bereich von *nadR*. Im weiteren Verlauf wird hier der HI0762-Locus als *nadX* bezeichnet. Diese *nadR/nadX* Anordnung findet man auch im Genom anderer *Pasteurellaceae*, z.B. bei *P. multocida*, *H. ducreyi*, und *A. actinomycetemcomitans*. Da *nadR* eine essentielle Rolle im NAD⁺-Metabolismus von *H. influenzae*, und vermutlich auch bei anderen *Pasteurellaceae* spielt, ist es nahe liegend anzunehmen, dass *nadX*, als Bestandteil vom *nadR*-Operon auch eine Funktion im NAD⁺-Metabolismus haben könnte. Dies sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

Bioinformatische Analysen ergaben für das putative NadX-Protein (Swiss-Prot Accession-Nr: P44050) folgende Informationen: das 681 bp langes ORF kodiert für ein hypothetisch konserviertes, 226 AS langes Protein. Das errechnete Molekulargewicht beträgt ca. 26 kDa und der theoretische isoelektrische Punkt (pI) liegt bei 6,75. Das Hydrophobizitätsmodell nach Kyte und Doolittle (Kyte und Doolittle, 1982) und nach GES (Goldman, Engelman und Steitz; Engelman et al., 1986) ergab keine auffälligen hydrophoben Bereiche, die eine Transmembrandomäne vermuten lassen. Die Suche nach konservierten Domänen im NCBI-Server (CDD; Marchler-Bauer et al., 2004) und mit Prosite-Programm (F) ergab für NadX eine Zuordnung zu der Familie der Metallophosphoesterasen (pfam00149). Diese Proteinfamilie beinhaltet eine Vielzahl von Phosphoesterasen, wie z. B. Protein Phosphoserin Phosphatasen, Nucleotidasen, 2'-3' cAMP Phosphodiesterasen, Sphingomyelin Phosphodiesterasen und Nucleasen wie das bakterielle Protein SbcD.

Innerhalb der Familie der Metallophosphoesterasen weist NadX die meiste Ähnlichkeit zu der COG-Gruppe 2129 (e-Werte: 4e-04; putative Phosphoesterasen). Mitglieder dieser vorwiegend nicht charakterisierten Familie teilen ein Motif, dessen ungefähre Consensussequenz: „HxD(25x)GDxxDx(25x)GNHD“ lautet. Eine Gegenüberstellung weiterer Mitglieder dieser Gruppe zu NadX befindet sich im Anhang (Abb. 31). Eine BLAST-Suche (Altschul et al., 1997) mit NadX ergab Homologien zu unbekanntem, hypothetisch konserviertem Protein PM1388 bei *P. multocida* PM70 (77,4 % Identität); zu hypothetischen MS0168 Protein bei *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E (69, 9%

Identität) und zu zwei putativen Proteinen bei *H. ducreyi* 35000HP: HD0276 (64,1 % Identität) und HD0277 (70 % Identität). Das HD0276 entspricht dem N'-terminalen Teil von NadX und HD0277 dem C'-terminalen Teil von NadX, und da diese zwei ORF's sich überlappen, ist es wahrscheinlich, dass es sich hier eigentlich um ein ORF handelt.

Um den Einfluss von NadX auf NAD⁺-Metabolismus zu untersuchen, wurde zunächst entsprechende Deletionsmutation im AK01 (Rd *sxy-1*, Str^r, konstitutiv kompetent) Stamm konstruiert, wobei das *nadX*-Gen durch eine *cat*-Kassete ersetzt wurde (siehe III.13.1; III.14.1). Die Cm^r-Klone wurden mittels Southernblot und durch Sequenzierung überprüft und bestätigt. Gleichzeitig wurde auch das entsprechende Komplementationsplasmid pNadXKan konstruiert (III.14.2), durch Sequenzierung überprüft und anschließend in die AK01Δ*nadX*-Mutante transformiert (III.11.6). In den ersten Versuchen wurde die Wachstumsfähigkeit der Mutante mit dem Wt und der Komplementante auf Agar-Platten und im Flüssigmedium verglichen. Dabei wurde sowohl das BHI-Medium mit Hemin und verschiedenen NR, NMN und NAD⁺ Konzentrationen verwendet als auch das Minimalmedium mit Hämin und mit verschiedenen Konzentrationen von NR, NMN und NAD⁺. Unter keiner der getesteten Bedingungen konnte ein signifikanter Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden. In weiteren Versuchen wurde die Transportfähigkeit der *nadX*-Deletionsmutante untersucht und auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zum Wt beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). In einem weiteren Versuch wurde in der DC-Analyse die NAD⁺-Synthese zwischen der Deletionsmutante, dem Wt und der Komplementante verglichen. Dabei wurden die jeweiligen Rohextrakte mit ¹⁴C-NR bzw. ¹⁴C-NMN (je ca. 45 μM) und 2 mM ATP und 10 mM MgCl₂ bei 37°C inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten (2 min und 30 min) wurden Aliquots entnommen. Die Reaktion wurde durch 5 min lange Inkubation bei 95°C gestoppt und denaturierte Proteine abzentrifugiert (5 min, 13000 rpm). Danach wurden 10 μl des Überstandes in der DC aufgetrennt und auf einem Röntgenfilm visualisiert (III.12.4). Die Ergebnisse der DC-Analyse sind in der Abb. 30 dargestellt.

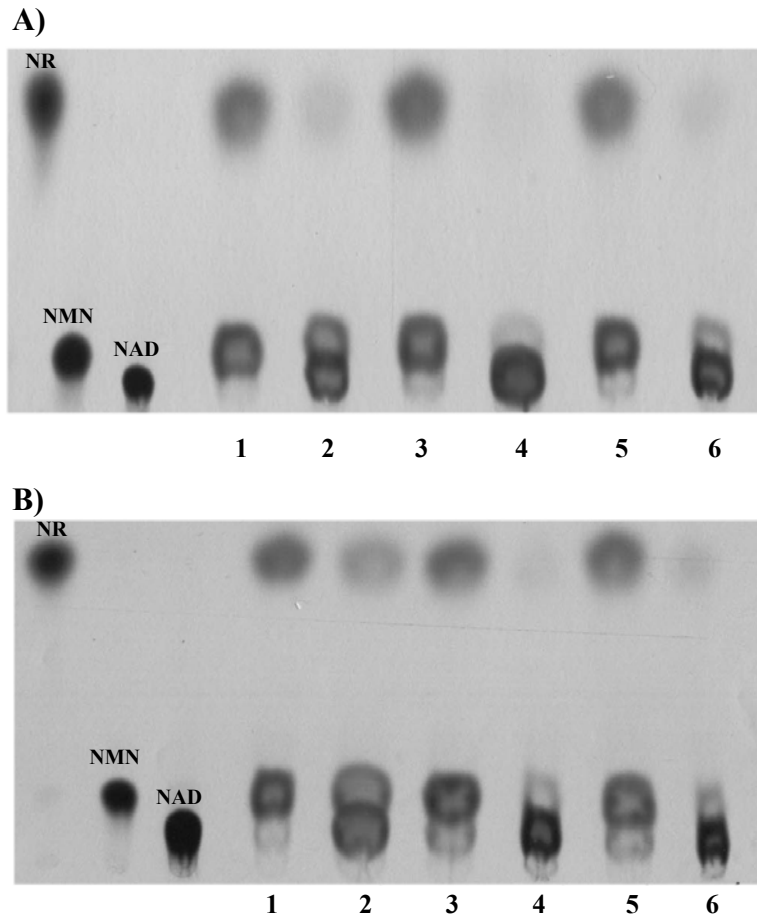


Abb. 30: DC-Analyse der NAD^+ -Synthese in Abhängigkeit vom *nadX*-Gen. Dargestellt ist eine DC-Analyse der NAD^+ -Synthese im AK01 (Wt), AK01 Δ *nadX* und AK01 Δ *nadX*_{compl}. Rohextrakte aus AK01(Wt), AK01 Δ *nadX* und AK01 Δ *nadX*_{compl} (Δ *nadX*, pNadXKan) wurden mit ^{14}C -NR (**30/A**) und ^{14}C -NMN (**30/B**) inkubiert und in der DC aufgetrennt. Als Standard wurden jeweils $1\mu\text{l}$ ^{14}C -NR, ^{14}C -NMN und ^{14}C - NAD^+ aufgetragen. Spuren **1-2** : Rohextrakt aus AK01 (Wt) nach 2 min (**1**) und 30 min (**2**) Inkubation; Spuren **3-4**: Rohextrakt aus AK01 Δ *nadX* nach 2 min (**3**) und 30 min (**4**) Inkubation; Spuren **5-6**: Rohextrakt aus AK01 Δ *nadX*_{compl} (Δ *nadX*, pNadXKan) nach 2 min (**5**) und 30 min (**6**) Inkubation.

In der DC-Analyse der NAD^+ -Synthese konnten zwischen dem AK01 (Wt; Spuren 1 und 2) und der *nadX*-Deletionsmutante (Spuren 3 und 4) nur leichte Unterschiede festgestellt werden. Der ^{14}C - NAD^+ -Spot nach 30 min ist bei der Deletionsmutante etwas intensiver, unabhängig davon, ob ^{14}C -NR (Abb. 30/A; Spur 4) oder ^{14}C -NMN als Substrat (Abb. 30/B; Spur 4) diente. Gleichzeitig ist die Intensität der ^{14}C -NR-Spots bei der *nadX*-Deletionsmutante etwas schwächer als bei dem Wt, v. a. im 30 min Wert (Spuren 2 beim Wt und Spuren 4 bei der Δ *nadX*-Mutante). Der Unterschied in der Intensität der ^{14}C -NR Spots ist vor allem in der Abb. 30/B besonders deutlich. Nach 30 min ist bei der *nadX*-Deletionsmutante fast gar kein ^{14}C -NR (Abb. 30/B; Spur 4) zu sehen, während beim Wt

noch ein recht deutlicher Spot zu sehen ist (Abb. 30/B; Spur 2). Da in diesem Test Rohextrakte verwendet wurden, in welchen auch NadN und e(P4) vorhanden sind, ist die Entstehung von ^{14}C -NR in den Ansätzen, die mit ^{14}C -NMN inkubiert wurden durch die Aktivität vom e(P4) zu erklären. Allerdings scheint die NR-erzeugende Aktivität in den Ansätzen mit dem Rohextrakt aus der *nadX*-Deletionsmutante etwas niedriger als im Wt-Rohextrakt zu sein, obwohl die *nadX*-Deletionsmutante auch e(P4) und NadN besitzt. Die Intensität der ^{14}C -NAD⁺ und ^{14}C -NR Spots bei der Komplementante (AK01 Δ *nadX*_{compl}; Spuren 5 und 6) entsprach mehr der *nadX*-Mutante als dem Wt, so dass hier nicht eindeutig sicher ist, ob die *nadX*-Deletion durch das pNadXKan Plasmid komplementiert wird. Da bioinformatische Analysen das NadX-Protein in die Familie der Phosphoesterasen einordnen, ist es verlockend für NadX eine NMN-Phosphoesterase Funktion zuzuordnen. Allerdings sind die hier durchgeführten DC-Analysen nicht eindeutig genug bzw. nicht ausreichend für eine definitive Aussage.

Aus diesem Grund sollte in weiteren Versuchen ein Expressionssystem für NadX etabliert werden, welches eine anschließende Reinigung des NadX-Proteins und weitere *in vitro* Charakterisierung ermöglicht. Im Hinblick der weiteren Untersuchungen, unter anderem auch der Frage ob NadX mit NadR interagiert, wurde als Expressionssystem zunächst das pGEX-3X GST (Gluthation S-Transferase)-Expressionssystem vom Amersham gewählt, da das NadR mit dem His-Tag schon vorhanden war. Die Klonierung des *nadX*-Gens in den pGEX-3X Vektor ist in Kapitel III.14.2.2 beschrieben. Das resultierende Plasmid wurde pGST-*nadX* genannt. Dabei wurde an den N⁷-Terminus von NadX das GST-Protein fusioniert. Die erste AS vom NadX wurde aufgrund der Klonierung von Methionin zu Tryptophan verändert. Das GST-NadX Fusionsprotein sollte ein Molekulargewicht von ca. 52 kDa haben. Die Überexpression des GST-NadX Proteins wurde im *E. coli* BL21 Stamm durchgeführt. Obwohl bei 37°C und mit 0,8 mM IPTG eine gute Überexpression des rekombinanten GST-NadX Proteins beobachtet wurde, war das GST-NadX leider nicht löslich. In weiteren Versuchen, bei welchen die Expression- und Zellaufschlussbedingungen verändert wurden (Erniedrigung der Expressionstemperatur auf 20°C bzw. 15°C; niedrigere IPTG Konzentrationen: 0,5 mM und 0,3 mM; Zellaufschluss in verschiedenen Puffer: PBS, 50 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 50 mM NaH₂PO₄ mit verschiedenen NaCl- Konzentrationen (150-500 mM), verschiedenen Detergenzien: Triton X-100 (0,5 bzw. 1 %); Brij 35: 0,1 %) konnte das Problem der Insolubilität von GST-NadX nicht gelöst werden (Daten nicht gezeigt).

Daher wurde ein zweites Expressionssystem konstruiert, mit welchem das native NadX überexprimiert und gereinigt werden soll. Das *nadX*-Gen wurde in den pTrc99A, einen IPTG induzierbaren Vektor kloniert. Aufgrund der Klonierungsstrategie wurde die zweite AS von Isoleucin zu Valin verändert (siehe III.14.2.2). Das resultierende Plasmid wurde pTrc99A-*nadX* genannt und durch Sequenzieren überprüft. Leider konnten weitere Untersuchungen (Löslichkeit von NadX, eventuelle Reinigung etc) aus Zeitmangel nicht durchgeführt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass *nadX* kein essentielles Gen für *H. influenzae* ist. In den Wachstums- und Transportassays konnten keine Unterschiede zwischen dem Wt und der *nadX*-Deletionsmutante festgestellt werden. Lediglich in der DC-Analyse der NAD⁺-Synthese konnten zwischen dem Wt und der *nadX*-Deletionsmutante leichte Unterschiede beobachtet werden, die jedoch nicht ausreichend sind, um eine eindeutige Aussage treffen zu können. Da in dieser Arbeit keine Aufreinigung des GST-NadX Fusionsproteins aufgrund der Unlöslichkeit des rekombinanten Proteins durchgeführt werden konnte, können hier keine eindeutigen Aussagen über die Funktion von NadX in *H. influenzae* gemacht werden.

V Diskussion

H. influenzae ist ein opportunistischer Krankheitserreger, welcher nur beim Menschen vorkommt. Ein besonderes Merkmal von *H. influenzae* ist deren strikte Abhängigkeit von NAD^+ . Das Bakterium kann NAD^+ nicht selbst synthetisieren und ist daher auf NAD^+ Ressourcen des Wirtes angewiesen, um überleben zu können. Aus diesem Grund sind die Komponenten des NAD^+ Stoffwechselweges als putative Antibiotika Ziele von Interesse. Eine zentrale Rolle im NAD^+ Stoffwechsel spielt das Protein NadR. Erst kürzlich wurde dessen Kristallstruktur aufgeklärt (Singh et al., 2002). Kurz danach erfolgte auch die *in vitro* Charakterisierung. Dabei stellte sich heraus, dass NadR von *H. influenzae* zwei funktionelle Domänen besitzt: Im N'-terminalen Bereich befindet sich die Nikotinamid-Mononukleotid-Adenylyltransferase (NMNAT), welche aus NMN und ATP NAD^+ synthetisiert. In der C'-terminalen Hälfte des Proteins liegt die Ribosylnukleotid-Kinase (RNK), die Synthese von NMN aus NR und ATP katalysiert (Kurnasov et al., 2002). Ziel dieser Arbeit war es NadR unter *in vivo* Bedingungen zu charakterisieren, wobei der Schwerpunkt auf der Charakterisierung der RNK-Domäne lag.

1. Charakterisierung der NadR-RNK-Domäne in *H. influenzae*

Dass *nadR* ein essentielles Gen in *H. influenzae* ist, wurde indirekt von mehreren Gruppen unabhängig voneinander gezeigt, indem die *in vitro* eingeführte Transposoninsertionen im *nadR*-Gen nicht in das Chromosom transferiert werden konnten (Akerley et al., 2002; Kurnasov et al., 2002). Auch im Laufe dieser Arbeit gelang keine Herstellung von *nadR*-Knockout Mutanten. Der Versuch, ein induzierbares System auf der Basis von *tet*-Promotor für *nadR* zu konstruieren schlug ebenfalls fehl. Kurnasov et al. konnten eine verkürzte Version von NadR, welche nur die NMNAT-Domäne enthielt, in *E. coli* überexprimieren und als funktionsfähiges Protein aufreinigen. Um festzustellen, ob diese verkürzte Version *in vivo* für die Lebensfähigkeit der Zelle ausreichend ist, wurden zwei verschiedene RNK-Deletionsmutanten im SE01 Hintergrund hergestellt. Da der SE01 Stamm eine chromosomale Kopie des *H. ducreyi nadV* Gens besitzt, welches für eine Nam-Phosphoribosyltransferase kodiert, die aus Nam und PRPP NMN synthetisiert, wurde davon ausgegangen, dass in diesem Stamm das Fehlen der RNK-Aktivität kompensiert werden kann. In der Tat konnten im SE01 Stamm zwei RNK-Deletionen hergestellt werden. Bei einer RNK-Deletion (SE01 Δ RNK) fehlte die ganze RNK-Domäne (AS225-

418) und in der zweiten fehlten die letzten C'-terminalen 58 AS (SE01 Δ RNK58). Damit konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von NadV, die RNK Domäne nicht essentiell ist. Um festzustellen, ob in einem „normalen“ *H. influenzae* Stamm, also *nadV*, die RNK Domäne essentiell ist, wurde versucht die beschriebenen Deletionen in den AK01 (Rd *sxy-1*) zu transferieren (IV.1.2). Dabei stellte sich heraus, dass die RNK-Deletionen immer nur zusammen mit dem *nadV* Gen in den AK01 Stamm transferiert werden konnten. Alle Cm^r-Klone konnten auf Nam als einzige Faktor V-Quelle wachsen. Die Anzahl der Cm^r Klone in den transformierten SE01 und AK01pNadRKan Stämmen, welche als Vergleichskontrolle parallel behandelt wurden, war ca. 300-400x höher als die Anzahl der AK01 Cm^r Klone. Die Tatsache, dass die RNK-Deletionen nur zusammen mit *nadV* in das Chromosom von AK01 transferiert werden konnten, sowie die Häufigkeit (1/300), mit welcher diese zwei crossover Ereignisse stattfanden, zeigt indirekt, dass nicht nur die RNK-Domäne von NadR sondern auch die letzten 58 AS essentiell in *H. influenzae* sind. Desweiteren kann aufgrund dieser Ergebnisse angenommen werden, dass die RNK-Domäne von NadR bei NAD⁺-unabhängigen *Pasteurellaceae* wie *P. multocida*, *A. actinomycetemcomitans* und *H. ducreyi* nicht essentiell ist, da diese *nadV*⁺ besitzen. In weiteren Versuchen wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung der RNK-Deletion im SE01 Stamm untersucht. Um sicher zu gehen, dass alle beobachteten Effekte auf dem Fehlen der RNK-Domäne beruhen, wurde die verkürzte NadR-Variante auf ihre Funktionsfähigkeit überprüft. Bei anfänglichen Tests wurden dafür die Rohextrakte aus Wt (SE01), Deletionsmutante (SE01 Δ RNK) und der Komplementante (SE01 Δ RNK_{compl}; pNadRKan) verwendet und in einer DC analysiert. Wie erwartet, konnten der Wt und die Komplementante sowohl aus ¹⁴C-NR als auch aus ¹⁴C-NMN NAD⁺ synthetisieren, was auf ein funktionsfähiges NadR Protein in den Zellextrakten hindeutete. Bei der RNK-Deletionsmutante traten jedoch überraschende Ergebnisse zutage: Mit ¹⁴C-NR als Substrat konnte eine Entstehung von NMN beobachtet werden, wohingegen mit ¹⁴C-NMN als Substrat keine NAD⁺ Synthese beobachtet wurde (IV.2; Abb. 8/A/B). Da hier die RNK-Domäne deletiert wurde, deutete die beobachtete NMN-Synthese auf das Vorhandensein einer zweiten, unbekanntenen Kinase hin, die NR zu NMN phosphorylieren kann. Die Tatsache, dass mit ¹⁴C-NMN als Substrat keine NAD⁺-Synthese zu detektieren war, könnte mit der Instabilität des Proteins erklärt werden, demzufolge kann der Zellaufschluss zum Verlust der NMNAT Aktivität führen. Also waren nach diesen Versuchen zwei Fragen offen: Warum ist die RNK-Domäne essentiell, wenn in den Zellextrakten eine zweite NR-

Kinase vorhanden zu sein scheint und ist das verkürzte NadR Protein *in vivo* tatsächlich funktionsfähig?

Eine der Fragen konnte in den weiteren Versuchen, bei welchen die NAD⁺-Synthese in intakten Zellen untersucht wurde, beantwortet werden. Wurden intakte Zellen mit ¹⁴C-Nam gefüttert und anschließend deren Zelllysate in der DC analysiert, so konnte sowohl bei dem Wt und der Komplementante als auch bei der RNK-Deletionsmutante die Entstehung von NAD⁺ beobachtet werden (IV.2; Abb.9A). Demzufolge waren die Zellen in der Lage, aus Nam via NadV NMN zu synthetisieren, welches dann von der NadR-NMNAT-Domäne zu NAD⁺ adenyliert wurde. Da dies auch bei der RNK-Mutante der Fall war, konnte hier von einer funktionsfähigen NadR-NMNAT-Domäne ausgegangen werden. Wurden die Zellen mit ¹⁴C-NR gefüttert, so konnte nur bei dem Wt und der Komplementante eine NAD⁺ Synthese beobachtet werden, aber nicht bei der RNK-Deletionsmutante (IV.2; Abb.9/B). Dies machte deutlich, dass die in den Zellextrakten beobachtete unbekannte Kinase, welche NR phosphorylieren konnte, die RNK-Aktivität *in vivo* nicht ersetzen kann. Eine Erklärung warum dies der Fall ist, lieferten die nachfolgenden Experimente, in welchen die Aufnahmefähigkeit von NR untersucht wurde.

In *E. coli* und *S. enterica* sv. Typhimurium wurden *nadR* Mutationen beschrieben, welche Auswirkungen auf die Aufnahmefähigkeit von NAD⁺-Vorstufen haben. Hierbei ist anzumerken, dass früher von einer Aufnahme des NMN via PnuC in die Zelle ausgegangen wurde. Inzwischen ist jedoch nachgewiesen, dass PnuC auch in *S. enterica* ein NR-Transporter ist (Sauer et al., 2004; Grose et al., 2005). Die oben erwähnten Mutationen lagen im C'-Terminus des Proteins (Zhu et al., 1991), daher lag die Vermutung nahe, dass bei *H. influenzae* die NadR-RNK Domäne eventuell Einfluss auf die NR-Aufnahme haben könnte. Als Substrat wurde in diesen Versuchen ¹⁴C-NAD⁺ verwendet. Da NAD⁺ zu NR degradiert werden muss, bevor es in die Zelle aufgenommen werden kann, können somit indirekt über intrazelluläre Akkumulation von ¹⁴C-Label Rückschlüsse auf die NR-Transportfähigkeit gezogen werden. Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus, dass die RNK-Deletionsmutante enorme Defizite in der NR-Aufnahme aufweist. Während beim Wt eine ca. 80% Akkumulation des ¹⁴C-Labels beobachtet werden konnte, waren es bei der RNK-Mutante nur noch 2-5%. Die Komplementante zeigte mit ca. 70% Akkumulation ähnliche Werte wie der Wt (s. IV.2.1; Abb. 10). Aufgrund der erfolgreichen Komplementation des Aufnahme-Defizites mit pNadRkan, konnte hier ein Zusammenhang zwischen der RNK-Domäne und der NR-Aufnahme festgestellt werden. Ein vergleichbares Defizit in der NR-Aufnahme wurde bisher nur für eine *pnuC*-Knockout

Mutante beschrieben (Herbert et al., 2003; Sauer et al., 2004). Diese Versuche lieferten Erklärung dafür, warum die Kinase, deren Aktivität in den Zellextrakten beobachtet werden konnte (IV.2; Abb.8), das Fehlen der RNK-Domäne nicht kompensieren kann: Das Fehlen der RNK-Domäne verhindert den Transport von NR in die Zelle, so dass die unbekannte Kinase kein NR zu NMN phosphorylieren kann. Es wäre also vorstellbar, dass diese unbekannte Kinase zwar NR-Phosphorylierung durchführen kann, aber die Rolle der NadR-RNK-Domäne bei dem Transport von NR nicht ersetzen kann. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete NR-Phosphorylierung in den Zellextrakten der RNK-Deletionsmutante ein *in vitro* Artefakt ist, d. h. unter *in vivo* Bedingungen würde diese Kinase NR als Substrat gar nicht erkennen und daher auch nicht phosphorylieren.

2. NadR und 3-Aminopyridin (AmPR)

Bereits Anfang der 90er Jahre wurde festgestellt, dass AAD und seine Vorstufen AMN und AmPR wachstumshemmend auf *H. influenzae* wirken, allerdings wurde der Mechanismus der Hemmung nicht genau geklärt (Godek et al., 1990; Denicola-Seoane et al., 1990). Es wurde aber in anderen Untersuchungen beobachtet, dass AAD einen inhibitorischen Effekt auf NAD^+ -abhängige Dehydrogenasen hat (Fisher et al., 1973). Kürzlich wurde von Sauer et al. gezeigt, dass AAD auf die gleiche Art wie NAD^+ prozessiert wird, bevor es in die Zelle aufgenommen wird: AAD wird von e(P4) und NadN über AMN zu AmPR degradiert, welches dann über PnuC in die Zelle aufgenommen wird. Die Tatsache, dass die *pnuC*-Knockout Mutante resistent gegenüber AmPR war, deutete darauf hin, dass AmPR nur dann wachstumshemmend wirkt, wenn es in die Zelle aufgenommen wird (Sauer et al., 2004). Weiterhin wurde festgestellt, dass AmPR resistente Mutanten (im *nadV*⁺ Hintergrund) vorwiegend Mutationen im *nadR* Gen aufweisen, wobei die Mutationen im Walker A Motif der RNK-Domäne besonders häufig auftraten (s. Tabelle 8). Es konnten Punktmutation, die zu AS Veränderung führten, sowie Insertionen und Deletionen festgestellt werden, wobei einige zur Verschiebung des Leserasters im *nadR* führten („out of/in frame“ Deletionen und Insertionen). Daher stellte sich die Frage wie AmPR eigentlich auf NadR wirkt? Ist es ein Inhibitor der NadR Aktivität, oder erkennt NadR AmPR als Substrat und synthetisiert daraus AAD?

Mit Hilfe einer HPLC-Analyse konnte gezeigt werden, dass NadR aus AmPR in Anwesenheit von ATP und MgCl_2 AAD synthetisieren kann (s. IV.4.1; Abb. 13). Damit

kann ausgeschlossen werden, dass AmPR für NadR einen Inhibitor der unkompetitiven Art darstellt. AmPR bzw. AMN können mit NR/NMN um die Besetzung des aktiven Zentrums der jeweiligen Domänen konkurrieren, insofern sind sie als kompetitive Inhibitoren anzusehen. Aufgrund dieser Ergebnisse kann folgender Mechanismus für die AAD-Hemmung postuliert werden: AAD wird vor der Aufnahme in die Zelle zu AmPR degradiert und dann via PnuC ins Cytoplasma transportiert. Hier wird es anschließend von NadR zu AAD synthetisiert, welches wiederum die Reaktionen, an welchen NAD^+ als Coenzym beteiligt ist, hemmt. Dadurch wird letztendlich ein Stillstand des Metabolismus herbeigeführt, was den Tod der Zelle zur Folge hat. Gleichzeitig konnte AmPR als einer der wenigen Pyridine identifiziert werden, die von NadR als Substrat angenommen werden, obwohl NadR eine hohe Substratspezifität für NR bzw. NMN aufweist. So konnten z. B. Thiazofurin, Nikotinsäure, Uracil und Cytosin nicht von NadR phosphoryliert werden (Kurnasov et al., 2002). Diese Beobachtungen könnten bei der Suche nach weiteren NR-Analoga, welche NadR inhibieren, hilfreich sein. Zusätzlich konnte es bei der Aufklärung der an der Substraterkennung beteiligter AS von Nutzen sein.

3. Charakterisierung der RNK-Domäne und die subzelluläre Lokalisation von NadR

Die Annahme, dass die N⁷-terminale Hälfte von NadR eine Kinase Aktivität besitzt, wurde ursprünglich aufgrund der Struktur-Homologie der RNK-Domäne zu typischen P-Loop Kinasen, z. B. die Thymidylat-Kinase von Hefe, die Adenylat-Kinase von *Bacillus stearothermophilus* und die Thymidin-Kinase des Herpes simplex Virus, postuliert (Kurnasov et al., 2002; Singh et al., 2002). In der RNK-Domäne von NadR befinden sich mehrere Motife, welche bei Kinasen im allgemeinen eine essentielle Rolle bei der ATP bzw. GTP Bindung und Hydrolyse spielen, die sogenannten Walker A und Walker B Motife sowie die LID-Domäne (Walker et al., 1982; Saraste et al., 1990). Das Walker A Motif, auch P-Loop genannt (GxxxxGK(S/T)), bindet die Phosphatgruppe des Nukleotids. Dabei spielen die AS Glycin (G) und Lysin (K) (unterstrichen in der Consensus-Sequenz) eine essentielle Rolle. Im Walker B Motif (DBBB) ist das invariante Aspartat entscheidend bei der Bindung und der Koordination von katalytischem Mg^{2+} (Dever et al., 1987; Pai et al., 1990).

Durch die Analyse der 3D Struktur von einigen kristallisierten P-Loop Kinasen wurden neben den klassischen Walker A und B Motifen, mehrere andere Determinanten identifiziert, welchen eine Funktion bei der Nukleotidbindefähigkeit von P-Loop Kinasen

zugeordnet wurde (Via et al., 2000). Unter anderem wurde in allen untersuchten Kinasen ein Bereich mit positiver Ladung festgestellt (K, R und seltener Q), welche eine Rolle bei der Bindung des Nukleotids spielt. Die Lokalisation dieser positiven Ladung in der primären Sequenz variierte erheblich: Bei den meisten Kinasen befindet sich diese positive Ladung 95-220 AS nach dem P-Loop, wieder bei einigen liegt sie N'-terminal zum P-Loop und bei der Adenosylcobinamid-Kinase ist die positive Ladung sogar in einer anderen Untereinheit des Proteins lokalisiert. Weiterhin wurde eine weitere positive Ladung (in 79% der Fälle ein R, 21% ein K) gefunden, welche wahrscheinlich eine Rolle bei der Stabilisierung des Übergangszustandes bei der Hydrolyse des Nukleotids spielt (Ahmadian et al., 1996; Lavie et al., 1998). Auch in diesem Fall ist die Lokalisation in der Primärsequenz variierbar: Entweder befindet sie sich 4 AS vor dem P-Loop, liegt zwischen dem P-Loop und dem Walker B Motif, zwischen dem Walker B und der positiven Ladung oder sie ist nach der ersten positiven Ladung lokalisiert (Via et al., 2000). Bei der *E. coli* Thymidylat-Kinase findet sich dieses Arginin in der LID-Domäne (Lavie et al., 1998).

Für die LID-Domäne wurde bei anderen Kinasen gezeigt, dass sie drastische Konformationsänderung eingeht, je nachdem ob und wie viele Substrate gebunden sind (Lavie et al., 1998; Müller et al., 1996; Yan und Tsai, 1999).

Die NadR Proteine mit AS-Substitutionen, die im Walker A Motif ($G^{238}N/S$), Walker B Motif ($D^{304}C/N/S$) und in der LID-Domäne ($R^{352}A/C/M/N$) von *hiNadR* eingeführt wurden, konnten als rekombinante HisTag-Fusionsproteine über Ni^{2+} -Säulen gereinigt und unter *in vitro* Bedingungen auf ihre NMNAT- und RNK-Aktivitäten untersucht werden. Alle oben aufgezählten AS-Austausche führten zum völligen Verlust der RNK-Aktivität *in vitro*, die NMNAT-Aktivität jedoch war bei allen Punktmutanten nicht beeinträchtigt (s. IV.5.2; Abb.15). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der von Singh et al. aufgestellten Hypothese, dass die zwei Domänen unabhängig voneinander funktionieren können. Auch die Tatsache, dass das verkürzte NadR Protein mit der NMNAT Domäne sowohl *in vitro* (Kurnasov et al., 2002) als auch *in vivo* (diese Arbeit; IV.2) funktionsfähig ist, spricht dafür, dass zwischen den zwei einzelnen Domänen von NadR kein „cross-talk“ stattfindet. Zusätzlich konnte hier eine essentielle Rolle des Arginins in der Position 352 bei der katalytischen Reaktion gezeigt werden. Allerdings sind weitere Untersuchungen notwendig, um weitere an der Katalyse beteiligte AS zu identifizieren.

Die oben genannten NadR Punktmutanten wurden weiterhin unter *in vivo* Bedingungen charakterisiert. Dafür wurden die Fragmente, welche die Punktmutanten kodierte (mit N'-terminalem V5/His₆ Tag) in den pBAD18Kan Vektor kloniert, welcher anschließend in

den SE01 Δ RNK(Δ RNK, $nadV^+$) Stamm transformiert wurde. Der SE01 Δ RNK Stamm mit wildtypischem $nadRHis_6$ im Chromosom konnte in den Transport-Assays den Δ RNK-Phänotyp komplementieren. Die Akkumulation des ^{14}C -Labels lag bei ca. 70% (Wt ca. 65%; Δ RNK ca. 2-5%). Dagegen zeigten alle Punktmutanten ($NadRHis_6$ G 238 N/S; $NadRHis_6$ D 304 C/N/S; R 352 A/C/M/N) eine stark verminderte Akkumulation des ^{14}C -Label. Abgesehen von den Proteinmutanten mit den AS-Substitutionen D 304 C (ca. 15%) und D 304 N (ca. 20%), war bei allen anderen Mutanten die Akkumulation mit 3-6% vergleichbar zu der Akkumulation, die bei der Δ RNK-Deletionsmutante gemessen wurde (s. IV.5.3/Abb.16).

In früheren Untersuchungen in *S. enterica* sv. Typhimurium wurde beobachtet, dass Mutationen im C'-Terminus von $nadR$ zu einer signifikanten Defizienz in der NMN* Aufnahme führten (*inzwischen revidiert zu NR-Aufnahme; Sauer et al., 2004; Grose et al., 2005), allerdings wurden keine detaillierten Untersuchungen hinsichtlich des Mechanismus durchgeführt (Foster et al., 1990, 1993; Zhu et al., 1991).

In dieser Arbeit konnte eine Korrelation zwischen der RNK-Aktivität und der NR-Transportfähigkeit gezeigt werden. Dadurch wurde die Theorie, dass NadR eine Rolle bei der Aufnahme von NR spielt, auch für *H. influenzae* bestätigt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von NR direkt an die Aktivität der RNK-Domäne gekoppelt ist, da alle Punktmutanten ohne nachweisliche RNK-Aktivität auch hinsichtlich der NR-Aufnahme stark beeinträchtigt sind. Aufgrund dieser Ergebnisse lassen sich Vermutungen über den Aufnahme-Mechanismus von NR via PnuC aufstellen: Dabei könnte PnuC als eine Permease fungieren, die zwar NR Transport in die Zelle erlaubt, aber auch dessen Efflux aus der Zelle. Erst durch die RNK-Aktivität von NadR kann das NR zu NMN phosphoryliert und dadurch in der Zelle behalten werden. Ein ähnlicher Mechanismus ist für GlpF (Glycerol Kanal) in *E. coli* beschrieben: Die Phosphorylierung des Glycerols durch eine Kinase verhindert dessen Efflux aus der Zelle. In diesem Fall wird auch eine direkte Proteininteraktion zwischen der Kinase und der GlpF Permease vermutet (Sweet et al., 1990; Voegelé et al., 1993).

In früheren Untersuchungen mit *H. parainflunzae* (Cynamon et al., 1988) konnte gezeigt werden, dass wenn den Zellen ATP entzogen wird (DNP Zugabe) auch die NR-Aufnahme unterbunden wird. Wurde jedoch die PMF durch KCN Zugabe unterbrochen, so war die Aufnahme kaum beeinträchtigt. Diese Beobachtung ist konsistent mit in dieser Arbeit erhaltenen Daten, da beim Fehlen von ATP keine NR-Phosphorylierung stattfinden kann. Der hier postulierte NR-Aufnahmemechanismus läßt zwei mögliche Erklärungen für die

bei den D³⁰⁴C und D³⁰⁴N Punktmutationen beobachtete Akkumulation von ¹⁴C-Label zu: (i) Diese Proteinmutanten haben zwar *in vitro* keine RNK-Aktivität, aber *in vivo* ist eine Restaktivität vorhanden; (ii) Diese Punktmutationen befinden sich in dem Walker B Motif, welches an der Koordination und Bindung des ATP/Mg²⁺ Komplexes beteiligt ist. Es wäre möglich, dass bei diesen AS-Austauschen die Bindung der Substraten (NR + ATP/Mg²⁺) zwar stattfinden, aber aufgrund der fehlerhaften Koordination keine weitere Hydrolyse von ATP erfolgen kann. Dadurch könnte ein Teil von NR vom PnuC abgezogen werden, aber nur so lange bis das NadR gesättigt ist, wodurch die im Vergleich zum Wt niedrige Akkumulation des ¹⁴C-Labels erklärt werden könnte.

Bei den Analysen bezüglich der subzellulären Lokalisation von NadR wurde festgestellt, dass sich NadR sowohl in der löslichen als auch in der Membranfraktion befindet. In beiden Fraktionen konnte NadR-Aktivität nachgewiesen werden. Die Aktivität der einzelnen Domänen (NMNAT und RNK) war aber in den verschiedenen Fraktionen unterschiedlich: Während die RNK-Aktivität in der Membranfraktion stärker war als in der löslichen, erschien die NMNAT-Aktivität in der löslichen Fraktion stärker als in der Membranfraktion (IV.6.1; Abb. 18/19). Dies lässt vermuten, dass in den jeweiligen Fraktionen Faktoren vorhanden sind, die auf die jeweiligen Domänen unterschiedliche Effekte haben: Im Falle der RNK-Domäne ist es verlockend, eine Interaktion zwischen PnuC und der RNK-Domäne zu postulieren, allerdings müsste dies in weiteren Versuchen, wie z. B Ko-Immunopräzipitation, untersucht werden.

Eine weitere Behandlung der Membranfraktion mit 1 M NaCl, resultierte in einer partiellen Solubilisierung des membranassoziierten NadR Proteins. Obwohl der NadR Anteil in dieser Fraktion höher war als in den anderen, konnte hier keine NadR Aktivität detektiert werden. Unter Umständen geht die NadR Aktivität aufgrund der Solubilisierung und der anschließenden Dialyse verloren. Überraschenderweise blieb nach der Salz-Solubilisierung ein erheblicher Anteil vom NadR in der Membran, welches auch durch eine zusätzlich Behandlung der Membranen mit 2% Triton X-100 nicht effektiv solubilisiert werden konnte.

Die Lokalisation von NadR in der Salzfraktion deutet auf eine Assoziation mit der cytoplasmatischen Membran hin. Aufgrund der Rolle, die das NadR beim NR-Transport spielt erscheint dies logisch. Da bioinformatische Analyse für NadR keine erkennbaren hydrophoben Bereiche aufdeckten, ist das Vorhandensein von NadR im unlöslichen Membranpellet dagegen schwer zu erklären. Da sich diese NadR Fraktion auch durch Triton X-100 nicht solubilisieren ließ, handelt es sich hier wahrscheinlich um einen

Artefakt bzw. Proteinaggregate, die aufgrund der Zellaufschlussbedingungen zustande kommen. Bei der Analyse der subzellulären Lokalisation der NadR-Punktmutanten ($G^{238}N/S$; $D^{304}C/N/S$; $R^{352}A/C/M/N$) wurde eine ähnliche Verteilung beobachtet, so dass ausgeschlossen werden kann, dass das Vorhandensein der RNK-Aktivität *per se* für eine Assoziation mit der Cytoplasmamembran notwendig ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch in Abwesenheit von PnuC ($\Delta pnuC$ -Knockout) NadR weiterhin in der Membranfraktion gefunden werden kann. Demzufolge sind vermutlich keine direkten Proteininteraktionen zwischen NadR und PnuC für die Assoziation von NadR mit der cytoplasmatischen Membran notwendig.

4. Feedback Inhibition durch NAD^+

In der Analyse der *hi*NadR Kristallstruktur wurde die Bindung von einem NAD^+ Molekül an einer Stelle außerhalb des aktiven Zentrums beobachtet (Singh et al., 2002). Obwohl die Autoren ein Artefakt nicht ausschlossen, so ließ die Spezifität der Interaktion zwischen den NAD^+ Molekülen und dem NadR Tetramer eher eine biologisch relevante Funktion, wie z. B. Feedback-Hemmung, vermuten. Das NAD^+ -Molekül, das an dieser „non-active site“ gebunden ist, nimmt eine sehr dicht gefaltete Konformation an, dabei liegt der Nikotinamidring praktisch parallel über der Adeninbase. Sowohl der Nikotinamidring als auch die Adeninbase befinden sich in der Kristallstruktur zwischen den AS Tyrosin (Y)²⁹² und Tryptophan (W)²⁵⁶ eines Monomers (s. IV.7; Abb.21). Der Pyrophosphatrest von NAD^+ zeigt nach außen und ist im Kontakt mit dem Lysin (K)¹²⁶ des benachbarten Monomers. Zusätzlich scheint auch das Tyrosin (Y)²⁸⁹ im Kontakt mit dem N-6 Atom der Adeninbase zu stehen.

Bei NadR in *S. enterica* (*st*NadR) konnte vor einiger Zeit gezeigt werden, dass NadR in Anwesenheit von NAD^+ eine Repressorfunktion annimmt und an die „NAD Boxen“ im Promotorbereich des *nadA/nadB*-Operons (*de novo* NAD^+ -Biosynthese) und des *pncB*-Gens (zentrale Rolle bei dem Recycling von NAD^+) binden kann. Dadurch wird die Expression dieser Gene verhindert bzw. stark vermindert (Penfound und Foster, 1996; Penfound und Foster, 1999). Es muss an dieser Stelle allerdings angemerkt werden, dass sich *st*NadR von *hi*NadR unterscheidet: Zusätzlich zu der NMNAT- und der RNK-Domäne, hat *st*NadR ein Helix-Turn-Helix (HTH) Motif am N'-Terminus, welches die Bindung an die DNS vermittelt. Diese Domäne fehlt bei *hi*NadR (Kurnasov et al., 2002).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob NAD^+ einen inhibitorischen Effekt auf *hiNadR* ausübt und wie dieser zustande kommt. In den *in vitro* Assays konnte hier gezeigt werden, dass in Anwesenheit von NAD^+ die RNK-Aktivität stark beeinträchtigt ist. Eine graduelle Erhöhung der NAD^+ Konzentration (50x, 100x und 200x Überschuss verglichen mit der Konzentration des NR-Substrats) führte zu einer graduellen Abnahme der NAD^+ -Synthese, die als Maß für die RNK-Aktivität herangezogen wurde. So konnte z. B. in dem Ansatz mit 50x Überschuss NAD^+ nach 80 min nur noch ca. 60% der ursprünglichen RNK-Aktivität nachgewiesen, mit 100x Überschuss NAD^+ verblieben ca. 42% und mit 200x Überschuss NAD^+ nur noch ca. 20% der RNK-Aktivität (s. IV.7.1; Abb.23/A). Dagegen stellte sich heraus, dass die NMNAT-Aktivität (NMN als Substrat für die NAD^+ -Synthese) durch NAD^+ kaum beeinträchtigt wird. Unabhängig von den verwendeten NAD^+ -Konzentrationen war die NMNAT-Aktivität um ca. 8-15% niedriger als in der Kontrollreaktion ohne NAD^+ (s. IV.7.1; Abb. 23/B). Es konnte also eine Feedback-Inhibition durch das NAD^+ gezeigt werden, wobei in erster Linie die RNK-Aktivität gehemmt wird.

Begleitende *in vivo* Analysen zeigten, dass bei höheren intrazellulären NAD^+ -Konzentrationen (vor der Transport-Messung wurden Zellen mit NAD^+ inkubiert) die Aufnahme von NR ca. dreifach niedriger ist, als in den Zellen, die vor der Transport-Messung ohne NAD^+ inkubiert wurden (s. IV.7.2; Abb. 24).

In weiteren Analysen wurde untersucht, ob die AS K^{126} , W^{256} und Y^{292} , die nach Singh et al. Interaktionen mit dem „non-active site“ gebundenem NAD^+ eingehen, tatsächlich eine Rolle bei der NAD^+ -bedingten Feedback-Inhibition von *NadR* spielen. Dafür wurden gezielte AS-Substitutionen in das *NadR* eingeführt, wobei K^{126} gegen Alanin (A) und Threonin (T), W^{256} gegen Phenylalanin (F) und Y^{292} gegen Isoleucin (I) ausgetauscht wurden. Diese *NadR* Punktmutanten konnten überexprimiert und gereinigt werden. Bei der *in vitro* Charakterisierung stellte sich heraus, dass bei der Punktmutante mit dem W^{256}F Austausch die RNK-Aktivität in Anwesenheit von NAD^+ im Vergleich zum Wt-Protein nicht so stark inhibiert wird. Bei der gleichen Mutante wurde bei 200x Überschuss an NAD^+ nach 80 min nur eine Verminderung der RNK-Aktivität um 4% festgestellt. Dagegen war die RNK-Aktivität des Wt-*NadR* bei gleichen NAD^+ -Konzentrationen um ca. 80% vermindert (s. IV. 7.5; Abb. 27). Die *NadRW*^{256F} Mutante war in den Assays ohne NAD^+ sowohl in der NMNAT- als auch der RNK-Aktivität vergleichbar mit dem Wt-Protein. Daher kann angenommen werden, dass die AS W^{256} eine wichtige Rolle bei der

NAD⁺-Feedback Inhibition spielt und eventuell ein Teil des allosterischen Zentrums darstellt, an welches NAD⁺ in seiner Funktion als Inhibitor bindet.

Das NadR-Protein mit dem K¹²⁶A/T Austausch zeigte bereits in der Reaktion ohne NAD⁺ deutliche Abweichung von dem Wt-Protein: Mit NR als Substrat konnte keine NAD⁺-Synthese beobachtet werden und auch die NMNAT-Aktivität war, (verglichen mit der Aktivität des Wt-Proteins), stark beeinträchtigt (IV.7.4; Abb. 26/A). Das Protein mit dem Y²⁹²I Austausch war bei höherer Proteinkonzentration (0,04 mg/ml) in seiner Aktivität vergleichbar mit dem Wt-Protein. Bei niedrigeren Proteinkonzentrationen (0,002 mg/ml) war hingegen dessen RNK-Aktivität wesentlich geringer als die des Wt-Proteins (Abb. 26/B). Da schon in den Standardassays ohne NAD⁺ beide Proteinvarianten deutliche Defizite in der Aktivität aufwiesen, konnte über die Funktion dieser zwei AS (K¹²⁶ und Y²⁹²I) bei der NAD⁺-Inhibition keine Aussagen getroffen werden.

Interessanterweise liegt die AS K¹²⁶ in der NMNAT-Domäne (RNK-Domäne fängt erst ab AS 225), daher ist es etwas überraschend, dass bei dem K¹²⁶A/T Austausch die RNK-Aktivität stärker beeinträchtigt erschien als die NMNAT-Aktivität selbst. K¹²⁶ interagiert mit dem Pyrophosphatrest desjenigen NAD⁺-Moleküls, das von dem benachbarten Monomer gebunden ist (Singh et al., 2002). Aufgrund dieser Beobachtungen könnte spekuliert werden, dass die AS K¹²⁶ unter Umständen eine Rolle bei der Oligomerisierung des NadR-Proteins spielt. Der Oligomerisierungszustand des Proteins wiederum könnte starke Auswirkungen auf die enzymatischen Aktivitäten von NadR haben, insbesondere auf die RNK-Domäne. Dafür spricht auch die Tatsache, dass eine alleinstehende RNK-Domäne im Gegensatz zur NMNAT-Domäne nicht als lösliches Protein überexprimiert und gereinigt werden konnte (Kurnasov et al., 2002). Ähnliche Überlegungen könnten auch eine Erklärung dafür sein, warum bei der Y²⁹²I Punktmutante die Erniedrigung der Proteinkonzentration zu einer starken RNK-Aktivitätsverminderung führte. Der Austausch von Y²⁹² zu I hat eventuell nicht so starke Auswirkungen auf die Oligomerisierung wie die K¹²⁶A/T Austausche, so dass sich dieser Effekt erst bei niedrigeren Proteinkonzentrationen bemerkbar macht (z. B. Dissoziation findet schon bei höheren Proteinkonzentration statt, als beim Wt-Protein). Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass diese Proteinvarianten instabiler sind und daher im Zuge der Aufreinigung oder im Laufe des Aktivitätsassays die Aktivität verlieren.

Bei den begleitenden *in vivo* Untersuchungen (Transformation von NadRHis₆/NadRHis₆K¹²⁶A/NadRHis₆W²⁵⁶F/NadRHis₆Y²⁹²I in den SE01ΔRNK Hintergrund) wurde keine Abhängigkeit der NR-Aufnahme von der intrazellulären NAD⁺-Konzentration

festgestellt. Dies war vor allem im Fall von NadRHis₆ überraschend, da hier *in vitro* eine deutliche Hemmung der RNK-Aktivität durch NAD⁺ gezeigt werden konnte. Dafür könnte es mehrere Erklärungen geben: (i) Das V5/His₆ Tag macht das Protein weniger empfänglich für die Feedback-Inhibition durch das NAD⁺. In den *in vitro* Assays konnte zwar eine Hemmung nachgewiesen werden, aber die intrazellulären NAD⁺ Konzentrationen in der Zelle liegen in einem niedrigeren Bereich (0,8-0,9 mM), so dass unter *in vivo* Bedingungen das NadRHis₆ weniger stark inhibiert wird. Das bedeutet auch, dass die Feinregulation der NAD⁺-Konzentration in der Zelle nicht mehr gewährleistet ist. Dies würde starke Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der Zellen haben, was hier jedoch nicht beobachtet wurde, aber auch nicht genauer untersucht wurde, z.B. durch Lebendzellzahlbestimmung bei hohen NAD⁺ Konzentrationen.

(ii): Das Vorhandensein von NadV im SE01ΔRNK Stamm hat Auswirkungen auf die NR-Aufnahme. Da aber der SE01 (*nadV*⁺) Stamm bei hohen intrazellulären NAD⁺ Konzentrationen auch eine verminderte NR-Aufnahme zeigte, konnte dies ausgeschlossen werden.

(iii): Der SE01ΔRNK Stamm mit dem chromosomalen NadRHis₆, besitzt auch zusätzlich das pBAD18Kan Plasmid und eine weitere, native Kopie der NadR-NMNAT-Domäne auf dem Chromosom. Dies könnte eventuell ein Effekt auf die NAD⁺-bedingte Feedback-Inhibition haben. Die Versuche, bei welchen das pBAD18Kan Plasmid und die verbleibende NMNAT Domäne aus dem Chromosom deletiert werden sollten, konnten aufgrund des zeitlich beschränkten Rahmens nicht mehr durchgeführt werden.

5. Charakterisierung der Punktmutationen im *nadR* aus AmPR^r -*H. influenzae*

Isolaten

Bei der Analyse der spontan AmPR-resistenten *H. influenzae* Stämme im *nadV*⁺ Hintergrund (IV.3) stellte sich heraus, dass die meisten dieser Klone Mutationen im *nadR*-Gen haben. Es traten sowohl Punktmutationen als auch Insertionen und Deletionen auf, wobei die Mutationen am häufigsten in dem Walker A Motif zu finden waren. Durch die Analyse der mutierten NadR Varianten mit gezielten AS Substitutionen im Walker A Motif konnte gezeigt werden, dass diese Punktmutationen nicht nur zum Verlust der RNK-Aktivität führen, sondern auch den Transport von NR verhindern (IV.5.2/5.3). Das Gleiche konnte auch für die Punktmutationen im Walker B Motif und in der LID-Domäne gezeigt werden. Da AmPR auf die gleiche Weise wie NR in die Zelle aufgenommen und dann

anschließend von NadR zu AAD umgewandelt wird (Sauer et al., 2002), erklärt sich dadurch der AmPR^r Phänotyp von *H. influenzae*. Einige der Punktmutationen traten jedoch außerhalb der Walker A und B Motifen bzw. der LID-Domäne auf, und einige waren sogar in der NMNAT-Domäne zu finden (s. Tabelle 8). Da die NMNAT-Aktivität essentiell für die Lebensfähigkeit der hier verwendeten *H. influenzae* Stämme (*nadV*⁺) ist, stellt sich die Frage wodurch diese Punktmutationen die AmPR-Resistenz bewirken. Die Immunoblot-Analysen zeigten, dass bei fast allen getesteten Punktmutanten, mit Ausnahme der H¹⁶¹P, die NadR-Menge in den Zellextrakten erheblich niedriger war als vergleichsweise in den Zellextrakten des Wt (s. IV.8/ Abb. 28/A). Bei diesen Punktmutanten wurde auch keine bzw. kaum NAD⁺ Synthese in den Assays mit Rohextrakten festgestellt, unabhängig davon, ob NR oder NMN als Substrat verwendet wurde (s. IV.8/Abb. 28/B/C).

Im Transport-Assay zeigten alle Mutanten, wiederum mit Ausnahme von H¹⁶¹P, eine Defizienz, die normalerweise nur bei der *pnuC*-Knockout- bzw. RNK-Deletionsmutante beobachtet wurden.

Die Ergebnisse des Immunoblots lassen zwei Schlüsse zu: (i) Die Mutationen bewirken eine Erniedrigung der Proteinexpression. Das Methionin in der Position 52 (M⁵²⁺) wurde z. B. bei einer der Mutanten zu Isoleucin. Da M⁵² als das eigentliche Startkodon für die Expression von NadR vermutet wird (Singh et al., 2002; Kurnasov et al., 2002), könnte dessen Veränderung zu einer Erniedrigung der Translation von *nadR* führen. Bei anderen wäre eher eine Beeinträchtigung der Translation, z. B. durch Veränderung des „Codon-Usage“, zu vermuten. (ii) Die Punktmutationen führen zur Instabilität des Proteins, so dass diese schneller abgebaut werden. Dies würde auch die Beeinträchtigung der Aktivität, die *in vitro* beobachtet wurde, erklären.

Die Tatsache, dass alle Punktmutationen eine verminderte bzw. keine RNK-Aktivität zeigen, korreliert zwar mit der beobachteten Transportdefizienz, aber das Fehlen der NMNAT-Aktivität in den *in vitro* Assays ist verwirrend. Da die NMNAT-Aktivität aber essentiell ist, ließe sich vermuten, dass die AS Austausch, welche in der NMNAT-Domäne liegen, unter Umständen die Substratspezifität ändern. Dafür spräche z. B. die Substitution des Valins in der Position 201, wodurch ein an der NAD⁺/ATP Bindung beteiligtes Motif (Singh et al., 2002) verändert wurde. Durch veränderte Substratpräferenz würde das NadR AmPR bzw. AMN wesentlich schlechter erkennen und damit auch umsetzen, was zu einer AmPR^r führen würde. Es ist auch möglich, dass bei diesen Mutationen die NadR Aktivität *in vitro* nur bei höheren Proteinkonzentrationen detektiert werden kann, wie das z. B. bei der NadRY²⁹²I Variante der Fall ist (s. IV.7.4)

Eine Aufreinigung der NadR-Varianten mit den hier beschriebenen Punktmutationen und eine anschließende *in vitro* Charakterisierung würde mehr Aufschlüsse über die an der Katalyse und Substraterkennung beteiligten AS des NadR Proteins liefern. Zusätzlich würde es auch mehr Informationen über den Mechanismus der AmPR^f hervorbringen.

6. ORF HI0762 und seine Funktion in *H. influenzae*

Bioinformatischen Analysen zufolge bildet das ORF HI0762 (hier *nadX* genannt) in *H. influenzae* ein Operon mit *nadR*. Die kodierenden Bereiche von *nadR* und *nadX* überlappen sich, der Anfang von *nadX* liegt im C'-Terminus von *nadR*. Da Gene, die zusammen ein Operon bilden, oft an gleichen Stoffwechselprozessen beteiligt sind, stellte sich hier die Frage, ob das *nadX* ebenfalls eine Rolle im NAD⁺-Metabolismus spielt. Die Domänen-Suche mit verschiedenen Programmen (CDD; Prosite) ordnete NadX der Familie der Metallophosphoesterasen zu, wobei die größte Homologie zu der COG-Gruppe 2129 bestand. Die Proteine in dieser Gruppe sind vorwiegend als putative bzw. Proteine mit unbekannter Funktion annotiert, wobei die archeale Proteine einen großen Anteil dieser COG-Gruppe darstellen. Die Consensus-Sequenz lautet HxD(25x)GDxxDx(25x)GNHD und oft sind im C'-terminalem Bereich mehrere Histidine lokalisiert. Diese Consensus-Sequenz lässt sich auch bei NadX finden (s. Anhang; Abb. 31). Für die Aufklärung einer möglichen Beteiligung von NadX am NAD⁺-Metabolismus, wurde eine Knockout-Deletion hergestellt. Dabei wurde großer Wert darauf gelegt, die letzten paar AS von NadR nicht zu deletieren, um polare Effekte ausschließen zu können. Die Deletion von *nadX* hatte keine signifikanten Wachstumsdefizite zur Folge und im Transport-Assay wurde eine ähnliche, mit dem Wt vergleichbare Akkumulation des ¹⁴C-Labels gemessen. Lediglich bei der Analyse der NAD⁺-Synthese unter Verwendung von Rohextrakten, konnten zwischen dem Wt und der *nadX*-Deletionsmutante leichte Unterschiede festgestellt werden: Die NAD⁺-Synthese in den Ansätzen mit den Rohextrakten aus der Mutante war etwas stärker ausgeprägt als beim Wt. Auch die Menge des detektierten NR war nach 30 min Inkubation bei der Mutante niedriger als beim Wt.

Im Hinblick auf die bioinformatischen Analysen, welche NadX als eine putative Phosphoesterase einordneten, ist es verlockend für NadX eine NMN-Phosphoesterase Funktion vorherzusagen. Allerdings sind diese Ergebnisse nicht eindeutig genug, um eine Beteiligung von NadX am NAD⁺-Metabolismus zu postulieren. Um zu untersuchen, ob NadX tatsächlich eine Phosphoesterase darstellt und ob deren Aktivität mit dem NAD⁺-

Stoffwechsel gekoppelt ist, wurde ein IPTG-induzierbares Expressionssystem für NadX konstruiert, bei welchem das GST-Protein an den N'-Terminus von NadX fusioniert wurde. Obwohl eine gute Überexpression erzielt werden konnte, stellte sich nach Zellaufschluss heraus, dass das GST-NadX Protein unlöslich war. Alle Versuche, die Löslichkeit des Proteins durch Optimierung der Expressions- und Zellaufschlussbedingungen zu verbessern, schlugen fehl. Weitere Versuche, NadX als natives Protein zu überexprimieren und zu reinigen konnte in dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Somit lässt sich hier für NadX weder eine eindeutige Aktivität noch dessen eventuelle Beteiligung im NAD⁺-Stoffwechsel postulieren.

7. Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden dass NadR die zentrale Rolle im NAD⁺ Stoffwechsel von *H. influenzae* einnimmt. Das Protein ist nicht nur für die Resynthese von NAD⁺ verantwortlich, es ist auch essentiell für die NR-Aufnahme in die Zelle. Die Regulation der Aufnahme und der NAD⁺ Synthese wird durch die Feedback Inhibition der RNK Domäne durch das NAD⁺ gewährleistet. Steigt die intrazelluläre NAD⁺-Konzentration, so wird die RNK-Aktivität von NadR inhibiert und sowohl die Synthese von NAD⁺ als auch die NR-Aufnahme reduziert. Allerdings ist das intrazelluläre NAD⁺ einem ständigen Turnover unterworfen. So wurde in *S. enterica* unter aeroben Bedingungen für NAD⁺ eine biologische Halbwertszeit von 90 min ermittelt (Park et al., 1989). Es ist anzunehmen, dass die Halbwertszeit von NAD⁺ in *H. influenzae* ähnlich ist wie in *S. enterica*. Daher stellt sich die Frage, welche Proteine am NAD⁺-Turnover beteiligt sind. Dass die Aktivität der NAD⁺-Ligase den NAD⁺-Turnover nicht besonders beeinflusst, konnte bei *S. enterica* gezeigt werden (Park et al., 1989). In *H. influenzae* wurde bereits eine NAD⁺-Glycohydrolase und eine NMN-Glycohydrolase Aktivität beschrieben (Denicola-Seoane et al., 1990; Cynamon et al., 1990). Die Gene, die für diese Enzyme kodieren, konnten bisher weder bei *H. influenzae* noch bei anderen Organismen, identifiziert werden. Diese zwei Enzyme könnten eine Rolle beim intrazellulären NAD⁺ Turnover spielen, sofern sie im Cytoplasma lokalisiert sind. Desweiteren wurde eine putative NADH Pyrophosphorylase mit dem NUDIX-Motif in *H. influenzae* beschrieben (HI0432). Obwohl die Knockout-mutante in Infektionsmodellen mit neugeborenen Ratten attenuiert ist, konnte für dieses Protein bisher keine eindeutige Rolle im NAD⁺ Stoffwechsel gezeigt werden. Auch die Rolle der putativen Phosphoesterase NadX

(HI0762) ist ungeklärt. Da die Feinregulation des NAD^+ Stoffwechsels essentiell ist für die Lebensfähigkeit der Zelle, erscheint es unwahrscheinlich, dass nur NadR dafür verantwortlich ist. Daher sind weiterführende und detaillierte Arbeiten notwendig, um die Proteine, welche am NAD^+ -Turnover und der Feinregulation des NAD^+ Stoffwechsels beteiligt sind, zu identifizieren.

VI. Literaturverzeichnis

1. **Ahren, I. L., H. Janson, A. Forsgren, and K. Riesbeck.** 2001. Protein D expression promotes the adherence and internalization of non-typeable *Haemophilus influenzae* into human monocytic cells. *Microb. Pathog.* **31**:151-8.
2. **Ahren, I. L., D. L. Williams, P. J. Rice, A. Forsgren, and K. Riesbeck.** 2001. The importance of a beta-glucan receptor in the nonopsonic entry of nontypeable *Haemophilus influenzae* into human monocytic and epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **184**:150-8.
3. **Akerley, B. J., E. J. Rubin, V. L. Novick, K. Amaya, N. Judson, and J. J. Mekalanos.** 2002. A genome-scale analysis for identification of genes required for growth or survival of *Haemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**:966-71.
4. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, Z. J., Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
5. **Amann, E., B. Ochs, and K. J. Abel.** 1988. Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* **69**:301-315.
6. **Andersen, C., E. Maier, G. Kemmer, J. Blass, A. K. Hilpert, R. Benz, and J. Reidl.** 2003. Porin OmpP2 of *Haemophilus influenzae* shows specificity for nicotinamide-derived nucleotide substrates. *J. Biol. Chem.* **278**:24269-76.
7. **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**:264-9.
8. **Araki, T., Y. Sasaki, and J. Milbrandt.** 2004. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science* **305**:1010-3.
9. **Aubrey, R. a. T., C.** 2002. The pathogenesis of disease due to type b *Haemophilus influenzae*, p. 29-50. *In* M. A. Herbert, Hood, Derek W., Moxon, E. Richard (ed.), *Haemophilus influenzae* protocols, vol. 71.
10. **Baer, M., R. Vuento, and T. Vesikari.** 1995. Increase in bacteraemic pneumococcal infections in children. *Lancet* **345**:661.
11. **Barcak, G. J., M. S. Chandler, R. J. Redfield, and J. F. Tomb.** 1991. Genetic systems in *Haemophilus influenzae*. *Methods. Enzymol.* **204**:321-42.
12. **Barenkamp, S. J.** 2004. Rationale and prospects for a nontypable *Haemophilus influenzae* vaccine. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **23**:461-2.
13. **Barenkamp, S. J.** 1996. Immunization with high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* modifies experimental otitis media in chinchillas. *Infect. Immun.* **64**:1246-51.
14. **Barenkamp, S. J.** 1992. Outer membrane proteins and lipopolysaccharides of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *J. Infect. Dis.* **165 Suppl 1**:S181-4.
15. **Barenkamp, S. J., and J. W. St Geme, 3rd.** 1996. Identification of a second family of high-molecular-weight adhesion proteins expressed by non-typable *Haemophilus influenzae*. *Mol. Microbiol.* **19**:1215-23.
16. **Barenkamp, S. J., and J. W. St Geme, 3rd.** 1994. Genes encoding high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* are part of gene clusters. *Infect. Immun.* **62**:3320-8.
17. **Bayliss, C. D., D. Field, X. de Bolle, and E. R. Moxon.** 2000. The generation of diversity by *Haemophilus influenzae*: response. *Trends Microbiol.* **8**:435-6.
18. **Bayliss, C. D., W. A. Sweetman, and E. R. Moxon.** 2005. Destabilization of tetranucleotide repeats in *Haemophilus influenzae* mutants lacking RnaseHI or the Klenow domain of PolII. *Nucleic Acids Res.* **33**:400-8.
19. **Bergman, N. H., and B. J. Akerley.** 2003. Position-based scanning for comparative genomics and identification of genetic islands in *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.* **71**:1098-108.
20. **Bieganowski, P., and C. Brenner.** 2004. Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. *Cell* **117**:495-502.
21. **Bochner, B. R., and B. N. Ames.** 1982. Complete analysis of cellular nucleotides by two-dimensional thin layer chromatography. *J. Biol. Chem.* **257**:9759-69.
22. **Bouchet, V., D. W. Hood, J. Li, J. R. Brisson, G. A. Randle, A. Martin, Z. Li, R. Goldstein, E. K. Schweda, S. I. Pelton, J. C. Richards, and E. R. Moxon.** 2003. Host-derived sialic acid is incorporated into *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide and is a major virulence factor in experimental otitis media. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**:8898-903.
23. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-54.

24. **Brinton, C. C., Jr., M. J. Carter, D. B. Derber, S. Kar, J. A. Kramarik, A. C. To, S. C. To, and S. W. Wood.** 1989. Design and development of pilus vaccines for *Haemophilus influenzae* diseases. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **8**:S54-61.
25. **Calvin, N. M., and P. C. Hanawalt.** 1988. High efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* **170**:2796-2801.
26. **Carlone, G. M., F. O. Sottnek, and B. D. Plikaytis.** 1985. Comparison of outer membrane protein and biochemical profiles of *Haemophilus aegyptius* and *Haemophilus influenzae* biotype III. *J. Clin. Microbiol.* **22**:708-13.
27. **Chakravarti, D. N., M. J. Fiske, L. D. Fletcher, and R. J. Zagursky.** 2000. Application of genomics and proteomics for identification of bacterial gene products as potential vaccine candidates. *Vaccine* **19**:601-12.
28. **Chance, D. L., T. J. Reilly, and A. L. Smith.** 1999. Acid phosphatase activity as a measure of *Haemophilus influenzae* adherence to mucin. *J. Microbiol. Methods.* **39**:49-58.
29. **Cope, L. D., R. P. Love, S. E. Guinn, A. Gilep, S. Usanov, R. W. Estabrook, Z. Hrkal, and E. J. Hansen.** 2001. Involvement of HxuC outer membrane protein in utilization of hemoglobin by *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **69**:2353-63.
30. **Cope, L. D., S. E. Thomas, Z. Hrkal, and E. J. Hansen.** 1998. Binding of heme-hemopexin complexes by soluble HxuA protein allows utilization of this complexed heme by *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **66**:4511-6.
31. **Cope, L. D., R. Yogev, U. Muller-Eberhard, and E. J. Hansen.** 1995. A gene cluster involved in the utilization of both free heme and heme:hemopexin by *Haemophilus influenzae* type b. *J. Bacteriol.* **177**:2644-53.
32. **Cutter, D., K. W. Mason, A. P. Howell, D. L. Fink, B. A. Green, and J. W. St Geme, 3rd.** 2002. Immunization with *Haemophilus influenzae* Hap adhesin protects against nasopharyngeal colonization in experimental mice. *J. Infect. Dis.* **186**:1115-21.
33. **Cynamon, M. H., T. B. Sorg, and A. Patapow.** 1988. Utilization and metabolism of NAD by *Haemophilus parainfluenzae*. *J. Gen. Microbiol.* **134**:2789-99.
34. **Dagert, M., and S. D. Ehrlich.** 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**:23-8.
35. **D'Angelo, I., N. Raffaelli, V. Dabusti, T. Lorenzi, G. Magni, and M. Rizzi.** 2000. Structure of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase: a key enzyme in NAD(+) biosynthesis. *Structure Fold. Des.* **8**:993-1004.
36. **Davies, J., I. Carlstedt, A. K. Nilsson, A. Hakansson, H. Sabharwal, L. van Alphen, M. van Ham, and C. Svanborg.** 1995. Binding of *Haemophilus influenzae* to purified mucins from the human respiratory tract. *Infect. Immun.* **63**:2485-92.
37. **Dawid, S., S. J. Barenkamp, and J. W. St Geme, 3rd.** 1999. Variation in expression of the *Haemophilus influenzae* HMW adhesins: a prokaryotic system reminiscent of eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:1077-82.
38. **Denicola-Seoane, A., and B. M. Anderson.** 1990. Studies of NAD kinase and NMN:ATP adenylyltransferase in *Haemophilus influenzae*. *J. Gen. Microbiol.* **136**:425-30.
51. **Dever, T. E., Glynias, M. J., Merrick., W. C.** 1987. GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**:1814-1818.
39. **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.* **65**:2700-6.
40. **Duim, B., L. Vogel, W. Puijk, H. M. Jansen, R. H. Meloen, J. Dankert, and L. van Alphen.** 1996. Fine mapping of outer membrane protein P2 antigenic sites which vary during persistent infection by *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **64**:4673-9.
41. **Emanuelli, M., A. Amici, F. Carnevali, F. Pierella, N. Raffaelli, and G. Magni.** 2003. Identification and characterization of a second NMN adenylyltransferase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr. Purif.* **27**:357-64.
42. **Engelman, D. M., T. A. Steitz, and A. Goldman.** 1986. Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **15**:321-53.
43. **Eskola, J., H. Peltola, A. K. Takala, H. Kayhty, M. Hakulinen, V. Karanko, E. Kela, P. Rekola, P. R. Ronnberg, J. S. Samuelson, and et al.** 1987. Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccine in infancy. *N. Engl. J. Med.* **317**:717-22.
44. **Evans, N. M., D. D. Smith, and A. J. Wicken.** 1974. Haemin and nicotinamide adenine dinucleotide requirements of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae*. *J. Med. Microbiol.* **7**:359-65.
45. **Farley, M. M., D. S. Stephens, S. L. Kaplan, and E. O. Mason, Jr.** 1990. Pilus- and non-pilus-mediated interactions of *Haemophilus influenzae* type b with human erythrocytes and human nasopharyngeal mucosa. *J. Infect. Dis.* **161**:274-80.

46. **Farley, M. M., D. S. Stephens, M. H. Mulks, M. D. Cooper, J. V. Bricker, S. S. Mirra, and A. Wright.** 1986. Pathogenesis of IgA1 protease-producing and -nonproducing *Haemophilus influenzae* in human nasopharyngeal organ cultures. *J. Infect. Dis.* **154**:752-9.
47. **Fink, D. L., A. Z. Buscher, B. Green, P. Fernsten, and J. W. St Geme, 3rd.** 2003. The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter mediates microcolony formation and adherence to epithelial cells and extracellular matrix via binding regions in the C-terminal end of the passenger domain. *Cell. Microbiol.* **5**:175-86.
48. **Fink, D. L., B. A. Green, and J. W. St Geme, 3rd.** 2002. The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter binds to fibronectin, laminin, and collagen IV. *Infect. Immun.* **70**:4902-7.
49. **Fisher, T. L., Vercellotti, S. V., and Anderson, B. M.** 1973. Interactions of 3-aminopyridine adenine dinucleotide with dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **248**:4293-4299.
50. **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, and et al.** 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**:496-512.
51. **Foster, J. W.** 1981. Pyridine nucleotide cycle of *Salmonella typhimurium*: in vitro demonstration of nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase, nicotinamide mononucleotide glycohydrolase, and nicotinamide adenine dinucleotide pyrophosphatase activities. *J. Bacteriol.* **145**:1002-9.
52. **Foster, J. W., and E. A. Holley.** 1981. Genetic mapping of the *Salmonella typhimurium pncB* locus. *J. Bacteriol.* **148**:394-6.
53. **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**:279-87.
54. **Foster, J. W., D. M. Kinney, and A. G. Moat.** 1979. Pyridine nucleotide cycle of *Salmonella typhimurium*: isolation and characterization of *pncA*, *pncB*, and *pncC* mutants and utilization of exogenous nicotinamide adenine dinucleotide. *J. Bacteriol.* **137**:1165-75.
55. **Foster, J. W., D. M. Kinney, and A. G. Moat.** 1979. Pyridine nucleotide cycle of *Salmonella typhimurium*: regulation of nicotinic acid phosphoribosyltransferase and nicotinamide deamidase. *J. Bacteriol.* **138**:957-61.
56. **Foster, J. W., Y. K. Park, T. Penfound, T. Fenger, and M. P. Spector.** 1990. Regulation of NAD metabolism in *Salmonella typhimurium*: molecular sequence analysis of the bifunctional *nadR* regulator and the *nadA-pnuC* operon. *J. Bacteriol.* **172**:4187-96.
57. **Franchetti, P., and M. Grifantini.** 1999. Nucleoside and non-nucleoside IMP dehydrogenase inhibitors as antitumor and antiviral agents. *Curr. Med. Chem.* **6**:599-614.
58. **Geluk, F., P. P. Eijk, S. M. van Ham, H. M. Jansen, and L. van Alphen.** 1998. The fimbria gene cluster of nonencapsulated *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **66**:406-17.
59. **Gerdes, S. Y., M. D. Scholle, M. D'Souza, A. Bernal, M. V. Baev, M. Farrell, O. V. Kurnasov, M. D. Daugherty, F. Mseeh, B. M. Polanuyer, J. W. Campbell, S. Anantha, K. Y. Shatalin, S. A. Chowdhury, M. Y. Fonstein, and A. L. Osterman.** 2002. From genetic footprinting to antimicrobial drug targets: examples in cofactor biosynthetic pathways. *J. Bacteriol.* **184**:4555-72.
60. **Gilsdorf, J. R., and P. Ferrieri.** 1986. Susceptibility of phenotypic variants of *Haemophilus influenzae* type b to serum bactericidal activity: relation to surface lipopolysaccharide. *J. Infect. Dis.* **153**:223-31.
61. **Gilsdorf, J. R., K. W. McCrea, and C. F. Marrs.** 1997. Role of pili in *Haemophilus influenzae* adherence and colonization. *Infect. Immun.* **65**:2997-3002.
62. **Godek, C. P., and M. H. Cynamon.** 1990. In vitro evaluation of nicotinamide riboside analogs against *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **34**:1473-9.
63. **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. *Pediatr. Res.* **24**:180-5.
64. **Grass, S., and J. W. St Geme, 3rd.** 2000. Maturation and secretion of the non-typable *Haemophilus influenzae* HMW1 adhesin: roles of the N-terminal and C-terminal domains. *Mol. Microbiol.* **36**:55-67.
65. **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**:1201-10.
66. **Gray-Owen, S. D., and A. B. Schryvers.** 1995. Characterization of transferrin binding proteins 1 and 2 in invasive type b and nontypeable strains of *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **63**:3809-15.
67. **Green, B. A., J. E. Farley, T. Quinn-Dey, R. A. Deich, and G. W. Zlotnick.** 1991. The e (P4) outer membrane protein of *Haemophilus influenzae*: biologic activity of anti-e serum and cloning and sequencing of the structural gene. *Infect. Immun.* **59**:3191-8.
68. **Grimberg, J., S. Maguire, and L. Belluscio.** 1989. A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal *Escherichia coli* DNA. *Nucleic. Acids. Res.* **17**:8893.
69. **Grose, J. H., Bergthorsson, U. and Roth, J. R.** 2005. Regulation of NAD Synthesis by the Trifunctional NadR protein of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **187**:2774-2782.

70. **Gu, X. X., C. M. Tsai, M. A. Apicella, and D. J. Lim.** 1995. Quantitation and biological properties of released and cell-bound lipooligosaccharides from nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **63**:4115-20.
71. **Guerina, N. G., S. Langermann, H. W. Clegg, T. W. Kessler, D. A. Goldman, and J. R. Gilsdorf.** 1982. Adherence of piliated *Haemophilus influenzae* type b to human oropharyngeal cells. *J. Infect. Dis.* **146**:564.
72. **Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson, and J. Beckwith.** 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**:4121-30.
73. **Hanahan, D.** 1993. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-80.
74. **Hanson, M. S., and E. J. Hansen.** 1991. Molecular cloning, partial purification, and characterization of a haemin-binding lipoprotein from *Haemophilus influenzae* type b. *Mol. Microbiol.* **5**:267-78.
75. **Hardie, K. R., R. A. Adams, and K. J. Towner.** 1993. Transferrin-binding ability of invasive and commensal isolates of *Haemophilus* spp. *J. Med. Microbiol.* **39**:218-24.
76. **Hardy, G. G., Tudor, S.M., St. Geme, JW III.** 2002. The Pathogenesis of disease due to nontypeable *Haemophilus influenzae*, p. 1-28. In M. A. Herbert, Hood, Derek W., Moxon, E., Richard (ed.), *Haemophilus influenzae* protocols. Humana Press, New Jersey.
77. **Hartmann, E., C. A. Lingwood, and J. Reidl.** 2001. Heat-inducible surface stress protein (Hsp70) mediates sulfatide recognition of the respiratory pathogen *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **69**:3438-41.
78. **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. Lett.* **150**:19-26.
79. **Helander, I. M., B. Lindner, H. Brade, K. Altmann, A. A. Lindberg, E. T. Rietschel, and U. Zahringer.** 1988. Chemical structure of the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* strain I-69 Rd-/b+. Description of a novel deep-rough chemotype. *Eur. J. Biochem.* **177**:483-92.
80. **Henderson, I. R., and J. P. Nataro.** 2001. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect. Immun.* **69**:1231-43.
81. **Hendrixson, D. R., and J. W. St Geme, 3rd.** 1998. The *Haemophilus influenzae* Hap serine protease promotes adherence and microcolony formation, potentiated by a soluble host protein. *Mol. Cell.* **2**:841-50.
82. **Herbert, M., A. Kraiss, A. K. Hilpert, S. Schlor, and J. Reidl.** 2003. Aerobic growth deficient *Haemophilus influenzae* mutants are non-virulent: implications on metabolism. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**:145-52.
83. **Herbert, M., E. Sauer, G. Smethurst, A. Kraiss, A. K. Hilpert, and J. Reidl.** 2003. Nicotinamide ribosyl uptake mutants in *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **71**:5398-401.
84. **Herbert, M. A., S. Hayes, M. E. Deadman, C. M. Tang, D. W. Hood, and E. R. Moxon.** 2002. Signature tagged mutagenesis of *Haemophilus influenzae* identifies genes required for in vivo survival. *Microb. Pathog.* **33**:211-23.
85. **Hill, J. C.** 1983. From the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Summary of a workshop on *Haemophilus influenzae* type B vaccines. *J. Infect. Dis.* **148**:167-75.
86. **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**:8491-7.
87. **Hood, D. W., M. E. Deadman, A. D. Cox, K. Makepeace, A. Martin, J. C. Richards, and E. R. Moxon.** 2004. Three genes, *lgtF*, *lic2C* and *lpsA*, have a primary role in determining the pattern of oligosaccharide extension from the inner core of *Haemophilus influenzae* LPS. *Microbiology* **150**:2089-97.
88. **Hood, D. W., G. Randle, A. D. Cox, K. Makepeace, J. Li, E. K. Schweda, J. C. Richards, and E. R. Moxon.** 2004. Biosynthesis of cryptic lipopolysaccharide glycoforms in *Haemophilus influenzae* involves a mechanism similar to that required for O-antigen synthesis. *J. Bacteriol.* **186**:7429-39.
89. **Hughes, K. T., J. R. Roth, and B. M. Olivera.** 1991. A genetic characterization of the *nadC* gene of *Salmonella typhimurium*. *Genetics* **127**:657-70.
90. **Hulo, N., C. J. Sigrist, V. Le Saux, P. S. Langendijk-Genevaux, L. Bordoli, A. Gattiker, E. De Castro, P. Bucher, and A. Bairoch.** 2004. Recent improvements to the PROSITE database. *Nucleic. Acids Res.* **32**:D134-7.
91. **Janson, H., B. Carl N, A. Cervin, A. Forsgren, A. B. Magnusdottir, S. Lindberg, and T. Runer.** 1999. Effects on the ciliated epithelium of protein D-producing and -nonproducing nontypeable *Haemophilus influenzae* in nasopharyngeal tissue cultures. *J. Infect. Dis.* **180**:737-46.
92. **Jarosik, G. P., and E. J. Hansen.** 1995. Cloning and sequencing of the *Haemophilus influenzae* *exbB* and *exbD* genes. *Gene* **152**:89-92.

93. **Jarosik, G. P., I. Maciver, and E. J. Hansen.** 1995. Utilization of transferrin-bound iron by *Haemophilus influenzae* requires an intact *tonB* gene. *Infect. Immun.* **63**:710-3.
94. **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**:206-13.
95. **Jin, H., Z. Ren, J. M. Pozsgay, C. Elkins, P. W. Whitby, D. J. Morton, and T. L. Stull.** 1996. Cloning of a DNA fragment encoding a heme-repressible hemoglobin-binding outer membrane protein from *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **64**:3134-41.
96. **Jin, H., Z. Ren, P. W. Whitby, D. J. Morton, and T. L. Stull.** 1999. Characterization of *hgpA*, a gene encoding a haemoglobin/haemoglobin-haptoglobin-binding protein of *Haemophilus influenzae*. *Microbiology* **145**:905-14.
97. **Johnson, A. P., and T. J. Inzana.** 1986. Loss of ciliary activity in organ cultures of rat trachea treated with lipo-oligosaccharide from *Haemophilus influenzae*. *J. Med. Microbiol.* **22**:265-8.
98. **Kahn, D. W., and B. M. Anderson.** 1986. Characterization of *Haemophilus influenzae* nucleotide pyrophosphatase. An enzyme of critical importance for growth of the organism. *J. Biol. Chem.* **261**:6016-25.
99. **Kasarov, L. B., and A. G. Moat.** 1972. Convenient method for enzymic synthesis of ¹⁴C-nicotinamide riboside. *Anal. Biochem.* **46**:181-6.
100. **Kelly, D. F., E. R. Moxon, and A. J. Pollard.** 2004. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *Immunology* **113**:163-74.
101. **Kemmer, G., T. J. Reilly, J. Schmidt-Brauns, G. W. Zlotnik, B. A. Green, M. J. Fiske, M. Herbert, A. Kraiss, S. Schlor, A. Smith, and J. Reidl.** 2001. NadN and e(P4) are essential for utilization of NAD and nicotinamide mononucleotide but not nicotinamide riboside in *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* **183**:3974-81.
102. **Ketterer, M. R., J. Q. Shao, D. B. Hornick, B. Buscher, V. K. Bandi, and M. A. Apicella.** 1999. Infection of primary human bronchial epithelial cells by *Haemophilus influenzae*: macropinocytosis as a mechanism of airway epithelial cell entry. *Infect. Immun.* **67**:4161-70.
103. **Kilian, M., and K. Poulsen.** 1992. Enzymatic, serologic, and genetic polymorphism of *Haemophilus influenzae* IgA1 proteases. *J. Infect. Dis.* **165 Suppl 1**:S192-3.
104. **Kolker, E., S. Purvine, A. Picone, T. Cherny, B. J. Akerley, R. S. Munson, Jr., B. O. Palsson, D. A. Daines, and A. L. Smith.** 2002. *H. influenzae* Consortium: integrative study of *H. influenzae*-human interactions. *Omics* **6**:341-8.
105. **Kraiss, A., S. Schlor, and J. Reidl.** 1998. In vivo transposon mutagenesis in *Haemophilus influenzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4697-702.
106. **Krasan, G. P., F. G. Sauer, D. Cutter, M. M. Farley, J. R. Gilsdorf, S. J. Hultgren, and J. W. St Geme, 3rd.** 2000. Evidence for donor strand complementation in the biogenesis of *Haemophilus influenzae* haemagglutinating pili. *Mol. Microbiol.* **35**:1335-47.
107. **Kroll, J. S., and E. R. Moxon.** 1988. Capsulation and gene copy number at the cap locus of *Haemophilus influenzae* type b. *J. Bacteriol.* **170**:859-64.
108. **Kubiet, M., R. Ramphal, A. Weber, and A. Smith.** 2000. Pilus-mediated adherence of *Haemophilus influenzae* to human respiratory mucins. *Infect. Immun.* **68**:3362-7.
109. **Kuklinska, D., and M. Kilian.** 1984. Relative proportions of *Haemophilus* species in the throat of healthy children and adults. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **3**:249-52.
110. **Kurnasov, O., V. Goral, K. Colabroy, S. Gerdes, S. Anantha, A. Osterman, and T. P. Begley.** 2003. NAD biosynthesis: identification of the tryptophan to quinolinate pathway in bacteria. *Chem. Biol.* **10**:1195-204.
111. **Kurnasov, O., L. Jablonski, B. Polanuyer, P. Dorrestein, T. Begley, and A. Osterman.** 2003. Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel kynurenine formamidase. *FEMS Microbiol. Lett.* **227**:219-27.
112. **Kurnasov, O. V., B. M. Polanuyer, S. Ananta, R. Sloutsky, A. Tam, S. Y. Gerdes, and A. L. Osterman.** 2002. Ribosylnicotinamide kinase domain of NadR protein: identification and implications in NAD biosynthesis. *J. Bacteriol.* **184**:6906-17.
113. **Kyte, J., and R. F. Doolittle.** 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**:105-32.
114. **Laarmann, S., D. Cutter, T. Juehne, S. J. Barenkamp, and J. W. St Geme.** 2002. The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter harbours two adhesive pockets that reside in the passenger domain and recognize the same host cell receptor. *Mol. Microbiol.* **46**:731-43.
115. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
116. **Lavie, A., M. Konrad, R. Brundiers, R. S. Goody, I. Schlichting, and J. Reinstein.** 1998. Crystal structure of yeast thymidylate kinase complexed with the bisubstrate inhibitor P1-(5'-adenosyl) P5-(5'-thymidyl) pentaphosphate (TP5A) at 2.0 Å resolution: implications for catalysis and AZT activation. *Biochemistry* **37**:3677-86.

117. **Li de la Sierra, I., H. Munier-Lehmann, A. M. Gilles, O. Barzu, and M. Delarue.** 2001. X-ray structure of TMP kinase from *Mycobacterium tuberculosis* complexed with TMP at 1.95 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **311**:87-100.
118. **Loeb, M. R.** 1995. Ferrochelatase activity and protoporphyrin IX utilization in *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* **177**:3613-5.
119. **Lutz, R., and H. Bujard.** 1997. Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids. Res.* **25**:1203-10.
120. **Marchler-Bauer A., Anderson J. B., Cherukuri P. F., DeWeese-Scott C., Geer L. Y., Gwadz M., He S., Hurwitz D. I., Jackson J. D., Ke Z., Lanczycki C., Liebert C. A., Liu C., Lu F., Marchler G. H., Mullokandov M., Shoemaker B. A., Simonyan V., Song J. S., Thiessen P. A., Yamashita R. A., Yin J. J., Zhang D., Bryant S. H.** 2005. CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids. Res.* **33**: Database Issue, 192-6.
121. **Maciver, I., J. L. Latimer, H. H. Liem, U. Muller-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**:3703-12.
122. **Magni, G., A. Amici, M. Emanuelli, G. Orsomando, N. Raffaelli, and S. Ruggieri.** 2004. Structure and function of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase. *Curr. Med. Chem.* **11**:873-85.
123. **Martin, D., J. Hamel, B. R. Brodeur, and J. M. Musser.** 1990. Antigenic relationships among the porin proteins of encapsulated *Haemophilus influenzae* clones. *J. Clin. Microbiol.* **28**:1720-4.
124. **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**:1168-74.
125. **Masoud, H., E. R. Moxon, A. Martin, D. Krajcarski, and J. C. Richards.** 1997. Structure of the variable and conserved lipopolysaccharide oligosaccharide epitopes expressed by *Haemophilus influenzae* serotype b strain Eagan. *Biochemistry* **36**:2091-103.
126. **McCrea, K. W., W. J. Watson, J. R. Gilsdorf, and C. F. Marrs.** 1994. Identification of *hifD* and *hifE* in the pilus gene cluster of *Haemophilus influenzae* type b strain Eagan. *Infect. Immun.* **62**:4922-8.
127. **Meats, E., E. J. Feil, S. Stringer, A. J. Cody, R. Goldstein, J. S. Kroll, T. Popovic, and B. G. Spratt.** 2003. Characterization of encapsulated and noncapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1623-36.
128. **Morton, D. J., A. Smith, Z. Ren, L. L. Madore, T. M. VanWagoner, T. W. Seale, P. W. Whitby, and T. L. Stull.** 2004. Identification of a haem-utilization protein (Hup) in *Haemophilus influenzae*. *Microbiology* **150**:3923-33.
129. **Morton, D. J., P. W. Whitby, H. Jin, Z. Ren, and T. L. Stull.** 1999. Effect of multiple mutations in the hemoglobin- and hemoglobin-haptoglobin-binding proteins, HgpA, HgpB, and HgpC, of *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.* **67**:2729-39.
130. **Moxon, E. R., B. E. Gewurz, J. C. Richards, T. Inzana, M. P. Jennings, and D. W. Hood.** 1996. Phenotypic switching of *Haemophilus influenzae*. *Mol. Microbiol.* **19**:1149-50.
131. **Moxon, E. R., and J. S. Kroll.** 1990. The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **150**:65-85.
132. **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**:266-74.
133. **Müller, C. W., G. J. Schlauderer, J. Reinstein, and G. E. Schulz.** 1996. Adenylate kinase motions during catalysis: an energetic counterweight balancing substrate binding. *Structure* **4**:147-56.
134. **Musser, J. M., J. S. Kroll, D. M. Granoff, E. R. Moxon, B. R. Brodeur, J. Campos, H. Dabernat, W. Frederiksen, J. Hamel, G. Hammond, and et al.** 1990. Global genetic structure and molecular epidemiology of encapsulated *Haemophilus influenzae*. *Rev. Infect. Dis.* **12**:75-111.
135. **Musser, J. M., J. S. Kroll, E. R. Moxon, and R. K. Selander.** 1988. Clonal population structure of encapsulated *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **56**:1837-45.
136. **Musser, J. M., J. S. Kroll, E. R. Moxon, and R. K. Selander.** 1988. Evolutionary genetics of the encapsulated strains of *Haemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**:7758-62.
137. **Nasu, S., F. D. Wicks, and R. K. Gholson.** 1982. L-Aspartate oxidase, a newly discovered enzyme of *Escherichia coli*, is the B protein of quinolinate synthetase. *J. Biol. Chem.* **257**:626-32.
138. **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.
139. **Noel, G. J., D. M. Mosser, and P. J. Edelson.** 1990. Role of complement in mouse macrophage binding of *Haemophilus influenzae* type b. *J. Clin. Invest.* **85**:208-18.
140. **O'Reilly, T., and D. F. Niven.** 1986. Pyridine nucleotide metabolism by extracts derived from *Haemophilus parasuis* and *H. pleuropneumoniae*. *Can. J. Microbiol.* **32**:733-7.
141. **Park, U. E., B. M. Olivera, K. T. Hughes, J. R. Roth, and D. R. Hillyard.** 1989. DNA ligase and the pyridine nucleotide cycle in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **171**:2173-80.

142. **Park, U. E., J. R. Roth, and B. M. Olivera.** 1988. *Salmonella typhimurium* mutants lacking NAD pyrophosphatase. *J. Bacteriol.* **170**:3725-30.
143. **Penfound, T., and J. W. Foster.** 1999. NAD-dependent DNA-binding activity of the bifunctional NadR regulator of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **181**:648-55.
144. **Penfound, T. a. F., J. W.** 1996. Biosynthesis and Recycling of NAD, p. 721-730. In F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. ASM, Washington D.C.
145. **Pichichero, M. E., and C. L. Pichichero.** 1995. Persistent acute otitis media: I. Causative pathogens. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **14**:178-83.
146. **Poje, G. a. R., R. J.** 2002. General methods for culturing *Haemophilus influenzae*, p. 51-71. In M. Herbert, Hood, D. W., Moxon, E.R. (ed.), *Haemophilus influenzae* Protocols, vol. 71. Humana Press. New Jersey.
147. **Poole, J., and L. Van Alphen.** 1988. *Haemophilus influenzae* receptor and the AnWj antigen. *Transfusion* **28**:289.
148. **Preston, A., D. Maskell, A. Johnson, and E. R. Moxon.** 1996. Altered lipopolysaccharide characteristic of the 169 phenotype in *Haemophilus influenzae* results from mutations in a novel gene, *isn*. *J. Bacteriol.* **178**:396-402.
149. **Raffaelli, N., Lorenzi, T., Mariani, L.P., Emanuelli, M., Amici, A., Ruggieri, S., Magni, G.** 1999. The *Escherichia coli* NadR regulator is endowed with nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase activity. *J. Bacteriol.* **181**:5509-5511.
150. **Raffaelli, N., A. Amici, M. Emanuelli, S. Ruggieri, and G. Magni.** 1994. Pyridine dinucleotide biosynthesis in archaeobacteria: presence of NMN adenylyltransferase in *Sulfolobus solfataricus*. *FEBS Lett.* **355**:233-6.
151. **Raffaelli, N., L. Sorci, A. Amici, M. Emanuelli, F. Mazzola, and G. Magni.** 2002. Identification of a novel human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**:835-40.
152. **Raghunathan, A., N. D. Price, M. Y. Galperin, K. S. Makarova, S. Purvine, A. F. Picone, T. Cherny, T. Xie, T. J. Reilly, R. Munson, Jr., R. E. Tyler, B. J. Akerley, A. L. Smith, B. O. Palsson, and E. Kolker.** 2004. In Silico metabolic model and protein expression of *Haemophilus influenzae* strain Rd KW20 in rich medium. *Omics* **8**:25-41.
153. **Read, R. C., R. Wilson, A. Rutman, V. Lund, H. C. Todd, A. P. Brain, P. K. Jeffery, and P. J. Cole.** 1991. Interaction of nontypable *Haemophilus influenzae* with human respiratory mucosa in vitro. *J. Infect. Dis.* **163**:549-58.
154. **Reddy, M. S., J. M. Bernstein, T. F. Murphy, and H. S. Faden.** 1996. Binding between outer membrane proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* and human nasopharyngeal mucin. *Infect. Immun.* **64**:1477-9.
155. **Redfield, R. J.** 1991. *sxy-1*, a *Haemophilus influenzae* mutation causing greatly enhanced spontaneous competence. *J. Bacteriol.* **173**:5612-8.
156. **Reidl, J., and J. J. Mekalanos.** 1996. Lipoprotein e(P4) is essential for hemin uptake by *Haemophilus influenzae*. *J. Exp. Med.* **183**:621-9.
157. **Reidl, J., S. Schlor, A. Kraiss, J. Schmidt-Brauns, G. Kemmer, and E. Soleva.** 2000. NADP and NAD utilization in *Haemophilus influenzae*. *Mol. Microbiol.* **35**:1573-81.
158. **Reilly, T. J., D. L. Chance, and A. L. Smith.** 1999. Outer membrane lipoprotein e (P4) of *Haemophilus influenzae* is a novel phosphomonoesterase. *J. Bacteriol.* **181**:6797-805.
159. **Reilly, T. J., and A. L. Smith.** 1999. Purification and characterization of a recombinant *Haemophilus influenzae* outer membrane phosphomonoesterase e (P4). *Protein Expr. Purif.* **17**:401-9.
160. **Ren, Z., H. Jin, D. J. Morton, and T. L. Stull.** 1998. *hgpB*, a gene encoding a second *Haemophilus influenzae* hemoglobin- and hemoglobin-haptoglobin-binding protein. *Infect. Immun.* **66**:4733-41.
161. **Risberg, A., G. Alvelius, and E. K. Schweda.** 1999. Structural analysis of the lipopolysaccharide oligosaccharide epitopes expressed by *Haemophilus influenzae* strain RM.118-26. *Eur. J. Biochem.* **265**:1067-74.
162. **Roche, R. J., and E. R. Moxon.** 1995. Phenotypic variation of carbohydrate surface antigens and the pathogenesis of *Haemophilus influenzae* infections. *Trends Microbiol.* **3**:304-9.
163. **Rodriguez, C. A., V. Avadhanula, A. Buscher, A. L. Smith, J. W. St Geme, 3rd, and E. E. Adderson.** 2003. Prevalence and distribution of adhesins in invasive non-type b encapsulated *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **71**:1635-42.
164. **Rohrer, H., W. Zillig, and R. Mailhammer.** 1975. ADP-ribosylation of DNA-dependent RNA polymerase of *Escherichia coli* by an NAD⁺: protein ADP-ribosyltransferase from bacteriophage T4. *Eur. J. Biochem.* **60**:227-38.
165. **Rombel, I., P. Peters-Wendisch, A. Mesecar, T. Thorgeirsson, Y. K. Shin, and S. Kustu.** 1999. MgATP binding and hydrolysis determinants of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein. *J. Bacteriol.* **181**:4628-38.

166. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2 ed. Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
167. **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**:4515-25.
168. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.
169. **Saraste, M., P. R. Sibbald, and A. Wittinghofer.** 1990. The P-loop, a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **15**:430-4.
170. **Sauer, E., M. Merdanovic, A. P. Mortimer, G. Bringmann, and J. Reidl.** 2004. PnuC and the utilization of the nicotinamide riboside analog 3-aminopyridine in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4532-41.
171. **Schlor, S., M. Herbert, M. Rodenburg, J. Blass, and J. Reidl.** 2000. Characterization of ferrocyclase (*hemH*) mutations in *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **68**:3007-9.
172. **Schlor, S., G. Kemmer, and J. Reidl.** 2003. Transposon Tn10. *Methods Mol. Med.* **71**:211-24.
173. **Schmidt-Brauns, J., M. Herbert, G. Kemmer, A. Kraiss, S. Schlor, and J. Reidl.** 2001. Is a NAD pyrophosphatase activity necessary for *Haemophilus influenzae* type b multiplication in the blood stream? *Int. J. Med. Microbiol.* **291**:219-25.
174. **Schryvers, A. B., and S. Gray-Owen.** 1992. Iron acquisition in *Haemophilus influenzae*: receptors for human transferrin. *J. Infect. Dis.* **165 Suppl 1**:S103-4.
175. **Schweda, E. K. a. R., J.C.** 2002. Structural profiling of short-chain lipopolysaccharides from *Haemophilus influenzae*, p. 161-183. In M. Herbert, Hood, D. W., Moxon, E.R. (ed.), *Haemophilus influenzae* Protocols, vol. 71. Humana Press, New Jersey.
176. **Singh, S. K., O. V. Kurnasov, B. Chen, H. Robinson, N. V. Grishin, A. L. Osterman, and H. Zhang.** 2002. Crystal structure of *Haemophilus influenzae* NadR protein. A bifunctional enzyme endowed with NMN adenylyltransferase and ribosylnicotinimide kinase activities. *J. Biol. Chem.* **277**:33291-9.
177. **Smith, D. H., D. V. Madore, R. J. Eby, P. W. Anderson, R. A. Insel, and C. L. Johnson.** 1989. *Haemophilus b* oligosaccharide-CRM197 and other *Haemophilus b* conjugate vaccines: a status report. *Adv. Exp. Med. Biol.* **251**:65-82.
178. **Smith, H. O., J. F. Tomb, B. A. Dougherty, R. D. Fleischmann, and J. C. Venter.** 1995. Frequency and distribution of DNA uptake signal sequences in the *Haemophilus influenzae* Rd genome. *Science* **269**:538-40.
179. **Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-17.
180. **Spencer, R. L., and J. Preiss.** 1967. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. The purification and the properties of diphosphopyridine nucleotide synthetase from *Escherichia coli* b. *J. Biol. Chem.* **242**:385-92.
181. **St Geme, J. W., 3rd.** 2002. Molecular and cellular determinants of non-typeable *Haemophilus influenzae* adherence and invasion. *Cell. Microbiol.* **4**:191-200.
182. **St Geme, J. W., 3rd.** 1994. The HMW1 adhesin of nontypeable *Haemophilus influenzae* recognizes sialylated glycoprotein receptors on cultured human epithelial cells. *Infect. Immun.* **62**:3881-9.
183. **St Geme, J. W., 3rd, and D. Cutter.** 2000. The *Haemophilus influenzae* Hia adhesin is an autotransporter protein that remains uncleaved at the C terminus and fully cell associated. *J. Bacteriol.* **182**:6005-13.
184. **St Geme, J. W., 3rd, D. Cutter, and S. J. Barenkamp.** 1996. Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils. *J. Bacteriol.* **178**:6281-7.
185. **St Geme, J. W., 3rd, S. Falkow, and S. J. Barenkamp.** 1993. High-molecular-weight proteins of nontypable *Haemophilus influenzae* mediate attachment to human epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**:2875-9.
186. **St Geme, J. W., 3rd, V. V. Kumar, D. Cutter, and S. J. Barenkamp.** 1998. Prevalence and distribution of the *hmw* and *hia* genes and the HMW and Hia adhesins among genetically diverse strains of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **66**:364-8.
187. **St Geme, J. W., J. S. Pinkner, 3rd, G. P. Krasan, J. Heuser, E. Bullitt, A. L. Smith, and S. J. Hultgren.** 1996. *Haemophilus influenzae* pili are composite structures assembled via the HifB chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**:11913-8.
188. **Surana, N. K., D. Cutter, S. J. Barenkamp, and J. W. St Geme, 3rd.** 2004. The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter contains an unusually short trimeric translocator domain. *J. Biol. Chem.* **279**:14679-85.
189. **Suzuki, N., J. Carlson, G. Griffith, and R. K. Gholson.** 1973. Studies on the de novo biosynthesis of NAD in *Escherichia coli*. V. Properties of the quinolinic acid synthetase system. *Biochim. Biophys. Acta.* **304**:309-15.

190. Sweet, G., C. Gandor, R. Voegelé, N. Wittekindt, J. Beuerle, V. Truniger, E. C. Lin, and W. Boos. 1990. Glycerol facilitator of *Escherichia coli*: cloning of *glpF* and identification of the *glpF* product. *J. Bacteriol.* **172**:424-30.
191. Swift, A. J., E. R. Moxon, A. Zwahlen, and J. A. Winkelstein. 1991. Complement-mediated serum activities against genetically defined capsular transformants of *Haemophilus influenzae*. *Microb. Pathog.* **10**:261-9.
192. Swords, W. E., B. A. Buscher, K. Ver Steeg Ii, A. Preston, W. A. Nichols, J. N. Weiser, B. W. Gibson, and M. A. Apicella. 2000. Non-typeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Mol. Microbiol.* **37**:13-27.
193. Swords, W. E., M. R. Ketterer, J. Shao, C. A. Campbell, J. N. Weiser, and M. A. Apicella. 2001. Binding of the non-typeable *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharide to the PAF receptor initiates host cell signalling. *Cell. Microbiol.* **3**:525-36.
194. Towbin, H., T. Staehlin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**:4350-4354.
195. van Alphen, L., Poole, J. and Overbeeks, M. 1986. The Anton blood group antigen is the erythrocyte receptor for *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **37**:69-71.
196. van Alphen, L., L. Geelen-van den Broek, L. Blaas, M. van Ham, and J. Dankert. 1991. Blocking of fimbria-mediated adherence of *Haemophilus influenzae* by sialyl gangliosides. *Infect. Immun.* **59**:4473-7.
197. 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.* **13**:673-84.
198. van Schilfgaarde, M., P. Eijk, A. Regelink, P. van Ulsen, V. Everts, J. Dankert, and L. van Alphen. 1999. *Haemophilus influenzae* localized in epithelial cell layers is shielded from antibiotics and antibody-mediated bactericidal activity. *Microb. Pathog.* **26**:249-62.
199. van Schilfgaarde, M., P. van Ulsen, W. van Der Steeg, V. Winter, P. Eijk, V. Everts, J. Dankert, and L. van Alphen. 2000. Cloning of genes of nontypeable *Haemophilus influenzae* involved in penetration between human lung epithelial cells. *Infect. Immun.* **68**:4616-23.
200. van Ulsen, P., M. van Schilfgaarde, J. Dankert, H. Jansen, and L. van Alphen. 2002. Genes of non-typeable *Haemophilus influenzae* expressed during interaction with human epithelial cell lines. *Mol. Microbiol.* **45**:485-500.
201. Vetter, I. R., and A. Wittinghofer. 1999. Nucleoside triphosphate-binding proteins: different scaffolds to achieve phosphoryl transfer. *Q. Rev. Biophys.* **32**:1-56.
202. Via, A., F. Ferre, B. Brannetti, A. Valencia, and M. Helmer-Citterich. 2000. Three-dimensional view of the surface motif associated with the P-loop structure: cis and trans cases of convergent evolution. *J. Mol. Biol.* **303**:455-65.
203. Virkola, R., M. Brummer, H. Rauvala, L. van Alphen, and T. K. Korhonen. 2000. Interaction of fimbriae of *Haemophilus influenzae* type B with heparin-binding extracellular matrix proteins. *Infect. Immun.* **68**:5696-701.
204. Vogel, L., B. Duim, F. Geluk, P. Eijk, H. Jansen, J. Dankert, and L. vanAlphen. 1996. Immune selection for antigenic drift of major outer membrane protein P2 of *Haemophilus influenzae* during persistence in subcutaneous tissue cages in rabbits. *Infect. Immun.* **64**:980-6.
205. Voegelé, R. T., G. D. Sweet, and W. Boos. 1993. Glycerol kinase of *Escherichia coli* is activated by interaction with the glycerol facilitator. *J. Bacteriol.* **175**:1087-94.
206. Walker, J. E., Saraste M., Runswick, M. J., Gay, N. J. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**:945-951.
207. Watson, W. J., J. R. Gilsdorf, M. A. Tucci, K. W. McCrea, L. J. Forney, and C. F. Marrs. 1994. Identification of a gene essential for piliation in *Haemophilus influenzae* type b with homology to the pilus assembly platform genes of gram-negative bacteria. *Infect. Immun.* **62**:468-75.
208. Weiser, J. N., J. M. Love, and E. R. Moxon. 1989. The molecular mechanism of phase variation of *H. influenzae* lipopolysaccharide. *Cell* **59**:657-65.
209. Wimpenny, J. W., and A. Firth. 1972. Levels of nicotinamide adenine dinucleotide and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in facultative bacteria and the effect of oxygen. *J. Bacteriol.* **111**:24-32.
210. Winter, L. E., and S. J. Barenkamp. 2003. Human antibodies specific for the high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* mediate opsonophagocytic activity. *Infect. Immun.* **71**:6884-91.
211. Wong, S. M., and B. J. Akerley. 2003. Inducible expression system and marker-linked mutagenesis approach for functional genomics of *Haemophilus influenzae*. *Gene* **316**:177-86.
212. Wyman, C., I. Rombel, A. K. North, C. Bustamante, and S. Kustu. 1997. Unusual oligomerization required for activity of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein. *Science* **275**:1658-61.

213. **Yalowitz, J. A., and H. N. Jayaram.** 2000. Molecular targets of guanine nucleotides in differentiation, proliferation and apoptosis. *Anticancer. Res.* **20**:2329-38.
214. **Yan, H., and M. D. Tsai.** 1999. Nucleoside monophosphate kinases: structure, mechanism, and substrate specificity. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **73**:103-34.
215. **Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-19.
216. **Yanofsky, C.** 1954. The absence of a tryptophan-niacin relationship in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **68**:577-84.
217. **Zagursky, R. J., 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**:2525-34.
218. **Zhang, H., T. Zhou, O. Kurnasov, S. Cheek, N. V. Grishin, and A. Osterman.** 2002. Crystal structures of *E. coli* nicotinate mononucleotide adenylyltransferase and its complex with deamido-NAD. *Structure* **10**:69-79.
219. **Zhang, X., O. V. Kurnasov, S. Karthikeyan, N. V. Grishin, A. L. Osterman, and H. Zhang.** 2003. Structural characterization of a human cytosolic NMN/NaMN adenylyltransferase and implication in human NAD biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **278**:13503-11.
220. **Zhou, T., O. Kurnasov, D. R. Tomchick, D. D. Binns, N. V. Grishin, V. E. Marquez, A. L. Osterman, and H. Zhang.** 2002. Structure of human nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase. Basis for the dual substrate specificity and activation of the oncolytic agent tiazofurin. *J. Biol. Chem.* **277**:13148-54.
221. **Zhu, N., B. M. Olivera, and J. R. Roth.** 1991. Activity of the nicotinamide mononucleotide transport system is regulated in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **173**:1311-20.
222. **Zubay, G. L.** 1998. *Biochemistry*, 4 ed. WCB.
223. **Zwahlen, A., J. S. Kroll, L. G. Rubin, and E. R. Moxon.** 1989. The molecular basis of pathogenicity in *Haemophilus influenzae*: comparative virulence of genetically-related capsular transformants and correlation with changes at the capsulation locus *cap*. *Microb. Pathog.* **7**:225-35.

VII Anhang

1. Abkürzungen

AAD	3-Aminopyridin-Adenin-Dinukleotid
AMN	3-Aminopyridin-Mononukleotid
AmPR	3-Aminopyridin
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Aminosäuren	gemäß des 1- bzw. 3-Buchstaben Code
AM	Außenmembran
Ap ^{r/s}	Ampicillin resistent/ sensitiv
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
Bla	β-Lactamase
<i>bla</i>	β-Lactamase-Gen
BHI	“brain-heart-infusion”
BSA	„bovine serum albumine“ (Rinderserumalbumin)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CM	Cytoplasmamembran
Cm ^r	Chloramphenicol resistent
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
<i>cat</i>	Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen aus pACYC184
CFU	„colony forming units“
Δ	Deletion
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DNP	2,4-Dinitrophenol
dNTP	desoxy Nucleosid- (Adenosin-, Cytosin-, Thymidin-, Guanosin-) triphosphat

DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
Faktor V	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid und Derivate
Fe ²⁺	Eisen
g	Gramm
Glc	Glucose
GTP	Guanosintriphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
h	Stunde
Hib	<i>H. influenzae</i> Typ b
HMW	„high molecular weight“ Adhäsine
HPLC	„high pressure liquid chromatography“
IgA1	Immunglobulin A1
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IM	Innenmembran
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
<i>kan</i>	Kanamycin-Resistenz-Gen aus pACYC177
kb	Kilobasenpaare
KCN	Kaliumcyankali
kDa	Kilo-Dalton
KDO	3-Deoxy-D-Manno-Oktulonsäure
Kern OS	Kernoligosaccharid
Km ^{r/s}	Kanamycin resistant/sensitiv
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
mA	Milliampere
Mb	Megabasen
MCS	„multiple cloning site“
mg	Milligramm

µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
min	Minuten
MLEE	Multilocus-Enzym-Elektrophorese
MLST	Multilocus-Sequence-Typing
NA	Nikotinsäure
Nam	Nikotinamid
NAD ⁺ /NADH+H	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte/reduzierte Form)
NADP	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NMN	Nikotinamid-Mononukleotid
NR	Nikotinamidribosyl
NAMN	Nikotinsäure-Mononukleotid
NAAD	Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid
NMNAT	Nikotinamid-Mononukleotid-Adenylyltransferase
nm	Nanometer
NTHi	nicht-typisierbare <i>H. influenzae</i>
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge "x" (nm)
OMP	Außenmembran Porin
ORF	„open reading frame“ (offenes Leseraster)
P	Phosphat
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion/ „polymerase-chain-reaction“
pI	isoelektrischer Punkt
PP	Pyrophosphat
PPIX	Protoporphyrin IX
PRP	Polyribosyl-Ribitol-Phosphat
PRPP	Phosphoribosylpyrophosphat
PEtn	Phosphoethanolamin
PNC's	Pyridin-Nukleotid-Zyklen / „pyridine nucleotide cycles“

Rbs	Ribosomenbindestelle
RNK	Ribosylnukleotid-Kinase
rpm	„rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Sm ^{r/s}	Streptomycin resistant/ sensitiv
Sp ^{r/s}	Spectinomycin resistant/sensitiv
sv.	Serovar
QA	Quinolinat
Tc ^r	Tetracyclin resistant
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
u. a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur/ en
V	Volt
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
Wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
X	beliebige Aminosäure
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-D-Galaktopyranosid
X-Phos	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat-Dinatriumsalz

2. Abbildungen

```

1  ---MILFAGDPHGSYDHIYPFIKSEQ---ENVALIILGDLQLTT--SDELDKLAKHCD-
2  ---MILFAGDPHGSFDHLYPFIKDK---QDVALIILGDLQLTT--ASELEKLAQYCD-
3  ---MILFAGDPHGYEKHLYPFVRGK---EDIALIILGDLQLTT--VEELDKLSQYCD-
4  -----
5  MSEGHVVICGDPHGEFGLIESVHRH---RPEAVVLAGDIQARRPLDEELASILPLTQ-
6  ---MILFAGDPHGNVQHLATFLQQCGKAKEETALILGDLQLSS--TEALDRLAEYCE-
7  ---MKILAISDPHGDYSKMKQILEKAG---DFDLAVVVGDITNFGP-DEQVDELAEMFDK
          ***                **

1  -LWFIHGNDHDKTISAFDSIWGSEWQSRNLHNRVVDIQGTRIAGLGGVFRGQIWMPNRP
2  -LWFIHGNDHDKTIDAFESIWESEWQSRNLHGKVTIIOGKKIAGLGGVFRGQIWMPNRP
3  -LWFIHGNDHDKTVAAFEALWGSKWKNRNLHGRVAEIQGKKIAGLGGVFRGQIWMPNRP
4  -----MTAFDTLWNSHWKARNLHGRVVEIQGIK IAGLGGVFRGHIWMPNRP
5  -VWVWIPGNHDTDSADADYDNLFGSALADRNLDRVVTIAGLRIAGLGGIFRGQVWMPPEPA
6  -LWFIHGNDHDKQ-----
7  PVLALIPGNCDQKTI LLEALENS----KAVNHLGKAEQIGKIRF IGLGGSNP----TPTNTP
          ****

1  MFEDPIHYCQYSPQEKIWRGGVPLRHRISIFPSEIILENQQADVLICHEAPKPHPMGFQ
2  LFEDPIHYCQYCSQEKIWRGGVPLRHRISIFPSEIIBALEQQKADLICHEAPKPHPSGFA
3  LFEDPIHYCQYCSQEKIWRGGIPLRHRSSIFPADIEENLSKETADLICHEAPKPHPSGFT
4  MFEDPIHYCQYCPQERIWRGGIPLRHRSSIFPSEIIBALANQQADLITHEAPRPHPGFA
5  RMESESDYLAKCGKGNVWRGGLPRRHRSTIFPQTYNALLSQHADVLVSHEAPACHPHGFE
6  -----
7  FELSE-----EETENALEGMVCSAENS--GECGTIVL LTHAPP GARDEL PFGH-VGSK

1  VINDLAMKMGVKLVFHGHHHNFNTY---RTKYPKITINVG---FRSLADAEQNYL--IQ
2  VINTLAQKMQVKHIFHGHHHNFYDT--LSEEFKITINVG---FRSLCNIEGEYL--LL
3  VINELASQMQIKHIFHGHHHNFYDS-ELAPQTPFATINVG---FRSLCDEKGNYL--IK
4  VINQLAKKMGVSKIFHGHHHNFYAPVNRNKH-CELFNIG---FRSLADINGNYL--II
5  AIDMLIEMRVKRAFHGHHHESTAMP---TAGPCRIFGLG---ACAVATIEGEFLPSVL
6  -----
7  AIQKFLD--RVDLIVCGHIHEAKGSE---KVGKTVV VNPGEACKGS CALIEIEETGNKP

1  TIDDRK--
2  GVDDR----
3  NIDDRKKNP
4  GVDDREHR-
5  TCFDQVEGG
6  -----
7  IEVIFVEV-

```

Abb. 31: Gegenüberstellung verschiedener NadX homologer Proteine. Gezeigt sind die Proteinsequenzen unterschiedlicher Proteine, die Homologien zu NadX (HI0762; Y762) aufweisen (Identität) aus verschiedenen Bakterien, die durch das Computerprogramm ClustalW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) einander zugeordnet wurden: 1: Y762/NadX *H. influenzae*; 2: Q9CL55, *P. multocida*; 3: Q65W85, *Mannheimia succiniciproducens*; 4: Q7VP31, *H. ducreyi*; 5: Q7WXF3, *Ralstonia eutropha* H16; 6: Q7VP32, *H. ducreyi*; 7: Q8TQU0, *Methanosarcina acetivorans*. Identische AS sind in schwarz und ähnliche in grau dargestellt. Das Phosphoesterase Consensus-Motif HxD(25x)GDxxDx(25x)GNHD ist mit * gekennzeichnet.

3. Erklärungen

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig 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 (neben dem Diplom in Biologie) erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, Mai 2005

Melisa Merdanović

4. Publikationsliste

Heidrich, C., Templin, M. F., Ursinus, A., Merdanovic, M., Berger, J., Schwarz, H., de Pedro, M. A., Höltje, J. V. 2001. Involment of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separatuon and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia Coli*. *Mol. Microbiol.* **41**(1):167-178

Sauer, E., Merdanovic, M., Mortimer, A. P., Bringmann, G. and Reidl, J. 2004. PnuC and utilization of the nicotinamide riboside analog 3-aminopyridine in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**(12): 4532-4541

Merdanovic, M., Sauer, E. and Reidl, J. 2005. Coupling of NAD⁺ biosynthesis and nicotinamide ribosyl transport: Characterization of NadR ribonucleotide kinase mutants of *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* *in press*

5. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Melisa Merdanović
 Geburtsdatum 29. Januar 1977
 Geburtsort Prijedor, Bosnien-Herzegowina

Wissenschaftliche Anstellung

seit Jan. 2002 Dissertation zum Thema: “ Charakterisierung von NadR:
 Das essentielle Enzym der NAD⁺-Synthese bei *Haemophilus
 influenzae*“
 am Institut für Hygiene und Mikrobiologie
 der Universität Würzburg
 bei Herrn Prof. J. Reidl

Studium

Okt. 1996 - Jan. 2002 Studium der Biologie an der Universität Tübingen
 Studienschwerpunkte: Genetik, Mikrobiologie und
 Biochemie
 Diplomarbeit (Nov 2000 – Okt. 2001) zum Thema:
 “Biochemische Charakterisierung der N-Acetylmuramyl-L-
 Alanin Amidase AmiB aus *Escherichia coli*“ am Max-
 Planck Institut für Entwicklungsbiologie, Abt. Biochemie in
 Tübingen bei Herrn Prof. J.-V. Höltje

Schulbildung

Sep. 1983-Juli 1991 Allgemeine (8 jährige) Schule „Narodni front“, Sanski Most,
 Bosnien-Herzegowina (BiH)
 Sep. 1991-April 1992 „Ivan Goran Kovacic“ Gymnasium, Sanski Most, BiH
 Mai 1992-Juli 1992 Gymnasium, Jesenice, Slowenien
 Sep. 1992-Dez. 1992 9. Klasse der Hauptschule, Dettingen am Erms
 Jan. 1993-Juli 1993 Gastschüler am „Graf Ebershardt“ Gymnasium, Bad Urach
 Sep. 1993-Juli 1994 11. Klasse am „Johannes Kepler“ Gymnasium, Reutlingen
 Sep. 1994-Juni 1996 „Isolde Kurz“ Gymnasium, Reutlingen
 Abschluss: Abitur

