

**"NAD<sup>+</sup>-Abhängigkeit bei *Pasteurellaceae*:  
Charakterisierung der Nikotinamid-Ribosid-  
Aufnahme bei *Haemophilus influenzae*"**

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

vorgelegt von  
Elizabeta Sauer  
aus Strumica, Mazedonien

Würzburg, 2006

Eingereicht am: \_\_\_\_\_

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. J. Reidl

Gutachter: PD Dr. M. Steinert

Tag des Promotionskolloquiums: \_\_\_\_\_

Doktorurkunde ausgehändigt am: \_\_\_\_\_

## **Danke!**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2002 bis November 2005 am Zentrum für Infektionsforschung und am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. J. Reidl erstellt.

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Allen voran gilt der Dank natürlich dem Doktorvater dieser Arbeit, Prof. Dr. J. Reidl, der durch zahlreiche fachliche Anregungen diese Arbeit bis in die Endphase hinein wesentlich beeinflusst hat. Außerdem bin ich für sein Vertrauen, seine Geduld und den Freiraum, den er mir eingeräumt hat, sehr dankbar. PD Dr. M. Steinert danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Insgesamt möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Reidl bedanken, allen voran der zweiten Hälfte der Balkan-Fraktion „mala Bosanka“ Melisa, die mir im *Haemophilus*-Lager zur Seite stand und dem „Fragt mich, ich weiß alles“-Stefan. Weiterhin möchte ich Dagmar für die nachdenklichen Momente und dem Organisationstalent Karina danken.

Danke auch an Dodo, Gabi, Paul, Anja, Joanna und Ulla, die mir während der Schwangerschaft die EtBr-Gele gefärbt und photographiert haben bzw. schwere Sachen getragen haben. Des Weiteren danke ich Allen aus dem Röntgenring und aus der Hygiene, die zu meinem Wohlbefinden beigetragen haben, insbesondere möchte ich Artur für seine stete Hilfsbereitschaft danken.

Meinen Eltern und meinem Mann, Stefan, bin ich dankbar für die Unterstützung und ihre Liebe, die mich all die Jahre durch mein Studium begleitet haben. Meinen Schwiegereltern danke ich für die tatkräftige Unterstützung als Großeltern, während des letzten Jahres.

Lara, danke, dass es dich gibt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>I. Summary .....</b>	<b>4</b>
<b>II. Einleitung.....</b>	<b>7</b>
<b>1. <i>Haemophilus influenzae</i> allgemein.....</b>	<b>7</b>
1.1. Historischer Rückblick.....	7
1.2. Taxonomie und Morphologie .....	8
1.3. Molekulare und genetische Grundlagen zu <i>H. influenzae</i> .....	9
1.4. Epidemiologie.....	13
1.5. Pathogenität und Virulenz .....	14
1.6. Therapeutika bzw. Vakzine gegen <i>H. influenzae</i> .....	19
<b>2. NAD<sup>+</sup>-Biosynthese.....</b>	<b>21</b>
2.1. Biologische Bedeutung von NAD <sup>+</sup> .....	21
2.2. Allgemeine Funktionsabläufe der NAD <sup>+</sup> -Biosynthese .....	23
2.3. NAD <sup>+</sup> -Aufnahme .....	26
2.4. Regulation der Biosynthese.....	27
2.5. NAD <sup>+</sup> -Biosynthese bei den <i>Pasteurellaceae</i> .....	28
<b>3. Transportsysteme.....</b>	<b>32</b>
3.1. Kanäle und Poren.....	33
3.2. „Carrier“ vermittelter Transporter .....	34
3.2.1. Primär aktive Transporter.....	35
3.2.2. Sekundär aktive Transporter.....	36
3.2.3. Gruppentranslokation .....	37
<b>4. Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>39</b>
<b>III. Material.....</b>	<b>40</b>
<b>1. Bakterienstämme .....</b>	<b>40</b>
1.1. <i>E. coli</i> -Stämme.....	40
1.2. <i>H. influenzae</i> -Stämme .....	41
1.3. Sonstige Stämme.....	42
<b>2. Plasmide und Oligonukleotide.....</b>	<b>42</b>
2.1. Plasmide .....	42
2.2. Oligonukleotide .....	43
<b>3. Nährmedien und Medienzusätze .....</b>	<b>46</b>
3.1. Medien.....	46
3.2. Agar.....	49
3.3. Medienzusätze .....	50
<b>4. Verbrauchsmaterialien und Geräte.....</b>	<b>51</b>

4.1. Chemikalien und Kits.....	51
4.2. Größenmarker, Antikörper und Enzyme.....	52
4.3. Geräte.....	52
<b>5. Internetanwendungen.....</b>	<b>54</b>
<b>IV. Methoden.....</b>	<b>55</b>
<b>1. Kultivierung von Bakterienstämmen.....</b>	<b>55</b>
1.1. Kultivierung von <i>H. influenzae</i> .....	55
1.1. Kultivierung von <i>A. actinomycetemcomitans</i> und <i>P. multocida</i> .....	55
<b>2. Molekulargenetische Methoden.....</b>	<b>56</b>
2.1. Präparation von Plasmid-DNS.....	56
2.1.1. Midi-Präparation.....	56
2.1.2. Mini-Präparation.....	57
2.2. Präparation von chromosomaler DNS.....	57
2.3. DNS-Linearisierung und Ligation von linearisierter Plasmid-DNS.....	58
2.3.1. DNS-Verdau mit Restriktionsenzymen.....	58
2.3.2. Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNS.....	58
2.3.3. Ligation von linearisierten DNS-Fragmenten.....	59
2.4. Polymerase-Ketten-Reaktion und Agarose-Gelelektrophorese.....	59
2.4.1. Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR).....	59
2.4.2. Ortsgerichtete Mutagenese.....	60
2.4.3. Horizontale Agarose-Gelelektrophorese.....	61
2.4.4. Elution von DNS-Fragmenten.....	62
2.4.5. DNS-Konzentrationsbestimmung.....	62
2.5. Southern-Blot.....	62
2.5.1. DNS-Transfer aus Agarosegelen auf Membranen.....	62
2.5.2. Southern-Hybridisierung mit dem ECL-Kit.....	63
2.5.3. Entwicklung des Blots.....	64
2.5.4. Dehybridisierung des Blots (Strippen).....	64
2.6. Herstellung kompetenter Bakterienzellen.....	65
2.6.1. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen für Elektroporation.....	65
2.6.2. Herstellung kompetenter <i>H. influenzae</i> Zellen.....	65
2.7. Transformation kompetenter Zellen.....	65
2.7.1. Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation.....	65
2.7.2. Transformation von MIV-kompetenten <i>H. influenzae</i> Zellen.....	66
2.7.3. Transformation von <i>H. influenzae</i> BRAD.....	66
2.8. DNS-Sequenzierung.....	67
2.8.1. Sequenzierung mit dem LiCor System.....	67
2.8.2. Sequenzierung mit dem ABI Sequenzer.....	68
<b>3. Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>69</b>
3.1. Präparation von Periplasma-Extrakten.....	69
3.2. Überexpression von <i>H. influenzae</i> PnuC in <i>E. coli</i> .....	69
3.3. Isolierung der Membranfraktion von PnuC aus <i>E. coli</i> .....	69
3.4. Isolierung der Membranfraktion von PnuC aus <i>H. influenzae</i> .....	70
3.5. Isolierung der Membranfraktion von NQR.....	70
3.6. Proteinkonzentrationsbestimmung.....	71
3.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	71

3.8. Coomassie-Färbung .....	72
3.9. Western-Blot.....	73
<b>4. Enzym-Assays.....</b>	<b>73</b>
4.1. Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität .....	73
4.2. Bestimmung der Phosphatase-Aktivität .....	74
4.3. Bestimmung der NADH-Oxidase-Aktivität .....	75
<b>5. Herstellung von Nikotinamid-Nukleotid-Reagenzien .....</b>	<b>76</b>
5.1. Herstellung von NMN und NR.....	76
5.2. Herstellung von $^{14}\text{C}$ -NMN und $^{14}\text{C}$ -NR.....	76
5.3. Herstellung von 3-AAD und 3-AmPR.....	76
<b>6. Transport-Assay.....</b>	<b>77</b>
<b>7. Dünnschicht-Chromatographie .....</b>	<b>77</b>
<b>V. Ergebnisse .....</b>	<b>78</b>
<b>1. Identifikation von <i>pnuC</i> .....</b>	<b>78</b>
1.1. Reannotierung von HI1077.1 zu <i>pnuC</i> .....	79
1.2. Konstruktion einer HI1077.1 Deletionsmutante.....	81
1.3. Konstruktion eines <i>pnuC</i> -Komplementationsplasmids.....	81
<b>2. Charakterisierung von <i>pnuC</i> .....</b>	<b>83</b>
2.1. Phänotypische Charakterisierung der HI1077.1-Mutante und der <i>pnuC</i> -Komplementante .....	83
2.2. Phänotypische Charakterisierung der HI1077.1-Mutante und der <i>nadV</i> -Komplementante .....	87
2.3. Charakterisierung der HI1077.1-Mutante mit Hilfe des Transport-Assays .....	88
2.4. Charakterisierung der HI1077.1-Mutante durch <i>in vivo</i> Versuche .....	89
<b>3. Zelluläre Lokalisation und Topologie von PnuC .....</b>	<b>91</b>
3.1. Hydrophobizitäts-Diagramm .....	91
3.2. Konstruktion einer <i>pnuC</i> -Komplettdelation .....	92
3.3. Konstruktion von His-Tag-PnuC und Membranfraktionierung .....	93
3.4. Bestimmung von Transmembrandomänen.....	95
3.5. Topologie von PnuC .....	96
3.6. Strukturelle Funktion von PnuC .....	99
<b>4. Untersuchungen zur Substratspezifität von PnuC .....</b>	<b>101</b>
4.1. Kann <i>H. influenzae</i> PnuC NMN bzw. NR in <i>S. typhimurium</i> transportieren? .....	101
4.2. Kann <i>E. coli</i> PnuC in <i>H. influenzae</i> NMN bzw. NR transportieren?.....	103
4.3. Substratspezifität von <i>A. actinomycetemcomitans</i> und <i>P. multocida</i> PnuC .....	106
4.4. NMN-Aufnahme Suppressormutanten.....	109
4.5. Einführung von Punktmutanten mit Hilfe ortsgerichteter Mutagenese .....	111
<b>5. Expressionsstudien mit PnuC-His-Tag Protein .....</b>	<b>114</b>
<b>6. Weitere putative Gene, die an der <math>\text{NAD}^+</math>-Aufnahme und <math>\text{NAD}^+</math>-Umsatz beteiligt sein könnten .....</b>	<b>118</b>

6.1. ABC-Transporter .....	118
6.2. PnuD.....	120
<b>7. Aktivierung der NR-Aufnahme durch Na<sup>+</sup>-NQR-Aktivität ? .....</b>	<b>122</b>
7.1. Konstruktion einer Na <sup>+</sup> -NQR-Mutante .....	122
7.2. Transport-Assay.....	124
7.3. NQR-Charakterisierung .....	124
7.3.1. Wachstumsphänotyp .....	124
7.3.2. Wachstumskurve.....	126
7.3.3. NADH-Oxidase-Aktivität.....	127
<b>8. Aufnahme von NAD<sup>+</sup>-Analoge (Inhibitoren) über den NAD<sup>+</sup>-Aufnahmeweg.....</b>	<b>129</b>
8.1. Charakterisierung des Aufnahmeweges von 3-Aminopyridin-Derivaten.....	129
8.2. Isolierung von 3-AmPR-spontanresistenten <i>H. influenzae</i> Mutanten.....	132
8.3. HPLC-Analyse mit rekombinantem NadR-Protein und 3-AmPR.....	134
<b>VI. Diskussion.....</b>	<b>136</b>
1. Charakterisierung von HI1077.1 bzw. PnuC .....	136
2. Topologie von PnuC.....	139
3. Substratspezifität von PnuC <sup>Hi</sup> , PnuC <sup>Ec/St</sup> und PnuC <sup>Pm/Aa</sup> .....	142
4. Wo ist PnuC im TC Klassifikationssystem einzuordnen? .....	147
5. Die Wirkung und die Aufnahmeroute des Inhibitors 3-AAD.....	151
6. Ausblick.....	154
<b>VII. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>156</b>
<b>VIII. Anhang .....</b>	<b>168</b>
1. Abkürzungsverzeichnis.....	168
2. Abbildungen .....	172
3. Erklärungen .....	173
4. Publikationsliste .....	174
5. Lebenslauf .....	175

## I. Zusammenfassung

*Haemophilus influenzae* ist ein fakultativ anaerobes, Gram-negatives Bakterium aus der Familie der *Pasteurellaceae*. Während die bekapselten Arten invasive Erkrankungen, wie Meningitis, Zellulitis und septische Arthritis verursachen, sind die „nicht“-typisierbaren Unterarten (NTHi) für chronische Infektionen, Sinusitis, Otitis Media, Pneumonien und Bakteriämien verantwortlich. Das physiologische Merkmal von *H. influenzae* ist die essentielle, aber defiziente Hämin- und Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) Biosynthese. Während Hämin für aerobes Wachstum benötigt wird, ist  $\text{NAD}^+$  sowohl für aerobes, als auch für anaerobes Wachstum essentiell. Die meisten Mikroorganismen sind in der Lage  $\text{NAD}^+$  durch die *de novo* Synthese selbst zu synthetisieren und durch die Pyridin-Nukleotid-Zyklen (PNCs) ein effizientes „Recycling“ zu gewährleisten. Als  $\text{NAD}^+$ -abhängiger Organismus fehlen *H. influenzae* die meisten Enzyme für die  $\text{NAD}^+$ -Biosynthese. Daher kann dieses Bakterium nur eine begrenzte Anzahl an Vorläufermolekülen, wie  $\text{NAD}^+(\text{P})$ , Nikotinamid-Mono-Nukleotid (NMN) und Nikotinamid-Ribosid (NR) aus der Umwelt zur  $\text{NAD}^+$ -Synthese nutzen. Andere  $\text{NAD}^+$ -unabhängige *Pasteurellaceae*-Spezies, wie *Haemophilus ducreyi*, *Pasteurella multocida* und *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, können auch kein  $\text{NAD}^+$  aus der *de novo* Biosynthese bereitstellen, diese Arten können aber zusätzlich auf Nikotinamid (NA<sub>m</sub>) wachsen. Die Erforschung des  $\text{NAD}^+$ -Aufnahmesystems kann für die Entwicklung antimikrobieller Therapeutika von großem Interesse sein. Von unserer Arbeitsgruppe wurde die  $\text{NAD}^+$ -Aufnahmeroute aufgeklärt; so werden  $\text{NAD}^+(\text{P})$  und NMN von e(P4) und NadN zu NR degradiert, nachdem  $\text{NAD}^+$  und NMN durch OmpP2 in das Periplasma gelangt sind. NR wird schließlich, als einziges Substrat, durch einen putativen Transporter in das Zytoplasma aufgenommen. Kürzlich konnte auch geklärt werden, dass NR von NadR, welches sowohl eine Ribosyl-Nukleotid-Kinase (RNK) Aktivität, als auch eine Nikotinamid-Mononukleotid-Adenylyltransferase (NMNAT) Aktivität besitzt, wieder zu  $\text{NAD}^+$  resynthetisiert wird.

In dieser Arbeit wurde der putative NR-Transporter als das hypothetische Gen HI1077.1 im Genom von *H. influenzae* identifiziert, welches nur 13,8% Identität zu *Escherichia coli* *pnuC* und 43,6% Identität zu *P. multocida* *pnuC* aufwies. Es konnten zwei Sequenzierungsfehler im original-annotierten Genom von *H. influenzae* gefunden werden, die zu einer Leserasterverschiebung geführt haben. HI1077.1 wurde zu *pnuC<sup>Hi</sup>* reannotiert und weist nun eine 19,7% Identität zu *pnuC<sup>Ec</sup>* und 71,4% Identität zu *pnuC<sup>Pm</sup>* auf. Es wurde eine



HI1077.1 Mutante konstruiert, die ein Wachstumsdefizit auf BHI-Platten bis zu einer  $\text{NAD}^+$ -Konzentration von  $15 \mu\text{M}$  bzw. unterhalb einer NR-Konzentration von  $0,1 \mu\text{M}$  zeigte. Im Transport-Assay transportierte die HI1077.1 Mutante nur noch etwa 1% des eingesetzten  $\text{NAD}^+$ - bzw. NR-Labels. Im Rattenversuch konnte gezeigt werden, dass das *in vitro* nicht essentielle *pnuC in vivo* sehr wohl essentiell ist. Die HI1077.1 Mutante verursachte, im Gegensatz zum Wildtyp und zur *pnuC*-Komplementante keine Bakteriämie mehr. Bei einer Komplementation mit *NadV*, kodierend für eine Nikotinamid-Phosphoribosyltransferase von *H. ducreyi*, wurde ebenfalls eine mit dem Wildtyp vergleichende Bakteriämie verursacht. Da bisher noch keine *H. influenzae* Isolate bekannt sind, die *nadV* besitzen, würde sich der hier identifizierte NR-Transporter von *H. influenzae* gut als antimikrobielles Ziel eignen.

Die Protein-Topologie von PnuC wurde hinsichtlich der Membranlokalisierung analysiert und PnuC konnte als ein Transmembranprotein bestätigt werden, das in der cytosolischen Membran lokalisiert ist. Durch PhoA und LacZ Analysen konnte die Topologie von PnuC aufgeklärt werden. Demnach besitzt PnuC acht Transmembrandomänen (TMD), wobei die N'- und C'-Termini im Cytosol lokalisiert sind. Die Analyse der strukturellen Funktion ergab, dass PnuC nur eine Unterbrechung der sechs letzten C'-terminalen Aminosäuren (AS) toleriert, während die Proteinfunktion durch einen fusionierten C'- und N'-terminaler His-Tag nur mäßig beeinflusst wird.

Des Weiteren wurde die Substratspezifität von PnuC untersucht. Dabei zeigte sich, wie in dieser Arbeit erstmals charakterisiert, dass der lange geglaubte NMN-Transporter von *E. coli* ebenfalls als NR-Transporter fungiert. In einem Versuch, bei dem nach Spontanmutationen in *PnuC<sup>Hi</sup>* gesucht wurde, die eine geänderte Substratspezifität besitzen, wurden Revertanten isoliert, die trotz NMN-Dephosphorylierungsdefizienz auf NMN wachsen konnten, aber kein NMN-Transport zeigten. Die Substratspezifität wurde auch bei *A. actinomycetemcomitans* und *P. multocida* untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass *A. actinomycetemcomitans* und *P. multocida* ebenfalls als einziges Substrat NR transportieren können, aber im Gegensatz zu *H. influenzae*  $\text{NAD}^+$  und NMN nicht als NR-Quellen verwerten können, was wahrscheinlich auf das Fehlen von e(P4) und *NadN* zurückzuführen ist.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit das Gen HI0308 untersucht. HI0308 ist als hypothetisches, konserviertes Transmembranprotein im Genom von *H. influenzae* annotiert und besitzt 34% Identität zu dem Protein PnuD von *S. typhimurium* (genauer Name: *S.*

*enterica* serovar Typhimurium), welches als alternativer NR-Transporter bei diesen Bakterien fungiert. Eine HI0308 bzw. *pnuD*-Mutante zeigte allerdings keine signifikante Wachstumsdefizienz im Vergleich zum Ausgangsstamm.

Um dem Aspekt der Energetisierung des PnuC-Transporters näher zu kommen, sind die Gencluster HI1078-HI1080 und HI0164-HI0171 in die Untersuchung mit einbezogen worden. Das Gencluster HI1078-HI1080 kodiert für einen ABC-Transporter, der nur 125 bp stromaufwärts von *pnuC* zu finden ist, und ist als mögliche energieliefernde Komponente, bzw. als möglicher nieder-affiner NR-Transporter, in Betracht gezogen worden. Weiterhin wurde das Gencluster HI0164-HI0171, welches für eine  $\text{Na}^+$ -translozierende NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase ( $\text{Na}^+$ -NQR) kodiert und verantwortlich ist für die Generierung eines „sodium motive force“ (SMF), hinsichtlich einer möglichen Energetisierung des NR-Transportes untersucht. Für beide Gencluster wurden Knock-out-Mutationen konstruiert, die allerdings keinen Unterschied im Wachstum bzw.  $\text{NAD}^+$ -Transport im Vergleich zum Ausgangsstamm zeigten. Zusammenfassend aus diesen Analysen lässt sich PnuC zwischen dem  $\alpha$ -Kanal-Typ und den „Carrier“ vermittelten Transportern einordnen, welcher substratspezifisch ist, aber keine direkte Aktivierung bei dem Transport bewirkt.

Die  $\text{Na}^+$ -NQR-Oxidoreduktase wurde im Hinblick ihrer Dehydrogenase-Aktivität genauer charakterisiert. Eine  $\text{Na}^+$ -NQR-Deletionsmutante wies keine NADH-Oxidation mehr auf und es konnte gezeigt werden, dass die  $\text{Na}^+$ -NQR-Oxidoreduktase nicht spezifisch für  $\text{Na}^+$ -Ionen ist, sondern auch für andere positive Ionen, wie  $\text{Li}^+$  und  $\text{K}^+$ .

Die Suche nach möglichen Inhibitoren von PnuC führte zu 3-Aminopyridin-Analoga, die bereits früher als wachstumshemmend für *H. influenzae* beschrieben wurden, ohne den genauen Mechanismus zu kennen. Durch eine Mutantenanalyse konnte gezeigt werden, dass 3-AADP, 3-AAD und 3-AmPR der selben Aufnahmeroute folgen wie  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{NAD}^+$  und NR, und via PnuC in die Zelle aufgenommen werden. Darüber hinaus konnten wir nachweisen, dass NadR aus 3-AmPR und ATP das 3-AAD synthetisiert, welches als kompetitiver Inhibitor mit  $\text{NAD}^+$  in den zellulären Redoxreaktionen konkurriert und dadurch den Stoffwechsel hemmt. Des Weiteren wurden mehrere spontan 3-Aminopyridin-resistente *H. influenzae* Mutanten isoliert, dabei wurden keine Mutationen im *pnuC*-Gen gefunden, dafür aber war meist das *nadR*-Gen durch Mutation betroffen.

## I. Summary

*Haemophilus influenzae* is a facultativ anaerobic, Gram-negative bacterium of the family of *Pasteurellaceae*. The encapsulated strains cause invasive infections such as meningitis, cellulitis and septic arthritis, the non-typeable subspecies (NTHi) are responsible for chronic infections, such as sinusitis, otitis media, pneumonia and bacteremia. A physiological characteristic of *H. influenzae* is its essential but deficient hemin and NAD<sup>+</sup> biosynthesis. While hemin is required for aerobic growth, NAD<sup>+</sup> is essential for anaerobic and aerobic growth. Most microorganisms are able to synthesize NAD<sup>+</sup> by *de novo* synthesis or by scavenging those substrates by the pyridine-nucleotide-cycles (PNCs). As a NAD<sup>+</sup> dependent organism *H. influenzae* lacks the enzymes for NAD<sup>+</sup> biosynthesis and that is why it can only incorporate a limited number of precursor molecules, such as NAD<sup>+</sup>(P), NMN, and NR. Other NAD<sup>+</sup>-independent *Pasteurellaceae* such as *Haemophilus ducreyi*, *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* can grow on NAM, additionally to NR. Hence, the investigation of the NAD<sup>+</sup> uptake system harbors some potential to be utilized for the development of antimicrobial therapeutics. Our laboratory has clarified the NAD<sup>+</sup> uptake route; NAD<sup>+</sup>(P) and NMN are degraded by e(P4) and NadN to NR, after NAD<sup>+</sup> and NMN reached the periplasm through OmpP2. Finally, NR is taken up in the cytoplasm through a putative transporter. Recently, it was also resolved that NR is synthesized to NAD<sup>+</sup> from NadR which contains both a ribosyl nucleotide kinase (RNK) activity and a nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT) activity.

In this study, the putative NR transporter was identified as the hypothetical gene HI1077.1 in the genome of *H. influenzae*, which showed only 13,8% identity to the *pnuC* of *Escherichia coli* and 43,6% identity to the *pnuC* of *Pasteurella multocida*. Two sequencing errors were found within the *pnuC* encoding region in the original annotated genome of *H. influenzae*, which produced frame shifts. After sequence correction HI1077.1 was re-annotated to *pnuC<sup>Hi</sup>* now showing 19,7% identity to the *pnuC* of *E. coli*, and 71,4% identity to the *pnuC* of *P. multocida*. A knock-out mutation was constructed for HI1077.1, which showed a growth deficiency on BHI-plates, if supplemented with NAD<sup>+</sup> on concentrations below 15 µM, and NR concentrations below 0,1 µM. In transport assay the HI1077.1 mutant only transported 1% of the provided NAD<sup>+</sup> and NR label, respectively. In the rat model it could be shown that the *pnuC* knock-out mutation was essential. There in respect to bacterial growth in the animal model, the HI1077.1 mutant was not able to cause a bacteremia in

contrast to the wild type and the *pnuC*-complemented mutant. When the mutant was complemented with *nadV*, encoding a nicotinamide phosphoribosyltransferase of *H. ducreyi*, bacteremia was maintained that was comparable with the one produced by the wild type. Since, so far there are no *H. influenzae* isolates known, which carry the *nadV* gene, hence the NR transporter serves for essential gene function and could be further investigated as a potential antimicrobial target.

The topology of PnuC was also analysed. The localisation of PnuC was confirmed at the cytosolic membrane. The membrane topology of PnuC was resolved with the investigation of PhoA and LacZ insertion analysis. According to this, PnuC possesses eight transmembrane domains (TMD) with the N`- and C`-termini localized within the cytosole. The research of the structural function indicates that PnuC tolerates a truncation of the last six C`-terminal amino acids, while the function of the protein was only moderately affected by fusions of a C`- or N`-terminal His-Tags.

In addition, the substrate specificity of PnuC was investigated. Thereby, it was demonstrated that the NMN transporter in *E. coli* in fact acts as an NR transporter. A mutant screen was carried out to adopt spontaneous mutations, which would alter the substrate specificity of the transport. Revertants were isolated, which regained the ability to grow on, but did not transport NMN. The substrate specificity of *A. pleuropneumoniae* and *P. multocida* was also under examination. It was established that *A. pleuropneumoniae* and *P. multocida* can transport NR as the unique substrate. However,  $\text{NAD}^+$  and NMN could not serve as Substrats to deliver NR, raising the question, whether e(P4) or/and NadN function is present in these bacteria.

Additionally, in this study the gene HI0308 was investigated. HI0308 is annotated as hypothetical and conserved transmembrane protein and exhibits 34% identity to the protein PnuD of *S. typhimurium*, which functions as an alternative NR transporter in *S. typhimurium*. However, a HI0308 mutant did not show a significant growth deficiency compared to the wild type strain.

To approach the aspect of energizing the PnuC transporter and the residual low affinity NR uptake the gene cluster HI1078-HI1080 and HI0164-HI0171 were characterised. The gene cluster HI1078-HI1080 encodes an ABC-Transporter, which can be found only 125 bp

upstream from *pnuC* and was considered as a potential energizing component or a low affinity transporter for NR. The gene cluster HI0164-HI0171 encodes a Na<sup>+</sup>-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase (Na<sup>+</sup>-NQR), which is responsible for the generation of the sodium motive force (SMF) and it was considered as a potential energy delivering source. For both gene clusters knock-out-mutants were constructed, which however did not show any difference in growth or transport of NR in comparison to the wild type strain. In summary, for PnuC it can be placed between the  $\alpha$ -type channel and the carrier transporter, which is selective but not energy driven.

The Na<sup>+</sup>-NQR oxidoreductase was more precisely characterised with regard to the activity of the dehydrogenase. A Na<sup>+</sup>-NQR deletion mutant failed to exhibit NADH oxidation and it could be demonstrated that Na<sup>+</sup>-NQR oxidoreductase is not only specific for Na<sup>+</sup> ions but also for other positive ions, such as Li<sup>+</sup> und K<sup>+</sup>.

The search for putative inhibitors of PnuC yielded in the analysis of 3-aminopyridine analogs which were already classified as inhibitory for the growth of *H. influenzae*, without knowing the exact mechanism. In this work it was demonstrated, that 3-AADP, 3-AAD and 3-AmPR follow the same uptake route as NADP<sup>+</sup>, NAD<sup>+</sup> and NR, and are taken up via PnuC into the cell. Furthermore, we were able to show that 3-AAD can be synthesized from 3-AmPR and ATP. 3-AAD most likely competes versus NAD<sup>+</sup> in metabolic relevant redox reactions and thereby inhibits the biosynthesis rate of the cells. In addition, several 3-aminopyridin resistant *H. influenzae* mutants were isolated, and most of the mutations again clustered in the *nadR* gene but non in the *pnuC* gene.

## II. Einleitung

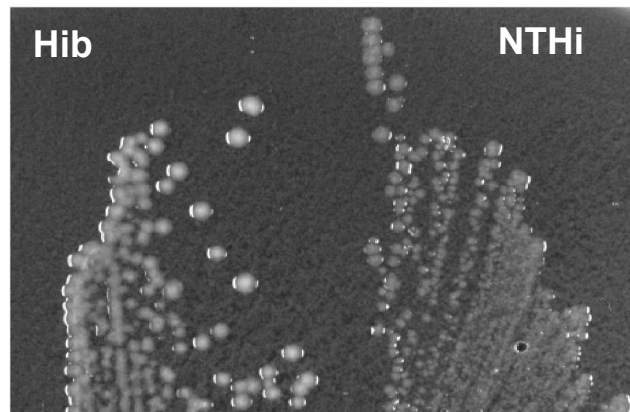
### 1. *Haemophilus influenzae* allgemein

#### 1.1. Historischer Rückblick

*H. influenzae* wurde erstmals 1892 von Richard Friedrich Johannes Pfeiffer während seines Aufenthalts am Robert Koch Institut beschrieben. Er fand das Bakterium im Sputum und im Respirationstrakt von Patienten, die an der Influenza erkrankt waren und glaubte, das „Influenza-Bacillus“, wie er es anfänglich nannte, sei für die Influenza-Epidemie verantwortlich. In den folgenden Jahren folgte eine Widerlegung nach der Anderen; so wurde das Bakterium auch in 30% des Sputums von Tuberkulosepatienten und in allen Fällen von Keuchhusten, in vielen Fällen von Masern, chronischer Bronchitis und Scharlach gefunden. Auch während der schweren spanischen Grippe 1918/19 konnte der richtige Erreger der Influenza nicht gefunden werden. Auch diesmal wurde das „Influenza-Bacillus“ nur in 60% der Lungen von verstorbenen Patienten gefunden; daher wurde geschlussfolgert, dass es sich beim „Pfeiffer-Bacillus“, wie es auch genannt wurde, nicht um den Auslöser der Influenza handeln konnte. *H. influenzae* wurde erstmals 1890 von Pfull aus dem Hirngewebe von Kindern isoliert, die an Meningitis verstorben waren. Die erste erfolgreiche Kultur von *H. influenzae* aus einem eitrigen Spinalkanal wurde von Slawyk 1898 durch eine Lumbalpunktion angelegt. Den Namen hat *Haemophilus* (gr.n. haima, Blut; gr.n. philos, Liebhaber) von Winslow et al., aufgrund der Bedürftigkeit nach Wachstumsfaktoren, bekommen, die in Blutbestandteilen enthalten sind (266). Erst 1933 konnten Smith et al. beweisen, dass es sich beim Erreger der Influenza um einen Virus handelte, und dass es sich bei *H. influenzae* um eine Sekundärinfektion handelte. In der Zwischenzeit konnte Margaret Pittman zeigen, dass *H. influenzae* in bekapselter und mehreren unbekapselten Formen isoliert werden kann, und dass fast alle Isolate, die aus cerebrospinaler Flüssigkeit oder dem Blut entnommen werden, dem *H. influenzae* Typ b-Stamm zuzuordnen waren (182).

## 1.2. Taxonomie und Morphologie

*H. influenzae* ist ein Gram-negatives, fakultativ anaerobes Bakterium und wird zu den Gamma-Proteobakterien, und hier in die Familie der *Pasteurellaceae* eingeordnet. Als Kokkobacillus wird *Haemophilus* phylogenetisch zwischen den Genusfamilien *Vibrionaceae* und *Pseudomonadaceae* eingeordnet. Bei *H. influenzae* handelt es sich um ein kleines (Länge: 1,0–1,5 µm, Breite: 0,3 µm), nicht-motiles und sporenloses Stäbchenbakterium. Neben den bekapselten Arten, die durch sechs Kapseltypen (a-f) unterschieden werden (182), kommen unbekapselte bzw. nicht-typisierbare Unterarten (NTHi) vor. Während die bekapselten Arten große, kreisrunde und mykoide Kolonien bilden, sind die Kolonien der unbekapselten Arten kleiner, glasig transparent und scharfrandig (Abb. 1).



**Abb. 1** *H. influenzae* auf einer Blut-Agar-Platte. Links: der bekapselt *H. influenzae* Typ b (Hib); rechts: ein nicht typisierbarer *H. influenzae* (NTHi)-Stamm.

*H. influenzae* wird auf der Basis von biochemischen Tests (Urease-Produktion, Indol- und Ornithin-Decarboxylase-Reaktion) in die Biotypen I–VIII eingeordnet (129). Dieses Klassifikations-System ist von begrenztem Nutzen für die epidemiologischen Studien, da die meisten klinischen Isolate in die drei Biotypen I, II und III unterteilt werden. Mehr als 90% der Typ b Isolate gehören dem Biotyp I an und die meisten Isolate aus dem Nasopharynx von gesunden Personen gehören dem Biotyp II und III an (207).

Die Populationsgenetik und evolutionäre Verwandtschaft der unterschiedlichen Arten wurde unter anderem mit Hilfe von exakten Methoden wie elektrophoretischem „profiling“ von RFLP der IgA1-Proteasene (27), der Gene für die Kapselsynthese (7, 160) und Multilocus-Enzym-Elektrophorese (164, 165, 167) untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass

das ursprüngliche *H. influenzae*-Bakterium nicht bekapselt war und sich in zwei Linien aufteilte. Aufgrund von Untersuchungen der *cap*-Gene, die für die Produktion des Kapsel-Polysaccharids kodieren, wurden die bekapselten Stämme als klonal eingestuft (166) und in zwei Hauptgruppen I und II aufgeteilt. Da die zwei Gruppen überlappen, werden zur Hauptgruppe I die Serotypen a, b, c, d und e eingeordnet, während zur Hauptgruppe II die Serotypen a, b und f gezählt werden. Unter den bekapselten Stämmen stellt Serotyp c die älteste Form dar. Während die Kapseltypen a und b eine starke Ähnlichkeit in ihrer Kapselstruktur aufweisen, scheint Serotyp d sich erst kürzlich aus Serotyp b entwickelt zu haben (167). Die nicht-typisierbaren *H. influenzae*-Stämme (NTHi) scheinen eher eine separate und diverse Population darzustellen und scheinen sich nicht von den bekapselten Stämmen, z. B. durch den Verlust oder Inaktivierung der Gene für die Kapselbiosynthese abzuleiten (155, 164, 185). Die NTHi-Stämme weisen eine starke Heterogenität auf. So wurden z.B. in einer Studie von 135 Isolaten 88 verschiedene Genotypen identifiziert (185). Die Heterogenität ist möglicherweise auf eine höhere Rekombinationsrate und Transformationsfähigkeit zurückzuführen (155).

Innerhalb der Taxonomie und Diagnose von *Haemophilus* spielt die Bedürftigkeit für den Faktor-X und Faktor-V eine wesentliche Rolle (58). Der Faktor-X steht für Hämin, welches für aerobes Wachstum benötigt wird; dabei dient Hämin als Quelle für Eisen und Porphyrin. Protoporphyrin kann als Ersatz für Hämin dienen, wenn zusätzlich eine Eisenquelle vorhanden ist (259). Der Faktor-V steht für NAD<sup>+</sup>(P) (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat)) und ist essentiell für aerobes und anaerobes Wachstum.

### 1.3. Molekulare und genetische Grundlagen zu *H. influenzae*

*H. influenzae* war der erste Organismus, dessen komplettes Genom sequenziert wurde (64). Das Genom von *H. influenzae* umfasst 1,83 Megabasen und 1700 offene Leseraster. Dabei wurde nicht nur festgestellt, dass z. B. die Gene für die Hämin- und NAD<sup>+</sup>-Biosynthese fehlen, sondern auch viele andere Gene, darunter Genfunktionen, die für Enzyme des Tricarbonsäurecyclus kodieren, namentlich die Citrat-Synthase, Isositrat-Dehydrogenase, Aconitase und Succinat-Dehydrogenase (64). Ebenso nicht vorhanden ist z. B. das Enzym Glukokinase und weitere wichtige Genprodukte, die z. B. bei freilebenden Bakterien in der Umwelt in deren zentralen Metabolismus angetroffen werden. So berichten



Tatusov et al. allgemein über eine 2.5fache Reduktion der Gene von *H. influenzae* im Vergleich zu *E. coli* (240).

Eine weitere typische Eigenschaft von *H. influenzae* ist die hohe Effizienz der Transformierbarkeit aufgrund der natürlichen Kompetenz. *H. influenzae* präferiert die DNS-Aufnahme seiner eigenen, oder nah verwandten Art, indem es eine 9-Basenpaar-Sequenz (5'-AAGTGCGGT-3') erkennt. Diese Erkennungsstellen (USS) kommen ca. 1465 mal auf dem Chromosom verteilt vor (223).

Die Zellhülle von *H. influenzae* besteht aus der inneren Membran (Zytoplasmamembran), dem Periplasma mit Murein, welches mit der äußeren Membran durch Lipoproteine verankert ist, und so zusammen mit den eingelagerten Lipopolysacchariden (LPS) die äußere Zellhülle bildet. Das LPS von *H. influenzae* enthält kürzere Lipooligosaccharid- (LOS) Seitenketten, als die vergleichsweise längeren Polysaccharid-Seitenketten der *Enterobacteriaceae* (65). Das LOS ist ein komplexes Glykolipid, welches mit einem Lipid A Anteil an der Membran verankert ist. Diese Membran ist wiederum mit einem einzigen 2-Keto-3-Deoxyoctulon-Säurerest (Kdo) mit dem heterogenen Oligosaccharid verknüpft, das sich aus neutralen Heptosen und Hexosen zusammensetzt (275). Die LOS-Kernregion besteht aus einem konservierten Trisaccharid-Innenkern, an den Heptosen können weitere Kettenverlängerungen angehängt werden. Die strukturelle Heterogenität von *H. influenzae* LOS wird durch weitere Substituenten, wie freie Phosphatgruppen, Phosphoethanolamin, Pyrophosphoethanolamine, Phosphocholine, Glycin und O-Acetyl-Gruppen bestimmt. Einige dieser Oberflächenepitope führen zu der strukturellen Variabilität und unterziehen sich einer LPS-Phasenvariation (201).

Für die äußere Membran sind die Außenmembranproteine (OMP) charakteristisch. SDS-PAGE Studien haben gezeigt, dass die äußere Membran von *H. influenzae* bis zu 36 Proteine enthält, von denen sechs P1 bis P6 den Hauptproteingehalt darstellen (144). Das Molekulargewicht von P1 bis P6, die auch mit absteigendem Molekulargewicht mit a-f bezeichnet werden, beträgt zwischen 15 und 50 kDa (163). Das Außenmembranprotein P1 (oder a) hat ein Molekulargewicht von 35 kDa bei Raumtemperatur und 46-50 kDa bei 100°C. Es macht 10% des gesamten Außenmembranproteingehaltes aus. Aufgrund seiner Hitze-Variabilität wird es als Subtyping unter den Typ b Stämmen verwendet. Des Weiteren besitzt es acht Epitope, die konservierte Bereiche zwischen den Typ b und den nicht

typisierbaren Stämmen aufweisen (38). Das OmpP2 (oder Protein b/c), ein Hauptprotein der Außenmembran, variiert zwischen 36 und 42 kDa. P2 besitzt 16 relativ konservierte Transmembrandomänen (TMD) und acht heterogene oberflächenexponierte Loops. Das immunogene Protein bildet als Trimer eine Pore, durch die spezifische Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 1400 Da durchgelassen werden (251). So konnte eine Substratspezifität für  $\text{NAD}^+$  und Nikotinamid-Mononukleotid (NMN) nachgewiesen werden, jedoch nicht für NR und andere Purine oder Pyrimidin-Nukleotide oder Nukleoside (8). Das OmpP4 (oder Protein e) ist ein 28 bis 30 kDa Lipoprotein und fungiert als saure Phosphomonoesterase, welches NMN zu NR und  $\text{NADP}^+$ , zu  $\text{NAD}^+$  spaltet (195, 197). Das hitzomodifizierbare OmpP5 (oder Protein d) ist 27 kDa groß und wirkt als Fimbrien-Adhesin Rezeptor, welches an die Epithelien des Respirationstraktes bindet (193). Im N-terminalen Bereich des Proteins befinden sich vier oberflächenexponierte Regionen, wovon jede eine hohe Sequenz-Diversität zeigt. Über die Struktur von OmpP5 gibt es kontroverse Studien; Sirakova et al. berichten über eine Fimbrienstruktur, die aus zusammengesetzten „coiled coils“ besteht und Munson et al. vergleichen die P5 Struktur mit der OmpA-Struktur von *E. coli*, welche eine acht strängige  $\beta$ -„Barrel“ Form aufweist (162, 219). Kürzlich wurde gezeigt, dass OmpP5 bei bekapselten und NTHi Stämmen als Rezeptor mit der humanen Oberflächenprotein Klasse CEACAM1 interagiert (109). Das Omp P6 (oder PAL-Protein oder Protein g) ist ein 16 kDa Lipoprotein. Das Protein ist hoch konserviert, oberflächenexponiert und immunogen.

Weitere wichtige hochmolekulare Proteine sind die Hauptadhäsine HMW1 und HMW2 („high molecular weight“) der NTHi-Stämme für Epithelzellen, Mononuklearzellen und der extrazellulären Matrix (17). Es konnte eine Ähnlichkeit mit dem Filament-Hemagglutinin von *Bordetella pertussis* festgestellt werden. HMW1 (125 kDa) und HMW2 (120 kDa) weisen eine 71% Identität und 80% Ähnlichkeit mit den NTHi-Stämmen auf (18). Neuere Untersuchungen zeigen, dass *hmw1* und *hmw2* bei 56% der NTHi-Stämme jedoch gar nicht bei den bekapselten Stämmen vorkommen (56). In diesem Zusammenhang ist das hochmolekulare Adhäsine Hia nennenswert, das von dem Gen *hia* kodiert wird und die Anhaftung an Epithelzellen vermittelt. *hia* kommt bei 33% der NTHi-Stämme und bei einigen Typ a, e und f Stämmen vor und ist bei dem Typ b Stamm nicht nachweisbar. Hia ist ein Autotransporter, der 72% Identität mit dem Hsf-Adhäsine aufweist, welches vom Typ b exprimiert wird (230). Das Hsf Protein bildet faserähnliche Strukturen auf der bakteriellen

Oberfläche. Seine molekulare Masse beträgt 245 kDa und der *hsf* Locus ist bei allen bekapselten Stämmen vorhanden (230).

Weitere nennenswerte Proteine sind: Omp26, dieses 26 kDa Protein hat sich als ein dominantes Antigen herausgestellt (57, 198). Der Hap-Autotransporter ist ein Adhäsion, welches die Adhärenz an Epithelzellen fördert und bakterielle Aggregation vermittelt (231). Eine Immunisierung mit rekombinantem Protein, bestehend aus der C-terminalen zellbindenden Domäne des Proteins, reduzierte die Bindung an Epithelzellen (142). Das OapA Protein ist ein oberflächenassoziiertes Lipoprotein, das für den transparenten Kolonietyp verantwortlich ist und in Zusammenhang mit der Kolonisierung im Nasopharynx gebracht wurde (188). Protein D ist ein Lipoprotein mit Glycerol-3-Phosphodiester-Phosphodiesterase Aktivität. NTHi-Stämme, die das Protein D exprimieren, adhären vierfach stärker an humanen Monozyten, als NTHi-Stämme, die das Protein D nicht mehr exprimieren können (3). Die Transferrin-Bindeproteine (Tbp) sind Oberflächenrezeptoren, die mit dem menschlichen Eisenbindeprotein Transferrin interagieren können (158). Das HxuA Protein ist sowohl auf der bakteriellen Oberfläche, als auch im Kulturüberstand vorzufinden. HxuA ist ein Häm:Hämopexin Bindeprotein, welches Häm als Nährstoffquelle bereitstellt (41).

Die Kapsel der bekapselten Stämme a–f wird durch den Locus *cap* kodiert, von denen bis zu 5 an der Zahl im Genom vorhanden sein können. Der *cap*-Locus aller Serotypen besteht aus drei Regionen I, II und III. Die Regionen I und III sind allen Serotypen gemeinsam und sind für die Prozessierung und den Export des Kapselmateriale verantwortlich. Die Region I-Gene (*bexDCBA*) kodieren für den ATP-getriebenen Kapsel-Transport (135), die Region II besitzt Serotyp spezifische Biosynthesegene (213), die Region III Gene scheinen bei der Kapsel-Postpolymerisation eine Rolle zu spielen (74). Die Kapsel des Typ a Stammes besteht aus Polyglucose-Ribitol-Phosphat, die des Typ b aus Polyribosyl-Ribitol-Phosphat (PRP). Während die Grundeinheit der Kapsel bei den Typen c und f aus 2-Acetamido-2-Desoxyhexose besteht, verwenden die Typen d und e 2-Acetamid-2-Desoxy-D-Mannose als Grundeinheit (13).

### 1.4. Epidemiologie

Das einzige, bisher bekannte Bioreservoir für *H. influenzae* ist der Mensch. Die Übertragung erfolgt durch Tröpfchen oder direkten Körperkontakt mit Trägern. Dabei ist *H. influenzae* ein kommensales Bakterium, welches bei 80% der Bevölkerung zu finden ist. Von den isolierten Stämmen wurden 5% als bekapselte Stämme (meistens Typ b) und der Rest als NTHi-Stämme identifiziert (24). Hauptträger von *H. influenzae* sind Kinder bis zu 5 Jahren, wobei die erste Besiedlung bereits im ersten Lebensmonat stattfindet. Die Kolonisierung von *H. influenzae* ist ein dynamischer Prozess. Eine Studie, die in einer Kindertagesstätte durchgeführt wurde, zeigte, dass die Kinder einen Stamm erwerben, eine Zeit lang behalten und diesen wieder verlieren und nach einer Weile wieder mit einem neuen Stamm kolonisiert werden (244). Die meisten Träger von *H. influenzae* sind asymptomatisch, jedoch kommt es gelegentlich zu zwei unterschiedlichen Erkrankungsformen, je nachdem, ob sie von den bekapselten oder den NTHi-Stämmen verursacht werden. Die bekapselten Stämme verursachen invasive Erkrankungen, wie Meningitis, Epiglottitis, Zellulitis, septische Arthritis und Pneumonien (161). Die unbekapselten Arten dagegen sind für Otitis Media, Sinusitis, Konjunktivitis, Bronchitis und Pneumonien verantwortlich (191, 246).

Vor der Einführung der Hib-Prophylaxe 1985-1990 erkrankten in den USA 0,05%-0,06% der 0-4 jährigen Kinder an Meningitis, verursacht durch Hib (29), während es in Europa 0,023% waren (177). Mit 0,53% waren bei der Inuit Population in Kanada die meisten Fälle von Meningitis nachzuweisen. Weltweit wurden ca. 357.000 Fälle an Meningitiserkrankungen pro Jahr gezählt, wovon rund 101.300 zum Tode geführt haben. Des Weiteren konnten ca. 300.000 Todesfälle durch Pneumonien gezählt werden, die durch Hib bei 0-4 jährigen verursacht wurden (178). Andererseits wird der untere Respirationstrakt sehr leicht durch NTHi-Stämme besiedelt; so zeigte eine Studie in Papua-Neuguinea, dass 80% der aus der Lunge isolierten Stämme zu den NTHi gehörten (81). Die NTHi-Stämme sind auch die häufigsten Verursacher von chronischer Mittelohrentzündung. Der wirtschaftliche Faktor, der durch die NTHi-Erkrankungen verursacht wird, ist nicht zu vernachlässigen; so werden 1 Milliarde Dollar pro Jahr allein in den USA ausgegeben (234).

### 1.5. Pathogenität und Virulenz

*H. influenzae* besiedelt den Nasopharynx und breitet sich von dort in höher und tiefer gelegene Regionen des respiratorischen Traktes aus. Danach erfolgt die Kolonisierung entsprechender Epithelzellen (Abb. 2). Um die Mukosaoberfläche zu besiedeln, muss *H. influenzae* bestimmten lokalen Immunmechanismen widerstehen. Eine Strategie besteht in der Sekretion bakterieller Faktoren, welche die ziliäre Dissorientierung, „Ciliostasis“ und Verlust der Zilien zur Folge haben (192, 262). Ein Faktor stellt das Lipid A des LOS von *H. influenzae* dar (120). Das LOS beträgt ungefähr 4% des Trockengewichtes von *H. influenzae*. Die Adhäsion durch LOS wird durch die Phasenvariation verstärkt (258). An der „Ciliostasis“ scheint das Protein D durch eine bisher unbekannte Weise beteiligt zu sein. Das Hauptimmunoglobulin, das von dem Gewebe der Mukosa produziert wird, ist das IgA, wobei IgA1 den Hauptanteil (mehr als 90%) ausmacht. Die IgA1-Protease spielt eine wichtige Rolle bei der Wirtsverteidigung, indem sie der protektiven Wirkung von IgA1 entgegen steht. Dabei kann *H. influenzae* mit Hilfe der IgA1-Protease (extrazelluläre Endopeptidase) die Antigen-Bindedomäne (Fab) von dem Fc-Anteil des Moleküls spalten und so die agglutinierende Wirkung von IgA1-Antikörper zerstören (183). Bei *H. influenzae* sind drei verschiedene IgA1-Protease Typen bekannt, die an unterschiedlichen Stellen in der „hinge“ Region den Antikörper schneiden (130). Die Expression dieses Proteins scheint jedoch nicht essentiell für die Virulenz zu sein, zumal immer wieder einzelnen *H. influenzae* Isolaten die IgA1-Protease Aktivität fehlt.

Nach der anfänglichen Interaktion mit dem Respirationstrakt folgt die direkte Adhäsion an den Epithelzellen (Abb. 2). Dabei haben Untersuchungen gezeigt, dass *H. influenzae* vorzugsweise an Gewebe ohne Zilien oder an verletztem Gewebe adhärirt (59, 192). Die Adhärenz wird unter anderem durch die hemagglutinierenden Pili vermittelt, die peritrichial sind und eine Länge von 450 nm erreichen. Die Pili werden von dem *hif*-Gencluster kodiert, das aus *hifA* bis *hifE* besteht. Dabei kodiert *hifA* für die Hauptstruktur-Untereinheit, *hifB* kodiert für ein Chaperon, das für den Zusammenhalt der einzelnen Untereinheiten und die stabile Konformation sorgt (233). *hifC* liegt an der äußeren Membran und ist für die Translokation der Untereinheiten über die äußere Membran verantwortlich. *hifD* und *hifE* bilden die Spitze des Pilus (153). Sie zeigen eine hohe Bindungsaffinität an oropharyngealen Epithelzellen und menschlichen Erythrozyten (90, 181). Weitere nicht-Pilus Adhäsine sind HMW1 und HMW2 (von Barenkamp und Bodor (17)), diese Proteine binden an

menschlichen Oberflächenstrukturen, die Heparan-Sulfat ähnliche Glycoproteine enthalten (171, 228). Dabei bindet HMW1 bevorzugt an oropharyngale Zellen, während HMW2 eine Präferenz für die Zellen des Genitaltraktes aufweist (45, 232). HMW1 und HMW2 werden von einem separaten Locus kodiert, wovon jeder aus drei Genen *hmwA-C* besteht. HMW1 und HMW2 defiziente Stämme (25% der NTHi-Stämme) besitzen ein weiteres Adhäsins Hia, das an Epithelzellen adhärert (19) und eine große Ähnlichkeit mit einem anderen Adhäsins (Hsf) besitzt. Während Hsf mit der Expression von kurzen und dünnen Oberflächenfibrillen assoziiert ist, kann Hia nicht im Elektronenmikroskop visualisiert werden, was vielleicht an der unterschiedlichen Größe liegt, denn Hsf ist mit 250 kDa doppelt so groß, wie Hia mit 115 kDa. Die durch Hia vermittelte Adhärenz ist unabhängig von anderen Genprodukten, so dass man annimmt, dass Hia zu der Familie der autotransportierenden IgA1-Protease Proteinfamilie gehört (121). Da die meisten Stämme, die das *hia*-Gen besitzen, auch das Pilus Gencluster haben, vermutet man, dass die *hia/hsf*- und *hif*-Gene sich co-entwickelt haben (191).

Mutanten, die weder HMW1, HMW2, noch Hia exprimieren, behalten ihre Adhärenzfähigkeit mit Hilfe eines zusätzlichen Adhäsins Hap, das 55% Ähnlichkeit mit der IgA1-Protease aufweist. Hap ist jedoch nicht in der Lage IgA1 zu schneiden und vermittelt nicht nur Adhärenz, sondern ist in der Lage bakterielle Aggregation und Mikrokolonie-Formation auf der Epitheloberfläche zu fördern (101). Durch die Aggregation und die Mikrokolonien wird *H. influenzae* resistent gegenüber bakteriostatischen Komponenten, wie Laktoferrin, Lysozym und Peroxidasen.

Nachdem *H. influenzae* erfolgreich an der mukosalen Oberfläche adhärert hat, muss es, um persistieren zu können, in der Lage sein, an Nährstoffe heranzukommen, wie z.B. Eisen oder Häm und muss der spezifischen und nicht-spezifischen Immunantwort des Menschen entkommen. Das meiste intrazelluläre Eisen ist beim Menschen an Ferritin gebunden, oder liegt in Häm assoziierten Proteinen vor, während das extrazelluläre Eisen vorwiegend an Transferrin und Laktoferrin gebunden ist. *H. influenzae* besitzt Transferrin-Bindeproteine, Tbp1 und Tbp2, die unter der Kontrolle des Eisen-Aufnahme-Regulatorprotein (Fur, „ferric uptake regulator“) stehen. Allerdings scheint noch nicht klar zu sein, ob Tbp1 und Tbp2 durch Häm oder freies Eisen reguliert werden (95, 157). Tbp1 ist 95 kDa groß und ein integrales Außenmembranprotein, während Tbp2 je nach Stamm in der Größe zwischen 68 und 85 kDa variiert und an der AM (Außenmembran) verankert ist (82). Nachdem das Eisen

von Tbp1 gebunden und im periplasmatischen Raum freigelassen wird, wird es von FbpA, einem hoch-affinem Bindeprotein im Periplasma gebunden und an HitB, eine cytoplasmatische Permease weitergegeben, die das Eisen aus dem Periplasma in das Cytosol befördert (2, 210). *H. influenzae* fehlen die meisten Gene für die Hämin-Biosynthese, daher ist es auf verschiedene Häm-Aufnahmesysteme angewiesen. Im menschlichen Körper wird Häm und Hämoglobin durch Hemopexin und Haptoglobin gespeichert. *H. influenzae* hat bestimmte Mechanismen entwickelt, um sich Häm anzueignen. Einen Häm- bzw. Häm:Hämopexin-bindenden Komplex stellen die Proteine HxuA, HxuB und HxuC dar. HxuA ist ein 100 kDa Protein und wird in das Medium sezerniert, wo es Häm-Hämopexin binden kann. HxuB ist ein 60 kDa Protein und ist an der Sezernierung von HxuA beteiligt. HxuC (78 kDa) scheint an dem Transport von Häm in die Zelle beteiligt zu sein (42, 94). Für die Bindung des am Hämoglobin assoziierten Häm besitzt *H. influenzae* ein 120 kDa Protein, das von dem Gen *hgpA* kodiert wird und nur bei Häm limitierten Bedingungen exprimiert wird. Das Protein bindet sowohl Hämoglobin:Haptoglobin, als auch freies Hämoglobin (119). Ein weiteres Hämoglobin:Haptoglobin-bindendes Protein ist das HhuA mit 115 kDa (146).

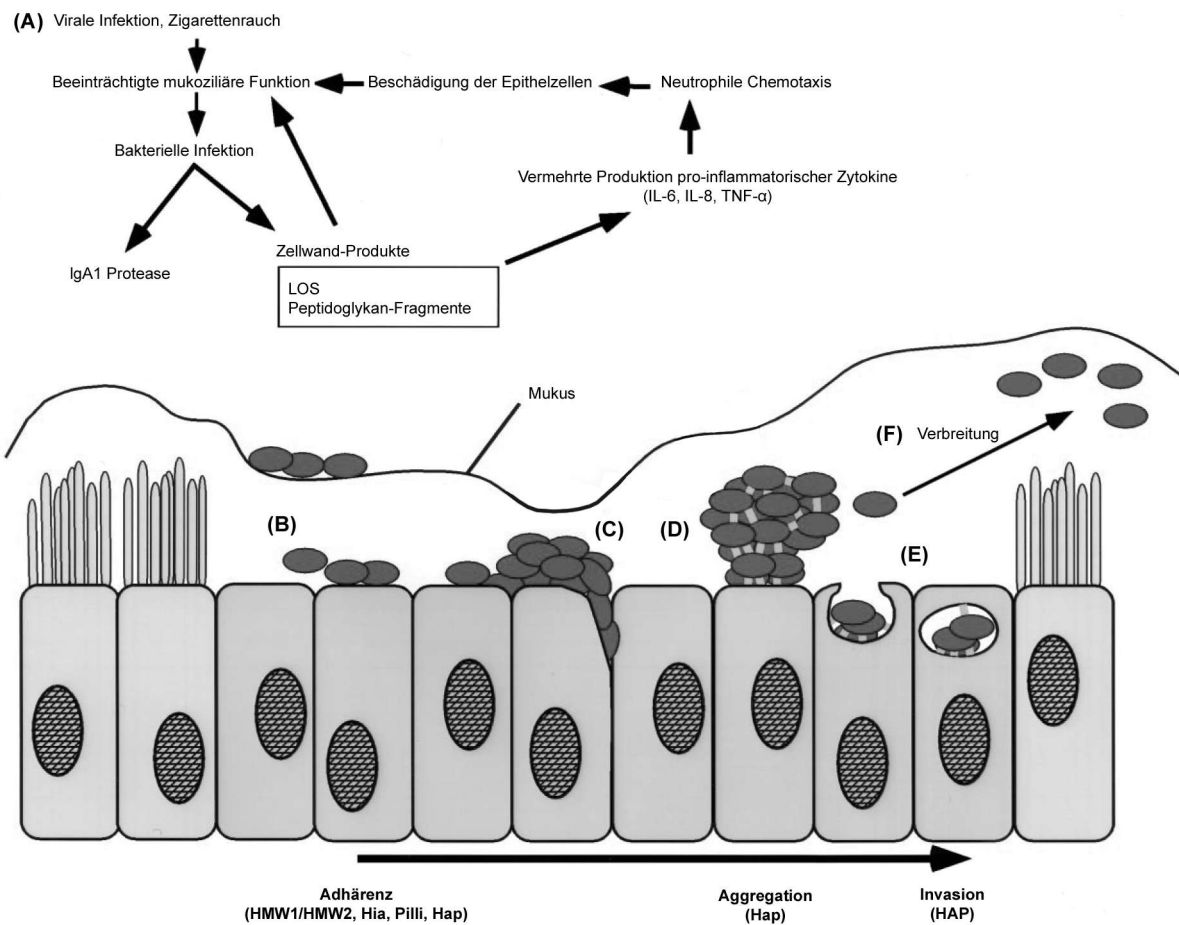
Um unter variierenden Bedingungen persistieren zu können, bedient sich *H. influenzae* der Phasen- und Antigen-Variation; diese sind durch Verlust bzw. Aneignung von definierten Oberflächenstrukturen charakterisiert. Die Phasenvarianz beruht auf der Variation von tandemartigen Repeats innerhalb der 5'-Region eines Gens, die durch „slipped-strand mispairing“ verursacht wird. Die Veränderung der Anzahl der tandemartigen repeats führt letztendlich zu Leserasterverschiebungen, die zu einem veränderten Protein führen, bzw. dazu führen, dass ein Protein gar nicht abgelesen wird. Dabei sind folgende Oberflächenstrukturen von der Phasenvariation betroffen: LOS, Pili, HMW1, HMW2 und Häm-Rezeptoren. Im Gegensatz zu der Phasenvariation ist die Antigenvariation oder „antigenic drift“, dessen molekularer Mechanismus noch unklar ist, ein irreversibler Prozess, bei dem Aminosäuren in immunodominanten Regionen ausgetauscht werden. So sind sowohl die Omp P2 und P5, als auch IgA1 Protease und HifA und HifE Pilus-Untereinheiten davon betroffen (229).

Die intrazelluläre Vermehrung, also die Invasion von Epithelzellen und Epithelzwischenräumen, stellt einen weiteren Mechanismus von *H. influenzae* dar, dem Immunsystem des Wirtes zu entkommen. Es sind drei verschiedene Mechanismen der Invasion bekannt, wovon einer der Makropinocytose ähnelt. Die Invasion beginnt mit der

---

„Extension“ der Wirtszell-Mikrovilli und der Formation von Lamellipodien. Diese umschließen die adhärierenden Bakterien und bilden membrangebundene Vakuolen (128). Die meisten *H. influenzae* Stämme verwenden für die Invasion einen Makropinocytose-unabhängigen Mechanismus, der durch PAF-Rezeptor (platelet-activating factor) vermittelt wird. Obwohl der genaue Mechanismus noch unbekannt ist, scheint die PAF-Rezeptor vermittelte Invasion durch Aktivierung eines Pertussis-Toxin sensitiven heterotrimeren G-Proteinkomplexes, als auch durch einen gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel (238, 239) bewirkt zu werden. Am dritten Mechanismus scheint  $\beta$ -Glukan beteiligt zu sein (4), jedoch ist dieser Mechanismus kaum untersucht.





**Abb. 2** Pathogenese von *H. influenzae*. (A) Nach Eintritt in den Nasopharynx treffen die Bakterien auf das Flimmerepithel. Virale Infektionen und Zigarettenrauch beeinträchtigen das Flimmerepithel und erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer bakteriellen Kolonisation. Bakterielle Exoprodukte, wie das LOS und Zellwandfragmente schädigen das Flimmerepithel direkt und stimulieren pro-inflammatorische Zytokine, die ebenfalls die mukoziliäre Funktion stören. Die IgA1-Protease inaktiviert das sekretierte IgA1 und erleichtert den Bakterien den Zugang an der Mukosaoberfläche. (B) Die Organismen adhären an den beschädigten Epithelzellen via HMW1 und HMW2 oder Pili und Hia. (C+D) Hap fördert ebenfalls die Adhärenz an die Epithelzellen und vermittelt interbakterielle Interaktion, die zu einer bakteriellen Aggregation und Mikrokolonie-Formation führt, die wiederum die Persistenz erleichtert. (E) Schließlich begünstigen Hap und andere Faktoren (siehe Text) die Invasion der Epithelzellen. (F) Letztlich kommt es zu einer durch Hap bewirkten Autoproteolyse, die zu einer Verbreitung und Zerstreung der Organismen innerhalb des Respirationstraktes führt (191).

### 1.6. Therapeutika bzw. Vakzine gegen *H. influenzae*

Die häufigsten Antibiotika, die gegen *H. influenzae* verschrieben werden, sind Makrolide und  $\beta$ -Laktame. Bei vielen klinischen Isolaten wurde jedoch der Efflux aufgrund der Efflux-Pumpe AcrAB von Erythromycin, Azithromycin, Clarithromycin und Ketoliden beobachtet (123). Der häufigste Resistenzmechanismus gegenüber Aminopenicillinen beruht auf der Expression von TEM-1 und ROB-1  $\beta$ -Lactamasen (54, 99). So konnte eine Studie von Campos et. al. zeigen, dass eines von vier *H. influenzae* Isolaten Ampicillin-resistent war und alle Ampicillin-resistenten  $\beta$ -Lactamase produzierten. Ebenso wurde eine gesteigerte Resistenz gegenüber Tetrazyclin, Chloramphenicol und Trimethoprim-sulfamethoxazol beobachtet (34).

Für die aktive Immunisierung sind mittlerweile vier verschiedene Konjugat-Vakzine gegen Hib in Gebrauch. Seit der Einführung der Hib-Prophylaxe in den 80er Jahren sind die durch Hib bedingten Meningitisfälle kaum erfassbar. Für die Entwicklung der Impfstoffe war das Kapselmateriale von *H. influenzae* Typ b sehr hilfreich, denn die Kapselstruktur weist in den verschiedenen Hib-Stämmen keine Varianz auf und die Antikörper wirken gegen das Polysaccharid der Hib-Kapsel, Polyribosyl-Ribitol-Phosphat (PRP), protektiv (110). Da das PRP allerdings ein T-Zell-unabhängiges Antigen ist (222) und nur die Bildung von IgM induziert, aber nicht von IgG sowie Gedächtniszellen, die für eine schnelle Sekundärantwort nötig wären, wurde das PRP an T-Zell-abhängige Trägermoleküle gekoppelt (80). Während beim Impfstoff PRP-T das detoxifizierte Tetanus-Toxin als Träger dient, ist es beim Impfstoff PRP-D das Diphtherie-Toxin. Bei dem Impfstoff PRP-OMPC dient ein Außenmembran-Protein-Komplex von *Neisseria meningitidis* Serotyp B als Träger und bei dem Impfstoff HbOC ein Derivat des Toxins von *Corynebacterium diphtheriae* (126). Die Impfung erfolgt bei Säuglingen bereits im zweiten und fünften Lebensmonat mit einer letzten Boosterung im ersten bzw. zweiten Lebensjahr. Die Hib-Konjugat-Vakzine haben sich als sehr effizient erwiesen, so konnte z. B. in England eine 16fache Reduktion der Hib-Erkrankungen der unter fünfjährigen Kinder nach Einführung des Hib-Impfstoffes festgestellt werden (221). Bei einer anderen Untersuchung, die in den Niederlanden durchgeführt wurde, konnte ein stärkerer Rückgang der Hib-Erkrankungen nach Einführung der Hib-Prophylaxe 1992 beobachtet werden: von 28,7/100.000 im Jahr 1992 auf 0,8/100.000 im Jahr 2002 (252).

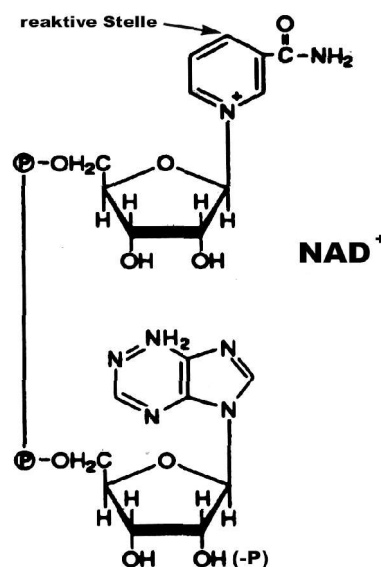
In den letzten Jahren allerdings wird von einer Zunahme der invasiven Erkrankungen berichtet, die nicht von *H. influenzae* Serotyp b, sondern von Typ e oder f verursacht werden (250, 255). In den USA nahmen die invasiven Erkrankungen, die von Serotyp f verursacht wurden, von 1% in 1989 auf 17% in 1994 zu (250). Ebenso wird eine Zunahme der invasiven Erkrankungen registriert, die durch nicht bekapselte NTHi-Stämme verursacht werden, so machen sie mittlerweile 73,6% der isolierten Stämme bei invasiven Erkrankungen aus (34). Ein Impfstoff gegen die NTHi-Stämme konnte bislang nicht entwickelt werden. Bisher wurden diverse Oberflächenstrukturen, wie das LOS, Außenmembranproteine, Fimbrien und Pili, als potentielle Impfstoffkandidaten untersucht. Das LOS scheint aufgrund seiner hohen Heterogenität ungeeignet zu sein, es kann allerdings als Träger eingesetzt werden. Die meisten Omp zeigen immunogene Eigenschaften, erweisen sich allerdings wegen des „Antigenen drifts“ und der starken Heterogenität zwischen den einzelnen Stämmen als schwierige Kandidaten für einen potentiellen Impfstoff. Als vielversprechende Impfstoffkandidaten der Außenmembran haben sich die Außenmembranproteine P4, P6, Hpd, PCP und D15 erwiesen. Die Antikörper, die von diesen Proteinen induziert werden, zeigen eine hohe Kreuzreaktion bei den NTHi- und den bekapselten Stämmen und haben *in vivo* eine bakterizide Aktivität (6, 46, 83, 145, 267). Synergistische, bakterizide Effekte, mit einer breiteren Spezifität, konnten bei einer Kombination zwischen P4/PCP und P6/PCP beobachtet werden (84). Des Weiteren wurden auch Außenmembran-assoziierte Proteine, wie die LKP-Pili, HMW1 und HMW2 und NadN als potentielle Impfstoffkandidaten untersucht. Im Chinchilla-Modell erwiesen sich die anti-LKP (28) und anti-HMW-Antikörper (16) als protektiv gegen NTHi für Otitis Media. Aufgrund ihrer Phasenvariation sind sie als Impfstoffkandidaten ungeeignet. Das 63 kDa Außenmembran-assoziierte, periplasmatische Protein NadN gilt sowohl unter den bekapselten, als auch unter den unbekapselten Stämmen als hoch konserviert. Es ist ein immunogenes Protein, das die Produktion von kreuzreaktiven, bakteriziden Antikörpern gegen bekapselte und unbekapselte Stämme induziert. So führte eine passive Immunisierung von 5-6 Tage alten Rattenbabies mit NadN-Antiserum zu einer 10fachen Reduktion der Bakteriämie (274).

## 2. NAD<sup>+</sup>-Biosynthese

### 2.1. Biologische Bedeutung von NAD<sup>+</sup>

NAD<sup>+</sup> gehört zu der Gruppe der Nikotinamid-Nukleotide (Pyridin-Nukleotide) und ist in allen lebenden Organismen ubiquitär und essentiell. In der älteren Fachliteratur ist NAD<sup>+</sup> auch unter der Bezeichnung Diphosphopyridinnukleotid (DPN), oder unter den Namen Codehydrogenase I und Coenzym I bekannt.

Das NAD<sup>+</sup> besteht aus einem Pyridin-Ring, der über eine N-glykosidische Bindung mit einem Ribose-Molekül verknüpft ist. Dieses Nikotinamid-Ribosyl ist über eine Pyrophosphatbindung mit Adenosin verbunden (Abb.3).



**Abb. 3** Strukturformel von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) bzw. NADP<sup>+</sup>. Die reaktive Stelle am Nikotinamid-Ring ist gekennzeichnet.

Das zweite Coenzym des Nikotinamids, das NADP<sup>+</sup>, trägt eine Phosphatgruppe am C2-Atom des Adenosylrestes. Die Hauptaufgabe von NAD<sup>+</sup> und NADP<sup>+</sup> in biologischen Systemen ist die katalytische Aktivität an über 300 Oxidations- und Reduktions-Reaktionen. Chemotrophe Organismen sind auf die ständige Energiezufuhr angewiesen, um ihre Zellbestandteile neu zu synthetisieren. Die freie Energie wird aus der Oxidation von Nährstoffen in der Glykolyse, in dem anschließendem Citratcyklus und während der Fettsäureoxidation gewonnen. Anschließend werden die Elektronen und Protonen von dem

reaktiven Teil des  $\text{NAD}^+$  (positiv geladener Nikotinamid-Ring) aufgenommen, das zu NADH reduziert wird. NADH ist frei dissoziierbar und gibt anschließend die Elektronen über eine Elektronentransportkette, eine Reihe von hintereinander geschalteten Proteinkomplexen, die aus Ubiquinonen, Flavinen und Cytochromen bestehen, an einen endständigen Elektronenakzeptor, wie z. B. Sauerstoff, bei aerober Atmung, weiter.

Neben der Funktion als Coenzym in der Redoxreaktion dient  $\text{NAD}^+$  als Substrat für die Reparatur von DNS durch die DNS-Ligase und ist somit essentiell für die DNS-Synthese, Reparatur und Rekombination (140, 173). Dabei wird das  $\text{NAD}^+$  als Energiequelle für die Knüpfung der Phosphodiesterbindungen zwischen der 3'-OH-Gruppe am Ende einer DNS-Kette und der 5'-Phosphatgruppe am Ende einer Anderen benötigt. Des Weiteren dient  $\text{NAD}^+$  als Substrat für die Modifikation von Proteinen durch ADP-Ribosyltransferasen (202). Unter anderem wird die ADP-Ribosylierung durch bakterielle Toxine, wie Pertussis-, Cholera- und Diphtherie-Toxin katalysiert. Dabei wird  $\text{NAD}^+$  in Nikotinamid und ADP-Ribose gespalten; die ADP-Ribose wiederum wird auf eukaryontische Proteine, wie EF2 und  $\text{G}\alpha\text{s}$  übertragen. Auf diese Weise werden nachgeschaltete Signaltransduktionswege, z. B. Ribosylierung von  $\text{G}\alpha\text{s}$ , durch das Cholera-Toxin, aktiviert.

Für die Synthese von Vitamin B12 (Cobalamin) wird unter anaeroben Bedingungen von einigen Mikroorganismen ein Zwischenprodukt der Biosynthese von  $\text{NAD}^+$  benötigt, das Nikotinsäure-Mononukleotid (NAMN) (118). Die Relevanz von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  auf den Metabolismus in der Zelle führt dazu, dass kleinere Schwankungen in der Konzentration (0,8 mM für  $\text{NAD}^+$ ; 0,02 mM für NADH; 0,05 mM für  $\text{NADP}^+$  und 0,15 mM für NADPH) bereits enorme Auswirkungen auf die Zellphysiologie haben (23, 263).

Auch in eukaryontischen Zellen ist  $\text{NAD}^+$  ein essentielles Coenzym. So sind Protein-Deacetylasen, wie die Sir2-Proteine (silent information regulator)  $\text{NAD}^+$  abhängig. Sir2 regulieren transkriptionelle Repression, Rekombination, den Zellteilungszyklus, mikrotubuläre Organisation und zelluläre Antwort auf DNS schädigende Agentien (172).

## 2.2. Allgemeine Funktionsabläufe der NAD<sup>+</sup>-Biosynthese

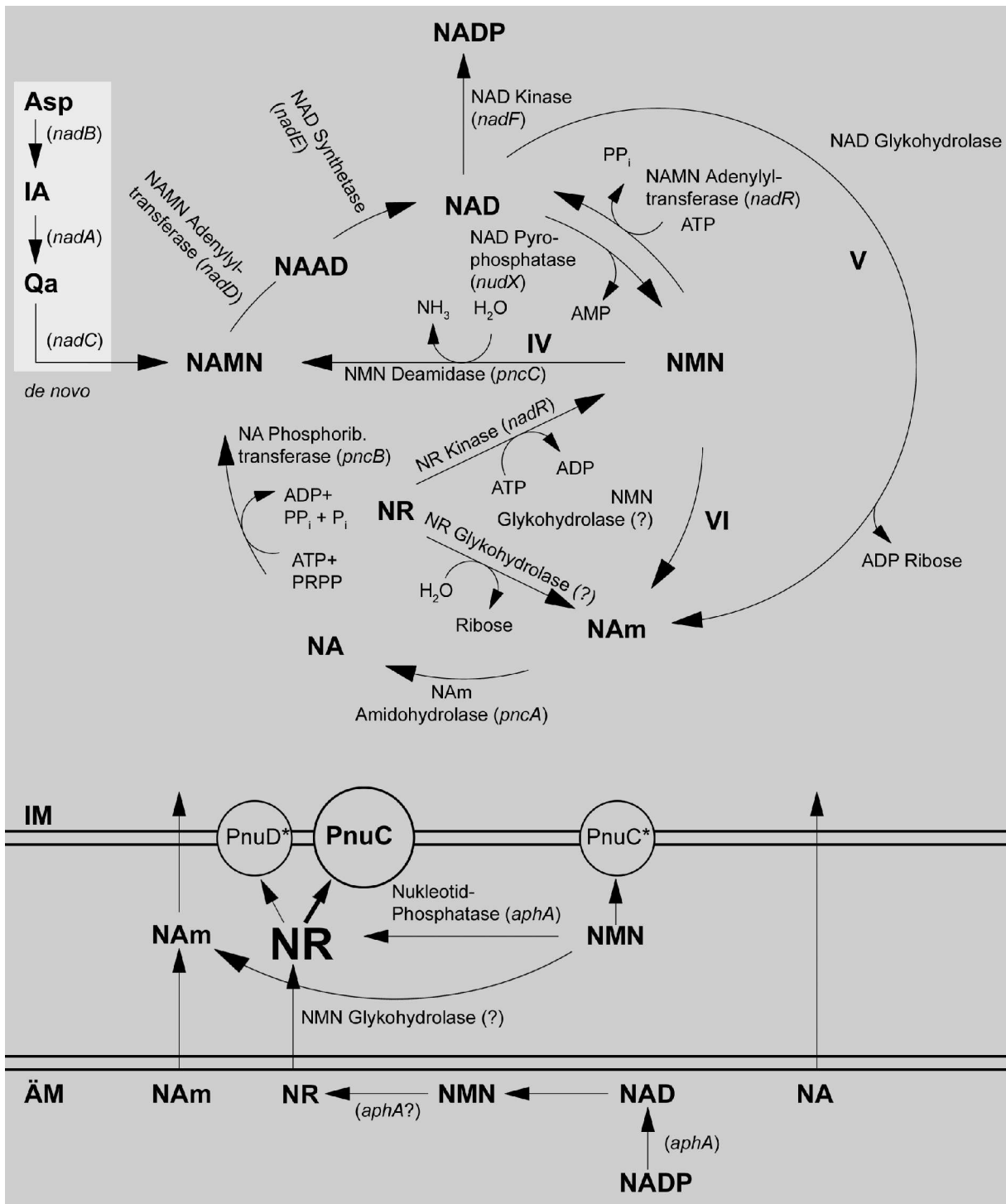
Nahezu alle Organismen sind in der Lage das NAD<sup>+</sup> selbst zu synthetisieren, entweder beginnen sie mit der Aminosäure Tryptophan bzw. Aspartat (*de novo* Synthese) oder sie können bestimmte Vorstufen oder Abbauprodukte aufnehmen bzw. wiederverwerten (Pyridin-Nukleotid-Zyklen, PNCs) (Abb. 4). Bei Eukaryonten beginnt die NAD<sup>+</sup>-Biosynthese mit Tryptophan, bei den meisten Prokaryonten dagegen mit L-Aspartat (270). Wobei erst kürzlich gezeigt wurde, dass bei einigen Bakterienspezies, wie *Xanthomonas pruni*, *Karlingia rosea* und *Streptomyces antibioticus* ebenso der NAD<sup>+</sup>-Biosyntheseweg vorhanden ist, beginnend mit Tryptophan (136, 137). Beide Wege führen zur Synthese von Quinolinat (66, 67, 116). Bei den meisten Prokaryonten wird im ersten Schritt durch Aspartat mit Hilfe der Aspartat-Oxidase, kodiert von *nadB*, Iminoaspartat hergestellt (36, 168). Danach katalysiert die Quinolinat-Synthase, die von *nadA* kodiert wird, die Kondensation zwischen Iminoaspartat und Dihydroxyaceton-Phosphat zu Quinolinat (260). Die Quinolinat-Phosphoribosyltransferase (QAPRTase), kodiert von *nadC*, katalysiert anschließend die Umwandlung von Quinolinat zu Nikotinsäure-Mononukleotid (NAMN), das Zwischenprodukt der PNCs. NAMN wird von der NAMN-Adenylyl-Transferase, kodiert von *nadD*, zu Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid (NAAD) umgesetzt. Im letzten Schritt der *de novo* Biosynthese wird NAAD von der NAD<sup>+</sup>-Synthase, die von *nadE* kodiert wird, zu NAD<sup>+</sup> umgewandelt (227).

Obwohl NAD<sup>+</sup> im Verlauf der Oxidationsreaktion durch die Atmungskette neu regeneriert wird, ist trotzdem in der Zelle ein ständiger NAD<sup>+</sup>-Turnover vorzufinden; die Halbwertszeit von NAD<sup>+</sup> unter aeroben Bedingungen liegt bei 90 min (176). Dieser ständige NAD<sup>+</sup>-Turnover lässt sich durch die PNCs erklären. Die PNCs, die bei *E. coli* und *S. typhimurium* sehr gut untersucht wurden, beginnen mit dem enzymatischen Abbau von NAD<sup>+</sup> und führen über verschiedene Wege zur Synthese von NAMN. NAMN wird schließlich durch die letzten zwei Schritte der *de novo* Synthese zu NAD<sup>+</sup> umgesetzt (Abb. 4) (189). Dieses „Recycling“ durch die PNCs wird der *de novo* Synthese bevorzugt, da dadurch die energetisch günstigere Konservierung des Pyridinringes der Vorläufermoleküle genutzt wird (154). Mittlerweile sind drei PNCs (PNC IV, V und VI) bekannt, wobei PNC IV und V für das intrazelluläre „Recycling“ zuständig sind und der PNC VI die Synthese von NAD<sup>+</sup> aus Pyridinen aus der Umwelt übernimmt.

Am häufigsten wird der PNC IV genutzt; durch diesen Zyklus werden 80-90% der Pyridine „recycled“ (11, 70). Das „Recycling“ von  $\text{NAD}^+$  beginnt damit, dass  $\text{NAD}^+$  durch eine noch unbekannte  $\text{NAD}^+$ -Pyrophosphatase zu Nikotinamid-Mononukleotid (NMN) und Adenosin-Monophosphat (AMP) gespalten wird (Abb. 4). Ein mögliches Enzym, das  $\text{NAD}^+$  zu NMN spalten kann, ist die DNS-Ligase. Die Energie, die aus der Spaltung der  $\text{NAD}^+$ -Pyrophosphat-Bindung freigesetzt wird, benutzt die Ligase, um die Nicks in der doppelsträngigen DNS zu schliessen. Es hat sich allerdings herausgestellt, dass dies nicht die einzige  $\text{NAD}^+$ -Pyrophosphatase ist, denn wenn die DNS-Ligase durch die ATP-abhängige DNS-Ligase des T4-Phagens ersetzt wurde, konnte keine Abnahme des  $\text{NAD}^+$ -Umsatzes beobachtet werden (176). Eine Rolle beim  $\text{NAD}^+$ -Turnover könnten auch  $\text{NAD}^+$ -abhängige Proteinmodifikationen spielen. Denn unter aeroben Bedingungen ist eine dreimal höhere  $\text{NAD}^+$ -Umsatzrate als unter anaeroben beobachtet worden. So könnten am  $\text{NAD}^+$ -Turnover auch Enzyme beteiligt sein, die die Membran oder DNS vor Schädigung durch Sauerstoff schützen (176, 220). Im PNC IV wird dann das NMN durch die Nikotinamid-Amidohydrolase, kodiert von *pncC*, zu NAMN desaminiert (Abb. 4) (111, 132). Das NAMN wiederum, Zwischenprodukt von allen PNCs und der *de novo* Biosynthese, wird durch NadD weiter zu NAAD und dieses schließlich durch NadE weiter zu  $\text{NAD}^+$  synthetisiert (111).

Im PNC V wird  $\text{NAD}^+$  durch die  $\text{NAD}^+$ -Glykohydrolase zu Nikotinamid (NA<sub>m</sub>) und ADP-Ribose gespalten. Im Folgenden wird das NA<sub>m</sub> mit Hilfe der NA<sub>m</sub>-Amidohydrolase, kodiert von *pncA*, zu Nikotinsäure (NA) desaminiert (52). NA wird schließlich durch die NA-Phosphoribosyltransferase (NAPRTase) wieder zu NAMN aufgebaut (69). Daraufhin wird das NAMN mittels NadD/NadE zu  $\text{NAD}^+$  synthetisiert (Abb. 4).

Bei dem PNC VI wird  $\text{NAD}^+$  zu NMN gespalten, das mittels einer bisher unbekanntes NMN-Glykohydrolase zu NA<sub>m</sub> hydrolysiert wird. Das NA<sub>m</sub> wird, wie in PNC V, weiter zu NA degradiert und anschließend wieder zu NAMN synthetisiert. Danach wird das NAMN mittels NadD/NadE zu  $\text{NAD}^+$  synthetisiert (Abb. 4).



**Abb. 4** NAD<sup>+</sup>-Biosynthese, „Recycling“ und NAD<sup>+</sup>-Aufnahme von *S. typhimurium* bzw. *E. coli*. Nicht identifizierte Gene sind mit einem (?) gekennzeichnet. Verändert nach Grose et al. und Penfound et al. (88, 179).



### 2.3. NAD<sup>+</sup>-Aufnahme

*E. coli* und *S. typhimurium* können aus ihrer Umwelt Pyridine, wie Quinolinat (QA), Nikotinsäure (NA), Nikotinamid (NAm), (NR), NMN und NAD<sup>+</sup>(P) aufnehmen. QA, NA und NAm können durch die Membranen diffundieren; zumindest konnte bisher kein energieabhängiger aktiver Transport gezeigt werden (154, 174). NMN und NAD<sup>+</sup> müssen dagegen in ihre Vorläufermoleküle gespalten werden, bevor sie in die Zelle aufgenommen werden können. So muss NAD<sup>+</sup> mittels der NAD<sup>+</sup>-Pyrophosphatase, kodiert von *pnuE*, erst zu NMN gespalten werden. NMN kann in zwei unterschiedlichen Routen in die Zelle aufgenommen werden (Abb. 4). Die effizientere Route bei *S. typhimurium* ist, wenn NMN durch eine bisher unbekannte NMN-Glykohydrolase zu NAm gespalten wird. NAm kann dann durch die Membran diffundieren und wird anschließend durch die Genprodukte von *pncA* und *pncB* weiter zu NAMN prozessiert (88). Eine weitere Möglichkeit exogenes NMN zu nutzen, ist durch die periplasmatische saure Phosphatase AphA gegeben, durch die NMN zuerst zu NR dephosphoryliert wird. Diese Route ist allerdings weniger effizient und benötigt 100 µM NMN im Gegensatz zu 10 µM NMN, die benötigt werden, wenn NMN verwertet wird, wie im PNC VI bzw. V dargestellt (89). NR wird anschließend durch den PnuC-Transporter in die Zelle aufgenommen. Der *S. typhimurium* PnuC-Transporter wurde früher als NMN-Transporter beschrieben (279), was in dieser Arbeit widerlegt wird. Das integrale Membranprotein PnuC von *S. typhimurium* wird von *pnuC* kodiert, das 966 bp lang bzw. 36,930 Da schwer ist. *pnuC* liegt stromabwärts von *nadA* innerhalb desselben Operons und besitzt einen eigenen schwachen Promotor (71, 280). PnuC ist ein stark hydrophobes Protein, mit sieben möglichen TMD (71).

Anschließend wird NR Substrat für NadR, das neben seiner regulatorischen Funktion auch zwei enzymatische Funktionen besitzt. Eine katalytische Funktion besitzt die C'-terminale Nikotinamidribosid-Kinase (RNK), die NR zu NMN phosphoryliert, und die andere ist eine zentrale Domäne, die eine NMN-Adenylyltransferase (NMNAT) darstellt und die Umwandlung von NMN zu NAD<sup>+</sup> katalysiert (138, 190, 218). Allerdings wurde erst kürzlich beschrieben, dass die NMNAT-Aktivität von NadR für das Wachstum von *S. typhimurium* nicht essentiell ist. Da NadD- oder NadE-Mutanten nicht auf NMN wachsen konnten, bedeutet dies, dass die NMNAT-Aktivität von NadR allein nicht zum Wachstum ausreicht (88).

## 2.4. Regulation der Biosynthese

In der *de novo* Biosynthese bestehen die ersten zwei Schritte in der Umwandlung von L-Aspartat zu Quinolinat mittels der Enzyme NadAB. Der Enzymkomplex unterliegt folgender Kontrolle: Zum einen werden bei  $\text{NAD}^+$ -Konzentrationen über 1 mM auf transkriptioneller Ebene die Gene *nadA* und *nadB* durch NadR negativ reguliert. Die Transkription wird hingegen aktiviert, wenn die  $\text{NAD}^+(\text{P})$  Konzentrationen unter 1,0 mM sinken (113). Zum anderen unterliegt die Aspartat-Oxidase NadB einer Feedback-Inhibition durch  $\text{NAD}^+$ . Die Quinolinat-Produktion wird von NadA und NadB in ähnlichem Maße begrenzt (63), so werden große Mengen an Quinolinat nur dann produziert, wenn beide Gene vorhanden sind. Die weitere Prozessierung zu NAMN erfolgt mit Hilfe des Produktes von *nadC*. Dieses wird weder auf transkriptioneller Ebene, noch durch eine Feedback-Inhibition reguliert (112, 214).

Alle PNCs und die *de novo* Synthese haben die Bildung von NAMN zu NAAD und weiter zu  $\text{NAD}^+$  gemeinsam (Abb. 4). Die benötigten Enzyme werden von *nadD* und *nadE* kodiert; es ist nicht bekannt, ob *nadD* und *nadE* unter einer Regulationskontrolle stehen. Eine regulierende Aufgabe übernimmt die NMN-Glykohydrolase von PNC VI; diese vermutete Kontrollfunktion beruht auf der Feedback-Inhibition durch  $\text{NAD}^+(\text{H})$ , GTP, GMP, AMP und ADP-Ribose und stellt einen gemeinsamen Kontrollpunkt zwischen PNC IV und VI dar (66). Die NAPRTase der PNC V und VI unterliegt einer Feedback-Inhibition durch  $\text{NAD}^+$ . So wird NA ausgeschieden, wenn der zelluläre  $\text{NAD}^+$ -Spiegel zu hoch ist, und später wieder aufgenommen (66). Die NAPRTase wird von dem Gen *pncB* kodiert, welches das *nad*-Regulon zusammen mit den Genen des *de novo* Syntheseweges *nadA* und *nadB* bildet. Dieses Regulon unterliegt einer transkriptionellen Kontrolle durch den Repressor NadR, das zusammen mit  $\text{NAD}^+$  als Korepressor an die Promotorbereiche der drei Gene binden kann. Es konnten bei *nadA* und *nadB* jeweils zwei  $\text{NAD}^+$ -Boxen, bei *pncB* nur eine  $\text{NAD}^+$ -Box, als Bindungsstelle für den NadR/ $\text{NAD}^+$ -Komplex identifiziert werden (180).

Das in *S. typhimurium* trifunktionelle Protein NadR fungiert als transkriptioneller Repressor der *de novo* Synthese Gene und ist bei der Assimilation von Pyridinen beteiligt; ermöglicht wird diese Funktion durch eine Helix-Turn-Helix-Region im N'-terminalen Bereich. Bei Abwesenheit von allen Effektoren bindet reines NadR an die DNS. Die DNS-Bindeeigenschaft von NadR wird auch von ATP beeinflusst; so verliert NadR seine

Repressorfunktion bei Zugabe von ATP und gewinnt sie wieder bei Zugabe von höheren  $\text{NAD}^+$ -Konzentrationen. Schon geringe Mengen an ATP induzieren die DNS-Bindung.  $\text{NAD}^+$  wiederum reprimiert die Transkription, indem es die ATP-Bindung verhindert (88). Aufgrund der erst kürzlich gezeigten schwachen NMNAT-Aktivität bei *S. typhimurium*, wird postuliert, dass hier die NMNAT-Domäne eine regulierende Funktion besitzt, welche die DNS-Bindung und die NRK-Aktivität moduliert. Es wird vermutet, dass die Abwesenheit von gebundenem ATP zeitlich korreliert mit der Anwesenheit von internem NMN und mit dem Bedarf die Synthese von  $\text{NAD}^+$  zu reprimieren. Dies würde bedeuten, dass die Abwesenheit von ATP ein Signal für einen Pyridin-Influx darstellen würde. Grose et al. vermuten, dass die regulierende Rolle von ATP Bedeutung bekommt, wenn der ATP-Spiegel drastisch absinkt. In solch einem Fall würde die Induktion der  $\text{NAD}^+$ -Synthese und das „Recycling“ verhindert werden, da beide Routen ATP benötigen (88).

### 2.5. $\text{NAD}^+$ -Biosynthese bei den *Pasteurellaceae*

Anders als bei *E. coli* und *S. typhimurium* fehlen der Familie der *Pasteurellaceae* die Gene der *de novo* Biosynthese und der PNCs. Da der Faktor-V sowohl für aerobes als auch für anaerobes Wachstum essentiell ist, müssen die *Pasteurellaceae*  $\text{NAD}^+$  oder Vorläufermoleküle aus dem Wirt Mensch aufnehmen. Diese Pyridin-Nukleotid-Auxotrophie ist ein wichtiges Merkmal für die Klassifizierung von *Pasteurellaceae*-Arten. Hier werden zwei Gruppen von *Pasteurellaceae*-Arten unterschieden: die  $\text{NAD}^+$ -abhängigen und die  $\text{NAD}^+$ -unabhängigen. Die  $\text{NAD}^+$ -abhängigen Spezies können  $\text{NAD}^+(\text{P})$  und die Vorläufermoleküle NMN, NR, die eine intakte Pyridin-Ribosebindung mit einer aminierten Pyridin-Carbonylgruppe besitzen, nicht aber Quinolinat, NA, NAm oder NAMN aufnehmen. Die  $\text{NAD}^+$ -unabhängigen *Pasteurellaceae* können zusätzlich auf NAm wachsen, das in den meisten komplexen Medien vorzufinden ist (175).  $\text{NAD}^+$ -unabhängig sind z.B. *Actinobacillus pleuropneumoniae* (184), *H. haemoglobinophilus* (125), *H. parainfluenzae* (87), *H. paragallinarum* (26) und *H. ducreyi* (151). Während bei *A. pleuropneumoniae* die Faktor-V-Unabhängigkeit durch ein Gen auf dem Chromosom vermittelt wird (114), wird sie bei den anderen Stämmen auf einem Plasmid kodiert. So wird die  $\text{NAD}^+$ -Unabhängigkeit in dem Stamm *H. ducreyi* ATCC 27722 von dem Gen *nadV* kodiert, das sich auf einem 5,2 kb großem Plasmid befindet und die Aktivität einer Nikotinamid-Phosphoribosyltransferase (NAm-PRTase) besitzt. Die NAm-PRTase synthetisiert NAm und 5-Phosphoribosyl-

Pyrophosphat zu NMN (151, 265). Bei der Suche in der Genom-Datenbank nach Homologien von *nadV* zu anderen Organismen konnte eine signifikante Sequenz-Homologie zu dem „pre-B-cell colony-enhancing factor“ (PBEF) (208) gefunden werden. Eine Homologie wurde auch zu Proteinen von bisher unbekannter Funktion in Spezies wie z. B. *P. multocida*, *A. actinomycetemcomitans*, *S. putrefaciens*, *M. genitalum*, und *M. pneumoniae* entdeckt. Allerdings konnte bei  $\text{NAD}^+$ -abhängigen *Pasteurellaceae*, wie z. B. auch bei *H. influenzae* und Bakterienarten, welche die *de novo* Synthese und die PNCs durchführen (*Enterobacteriaceae* und *Bacillaceae*), kein entsprechendes homologes Gen gefunden werden (151).

Bis vor kurzem war wenig über die  $\text{NAD}^+$ -Prozessierung und  $\text{NAD}^+$ -Aufnahme in *H. influenzae* bekannt. Aufgrund der Tatsache, dass *H. influenzae* auf NMN und NR wachsen kann, wurde schon länger vermutet, dass ein  $\text{NAD}^+$ -Syntheseweg vorhanden ist, der NMN und NR als Vorläufermoleküle nutzt (14, 77). 1986 wurde von Kahn et al. von einer Nukleotid-Pyrophosphatase berichtet, die  $\text{NAD}^+$  zu NMN und AMP bzw. Flavinadenin-Dinukleotid (FAD) zu FMN und AMP spalten kann; deren Lokalisation war allerdings unbekannt (124). Zwei Jahre später wurde für *H. parainfluenzae* ein  $\text{NAD}^+$ -Syntheseweg beschrieben, bei dem  $\text{NAD}^+$  vor der Aufnahme enzymatisch zu NMN und weiter zu NR abgebaut wird (43).

Des Weiteren wurde der Effekt von  $\text{NAD}^+$ -, NMN- und NR-Analoga auf den  $\text{NAD}^+$ -Biosyntheseweg untersucht (48, 78). Dabei wurde festgestellt, dass *H. influenzae* auf  $\text{NAD}^+$ -Analoga wachsen konnte, die einen Nikotinamidring tragen. Geringes Wachstum wurde auch auf  $\text{NAD}^+$ -Analoga beobachtet, die am 3`-Pyridin eine Substitution hatten, wie 3`-Thioamid und 3`-Acetyl. Die Vermutung war, dass diese Stoffe im  $\text{NAD}^+$ -Biosyntheseweg zu ThioNAD und 3`-AcPAD verstoffwechselt wurden und in den Oxido-Redox-Reaktionen statt  $\text{NAD}^+$  verwertet wurden (78), da wie bereits früher schon gezeigt, beide Analoga als Coenzyme in Dehydrogenase-Reaktionen dienen können (9, 39). Andere  $\text{NAD}^+$ -Analoga, wie NAAD, 3`-AAD, 3`-PAAD und 3`-IodoPAD, können nicht als Faktor-V-Quelle dienen bzw. wirken wachstumshemmend (78). Die wachstumshemmende Wirkung von 3`-AAD konnte auch in anderen Studien gezeigt werden (48, 124). Der genaue Mechanismus der Inhibition konnte jedoch nicht identifiziert werden. So blieb die Vermutung, dass 3`-AAD die  $\text{NAD}^+$ (P)-abhängigen Oxidoreduktasen und Fermentation zu hemmen schien. Die inhibierende Wirkung von 3-AAD auf  $\text{NAD}^+$ -abhängige Dehydrogenasen wurde von Fisher

et al. gezeigt (62). Ebenso konnte bereits nachgewiesen werden, dass in *H. influenzae* NADP<sup>+</sup>-abhängige Enzyme, wie die Malat- und 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase, *in vitro* von 3-Aminopyridin-Analoga inhibiert werden (271, 272). In dieser Arbeit wird die Wachstumsinhibierung von 3'-Aminopyridin Derivativen, deren Aufnahmeweg und die Effekte auf die NAD<sup>+</sup>-Resynthese genauer charakterisiert.

Die Komponenten der NAD<sup>+</sup>-Biosynthese von *H. influenzae* wurden von unserer Arbeitsgruppe erst kürzlich charakterisiert. Wie schon erwähnt, kann *H. influenzae* auf NAD<sup>+</sup>(P), NMN und NR wachsen, vor der Aufnahme müssen allerdings NAD<sup>+</sup>(P), NAD<sup>+</sup> und NMN zu NR gespaltet werden. Das erste Enzym, das an der enzymatischen Degradation beteiligt ist, ist die saure Phosphatase e(P4), die von dem Gen *hel* kodiert wird. Die saure Phosphatase wurde als erstes von Green et al. als ein immundominantes und zwischen den typisierbaren und den NTHi-Stämmen stark konserviertes Protein charakterisiert (84). Etwas später wurde es irrtümlicherweise als ein Enzym beschrieben, das an der Hämin-Aufnahme beteiligt zu sein schien (194). Das Protein e(P4), welches sich an der Außenmembran befindet, vermag sowohl an der Zelloberfläche, als auch im Periplasma NADP<sup>+</sup> zu NAD<sup>+</sup>, NMN zu NR, aber auch AMP zu Adenosin zu dephosphorylieren (Abb. 5) (127, 195, 196). NAD<sup>+</sup>, NMN gelangen dann mit Hilfe des an der Außenmembran befindlichen OmpP2-Porins in das Periplasma. OmpP2 wurde als ein Porin mit einer Substrat-Durchlässigkeit von 1400 Da beschrieben (251). Kürzlich konnte mit „black lipid bilayer“ Experimenten gezeigt werden, dass OmpP2 eine Substratspezifität für NAD<sup>+</sup> und NMN mit einer K<sub>s</sub> von ~ 8 mM bzw. 4 mM in 0,1 M KCl besitzt, aber nicht für das Nukleosid NR und anderen Purinen oder Pyrimidin-Nukleotiden, wie NADH, ATP, ADP, AMP, GTP und GMP. So wurde eine Bindestelle für NAD<sup>+</sup> und NMN vermutet, deren Diffusion durch OmpP2 erleichtert wird (8). Das Wachstum von OmpP2-Mutanten war auch in Anwesenheit von NR stark beeinträchtigt (8, 93), so dass man davon ausgehen kann, dass auch andere Substanzen durch OmpP2 aufgenommen werden.

Nachdem NAD<sup>+</sup> und NMN durch OmpP2 und NR durch ein bisher unbekanntes Aufnahmesystem oder Pore in das Periplasma gelangt sind, werden NAD<sup>+</sup> und NMN Substrat für NadN, ein weiteres enzymatisches Protein (Abb. 5). NadN ist ein 63 kDa Protein und ist antigenisch stark zwischen den typisierbaren und NTHi-Stämmen konserviert (84, 85). NadN wurde bereits 1986 als ein Protein mit Nukleotid-Pyrophosphatase Aktivität beschrieben (124). Bei den NTHi-Stämmen wurde NadN anfangs als NucA Protein mit 5'-

Nukleotidase Aktivität charakterisiert (274). Es stellte sich aber heraus, dass es sich bei NadN und NucA um dasselbe Protein mit NAD<sup>+</sup>-Pyrophosphatase und NMN-5'-Nukleotidase Aktivität handelte (127, 195), welches NAD<sup>+</sup> zu NMN und NMN zu NR dephosphorylieren kann. Letztlich wird NR als einziges Substrat in die Zelle aufgenommen und fördert das Wachstum von *H. influenzae*. So wurde in Experimenten mit einer Doppelmutante gezeigt, bei der e(P4) und NadN deletiert wurden, dass die Mutante nur noch auf NR wachsen konnte (127). Das Aufnahmesystem von NR bei *H. influenzae* war bis zu Beginn dieser Arbeit noch unbekannt und wird zentrales Thema dieser Arbeit. Nachdem NR in das Cytoplasma gelangt ist wird es Substrat für NadR. NadR ist bei *H. influenzae* ein bifunktionelles Protein mit C-terminaler RNK- und N-terminaler NMNAT-Domäne, das NR zu NMN und NMN zu NAD<sup>+</sup> synthetisiert. Die Essentialität von NadR wurde indirekt beschrieben, da keine Transposoninsertionen im *nadR*-Gen erzeugt werden konnten (5). Beinahe zeitgleich wurde auch die Kristallstruktur von NadR und dessen Funktion charakterisiert (138, 218). Sowohl die NMNAT-Domäne, als auch die RNK-Domäne besitzen ATP-Bindestellen: das (H/T)IGH-Motiv in der NMNAT-Domäne und die Walker A und B Motive in der RNK-Domäne. Die spezifische NMNAT-Aktivität ist bei *H. influenzae* NadR 200fach höher als bei *E. coli* NadR (138, 190), was noch einmal für die Essentialität von NadR in *H. influenzae* spricht. Aufgrund der fehlenden Gene für die *de novo* NAD<sup>+</sup>-Biosynthese in *H. influenzae*, wurde NadR offensichtlich zum einzigen NAD<sup>+</sup>-Syntheseweg und in diesem Zusammenhang wurde z. B. die NMNAT-Aktivität optimiert. Kürzlich wurden von unserer Arbeitsgruppe verschiedene RNK-Mutanten *in vitro* und *in vivo* charakterisiert (156). Während es nicht möglich war, Mutationen in der NMNAT-Domäne einzuführen, konnten in der RNK-Domäne nur bei Anwesenheit der NadV-Aktivität Mutationen eingeführt werden. Dies konnte mit Hilfe eines Stammes bewerkstelligt werden, der eine chromosomale Kopie des *nadV*-Gens von *H. ducreyi* trägt (Diplomarbeit, Sauer 2002). Das *nadV*-Gen kodiert für eine Nikotinamid-Phosphoribosyltransferase und kann aus NAm und Phosphoribosyl-Pyrophosphat (PRPP) NMN synthetisieren, wodurch die RNK-Aktivität von NadR umgangen werden kann (Abb. 5).

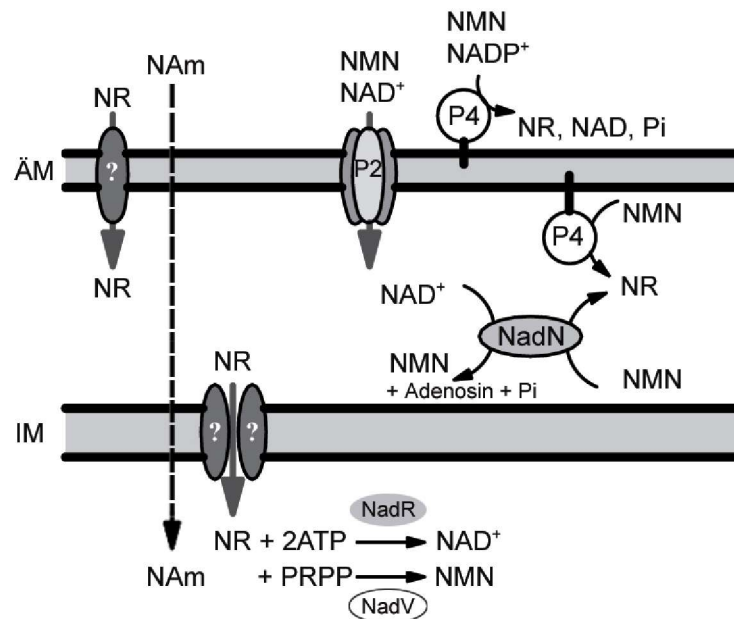


Abb. 5 Modell der NAD<sup>+</sup>-Biosynthese und der NAD<sup>+</sup>-Aufnahme bei *H. influenzae*.

### 3. Transportsysteme

Transportsysteme sind für die Zelle von immenser Wichtigkeit. Zum einen ermöglichen sie die Aufnahme von Nährstoffen bzw. Stoffwechselprodukten. Zum zweiten wird die Exkretion von Endprodukten des Zellmetabolismus ermöglicht. Zum dritten werden durch diese Systeme die Aufnahme und der Efflux von Ionen ermöglicht, die das Membranpotential und den Ionen-Konzentrations-Gradienten aufrecht erhalten. Des Weiteren werden toxische Substanzen aktiv aus der Zelle geschleust, Neurotransmitter und andere Signalmoleküle können aufgenommen und in das Medium abgegeben und Nukleinsäuren können transferiert werden, wodurch der genetische Austausch bzw. Diversität zwischen den Bakterienarten ermöglicht wird. Die essentielle Bedeutung von Transportprozessen auf biologische Systeme wurde bereits vor einem halben Jahrhundert erkannt und untersucht (76). Das meist- und best-untersuchte Transportsystem, durch das spezifische „Carrier“-Proteine entdeckt wurden, die am Transport beteiligt sind, ist die Lactose-Permease von *E. coli* (32, 40, 122). Durch Gensequenzierungs-Techniken wurde zunächst die primäre Struktur von Transportern geklärt, bis schließlich mit Hilfe von Röntgenstrahlung 3-dimensionale Kristallstrukturanalysen möglich waren (47, 245). 1999 wurde ein Transporter-Protein-Klassifikations-System (TC-System) von Saier et al. entwickelt, das auf phylogenetischen Analysen und funktionellen Merkmalen von über 250 Familien mit sequenzverwandten

Transportern bei Bakterien, Archea und Eukaryonten basiert (Abb. 6) (205). Drei Jahre später umfasste das TC-System fast 400 Familien, die von der „International Union of Biochemistry and Molecular Biology“ übernommen wurden (31). In diesem TC-System werden Transporter in zwei Hauptklassen aufgeteilt: 1) Kanäle bzw. Poren und 2) „Carrier“ (31, 204). „Carrier“ vermittelte Transporter werden in drei Untergruppen unterteilt: in primär aktive Transporter, in sekundär aktive Transporter und in Gruppentranslokatoren (204).

### 3.1. Kanäle und Poren

Bei einem Kanal vermittelten Transportvorgang werden Substrate in einem Diffusions-limitierenden Prozess durch einen Kanal oder einer Pore durch eine Membran geschleust. Die Diffusion ist energieunabhängig und kann somit keinen Konzentrationsgradienten über eine Membran aufbauen. Kanäle und Poren besitzen hydrophile Aminosäurereste für hydrophile Substanzen, hydrophobe AS-Reste für hydrophobe Substanzen und amphipathische AS-Reste für amphipathische Substanzen. Während viele der „Carrier“ vermittelten Transporter als Monomere funktionieren können, bilden die meisten Kanäle und Poren Oligomere Komplexe. Die meisten  $\alpha$ -Typ Kanalproteine besitzen drei oder weniger Transmembransegmente (TMS) pro Polypeptidkette. In dem TC-System gehören zu dem Kanal vermittelten Transport, neben den Kanälen und Poren, auch Toxine, die Poren formen (z. B. Cholizine), und nicht ribosomal synthetisierte Kanäle (z. B. Gramicidin A) (Abb. 6).

Während die  $\alpha$ -Typ Kanäle vorwiegend aus  $\alpha$ -Helices bestehen, wobei selten auch  $\beta$ -Stränge vorhanden sein können, bestehen Poren ausschließlich aus  $\beta$ -Strängen, die gewöhnlich  $\beta$ -„Barrel“ bilden (30).  $\alpha$ -Typ Kanäle kommen in den Membranen von allen Organismen vor, sind aber vorwiegend bei Eukaryonten vorzufinden. Die meisten Kanäle sind entweder nicht selektiv, oder besitzen lediglich eine Ladungspräferenz, indem sie eher Kationen oder Anionen präferieren, wie z. B. der MscL-Kanal von *E. coli*, welches Kationen vor Anionen präferiert (97). Viele andere Kanäle besitzen eine strenge Spezifität für bestimmte Ionen, wie z. B. selektive  $\text{Cl}^-$  und  $\text{Ca}^+$ -Kanäle bei der Familie der Chlorid-Kanäle (ClC) (117).

Porine sind vorwiegend an der äußeren Membran von Gram negativen Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten vorzufinden (22, 61). Obwohl Porine eine größere



Bandbreite an Substratselektivität im Verhältnis zu den  $\alpha$ -Typ Kanälen haben, sind die meisten Porine ebenfalls nicht selektiv oder besitzen nur eine geringe Präferenz für bestimmte Ionen, oder aber sie sind hoch selektiv und exportieren Makromoleküle an der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien (169, 256). Aufgrund der  $\beta$ -„Barrel“ werden Membrane durchlässig für hydrophile Moleküle, die kleiner als 650 Da sind (170). Die meisten Makromoleküle, die von den Poren transportiert werden, sind bestimmte Proteine und komplexe Kohlenhydrate. Als Beispiele hierfür können die OmpA-OmpF Porine, OmpG Porine und Glukose-selektiven OprB Porine genannt werden.

Poren formende Toxine sind Proteine und Peptide, die von einer Zelle synthetisiert und in eine andere Zelle sekretiert werden, wo sie in die Membran inseriert werden und Transmembranporen bilden. Ihre toxische Wirkung verursachen sie, indem nun ein freies Fließen von Elektrolyten und anderen Molekülen durch die Membran ermöglicht wird. Hierzu werden die Familie der  $\alpha$ -Hämolytine, Cholizine, Diphtherie- und Tetanus-Toxine uva. gezählt (204).

Als die letzte Gruppe, die zu der Klasse der Kanäle und Poren gehört, sind die „nicht ribosomal synthetisierten Kanäle“ zu erwähnen. Diese Moleküle sind meistens Ketten von L- und D-Aminosäuren oder Hydroxysäuren, wie Laktat und können oligomere Transmembran-Ionen-Kanäle bilden. Diese sog. „Depsipeptide“ gehören zu den Verteidigungsmechanismen von bestimmten Bakterien oder Pilzen (204).

### 3.2. „Carrier“ vermittelter Transporter

Der „Carrier“ vermittelte Transport ist gekennzeichnet durch viel langsamere Transportraten und eine stereospezifische Substratspezifität, im Verhältnis zu den Kanälen und Poren. Die Klasse der „Carrier“ vermittelten Transporter wird in drei Untergruppen unterteilt: in primär aktive Transporter, sekundär aktive Transporter und Gruppentranslokatoren (Abb. 6).

### 3.2.1. Primär aktive Transporter

Zu den primären aktiven Transportern gehören Aufnahmesysteme, die mit Hilfe einer primären Energiequelle eine Substanz gegen einen Konzentrations-Gradienten transportieren und in die Zelle akkumulieren. Als primäre Energiequellen werden z.B. chemische Reaktionen, Lichtabsorption und Elektronenfluss angesehen. Hierzu gehören Transporter, die durch die Hydrolyse von Pyrophosphatbindungen getrieben werden (wie z. B. ATP), aber auch die Transporter, welche durch Dekarboxylation, Methyl-Transfer, Oxido-Reduktion oder mechanisch getrieben werden (Abb. 6) (204). Primär aktive Transporter können nach einem „Carrier“-Typ- oder nach einem Kanal-Typ-Mechanismus funktionieren. Den größten Teil dieser Gruppe machen die ABC-Transporter aus (ATP-binding cassete), die alleine 5% der Gene im Genom von *E. coli* und *Bacillus subtilis* ausmachen (141, 273). Neben den BPD- (periplasmic binding protein-dependent) Transportern kommen in Bakterien auch ABC-Transporter vor, bei denen das Bindeprotein nicht vorhanden ist. ABC-Transporter sind hoch konserviert und bestehen aus vier Core-Domänen: zwei TMD und zwei Nukleotid-Bindedomänen (NBD). Die TMD bestehen aus mehreren, meistens sechs (106, 108), membranumspannenden  $\alpha$ -Helices, die gemeinsam eine Bindestelle für die zu transportierende Substanz bilden und durch die eine zu transportierende Substanz die Lipiddoppelschicht passiert. Die NBD koppeln die Konformationsänderung mit dem Transportprozess, die durch die ATP-Bindung, ATP-Hydrolyse und ADP-Freilassung bewirkt wird. Die NBD von allen ABC-Transportern besitzen eine starke Sequenzhomologie und einige charakteristische Motive (107). So sind hier die Walker A Motive (oder P-Loop), Walker B Motive, das ABC-Signatur Motiv, H-Loop und Q-Loop zu finden. ABC-Transporter sind an der Aufnahme von Zucker und anderen Kohlenhydraten (216), Aminosäuren (115), Peptiden (49), Eisen (133) und vielen anderen Substraten beteiligt. Der Mechanismus der ABC-Transporter beruht auf der Interaktion zwischen dem mit Substrat beladenen Bindeprotein und der Membran-Komponente mit anschließend folgender Konformationsänderung beider Komponenten, wodurch ATP-Hydrolyse und Substrattransport in Gang gesetzt werden.

Zu den primär aktiven Transportern gehören auch aus Oxido-Reduktionen getriebene Transporter, zu welchem wahrscheinlich auch die  $\text{Na}^+$ -translozierende NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase ( $\text{Na}^+$ -NQR) Redox getriebene Natrium-Pumpe gehört. Der  $\text{Na}^+$ -NQR-Komplex ist vorwiegend bei Gram-negativen, marinen und halophilen Bakterien zu finden und ist die „Eintrittspforte“ für Elektronen in der Atmungs-Kette (248, 249). Dieser wurde

bereits 1996 in *H. influenzae* entdeckt (100). Der  $\text{Na}^+$ -NQR-Komplex akzeptiert die reduzierten Äquivalente von NADH und gibt sie an den Quinon-Pool weiter (53, 248). Die Energie von dieser Redox-Reaktion wird genutzt, um Natrium von der inneren zur äußeren Membran zu transportieren, wodurch ein SMF gebildet wird, das wiederum für Stoffwechselprozesse genutzt wird (50, 51). Des Weiteren wurde gezeigt, dass der  $\text{Na}^+$ -NQR-Komplex in *Vibrio*-Spezies entschieden zu der Regulation der Natrium-Homeostase beiträgt (242).

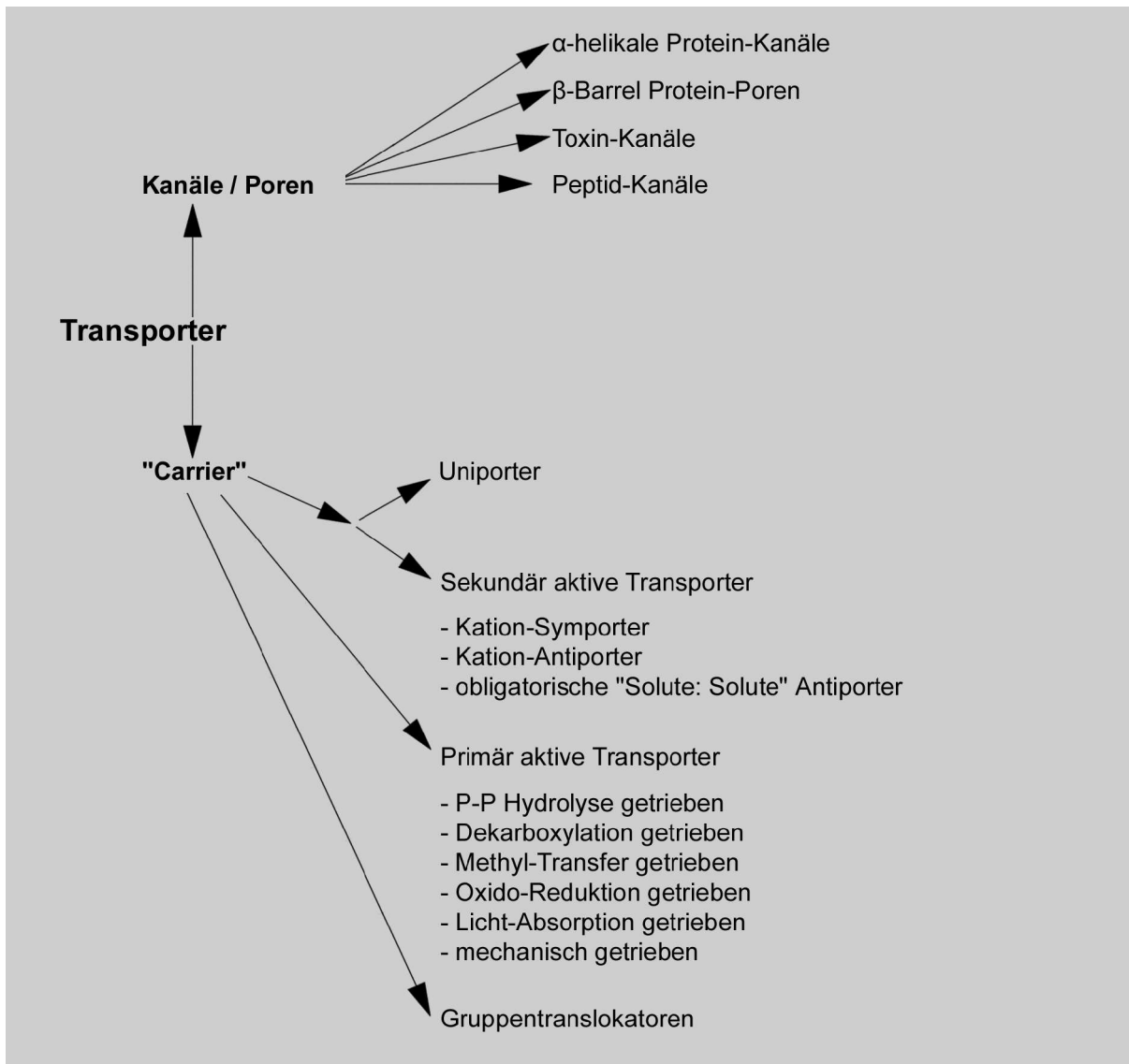
### 3.2.2. Sekundär aktive Transporter

Transportsysteme werden in die Klasse der sekundär aktiven Transporter aufgenommen, sobald eine sekundäre Energiequelle an dem Transportprozess beteiligt ist. Als sekundäre Energiequelle wird der elektrochemische Gradient gezählt, welcher durch „proton motive force“ PMF im Falle von Protonen oder SMF im Falle von Natrium-Ionen bewirkt wird. Bei den sekundär aktiven Transportern wird also die Bewegung einer Substanz entlang eines Konzentrationsgradienten genutzt, um ein anderes Substrat gegen einen Konzentrationsgradienten auf die andere Seite einer Membran zu befördern. Zu den sekundär aktiven Transporter gehört die große Gruppe der Uniporter, Symporter und Antiporter (Abb. 6). Während Uniporter eine molekulare Substanz entlang ihres Konzentrationsgradienten transportieren und dadurch unabhängig von der Bewegung bzw. Transport anderer Substrate sind, katalysieren Symporter bzw. Kotransporter den Transport von zwei oder mehreren Molekülen in dieselbe Richtung. Antiporter dagegen katalysieren den Austausch eines oder mehrere Substrate in die eine Richtung, gegen ein oder mehrerer Substrate in die andere Richtung (31). Dabei gibt es zwei Kategorien: den Antiport zwischen zwei gleichen Substanzklassen (z. B. Substrat-Substrat Antiport), oder den Antiport zwischen zwei unterschiedlichen Molekülen (z. B. Substrat-Kation Antiport). Früher hatte man die Uniporter, Symporter und Antiporter als Mitglieder einer Superfamilie von Transportern eingeordnet (79). Heute werden diese „Carrier“-Proteine in die große Gruppe der „Porter“ eingeordnet, die mehrere Transporter-Superfamilien enthält (31). Die meisten sekundären „Carrier“-Typ Transporter haben eine selektive Spezifität für anorganische Kationen und Anionen, jedoch werden auch die meisten organischen Substanzen von diesem Typ transportiert. „Carrier-Typen“ sind bei Prokaryonten und Eukaryonten zu finden und bestehen meistens aus acht bis 14 Transmembran-Domänen und bilden ein Monomer (204),

während „Carrier“-Typen mit vier bis sieben Transmembran-Domänen als Dimer funktionieren und eher bei eukaryontischen Organellen, wie Mitochondrien und Chloroplasten, vorzufinden sind (204). Zu den Uniportern gehört der Transport von Glycerol (212) und der Nitrat/Nitrit-Porter; zu den Symportern gehören die Phosphat/  $H^+$ , Nukleosid/ $H^+$ -Symporter und Alanin/Kation-Symporter, während zu den Familien der Antiporter die Transporter von  $Ca^{2+}$ /Kation, NhaA, B, C und D  $Na^+/H^+$  und Oxalat/Format gehören (204).

### 3.2.3. Gruppentranslokation

Bei diesem Typ von „Carrier“-vermitteltem Transport (Abb. 6) wird das Substrat während des Transportes chemisch modifiziert. Das am besten untersuchte Gruppen-Translokations-System ist das Phosphotransferase-System (PTS), bei dem das Zucker-Substrat (Glukose, Mannose und Fruktose) während des Transportvorganges phosphoryliert wird. Das PTS-System von *E. coli* besteht aus 24 Proteinen, cytoplasmatische und Membranproteine, von denen wenigstens vier nötig sind, um einen bestimmten Zucker zu transportieren. Die Phosphatbindung, welche die Energie für das PTS liefert, stammt aus dem Stoffwechselzwischenprodukt Phosphoenolpyrophosphat. Dabei werden die Proteine des PTS-Systems kaskadenartig phosphoryliert und dephosphoryliert bis das Transmembranprotein IIC-Enzym das Phosphat auf den Zucker im Transportvorgang überträgt (186, 199, 200). PTS-Systeme sind begrenzt nur bei den Eubakterien zu finden, so sind bisher keine in Archea und Eukaryonten gefunden worden (204).



**Abb. 6** TC-System nach Milton H. Saier (204).

#### 4. Zielsetzung der Arbeit

Als NAD<sup>+</sup>-auxotropher Organismus kann *H. influenzae* nur eine bestimmte Anzahl an Vorläufermolekülen verwerten. Die Enzyme, die an der NAD<sup>+</sup>-Prozessierung beteiligt sind, wurden erst kürzlich identifiziert. NAD<sup>+</sup>(P) und NMN müssen von e(P4) und NadN erst zu NR degradiert werden, bevor dieses in das Zellinnere aufgenommen werden kann und schließlich mit Hilfe von NadR wieder zu NAD<sup>+</sup> synthetisiert wird. Mit Blick auf das NAD<sup>+</sup>-Aufnahmesystem in *E. coli* und *S. typhimurium* wurde auch in *H. influenzae* ein NMN- bzw. NR-Transporter vermutet. Das Hauptziel dieser Arbeit war es, diesen Transporter zu identifizieren und charakterisieren. Ziel war es zu klären, ob dieser Transporter *in vivo* essentiell ist. Des Weiteren sollte die Protein-Topologie hinsichtlich der Membranlokalisation und strukturellen Funktion analysiert werden. Darüberhinaus sollte die Substratspezifität des Transporters, nicht nur bei *H. influenzae*, sondern auch bei *E. coli*, *P. multocida* und *A. actinomycetemcomitans* untersucht werden. Dabei waren Mutanten zu isolieren, die eine geänderte Substratspezifität besitzen. Im weiteren Verlauf sollte das Gen HI0308 als möglicher zweiter Transporter untersucht werden. Die Gencluster HI1078-HI1080 und HI0164-HI0171 sollten unter dem Aspekt der Energetisierung des Transporters studiert werden, wobei das Gencluster HI0164-HI0171 zusätzlich im Hinblick der Dehydrogenase-Aktivität genauer zu charakterisieren war. Ein weiteres Ziel war es den Transporter unter dem Aspekt als potentiell Angriffsziel für bestimmte Agentien (Therapeutika), wie 3-Aminopyridin-Derivate, zu untersuchen. Ein Hauptaugenmerk richtet sich dabei auf die Charakterisierung der Aufnahmeroute und Synthese von 3-AAD und auf die Isolierung von 3-Aminopyridinspontan-resistenten Mutanten.

### III. Material

#### 1. Bakterienstämme

Die Bakterienstämme wurden als Glycerinkulturen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Hierfür wurde 1 ml ÜN-Kultur mit 500  $\mu\text{l}$  (70%) Glycerin weggefroren.

#### 1.1. *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21	$F^{-} ompT hsdS_B (r_B^{-} m_B^{-}) gal dcm$	Novagen/Merck, Darmstadt
BL21pLysS	$F^{-} ompT hsdS_B (r_B^{-} m_B^{-}) gal dcm$ (DE3), pLysS ( $\text{Cm}^R$ )	Invitrogen
C600	$F^{-}[e14^{+}(\text{McrA}^{+})] thr-1 leuB6 thi-1 lacY1 glnV44 rfbD1 fhuA21$ ; EcoK $r^{+}m^{+}$ McrBC	NEB, Frankfurt
CC118	$araD139\Delta(ara leu)7697 \Delta lacX74 phoA\Delta20 galE galK thi rpsE rpoB argE_{am} recA1$	(149)
LE392	$F^{-}e14^{-}(\text{McrA}^{-}) hsdR514(r_K^{-}m_K^{+}) glnV44 supF58 lacY1/\Delta (lacIZY)6 galK2 galT22 metB1 trpR55$	(217)
MC4100	$F^{-} araD139 \Delta(argF-lac)U169 rpsL 150 (\text{Str}^R) relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR$	NEB, Frankfurt
TOP10F'	$F^{-}[lacI^q, \text{Tn}10(\text{Tet}^R)] mcrA\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi80 lacZ\Delta M15\Delta lacX74 recA1 deoR araD139\Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL (\text{Str}^R) endA1 nupG$	Invitrogen

**Tabelle 1** Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme.

1.2. *H. influenzae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>H. influenzae</i> Rd KW20	Rd-f/F-Horgon, A. Wrights (Isolat, ohne Kapsel)	(64)
BRAD	Rd KW 20 ( <i>tfoX</i> , <i>sxy-1</i> , Str <sup>R</sup> ), konstitutiv kompetent	(102)
Hib	Typ b-Kapsel	Eagan, Isolat G. Siber
Rd-b <sup>+</sup>	Typ b-Kapsel, virulente Form von Rd KW20	(10)
Rd-b <sup>+</sup> , ΔHI1077.1	Rd-b <sup>+</sup> , ΔHI1077.1:: <i>kan</i> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
SE01	BRAD, <i>hel</i> :: <i>nadV</i>	E. Sauer, 2002
SE02	SE01, Δ <i>pnuC</i> :: <i>kan</i> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
SE03	BRAD, Δ <i>pnuC</i> :: <i>kan</i> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
SE01ΔRNK	SE01, <i>nadR</i> ΔRNK:: <i>cat</i> , Cm <sup>R</sup>	M. Merdanovic
REI1010	Rd KW20, <i>nadN</i> :: <i>cat</i> , Cm <sup>R</sup>	(195)
REI1012	Rd KW20, Δ <i>hel</i> :: <i>kan</i> , Kan <sup>R</sup>	(127)
GK04	Rd KW20, <i>nadN</i> :: <i>cat</i> , Δ <i>hel</i> :: <i>kan</i> , Cm <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	(127)
GK04* <sup>1</sup>	Rd KW20, <i>nadN</i> :: <i>cat</i> Δ <i>hel</i> :: <i>kan</i> , Cm <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , NMN	diese Arbeit
GK04* <sup>2</sup>	Rd KW20, <i>nadN</i> :: <i>cat</i> , Δ <i>hel</i> :: <i>kan</i> , Cm <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , NMN	diese Arbeit
<i>H. influenzae</i> Δ <i>ompP2</i>	Rd KW20, Δ <i>ompP2</i> :: <i>cat</i> , Cm <sup>R</sup>	(8)
SE04	BRAD, <i>hel</i> <sup>+</sup> :: <i>nadV</i> <sup>+</sup> , Δ <i>pnuD</i> :: <i>cat</i> , Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
SE05	BRAD, <i>hel</i> <sup>+</sup> :: <i>nadV</i> <sup>+</sup> , Δ <i>pnuC</i> :: <i>kan</i> , Δ <i>pnuD</i> :: <i>cat</i> , Kan <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
SE06	Rd-b <sup>+</sup> , ΔHI1077.1:: <i>kan</i> , <i>ABC</i> :: <i>cat</i> , Kan <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> ,	diese Arbeit
SE07	SE01, Δ <i>nqr</i> :: <i>kan</i> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
SE08	Rd KW20, Δ <i>nqr</i> :: <i>kan</i> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
SE09	Hib, Δ <i>nqr</i> :: <i>kan</i> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit

**Tabelle 2** Die in dieser Arbeit verwendeten *H. influenzae*-Stämme.



### 1.3. Sonstige Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Salmonella enterica</i> sv. Typhimurium JF 214	<i>nadB::Tn10</i> , <i>pnuC9::MudJ</i> , Kan <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	John W. Foster
<i>Pasteurella multocida</i> A3 <i>Actinobacillus</i> <i>actinomycetemcomitans</i> CU4000N	Serogruppe A3	L. Weiler (60)

**Tabelle 3** Die in dieser Arbeit verwendeten *Actinobacillus*-, *Pasteurella*- und *Salmonella*-Stämme.

## 2. Plasmide und Oligonukleotide

### 2.1. Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pACYC184	Cm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	(203)
pAKcat	Cm <sup>R</sup>	
pSWFII	Amp <sup>R</sup>	M. Ehrmann
pUC4k	Kan <sup>R</sup>	(241)
pCR4-TOPO	Kan <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	Invitrogen
pCRT7-CT-TOPO	Amp <sup>R</sup>	Invitrogen
pCRT7-TOPOpnuCHis <sub>6</sub>	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pIVEX2.4b	Amp <sup>R</sup>	Roche Molecular Biochemicals
pIVEX-pnuCHis <sub>6</sub>	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEpnuC	Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEpnuC <sub>E. coli</sub>	Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEpnuC-His <sub>6</sub> C'	Tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEpnuC-His <sub>6</sub> N'	Tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEpnuC( <i>StuI</i> ) <sub>1-9</sub>	Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEphoA <sub>D39</sub>	Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEphoA <sub>V94</sub>	Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit

pSEphoA <sub>A150</sub>	Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEphoA <sub>E196</sub>	Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEphoA <sub>E10</sub>	Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEphoA <sub>S63</sub>	Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEphoA <sub>Q179</sub>	Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEphoA <sub>K220</sub>	Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSElacZ <sub>E10</sub>	Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSElacZ <sub>S63</sub>	Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSElacZ <sub>S118</sub>	Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSElacZ <sub>Q179</sub>	Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSElacZ <sub>K220</sub>	Cm <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEpnuC <sub>K61A</sub>	Tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEpnuC <sub>R175M</sub>	Tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEpnuC <sub>D158K/R175M</sub>	Tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
pMMnadR-His <sub>6</sub>	Amp <sup>R</sup>	M. Merdanovic
pSEnadV	Cm <sup>R</sup>	E. Sauer, 2002 (Diplomarbeit)

**Tabelle 4** Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

## 2.2. Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden bei den Firmen MWG Biotech bzw. Sigma-ARK bezogen.

Oligonukleotide	Sequenz (5' – 3')
PnuC-F1	5'-GGTTCTGCAATAAGTGCG-3'
PnuC-R1	5'-CAAGGATCCATGATTTTGCCGTTATCG-3'
PnuC-F2	5'-CTTGGATCCTGCTAACCAAGAATCAGG-3'
PnuC-R3	5'-AAACAGTTCTTGTTACAAGC-3'
pnuCE5'	5'-AAAGATATCCAATGCGAAAATGGTCACCTC-3'
pnuCKB3'	5'-AAAGGTACCGGATCCCCTTGGTTTGTGCGCTTGTC-3'
nadV5'EcoRV	5'-TAGATATCAGACTTATGTCTCGGAGTATAACG-3'
nadV3'EcoRV	5'-TTGATATCTCATAGCGTAGTGCGACTAAC-3'
hel5'PstI	5'-AAA <u>ACTGCAGCAGAA</u> AGACTTACTATAACCCTG-3'

hel3'EcoRV	5'-TCGATATCACAATGCGCTATTCTGACGGG-3'
PnuC1	5'-CGACGTTTCGTCAATGGTCTT-3'
PnuC2	5'-AACTGCAGGAGGTGACCATTTTCGCATTG-3'
I6	5'-AAAGGCCTGCGTACTAACTAAATATAAAAACAG-3'
PnuC4	5'-CCTTGGTTTGTTCGCTTGTCA-3'
5'-lacZ	5'-TTCCCGGGTTATGATTACGGATTCACTGGCCGTC-3'
3'-lacZ	5'-TTCCCGGGATAGTACATAATGGATTTCCCTTACGCG-3'
E.copnuC5'	5'-TTTGATATCTTTCGCGCTACACTACGTGGA-3'
E.copnuC3'	5'-AAAGGATCCAGACTGCCACCTGAATGAAG-3'
pnuC5'CHis	5'-ATGACTTTGGCAGCGCGTTTA-3'
pnuC3'CHis	5'-GTTAGTACGCTTAACTAACTAATTCGTCCAGTT-3'
nadRItopo5'	5'-GTGGGCTTACCACCGGTAGGGAAT-3'
nadRItopo3'	5'-TTGAGATGTCCCTTTTATAGGAAAG-3'
PnuC5'pIVEXHis	5'-TTACTCGAGACTTTGGCAGCGCGTTTAAAACA-3'
PnuC3'pIVEXHis	5'-ATTCTGCAGTTATATTTAGTTAGTACGCTTAAC-3'
CT-Topo5'	5'-AAAGAATTCAGACCACAACGGTTTCCCTCTA-3'
CT-Topo3'	5'-TTTAGTACTTGCTCAGCTAAGGTTTCTTCT-3'
pIVEX2.4b5'	5'-AAAGAATTCGAGACCACAACGGTTTCCCTCTA-3'
pIVEX2.4b3'	5'-TTTAGTACTTTCCTTTCGGGCTTTGTTAGCA-3'
aa D39 3'	5'-AAAGGCCTGAGGTGTTTGTACATAAGCCCAAAT-3'
aa D39 5'	5'-AAAGGCCTGGTTAGCAATGATTTCTGGTATTTTC-3'
aa V94 3'	5'-AAAGGCCTGGTAAAGTACGGTGTTCAATTCGCC-3'
aa V94 5'	5'-GGAGGCCTAATTTATTGGTTACTTTATGTGGAA-3'
aa S118 3'	5'-TTAGGCCTGTTCTCCACCATCGCTATTTTGCAT-3'
aa S118 5'	5'-AAAGGCCTGCGTGATTGCAAAAGCGTTAACTGT-3'
aa Q179 3'	5'-TTAGGCCTGTTACGATAACGCAAAATCATTA-3'
aa Q179 5'	5'-TTAGGCCTTGGTTGTTATGGATTGGATTAATA-3'
aa E196 3'	5'-AAAGGCCTGTCCCATAAGAAAATAGAAAGAAT-3'
aa A150 3'	5'-AAAGGCCTGCGCTTGTAATGCTTGAACAAAA-3'
aa A150 5'	5'-AAAGGCCTGCTGGTGGTAGCTCAACAGGTTT-3'
aa E10 3'	5'-TTAGGCCTGTTGTTTTAAACGCGCTGCCAAAGT-3'
aa S63 3'	5'-TTAGGCCTGAATTTTACCTTTACTTACCAATAC-3'
aa S63 5'	5'-AAAGGCCTGCCTATACTTATTTTTATGTTGCT-3'
aa K220 3'	5'-AAAGGCCTGCGTCCAGTTATAATAACCATACAA-3'

---

aa K220 5`	5`-AA <u>AGGCCT</u> GCGTACTAACTAAATATAAAAAACAG-3`
ArgzuMet5`	5`-GCGGCACAGATTTTAATGATTTTGA TGTATCGTGAACAATGG -3`
ArgzuMet3`	5`-CCATTGTTACGATACATCAAAATCATT AAAATCTGTGCCGC -3`
LyszuAla5`	5`-GTGGTATTGGTAAGTAAAGGT GCAATTAGTAATTATTTCTTTGG-3`
LyszuAla3`	5`-CCAAAGAAATAATTACTAATTGC ACCTTTACTTACCAATACCAC-3`
AspzuLys5`	5`-GGTAGCTCAACAGGTTTAAAAGGT CTAACTACAATTATTACG-3`
AspzuLys3`	5`-CGTAATAATTGTAGTTAGACCTTTT AAACCTGTTGAGCTACC-3`
GluzuGln5`	5`-GATTTTAATGATTTTGCGTTATCGTCA ACAATGGTTGTTATGG-3`
GluzuGln3`	5`-CCATAACAACCATTGTTGACGATAACGC AAAATCATTAAAATC-3`
per1	5`-TTTATTAGTCGGAACAGAAGG-3`
per2	5`-AA <u>CTGCAG</u> CAACATAGGCCAAAACGAGC-3`
atp1	5`-AA <u>CTGCAG</u> GCGGTCAATTTTTAGAGCG-3`
PnuD1	5`-ATCGATAGTACGCGTCATGCCA-3`
PnuD2	5`-AA <u>CTGCAG</u> GTAACCTAGAAAGCTCAGTGC-3`
PnuD3	5`-AA <u>CTGCAG</u> TCGCTATATCACCACGCAAC-3`
PnuD4	5`-CGACTGGGTAATTTAGGCGA-3`
NQR1	5`-CAAGTTGCGATTCTAGGTGAG-3`
NQR2	5`-TT <u>CTGCAG</u> TCGTTCTGAATAAAGTTCGCC-3`
NQR3	5`-AAAAAT <u>GCGCAG</u> CAACGGGTGAATACACACAA-3`
NQR4	5`-CTAAGGTA <u>ACTGCA</u> ATCGCCA-3`

---

**Tabelle 5** Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

### 3. Nährmedien und Medienzusätze

#### 3.1. Medien

Für die Herstellung von den in Tabelle 6 aufgelisteten Nährmedien für Flüssigkulturen und Agarplatten wurde entweder Wasser, welches über eine Filteranlage (Milli-Q-Plus, Millipore) entsalzt wurde, oder Ampuwawasser (Fresenius Kabi) verwendet. Die Medien wurden 20 min bei 120°C autoklaviert. Medienzusätze (Tabelle 8) wurden mit Ampuwa-Wasser angesetzt und anschließend autoklaviert, oder falls hitzeinstabil sterilfiltriert, und nach Abkühlen der Nährmedien auf ca. 50°C hinzugegeben.

Medium (Firma)	Zusammensetzung
<b>LB-Medium</b> (Gibco) 25 g/l H <sub>2</sub> O	1% Bactotrypton, 0,5% NaCl, 0,5% Hefeextrakt.
<b>BHI-Medium</b> (Difco) 37 g/0,8l H <sub>2</sub> O	20% Kalbshirninfusion, 25% Rinderherzinfusion, 1% Bacto Proteose Pepton, 0,2% Bacto Dextrose, 0,5% NaCl, 0,25% Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Minimalmedium (M1c)</b> (105)	<b>Lösung 1:</b> 800 ml H <sub>2</sub> O, 5,0 g L-Asparaginsäure, 13,0 g L-Glutaminsäure, 58,0 g NaCl, 10,0 g K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 4,0 g MgCl <sub>2</sub> , 0,294 g CaCl <sub>2</sub> , 0,037 g Na <sub>2</sub> EDTA, 2,2 g NH <sub>4</sub> Cl, pH 7,2 mit 10 N NaOH einstellen, ad 1l H <sub>2</sub> O, autoklavieren.

**Lösung 2:**

(Lösung A, B und C im Verhältnis 1:1:1):

**Lösung A:**

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,

in 100 ml 0,1 N HCl lösen, sterilfiltrieren.

**Lösung B:**

1,5 g L-Leucin,

in 100 ml 0,1 N HCl lösen, sterilfiltrieren.

**Lösung C:**

1g L-Tyrosin, in 20 ml 1 N HCl lösen,

ad 100 ml H<sub>2</sub>O, sterilfiltrieren.

**Lösung 3:**

0,1% (v/v) Tween 80, 0,1% (w/v) Polyvinylalkohol, 15%

(w/v) Glyzerin, 4,0 g Natriumlaktat,

ad 100 ml H<sub>2</sub>O, sterilfiltrieren.

**Lösung 4:**

0,2 g Uracil, 0,04 g Hypoxanthin,

ad 100 ml 0,1 N HCl, sterilfiltrieren.

**Lösung 5A:**

1,0 g Inosin, 1,74 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,36 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

ad 100 ml H<sub>2</sub>O, sterilfiltrieren.

alternativ:

**Lösung 5B:**

90 ml H<sub>2</sub>O, 1,0 g Inosin, 1,57 g Tris-HCl,

pH 7,4 mit NaOH einstellen, ad 100 ml H<sub>2</sub>O, sterilfiltrieren.

**Lösung 6:**

0,1 g Hämin, 0,1 g L-Histidin, 4% Triethanolamin,

ad 100 ml H<sub>2</sub>O, 30 min bei 65°C, sterilfiltrieren.

**Lösung 7:**

0,1 g NAD<sup>+</sup> (od. NR, NAm, NMN),  
0,1 g Thiamin, 0,1 g Pantothensäure,  
ad 10 ml H<sub>2</sub>O, sterilfiltrieren.

**100 ml 1xMIC-Medium:**

10 ml Lösung 1, 6 ml Lösung 2, 2 ml Lösung 3,  
5 ml Lösung 4, 20 ml Lösung 5A oder 5B,  
2 ml Lösung 6, 100 µl Lösung 7,  
20 mg L-Cystin in 1 ml 1 N HCl lösen,  
pH 7,2 mit 1-5 N NaOH einstellen,  
ad 100 ml H<sub>2</sub>O, sterilfiltrieren.

**MIV-Medium:**

(15)

**Lösung 21:**

850 ml H<sub>2</sub>O, 4,0 g L-Asparaginsäure,  
0,2 g L-Glutaminsäure, 1 g Fumarsäure, 4,7 g NaCl, 0,2 ml  
Tween 80, 0,87 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,67 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  
pH 7,4 mit 4-5 N NaOH einstellen,  
ad 1 l H<sub>2</sub>O, autoklavieren.

**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 H<sub>2</sub>O, sterilfiltrieren.

**Lösung 23:**

100 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung, autoklavieren.

**Lösung 24:**

100 ml 0,1 M MgSO<sub>4</sub>-Lösung, autoklavieren.

**Lösung 40:**

100 ml 5% (w/v) vitaminfreie  
Casaminosäuren-Lösung, sterilfiltrieren.

---

**100 ml MIV-Medium:** 100 ml Lösung 21, 1 ml Lösung 22, 1 ml Lösung 23,  
1 ml Lösung 24, 1 ml Lösung 40.

---

**Tabelle 6** Die in dieser Arbeit verwendeten Medien.

### 3.2. Agar

Medium (Herkunft)	Zusammensetzung
<b>LB-Agar:</b> (Gibco)	1% Bactotrypton, 0,5% NaCl, 0,5% Hefeextrakt, 1,5% Agar.
<b>BHI-Agar:</b> (Difco)	20% Kalbshirninfusion, 25% Rinderherzinfusion, 1% Bacto Proteose Pepton, 0,2% Bacto Dextrose, 0,5% NaCl, 0,25% Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,5% Agar.
<b>Mic-Agar (500 ml):</b>	250 ml 2xMic-Medium, 3,2% Agar, 250 ml H <sub>2</sub> O.
<b>Schoko-Agar (300 ml):</b>	2,34 g Caseinpepton, 2,34 g Fleischpepton bzw. Bactopepton, 0,84 g Hefeextrakt, 1,68 g NaCl, 4,5 g Agar, ad 300 ml H <sub>2</sub> O, autoklavieren, ad 21 ml Vollblut, 300 µl NAD <sup>+</sup> , 3 ml 10% Glucose.

---

**Tabelle 7** Der in dieser Arbeit verwendete Agar.



### 3.3. Medienzusätze

Je nach Bedarf wurden folgende Antibiotika, Faktor-V-Quellen und Indikatoren zugegeben. Diese wurden von den Firmen Sigma/Aldrich und Roth bezogen. Die Faktor-V-Quellen NMN und NR bzw. die 3-Aminopyridinderivative wurden, wie in Kapitel IV.5.1. und IV.5.2. beschrieben, selbst hergestellt.

Zusätze	Endkonzentration	Stammlösung
Ampicillin	6 µg/ml ( <i>H. influenzae</i> ) bzw. 100 µg/ml ( <i>E. coli</i> )	6 mg/ml bzw. 100 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Chloramphenicol	2 µg/ml ( <i>H. influenzae</i> ) bzw. 30 µg/ml ( <i>E. coli</i> )	2 mg/ml bzw. 30 mg/ml in 100% EtOH
Kanamycin	10 µg/ml ( <i>H. influenzae</i> ) bzw. 50 µg/ml ( <i>E. coli</i> )	10 mg/ml bzw. 50 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Tetracyclin	0,6 µg/ml ( <i>H. influenzae</i> ) bzw. 12 µg/ml ( <i>E. coli</i> )	1 mg/ml-12 mg/ml in 50% EtOH
NAm	60 µM	60 mM in H <sub>2</sub> O
NAD <sup>+</sup>	15 µM	15 mM in H <sub>2</sub> O
NMN	30 µM	30 mM in H <sub>2</sub> O
NR	15 µM	15 mM in H <sub>2</sub> O
Hämin	20 µg/ml	1 mg/ml Hämin, 1 mg/ml L-Histidin, 4% Triethanolamin
X-Gal <sup>1)</sup>	40 µg/ml	40 mg/ml N, N-Dimethylformamid
X-Phos <sup>2)</sup>	40 µg/ml	40 mg/ml in H <sub>2</sub> O
IPTG <sup>3)</sup>	0,8 µM	1 mM in H <sub>2</sub> O
3-AADP, 3-AAD, 3-AmR		100 mM in H <sub>2</sub> O

**Tabelle 8** Die in dieser Arbeit verwendeten Medienzusätze.<sup>1)</sup>: (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktose);  
<sup>2)</sup>: (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat-Dinatriumsalz); <sup>3)</sup>: Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid.

## 4. Verbrauchsmaterialien und Geräte

### 4.1. Chemikalien und Kits

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien, Enzyme und Kits wurden, soweit im Text nicht anders angegeben, von den Firmen Amersham Bioscience (Freiburg), Biolabs, BioRad, Boehringer (Ingelheim), Difco, Eppendorf (Hamburg), Fluka, Gibco-BRL, Greiner, Invitrogen, MWG, New England, Novagen/Merck (Darmstadt), Oxoid, Pharmacia Biotech, Qiagen (Hilden), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), Roth, Sigma/Aldrich (Taufkirchen) und Stratagene bezogen.

<b>Laborkit</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Extraction Kit	Qiagen
ECL-Hybridisierungskit	Amersham
Sequenzierkit	Amersham
Nucleobond AX Midi Kit	Macherey-Nagel
PCR T7 TOPO TA Expression Kit	Invitrogen
Protino <sup>R</sup> Ni 1000 prepacked columns kit	Macherey-Nagel

**Tabelle 9** Die in dieser Arbeit verwendeten Kits.

## 4.2. Größenmarker, Antikörper und Enzyme

Zur Größenbestimmung von DNS-Fragmenten wurde die 1 kb DNS-Leiter von Invitrogen und NEB verwendet. Für die Größenbestimmung von Proteinen wurde der Prestained Protein Marker von MBI Fermentas oder von NEB verwendet.

Zur Detektierung von His gekoppelten Proteinen wurde als erster Antikörper der Maus-Anti-Penta-His-Antikörper (monoklonal) von Qiagen und als zweiter Antikörper ein Ziege-Anti-Maus-HRP-Konjugat (monoklonal) von Dianova verwendet.

Enzyme	Bezugsquelle
DNAseI	Boehringer
Lysozym	Roth
Mastermix	Eppendorf
PAN-Polymerase	PAN-Systems
PfuUltra Polymerase	Stratagene
Proteinase K	Roth
Restriktionsenzyme	Invitrogen bzw. NEB
Ribonuklease A	Roche
T4 DNS-Ligase	Invitrogen
TripleMaster	Eppendorf

**Tabelle 10** Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme.

## 4.3. Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Chyo
Autoklaven	Teknomara
Blotter für Proteine (Semi-Dry)	BioRad
Brutschrank	Memmert
Cleanbench	Nuaire
DNS-Sequencer (LI-COR Modell 4000)	MWG-Biotech
ABI Prism	Applied Biosystems (Weiterstadt)

---

DNS-Elektrophoresekammer	MWG-Biotech
DNS-Vakuumblotter	Pharmacia Biotech
Elektroporationsgerät	EQUIBIO
Eismaschine	Scotman AF-20
Exponierkassette	Dr. Goos, Amersham
Geldokumentationsanlage	BioRad
Grobwaage	Chyo
Hybridisierungssofen	Hybaid (Ulm)
Hyperfilm ECL	Amersham
Kühlzentrifuge	Sorvall RC5B
Magnetrührer	GLW
Mikrowelle	Privileg
Netzgeräte	BioRad
PCR-Thermocycler	Eppendorf mastercycler gradient
pH-Meter	WTW pH 523
Photometer	Unicam 8625
Protein Laufkammer	BioRad
Schüttelinkubator	Celloshaker Renner
Speed-Vac, SL110	Savant, Holbrook, USA
Szintillationszähler	SL 6000SC, Beckman
Thermoblock	Falc
Tischzentrifuge	Heraeus Biofuge pico, Heraeus Biofuge fresco
Transport-Assay-Gerät	Eigenbau Uni Konstanz
UV-Crosslinker	Pharmacia
Ultrazentrifuge	Optima TL; Beckman Counter (Krefeld)
Vortexer	GLW
Wasserbad	GFL
Zellaufschluss	
(großer Maßstab): French Press	SLM Instruments/Thermo Spectronic (Madison, USA)
(kleiner Maßstab): Cell Shredder	Bio 101, Savant Instruments Inc. (New York)

---

**Tabelle 11** Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

## 5. Internetanwendungen

Der Nukleotid- und Aminosäuresequenz-Vergleich wurde mit folgenden Internetanwendungen bewerkstelligt. Ebenso sind in Tabelle 12 die Internetanwendungen aufgelistet, mit denen das ursprüngliche Transmembran-Topologie Modell von PnuC erstellt wurde.

Internetanwendung	Webseite
<u>Nukleotid- und</u>	
<u>Aminosäuresequenz-Vergleich:</u>	
BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
ClustalW 1.8	<a href="http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/">http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/</a>
Boxshade	<a href="http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html">http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html</a>
Blockmaker	<a href="http://blocks.fhcrc.org/blocks/blockmkr/make_blocks.html">http://blocks.fhcrc.org/blocks/blockmkr/make_blocks.html</a>
Tigr	( <a href="http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenePieChart.spl?db=ghi">http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenePieChart.spl?db=ghi</a> )
Interpro	( <a href="http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html">http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html</a> )
<u>Topologie:</u>	
Kyte Doolittle Hydropathy Plot	<a href="http://occawlonline.pearsoned.com/bookbind/pubbooks/bc_mcampbell_genomics_1/medialib/activities/kd/kyte-doolittle.htm">http://occawlonline.pearsoned.com/bookbind/pubbooks/bc_mcampbell_genomics_1/medialib/activities/kd/kyte-doolittle.htm</a>
TMPRED	<a href="http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/protein/">http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/protein/</a>
PRED-TMR	<a href="http://biophysics.biol.uoa.gr/cgi-bin/PRED-TMR/PRED-TMR">http://biophysics.biol.uoa.gr/cgi-bin/PRED-TMR/PRED-TMR</a>
“DAS”	<a href="http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/maindas.html">http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/maindas.html</a>
TMHMM	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</a>
SOSUI	<a href="http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/welcmeE.html">http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/welcmeE.html</a>

**Tabelle 12** Die in dieser Arbeit verwendeten Internetanwendungen.

## IV. Methoden

Falls nicht anders angegeben, sind allgemeine Methoden aus dem CSH Lab-Manual (209) und *H. influenzae* spezifische Methoden aus Barcak et al. entnommen (15).

### 1. Kultivierung von Bakterienstämmen

#### 1.1. Kultivierung von *H. influenzae*

*H. influenzae* wurde im allgemeinen aerob auf BHI-Medium kultiviert. Falls ein Versuch eine definierte Zusammensetzung des Mediums erforderte, wurde zur Kultivierung das Minimalmedium verwendet. Da *H. influenzae* eine Protoporphyrinquelle und eine Faktor-V-Quelle benötigt, wurde sowohl dem Flüssigmedium als auch dem Agar Häm in und die Kofaktoren  $\text{NAD}^+$ , NMN bzw. NR hinzugefügt. Für optimales Wachstum der Zelle sollte man *H. influenzae* aus einer Glycerinkultur zuerst auf BHI- bzw. Schoko-Platten ausstreichen, bevor eine Flüssigkultur angeimpft wird. Dabei benötigt *H. influenzae* ca. einen Tag um auf BHI- bzw. Schoko-Platten anzuwachsen, auf Minimalmediumplatten bis zu zwei Tage. Auf BHI-Agar-Platten ist *H. influenzae* bei Raumtemperatur bis zu vier Tage lebensfähig. Die Generationszeit von *H. influenzae* in BHI-Medium beträgt ca. 40 min. Die Zellen erreichen nach 2-4 h die log-Phase ( $\text{OD}_{490\text{nm}}$  0,9-1,5).

#### 1.1. Kultivierung von *A. actinomycetemcomitans* und *P. multocida*

*A. actinomycetemcomitans* wurde anaerob in einem Anaerocult mit einem GasPakPlus im BHI-Medium kultiviert. Für optimales Wachstum benötigt *A. actinomycetemcomitans* 2-3 Tage und bildet dabei sehr kleine, durchscheinende und auf Agarplatten fest haftende Kolonien mit einem sehr strengen charakteristischen Geruch.

*P. multocida* wurde ebenfalls in BHI-Medium, ohne Zugabe von  $\text{NAD}^+$ , aerob kultiviert. Bereits nach einem Tag bildet *P. multocida* sehr große, mukoide und weißliche Kolonien.

## 2. Molekulargenetische Methoden

### 2.1. Präparation von Plasmid-DNS

Die Isolierung von Plasmid-DNS wurde abgeleitet nach der Methode von Birnboim und Doly (21) und mit Hilfe der Plasmid-Kits der Firmen Qiagen und Macherey-Nagel durchgeführt.

#### 2.1.1. Midi-Präparation

100-250 ml einer Übernachtskultur (ÜN) wurden abzentrifugiert und das Pellet bei Raumtemperatur mit jeweils 8 ml Resuspensions- und Lysispuffer versetzt. Nach 5 min wurden 8 ml Neutralisationspuffer hinzugegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 30 min bei 4°C wurde der Überstand filtriert und auf eine mit 2,5 ml Equilibrierungspuffer behandelte Säule gegeben. Die gebundene DNS wurde mit 10 ml Waschpuffer gewaschen und mit 5 ml Elutionspuffer eluiert. Die Nukleinsäuren wurden mit 3,5 ml Isopropanol präzipitiert, nach einem Zentrifugierungsschritt von 30 min bei 13000 rpm wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Danach wurde die DNS getrocknet und in 100-200 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

<b>Resuspensions- puffer</b>	50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8	<b>Lysispuffer</b>	200 mM NaOH, 1% SDS
<b>Neutralisations- puffer</b>	2,8 M K-Acetat, pH 5,1	<b>Equilibrierungs- puffer</b>	100 mM Tris, 15% Ethanol, 900 mM KCl, 0,15% Triton X-100, pH 6,3 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>

---

<b>Waschpuffer</b>	100 mM Tris, 15% Ethanol, 1,15 M KCl, pH 6,3 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	<b>Elutionspuffer</b>	100 mM Tris, 15% Ethanol, 1 M KCl, pH 8,5 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
--------------------	--	-----------------------	---

### 2.1.2. Mini-Präparation

2 ml ÜN-Kultur wurden abzentrifugiert und das Pellet in 300 µl Resuspensionspuffer gelöst. Zum Aufschluss der Zellen wurden 300 µl Lysispuffer zugegeben; nachdem die Lösung geschwenkt wurde, wurde sie für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 300 µl Neutralisationspuffer zugegeben, die Lösung wurde invertiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (30 min, RT, 13000 rpm) wurde der plasmidhaltige Überstand in ein frisches Gefäß überführt und die DNS durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol gefällt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (30 min, RT, 13000 rpm) wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 30 µl H<sub>2</sub>O oder TE aufgenommen.

### 2.2. Präparation von chromosomaler DNS

2 ml einer ÜN-Kultur wurden 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert; das Pellet wurde in 1 ml TNE-Puffer resuspendiert und erneut 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 270 µl TNEX-Puffer aufgenommen und dem Lysat 30 µl Lysozym (5 mg/ml H<sub>2</sub>O) dazu pipettiert. Nach 20 min Inkubation bei 37°C wurde 15 µl Proteinase K (20 mg/ml H<sub>2</sub>O) dazugegeben und der Ansatz wurde bei 65°C für 2 h bzw. bis zum Klarwerden inkubiert. Der Ansatz wurde entweder gleich gefällt oder erst mit einem „Phase Lock Gel Light“-Gefäß (Eppendorf) aufgereinigt. Dazu wurde der klaren Lösung 1x Volumen Phenol (gesättigt mit TE, pH 8) dazugegeben und das Gemisch wurde invertiert und anschließend 10-15 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde mit 15 µl 5 M NaCl und 500 µl eiskaltes 100% Ethanol gefällt und anschließend für 5 min bei RT und 7000 rpm abzentrifugiert. Das DNS-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen; anschließend



getrocknet und in ca. 150  $\mu$ l H<sub>2</sub>O auf einem Schüttler resuspendiert, abgeleitet nach Grimberg et al. (86).

<b>TNE-Puffer</b>	10 mM Tris, pH 8,0, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 8,0 autoklavieren	<b>TNEX-Puffer</b>	TNE-Puffer, 1% Triton X 100, sterilfiltrieren
-------------------	---	--------------------	---

### **2.3. DNS-Linearisierung und Ligation von linearisierter Plasmid-DNS**

#### **2.3.1. DNS-Verdau mit Restriktionsenzymen**

Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNS an 4-6 langen, palindromen Erkennungssequenzen. Der Reaktionsansatz beinhaltet die zu spaltende Plasmid- oder chromosomale DNS, das entsprechende Enzym und den für das verwendete Enzym geeigneten Reaktionspuffer. Der Ansatz wurde für mind. 1 h (Plasmid-DNS) bzw. mind. 2-3 h (chromosomale DNS) bei der vom Hersteller für das Enzym angegebenen Temperatur inkubiert. Dabei spaltet 1 Enzymeinheit (Unit) der Restriktionsendonuklease 1  $\mu$ g DNS. Die gespaltenen Fragmente wurden anschließend durch eine Agarosegel-Elektrophorese sichtbar gemacht, überprüft und gegebenenfalls aus dem Gel isoliert.

#### **2.3.2. Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNS**

Wurden die DNS-Fragmente für eine Ligation benötigt, wurde dem Reaktionsansatz das Enzym CIP (calf intestine alkaline phosphatase) hinzugegeben. Dieses Enzym entfernt an den DNS-Fragmenten die endständigen 5'-Phosphatgruppen und verhindert so die Religation des Vektors. Dazu wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert.

### 2.3.3. Ligation von linearisierten DNS-Fragmenten

Um linearisierte Insert-DNS mit linearisierter Vektor-DNS zu ligieren wurde ein Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 15  $\mu$ l hergestellt. Hierfür wurden Vektor- und Insert DNS in einem molaren Verhältnis von 1:3, 5x Ligase-Puffer und 1  $\mu$ l T4-Ligase zusammen pipettiert und ÜN bei 16°C in einem Wasserbad inkubiert.

## 2.4. Polymerase-Ketten-Reaktion und Agarose-Gelelektrophorese

### 2.4.1. Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR)

Bei der PCR nach Saiki et al. wird ein bestimmter DNS-Bereich durch enzymatische Verlängerung der freien 3`-Enden zweier flankierender Oligonukleotid-Primer amplifiziert (206). Das verwendete Enzym, die DNS-Polymerase, stammt aus thermophilen Bakterien. Die PCR beginnt mit der Denaturierung der DNS in Einzelstränge bei 95°C. Anschließend folgt bei geeigneter Temperatur das Binden der Oligonukleotide (Annealing). Die Annealing-Temperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer, wobei für jedes hybridisierende AT-Paar 2°C und für jedes hybridisierende GC-Paar 4°C berechnet wurden. Schließlich folgt die Elongation der Primer durch die Polymerase bei 68-72°C. Je PCR-Reaktion wurden 30 Amplifikationszyklen durchgeführt, wobei jeder Zyklus 30 sec - 1 min Denaturierung bei 95°C, 30 sec - 1 min Primer-Annealing und 1 min Elongation pro kb des zu amplifizierenden DNS-Fragments bei 68-72°C umfasste. Die entstandenen PCR-Produkte wurden mittels eines analytischen Agarosegels überprüft.

#### Aufkoch-PCR:

Bei einer Aufkoch-PCR wird auf schnelle Weise chromosomale DNS freigesetzt und somit für die PCR bereitgestellt. Hierfür wurden Bakterienkolonien von einem ÜN-Ausstrich abgekratzt und in 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O gelöst. Die Zellen wurden dann für 10 min bei 100°C in einem Heizblock aufgekocht und anschließend für 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Im Überstand ist die freigesetzte DNS enthalten, welche unverdünnt in die PCR eingesetzt wird.

**Tripelmaster PCR System** (Eppendorf)

1 µl dNTPs (10 mM)  
1 µl Primer 1 (400 mM, 1:10)  
1 µl Primer 2 (400 mM, 1:10)  
2 µl DNS-Template (1-500 ng, 1:120)  
5 µl Puffer  
0,4 µl Triple Master Enzym Mix  
ad 50 µl H<sub>2</sub>O

**Mastermix PCR System** (Eppendorf)

20 µl MasterMix (2,5x)  
1 µl Primer 1 (400 mM, 1:10)  
1 µl Primer 2 (400 mM, 1:10)  
2 µl DNS-Template (1-500 ng, 1:120)  
ad 50 µl H<sub>2</sub>O

**PAN-Polymerase**

2,5 µl NH<sub>4</sub>  
1,25 µl MgCl  
0,5 µl Primer 1 (400 mM, 1:10)  
0,5 µl Primer 2 (400 mM, 1:10)  
0,5 µl dNTPs (10 mM)  
2 µl DNS-Template (1-500 ng, 1:120)  
0,1 µl PAN-Polymerase  
ad 25 µl H<sub>2</sub>O

**2.4.2. Ortsgerichtete Mutagenese**

Die Erzeugung einzelner Basenaustausche in Plasmid-DNS erfolgte weitgehend nach der Vorschrift des „Quik Change<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene). Für den gezielten Austausch der gewünschten Basen wurden zunächst Primer konstruiert, die komplementär zueinander gerichtet waren und in der Mitte die gewünschte Mutation trugen. Nach durchgeführter PCR mit Hilfe der Pfu-Ultra-Polymerase wurde die methylierte Ausgangs-DNS durch *DpnI* abgebaut, während die mutierte, neu synthetisierte und nicht methylierte DNS erhalten blieb. Da die neu synthetisierte DNS zwei versetzte Strangbrüche („nicks“) aufweist, wurde der Ansatz anschließend in einem *E. coli*-Stamm (BL21) transformiert, der die „nicks“ durch Ligation reparierte.

**Site-Directed Mutagenesis PCR-Ansatz**

5 µl Puffer (10x)

5-50 ng DNS-Template

1 µl Primer 1 (125 ng)

1 µl Primer 2 (125 ng)

1 µl dNTPs (10 mM)

ad 49 µl H<sub>2</sub>O

1 µl Pfu-Ultra-Polymerase (2,5 U/µl)

**2.4.3. Horizontale Agarose-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von DNS-Molekülen nach ihrer Größe erfolgt mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese. Dabei richtet sich die Agarosekonzentration und die angelegte Spannung nach der Größe der aufzutrennenden DNS-Fragmente. Die gewünschte Menge an Laufpuffer (1xTAE) wurde mit Agarose versetzt und in der Mikrowelle aufgekocht. Nachdem sich die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt hatte, wurde sie luftblasenfrei in eine Gelkammer mit dem entsprechenden Probenkamm gegossen. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde es in eine Gelkammer mit dem entsprechenden Laufpuffer gelegt und die Kämmen konnten entfernt werden. Schließlich wurden die DNS-Proben mit 5 x Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zur Größenbestimmung wurde neben den Proben auch eine 1 kb DNS-Leiter aufgetragen. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel in ein Ethidiumbromidbad (EtBr) gelegt. Da EtBr in die DNS interkaliert, konnten die DNS-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

**50 × TAE**            242 g Tris,  
                             57,1 ml Eisessig,  
                             100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0),  
                             ad 1 l H<sub>2</sub>O

#### 2.4.4. Elution von DNS-Fragmenten

DNS-Fragmente wurden nach dem Protokoll des Qiaquick Gel-Extraktionkits (Qiagen) aufgereinigt. Dazu wurden die gewünschten Banden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt und nach Anleitung weiterbehandelt. Die DNS wurde zum Schluss in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, und ein Aliquot von 1-5 µl zur Überprüfung auf ein Gel aufgetragen.

#### 2.4.5. DNS-Konzentrationsbestimmung

Die DNS-Konzentration einer Lösung kann mit Hilfe eines Spektralphotometers photometrisch bestimmt werden. Hierfür wurde die DNS-Lösung zuvor 1:50 bzw. 1:100 verdünnt und in einer Quartzküvette bei 260 nm, 280 nm und 230 nm mit Wasser als Referenz vermessen. Die Berechnung der DNS-Menge erfolgt über das Programm des Spektralphotometers. Aus dem Verhältnis der Extinktionskoeffizienten (E) bei den verschiedenen Wellenlängen lässt sich eine Aussage über die Reinheit der DNS treffen. So sollte  $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$  nicht kleiner als 1,8 und  $E_{260\text{nm}}/E_{230\text{nm}}$  nicht kleiner als 2,2 sein (209).

### 2.5. Southern-Blot

Bei dem Southern Blot Verfahren wird das DNS-Bandenmuster eines Agarosegels auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Die Nylonmembran wird anschließend mit einer markierten DNS-Sonde behandelt, die nur an komplementäre DNS-Fragmente hybridisiert und so die gewünschten DNS-Fragmente identifiziert (225).

#### 2.5.1. DNS-Transfer aus Agarosegelen auf Membranen

Die DNS wurde bei einem ÜN-Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten und danach auf einem Agarosegel elektrophoretisch 2-3 h bei ca. 100 V aufgetrennt. Das durch EtBr angefärbte Gel wurde dann mit einem fluoreszierenden Lineal, welches später für die Zuordnung der Größen des Hybridisierungssignals benötigt wurde, fotografiert. Die Übertragung der DNS auf eine Nylonmembran (Hybond-N<sup>+</sup>) erfolgte mit

einer Vakuumblot-Apparatur (VakuGeneBlotter). Dazu wurde die Membran, von der Größe des Gels, auf die Blotapparatur und darüber eine Maske, die kleiner war, gelegt. Das Gel wurde auf die Maske gelegt und ein Unterdruck von 50 mbar wurde erzeugt. Während dieses Vorgangs folgten mehrere Waschstritte. Das Gel wurde erst 15 min lang mit einer Depurinierungslösung überschichtet, dann 20 min lang mit einer Denaturierungslösung überschichtet; die Farbe des Probenpuffers wechselte dabei von blau zu grün und wieder zu blau. Zuletzt wurde das Gel für 20-30 min mit einer Neutralisierungslösung überschichtet, danach wurde die DNS, durch Überschichten des Gels für 1 h mit 20xSSC, auf die Membran transferiert. Nach dem Blotten wurde die Membran kurz in 2xSSC geschwenkt und auf Whatman-Papier getrocknet. Anschließend wurde die DNS durch UV-Bestrahlung (UV-Crosslinker) kovalent an die Membran gebunden.

**Depurinierungslösung:**

250 mM HCl

**Denaturierungslösung:**

1,5 M NaCl,

0,5 M NaOH

**Neutralisierungslösung:**

0,5 M Tris/HCl,

1,5 M NaCl,

pH 7,5

**20xSSC:**

88,2 g Natriumcitrat 0,3 M,

175,3 g NaCl 3 M,

ad 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7,0

### 2.5.2. Southern-Hybridisierung mit dem ECL-Kit

Die DNS-Sonden-Markierung und anschließende Hybridisierung wurde mit Hilfe des ECL-Kits der Firma Amersham durchgeführt (Enhanced Chemiluminescence). Dabei wird der positiv geladene Enzymkomplex der Meerrettich-Peroxidase mit Hilfe von Glutaraldehyd kovalent an die negativ geladene Sonden-DNS gebunden. Für die Vorhybridisierung wurde die Nylonmembran mit der darauf fixierten DNS in ein Hybridisierungsröhrchen aufgerollt mit 25 ml Hybridisierungslösung versetzt und 1 h bei 42°C im Hybridisierungsofen vorhybridisiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Zu diesem Mix wurde anschließend die DNS-Sonde gegeben. Die markierten Oligonukleotide haben über Nacht bei 42°C spezifisch an die fixierte DNS gebunden. Am folgenden Tag wurde die hybridisierte Nylonmembran einmal für 20 min und zweimal für 10 min bei 42°C mit dem Waschpuffer I gewaschen. Anschließend folgte zweimaliges Waschen, mit Lösung II (2xSSC) für 5 min.

**Waschpuffer I:**

360 g Urea 6 M,  
4 g SDS,  
25 ml 20 × SSC,  
ad 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7,0

**2.5.3. Entwicklung des Blots**

Zum Entwickeln des Blots wurde die Membran in eine Schale gelegt und für 1 min in den unmittelbar zuvor, im Verhältnis 1:1, gemischten ECL-Detektionslösung I (Luminol, p-Coumarsiure, Tris-HCl pH 8,5) und ECL-Detektionslösung II (Tris-HCl pH 8,5 + 30%iger Wasserstoffperoxidlösung) geschwenkt, in Cellophanfolie eingewickelt und mit der DNS-Seite nach oben in Expositionskassete gelegt. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurde auf die Membran ein Hyperfilm-ECL aufgelegt und je nach Stärke des Signals zwischen 10 sec und 1 h exponiert. Die Reaktion des Peroxidaseenzym mit dem Wasserstoffperoxid bewirkt die Änderung der Ringkonformation des Luminols und hat letztlich die Lichtemission zur Folge.

**2.5.4. Dehybridisierung des Blots (Strippen)**

Nach der Exponierung der Membran kann die gebundene Sonde auch wieder entfernt werden. Dazu wurde 0,5% SDS in der Mikrowelle aufgeköcht und kochend heiß über den Blot gegossen. Auf den Schüttler wurde der Blot auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurde der Blot kurz in 2×SSC gewaschen. Anschließend konnte der Blot für eine neue Vorhybridisierung mit einer anderen DNS-Sonde verwendet werden.

## 2.6. Herstellung kompetenter Bakterienzellen

### 2.6.1. Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen für Elektroporation

150-200 ml LB-Medium wurden mit 2 ml einer ÜN-Kultur angeimpft und bei 37°C in einem Rotationsschüttler bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1.0 inkubiert. Anschließend wurden sie in sterile Becher gefüllt und bei 5000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 ml eiskaltem, sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert und erneut für 10 min zentrifugiert. Der Vorgang wurde mit dem halben Volumen H<sub>2</sub>O wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 50 ml kalter, steriler 15% Glycerinlösung resuspendiert und wieder für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen, der im Zentrifugenröhrchen verbleibende Glycerinrest reicht für das Resuspendieren der Zellen. Die kompetenten Bakterienzellen wurden in Aliquote von 50-100 µl bei -80°C eingefroren (33).

### 2.6.2. Herstellung kompetenter *H. influenzae* Zellen

35 ml vorgewärmtes BHI-Medium wurden mit einer vom Vortag frisch ausgestrichenen *H. influenzae* Kultur angeimpft und in einem Rotationsschüttler bei 37°C bis zu einer OD<sub>490</sub> von 0,4-0,6 inkubiert. Die Kultur wurde bei 5000 rpm für 5 min abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 10 ml vorgewärmtem MIV-Medium (Tabelle 6) resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Bakterien in 35 ml MIV-Medium resuspendiert und für 90 min bei 37°C langsam (100 rpm) geschüttelt. Die Zellen konnten nun direkt für die Transformation eingesetzt werden oder mit 1/3 Vol. 70% Glycerin versetzt und so als Aliquote von 1,25 ml bei -80°C gelagert werden (15).

## 2.7. Transformation kompetenter Zellen

### 2.7.1. Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Bei der Elektroporation werden die Zellen kurzzeitig einem elektrischen Feld (2,5 kV; 25 µF; 200 Ω) ausgesetzt, welches die Porenbildung in der Membran fördert und so die Aufnahme von chromosomaler und Plasmid-DNS erleichtert (33). Weggefrorene Aliquots der kompetenten Zellen wurden auf Eis langsam aufgetaut. Zu den Zellen wurde



anschließend die zu transformierende DNS (0,5 µg Plasmid-DNS bzw. 1-5 µl Ligationsansatz) hinzupipettiert. Der Ansatz wurde in gekühlten Elektroporationsküvetten überführt, für 10 min auf Eis inkubiert und elektroporiert (GenePulser). Nach dem elektrischen Impuls wurden die Zellen sofort in 1 ml LB-Medium überführt und für 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien auf Selektionsplatten ausplattiert.

### **2.7.2. Transformation von MIV-kompetenten *H. influenzae* Zellen**

Aliquote eingefrorener, MIV-kompetenter Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und für 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml MIV-Medium gewaschen und erneut für 5 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 250 µl MIV-Medium resuspendiert und in ein kleines Reagenzglas überführt. Den Bakterien wurde 1-5 µg chromosomale DNS oder 10-15 µg Plasmid-DNS dazu gegeben. Anschließend wurde der Ansatz für 30-40 min ohne Schütteln bei 37°C inkubiert. Der Transformationsansatz wurde dann mit 1 ml vorgewärmtem BHI-Medium versetzt und für 90 min ohne Schütteln und für weitere 90 min mit Schütteln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf Selektionsplatten ausplattiert (15).

### **2.7.3. Transformation von *H. influenzae* BRAD**

Der Stamm *BRAD* ist eine konstitutiv kompetente *H. influenzae*-Mutante, die für eine G zu A Transition im *tfoX*-Gen kodiert (siehe Diplomarbeit von M. Rodenburg, 1998). 10 ml BHI-Medium wurden mit *H. influenzae BRAD* von einer, am Vortag frisch ausgestrichenen Platte angeimpft. Die Kultur wurde für 2-3 h bei 37°C und einer OD<sub>490</sub> 0,8-1,0 zum Schütteln gebracht. Anschließend wurde der Kultur 1 ml entnommen und in ein frisches Reagenzglas pipettiert. Nach DNS-Zugabe (Plasmid-DNS: 10 µg; chromosomale DNS: 1-5 µg) wurde der Ansatz bei 37°C für 30 min ohne Schütteln und für weitere 40 min mit Schütteln inkubiert und auf Selektionsplatten ausplattiert.

## 2.8. DNS-Sequenzierung

### 2.8.1. Sequenzierung mit dem LiCor System

Die Sequenzier-PCR läuft nach dem gleichen Prinzip ab wie die Amplifizierungs-PCR. In den vier Reaktionsansätzen (A, C, G, T) befinden sich neben den jeweiligen dNTPs auch die entsprechenden Dideoxynukleotide, die am 3'-Ende keine OH-Gruppe besitzen. Es kommt daher zu statistisch verteilten Kettenabbrüchen (211). Bei dem automatischen Sequenzer Modell 4000 (Li-COR) werden fluoreszenzmarkierte Primer (IRD 800, MWG) verwendet. Die entsprechend mit Fluoreszenzfarbstoff markierten DNS-Fragmente werden über ein Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und dabei mit einem Laserstrahl abgetastet. Dadurch wird der Fluoreszenzmarker zur Emittierung von Licht angeregt. Diese Signale werden detektiert, von einem Computer gespeichert und ausgewertet.

100 ng DNS pro kb Template wurden mit 1 pmol Sequenzierprimer, 3 µl des Prämixes und je 1 µl Terminations-Mix (jeweils für die Basen A, C, G und T) in einem Gesamtvolumen von 13 µl aufgenommen. Der Ansatz wurde gemischt, abzentrifugiert und mit einem Tropfen Paraffinöl überschichtet (Sequenzier-Kit von Amersham). Die Reaktion bestand aus 30 Zyklen zu folgenden Bedingungen (Schritt 2-4 wurden 30x wiederholt):

Schritt	Vorgang	Temperatur	Zeitdauer
1	Denaturierung der DNS	95°C	2 min
2	Denaturierung der DNS	95°C	15 sec
3	Annealing des Primers	T <sub>m</sub> + 3°C	30 sec
4	Elongation der DNS	70°C	15 sec

Nach Beendigung der PCR wurde zu jedem Ansatz 3 µl Stopuffer pipettiert. Jeweils 1,5 µl wurden auf ein Acrylamid-Sequenziergel aufgetragen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der unterschiedlichen Fragmente wurden die Sequenzen mit Hilfe des Computerprogramms Autoassembler 2.1 der Firma Perkin Elmer und dem Programm DNS-Strider ausgewertet. Homologievergleiche wurden mit Hilfe der in Tabelle 12 aufgeführten Internetanwendungen durchgeführt.

### 2.8.2. Sequenzierung mit dem ABI Sequenzer

Bei Sequenzierungen mit dem ABI-Sequenzer wurde das ABI-PRISM™-Protokoll als Vorlage benutzt. Für den Reaktionsansatz wurde entweder 10-100 ng gereinigtes PCR-Produkt oder 200-500 ng Plasmid-DNS verwendet. Weiterhin wurden dem Ansatz 15-50 pmol Primer und 4 µl AmpliTaq<sup>R</sup>FS BigDyeTerminator-Prämix, der entsprechend fluoreszenzmarkiert ist, beigemischt. Bei Bedarf wurde mit H<sub>2</sub>O auf 10 µl Endvolumen aufgefüllt. Die anschließende PCR-Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt (Schritt 2-4 wurden 25x wiederholt):

Schritt	Vorgang	Temperatur	Zeitdauer
1	Denaturierung der DNS	96°C	2 min
2	Denaturierung der DNS	96°C	10 sec
3	Annealing des Primers	T <sub>m</sub> des Primers (45 – 60°C)	5 sec
4	Elongation der DNS	60°C	4 min

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurde der Ansatz gefällt. Hierfür wurden 80 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl 3 M NaAc (pH 4,6) und 250 µl 100% EtOH (RT) dazugegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt von 15 min bei 15000 rpm wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 250 µl 70% EtOH (RT) gewaschen. Anschließend wurde erneut für 5 min bei 15000 rpm zentrifugiert und das Pellet für 5 min in einer Speed-Vac getrocknet. Bevor die Probe auf das Sequenzier-Gel geladen werden konnte, wurde das Pellet in 25 µl TSR aufgenommen und für 2 min bei 90°C auf einem Heizblock denaturiert.

### 3. Proteinbiochemische Methoden

#### 3.1. Präparation von Periplasma-Extrakten

10 ml eines geeigneten Mediums (LB- oder BHI-Medium) werden mit einer vom Vortag frisch ausgestrichenen *E. coli* oder *H. influenzae* Kultur angeimpft und in einem Schüttler bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> bzw. OD<sub>490</sub> von 2 inkubiert. Die Kultur wurde anschließend für 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und in 3 ml PBS-Puffer mit 140 mM NaCl gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren zu gleichen Bedingungen wurde das Pellet in 100 µl Polymyxin B (Sigma/Aldrich) (2 mg/ml in PBS-Puffer mit 140 mM NaCl) für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die ungeöffneten Zellen für 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand enthielt die periplasmatischen Proteine und konnte bei -20°C weggefroren werden.

#### 3.2. Überexpression von *H. influenzae* PnuC in *E. coli*

Für die Überexpression von PnuC wurden die Plasmide pSEpnuC-His<sub>6</sub>C' und pSEpnuC-His<sub>6</sub>N' immer frisch in die chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen BL21(DE3)pLysS oder in die elektrokompetenten *E. coli*-Zellen BL21(DE3) nach dem Protokoll des pCRT7 TOPO TA Expression Kits von Invitrogen transformiert. Nach der Transformation wurden die Zellen ÜN in 10 ml LB-Medium und 0,7 µg/ml Tetracyclin bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Kultur mit 10-25 ml frischem LB-Medium überimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> 0,6-0,8 bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur mit 0,8 mM IPTG induziert und bei 18°C ÜN weiterhin in einem Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Kultur bei 5000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert, anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und die Membranfraktion isoliert.

#### 3.3. Isolierung der Membranfraktion von PnuC aus *E. coli*

Nachdem PnuC ÜN bei 18°C exprimiert wurde (siehe Kapitel IV.3.2), konnte das Zellpellet am nächsten Tag in 100 µl 50 mM Hepes-Puffer (pH 7,5) resuspendiert werden. Dem Ansatz wurden 100 mg Glasperlen (Ø 0,17-0,18 mm) und Proteinaseinhibitor

zugegeben, anschließend wurde das Gemisch für 1 h auf einem Schüttler im 4°C-Raum stark geschüttelt. Die Glasperlen und die groben Zelltrümmer wurden für 2x2 min bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann für 20-30 min bei 70000-90000 rpm in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand dieses Zentrifugationsschrittes wurde zur Kontrolle bei 4°C aufgehoben, während das Pellet so weit es möglich war in 40 µl 50 mM Hepes-Puffer (pH 7,5) mit 2% Triton X-100 resuspendiert und ÜN bei 4°C leicht geschüttelt wurde. Am nächsten Tag wurden die Proben mit 50 mM Hepes-Puffer (pH 7,5) im Verhältnis 1:3 verdünnt, so dass die Triton X-100 Konzentration auf 0,5% verdünnt wurde. Bevor die Proben auf ein SDS-Gel geladen und im Western-Blot überprüft werden konnten, wurden sie für 30 min bei 37°C inkubiert.

### **3.4. Isolierung der Membranfraktion von PnuC aus *H. influenzae***

25 ml BHI-Medium wurden mit einem vom Vortag frisch ausgestrichenem *H. influenzae*-Stamm angeimpft und bis zu einer OD<sub>490</sub> 2 bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Mit dem Pellet wurde anschließend wie in Kapitel IV.3.3. verfahren.

### **3.5. Isolierung der Membranfraktion von NQR**

500 ml BHI-Medium wurden mit einer *H. influenzae* ÜN-Kultur im Verhältnis 1:25 – 1:50 überimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>490</sub> 2 in einem Rotationsschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und das Pellet wurde mit 20 ml Puffer 1 gewaschen. Nach einem erneutem Zentrifugationsschritt von 10 min bei 5000 rpm wurde das Pellet in 1 ml Puffer 2 gut resuspendiert und Proteinaseinhibitor dazugegeben. Die Zellen wurden anschließend mit dem Cell Shredder (Fast Prep 120) für 2x20 sec auf höchster Stufe (6,5) aufgeschlossen. Zum Entfernen der Glasperlen und groben Zelltrümmer wurde das Lysat für 2x5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann für 30 min bei 90000 rpm in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Membranpellet wurde dann in 500 µl Puffer 1 resuspendiert und für den anschließenden β-NADH-Assay bereitgestellt bzw. mit 10% Glycerin bei –20°C weggefroren.

---

<b>Puffer 1</b>	10 mM Hepes-Tris, 5 mM MgSO <sub>4</sub> , pH 7,5	<b>Puffer 2</b>	10 mM Hepes-Tris, 5 mM MgSO <sub>4</sub> , 1 mM DTT, pH 7,5
-----------------	---	-----------------	--

### 3.6. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde abgeleitet nach der Methode von Bradford mit Hilfe der Roti-Nanoquant-Färbelösung der Firma Roth durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird eine Eichgerade erstellt, deren Lösungen aus 800 µl (1:5 verdünnter) Roti-Nanoquant-Färbelösung und von 10 µl bis 200 µl aufsteigender Konzentration an (1:100 verdünntem) BSA besteht, beginnend mit 200 µl reinem H<sub>2</sub>O. Anschließend wird die OD<sub>590</sub> und die OD<sub>450</sub> aller Ansätze gegen reines H<sub>2</sub>O als Referenz gemessen und der Quotient OD<sub>590</sub>/OD<sub>450</sub> gegen die eingesetzte BSA-Menge eingetragen. Die photometrische Bestimmung wurde auf die gleiche Weise mit dem eigentlich zu bestimmendem Protein, welches zuvor 1:5 bzw. 1:10 verdünnt wurde, durchgeführt. Die Proteinmenge der Probe konnte anhand der zuvor erstellten Eichgerade abgelesen werden (abgeleitet nach Bradford (25))

### 3.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte durch eine diskontinuierliche Vertikalgelelektrophorese in einem SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) (139). Der SDS-Laufpuffer und die Lösungen zum Gießen der Gele wurden nach der Methode von Sambrook et al. hergestellt (209). Für das Gießen der PAA-Gele, bestehend aus einem Trenngel und einem Sammelgel, wurde eine verkaufsfertige Lösung aus 80% Acrylamid und 0,8% Bisacrylamid (Gel 30, Roth) verwendet. Die Polyacrylamid-Endkonzentration im Gel betrug je nach Größe des zu untersuchenden Proteins 10-15%. Den Proben wurde vor dem Auftragen auf das Gel 5xLämmli-Puffer zugegeben. Die Auftrennung erfolgte in einer Mini Protein 3 Zell-Kammer (BioRad) bei 20-50 mA, je nach Protein und Anzahl der Gele. Dabei wandern die SDS-komplexierten und somit negativ geladenen Proteine zur Anode. Nach der

Auftrennung wurde das PAA-Gel entweder Coomassie gefärbt oder direkt für den Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran für einen Western-Blot eingesetzt.

<b>5xSDS-Laufpuffer</b>	<b>Trenngel (12%)</b>	<b>Sammelgel</b>
15,1 g Tris,	2,5 ml Lsg. B,	1,25 ml Lsg. C,
94 g Glycin,	4 ml Gellösung,	0,65 ml Gellösung,
in 900 ml H <sub>2</sub> O lösen,	3,45 ml H <sub>2</sub> O,	3,07 ml H <sub>2</sub> O,
50 ml SDS,	50 µl 10% APS,	25 µl 10% APS,
ad 1 l H <sub>2</sub> O	5 µl TEMED	5 µl TEMED
<b>Lösung B</b>	<b>Lösung C</b>	
8,75 ml 2M Tris (pH 8,0),	6,85 ml 1 M Tris (pH 8),	
4 ml 10% SDS,	4 ml 10% SDS,	
21 ml H <sub>2</sub> O	46 ml H <sub>2</sub> O	
<b>5xLämmli-Puffer</b>	<b>Lösung I</b>	<b>Lösung II</b>
(Lösung I und II zu	1,1 g SDS,	0,2% Bromphenolblau
gleichen Teilen mischen)	0,41 g EDTA,	in 50% Glycerin
	0,17 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,	
	1,1 ml β-Mercaptoethanol	

### 3.8. Coomassie-Färbung

Das PAA-Gel wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung in einer Coomassie-Färbelösung gefärbt. Dazu wurde das Gel in eine mit der Färbelösung gefüllten Schale gelegt und für ca. 1 h leicht auf einem Schüttler geschwenkt. Der Hintergrund wurde anschließend mit der entsprechenden Entfärberlösung für 1-2 h behandelt, so dass nur noch die Proteinbanden zu sehen waren.

<b>Coomassie-Färbelösung</b>	40% Methanol bzw. 40% Ethanol, 10% Eisessig, 0,2% Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva, Heidelberg)
<b>Entfärbelösung</b>	40% Methanol bzw. 40% Ethanol, 10% Eisessig

### 3.9. Western-Blot

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurde das Western-Blot-Verfahren eingesetzt (243). Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond, Amersham) erfolgte elektrophoretisch mit Hilfe einer Semi-Dry Apparatur (BioRad) bei 20 V für 30 min. Hierfür wurden zuerst die Nitrocellulose-Membran und 12 Stücke Whatman-Papier auf die Größe des Gels zugeschnitten und in Transferpuffer gut angefeuchtet. Anschließend wurden im „Sandwich-Verfahren“ 6 Stücke Whatman-Papier, die Membran, das Gel und die restlichen 6 Stücke Whatman-Papier luftblasenfrei aufeinander gelegt und geblottet. Die folgenden Schritte des Western-Blots sind dem „QIAexpress Detection and Assay Handbook 10/2002“ von Qiagen entnommen. Nach dem Blotten wurde die Membran mit TBS-Puffer 2x für 10 min gewaschen. Anschließend wurden die noch freien Proteinbindestellen auf der Membran mit 3% BSA für 1h bei RT oder ÜN bei 4°C in TBS-Puffer abgesättigt. Nach 2x Waschen für 10 min in einem TBS-Tween/Triton-Puffer, wurde die Membran für weitere 10 min in TBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem Maus-Anti-Penta-His-Antikörper für 1 h bei RT inkubiert, dabei wurde der Antikörper in einer Verdünnung von 1:4000 in 3% BSA in TBS-Puffer verwendet. Die Membran wurde dann 2x für 10 min in TBS-Tween/Triton-Puffer und 1x in TBS-Puffer gewaschen, um sie dann mit dem zweiten Antikörper (Ziege-Anti-Maus-HRP-Konjugat) für eine weitere 1h bei RT zu inkubieren. Der Peroxidase gekoppelte Antikörper wurde in 10% Magermilch in TBS-Puffer verdünnt (1:5000). Nachdem die Membran 4x für 10 min mit TBS-Tween/Triton-Puffer gewaschen wurde, erfolgte der Nachweis der Proteine mit dem ECL-Kit.

## 4. Enzym-Assays

### 4.1. Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität

2 ml einer ÜN-Kultur wurden für 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml Z-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die  $OD_{578}$  gemessen und  $OD_{578}$  1 eingestellt. 200  $\mu$ l von der  $OD_{578}$  1 eingestellten Kultur wurden in ein Reagenzglas überführt. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden 50  $\mu$ l  $CHCl_3$  und 50  $\mu$ l 0,1% SDS zugegeben. Der Ansatz wurde dann für 1 min gevortext und bei RT für 10 min inkubiert. Nach Zugabe von



1,8 ml Z-Puffer wurde der Ansatz für weitere 10 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 200 µl ONPG (2-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid) gestartet und T=0 notiert. Nach Eintreten der Gelbfärbung wurde die Reaktion mit 500 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> abgestoppt und die für die Gelbfärbung benötigte Zeit notiert. Wenn keine Verfärbung eingetreten war wurde die Reaktion nach 40 min abgestoppt. Anschließend wurden 1-2 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Mit 1 ml Überstand wurde die Absorption bei 405 nm bestimmt und die spezifische Aktivität mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\Delta E_{405} \times V_t}{(\mu\text{mol Produkt/min} \times \text{mg Protein}) \times \text{OD}_{578} \times c_p \times V_B \times t \times \epsilon \times d}$$

$\Delta E_{405}$  = Extinktion von o-Nitrophenol bei 405 nm

$V_t$  = Endvolumen des Ansatzes

$\text{OD}_{578}$  = eingesetzte Bakterienmenge

$c_p$  = Proteinkonzentration (107 µg Protein/ml  $\text{OD}_{578}$ )

$V_B$  = Volumen an eingesetzter Zellsuspension

$t$  = Reaktionszeit in min

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient von o-Nitrophenol ( $4860 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ )

$d$  = Durchmesser der Küvette (1 cm)

<b>Z-Puffer</b>	10,7 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
	5,5 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
	0,75 g KCl
	0,246 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O

#### 4.2. Bestimmung der Phosphatase-Aktivität

1 ml einer ÜN-Kultur wurden für 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und anschließend 2x in Puffer 1 gewaschen. Die Kultur wurde auf  $\text{OD}_{600}$  von 1 eingestellt und 1 ml davon wurden abzentrifugiert. Nachdem das Pellet in 100 µl Puffer 1 resuspendiert wurde, sind 900 µl Puffer 2 dazugegeben worden. Durch Zugabe von 25 µl 0,1% SDS und 25 µl

CHCl<sub>3</sub> wurden die Zellen permeabilisiert und anschließend gevortexet. Nach einer Inkubation für 5 min bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 0,4% p-Nitrophenyl Phosphat (pNPP) gestartet und bis zur Gelbfärbung bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde nach Eintreten der Gelbfärbung bzw. bei nicht Gelbfärbung nach 40 min durch Zugabe von 120 µl 2,5 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> gestoppt und die Zeit notiert. Der Reaktionsansatz wurde für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und die Absorption bei 405 nm bestimmt. Die spezifische Phosphatase-Aktivität wurde nach der Formel in Kapitel IV.4.1. berechnet, wobei der Extinktionskoeffizient von pNPP 9600 M<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup> ist.

<b>Puffer 1</b>	10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,0	<b>Puffer 2</b>	1 M Tris, 0,1 mM ZnCl <sub>2</sub> , pH 8,0
-----------------	---------------------------------------	-----------------	---

### 4.3. Bestimmung der NADH-Oxidase-Aktivität

Für die Bestimmung der NADH-Oxidase-Aktivität wurde als erstes ein Puffer angesetzt mit 10 mM HEPES, 5 mM MgSO<sub>4</sub> und der jeweils entsprechenden Menge an NaCl bzw. KCl. Dieser Puffer diente als Referenzwert für die OD<sub>340</sub> Messung vor und nach Zugabe von 0,1 mM β-NADH. Anschließend wurden Eppendorfgefäße mit 2 ml der entsprechenden Lösung befüllt und es wurden jeweils 5 µg Protein dazupipettiert. Sofort wurden die Proben bei 30°C für 30 sec, 1 min bzw. 2 min inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Proben für 2 min bei 95°C inkubiert und anschließend für 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Mit dem Überstand wurde die Abnahme der Absorption bei 340 nm der jeweiligen Zeitwerte bestimmt.

## 5. Herstellung von Nikotinamid-Nukleotid-Reagenzien

### 5.1. Herstellung von NMN und NR

Die Herstellung von NMN und NR erfolgte aus  $\text{NAD}^+$  (Sigma). Zur Herstellung von NMN wurde  $\text{NAD}^+$  mit Schlangentoxin (Nukleotidpyrophosphatase, Sigma) und Restriktionspuffer 3 (NEB) für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde der Ansatz für 2 min bei  $95^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 13000 rpm wurde der Überstand in ein frisches Eppendorfgesäß überführt. Für die Herstellung von NR wurde dem oben beschriebenen Ansatz zusätzlich noch CIP (calf intestinal alkaline phosphatase) dazugegeben und auf die gleiche Weise behandelt. Die Umwandlung von  $\text{NAD}^+$  zu NMN bzw. NR konnte unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht und bestätigt werden.

### 5.2. Herstellung von $^{14}\text{C}$ -NMN und $^{14}\text{C}$ -NR

Die Herstellung von  $^{14}\text{C}$ -NMN und  $^{14}\text{C}$ -NR erfolgte aus  $^{14}\text{C}$ - $\text{NAD}^+$  (Amersham) nach dem gleichen Prinzip wie in Kapitel IV.5.1. beschrieben.

### 5.3. Herstellung von 3-AAD und 3-AmPR

Während 3-AADP (3-Aminopyridin-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) direkt von Sigma/Aldrich bezogen wurde, konnte 3-AAD (3-Aminopyridin-Adenin-Dinukleotid) selbst von Anne Price Mortimer am Institut für Organische Chemie, wie schon von Fisher et al. 1973 beschrieben, hergestellt werden (62). Die Herstellung von 3-AmPR (3-Aminopyridin-Ribosid) erfolgte aus 3-AAD nach dem gleichen Prinzip wie NR aus  $\text{NAD}^+$ , wie in Kapitel IV.5.1. beschrieben.

## 6. Transport-Assay

10-25 ml BHI-Medium wurden von einer am Vortag frisch ausgestrichenen Platte mit einer Anfangs-OD<sub>490</sub> von 0,05-0,1 angeimpft und bei 37°C in einem Rotationsschüttler bis zu einer OD<sub>490</sub> von 2 inkubiert. Die Kultur wurde dann für 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und 2x mit reinem BHI-Medium (ohne Zusatz von Hämin) gewaschen und resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Zu 3 ml der Kultur wurde die gewünschte Menge an <sup>14</sup>C-markiertem Faktor-V dazugegeben und alle 1, 3, 5, 9 und 12 min wurden 500 µl entnommen und durch angefeuchtete ME 25 Membranfilter (0,45 µm, Schleier und Schuell) mit Hilfe einer Vakuum-Pumpe gefiltert. Die Filter wurden mit einer 100 mM NaCl-Lösung gewaschen und in mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (EmulsifierSafe, Packard) gefüllte Vials gegeben. Die Radioaktivität wurde in einem Szintillationszähler (Beckman) gemessen.

## 7. Dünnschicht-Chromatographie

Zur Auftrennung der <sup>14</sup>C-radioaktiv markierten Proben wurde eine Dünnschicht-Chromatographie benutzt. Dazu wurde eine Dünnschicht-Chromatographie-Platte (Cellulose F, Merck) senkrecht in eine Laufkammer gestellt, in der sich ein Laufmittel, bestehend aus 200 ml Ammoniumacetat (1 M, pH 5,0) und Ethanol im Verhältnis 60:40, befand. In den Reaktionsansatz wurden 1-2 µl <sup>14</sup>C-markiertes Nukleotid, der entsprechende Puffer und ein zu untersuchendes Protein in einem Gesamtvolumen von 10 µl in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend für 2 min bei 95°C aufgeköcht. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 min bei 13000 rpm wurde der Überstand und eine Auswahl an mehreren <sup>14</sup>C-markierten Nukleotiden, die als Referenz benötigt wurden, auf eine Dünnschicht-Chromatographie-Platte aufgetropft und ÜN in eine Laufkammer gestellt. Am nächsten Tag wurde die Platte getrocknet und in einer Expositionskassette für 2-3 Tage einem Hyperfilm-ECL exponiert.

## V. Ergebnisse

### 1. Identifikation von *pnuC*

Spector et al. haben 1985 ein Gen, *pnuC* (NT01EC0901), identifiziert, welches bei *E. coli* und *S. typhimurium* für einen NMN-Transporter kodiert (226). Im Genom vom KW 20 *H. influenzae* (64) war allerdings kein *pnuC*-Gen annotiert. In Zusammenarbeit mit Mark Herbert (Department of Paediatrics, John Radcliffe Hospital) wurde die Homologie von mehr als 600 Genen, die für konservierte und nicht-konservierte hypothetische Proteine kodieren, mit der Internetanwendung „InterPro“ (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) mit Genen mit bekannter Funktion verglichen. Dabei wurde ein Gen, HI1077.1, gefunden, mit den chromosomalen Koordinaten bp 1144504 und 1144905, welches für ein offenes Leseraster mit bis dahin noch unbekannter Funktion kodiert. Dieses hypothetische 134 AS große Protein zeigte nur geringe Homologie zu *E. coli* PnuC, welches mit 239 AS fast doppelt so groß ist. Während die Ähnlichkeit 23,0% betrug, waren nur 13,8% Identität vorhanden (siehe Abb. 7.A). Im Gegensatz dazu zeigte HI1077.1 von *H. influenzae* eine 49,6% Ähnlichkeit und 43,6% Identität zu dem 234 AS großen, putativen PnuC (PM1838) von *Pasteurella multocida* (siehe Abb. 7.B), was seinerseits eine 24% Identität bzw. 39% Ähnlichkeit zu *E. coli* PnuC besitzt.

A)

```

HI1077.1 -----MISGISGILCVVLSKQ
PnuCE. coli -----MDFFSVQNILVHIPIGAGGYDLSWIEAVGTIAGLLCIGLASLE

HI1077.1 KISNYFFGLIFAYTYFYVAWGSNFLGEMNTVLYVYLPSQFIGYFMW-KANMQN-SDGGES
PnuCE. coli KISNYFFGLINVTLEFGIIFQIQLYASLLLQVF-FFAANIYGWYAWSRQTSQNEAELKIR

HI1077.1 --VIAKALTVK-----GWMTLIVVTTVGTLLLFVQA--LQAAGGSSTGLDGLTT-----
PnuCE. coli WLPLPKALSWLAVCVVSIGLMTVFINPVFAFLTRVAVMIMQALGLQVVMPELQPDAFPFW

HI1077.1 -----IITVAAQILMILPLS-----
PnuCE. coli DSCMMVLSIVAMILMTRKYVENWLLWVIINVISVVFALQGVYAMSLEYIILTFIALNGS

HI1077.1 -----
PnuCE. coli RMWINSARERGSRALSH

```

B)

```

HI1077.1 -----MISGISGILCVVLSKQ
PM1838 MNLQA-VKNEFLGGWKPFEVVWLSLFLIAQIVIIYIQDPDSILGMISGISGILCVVFSKQ

HI1077.1 KISNYFFGLIFAYTYFYVAWGSNFLGEMNTVLYVYLPSQFIGYFMW-KANMQN-SDGGESV
PM1838 KVSNYFFGLIFAYTYFYVAWQANYLGEMNTVLYVYLPAQFIGYFLWRENLOKGESEAESV

HI1077.1 IAKALTVKGWMTLIVVTTVGTLLLFVQALQAAGGSSTGLDGLTTIITVAAQILMILPLS--
PM1838 IAKSLTIKGWAIVLGTITIGTLLLFVQALNAAGGSSTGLDGLTTIVVVAQILMILRYREQ

HI1077.1 -----
PM1838 WLLWIALNVISIVLWTQAKEGSLAMVTMYSAYLLNSLYGYYNWTKLEKAHRQSVQ

```

**Abb. 7** Vergleichende Homologie zwischen (A) HI1077.1 und dem PnuC von *E. coli* und (B) zwischen HI1077.1 und dem putativen PnuC von *P. multocida* (PN1838). Dabei sind identische Regionen schwarz und ähnliche Aminosäuren grau dargestellt.

### 1.1. Reannotierung von HI1077.1 zu *pnuC*

Die Genregion flankierend zu HI1077.1 (zwischen den Koordinaten 1144355 und 1145045) wurde mit den Primern *pnuCE5'* und *pnuCKB3'* amplifiziert und sequenziert (Universität von Oxford, Department of Biochemistry, Core Sequencing Facility). Dabei wurden zwei Abweichungen von der original veröffentlichten Genomsequenz gefunden (64). Hierbei handelte es sich um zwei zusätzliche Baseninsertionen, ein G an der Position 1144511 und ein A an der Position 1144972. Nachdem die zwei zusätzlichen Nukleotide entfernt wurden, konnte HI1077.1 reannotiert und zu *pnuC* unbenannt werden, mit den neu

definierten Koordinaten zwischen 1144355 und 1145035. Diese zusätzlichen zwei Nukleotide hatten zwei Leserasterverschiebungen an der AS-Position 23 (N'-terminal A zu L) und an der AS-Position 175 (C'-terminal P zu R) von PnuC verursacht. Das reannotierte 678 bp große *pnuC* kodiert für ein 226 AS großes Protein, welches nun eine 19,7% Identität und 32,6% Ähnlichkeit mit dem PnuC von *E. coli* aufweist (Abb. 8A) und 71,4% Identität und 81,1% Ähnlichkeit zu dem PnuC von *P. multocida* zeigt (Abb. 8B).

## A)

```

PnuCH. influenzae  MTLAARLKQEFVSGWKPFVEVGLALFIIAQIWAYVQTPDSSLAMISGTSIGILCVVLVSKG
PnuCE. coli        -----MDFFSVQNILVHIPIGAGGYDLSWIEAVGTIAGLLCIGIASLE

PnuCH. influenzae  KISNYFFGLIFAYTYFYVAWGSNFLGEMNTVLYVYLPSQFIGYFMW-KANMON-SDGGES
PnuCE. coli        KISNYFFGLINVTLFGIIFQIQLYASLLLVQVF-FFAANIYGWYAWSRQTSQNEAELKIR

PnuCH. influenzae  --VIAKALTVK-----GWMTLIVVTTVGTLLFVQA--LQAAGGSSTGLDGLTT----
PnuCE. coli        WLPILPKALSWLAVCVVSIGLMTVFINPVFAFLTRVAVMIMQALGLQVVMPELQPDAPFFW

PnuCH. influenzae  -----IITVAAQILMILRYREQWLLWIGLNILSIFLW--AETPAIYLMYSAYLLNSLYGY
PnuCE. coli        DSCMMVLSIVAMILMTRKYVENWLLWVLIINVISVVI FALQGVYAMSLEYIILTFIALNGS

PnuCH. influenzae  YNWTKLVKRTN-----
PnuCE. coli        RMWINSARERGRALSH

```

## B)

```

PnuCH. influenzae  MTLAARLKQEFVSGWKPFVEVGLALFIIAQIWAYVQTPDSSLAMISGTSIGILCVVLVSKG
PM1838            MNLQA-VKNEFLGGWKPFVWLSLEFLIAQIVIYIQDPSILGMISGTSIGILCVVFSKGV

PnuCH. influenzae  KISNYFFGLIFAYTYFYVAWGSNFLGEMNTVLYVYLPSQFIGYFMW-KANMON-SDGGESV
PM1838            KVSNYFFGLIFAYTYFYVAWQANYLGEMNTVLYVYIIPAQFIGYFLWRENLOKQSEGAESV

PnuCH. influenzae  IAKALTVKGMWTLIVVTTVGTLLFVQALQAAGGSSTGLDGLTTIITVAAQILMILRYREQ
PM1838            IAKSLTLKGWAIIVLGTITIGTLLFVQALNAAGGSSTGLDGLTTIVVVAQILMILRYREQ

PnuCH. influenzae  WLLWIGLNILSIFLW----AETPAIYLMYSAYLLNSLYGYYNWTKLVKRTN
PM1838            WLLWIALNVISIVLWVQAKEGSLAMVTMYSAYLLNSLYGYYNWTKLEKAHRQSVQ

```

**Abb. 8** Vergleichende Homologie zwischen (A) dem reannotierten PnuC von *H. influenzae* und dem PnuC von *E. coli* und (B) zwischen *H. influenzae*-PnuC und dem putativen PnuC von *P. multocida* (PM1838). Dabei sind identische Regionen schwarz und ähnliche Aminosäuren grau dargestellt.

## 1.2. Konstruktion einer HI1077.1 Deletionsmutante

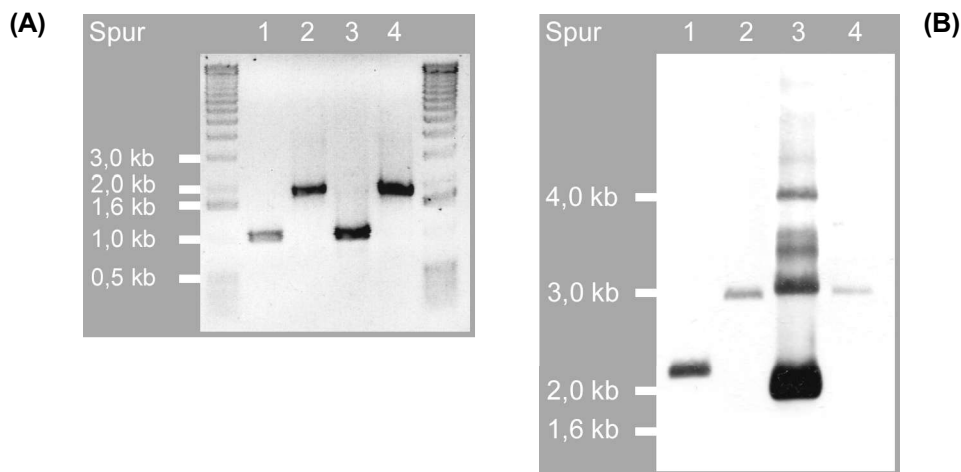
Für die Konstruktion einer HI1077.1-Deletionsmutante wurden die zentralen 383 bp (Koordinaten zwischen 1144523 und 1144905) deletiert und mit einer Kan-Kassette ersetzt. Hierfür wurden als erstes zwei PCR-Fragmente amplifiziert; mit den Oligonukleotiden PnuC-R3 und PnuC-F2 wurde das 357 bp stromaufwärts von HI1077.1 gelegene Fragment amplifiziert, während mit den Oligonukleotiden PnuC-R1 und PnuC-F1 das 307 bp stromabwärts von HI1077.1 gelegene Fragment amplifiziert wurde. Nach einem Restriktionsverdau mit *Bam*HI wurden die zwei PCR-Fragmente mit der T4-DNS-Ligase ligiert. Das 664 bp große Ligationsprodukt wurde in einer PCR amplifiziert und das daraus resultierende PCR-Produkt in den Klonierungsvektor pCR4-TOPO (Invitrogen) kloniert. Das neu entstandene Plasmid und die 1264 bp große Kanamycin-Kassette von dem Vektor pUC4k (241) wurden mit *Bam*HI verdaut und nach Dephosphorylierung des Vektors ligiert. Das daraus resultierende Plasmid wurde mit *Eco*RI verdaut und das 1928 bp große Fragment, welches die Kanamycin-Kassette und die zwei *pnuC*-Fragmente enthält, aus dem Gel eluiert und aufgereinigt. Anschließend wurde das Fragment in den *H. influenzae*-Stamm Rd-b<sup>+</sup> nach der Methode von Herriott (104) transformiert. Am nächsten Tag wurden Kanamycin-resistente Kolonien isoliert und gereinigt und mittels PCR und Southern-Blot verifiziert (Abb. 9). Der neu entstandene Stamm wurde als Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1 benannt.

## 1.3. Konstruktion eines *pnuC*-Komplementationsplasmids

Für die Konstruktion eines *pnuC*-Komplementationsplasmids wurde das neu reannotierte *pnuC* und die Promotorregion samt der Shine-Dalgarno-Sequenz mit den Oligonukleotiden pnuCE5' und pnuCKB3', die eine *Eco*RV- und eine *Bam*HI-Schnittstelle enthielten, von dem Stamm Rd KW 20 chromosomale DNS in einer PCR amplifiziert. Das 993 bp Fragment und das 4245 bp große pACYC184 wurden mit *Eco*RV und *Bam*HI verdaut und anschließend ligiert. Der Ligationsansatz wurde in den *E. coli*-Stamm LE392 transformiert und anschließend Chloramphenicol-resistente Kolonien isoliert und gereinigt. Das neu entstandene 5048 bp große Plasmid pSEpnuC und das Kontrollplasmid pACYC184 wurden in den *H. influenzae*-Stamm Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1 transformiert und mittels PCR und Southern-Blot verifiziert (siehe Abb. 9). Für die PCR wurde chromosomale DNS als Template und die Oligonukleotide pnuCE5' und pnuCKB3' verwendet. Abb. 9A Spur (1)



zeigt das dabei entstandene 993 bp große *pnuC*-Fragment des Wildtyp-Stammes Rd-b<sup>+</sup>. Durch den Austausch des Gens HI1077.1 mit der Kanamycin-Kassette entstand in dem Stamm Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1 ein 1874 bp großes Fragment (Spur 2). Spur 3 zeigt Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1+pSEpnuC, das stärkere 993 bp Fragment von dem Plasmid. In Spur 4 wurde die Probe des Stammes Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1+pACYC184 aufgetragen, hier ist nur das 1874 bp Fragment der Mutante zu sehen. Für den Nachweis per Southern-Blot (Abb. 9B) wurde die chromosomale DNS der vier Stämme mit dem Enzym *XmnI* ÜN verdaut. Als spezifische DNS-Sonde wurde ein PCR-Fragment von *pnuC* verwendet. Dabei ergab sich folgendes Bandenmuster: 2,1 kb für den Wildtyp-Stamm Rd-b<sup>+</sup> (Spur 1), 3,0 kb für die Mutante Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1 (Spur 2), bei der Komplementante Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1+pSEpnuC (Spur 3) treten zwei Haupt-Signale auf (1,9 kb und 3,1 kb), die von dem Plasmid herrühren. Hier ist kein Signal des Hintergrundstammes zu erkennen. Dagegen ist bei dem Stamm mit dem Kontrollplasmid Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1+pACYC184 (Spur 4) nur eine schwache Bande bei 3,0 kb des Hintergrundstammes zu sehen.



**Abb. 9** PCR- (A) bzw Southern-Blot-Nachweis (B) der Stämme (1) Rd-b<sup>+</sup> (2) Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1 (3) Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1+pSEpnuC (4) Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1+pACYC184. Bei der Southern-Hybridisierung wurde die chromosomale DNS mit *XmnI* verdaut und ein *pnuC* PCR-Fragment diente als DNS-Sonde.

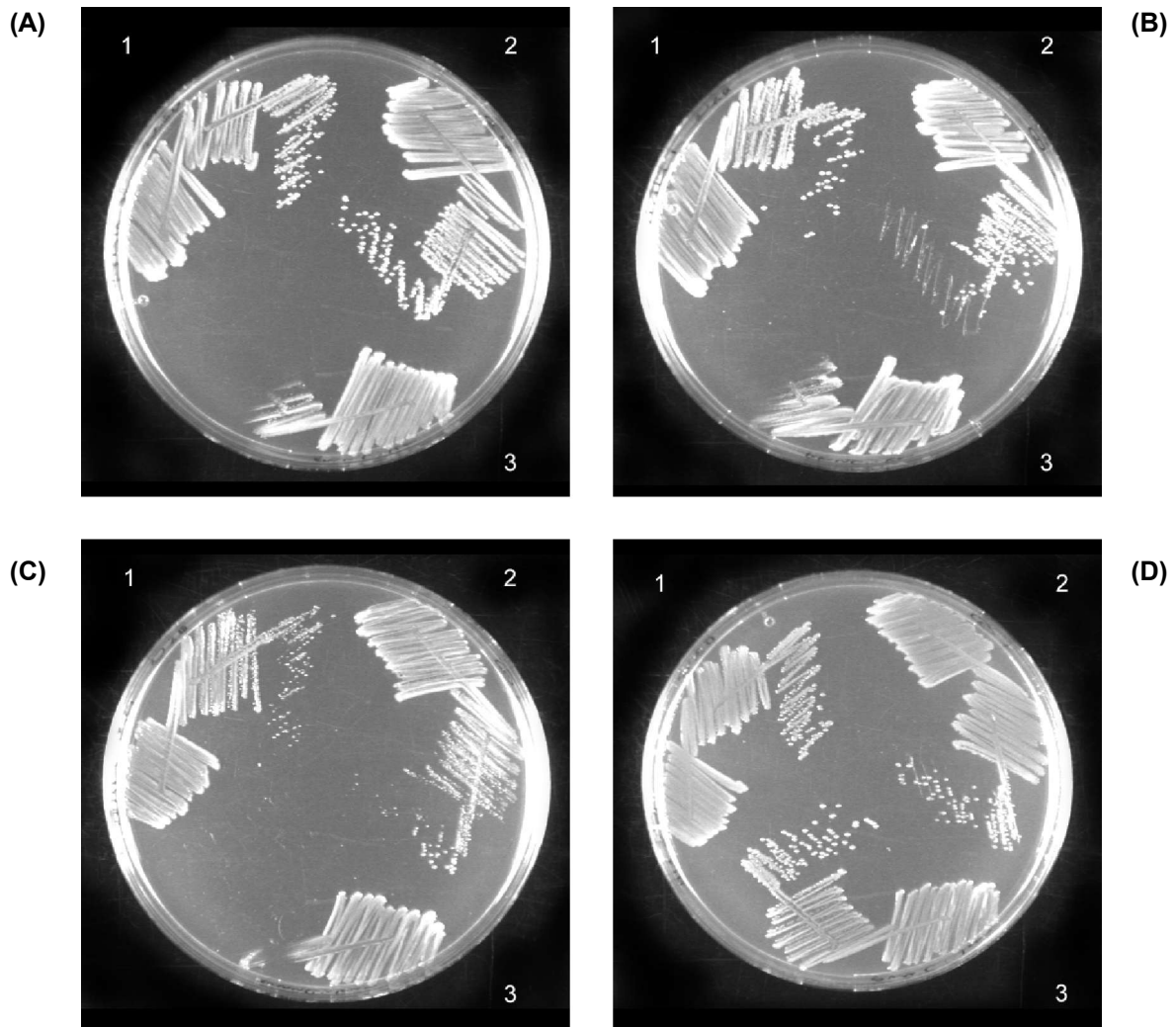
## 2. Charakterisierung von *pnuC*

### 2.1. Phänotypische Charakterisierung der HI1077.1-Mutante und der *pnuC*-Komplementante

Die Stämme Rd-b<sup>+</sup>, Rd-b<sup>-</sup>, ΔHI1077.1 und Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1+pSEpnuC wurden hinsichtlich ihres Wachstumsvermögens auf BHI- und MIc-Platten mit unterschiedlichen NAD<sup>+</sup>- und NR-Konzentrationen (0,5–15 μM) verglichen (Tabelle 13 und Abb. 10).

NAD <sup>+</sup> bzw. NR Konz. in BHI-Platten	Rd-b <sup>+</sup>	Rd-b <sup>-</sup> , ΔHI1077.1	Rd-b <sup>+</sup> , ΔHI1077.1+pSEpnuC	NAD <sup>+</sup> bzw. NR Konz. in MIc-Platten	Rd-b <sup>+</sup>	Rd-b <sup>-</sup> , ΔHI1077.1	Rd-b <sup>+</sup> , ΔHI1077.1+pSEpnuC
15 μM NAD <sup>+</sup>	++	+-	++	15 μM NAD <sup>+</sup>	++	+-	++
1 μM NAD <sup>+</sup>	++	+-	++	1 μM NAD <sup>+</sup>	++	+-	++
0,5 μM NAD <sup>+</sup>	++	+-	++	0,5 μM NAD <sup>+</sup>	++	+-	++
15 μM NR	++	++	++	15 μM NR	++	+-	++
3 μM NR	++	++	++	3 μM NR	++	+-	++
1 μM NR	++	++	++	1 μM NR	++	+-	++
0,5 μM NR	++	++	++	0,5 μM NR	+	+-	+

**Tabelle 13** Wachstumsphänotyp von Rd-b<sup>+</sup>, Rd-b<sup>-</sup>, ΔHI1077.1 und Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1+pSEpnuC auf BHI- und MIc-Platten mit unterschiedlichen NAD<sup>+</sup>- bzw. NR-Konzentrationen. Dabei bedeutet: ++: sehr gutes Wachstum mit großen Einzelkolonien, +: schlechtes Wachstum mit kleinen Einzelkolonien, + -: Wachstum bricht nach dem ersten oder zweiten Ausstrich ab, keine Einzelkolonien.

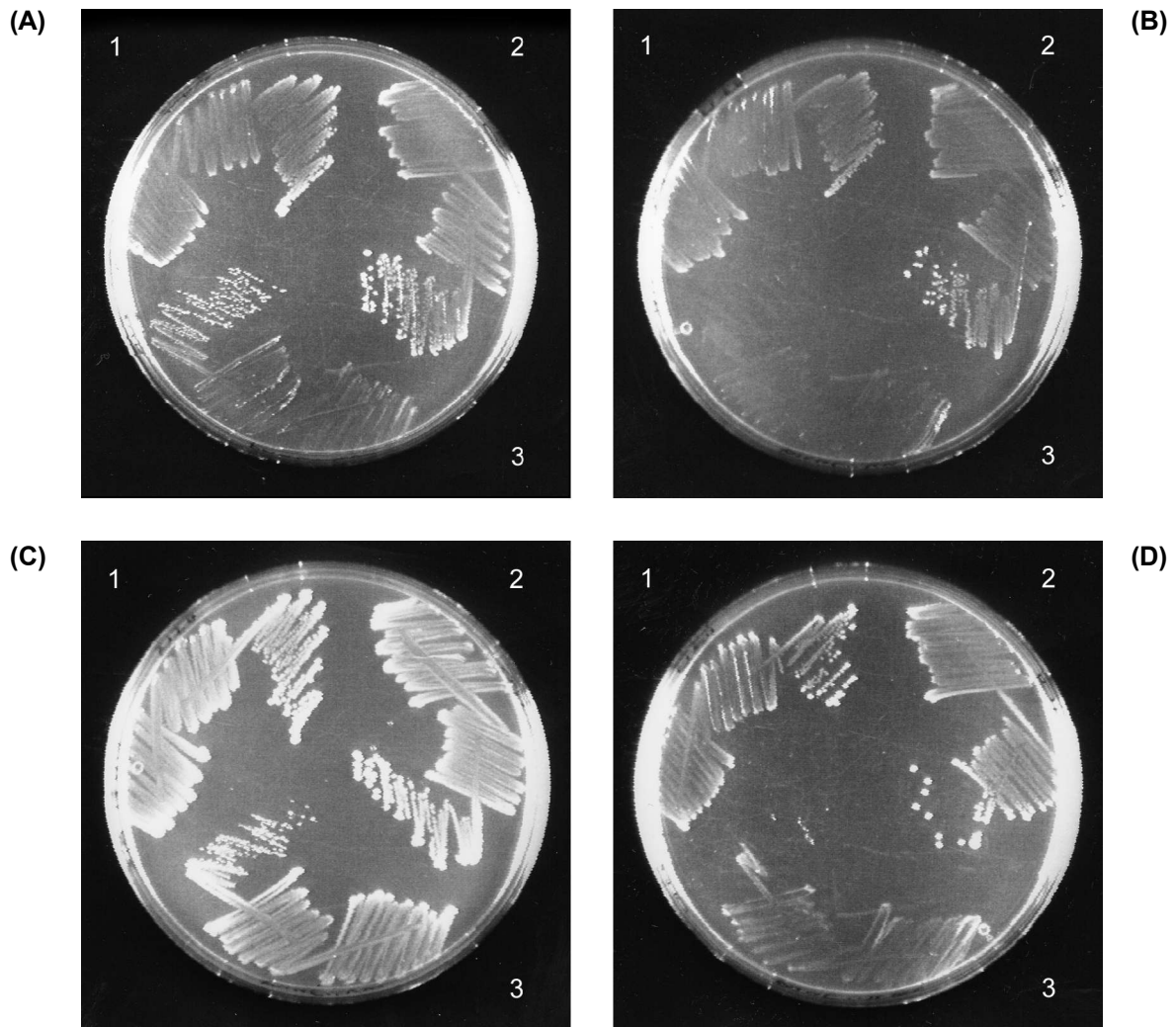


**Abb. 10** Wachstumsphänotyp von (1) *H. influenzae* Rd-b<sup>+</sup>, (2) Komplementante Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta$ HI1077.1+pSEpnuC und (3) Mutante Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta$ HI1077.1 auf BHI-Platten supplementiert mit (A) 15  $\mu$ M NAD<sup>+</sup>, (B) 1  $\mu$ M NAD<sup>+</sup>, (C) 0,5  $\mu$ M NAD<sup>+</sup> und (D) 0,5  $\mu$ M NR.

Der Stamm Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta$ HI1077.1 zeigte ein deutliches Wachstumsdefizit auf BHI- und Mic-Platten, die mit 0,5–15  $\mu$ M NAD<sup>+</sup> supplementiert waren, und auf Mic-Platten, die mit 0,5–3  $\mu$ M NR supplementiert waren. Der Wildtyp Rd-b<sup>+</sup> und die Komplementante Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta$ HI1077.1+pSEpnuC zeigten dagegen sehr gutes Wachstum. Auf den BHI-Platten mit 0,5–15  $\mu$ M NR und den Mic-Platten mit 15  $\mu$ M NR zeigten alle drei Stämme gleich gutes Wachstum. Um diesem Phänomen nachzugehen wurden weitere BHI-Platten gegossen, die mit niedrigeren NR-Konzentrationen (0,5–0,001  $\mu$ M NR) versehen waren. Des Weiteren wurden die Stämme auf ihr Wachstumsverhalten auf unterschiedlichen NMN-Konzentrationen (0,05–15  $\mu$ M NMN) überprüft.

NR Konz. in BHI-Platten	Rd-b <sup>+</sup>	Rd-b <sup>+</sup> , $\Delta$ H11077.1	Rd-b <sup>+</sup> , $\Delta$ H11077.1+pSEpnuC	NMN Konz. in BHI-Platten	Rd-b <sup>+</sup>	Rd-b <sup>+</sup> , $\Delta$ H11077.1	Rd-b <sup>+</sup> , $\Delta$ H11077.1+pSEpnuC
0,5 $\mu$ M NR	++	++	++	15 $\mu$ M NMN	++	++	++
0,1 $\mu$ M NR	++	+	++	1 $\mu$ M NMN	++	++	++
0,05 $\mu$ M NR	++	+	++	0,5 $\mu$ M NMN	++	+	++
0,01 $\mu$ M NR	+	-	+	0,1 $\mu$ M NMN	++	+-	++
0,005 $\mu$ M NR	+-	-	+-	0.05 $\mu$ M NMN	++	-	++
0.001 $\mu$ M NR	+-	-	+-				

**Tabelle 14** Wachstumsphänotyp von Rd-b<sup>+</sup>, Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta$ H11077.1 und Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta$ H11077.1+pSEpnuC auf BHI-Platten mit unterschiedlichen NR- bzw. NMN-Konzentrationen. Dabei bedeutet: ++: sehr gutes Wachstum mit großen Einzelkolonien, +: schlechtes Wachstum mit kleinen Einzelkolonien, +-: Wachstum bricht nach dem ersten oder zweiten Ausstrich ab, keine Einzelkolonien, -: kein Wachstum.

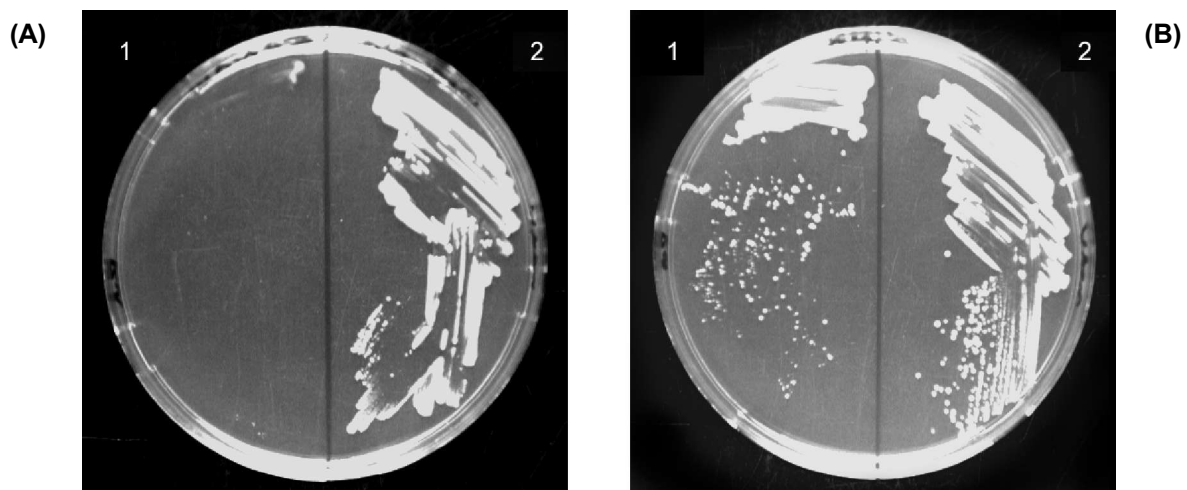


**Abb. 11** Wachstumsphänotyp von (1) *H. influenzae* Rd-b<sup>+</sup>, (2) Komplementante Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta$ HII1077.1+pSEpnuC und (3) Mutante Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta$ HII1077.1 auf BHI-Platten supplementiert mit (A) 0,1  $\mu$ M NR, (B) 0,05  $\mu$ M NR, (C) 0,5  $\mu$ M NMN und (D) 0,1  $\mu$ M NMN.

Wie Tabelle 14 und Abb. 11 zeigen, ist das Wachstumsdefizit der Mutante Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta$ HII1077.1 erst ab NR-Konzentrationen kleiner als 0,1  $\mu$ M zu beobachten. Ähnlich verhielt es sich mit der NMN-Konzentration, hier zeigt die Mutante einen signifikanten Wachstumsphänotyp ab 0,5  $\mu$ M NMN. Der Stamm Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta$ HII1077.1+pSEpnuC dagegen konnte die Wachstumsdefizienz der Mutante komplementieren und zeigte den gleichen Wachstumsphänotyp wie der Wildtyp Rd-b<sup>+</sup>.

## 2.2. Phänotypische Charakterisierung der HI1077.1-Mutante und der *nadV*-Komplementante

Innerhalb der Familie der *Pasteurellaceae*, und teilweise bei den *Haemophilus*-Spezies, sind  $\text{NAD}^+$ -unabhängige Stämme sehr verbreitet. Diese Bakterien verwerten NAM mit Hilfe eines Gens *nadV*, welches für eine NAM-PRPP kodiert und direkt NMN aus NAM bilden kann. Um zu untersuchen, ob *H. influenzae* auch dann NAM nutzen kann, wenn die NR-Aufnahme verhindert ist, wurde der Stamm Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta\text{HI1077.1}$  mit dem Plasmid pSEnadV transformiert, welches das Gen *nadV* aus *H. ducreyi* trägt (Diplomarbeit E. Sauer, 2002). Anschließend wurden die Stämme Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta\text{HI1077.1}$  und Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta\text{HI1077.1}$ +pSEnadV auf MIC-Platten ausgestrichen, die mit 0,5  $\mu\text{M}$  NR bzw. 60  $\mu\text{M}$  NAM supplementiert waren (Abb. 12).

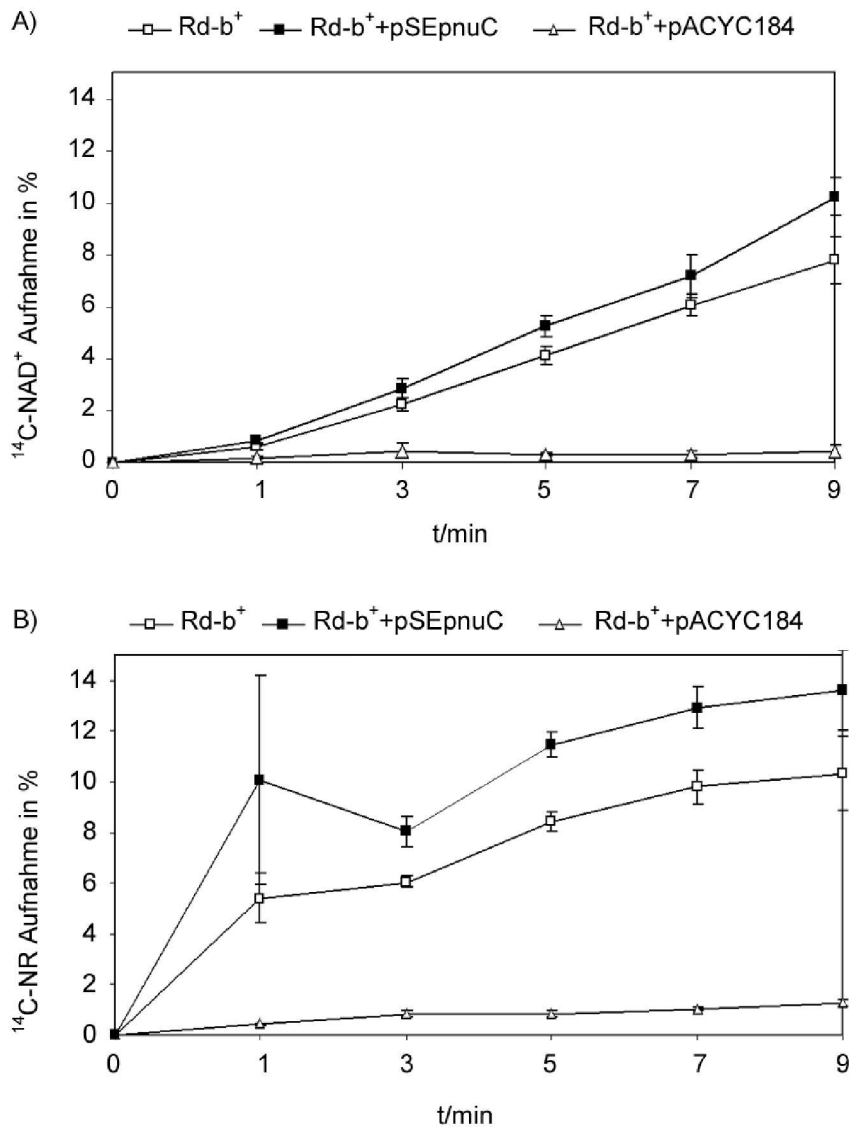


**Abb. 12** Wachstumsphänotyp von (1) *H. influenzae* Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta\text{HI1077.1}$  und (2) Komplementante Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta\text{HI1077.1}$ +pSEnadV auf MIC-Platten supplementiert mit (A) 60  $\mu\text{M}$  NAM und (B) 0,5  $\mu\text{M}$  NR.

Auf den MIC-Platten mit 60  $\mu\text{M}$  NAM war die Mutante (1) nicht wachstumsfähig, während der mit *nadV*-komplementierte Stamm (2) gutes Wachstum zeigte (Abb. 12.A). Auf den MIC-Platten mit 0,5  $\mu\text{M}$  NR zeigte die Mutante ein Wachstumsdefizit, während die *nadV*-Komplementante dagegen einen deutlich besseren Wachstumsphänotyp zeigte (Abb. 12.B). Dieser Phänotyp ist darauf zurückzuführen, dass NR *in vitro* instabil ist und wahrscheinlich zu NAM zerfällt. Ist NAM vorhanden, kann also *nadV* das Wachstumsdefizit der HI1077.1-Mutante komplementieren.

### 2.3. Charakterisierung der HI1077.1-Mutante mit Hilfe des Transport-Assays

Die Stämme  $Rd-b^+$ ,  $Rd-b^-$ ,  $\Delta HI1077.1+pSEpnuC$  und  $Rd-b^+$ ,  $\Delta HI1077.1+pACYC184$  wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit getestet, im Transport-Assay  $^{14}C-NAD^+$  und  $^{14}C-NR$  aufzunehmen. Die Zellen wurden bis zu einer  $OD_{490}$  2 angezogen und mit radioaktiv markiertem Substrat inkubiert. Nach 1, 3, 5, 7 und 9 min wurden Proben entnommen und in einem Szintillationszähler gemessen (siehe Kapitel IV.6.).



**Abb. 13** Aufnahme von  $^{14}C-NAD^+$  (A) bzw  $^{14}C-NR$  (B) von *H. influenzae*  $Rd-b^+$ ,  $Rd-b^-$ ,  $\Delta HI1077.1+pSEpnuC$  und  $Rd-b^+$ ,  $\Delta HI1077.1+pACYC184$ . Die Konzentration von  $^{14}C-NAD^+$  und  $^{14}C-NR$  betrug  $1 \mu M$  (spezifische Aktivität). Jeder Punkt repräsentiert den Durchschnittswert von drei unabhängigen Messungen. Die vertikalen Balken stellen die Standardabweichung dar. Die Aufnahme des radioaktiv markierten Substrats ist als prozentualer Anteil der eingesetzten Menge von  $1 \mu M$  Substrat angegeben.

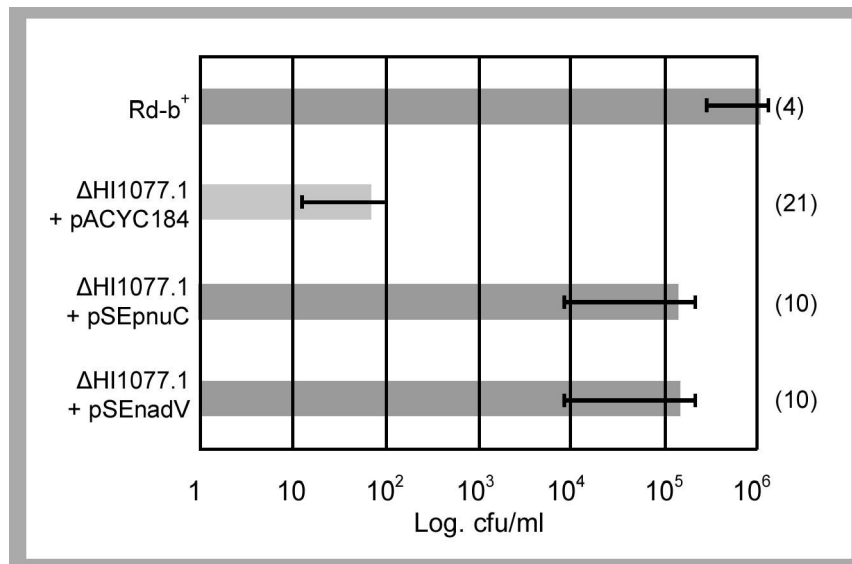
Abb. 13 zeigt, dass der Wildtyp Rd-b<sup>+</sup> nach 9 min ca. 7,8% und die Komplementante Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta$ HI1077.1+pSEpnuC ca. 10,2% der eingesetzten <sup>14</sup>C-NAD<sup>+</sup>-Menge aufgenommen hat, während die HI1077.1-Mutante nur 0,4% inkorporieren konnte. Ähnlich verhielt es sich mit dem <sup>14</sup>C-NR-Transport; der Wildtyp nahm nach 9 min 10,3%, die Komplementante 13,6% und die Mutante nur 1,3% der eingesetzten <sup>14</sup>C-NR-Menge auf. Die aufgenommene Restmenge <sup>14</sup>C-NAD<sup>+</sup>/NR der Mutante zeigt dennoch eine geringe Restaktivität der Aufnahmefähigkeit, die auch den Wachstumsphänotyp bei höheren NR-Konzentrationen erklären könnte, und eventuell auf einen zweiten ineffizienten NR-Aufnahmeweg hindeutet (siehe auch Diskussion Kapitel VI.1.).

#### 2.4. Charakterisierung der HI1077.1-Mutante durch *in vivo* Versuche

Die *in vivo* Versuche wurden von Mark Herbert am John Radcliffe Hospital, Headington durchgeführt. Für die Ermittlung der Virulenz wurde der „competitive index“ (CI) Assay verwendet (236). Die zu untersuchenden Stämme wurden auf  $2 \times 10^5$  CFU/100  $\mu$ l verdünnt, gemischt und im Verhältnis 1:1 mit dem Wildtyp Rd-b<sup>+</sup> intraperitoneal (i. p.) in jeweils zwei, fünf Tage alte Ratten injiziert. Nach 24 h wurde das Blut aus den Ratten isoliert und Verdünnungen im Verhältnis 1:200 hergestellt. 5  $\mu$ l dieser Verdünnungen wurden auf BHI-Platten ausplattiert, die jeweils mit (Nalidixinsäure und Kanamycin) und ohne Antibiotika supplementiert waren. Um zwischen den zu untersuchenden Stämmen und dem Wildtyp Rd-b<sup>+</sup> zu unterscheiden, wurden 200 Kolonien der antibiotikafreien Platte auf BHI-Platten jeweils mit und ohne Antibiotika weiter kultiviert. Der CI wurde folgendermaßen ermittelt: das injizierte Verhältnis zwischen Wildtyp und Mutante geteilt durch das Verhältnis zwischen Wildtyp und Mutante nach Versuchsende.

Folgende Stämme wurden bei diesem *in vivo* Versuch untersucht: Rd-b<sup>+</sup>, Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta$ HI1077.1+pACYC184, Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta$ HI1077.1+pSEpnuC und Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta$ HI1077.1+pSEnadV (Abb.14).





**Abb. 14** *In vivo* Analyse. Untersucht wurde die Virulenz der Stämme 1) Rd-b<sup>+</sup>, 2) Rd-b<sup>+</sup>, 3) ΔHI1077.1+pACYC184, Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1+pSEpnuC und Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1+pSEnadV anhand des Rattenmodells nach Sprague Dawley. 5 Tage alte Ratten wurden mit  $1 \times 10^5$  c.f.u. der Bakterienstämme intraperitoneal infiziert. Dargestellt sind die c.f.u./ml der Stämme nach 48 h (x)\*: Anzahl der infizierten Ratten.

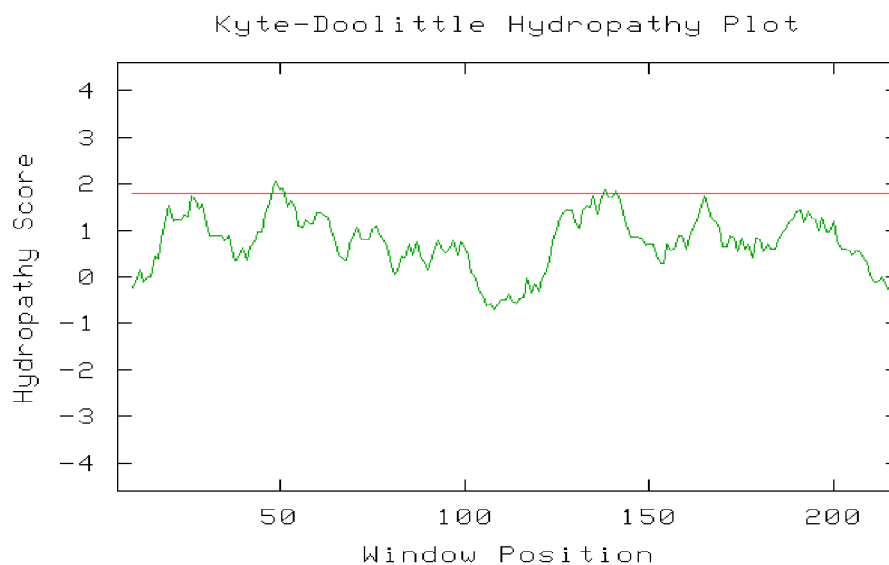
Das Diagramm in Abb. 14 zeigt, dass der Wildtyp Rd-b<sup>+</sup> eine Infektion mit einer Bakteriämie von ca.  $2 \times 10^6$  cfu/ml bei allen 4 Ratten verursacht hat. Für die Mutante Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1+pACYC184 konnten nur 200 cfu/ml aus dem Blut aller 10 Ratten gezählt werden, so dass der CI unter 0,001 lag. Beide Komplementanten waren virulent und verursachten eine Bakteriämie von ca.  $2 \times 10^5$  cfu/ml, ähnlich wie der Wildtyp. Für den Stamm Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1+pSEpnuC lag der CI bei 0,1, während der CI für die Komplementante Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1+pSEnadV bei 1 lag.

### 3. Zelluläre Lokalisation und Topologie von PnuC

Nachdem *pnuC* molekulargenetisch und phänotypisch charakterisiert wurde, sollte das Protein PnuC auf seine Topologie hin untersucht werden.

#### 3.1. Hydrophobizitäts-Diagramm

Mit Hilfe von Computer-Algorithmen können hydrophobe von hydrophilen Regionen eines Proteins unterschieden werden. Auf diese Weise lassen sich membranumspannende Segmente, die durch die Ausbildung von  $\alpha$ -Helices stark hydrophob sind, von Regionen unterscheiden, die sich auf der Membranoberfläche befinden und somit hydrophil sind. Bei dem Hydrophobizitäts-Diagramm nach Kyte-Doolittle werden TMD vorhergesagt, wenn Punkte oberhalb von +1,8 (horizontale Linie) erreicht werden.

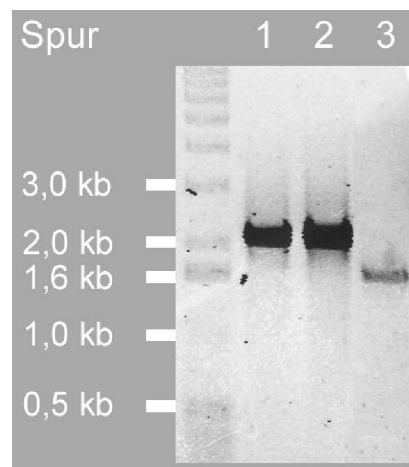


**Abb. 15** Hydrophobizitäts-Diagramm von *H. influenzae*-PnuC nach Kyte-Doolittle. Hydrophobe Regionen werden oberhalb der X-Achse und hydrophile Regionen unterhalb der X-Achse angezeigt. Auf der Y-Achse ist die Länge des Proteins (Aminosäureanzahl) dargestellt. Punkte, die +1,8 erreichen stellen Transmembranregionen dar.

Das Hydrophobizitäts-Diagramm lieferte den ersten Hinweis, dass es sich beim PnuC von *H. influenzae* um ein Transmembranprotein handelte. Das Diagramm zeigt vier stark hydrophobe Regionen und 3-4 leicht hydrophobe Regionen.

### 3.2. Konstruktion einer *pnuC*-Komplettdeletion

Für alle nachfolgenden Versuche wurde eine Mutante konstruiert, bei der nicht nur HI1077.1 deletiert war, sondern *pnuC* komplett fehlte. Dazu wurde mittels PCR und den Oligonukleotiden PnuC1 und PnuC2 (mit integrierter *PstI*-Schnittstelle) ein 670 bp großes Fragment im 5'-stromaufwärts gelegenen Bereich von *pnuC* amplifiziert. Ein weiteres 277 bp großes PCR-Fragment wurde mit den Oligonukleotiden I6 (mit integrierter *StuI*-Schnittstelle) und PnuC4 im 3'-stromabwärts gelegenen Bereich von *pnuC* amplifiziert. Als Template wurde chromosomale DNS von dem *H. influenzae*-Stamm BRAD verwendet. Anschließend wurden die PCR-Fragmente, sowie die 1180 bp große *kan*-Kassette aus dem Plasmid pUK4k mit *PstI* und *StuI* verdaut und ÜN ligiert. Am nächsten Tag wurde der Ligationsansatz als Template für eine PCR verwendet und mit den Oligonukleotiden PnuC1 und PnuC4 ein 2127 bp großes Fragment amplifiziert, welches die flankierenden Regionen stromaufwärts und stromabwärts von *pnuC* und mittig die *kan*-Kassette beinhaltet. Das PCR-Fragment wurde dann in den *H. influenzae*-Stämmen BRAD und SE01 (*nadV*<sup>+</sup>) transformiert und auf BHI-Platten ausplattiert, die mit Kanamycin (10 µg/ml) supplementiert waren. Am nächsten Tag wurden Kanamycin-resistente Kolonien isoliert und gereinigt. Anschließend wurde chromosomale DNS präpariert und die eingeführte Mutation mittels PCR mit den Oligonukleotiden PnuC1 und PnuC4 bestätigt (siehe Abb. 16). Die neu entstandenen Stämme wurden als SE02 (BRAD, *nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta pnuC$ ) und SE03 (BRAD,  $\Delta pnuC$ ) bezeichnet.



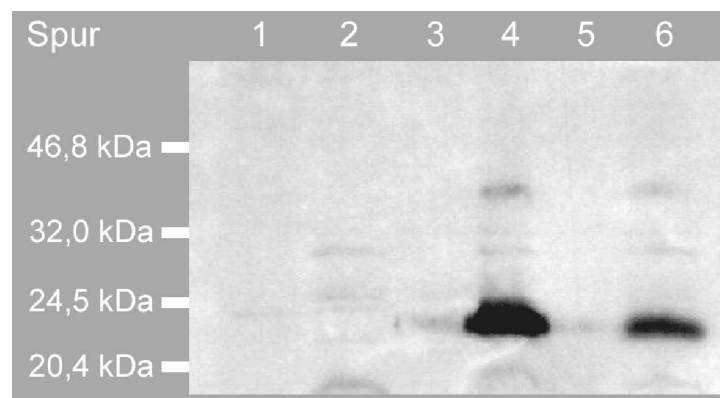
**Abb. 16** PCR-Nachweis der erfolgten *pnuC*-Komplettdeletion. Aufgetragen sind die Stämme (1) SE02 (*nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta pnuC$ ), (2) SE03 ( $\Delta pnuC$ ) und (3) SE01(*nadV*<sup>+</sup>). Die Abbildung zeigt einen „shift“ bei (1) und (2) bei erfolgter Insertion der *kan*-Kassette.

Abb. 16 zeigt das 2127 bp große PCR-Produkt, das sich ergibt, wenn *pnuC* durch die *kan*-Kassette ersetzt wurde. Für den Wildtyp dagegen ergibt sich ein 1643 bp großes PCR-Fragment. Die Deletion von *pnuC* und die Insertion der *kan*-Kassette konnte damit bestätigt werden.

### 3.3. Konstruktion von His-Tag-PnuC und Membranfraktionierung

Das Plasmid pSEpnuC wurde als Template in der PCR für die Konstruktion der N'- und C'-terminalen His-Tag-PnuC-Hybridproteine verwendet. Für die Konstruktion des C'-terminalen His-Tag von PnuC wurden die Oligonukleotide pnuC5'CHis und pnuC3'CHis benutzt. Nach erfolgter PCR wurde das 675 bp große Fragment, welches mit Start-Codon, aber ohne Stop-Codon amplifiziert wurde, mit dem Klonierungsvektor pCRT7-CT-TOPO ligiert. Ein Aliquot der Ligation wurde in den *E. coli*-Stamm TOP10F' (pCR T7 TOPO TA Expression Kit) transformiert, Ampicillin-resistente Kolonien isoliert und gereinigt. Das neu entstandene Plasmid pCRT7-TOPOpnuCHis<sub>6</sub> mit einem V5-Epitop und einem His-Tag am C'-terminalen Bereich von *pnuC* wurde durch Restriktionsverdau, Sequenzierung und Western-Blot nachgewiesen. Für die Konstruktion des N'-terminalen His-Tag von PnuC wurden die Oligonukleotide PnuC5'pIVEXHis und PnuC3'pIVEXHis verwendet, die eine *XhoI* bzw. eine *PstI*-Schnittstelle beinhalten. Nach PCR-Amplifizierung wurde das 690 bp große Fragment, welches ein Stop-, aber kein Start-Codon beinhaltete, und das Plasmid pIVEX2.4b mit *XhoI* und *PstI* verdaut und anschließend ligiert. Ampicillin-resistente Kolonien wurden isoliert und gereinigt und das neu entstandene Plasmid pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub> durch Restriktionsverdau, Sequenzierung und im Western-Blot verifiziert. Um die N'- und C'-terminalen His-Tag-PnuC-Hybridproteine auch in *H. influenzae* exprimieren zu können, wurden die zwei Fusionsproteine in das Plasmid pACYC184 weiter kloniert. Dazu wurden die vorher konstruierten Plasmide pCRT7-TOPOpnuCHis<sub>6</sub> und pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub> als Template für eine PCR benutzt. Mit den Oligonukleotiden CT-Topo5' und CT-Topo3' bzw. pIVEX2.4b5' und pIVEX2.4b3', die eine *EcoRI*- und eine *ScaI*-Schnittstelle trugen, wurden ein 870 bp (C'-terminal) und ein 900 bp (N'-terminal) große Fragmente amplifiziert. Die PCR-Fragmente und das Plasmid pACYC184 wurden mit *EcoRI* und *ScaI* verdaut, ligation und am nächsten Tag in den *E. coli*-Stamm LE392 transformiert. Anschließend wurden Tetracyclin-resistente Kolonien isoliert und gereinigt. Nach der Isolierung von Plasmid-DNS wurden die neu entstandenen Plasmide pSEpnuC-His<sub>6</sub>C' und pSEpnuC-His<sub>6</sub>N' in einem

Restriktionsverdau und durch Sequenzierung verifiziert. Um zu überprüfen, ob die neu konstruierten PnuC-Hybridproteine produziert werden und diese auch wirklich in der Membranfraktion vorzufinden sind, wurden die Plasmide pSEpnuC-His<sub>6</sub>C' und pSEpnuC-His<sub>6</sub>N' in die *H. influenzae* *pnuC*-Mutante SE02 (BRAD, *nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *pnuC*) transformiert. Es wurden die Membranfraktionen von diesen zwei Komplementanten und dem Kontrollplasmid SE02+pACYC184, nach der im Kapitel IV.3.4. beschriebenen Methode, isoliert und im Western-Blot mit Hilfe eines Maus-Anti-Penta-His-Antikörpers nachgewiesen (Abb. 17).

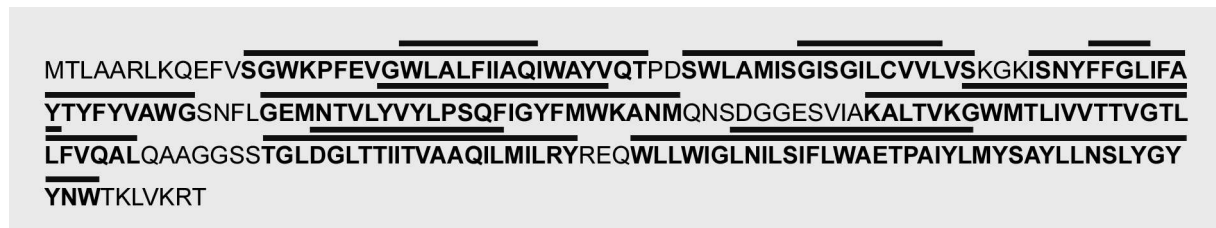


**Abb. 17** Western-Blot-Nachweis der PnuC-Lokalisation von *H. influenzae*. Aufgetragen sind Membranextrakte der Stämme (1+2) SE02+pACYC184, (3+4) SE02 (*nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *pnuC*) + pSEpnuC-His<sub>6</sub>C' und (5+6) SE02 (*nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *pnuC*) + pSEpnuC-His<sub>6</sub>N', wobei (1+3+5) den Überstand und (2+4+6) das Pellet des jeweiligen Stammes darstellen.

Der Western-Blot zeigt, dass die PnuC-Hybridproteine exprimiert werden und mit der cytosolischen Membran assoziiert sind (Spur 4, C'-terminales PnuC und Spur 6, N'-terminales PnuC) und nicht im Überstand vorliegen (Spur 3 und 5). Dagegen ist beim Kontrollstamm SE02+pACYC184 weder im Überstand (Spur 1), noch in der Membranfraktion (Spur 2) ein Signal zu erkennen.

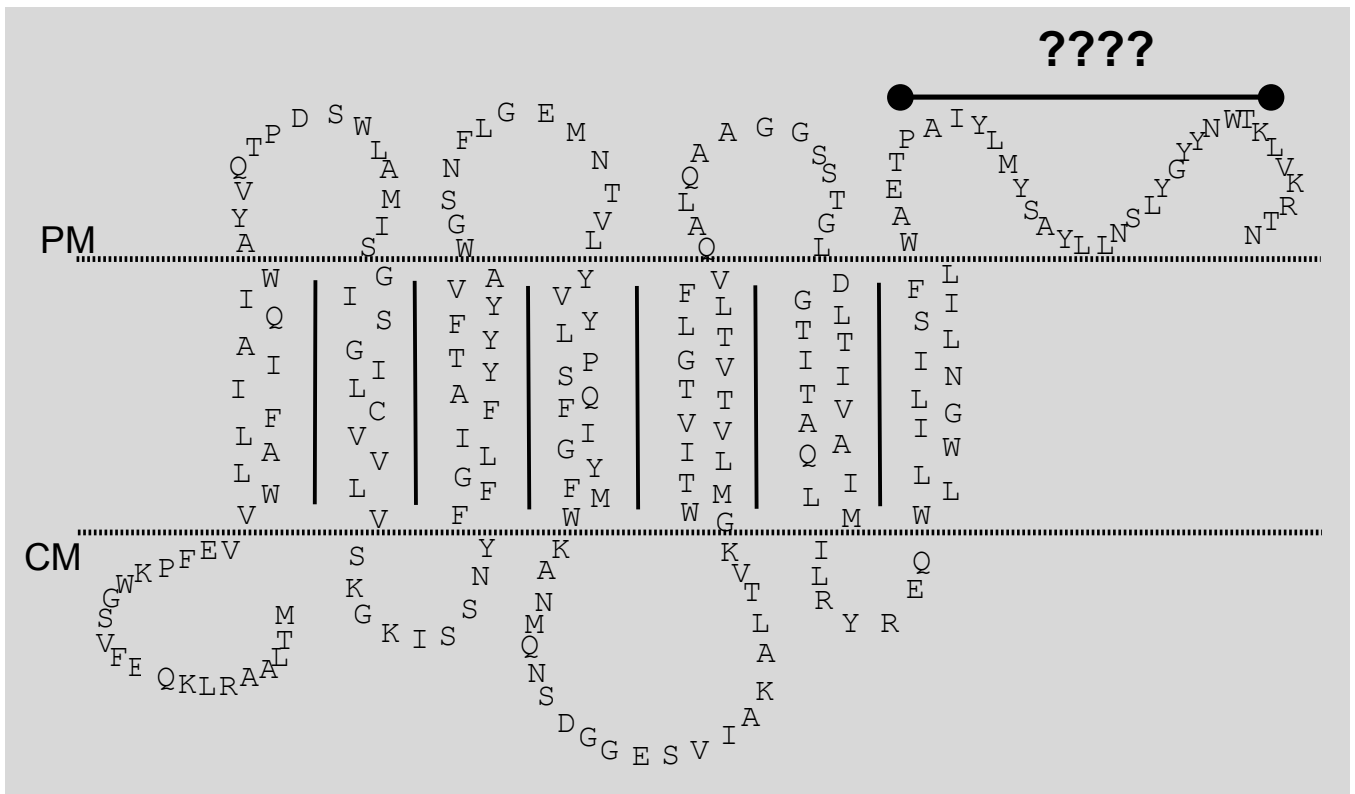
### 3.4. Bestimmung von Transmembrandomänen

Um eine genauere Vorhersage über das Topologiemodell von *H. influenzae* PnuC zu bestimmen, wurde mit Hilfe diverser Internetanwendungen eine TMD-Vorhersage (siehe Kapitel Materialien III.5.) ermittelt.



**Abb. 18** Aminosäure-Sequenz von *H. influenzae* PnuC. Die Balken oberhalb der Aminosäuren zeigen die Länge der TMD, die von den Internetanwendungen angegeben wurden (näheres siehe Text).

Abb. 18 zeigt die Aminosäure-Sequenz von PnuC. Vorhergesagte TMD sind mit einer Linie oberhalb gekennzeichnet. Dabei zeigt die kürzere der beiden Linien die Länge der TMD, die von allen Internetanwendungen angegeben wurde, und die längere Linie zeigt die TMD-Regionen, die nur von einigen Internetanwendungen berechnet wurden. Die nicht-fett gedruckten Aminosäuren zeigen die Protein-Region, die von allen Computer-Algorithmen als „Nicht-TMD“ identifiziert wurden, wobei der erste Loop meistens im Cytosol lokalisiert wurde. Aufgrund dieser Daten wurde ein vorläufiges Topologiemodell von *H. influenzae* PnuC erstellt (Abb. 19).



**Abb. 19** Vorläufiges Topologiemodell von *H. influenzae* PnuC. Das Modell wurde mit Hilfe mehrere Internetanwendungen, die TMD vorhersagen, erstellt.

Dabei wurden für den letzten Loop bzw. letzte TMD sehr unterschiedliche Angaben bezüglich der Länge der TMD errechnet, so dass die C'-terminale Region von PnuC im unklaren war.

### 3.5. Topologie von PnuC

Für die genetische Ermittlung der PnuC Topologie wurde die Methode der Fusionierung von Reportergenen (*phoA* und *lacZ*) verwendet. Das Produkt von *phoA*, die alkalische Phosphatase (PhoA), ist im Periplasma aktiv, während das Produkt von *lacZ*, die  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ), nur im Cytoplasma aktiv ist. Das Reportergen *phoA* wurde aus dem Plasmid pSWFII bezogen und mit *EcoRV* und *SmaI* so verdaut, dass das 1430 bp große Fragment keine kodierende Signalsequenz mehr beinhaltete. Das *lacZ*-Gen wurde in einer PCR mit den Oligonukleotiden 5'-*lacZ* und 3'-*lacZ* amplifiziert, wobei chromosomale DNS des *E. coli*-Stammes als Template diente, anschließend wurde das Fragment mit *SmaI*

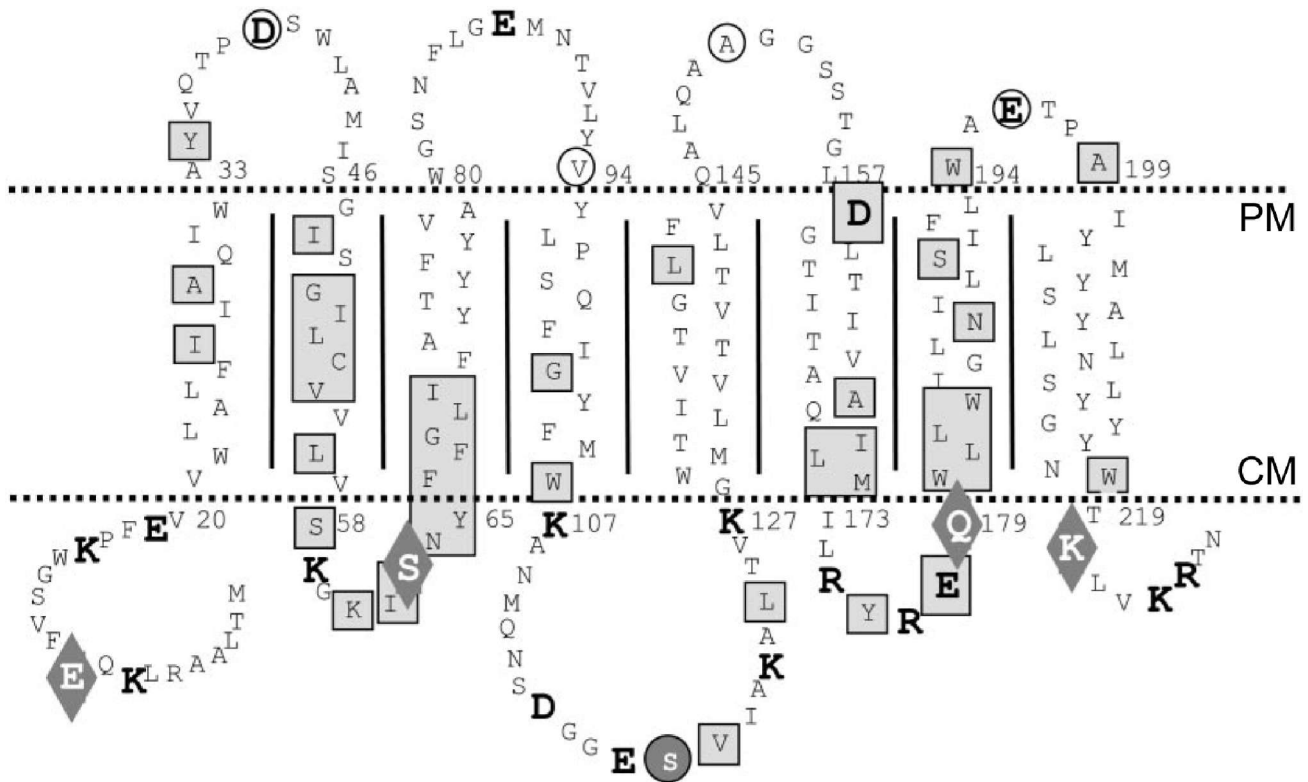
verdaut. Das 3134 bp große Produkt beinhaltet das Stop-Codon, aber nicht die Ribosomenbindestelle und das Start-Codon. Das 5048 bp große Plasmid pSEpnuC wurde verwendet, um entlang des Gens *pnuC* *StuI*-Restriktionsschnittstellen einzuführen. Dafür wurden für die von den Computer-Algorithmen vorhergesagten „Loops“ verschiedene Oligonukleotid-Pärchen generiert (Tabelle 5), die eine „blunt-end“ *StuI*-Restriktionsschnittstelle trugen. Nach der PCR und dem *StuI*-Verdau wurden die Fragmente religiert und in den *E. coli*-Stamm BL21 transformiert. Chloramphenicol-resistente Kolonien wurden isoliert, gereinigt und anschließend daraus Plasmid-DNS isoliert. Die neu entstandenen Plasmide pSEpnuC(*StuI*)<sub>1-9</sub> wurden mit *StuI* verdaut, mit der CIP dephosphoryliert und mit dem *EcoRV* und *SmaI* verdautem *phoA* bzw. mit dem *SmaI* verdautem *lacZ* ligiert und in den *E. coli*-Stamm CC118 transformiert. Die Transformation wurde auf LB-Platten ausplattiert, die mit Chloramphenicol (30 µg/ml) und X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktose; 40 µg/ml) bzw. X-Phos (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat-Dinatriumsalz, 40 µg/ml) supplementiert waren. Am nächsten Tag wurden entweder blaue oder weiße Kolonien, je nachdem ob sie aktiv waren in Anwesenheit von X-Phos bzw. X-Gal, isoliert und gereinigt. Da das Leseraster von *pnuC* durch die Insertionen nicht unterbrochen werden sollte, wurde die Fusionsstelle der neu entstandenen Plasmide pSEphoA<sub>AS</sub> bzw. pSElacZ<sub>AS</sub> mittels Sequenzierung überprüft. PhoA-Fusionen konnten in allen periplasmatischen (AS D39, V94, A150, E196) und cytoplasmatischen Regionen (AS E10, S63, Q179, K220), bis auf AS S118, eingeführt werden. LacZ-Fusionen dagegen konnten in allen cytoplasmatischen, aber nicht in periplasmatische Regionen generiert werden (siehe auch Tabelle 15). Anschließend wurde die Phosphatase- und die β-Galaktosidase-Aktivität, nach der im Kapitel IV.4.1 und IV.4.2 beschriebenen Methode, bestimmt. Die berechneten Aktivitäten in Miller Units sind in der Tabelle 15 dargestellt.



PhoA-Insertion	Aminosäure-Position	Phosphatase-Aktivität (Miller Units)	LacZ-Insertion	Aminosäure-Position	$\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (Miller Units)
pSEphoA <sub>D39</sub>	D39	240	-	-	-
pSEphoA <sub>V94</sub>	V94	80	-	-	-
pSEphoA <sub>A150</sub>	A150	60	-	-	-
pSEphoA <sub>E196</sub>	E196	70	-	-	-
pSEphoA <sub>E10</sub>	E10	2	pSElacZ <sub>E10</sub>	E10	1325
pSEphoA <sub>S63</sub>	S63	1	pSElacZ <sub>S63</sub>	S63	200
-	-	-	pSElacZ <sub>S118</sub>	S118	400
pSEphoA <sub>Q179</sub>	Q179	1	pSElacZ <sub>Q179</sub>	Q179	650
pSEphoA <sub>K220</sub>	K220	2	pSElacZ <sub>K220</sub>	K220	450
Negativ-Kontrolle (pSEpnuC)	-	1	Negativ-Kontrolle (pSEpnuC)	-	2,5

**Tabelle 15** Phosphatase- bzw.  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Miller Units der entsprechenden PhoA- bzw. LacZ-Insertionen.

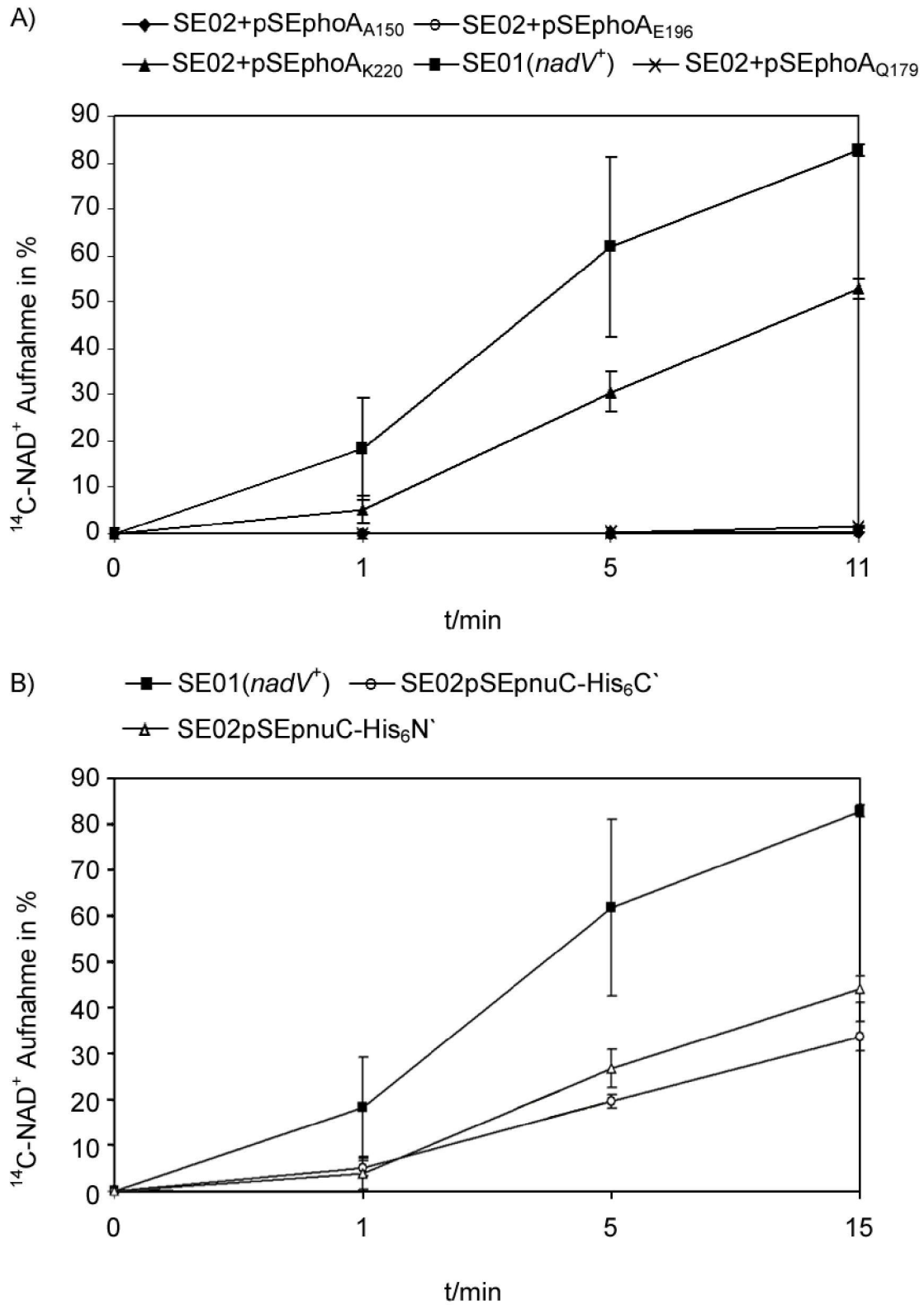
Wie man in Tabelle 15 sehen kann, sind die errechneten PhoA-Aktivitäten für die PhoA-Fusionen im Periplasma signifikant höher, als die für die PhoA-Fusionen im Cytosol bzw. für die Negativ-Kontrolle. Die PhoA-Aktivitäten im Periplasma lagen zwischen 60 und 240 Miller Units und differenzierten somit um das 4fache. Durch die LacZ-Aktivitäten der eingeführten LacZ-Fusionen im Cytoplasma konnten diese Werte signifikant bestätigt werden. Diese schwankten zwischen 200 und 1325 Miller Units, während die Negativ-Kontrolle 2,5 Miller Units betrug. Da auch die PhoA-Fusionen an diesen AS-Positionen eine PhoA-Aktivität zwischen 1 und 2 Miller Units erzeugten, kann das in Abb. 20 dargestellte Topologiemodell von *H. influenzae* als signifikant bestätigt angesehen werden. Somit wurde die Membran-Topologiestruktur von *H. influenzae* PnuC aufgeklärt. PnuC besitzt demnach 8 TMD. Sowohl der N'-terminale Bereich, als auch der bis zuletzt fragwürdige, C'-terminale Bereich befinden sich beide im Cytoplasma.



**Abb. 20** Sekundärstruktur von *H. influenzae* PnuC basierend auf TMD-Algorithmen und der Phosphatase- bzw.  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der PnuC-PhoA und PnuC-LacZ-Fusionen. Weiße Kreise: Position der PnuC-PhoA-Fusionen, grauer Kreis: Position der PnuC-LacZ-Fusion, graue Rauten: Position der PnuC-PhoA und PnuC-LacZ-Fusionen, hellgraue Boxen: konservierte AS, die im Vergleich der AS-Sequenz von PnuC mit denen von homologen Proteinen folgender Arten ermittelt wurden: *Yersinia pestis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas syringae*, *S. typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae* und *E. coli*. Negativ und positiv geladene AS sind im Modell fett gedruckt.

### 3.6. Strukturelle Funktion von PnuC

Um die strukturelle Funktion von *H. influenzae* PnuC zu testen, wurden die letzten 4 PhoA-Insertionen, die PnuC in der Länge an unterschiedlichen Stellen unterbrechen, und die N'- und C'-terminalen His-Tag-PnuC-Hybridproteine genauer untersucht. Die Plasmide pSEphoA<sub>A150</sub>, pSEphoA<sub>Q179</sub>, pSEphoA<sub>E196</sub>, pSEphoA<sub>K220</sub>, pSEpnuC-His<sub>6</sub>C' und pSEpnuC-His<sub>6</sub>N' wurden in den Stamm SE02 (BRAD, *nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *pnuC*) transformiert und im Transport-Assay mit <sup>14</sup>C-NAD<sup>+</sup> auf Komplementation getestet. Als Positiv-Kontrolle wurde der Stamm SE01 (BRAD, *nadV*<sup>+</sup>) verwendet. Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>490</sub> 2 angezogen und mit radioaktiv markiertem Substrat inkubiert. Nach 1, 5, und 11 bzw. 15 min wurden Proben entnommen und in einem Szintillationszähler gemessen (siehe kapitel IV.6.).



**Abb. 21** Aufnahme von  $^{14}\text{C-NAD}^+$  von *H. influenzae* (A) SE01 (*nadV*<sup>+</sup>), SE02+pSEphoA<sub>A150</sub>, SE02+pSEphoA<sub>Q179</sub>, SE02+pSEphoA<sub>E196</sub> und SE02+pSEphoA<sub>K220</sub> (B) SE01, SE02pSEpnuC-His<sub>6C</sub>' und SE02pSEpnuC-His<sub>6N</sub>'. Die Konzentration von  $^{14}\text{C-NAD}^+$  betrug  $1\ \mu\text{M}$  (spezifische Aktivität). Jeder Punkt repräsentiert den Durchschnittswert von zwei unabhängigen Messungen. Die vertikalen Balken stellen die Standardabweichung dar. Die Aufnahme des radioaktiv markierten Substrats ist als prozentualer Anteil der eingesetzten Menge von  $1\ \mu\text{M}$  Substrat angegeben.

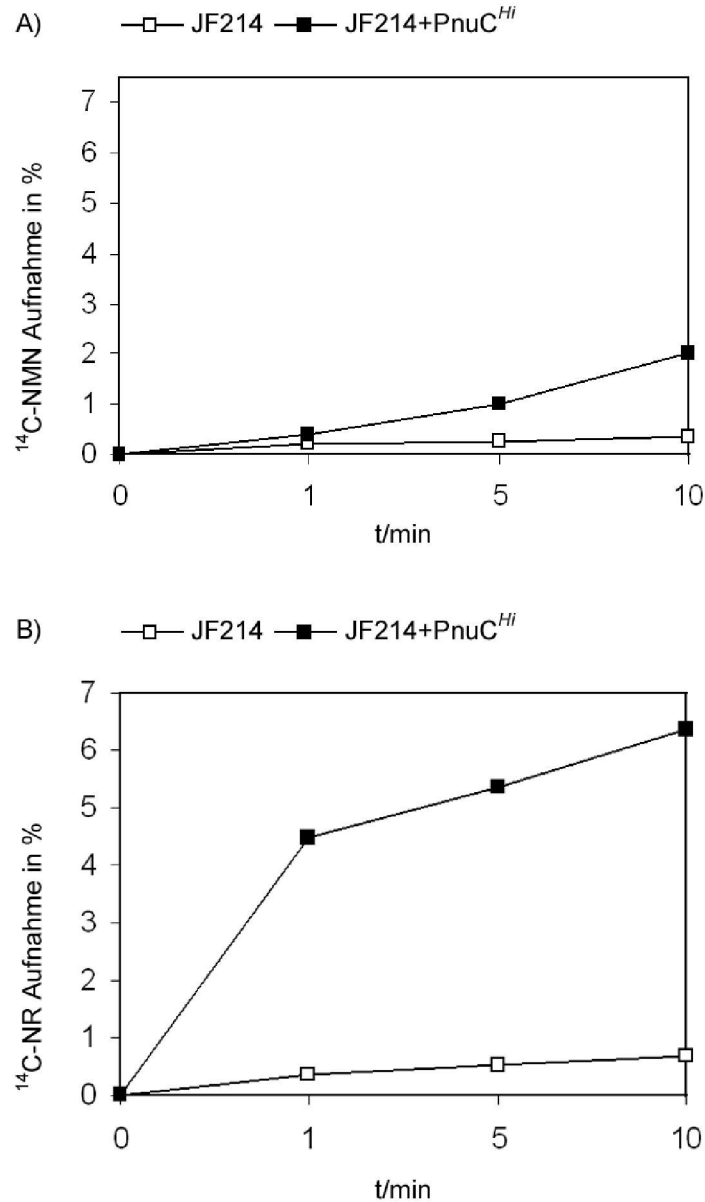
Das Diagramm in Abb. 21A und B zeigt, dass der Wildtyp nach 11 min 82,77% der eingesetzten  $^{14}\text{C-NAD}^+$  Menge aufnehmen konnte. Die Aufnahmefähigkeit von PnuC wird kaum beeinflusst, wenn im C'-terminalen Bereich nur die letzten 6 Aminosäuren fehlen; mit 52,75% transportiert die Komplementante mit der PhoA-Fusion pSEphoA<sub>K220</sub> noch mehr als die Hälfte der eingesetzten Radioaktivität. Wird das Protein allerdings weiter gekürzt bzw. unterbrochen, ist kein Transport mehr zu beobachten. So transportierte der Stamm SE02+pSEphoAQ179 nach 11 min 1,44%  $^{14}\text{C-NAD}^+$  und die im Periplasma gelegenen PhoA-Fusionen pSEphoA<sub>A150</sub> und pSEphoA<sub>E196</sub> beide nur noch 0,24%  $^{14}\text{C-NAD}^+$  (Abb. 21A). PnuC toleriert also nur eine geringe Verkürzung, ohne dass die Proteinfunktion beeinflusst wird. Die Aufnahmefähigkeit  $^{14}\text{C-NAD}^+$  bzw. die Proteinfunktion wird nur mäßig beeinflusst, wenn im N'- und C'-terminalen Bereich ein His-Tag fusioniert wird. So konnte der Stamm SE02pSEpnuC-His<sub>6</sub>C' nach 15 min 33,66% und der Stamm SE02pSEpnuC-His<sub>6</sub>N' 43,99%  $^{14}\text{C-NAD}^+$  transportieren.

#### 4. Untersuchungen zur Substratspezifität von PnuC

In den letzten Versuchen wurde geklärt, ob *H. influenzae* PnuC, trotz der sehr geringen Homologie, die gleiche Funktion ausübte wie *E. coli* bzw. *S. typhimurium* PnuC, nämlich die NMN-Aufnahme. Im Folgenden sollte geklärt werden, ob *H. influenzae* PnuC in einem *S. typhimurium*-Stamm bzw. *E. coli* PnuC in einem *H. influenzae*-Stamm NMN bzw. NR transportieren kann.

##### 4.1. Kann *H. influenzae* PnuC NMN bzw. NR in *S. typhimurium* transportieren?

Hierfür wurde ein *S. typhimurium*-Stamm JF214 verwendet, der eine Insertion im *pnuC* und in *nadB*, einem der Gene für die  $\text{NAD}^+$  *de novo* Biosynthese, besitzt. Der Stamm JF214 wurde kompetent gemacht und mit dem Plasmid pSEpnuC transformiert, welches das *H. influenzae pnuC* trägt (siehe Kapitel V.1.3.). Für den  $^{14}\text{C-NMN}$ - bzw.  $^{14}\text{C-NR}$ -Transport-Assay wurden dann JF214 und JF214+pSEpnuC angeimpft und wie in Kapitel IV.6. beschrieben weiterbehandelt. Die Proben wurden nach 1, 5 und 10 min entnommen und gemessen.

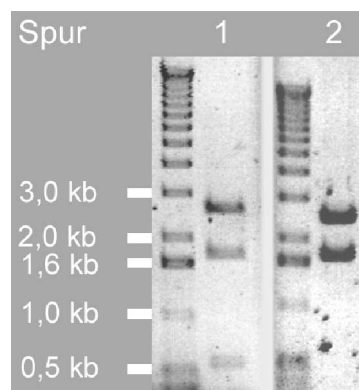


**Abb. 22** Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -NMN (A) bzw.  $^{14}\text{C}$ -NR (B) der Stämme JF214 und JF214+pSEpnuC<sup>Hi</sup>. Die Konzentration von  $^{14}\text{C}$ -NMN und  $^{14}\text{C}$ -NR betrug  $1\ \mu\text{M}$  (spezifische Aktivität). Die Aufnahme des radioaktiv markierten Substrats ist als prozentualer Anteil der eingesetzten Menge von  $1\ \mu\text{M}$  Substrat angegeben.

Abb. 22 zeigt, dass der Stamm JF214 nach 10 min nur 0,36%  $^{14}\text{C}$ -NMN aufnahm und der Stamm JF214+pSEpnuC mit 2,0% nicht wesentlich mehr der eingesetzten  $^{14}\text{C}$ -NMN-Menge transportieren konnte. Wurde  $^{14}\text{C}$ -NR als radioaktiv markiertes Nukleotid verwendet, so konnte der Stamm JF214 auch hier nach 10 min nur 0,68% aufnehmen, während der Stamm JF214+pSEpnuC mit 6,37% fast das 10fache inkorporieren konnte. Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass *H. influenzae* PnuC  $^{14}\text{C}$ -NR auch in *S. typhimurium* transportieren kann.

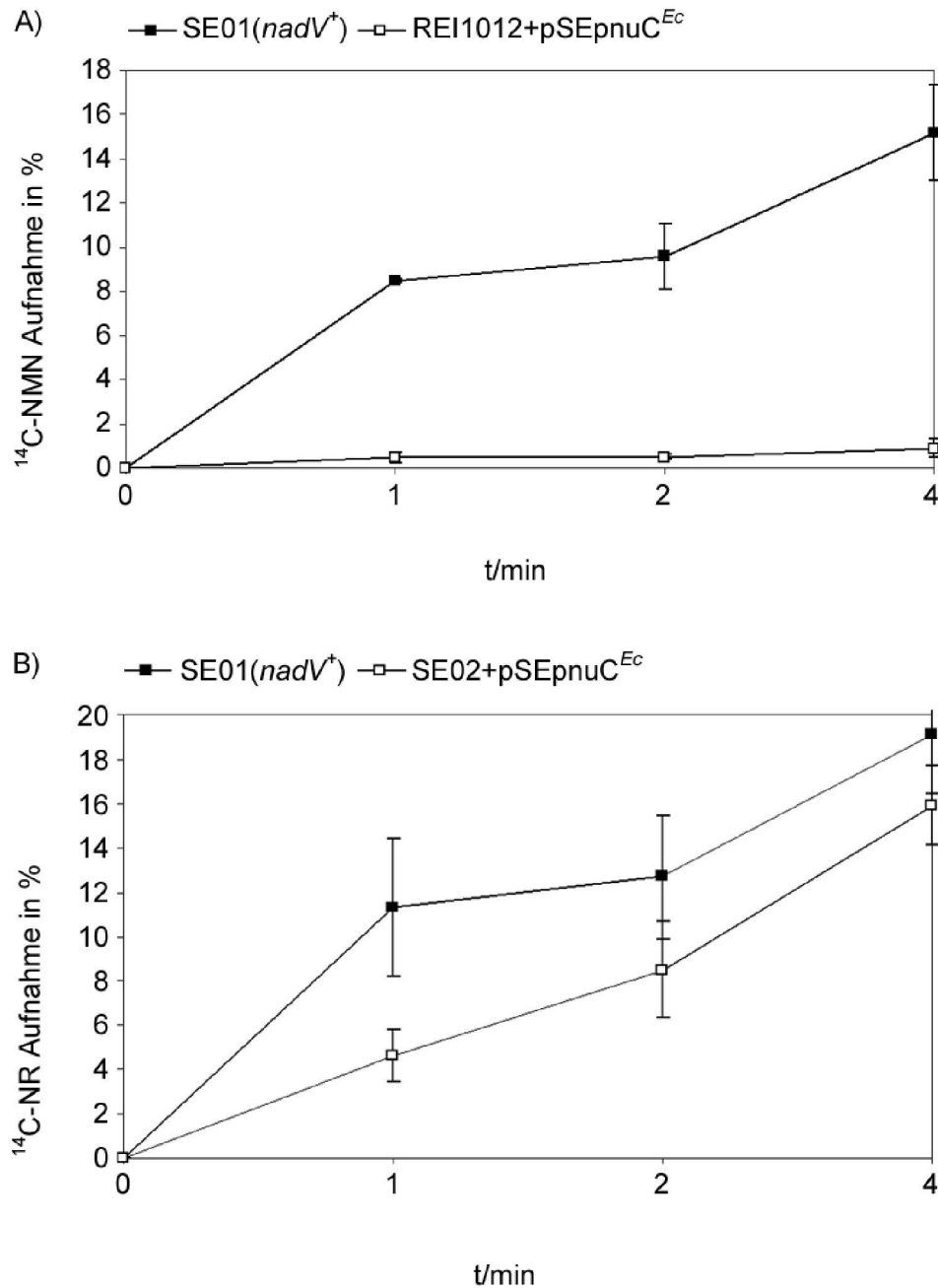
#### 4.2. Kann *E. coli* PnuC in *H. influenzae* NMN bzw. NR transportieren?

Bei *S. typhimurium* wurde PnuC von Spector et al. als NMN-Transporter beschrieben (226), während bei *H. influenzae* gezeigt werden konnte, dass nur NR in die Zelle aufgenommen werden kann (127). Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob das PnuC von *E. coli*, welches 89% Identität mit dem PnuC von *S. typhimurium* aufweist, in der Lage ist, in *H. influenzae* NMN bzw. NR zu transportieren, also eine mögliche Interaktion zwischen dem PnuC von *E. coli* und den am Transport beteiligten Komponenten, wie NadR, von *H. influenzae* stattfindet. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob PnuC<sup>Ec</sup> ausschließlich NMN, NR oder möglicherweise beides transportieren kann. Hierfür wurde *pnuC*<sup>Ec</sup> auf den Vektor pACYC184 kloniert und in zwei *H. influenzae*-Stämmen exprimiert. Für die Klonierung von *pnuC*<sup>Ec</sup> wurden die Oligonukleotide E.copnuC5' und E.copnuC3' verwendet. Als Template für die PCR diente chromosomale DNS von dem *E. coli*-Stamm C600. Das 827 bp große Fragment und der Vektor pACYC184 wurden mit *EcoRV* und *BamHI* verdaut und gereinigt. Nach Dephosphorylierung des linearisierten Vektors mit der CIP wurden Vektor und Insert ÜN ligiert. Anschließend wurde ein Aliquot der Ligation in den *E. coli*-Stamm LE392 transformiert. Am nächsten Tag wurden Chloramphenicol-resistente Kolonien isoliert und gereinigt. Nach Isolierung von Plasmid-DNS wurde das richtige Plasmid mit Hilfe eines *SspI*-Verdau bestätigt.



**Abb. 23** PCR-Nachweis des neu konstruierten *E. coli* *pnuC*-Plasmides pSEpnuC<sub>E. coli</sub>. Aufgetragen ist ein *SspI*-Verdau der Plasmide (1) pSEpnuC<sub>E. coli</sub> und (2) pACYC184.

Abb. 23 zeigt in Spur 1 die Banden bei 570 bp, 2592 bp und 1728 bp bei erfolgter Insertion im richtigen Leseraster, während sich für den Vektor pACYC184 die Bandengrößen von 1728 bp und 2517 bp ergeben. Das neu entstandene Plasmid pSEpnuC<sub>E. coli</sub> wurde anschließend in die *H. influenzae*-Stämme SE02 (*nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *pnuC*) und REI1012 ( $\Delta$ *hel*) transformiert. REI1012 ist eine Mutante, bei der das *hel*-Gen durch eine Kanamycin-Kassette ersetzt wurde und die durch fehlende Dephosphorylierung von NMN zu NR nicht in der Lage ist NMN aufzunehmen (127). Sollte PnuC<sup>Ec</sup> NMN transportieren können, müsste es den Stamm REI1012 im Transport komplementieren können. Die Mutante SE02 (*nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *pnuC*) wurde mit <sup>14</sup>C-NR inkubiert, während die Mutante REI1012 ( $\Delta$ *hel*) mit <sup>14</sup>C-NMN inkubiert wurde. Der Wildtyp SE01 (*nadV*<sup>+</sup>) wurde sowohl mit <sup>14</sup>C-NR, als auch mit <sup>14</sup>C-NMN inkubiert. Nach 1, 2 und 4 min wurden Proben entnommen, gefiltert und in einem Szintillationszähler gemessen (siehe Kapitel IV.6.).



**Abb. 24** Aufnahme von  $^{14}\text{C-NMN}$  (A) bzw.  $^{14}\text{C-NR}$  (B) von *H. influenzae* SE01 (*nadV*<sup>+</sup>) und SE02+pSEpnuC<sup>Ec</sup>. Die Konzentration von  $^{14}\text{C-NAD}^+$  und  $^{14}\text{C-NR}$  betrug 1  $\mu\text{M}$  (spezifische Aktivität). Jeder Punkt repräsentiert den Durchschnittswert von drei unabhängigen Messungen. Die vertikalen Balken stellen die Standardabweichung dar. Die Aufnahme des radioaktiv markierten Substrats ist als prozentualer Anteil der eingesetzten Menge von 1  $\mu\text{M}$  Substrat angegeben.

Abb. 24 zeigt, dass der Stamm SE02+pSEpnuC<sup>Ec</sup> nach 4 min 15,9% der eingesetzten  $^{14}\text{C-NR}$ -Menge transportieren konnte, was mit der aufgenommenen  $^{14}\text{C-NR}$ -Menge des Wildtypes SE01 mit 19,1% vergleichbar war. Im  $^{14}\text{C-NMN}$ -Transport dagegen erreicht der Wildtyp SE01 nach 4 min 15,2%, während der Stamm RE1012+pSEpnuC<sup>Ec</sup> die Mutante

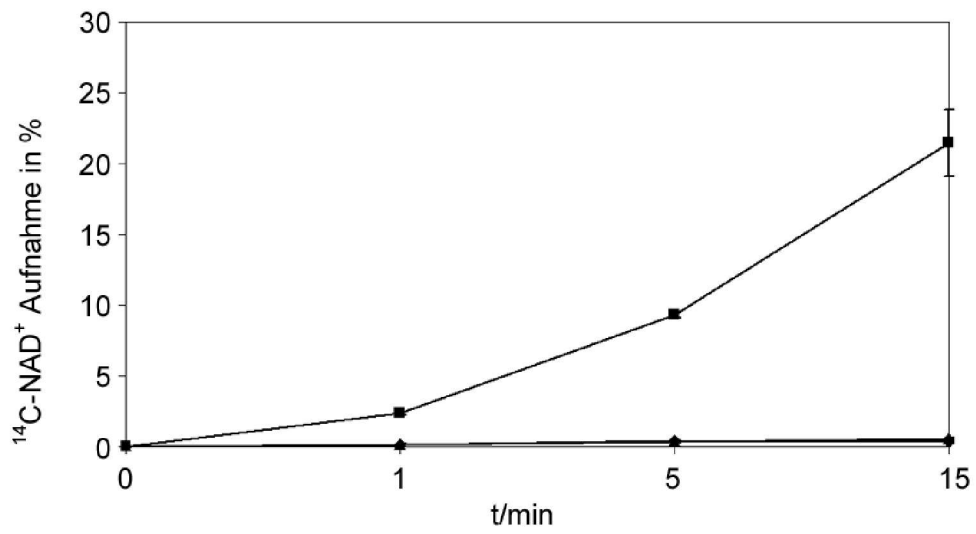


RE1012 nicht komplementieren konnte und nach 4 min mit 0,9% keine signifikante  $^{14}\text{C}$ -NMN-Aufnahme zu beobachten war. Das Ergebnis zeigt, dass NMN und nicht NR als Substrat für *E. coli* PnuC und wahrscheinlich auch für *S. typhimurium* PnuC dient.

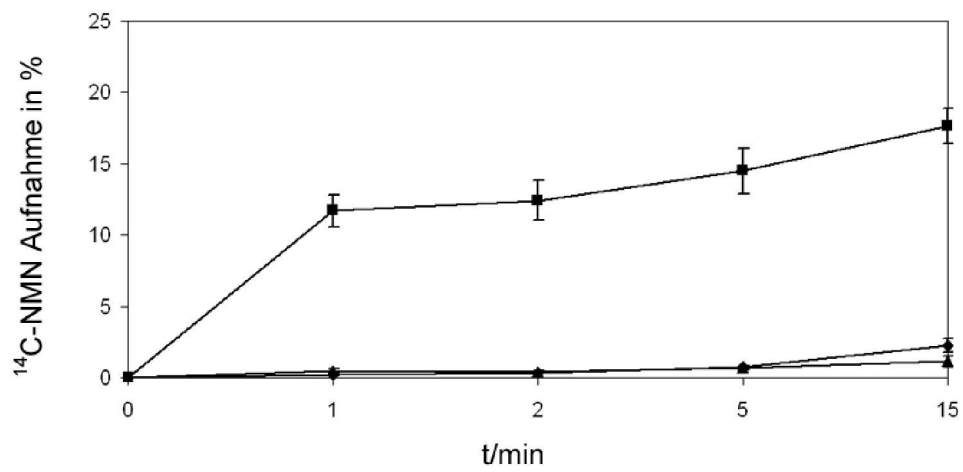
### 4.3. Substratspezifität von *A. actinomycetemcomitans* und *P. multocida* PnuC

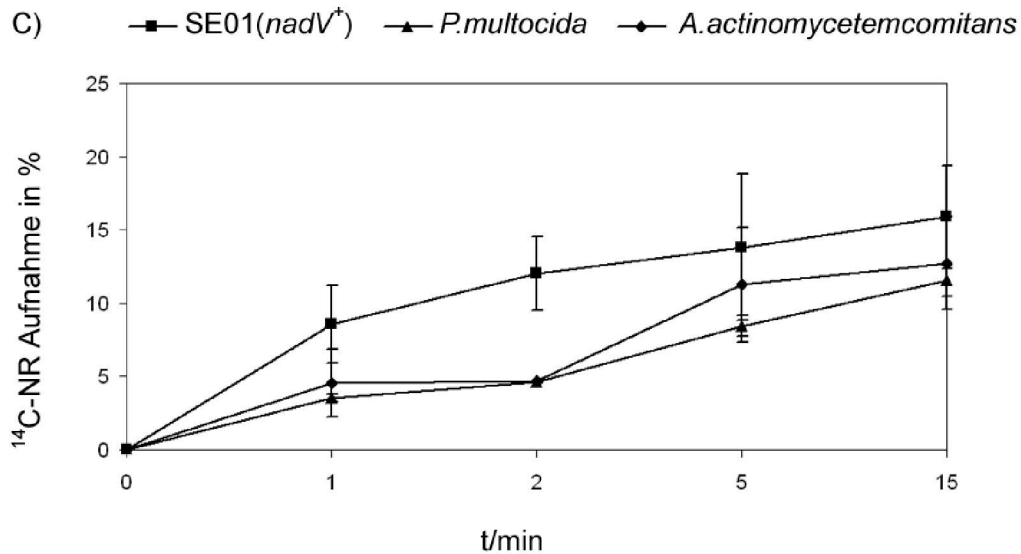
*A. actinomycetemcomitans* und *P. multocida* gehören zu der Familie der *Pasteurellaceae* und sind  $\text{NAD}^+$ -unabhängig. Diese Faktor-V-Unabhängigkeit wird ihnen durch ein Gen verliehen, welches eine Homologie zu *nadV* von *H. ducreyi* aufweist (150). Durch vergleichende Homologie konnte in Abb. 8 gezeigt werden, dass nach der Reannotierung die Identität von PnuC zwischen *H. influenzae* und *P. multocida* auf 71,4% und die Ähnlichkeit auf 81,1% gestiegen war. Um die Substratspezifität von PnuC von *A. actinomycetemcomitans* und *P. multocida* zu untersuchen, wurde ein Transport-Assay durchgeführt. Hierbei wurde auf die Transportfähigkeit von  $^{14}\text{C}$ - $\text{NAD}^+$  nach 1, 5 und 15 min, die Transportfähigkeit von  $^{14}\text{C}$ -NMN nach 1, 2, 5 und 15 min, die Transportfähigkeit von  $^{14}\text{C}$ -NR nach 1, 2, 5 und 15 min und die Transportfähigkeit von  $^{14}\text{C}$ -NAM nach 1, 2, 4 und 15 min getestet. Die Zellen wurden bis zu einer  $\text{OD}_{490}$  2 angezogen und mit radioaktiv markiertem Substrat inkubiert. Nach der gewünschten Zeit wurden Proben entnommen und in einem Szintillationszähler gemessen (siehe Kapitel IV.6.).

A)      ■ SE01(*nadV*<sup>+</sup>)    ▲ *P.multocida*    ◆ *A.actinomycetemcomitans*



B)      ■ SE01(*nadV*<sup>+</sup>)    ▲ *P.multocida*    ◆ *A.actinomycetemcomitans*





**Abb. 25** Aufnahme von  $^{14}\text{C-NAD}^+$  (A),  $^{14}\text{C-NMN}$  (B) bzw.  $^{14}\text{C-NR}$  (C) von *H. influenzae* SE01(*nadV*<sup>+</sup>), *A. actinomycetemcomitans* und *P. multocida*. Die Konzentration von  $^{14}\text{C-NAD}^+$ ,  $^{14}\text{C-NMN}$  und  $^{14}\text{C-NR}$  betrug  $1\ \mu\text{M}$  (spezifische Aktivität). Jeder Punkt repräsentiert den Durchschnittswert von drei unabhängigen Messungen. (Bei *A. actinomycetemcomitans* repräsentiert jeder Punkt den Durchschnittswert von zwei unabhängigen Messungen). Die vertikalen Balken stellen die Standardabweichung dar. Die Aufnahme des radioaktiv markierten Substrats ist als prozentualer Anteil der eingesetzten Menge von  $1\ \mu\text{M}$  Substrat angegeben.

Im  $^{14}\text{C-NAD}^+$  und  $^{14}\text{C-NMN}$  Transport zeigte sich, dass *A. actinomycetemcomitans* und *P. multocida* nicht in der Lage sind diese Nukleotide aufzunehmen. Während *H. influenzae* SE01(*nadV*<sup>+</sup>) nach 15 min 21,45% der eingesetzten  $^{14}\text{C-NAD}^+$  Menge transportieren konnte, nahm *P. multocida* in der selben Zeit nur 0,57% und *A. actinomycetemcomitans* 0,32%. Beim  $^{14}\text{C-NMN}$  Transport wurde eine ähnliche Situation beobachtet. Der Stamm SE01 hatte nach 15 min 17,67% des eingesetzten radioaktiven Substrats aufgenommen, während *P. multocida* 1,14% und *A. actinomycetemcomitans* 2,25% transportierten. Anders verhielt es sich im  $^{14}\text{C-NR}$  Transport, hier transportierten *P. multocida* 11,52% und *A. actinomycetemcomitans* 12,72% ähnlich viel  $^{14}\text{C-NR}$  wie SE01, der 15,89% nach 15 min aufnahm.

#### 4.4. NMN-Aufnahme Suppressormutanten

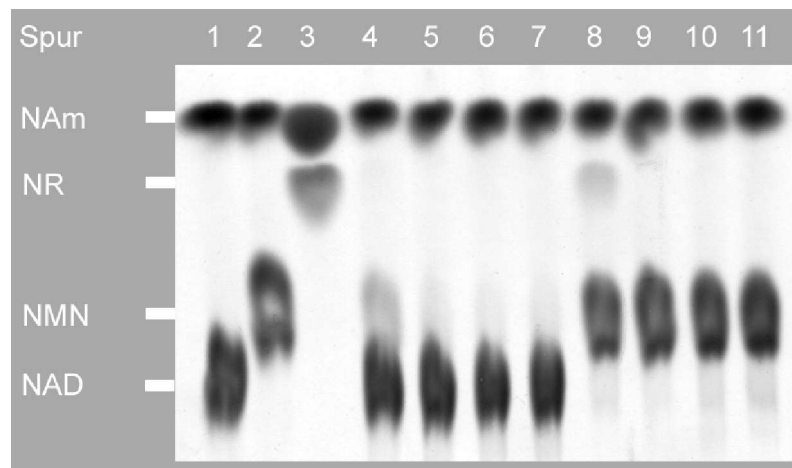
Im Folgenden wurde weiterhin die Substratspezifität von *H. influenzae* PnuC untersucht. Es sollte die Frage geklärt werden, ob sich durch Einführung von spontanen Mutationen im *pnuC* die Substratspezifität so verändern lässt, dass auch NMN als Substrat erkannt wird. Dazu wurde die *H. influenzae* Doppelmutante GK04 (*nadN::cat*,  $\Delta hel$ ) verwendet, die nur noch auf NR, aber nicht mehr auf  $NAD^+$  oder NMN wachsen kann (127). Die Mutante wurde angeimpft und bis zu einer  $OD_{490}$  2 kultiviert. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen der Kultur auf BHI-Platten, die mit 100  $\mu M$  NMN, 2  $\mu M$  Chloramphenicol und 10  $\mu M$  Kanamycin supplementiert waren, ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag waren einzelne, wenige Kolonien hochgewachsen. Zwei der Kolonien wurden auf BHI-Platten mit 15  $\mu M$  NMN, 2  $\mu M$  Chloramphenicol und 10  $\mu M$  Kanamycin weiter gereinigt. Abb. 26 zeigt den Wachstumsphänotyp der zwei Mutanten, die als GK04\*<sup>1</sup> und GK04\*<sup>2</sup> bezeichnet wurden, und den des Ausgangsstammes GK04.



**Abb. 26** Wachstumsphänotyp von (1) GK04, (2) GK04\*<sup>1</sup> und (3) GK04\*<sup>2</sup> auf einer BHI-Platte supplementiert mit 15  $\mu M$  NMN.

Nach dem signifikanten Wachstumsphänotyp, bei dem GK04\*<sup>1</sup> und GK04\*<sup>2</sup> sehr gutes Wachstum zeigten, während GK04, wie schon früher gezeigt, nicht wachsen konnte, wurden die drei Stämme auf Transport getestet. Getestet wurde der Transport auf <sup>14</sup>C-NMN und <sup>14</sup>C-NR nach 1, 2 und 4 min. Im Transport-Assay konnte jedoch kein signifikanter Unterschied der Mutanten GK04\*<sup>1</sup> und GK04\*<sup>2</sup> im Verhältnis zum Ausgangsstamm GK04 gezeigt werden. Nach 4 min transportierte der Stamm GK04 0,49%, GK04\*<sup>1</sup> 0,57% und GK04\*<sup>2</sup>

0,38% der eingesetzten  $^{14}\text{C}$ -NMN-Menge. Ähnlich verhielt es sich bei dem  $^{14}\text{C}$ -NR-Transport; GK04 transportierte 22,97%, GK04\*<sup>1</sup> 20,23% und GK04\*<sup>2</sup> 15,73% nach 4 min. Um dieses Ergebnis noch genauer zu untersuchen, wurde anschließend chromosomale DNS präpariert und die Region um *pnuC* samt Promotorbereich sequenziert. Es konnten keinerlei Mutationen, weder im *pnuC*, noch stromaufwärts im Promotorbereich, identifiziert werden. Um zu untersuchen, ob der Platten-Wachstumsphänotyp möglicherweise auf eine Phosphatase, die NMN zu NR dephosphoryliert, zurückzuführen ist, wurde von den Stämmen Rd KW20, GK04, GK04\*<sup>1</sup> und GK04\*<sup>2</sup> Periplasma-Extrakte isoliert (siehe Kapitel IV.3.1.) und diese nach Inkubation mit  $^{14}\text{C}$ -NAD<sup>+</sup> und  $^{14}\text{C}$ -NMN mit Hilfe einer Dünnschicht-Chromatographie (siehe Kapitel IV.7.) aufgetrennt.



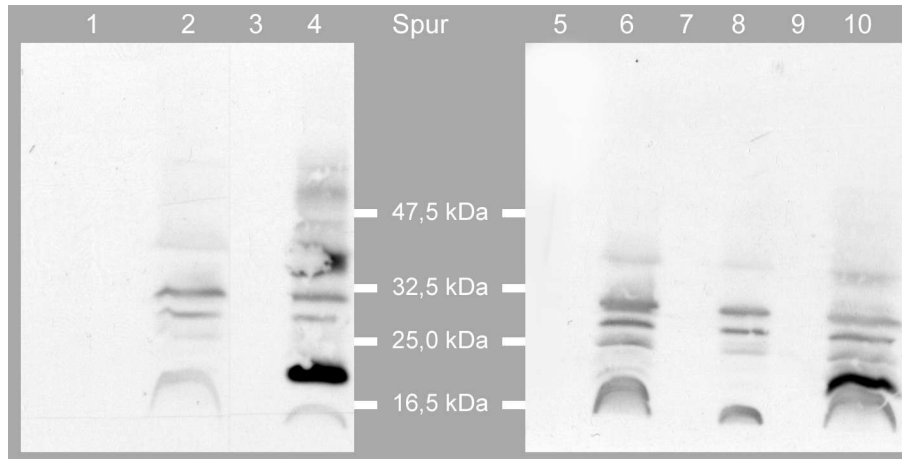
**Abb. 27** Dünnschicht-Chromatographie zur Überprüfung einer eventuellen Phosphatase-Aktivität. Periplasma-Extrakt der Stämme Stämme Rd KW20, GK04, GK04\*<sup>1</sup> und GK04\*<sup>2</sup> (Spur 4-7) mit NAD<sup>+</sup> als Substrat und (Spur 8-11) mit NMN als Substrat.

Die ersten drei Spuren der Dünnschicht-Chromatographie in Abb. 27 zeigen die Kontroll-Substrate. Spur 4 zeigt die Spaltung von NAD<sup>+</sup> zu NMN durch den Periplasma-Extrakt des Wildtyps Rd KW20. In Spur 5-7 sind die Periplasma-Extrakte der Stämme GK04, GK04\*<sup>1</sup> und GK04\*<sup>2</sup> (von links nach rechts) aufgetropft worden. Hier ist nur eine leichte Hintergrundbande zu sehen, die auf der Höhe von NMN läuft, die allerdings auch zu sehen ist, wenn NAD<sup>+</sup> als Kontroll-Substrat aufgetragen wird. Wird NMN als Substrat verwendet, ist das Ergebnis noch deutlicher. Während das Periplasma-Extrakt des Wildtyps NMN zu NR spaltet (Spur 8), wird NMN durch das Periplasma-Extrakt der anderen drei Stämme GK04, GK04\*<sup>1</sup> und GK04\*<sup>2</sup> (Spur 9-11, von links nach rechts) nicht gespalten.

#### 4.5. Einführung von Punktmutanten mit Hilfe ortsgerichteter Mutagenese

Nachdem keine spontanen Suppressor-Mutanten im *pnuC* gefunden wurden, sollten mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese gezielt einzelne Basen bzw. Aminosäuren ausgetauscht werden. Dabei interessierte nicht nur die Substratspezifität, sondern auch eine mögliche Substratbindestelle bzw. eine Region, die mit möglichen anderen Komponenten der  $\text{NAD}^+$ -Aufnahme interagieren könnte. Um die Frage zu klären, welche Aminosäuren ausgetauscht werden sollten, wurde ein Homologievergleich der PnuC-Proteine von mehreren Bakterienspezies durchgeführt. Verglichen wurde die Aminosäuresequenz der Spezies *H. influenzae*, *Yersinia pestis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas syringae*, *S. typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae* und *E. coli*. Die Aminosäurereste, die bei allen Stämmen identisch und konserviert waren, sind in dem Topologiemodell in Abb. 20 und im Anhang Abb.44 hervorgehoben. Unter den konservierten Domänen befanden sich drei Aminosäuren, die geladen waren (Lysin AS 61, Asparaginsäure AS 158 und Glutaminsäure AS 178) und sich für den Aminosäureaustausch anboten. Für den Austausch von Lysin zu Alanin wurden die Oligonukleotide LyszuAla5' und LyszuAla3' verwendet, für den Austausch Asparaginsäure zu Lysin wurden die Oligonukleotide AspzuLys5' und AspzuLys3' verwendet und für die Mutagenese von Glutaminsäure zu Glutamin wurden die Oligonukleotide GluzuGln5' und GluzuGln3' benutzt. Eine weitere positiv geladene AS Arginin 175, an dessen AS-Position die meisten, zur Homologie herangezogenen Bakterienarten ein konserviertes und positiv geladenes Lysin und davor ein Arginin hatten, wurde gegen Methionin ausgetauscht. Hierfür wurden die Primer ArgzuMet5' und ArgzuMet3' verwendet. Als Template für die PCR wurde das N'-terminale Fusionsplasmid pSEpnuC-His<sub>6</sub>N' verwendet und die PCR nach der im Handbuch von Invitrogen beschriebenen Methode durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mit *DpnI* verdaut, um die maternale Plasmid-DNS zu eliminieren, und anschließend in den *E. coli*-Stamm BL21 transformiert. Am nächsten Tag wurden Tetracyclin-resistente Kolonien in der Lys zu Ala, Arg zu Met und Asp zu Lys Mutagenese isoliert und gereinigt. Für die Glu zu Gln Mutagenese konnten keine Kolonien isoliert werden. Von den isolierten Stämmen wurde Plasmid-DNS präpariert und die eingeführte Punktmutation in einer Sequenzier-PCR verifiziert. Dabei stellte sich raus, dass bei der Asp zu Lys-Mutagenese eine zusätzliche Punktmutation bei AS 175 (Arginin zu Methionin) eingeführt wurde. Die drei neu entstandenen Plasmide pSEpnuC<sub>K61A</sub>, pSEpnuC<sub>R175M</sub> und pSEpnuC<sub>(D158K/R175M)</sub> wurden in die *H. influenzae pnuC*-Mutante SE02 (BRAD, *nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta pnuC$ ) transformiert. Um zu überprüfen,

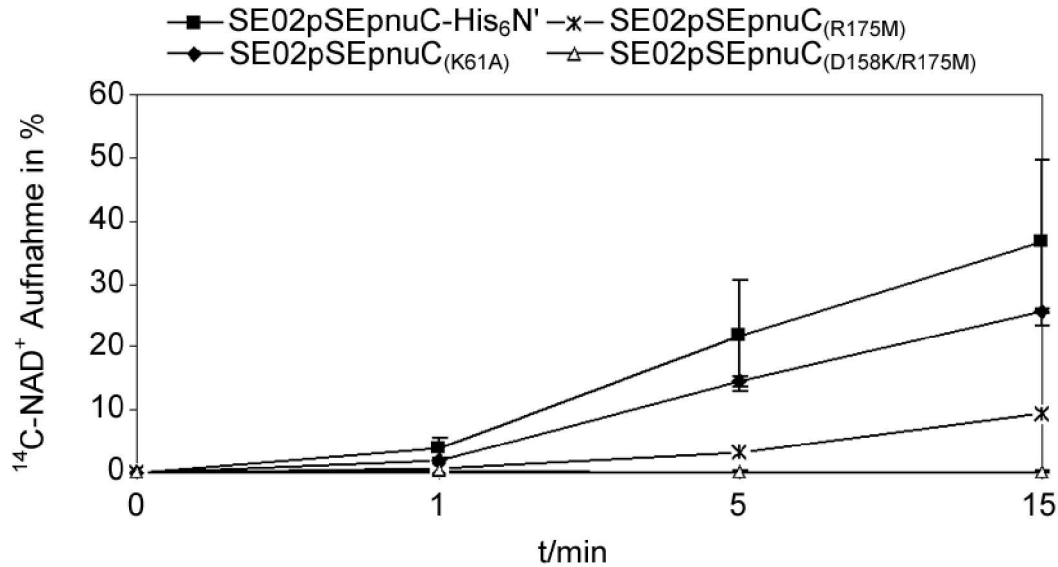
ob das PnuC-Fusionsprotein trotz eingeführter Punktmutationen von der Zelle noch exprimiert wird und an die cytoplasmatische Membran transportiert wird, wurden die Membranfraktionen von den Stämmen SE02pSEpnuC-His<sub>6</sub>N', SE02pSEpnuC<sub>(K61A)</sub>, SE02pSEpnuC<sub>(R175M)</sub>, SE02pSEpnuC<sub>(D158K/R175M)</sub> und dem Kontrollstamm SE02pACYC184 isoliert und im Western-Blot mit dem Maus-Anti-Penta-His-Antikörper sichtbar gemacht.



**Abb. 28** Western-Blot-Nachweis der eingeführten Punktmutationen im PnuC mittels ortsgerichteter Mutagenese. Aufgetragen sind Membranextrakte der Stämme (1+2) SE02pSEpnuC<sub>(R175M)</sub>, (3+4) SE02pSEpnuC<sub>(K61A)</sub> (5+6) SE02pSEpnuC<sub>(D158K/R175M)</sub>, (7+8) SE02pACYC184 und (9+10) SE02pSEpnuC-His<sub>6</sub>N', wobei (1+3+5+7+9) den Überstand und (2+4+6+8+10) das Pellet des jeweiligen Stammes darstellen.

Der Western-Blot in Abb. 28 zeigt bei dem Stamm SE02pSEpnuC-His<sub>6</sub>N', der als Positiv-Kontrolle diente, ein stärkeres Signal unterhalb der 25 kDa Bande, welches bei dem Kontrollstamm SE02pACYC184, der als Negativ-Kontrolle diente, und bei den Punktmutanten SE02pSEpnuC<sub>(R175M)</sub> und SE02pSEpnuC<sub>(D158K/R175M)</sub> nicht zu sehen ist. Bei der Punktmutante SE02pSEpnuC<sub>(K61A)</sub> dagegen ist auf der gleichen Höhe ein stärkeres Signal zu sehen, was darauf hinweist, dass das PnuC-Fusionsprotein trotz eingeführter Punktmutation exprimiert wird und an die Membran transportiert wird. Ob jedoch das Fusionsprotein seine Funktionalität verloren hatte, NR transportieren zu können, sollte im Transport-Assay überprüft werden.

Hierbei wurde der Transport von <sup>14</sup>C-NAD<sup>+</sup> nach 1, 5 und 15 min getestet. Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>490</sub> 2 angezogen und mit radioaktiv markiertem Substrat inkubiert. Nach der gewünschten Zeit wurden Proben entnommen und in einem Szintillationszähler gemessen (siehe Kapitel IV.6).



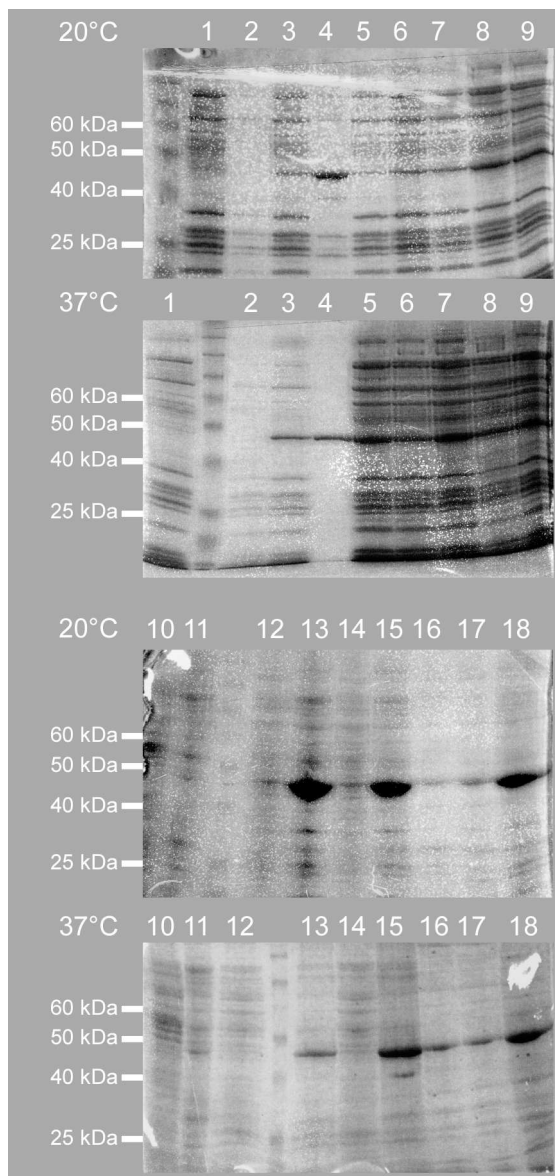
**Abb. 29** Aufnahme von  $^{14}\text{C-NAD}^+$  von *H. influenzae* SE02pSEpnuC-His<sub>6</sub>N', SE02pSEpnuC<sub>(K61A)</sub>, SE02pSEpnuC<sub>(R175M)</sub> und SE02pSEpnuC<sub>(D158K/R175M)</sub>. Die Konzentration von  $^{14}\text{C-NAD}^+$  und  $^{14}\text{C-NR}$  betrug 1  $\mu\text{M}$  (spezifische Aktivität). Jeder Punkt repräsentiert den Durchschnittswert von drei unabhängigen Messungen. Die vertikalen Balken stellen die Standardabweichung dar. Die Aufnahme des radioaktiv markierten Substrats ist als prozentualer Anteil der eingesetzten Menge von 1  $\mu\text{M}$  Substrat angegeben.

Die Stämme SE02pSEpnuC-His<sub>6</sub>N' und SE02pSEpnuC<sub>(K61A)</sub>, deren PnuC im Western-Blot exprimiert wurde (Abb. 28), waren auch im  $^{14}\text{C-NAD}^+$ -Transport positiv. So transportierte der Ausgangsstamm SE02pSEpnuC-His<sub>6</sub>N' 36,5% und die Punktmutante SE02pSEpnuC<sub>(K61A)</sub> 25,59% der eingesetzten radioaktiven Menge. Das PnuC des Stammes SE02pSEpnuC<sub>(D158K/R175M)</sub> konnte weder exprimiert werden, noch wurde  $^{14}\text{C-NAD}^+$  aufgenommen (0,16%). Der Stamm SE02pSEpnuC<sub>(R175M)</sub> konnte noch 9,46% des eingesetzten  $^{14}\text{C-NAD}^+$ -Labels transportieren, der Stamm war allerdings im Western-Blot negativ, da kein Signal auf der entsprechenden Größe zu sehen war.



## 5. Expressionsstudien mit PnuC-His-Tag Protein

Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der University von Piemont (Orientale Amedeo Avogadro, Novara, Italien), die sich auf das Kristallisieren von Protein-Strukturen spezialisiert haben, wurde eine Induktionsstudie mit dem Plasmid pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub> (Nr. 13) zum Zweck der Expression des N'-terminalen His-Tag-PnuC-Hybridproteins durchgeführt. Hierfür wurde das Plasmid pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub> (Nr. 13) und das Kontrollplasmid pIVEX2.4b immer neu in den *E. coli*-Stamm BL21pLysS bzw. BL21(DE3) transformiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur in Reagenzgläsern überimpft, die bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 inkubiert wurde. Die Kulturen wurden anschließend aufgeteilt und mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen (0; 0,4 und 0,8 mM IPTG) bei 20°C bzw. 37°C für unterschiedliche Zeiten (1h, 2h, 4h und ÜN) zum Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membranfraktion (nach der im Kapitel IV.3.3. beschriebenen Methode) isoliert und auf ein SDS-Gel geladen.

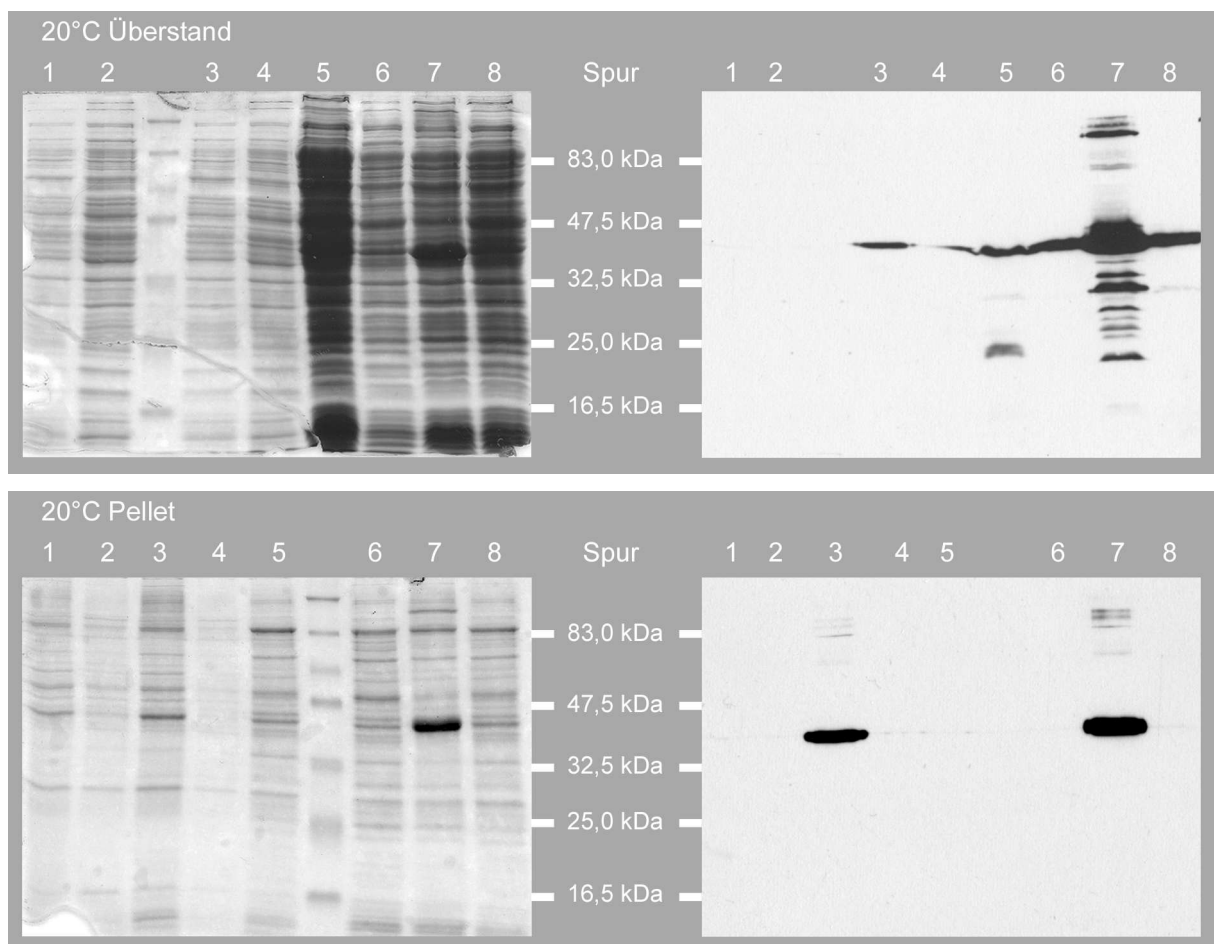


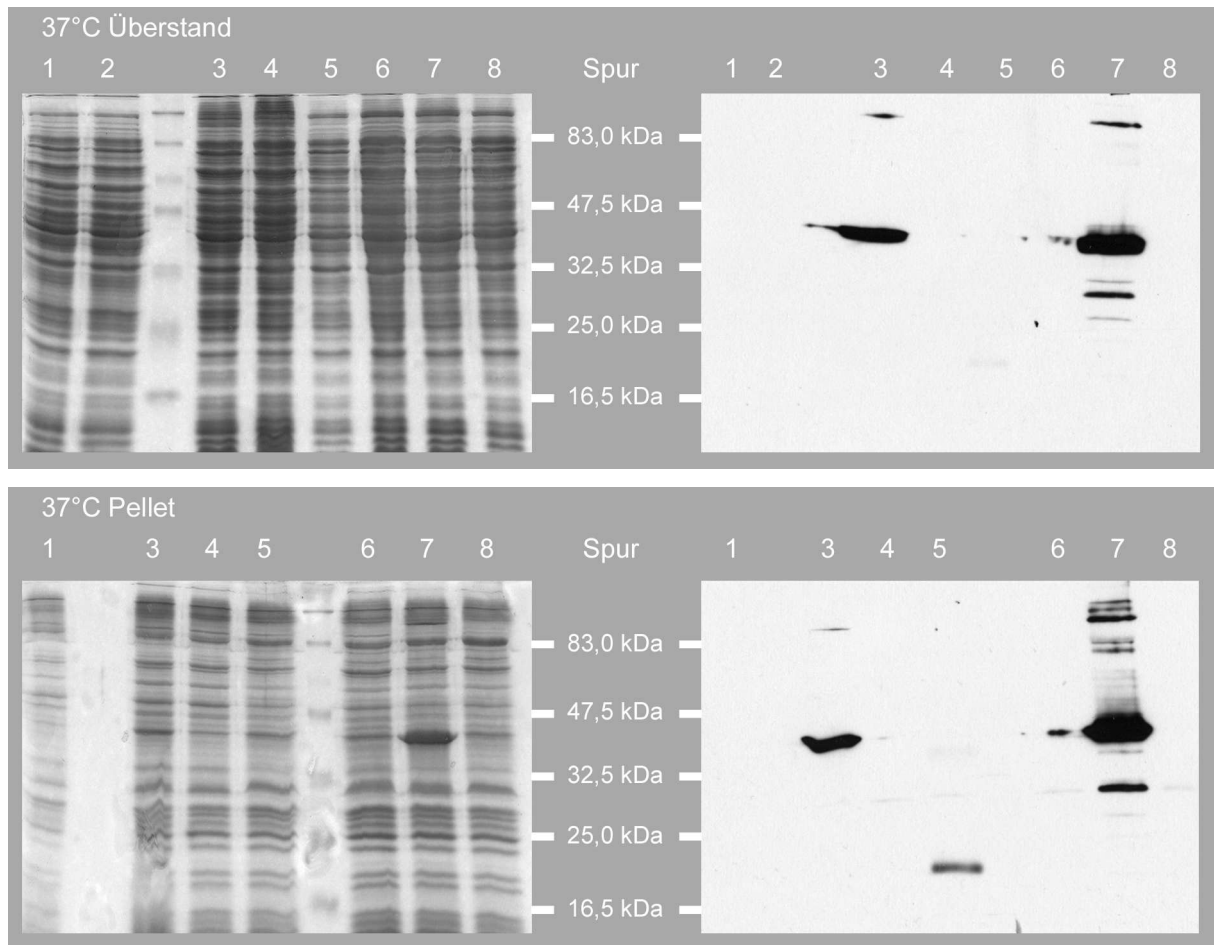
**Abb. 30** Induktionsstudie von PnuC. Untersucht wurde die Überexpression von PnuC (BL21(DE3) pIVEXpnuCHis<sub>6</sub>) bei unterschiedlichen Temperaturen 20°C, 37°C und unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen nach 1h, 2h 4h und ÜN. Als Negativkontrolle diente der Stamm mit Kontrollplasmid BL21(DE3) pIVEX2.4b. Ü: Überstand, P: Pellet.

- (1) pIVEX2.4b, 2 h, 0,4 mM IPTG, Ü
- (2) pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub>13, 2 h, 0,4 mM IPTG, Ü
- (3) pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub>13, 1 h, 0,4 mM IPTG, Ü
- (4) pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub>13, 1 h, 0,4 mM IPTG, P
- (5) pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub>13, 1 h, 0,8 mM IPTG, Ü
- (6) pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub>13, 2 h, 0,4 mM IPTG, Ü
- (7) pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub>13, 2 h, 0,8 mM IPTG, Ü
- (8) pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub>13, 4 h, 0,4 mM IPTG, Ü
- (9) pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub>13, 4 h, 0,8 mM IPTG, Ü
- (10) pIVEX2.4b, ÜN, 0,8 mM IPTG, Ü
- (11) pIVEX2.4b, ÜN, 0,8 mM IPTG, P
- (12) pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub>13, ÜN, 0,4 mM IPTG, Ü
- (13) pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub>13, ÜN, 0,4 mM IPTG, P
- (14) pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub>13, ÜN, 0,8 mM IPTG, Ü
- (15) pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub>13, ÜN, 0,8 mM IPTG, P
- (16) pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub>13, 2 h, 0,4 mM IPTG, P
- (17) pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub>13, 2 h, 0,8 mM IPTG, P
- (18) pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub>13, 4 h, 0,4 mM IPTG, P

Wie Abb. 30 zeigt konnte PnuC bei ca. 45 kDa exprimiert werden. PnuC hat normalerweise ein Molekulargewicht von 24,8 kDa, mit dem fusioniertem His-Tag kommt es auf ein Molekulargewicht von 30,1 kDa. Mit Hilfe eines Western-Blots konnte bestätigt werden, dass es sich bei der exprimierten 45 kDa Bande um PnuC handelte, was 75% seiner Dimer-Form entspricht. Die Expression war am stärksten in der Pellet-Fraktion bei den Proben, die bei 20°C und ÜN inkubiert wurden. Dabei konnten mit 0,4 mM bzw. 0,8 mM IPTG ähnliche Ergebnisse erzielt werden (Abb.30, Spur 13 und 15). Bei kürzeren Inkubationszeiten konnte eine stärkere Expression bei 37°C erzielt werden (Abb. 30, Spur 4). Nach 4h konnte die Expression bei 20°C gesteigert werden.

Der Versuch wurde mit zwei verschiedenen Versionen des Plasmids pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub> (das im obigen Versuch verwendete und neu aus einer Midi-Präparation isolierte Plasmid pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub> (Nr. 13) und dem aus einer Mini-Präparation isolierten Plasmid pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub> (Nr. 1) wiederholt. Als Kontrollplasmide wurden pIVEX2.4b und pCRT7-TOPOpnuCHis<sub>6</sub> verwendet. Es wurden zwei Ansätze mit unterschiedlichen Volumina durchgeführt: Reagenzgläser mit 10 ml Kulturen und Kölbchen mit 30 ml Kulturen. Die Kulturen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> 0,7 angezogen und anschließend mit 0,6 mM IPTG induziert. Danach wurden die Kulturen aufgeteilt und bei 37°C für 1,5 h bzw. bei 20°C ÜN im Schüttler bei ca. 150 rpm inkubiert.





**Abb. 31** Induktionsstudie von PnuC Nr. 2. Dargestellt ist zum SDS-Gel (links) auch immer der dazugehörige Western-Blot (rechts). Von oben nach unten sind der Überstand bei 20°C, das Pellet bei 20°C, der Überstand bei 37°C und das Pellet bei 37°C folgender Stämme dargestellt: (1+5): pCRT7-TOPOpnuCHis<sub>6</sub>, (2+6): pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub> (Nr. 13), (3+7): pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub> (Nr. 1) und (4+8): pIVEX2.4b. Die Proben Nr. 1+2+3+4 wurden in Kolben und die Proben Nr. 5+6+7+8 in Reagenzgläser exprimiert.

In den Ansätzen, die in den Kölbchen kultiviert wurden, konnte PnuC nur schwach überexprimiert werden, während in den Reagenzgläsern eine weit stärkere Expression des Plasmids pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub> (Nr. 1) zu erzielen war. In beiden Ansätzen konnte das neu isolierte Plasmid pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub> (Nr. 13) nicht überexprimiert werden, siehe Western-Blot (Abb. 31). Bei einer Wiederholung des Versuches, bei der diesmal das Plasmid pIVEX-pnuCHis<sub>6</sub> (Nr. 1) neu aus einer Midi-Präparation, sowie aus einer Mini-Präparation isoliert wurde, konnte PnuC nicht im SDS-Gel exprimiert werden. Im Western-Blot konnte nur das PnuC aus der Midi-Präparation dedektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Arbeitsgruppe aus Novara am Institut „Orientale Amedeo Avogadro“ konnte PnuC unter keinen Bedingungen exprimieren.

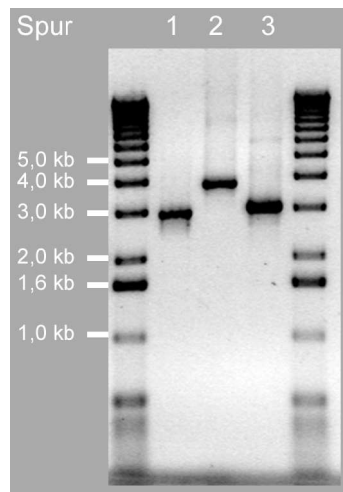
## 6. Weitere putative Gene, die an der NAD<sup>+</sup>-Aufnahme und NAD<sup>+</sup>-Umsatz beteiligt sein könnten

Aufgrund des Wachstumsphänotyps der *pnuC*-Mutante, die *in vitro* auf höheren NR-Konzentrationen sehr gutes Wachstum zeigte, lag die Annahme nahe, dass möglicherweise ein zweiter NR-Transporter existiert, der *in vitro*, aber nicht *in vivo* (Rattenmodell), noch genügend NR zum Überleben des Stammes bereitstellt. Potentielle Gene, die ein weiteres, selbständiges NR-Aufnahmesystem bzw. an dem *pnuC*-Transport unterstützend beteiligt sein könnten, wurden näher untersucht.

### 6.1. ABC-Transporter

Im 5'-Bereich von *H. influenzae pnuC*, nur 125 bp stromaufwärts, befindet sich ein Gencluster, welches als ein ABC-Transporter annotiert ist. Das Gencluster beinhaltet folgende drei Gene: HI1080, kodiert für das periplasmatische Bindeprotein des ABC-Transportes mit den Koordinaten 1147462 und 1146689 (773 bp), HI1079, kodiert für die Permease des ABC-Transporters mit den Koordinaten 1146621 und 1145989 (632 bp) und das Gen HI1078 (1145985 und 1145212), welches für das ATP-Bindeprotein des ABC-Transporters kodiert und 773 bp groß ist. Um zu untersuchen, ob der ABC-Transporter an der NR-Aufnahme des PnuC-Transporters beteiligt ist bzw. ein eigenes NR-Aufnahmesystem darstellt, wurde eine Deletionsmutante konstruiert, bei der der Bereich zwischen 1146988 und 1145208, die 3'-Hälfte von HI1080 und die kompletten Gene HI1078 und HI1079, durch eine Chloramphenicol-Kassette ersetzt wurde. Hierfür wurde der DNS-Bereich (374 bp) im HI1080 mit den Primern per1 und per2 und die DNS-Region (710 bp) im 3'-Bereich stromabwärts von HI1078 mit den Primern atp1 und aa Q179 3' amplifiziert. Als Template diente chromosomale DNS des Stammes Rd KW20. Die zwei PCR-Fragmente und die 998 bp große Chloramphenicol-Kassette des Plasmids pAKcat wurden mit *Pst*I verdaut und anschließend ÜN ligiert. Am nächsten Tag wurde eine PCR mit den Primern per 1 und aa Q179 3' angesetzt, bei welcher der Ligationsansatz als Template diente. Das 2082 bp große PCR-Fragment, welches links und rechts die zwei ABC-PCR-Fragmente und in der Mitte die *cat*-Kassette beinhaltete, wurde in die *H. influenzae*-Mutante Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1 transformiert. Nach Isolierung von Chloramphenicol-resistenten Kolonien wurde chromosomale DNS aus

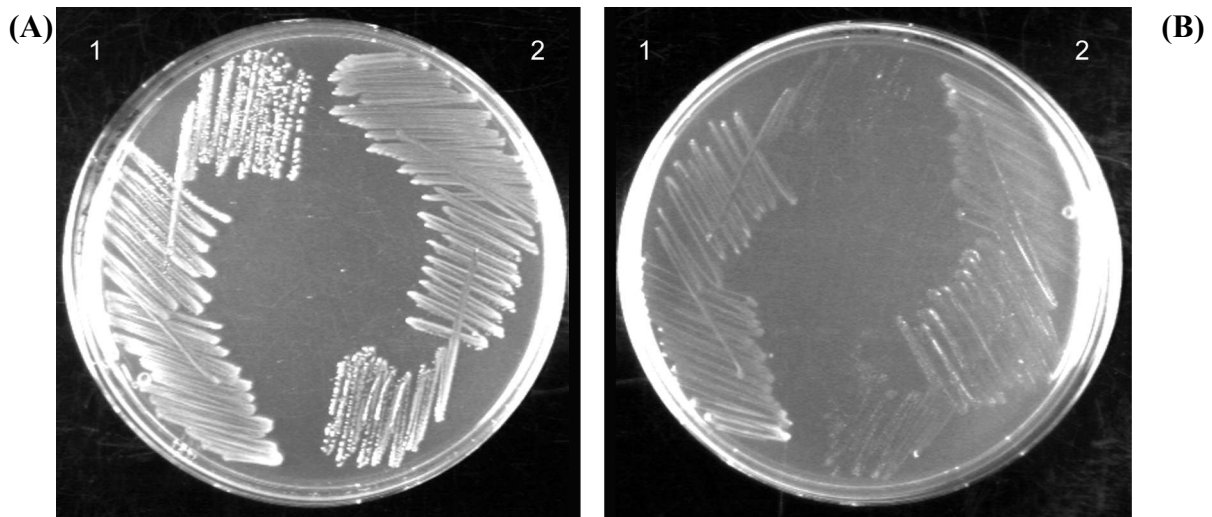
der neu entstandenen Mutante SE06 (Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta$ HII1077.1,  $\Delta$ ABC) präpariert und die Deletion mit Hilfe einer PCR bestätigt (Abb. 32).



**Abb. 32** PCR-Nachweis der erfolgten HI1078-HI1080-Deletion. Aufgetragen sind die Stämme (1) Rd-b<sup>+</sup>, (2) Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta$ HII1077.1 (3) SE06.

Die PCR in Abb. 32, die mit den Primern per1 und aa K220 3' durchgeführt wurde, zeigt das 2984 bp große Fragment des Wildtyps Rd-b<sup>+</sup> (Spur 1), das 3800 bp große Fragment des Stammes Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta$ HII1077.1 (Spur 2) und das 3083 bp große Fragment der Doppelmutante SE06 (Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta$ HII1077.1,  $\Delta$ ABC) (Spur 3).

Nachdem die Deletion des ABC-Transporters bestätigt wurde, sollte der Wachstumsphänotyp untersucht werden. Es wurden sowohl BHI- als auch MIC-Platten mit verschiedenen NAD<sup>+</sup>-Konzentrationen (0,05–15  $\mu$ M NAD<sup>+</sup>) und unterschiedlichen NR-Konzentrationen (0,01–15  $\mu$ M NR) gegossen. Die Doppelmutante SE06 wurde im Vergleich zum Ausgangsstamm Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta$ HII1077.1 ausgestrichen. Beispielhaft sind zwei BHI-Platten mit 0,5  $\mu$ M NR und 0,05  $\mu$ M NR in Abb. 33 abgebildet.



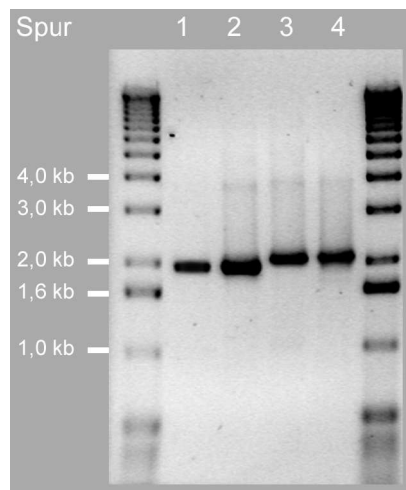
**Abb. 33** Wachstumsphänotyp von (1) Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1 und (2) SE06 auf BHI-Platten, supplementiert mit (A) 0,5 μM NR und (B) 0,05 μM NR.

Die Doppelmutante SE06 zeigte im Wachstum keinen Unterschied zum Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1-Stamm. Man kann davon ausgehen, dass der ABC-Transporter, der sich direkt stromaufwärts neben *pnuC* befindet, nicht an der NR-Aufnahme beteiligt ist.

## 6.2. PnuD

Nachdem *H. influenzae pnuC*, trotz geringer Identität, für die gleiche Funktion kodiert wie *S. typhimurium pnuC*, wurde das *S. typhimurium* NAD<sup>+</sup>-Aufnahmesystem genauer betrachtet. Dabei fiel ein Gen, *pnuD*, auf, welches mit *S. typhimurium* PnuC-Aufnahmesystem involviert zu sein schien (226). Daraufhin wurde das PnuD von *S. typhimurium* gegen das Genom von *H. influenzae* (64) mit Hilfe der Internetanwendung „BLAST“ abgeglichen. Dabei wurde ein hypothetisches, konserviertes Transmembranprotein HI0308 an der inneren Membran gefunden, welches 34% Identität mit *S. typhimurium* PnuD aufwies. HI0308 (Koordinaten 341452–342618) wurde als *H. influenzae* PnuD bezeichnet, es wurden Deletionsmutanten konstruiert und diese im Wachstum und im Transport-Assay untersucht. Für die Konstruktion der Deletionsmutanten wurde eine PCR durchgeführt, bei der mit den Primern PnuD1 und PnuD2 ein 527 bp großes Fragment im 5'-Bereich stromaufwärts von *pnuD* und mit den Primern PnuD3 und PnuD4 ein 572 bp großes Fragment im 3'-Bereich stromabwärts von *pnuD* amplifiziert wurde. Die zwei PCR-Fragmente und die *cat*-Kassette des Plasmids pAKcat wurden mit *Pst*I verdaut und ÜN

ligiert. Am nächsten Tag wurde eine PCR mit den Primern PnuD1 und PnuD4 durchgeführt, bei der der Ligationsansatz als Template diente. Das 2097 bp große PCR-Fragment beinhaltet links und rechts die zwei *pnuD*-PCR-Fragmente und in der Mitte die *cat*-Kassette. Anschließend wurde das PCR-Fragment in die *H. influenzae*-Stämme SE01(*nadV*<sup>+</sup>) und SE02 (*nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *pnuC*) transformiert. Chloramphenicol-resistente Kolonien wurden isoliert und gereinigt und die Region zwischen 341499 und 342396 durch die *cat*-Kassette ersetzt. Die Insertion der *cat*-Kassette wurde mittels einer PCR bestätigt (siehe Abb. 34). Die neu entstandenen Stämme wurden SE04 (BRAD*nadV*<sup>+</sup> $\Delta$ *pnuD*) und SE05 (BRAD*nadV*<sup>+</sup> $\Delta$ *pnuC*,  $\Delta$ *pnuD*) genannt.



**Abb. 34** PCR-Nachweis der erfolgten *pnuD*-Deletion. Aufgetragen sind die Stämme (1) SE01(*nadV*<sup>+</sup>), (2) SE02 (*nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *pnuC*), (3) SE04 (4) SE05.

Die PCR in Abb. 34, die mit den Primern PnuD1 und PnuD4 durchgeführt wurde, zeigt das 1996 bp große Fragment des Wildtyps SE01(*nadV*<sup>+</sup>) (Spur 1) und der *pnuC*-Mutante (Spur 2), bzw. das 2097 bp große Fragment des Stammes SE04 (Spur 3) und der Doppelmutante SE05 (Spur 4).

Die neu entstandenen Stämme SE04 und SE05 wurden im Wachstum und im Transport-Assay im Vergleich zu den Ausgangsstämmen SE01(*nadV*<sup>+</sup>) und SE02 (*nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *pnuC*) untersucht. Die Stämme wurden auf Minimalmediumplatten mit 15  $\mu$ M NAD<sup>+</sup>, 15  $\mu$ M NR und 0,5  $\mu$ M NR ausgestrichen. Es konnte weder ein Wachstumsdefizit noch ein verminderter Transport der neu konstruierten Mutanten im Bezug zu den Ausgangsstämmen



beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). PnuD scheint nicht am  $\text{NAD}^+$ -Aufnahmesystem beteiligt zu sein.

## 7. Aktivierung der NR-Aufnahme durch $\text{Na}^+$ -NQR-Aktivität ?

Hayashi et al. konnten 1996 zeigen, dass auch *H. influenzae*, wie das marine Bakterium *Vibrio alginolyticus*, für die Energetisierung der NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase (NQR) eine Redox getriebene  $\text{Na}^+$ -Pumpe verwendet (100). Das Enzym  $\text{Na}^+$ -NQR besteht aus dem *nqr*-Operon, welches sich aus sechs Untereinheiten (HI0164, HI0166, HI0167, HI0167, HI0168, HI0170 und HI0171) zusammensetzt (siehe Tabelle 16).

HI-Nummer	Name	Name	5'-Ende	3'-Ende	bp
HI0164	NQR (Subunit A, $\text{Na}^+$ -Translokation)	<i>nqrA</i>	179599	180942	1343
HI0166	NQR (Subunit B)	<i>nqrB</i>	180945	182180	1235
HI0167	NQR ( $\text{Na}^+$ -Translokation)	<i>nqrC</i>	182173	182907	734
HI0168	NQR ( $\text{Na}^+$ -Translokation)	<i>nqrD</i>	182907	183533	626
HI0170	NQR ( $\text{Na}^+$ -Translokation)	<i>nqrE</i>	183537	184133	596
HI0171	NQR ( $\beta$ -Subunt, $\text{Na}^+$ -Translokation)	<i>nqrF</i>	184146	185381	1235

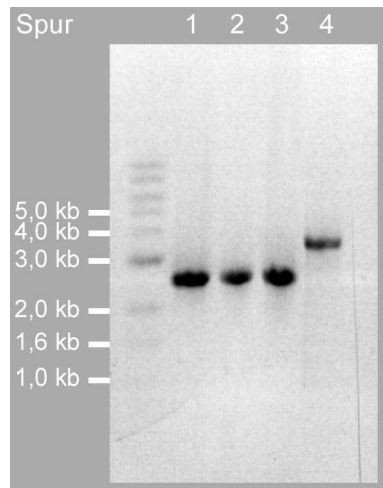
**Tabelle 16** Untereinheiten des NQR-Operons.

Im Folgenden sollte geklärt werden, ob der PnuC-Transporter von *H. influenzae* an einen  $\text{Na}^+$ -Gradienten bzw. an das  $\text{Na}^+$ -NQR-System gekoppelt ist.

### 7.1. Konstruktion einer $\text{Na}^+$ -NQR-Mutante

Für die Konstruktion der  $\text{Na}^+$ -NQR-Mutante wurden die letzten 557 bp stromaufwärts von *nqrA*, das komplette *nqrB* und die ersten 234 bp stromabwärts von *nqrC* deletiert. Hierfür wurden zwei PCR-Fragmente mit den Primern NQR1-4 amplifiziert, wobei chromosomale DNS des Wildtyps Rd KW20 als Template diente. Das erste 704 bp große

Fragment wurde mit den Primern NQR1 und NQR2 amplifiziert und beinhaltet eine *PstI*-Schnittstelle. Das zweite 650 bp große Fragment wurde mit den Primern NQR3 und NQR4 generiert und trug eine *FspI*-Schnittstelle. Anschließend wurden die zwei PCR-Fragmente mit *PstI* bzw. *FspI* und die 1180 bp große *kan*-Kassette aus dem Plasmid pUK4k mit *PstI* und *StuI* verdaut und ÜN ligiert. Am nächsten Tag wurde eine PCR durchgeführt, für die der Ligationsansatz als Template diente. Das daraus resultierende 2534 bp große PCR-Fragment wurde in die *H. influenzae* Stämme SE01(*nadV*<sup>+</sup>), RdKW20 und Hib transformiert. Am folgenden Tag wurden Kanamycin-resistente Kolonien isoliert und gereinigt. Anschließend wurde chromosomale DNS präpariert und die eingeführte Mutation mittels PCR mit den Oligonukleotiden NQR1 und NQR4 bestätigt (siehe Abb. 35). Die neu entstandenen Stämme wurden als SE07 (*nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta nqrABC$ ), SE08 (Rd,  $\Delta nqrABC$ ) und SE09 (Hib,  $\Delta nqrABC$ ) bezeichnet.)



**Abb. 35** PCR-Nachweis der erfolgten *nqrABC*-Deletion. Aufgetragen sind die Stämme (1) SE07 (2) SE08 (3) SE09 (4) Rd KW20. Die Abbildung zeigt das 2534 bp Fragment der NQR-Mutanten und das 3377 bp Fragment des Wildtyps.

Abb. 35 zeigt das 3377 bp große PCR-Fragment des Wildtyps Rd KW20 (Spur 4) und die kleineren 2534 bp Fragmente der NQR-Mutanten SE07 in Spur 1, SE08 in Spur 2 und SE09 in Spur 3 bei erfolgter Deletion von *nqrABC* und Insertion der *kan*-Kassette.

## 7.2. Transport-Assay

Nach erfolgter *nqrABC*-Deletion wurden die Stämme SE07 (*nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *nqrABC*) und der Wildtyp SE01(*nadV*<sup>+</sup>) im <sup>14</sup>C-NAD<sup>+</sup>-Transport getestet. Dabei zeigte sich, dass sowohl der Wildtyp, als auch die Mutante SE07 nach 15 min ca. 55% der eingesetzten <sup>14</sup>C-NAD<sup>+</sup>-Menge aufnehmen konnten (Daten nicht gezeigt).

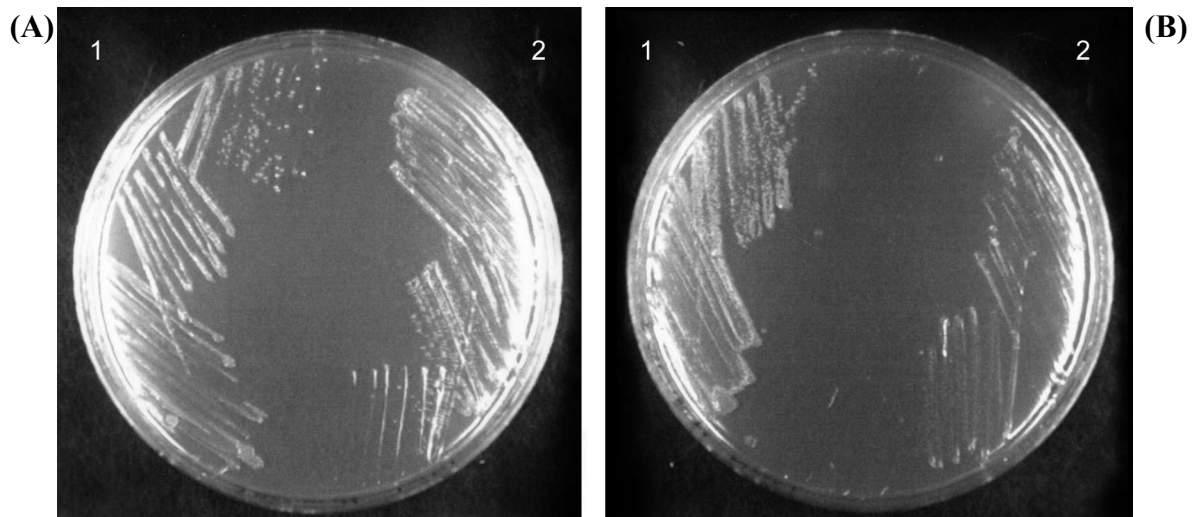
## 7.3. NQR-Charakterisierung

### 7.3.1. Wachstumsphänotyp

Die Stämme SE01(*nadV*<sup>+</sup>) und SE07 (*nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *nqrABC*) wurden hinsichtlich ihres Wachstums auf Mic-Platten untersucht, die mit unterschiedlichen NaCl- bzw. LiCl- und pH-Konzentrationen supplementiert waren. Das Mic-Medium wurde nach der Methode von Herriot et al. angesetzt (105), allerdings wurden alle NaCl-Zugaben weggelassen. Als Faktor-V-Quelle wurden 15  $\mu$ M NAD<sup>+</sup> zugegeben (Tabelle 17, Abb. 36)

	pH 7,2		pH 7,5		pH 7,8	
	SE01	SE07	SE01	SE07	SE01	SE07
NaCl 0 mM	+ -	+ -	(+) -	(+) -	-	-
NaCl 100 mM	++	+(+)	++	+(+)	+ -	+ -
NaCl 250 mM	+	-	+ -	-	(+) -	(+) -
NaCl 500 mM	-	-	-	-	-	-
LiCl 100 mM	++	++	++	++	+ -	(+) -
LiCl 250 mM	++	(+)-	-	-	-	-
LiCl 500 mM	-	-	-	-	-	-

**Tabelle 17** Wachstumsphänotyp von SE01 und SE07 auf Mic-Platten mit unterschiedlichen NaCl- bzw. LiCl- und pH-Konzentrationen. Dabei bedeutet: ++: sehr gutes Wachstum mit großen Einzelkolonien, +: schlechtes Wachstum mit kleinen Einzelkolonien, (+): schlechtes Wachstum ohne Einzelkolonien + -: Wachstum bricht nach dem ersten oder zweiten Ausstrich ab, keine Einzelkolonien, -: kein Wachstum.

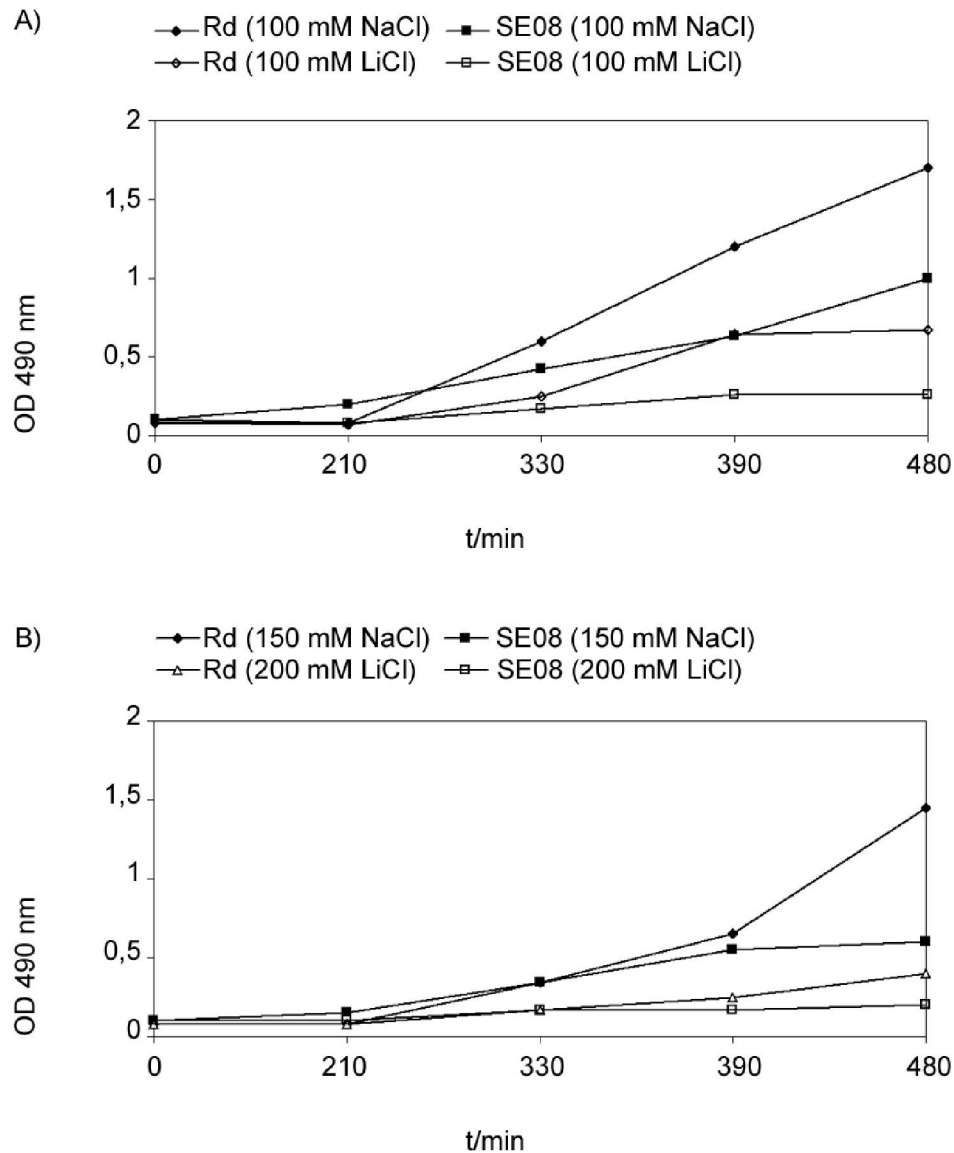


**Abb. 36** Wachstumsphänotyp von (1) SE01 und (2) SE07 auf MIC-Platten supplementiert mit 15 mM  $\text{NAD}^+$  und (A) 250 mM NaCl und (B) 250 mM LiCl.

Die Mutante SE07 ( $\text{nadV}^+$ ,  $\Delta\text{nqrABC}$ ) zeigte ein deutliches Wachstumsdefizit gegenüber dem Wildtyp SE01 ( $\text{nadV}^+$ ), dabei spielte es keine Rolle, ob NaCl oder LiCl zugegeben wurden. Am deutlichsten zeigte sich der Wachstumsunterschied bei 250 mM NaCl und 250 mM LiCl. Konzentrationen oberhalb von 250 mM NaCl bzw. LiCl wurden auch vom Wildtyp SE01 nicht toleriert, vor allem wenn dabei auch der pH Wert höher als pH 7,2 eingestellt wurde.

### 7.3.2. Wachstumskurve

Um das Wachstumsverhalten der NQR-Mutante genauer zu untersuchen, wurde eine Wachstumskurve erstellt. Die Stämme Rd KW20 und SE08 (Rd,  $\Delta nqrABC$ ) wurden im MIC-Medium mit 100 mM, 150 mM, 200 mM NaCl bzw. 100 mM LiCl angeimpft und die OD<sub>490</sub> wurde über acht Stunden aufgenommen.

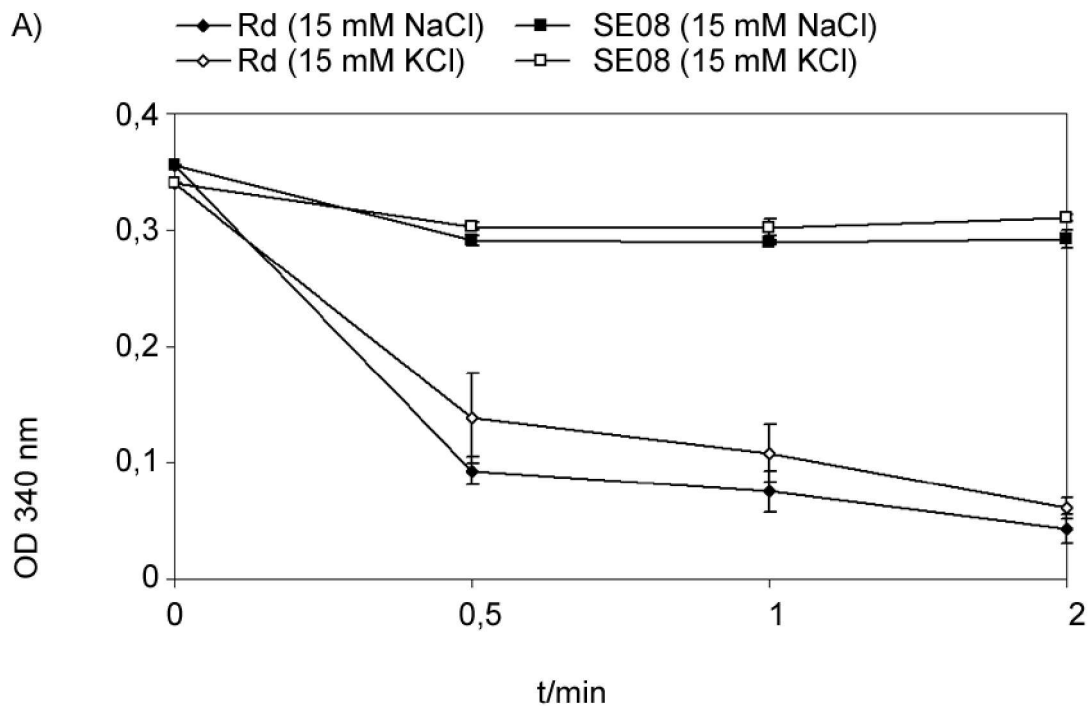


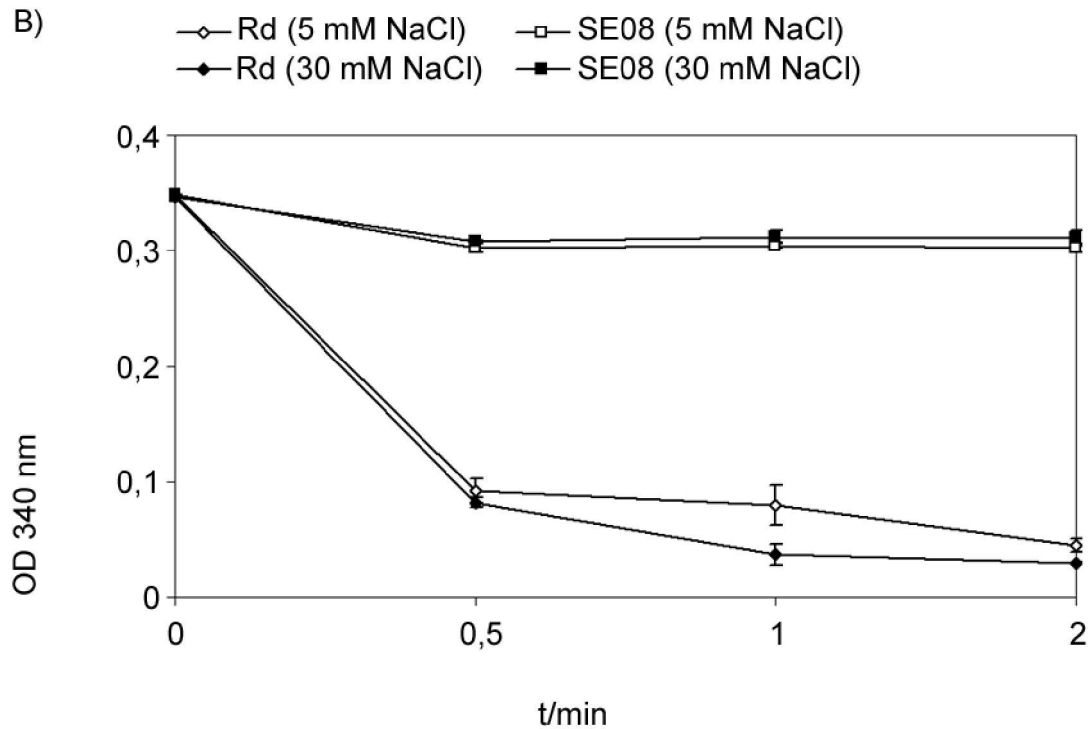
**Abb. 37** Wachstumskurve der Stämme Rd KW20 und SE08 mit (A) 100 mM NaCl und 100 mM LiCl bzw. (B) 150 mM und 200 mM NaCl. Der Wachstumsverlauf wurde im Zeitraum von acht Stunden aufgezeichnet und die OD<sub>490</sub> festgehalten.

Die Wachstumskurven bestätigen die Wachstumsdefizienz des Stammes SE08 (Rd,  $\Delta nqrABC$ ) im Vergleich zum Rd KW20. Die Lebendkeimzahl des Wildtyps ist nach acht Stunden ca. doppelt so hoch wie die der Mutante bei allen NaCl- bzw. LiCl-Konzentrationen. Mit steigender NaCl-Konzentration verschlechtert sich das Wachstum beider Stämme, dabei entsprechen 100 mM NaCl der gewöhnlich vorkommenden NaCl-Konzentration im MIC-Medium (105).

### 7.3.3. NADH-Oxidase-Aktivität

Die Oxidation NADH zu  $NAD^+$  wurde mit den Stämmen Rd KW20 und SE08 (Rd,  $\Delta nqrABC$ ) in einem NADH-Oxidase-Assay gemessen. Isolierte Membranextrakte (siehe Kapitel IV.3.5.) wurden mit 0,1 mM NADH im Medium mit unterschiedlichen NaCl- bzw. KCl-Konzentrationen bei  $T=0$  inkubiert und die Absorptionsänderung bei  $OD_{340}$  nach 30 sec, 1 min und 2 min gemessen.





**Abb. 38** NADH-Oxidase-Aktivität der Stämme Rd KW20 und SE08 mit (A) 15 mM NaCl bzw. 15 mM KCl und (B) 5 mM bzw. 30 mM NaCl. Die Absorption wurde bei  $OD_{340}$  nach 0,5 sec, 1 min und 2 min gemessen.

Beim Wildtyp Rd KW20 wurde die NADH-Oxidase-Aktivität sowohl durch  $Na^+$ , als auch durch  $K^+$  stimuliert, wobei die NADH-Oxidation etwas stärker durch  $Na^+$  stimuliert wurde. Nach 30 sec nahm die  $OD_{340}$  von 0,35 auf 0,093 (15 mM NaCl) bzw. auf 0,138 (15 mM KCl) ab und nach 2 min betrug die Absorption 0,043 (15 mM NaCl) und 0,061 (15 mM KCl). Eine höhere  $Na^+$ -Konzentration ging mit einer Aktivierung der NADH-Oxidation einher. So betrug die  $OD_{340}$  nach 1 min bei einer Inkubation mit 5 mM NaCl 0,08, mit 15 mM NaCl 0,075 und mit 30 mM NaCl 0,037. Bei der Mutante SE08 dagegen konnte keine signifikante Abnahme der Absorption, auch bei steigender  $Na^+$ -Konzentration, gemessen werden. Die  $OD_{340}$  betrug nach 2 min 0,292 (15 mM NaCl) bzw. 0,31 (15 mM KCl).

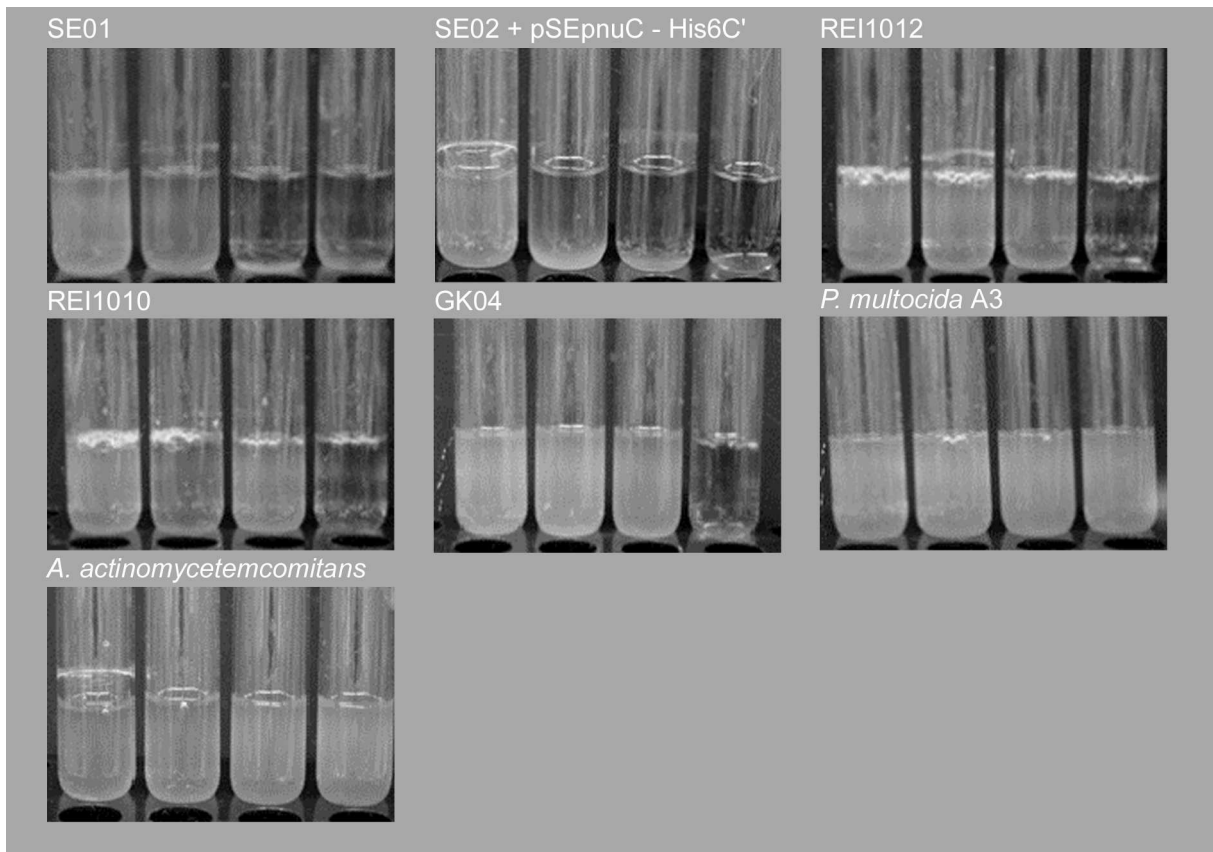
## 8. Aufnahme von NAD<sup>+</sup>-Analoga (Inhibitoren) über den NAD<sup>+</sup>-Aufnahmeweg

Wie in früheren Studien beschrieben wirken 3-Aminopyridin-Derivate inhibitorisch auf das Wachstum von *H. influenzae* (48, 78). Im Folgenden sollte die Wirkung und das Aufnahmesystem von 3-Aminopyridin-Derivaten bei verschiedenen *H. influenzae*-Mutanten und anderen *Pasteurellaceae*, wie *P. multocida* und *A. actinomycetemcomitans*, untersucht werden. Weiterhin sollten resistente 3-Aminopyridin-Ribosid-Mutanten isoliert werden.

### 8.1. Charakterisierung des Aufnahmeweges von 3-Aminopyridin-Derivaten

Um die Wirkung und die Aufnahmeroute von 3-Aminopyridin-Derivaten (3-AADP, 3-AAD und 3-AmPR) zu untersuchen, wurden folgende Stämme verwendet: SE01(*nadV*<sup>+</sup>), SE02 (*nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *pnuC*), SE02pSEpnuC-His<sub>6</sub>C<sup>+</sup>, REI1012 ( $\Delta$ *hel*), REI1010 (*nadN::cat*), GK04 ( $\Delta$ *hel*, *nadN::cat*), *H. influenzae*  $\Delta$ *ompP2*, *P. multocida* A3 und *A. actinomycetemcomitans* CU4000N. Die Stämme wurden in BHI-Medium angeimpft, welches mit 15  $\mu$ M NR supplementiert war. 3-AADP, 3-AAD und 3-AmPR wurden im Verhältnis 1:100 (1,5 mM), bezogen auf NR, zugegeben. Die Kulturen wurden mit einer Zellzahl von 10<sup>5</sup> angeimpft und das Wachstum über 24 h beobachtet (siehe Abb. 39 und Tabelle 18).





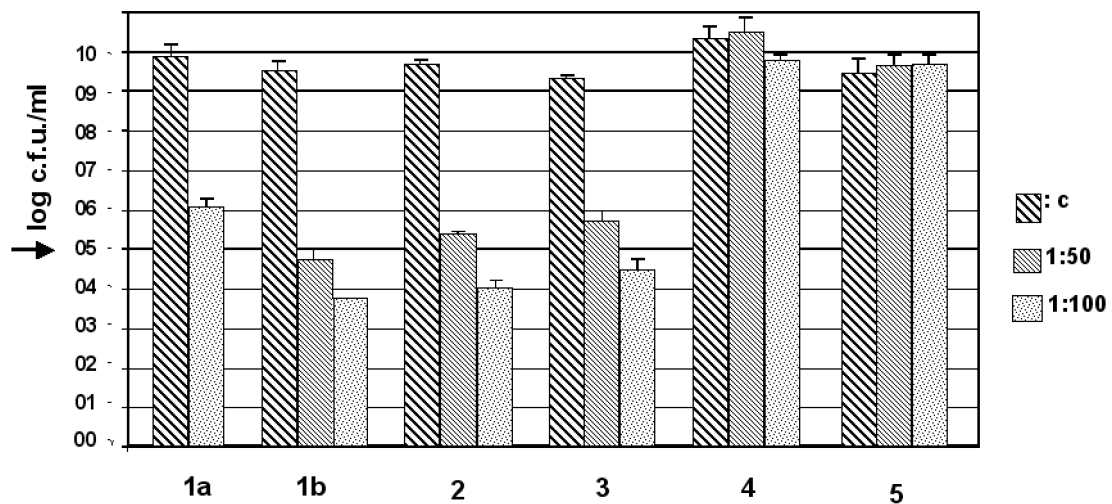
**Abb. 39** Abbildung des Wachstums auf 3-Aminopyridin-Derivaten. Das BHI-Medium wurde mit 15  $\mu$ M NR supplementiert. 3-AADP, 3-AAD und 3-AmPR wurden im Verhältnis 1:100 zugesetzt (1,5 mM). Die Kulturen wurden mit  $10^5$  Zellen angeimpft und 24 h lang inkubiert.

Stämme	NR	3-AADP	3-AAD	3-AmPR
SE01( <i>nadV</i> <sup>+</sup> )	+	-	-	-
SE02 ( <i>nadV</i> <sup>+</sup> , $\Delta$ <i>pnuC</i> )	+	+	+	+
SE02pSEpnuC-His <sub>6</sub> C'	+	-	-	-
REI1012 ( $\Delta$ <i>hel</i> )	+	+	+	-
REI1010 ( <i>nadN</i> :: <i>cat</i> )	+	+	+	-
GK04 ( $\Delta$ <i>hel</i> , <i>nadN</i> :: <i>cat</i> )	+	+	+	-
<i>H. influenzae</i> $\Delta$ <i>ompP2</i>	+	+	+	-
<i>P. multocida</i> A3	+	+	+	+
<i>A. actinomycetemcomitans</i> CU4000N	+	+	+	+

**Tabelle 18** Wachstum auf 3-Aminopyridin-Derivaten. Das BHI-Medium wurde mit 15  $\mu$ M NR supplementiert. 3-AADP, 3-AAD und 3-AmPR wurden im Verhältnis 1:100 zugesetzt (1,5 mM). Die Kulturen wurden mit  $10^5$  Zellen angeimpft und 24 h lang inkubiert. +: Wachstum, -: kein Wachstum

Das Ergebnis in Abb. 39 und Tabelle 18 zeigt, dass 3-AADP und 3-AAD den selben Aufnahmeweg folgen wie  $\text{NADP}^+$  und  $\text{NAD}^+$ . Während alle drei Aminopyridin-Derivate (3-AADP, 3-AAD und 3-AmPR) auf den Wildtyp SE01 und auf die Komplementante SE02pSEpnuC-His<sub>6</sub>C' inhibitorisch wirken, werden die *hel*-, *nadN*- und *ompP2*-Mutanten (REI1012, REI1010, GK04 und *H. influenzae*  $\Delta\text{ompP2}$ ) nur durch 3-AmPR inhibiert und sind gegen 3-AAD und 3-AADP resistent. Im Gegensatz dazu sind die Stämme SE02, *P. multocida* A3 und *A. actinomycetemcomitans* nicht nur gegenüber 3-AADP und 3-AAD, sondern auch gegenüber 3-AmPR resistent.

Um die Aufnahme von Aminopyridin am PnuC-Transporter genauer zu charakterisieren, wurden die Stämme BRAD, SE01(*nadV*<sup>+</sup>), SE03 ( $\Delta\text{pnuC}$ ), SE02 (*nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta\text{pnuC}$ ) und SE01 $\Delta\text{RNK}$  im BHI-Medium mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{NADP}^+$  und 1:50 (0,75 mM) bzw. 1:100 (1,5 mM) 3-AADP angeimpft. Die Kulturen wurden mit einer Zellzahl von  $10^5$  angeimpft und das Wachstum über 24 h beobachtet. Nach 24 h wurde ein Aliquot ausplattiert und die Lebendzellzahl gezählt.



**Abb. 40** 3-AADP Wachstumshemmung. Untersucht wurden unterschiedliche *H. influenzae*-Stämme. (1): BRAD, (1a): anaerob, (1b): aerob, (2): SE01, (3): SE03, (4): SE02 und (5): SE01 $\Delta\text{RNK}$ . Das BHI-Medium wurde mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{NADP}^+$  supplementiert, der Inhibitor wurde in einem molaren Verhältnis von 1:50 und 1:100 zugegeben. Die Kulturen wurden mit einer Zellzahl von  $10^5$  angeimpft, nach 24 h ausplattiert und die Lebendzellzahl bestimmt.

Die Stämme SE02 und SE01 $\Delta$ RNK waren resistent gegenüber 3-AADP; so erreichte der Stamm SE02 eine Lebendzellzahl von  $3,29 \cdot 10^{10}$ , wenn NADP<sup>+</sup>:3-AADP 1:50 eingesetzt wurde bzw.  $6,20 \cdot 10^9$ , wenn der Inhibitor in 100facher Konzentration vorlag (Abb. 40, Nr. 4), ähnliche Werte erlangte der Stamm SE01 $\Delta$ RNK (Abb. 40, Nr. 5). Dagegen wurden die Stämme BRAD (aerob und anaerob) (Abb. 40, Nr. 1a und 1b), SE01 (Abb. 40, Nr. 2) und SE03 (Abb. 40, Nr. 3) inhibiert, dabei wirkte das 3-AADP stärker inhibierend, wenn es im Verhältnis 1:100 eingesetzt wurde (z. B. beim Stamm SE01 wurden bei NADP<sup>+</sup>:3-AADP (1:100)  $1,07 \cdot 10^4$  und bei (1:50)  $2,6 \cdot 10^5$  Zellen gezählt).

## 8.2. Isolierung von 3-AmPR-spontanresistenten *H. influenzae* Mutanten

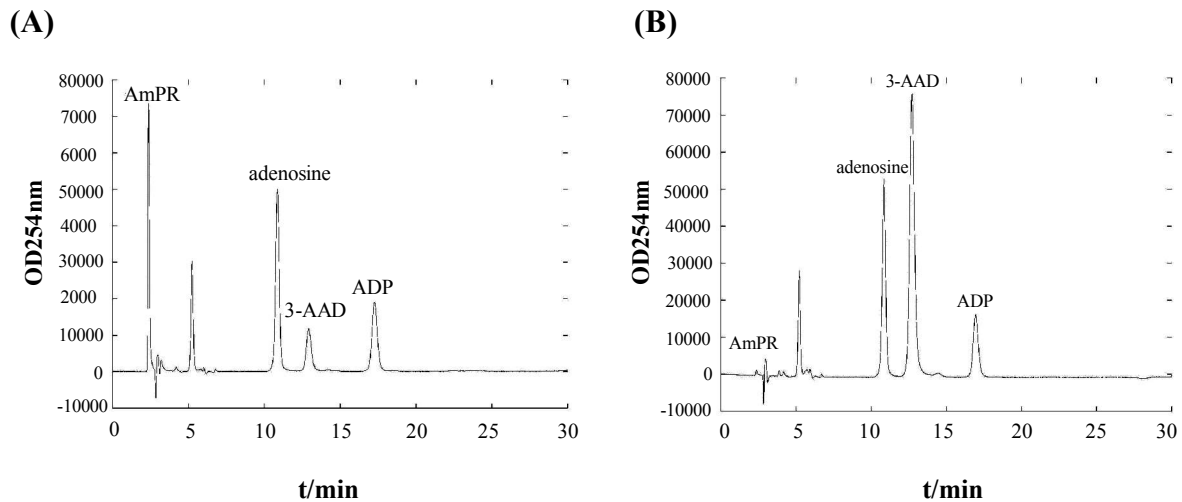
Für die Isolierung von 3-AmPR-spontanresistenten *H. influenzae* Mutanten wurden die Stämme SE01 (*nadV*<sup>+</sup>) und SE02 (*nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *pnuC*) + pSEpnuC-His<sub>6</sub>C` verwendet. Diese Stämme können NR und NAm, aufgrund von *nadV*, verwerten; das Wachstum wird allerdings in Gegenwart von AAD oder 3-AmPR gehemmt. Eine Spontanmutation wäre im NR-Aufnahmesystem oder in der NMN-Resynthese möglich, da durch *nadV*, welches NAm zu NMN synthetisiert, die Versorgung mit dem Faktor-V gesichert wäre. Die Stämme wurden auf BHI-Platten ausplattiert, die mit 65  $\mu$ M 3-AmPR supplementiert waren. Am nächsten Tag waren wenige Einzelkolonien zu sehen. Nach Aufreinigung und Präparation von chromosomaler DNS aus 24 Isolat, wurden diese zum Sequenzieren in den Genorten *pnuC* und *nadR* bereit gestellt. Nach der Sequenzierung wurde festgestellt, dass keine Mutation im *pnuC*-Gen vorhanden war, dafür wurden für alle Isolate die Mutationen im *nadR*-Gen vorgefunden. Es zeigte sich, dass die Spontanmutationen mit einer sehr hohen Frequenz in der RNK-Domäne, insbesondere im Walker A Motiv clustern, allerdings konnten auch weitere Mutationen außerhalb der RNK Domäne beobachtet werden. Die verursachten Mutationen der Stämme SE01 (*nadV*<sup>+</sup>) und SE02 (*nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *pnuC*) + pSEpnuC-His<sub>6</sub>C` sind in Tabelle 19 aufgelistet.

Mutation	AS-Position	Mutationen 5'-3'	Motiv/Domäne
AS-Austausch	52	ATG (Met)→ATC (Ile)	NMNAT (putativer Startcodon nach Kuransov et al. (138))
	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 19** 3-AmPR-spontanresistente *H. influenzae* Mutanten. Die 3-AmPR-sensitiven Stämme SE01 und SE02pSEpnuC-His<sub>6</sub>C' wurden auf 3-AmPR (65 µM) supplementierten BHI-Platten ausplattiert. Spontanresistente Einzelkolonien wurden mit oben genannten Mutationen isoliert.

### 8.3. HPLC-Analyse mit rekombinantem NadR-Protein und 3-AmPR

Die letzten durchgeführten Experimente zeigten, dass 3-Aminopyridin-Derivate über das NAD<sup>+</sup>-Aufnahmesystem aufgenommen werden, schließlich über den PnuC-Transporter und vermutlich über den, noch unbekannt, nieder-affinen NR-Transporter (Kapitel V.2./VI.1.) in die Zelle gelangen, wo sie dann ihre inhibitorische Wirkung entfalten können. Des Weiteren wurde gezeigt, dass 3-AmPR-spontanresistente Mutationen ausschließlich im *nadR*-Gen verursacht wurden. Um der Frage nach dem Mechanismus der Inhibition näher zu kommen, wurde ein weiteres Experiment von meiner Kollegin M. Merdanovic und von Anne Price Mortimer am Institut für organische Chemie (Lehrstuhl Bringmann) durchgeführt. Der Versuch sollte klären, ob NadR direkt durch 3-Aminopyridin inhibiert wird und so kein NAD<sup>+</sup>-turnover mehr stattfindet oder ob 3-AmPR von NadR als Substrat erkannt wird und zu 3-AAD umgesetzt wird und so in den nachfolgenden Redox-Reaktionen das NAD<sup>+</sup> durch kompetitive Hemmung verdrängt. NadR konnte von M. Merdanovic als rekombinantes Protein überexprimiert und anschließend über Ni<sup>2+</sup>-Matrix-Säulen aufgereinigt werden (NadRHis<sub>6</sub>). Daraufhin wurde von Anne Price Mortimer eine HPLC-Analyse durchgeführt. Die Auftrennung der Reaktionsbestandteilen erfolgte auf einer Symmetry C<sub>18</sub> Säule (4,6x250 mm; 5 µm; Waters). Bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min wurde eine isokratische Elution mit Puffer A (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM Tetrabutylammoniumbromid, 8% Methanol) durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 254 nm mit einem 200-500 nm Photodiode Arraydetektor. Der Reaktionsansatz enthielt 2 mM 3-AmPR mit 4 mM ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,05 mg/ml NadRHis<sub>6</sub> (Abb. 41. B). Der Kontrollansatz enthielt kein NadRHis<sub>6</sub> (Abb. 41. A). Die zwei Ansätze wurden bei 37°C ÜN inkubiert, am nächsten Tag wurde die Reaktion bei 95°C für 5 min abgestoppt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 13000 rpm wurden die Überstände für die HPLC-Analyse verwendet (siehe Abb. 41) (siehe auch Doktorarbeit M. Merdanovic).



**Abb. 41** HPLC-Analyse der NadR-Aktivität mit AmPR als Substrat. HPLC-Profil des (A): Kontrollansatzes ohne NadRHis<sub>6</sub> und (B): des Reaktionsansatzes mit 0,05 mg/ml NadRHis<sub>6</sub>. Die Ansätze enthielten weiterhin 2 mM AmPR, 4 mM ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub> in 100 mM HEPES-NaOH, pH 7,5 und wurden ÜN bei 37°C inkubiert. Die jeweiligen Substanzen wurden anhand der Standards bestimmt.

Abb. 41. A zeigt das HPLC-Profil des Kontrollansatzes ohne NadRHis<sub>6</sub>. In Abb. 42. B kann man das HPLC-Profil des Reaktionsansatzes mit NadRHis<sub>6</sub> erkennen. Im HPLC-Profil des Reaktionsansatzes kann man eine signifikante Zunahme von 3-AAD und eine gleichzeitige Abnahme von 3-AmPR ablesen. Im Kontrollansatz dagegen bleibt der 3-AmPR-„Peak“ hoch und es kann nur eine geringe 3-AAD Menge gemessen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass 3-AmPR, ebenso wie NR, als Substrat von NadR erkannt und in Anwesenheit von ATP zu 3-AAD resynthetisiert wird. 3-AmPR kann als kompetitiver Inhibitor angesehen werden, der mit NR konkurriert.

## VI. Diskussion

*H. influenzae* gehört zu der Familie der *Pasteurellaceae* und ist als ein opportunistischer Krankheitserreger im oberen Respirationstrakt des Menschen zu finden. Aufgrund fehlender Enzyme der *de novo* Biosynthese ist *H. influenzae* auxotroph in Bezug auf  $\text{NAD}^+$  (Faktor-V) (43, 124) und muss exogenes  $\text{NAD}^+$  bzw. dessen Vorläufermoleküle aufnehmen (58). Erst kürzlich wurde von unserer Arbeitsgruppe die  $\text{NAD}^+$ -Aufnahmeroute von *H. influenzae* aufgedeckt (8, 127, 195, 215). So können  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{NAD}^+$ , NMN und NR als Faktor-V-Substrate dienen, nicht aber QA, NA, NAm und NAMN (78). Nachdem die saure Phosphatase e(P4)  $\text{NADP}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  und NMN zu NR dephosphoryliert hat, gelangen  $\text{NAD}^+$  und NMN durch das Außenmembran-Porin OmpP2 in das Periplasma und werden Substrat für die Pyrophosphatase und Nukleotidase NadN, welches  $\text{NAD}^+$  zu NMN und NMN zu NR spaltet. Letztendlich gelangt NR als einziges Substrat (127) in das Cytosol, wo es von dem Protein NadR zu NMN und weiter zu  $\text{NAD}^+$  synthetisiert wird (138, 156). In dieser Arbeit wurde vor allem das Aufnahmesystem für NR charakterisiert. Das NR-Aufnahmesystem wurde auch unter dem Aspekt als potentiellles Angriffsziel für bestimmte Agentien (Therapeutika), wie 3-Aminopyridin-Derivate, untersucht.

### 1. Charakterisierung von HI1077.1 bzw. PnuC

*H. influenzae* ist das erste Bakterium dessen Genom 1995 vollständig sequenziert wurde. Durch diese Genomsequenzierung konnte allerdings kein *pnuC*-Gen annotiert werden (64). Von *E. coli* und *S. typhimurium* war bereits das Gen *pnuC* bekannt, von welchem man zu wissen glaubte, dass es als NMN-Transporter fungierte. Aufgrund der Tatsache, dass in *H. influenzae* auch ein homologes *nadR*-Gen existierte, welches NR zu NMN und weiter zu  $\text{NAD}^+$  synthetisiert (138, 218) und *H. influenzae* auf NR als einziges Substrat wachsen konnte (127), lag die Vermutung nahe, dass auch bei *H. influenzae* ein zu *E. coli pnuC* entsprechendes Gen zu finden sein musste. Reine Diffusion wurde aufgrund der Kinetik von  $^{14}\text{C}$ -NR-Transport-Studien ausgeschlossen, die bereits 1988 bei *H. parainfluenzae* durchgeführt wurden (43). In Zusammenarbeit mit Mark Herbert wurde mittels ausgedehnter Homologie-Studien das Gen HI1077.1 mit geringer Homologie (Ähnlichkeit: 23,0%, Identität: 13,8%) zu *E. coli pnuC* identifiziert. Die geringe Homologie war auch auf zwei Genom-Sequenzierungsfehler zurückzuführen, die aus zwei zusätzlichen Baseninsertionen

bestanden und dadurch zu einer theoretischen Leserasterverschiebung führten (64). HI1077.1 wurde re-annotiert und zu *H. influenzae pnuC* umbenannt (103). Die Re-Annotierung resultierte in einem doppelt so großem Protein PnuC (226 AS) im Vergleich zu dem HI1077.1 (134 AS) und einer Zunahme des Homologiegrades zu *E. coli* PnuC (Ähnlichkeit: 32,6%, Identität: 19,7%). Des Weiteren war für HI1077.1 keine Shine-Dalgarno-Sequenz bekannt. Diese wurde stromaufwärts von *pnuC<sup>Hi</sup>* identifiziert.

Um festzustellen, ob das neu re-annotierte *pnuC* von *H. influenzae* am NR-Transport beteiligt ist, wurde eine HI1077.1-Deletionsmutante (Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1), bei der die zentralen 383 bp deletiert wurden und eine Komplementante Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1+pSEpnuC konstruiert (Kapitel V.1.2. und V.1.3.) und auf Wachstum getestet. Die Mutante zeigte ein deutliches Wachstumsdefizit auf BHI- und MIC-Platten, die mit 0,5–15 μM NAD<sup>+</sup> supplementiert bzw. auf MIC-Platten, die mit 0,5–3 μM NR supplementiert waren. Die Komplementante konnte, genauso gut wie der Wildtyp, das Wachstumsdefizit ausgleichen (Kapitel V.2.1. Tabelle 13 und Abb. 10). Im Gegensatz dazu war auf den mit 0,5-15 μM NR supplementierten BHI-Platten und der mit 15 μM NR supplementierten MIC-Platte kein Unterschied im Wachstum zu beobachten. Da das Minimalmedium nur definierte Bestandteile und Mengen enthält, die *H. influenzae* unbedingt zum Wachstum braucht, war das Wachstum auf MIC-Platten im Allgemeinen stressanfälliger als auf BHI-Platten. In der Annahme, dass eine Reduktion der NR-Konzentration in den BHI-Platten, ein Wachstumsdefizit der Mutante bewirkt, wurden weitere Wachstumsbestimmungen auf BHI-Platten mit 0,5-0,001 μM NR und 0,05-15 μM NMN durchgeführt. Das Wachstumsdefizit der Mutante Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1 wurde bei einer Unterschreitung der NR-Konzentration von 0,5 μM NR und von 1 μM NMN sichtbar. Der Wachstumsphänotyp bei höheren NAD<sup>+</sup> und NMN Konzentrationen ist auf die Aufnahmekinetik von NAD<sup>+</sup> und NMN zurückzuführen, beide Substrate müssen erst zu NR abgebaut werden. Das Wachstumsdefizit der Mutante konnte noch deutlicher im <sup>14</sup>C-NAD<sup>+</sup> und <sup>14</sup>C-NR-Transport gezeigt werden. Während der Wildtyp und die Komplementante ähnlich viel <sup>14</sup>C-NAD<sup>+</sup> und <sup>14</sup>C-NR transportierten, konnte die Mutante (Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1) nur 1/20 <sup>14</sup>C-NAD<sup>+</sup> und 1/10 <sup>14</sup>C-NR aufnehmen. Diese geringe Restaktivität im Transport von <sup>14</sup>C-NAD<sup>+</sup> und <sup>14</sup>C-NR der Mutante erklärt auch den Wachstumsphänotyp auf Platten mit höheren NR-Konzentrationen und ist möglicherweise auf ein zweites nieder-affines und unbekanntes Transportsystem zurückzuführen.



Um der Frage nachzugehen, ob der PnuC-Transporter für die Virulenz *in vivo* benötigt wird, wurden die Stämme von Mark Herbert im Rattenmodell getestet. Die Tests bewiesen, dass die Mutante Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1+pACYC184 nicht überlebensfähig war, während der Wildtyp Rd-b<sup>+</sup> und die Komplementante Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1+pSEpnuC eine Bakteriämie entwickelten. Hiermit konnte gezeigt werden, dass die restliche Transportaktivität, die im Wachstumsphänotyp und im radioaktiv Transport zu beobachten war, nicht zum Wachstum bzw. Überleben von *H. influenzae in vivo* beiträgt. Somit würde *pnuC* ein potentielles Ziel für die Entwicklung von Inhibitoren gegen *H. influenzae* darstellen.

Die Familie der *Pasteurellaceae* kann in zwei Untergruppen klassifiziert werden: die NAD<sup>+</sup> bzw. NR-abhängigen, wie *H. influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus parasuis*, und *Actinobacillus pleuropneumoniae*; und die NR-unabhängigen bzw. die NAM-nutzenden, wie *P. multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *H. haemoglobinophilus* und *A. actinomycetemcomitans*. Es existieren einige NR-unabhängige *Haemophilus*-Spezies, wie *H. paragallinarum*, *H. parainfluenzae* und *H. ducreyi*. Diese NR-Unabhängigkeit wird auf Grund der Genfunktion von *nadV* verliehen, welches sich auf einem Plasmid befindet und für eine NAM-Phosphoribosyltransferase kodiert (151). Diese *Haemophilus*-Spezies können exogenes NAM, welches in die Zelle diffundiert, direkt zu NMN synthetisieren und so den Transport von NR umgehen. Bei *H. influenzae* wurde bisher keine NAD<sup>+</sup>- bzw. NR-Unabhängigkeit beschrieben, allerdings könnte der Erwerb eines *nadV* kodierenden Plasmids einer Inhibitor-Entwicklung entgegenwirken. Um zu überprüfen, ob *H. influenzae* eine exogene NAM-Quelle auch bei einem verminderten NR-Transport nutzen würde, wurde die Mutante Rd-b<sup>+</sup>, ΔHI1077.1 mit einem Plasmid (pSEnadV) komplementiert, auf welchem sich das Gen *nadV* von *H. ducreyi* befindet (Diplomarbeit E. Sauer 2002). Während die Mutante auf 60 μM NAM nicht wachsen konnte und auf 0,5 μM NR ein Wachstumsdefizit aufwies, zeigte die *nadV*<sup>+</sup>-Konstruktion auf beiden Plattentypen sehr gutes Wachstum (V.2.2. Abb. 12) und konnte so das Wachstumsdefizit der HI1077.1-Mutante ausgleichen. Dieses Ergebnis zeigt, dass NAM nicht via PnuC aufgenommen wird, sondern wahrscheinlich durch passive Diffusion in die Zelle gelangt. Diese *nadV*-Komplementante wurde ebenfalls von Mark Herbert im Rattenmodell getestet, mit dem Ergebnis, dass auch dieser Stamm mittels NadV seine Virulenz zurück erhalten und eine genauso starke Bakteriämie verursachen kann, wie der Wildtyp. Auf diese Weise dient NAM als NR-Substituent und umgeht somit die PnuC-Route. Bisher sind allerdings keine natürlich vorkommenden *H. influenzae* Stämme bekannt, die mittels *nadV* oder eines anderen Gens als NAD<sup>+</sup>-unabhängig gelten. Die Nutzung von

NAm für *H. influenzae* stellt möglicherweise keinen Vorteil dar, weil in dem „natürlichen“ Lebensraum bzw. Nische, dem Nasopharynx, das Substrat NAm vermutlich in erheblich geringerem Maße verfügbar ist als die Substrate  $\text{NAD}^+$ , NMN und NR. In diesem Falle würde ein Impfstoff/Inhibitor, der gegen PnuC gerichtet ist, eine Erkrankung durch *H. influenzae* verhindern. Andererseits wurde ein ähnliches Plasmid, mit Homologie zu *nadV*; auch in *H. parainfluenzae* beschrieben, welches ein häufig vorkommendes kommensales Bakterium des Respirationstraktes darstellt (264). Des Weiteren wurde eine Homologie von NadV zu Proteinen von bisher unbekannter Funktion in Spezies wie beispielsweise *P. multocida*, *A. actinomycetemcomitans*, *S. putrefaciens*, *M. genitalum* und *M. pneumoniae* gefunden, von denen die ersten zwei zu den  $\text{NAD}^+$ -unabhängigen gehören. Aufgrund dieser Tatsache kann man davon ausgehen, dass ein horizontaler Gentransfer stattgefunden hat. Um zu klären, ob mögliche PnuC-Inhibitoren eine Kolonisierung verhindern würden, wäre die Erforschung der auf der Mukosa verfügbaren Faktor-V-Quellen hilfreich, die von den bekapselten und nicht typisierbaren *H. influenzae* Stämmen benutzt werden.

## 2. Topologie von PnuC

Die Topologie von PnuC war bisher weder in *E. coli* bzw. *S. typhimurium* noch in *H. influenzae* bekannt. Mit Hilfe eines Hydrophobizitäts-Diagrammes nach Kyte-Doolittle, wurde ein erster Hinweis geliefert, dass es sich bei PnuC um ein Transmembranprotein handelt. Dieses unterscheidet hydrophobe TMD ( $\alpha$ -Helices) von hydrophilen (Loops) Regionen. Ein vorläufiges Topologiemodell wurde unter Zuhilfenahme von mehreren Compute-Algorithmen und unter Einbeziehung der Verteilung von positiv geladenen AS nach der „positiv inside“ Regel (254) erstellt. Da verschiedene Computer-Algorithmen unterschiedliche TMD vorhergesagt haben, die zwischen fünf (SOSUI), sechs (TMPred) und sieben (DAS, THMM) TMD variierten, blieb die Lokalisation der C-terminalen Region von PnuC ungeklärt. Um experimentell nachzuweisen, dass es sich bei PnuC um ein an der Zytoplasmamembran lokalisiertes Protein handelt, wurde eine Komplettdelation von *pnuC* (SE02 und SE03) und zwei His-Tag-PnuC-Hybridplasmide (pSEpnuC-His<sub>6</sub>C' und pSEpnuC-His<sub>6</sub>N') konstruiert. Die PnuC-Hybridplasmide wurden in die *pnuC*-Mutante transformiert und anschließend die Membranfraktion isoliert. Im Western-Blot wurde die zelluläre Lokalisation von PnuC an der cytosolischen Membran bestätigt. PnuC hat normalerweise ein Molekulargewicht von 24,8 kDa und erreicht mit dem fusionierten His-Tag-Protein ca. 30

kDa. Im Western-Blot wurde allerdings ein Laufverhalten bei ca. 22 kDa beobachtet, was 73% von dem eigentlichen Molekulargewicht entspricht. Wurde PnuC in einem *E. coli*-Stamm überexprimiert, dann wurde das Protein bei 45 kDa detektiert, was wiederum 75% seiner Dimer-Form entsprechen. Diese Beobachtung ist darauf zurückzuführen, dass Membran-Transport-Proteine sehr oft zwischen 65–75% ihres eigentlichen Molekulargewichtes laufen, möglicherweise auf Grund ihrer Hydrophobizität und starken Bindung zu SDS (257). Warum PnuC in *E. coli* hauptsächlich in der Dimerform nachweisbar ist, konnte nicht geklärt werden.

Die experimentelle Analyse der Topologie erfolgte mit der PhoA- und LacZ-Genfusionsmethode. Es konnte in allen periplasmatischen „Loops“ (AS D39, V94, A150, E196) und bis auf AS S118 auch in allen cytoplasmatischen „Loops“ (AS E10, S63, Q179, K220) PhoA fusioniert werden. Die Aktivität von PhoA war im ersten periplasmatischen Loop AS D39 am stärksten. Diese Beobachtung beruht darauf, dass Aktivitäten und Expressionslevel von Genfusionen mit der Länge abnehmen, da längere Fusionen für die Zelle toxischer zu sein scheinen als Kürzere und in Folge schneller abgebaut werden (152). Der gleiche Effekt wurde auch bei den eingeführten LacZ-Fusionen beobachtet. Die erste LacZ-Fusion, die sich am nächsten am N'-terminalen Ende befand, AS E10, hatte die stärkste Aktivität. Während in allen cytoplasmatischen Regionen (AS E10, S63, S118, Q179, K220) eine LacZ-Fusion eingeführt werden konnte, war dies im Periplasma lokalisierten PnuC-Teil nicht möglich. Diese LacZ-Fusionen führen zu Hybrid-Proteinen, deren Translokation durch die Membran durch die gefaltete LacZ-Domäne behindert wird (20, 224) und dadurch hoch toxisch für die Zelle wirken (148). Trotzdem lieferten sowohl die PhoA-Fusionen im Periplasma und im Cytosol, als auch die entsprechenden LacZ-Fusionen im Cytosol signifikante Aktivitäten, ohne widersprüchliche Resultate, die in der Erforschung von Membran-Topologien oft vorkommen (44, 92). Demnach besitzt PnuC acht TMD, vier periplasmatische „Loops“ und drei cytoplasmatische „Loops“. Das N'-terminale Ende und das vorher ungeklärte C'-terminale Ende befinden sich im Cytoplasma. Diese Möglichkeit ist bei allen Transmembranproteinen die am häufigsten präferierte, außer bei denen von *Caenorhabditis elegans* (134). Während die meisten TM-Proteine mit 2, 4 oder 6 TMD zu den Kanälen eingeordnet werden, die mit 7 TMD meistens Pumpen oder Rezeptoren und die mit 12 TMD meistens Transporter sind, wie z. B. Na<sup>+</sup>-, ATP- und Zucker-Transporter (12, 235), können die TM-Proteine mit 8 TMD schlechter zusammengefasst werden. Diese Klasse von TM-Proteinen sind eine Mischung aus verschiedenen Arten von Transporter-Gruppen, zu

denen auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -transportierende ATPase und  $\text{K}^{+}$ -transportierende ATPase (235), aber auch MalF gehören. Letzteres ist mit 514 AS mehr als doppelt so groß wie PnuC (75).

Eine Studie über vergleichende Analyse von Transmembran-Topologien in 50 ausgewählten prokaryontischen Genomen zeigte, dass TM-Proteine mit acht TMD neben denen mit neun TMD am seltensten vorkommen, wenn man die TM-Proteine mit bis zu 12 TMD betrachtet (12).

Des Weiteren wurde die strukturelle Funktion von PnuC untersucht. Die letzten vier C`-terminalen PhoA-Fusionen wurden auf Transport gemessen. Ergebnis dieser Messungen war, dass PnuC nur das Fehlen der sechs letzten C`-terminalen AS tolerierte. Fehlte allerdings allein die letzte TMD (TMD 8) wurde kein Transport mehr gemessen. In dieser letzten TMD befinden sich gleich sechs Tyrosine und ein Trypophan; diese AS sind dafür bekannt, dass sie einer TM-Helix die größte Stabilität verleihen (247). So könnte der Verlust der letzten TMD eventuell zum Verlust der Gesamtstabilität des Proteins führen.

Die AS-Sequenz von PnuC beinhaltet zwei konservierte Domänen. Bei einem Homologievergleich zwischen den Stämmen *H. influenzae*, *Yersinia pestis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas syringae*, *S. typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae* und *E. coli* hatten immer mindestens fünf dieser Stämme eine Homologie in folgender AS-Sequenz: Die erste konservierte Domäne umspannt die zweite TM-Domäne, den ersten periplasmatischen „Loop“ und reichte in die dritte TM-Domäne GXLGX<sub>2</sub>LXSX<sub>2</sub>KISNYXFGLI. Die zweite konservierte Domäne umspannt die sechste TM-Domäne, den dritten periplasmatischen „Loop“ und die siebte TM-Domäne AXILMX<sub>3</sub>YXEXWLLWX<sub>3</sub>NX<sub>2</sub>S. Diese AS-Sequenz der konservierten Domänen wurde mit einer Internetanwendung nach Motiven mit bekannter Funktion durchsucht; dabei wurde allerdings kein bekanntes Motiv gefunden.

### 3. Substratspezifität von PnuC<sup>Hi</sup>, PnuC<sup>Ec/St</sup> und PnuC<sup>Pm/Aa</sup>

Frühere Untersuchungen zeigten, dass *E. coli* und *S. typhimurium* NMN transportieren (71, 226, 279). Da *H. influenzae* NR transportiert, wurde im Folgenden untersucht, ob PnuC<sup>Hi</sup> in einem PnuC- und NadB-negativen *S. typhimurium* Stamm JF214 NR oder NMN transportieren kann. Hierfür wurde das Plasmid pSEpnuC in JF214 transformiert. Die Komplementante konnte annähernd das 10fache der eingesetzten <sup>14</sup>C-NR-Menge im Verhältnis zum Ausgangsstamm (JF214) transportieren, während nur unwesentliche Mengen des eingesetzten <sup>14</sup>C-NMN-Labels aufgenommen wurden. Dieser Versuch zeigte, dass PnuC<sup>Hi</sup> zu einem signifikanten Teil den Transport von NR in *S. typhimurium* förderte. Auch wenn die Transportraten nicht allzu hoch waren, zeigten die Daten eine Tendenz, wonach PnuC<sup>Hi</sup> auch in *S. typhimurium* <sup>14</sup>C-NR und nicht <sup>14</sup>C-NMN transportiert. Die geringere Transportrate von PnuC<sup>Hi</sup> mag andere Gründe haben: geringere V<sub>max</sub> von *S. typhimurium*, z. B. durch geringere Aktivität von NadR, nicht optimierte Transportbedingungen und die in *S. typhimurium* zusätzlich am NAD<sup>+</sup>-Stoffwechsel beteiligten Enzyme, wie der NAD<sup>+</sup>-Glykohydrolase oder NR-Glykohydrolase. Möglicherweise wurde auch zu wenig Substrat verwendet, so benötigt z. B. *Salmonella* etwa 10 mal mehr NMN (100 µM) zum Wachstum als *H. influenzae* (89).

Ein weiterführender Versuch wurde durchgeführt, bei welchem nun *E. coli* PnuC<sup>Ec</sup> (pSEpnuC<sub>E. coli</sub>) kloniert und in die *H. influenzae*-Stämme SE02 (*nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *pnuC*) und REI1012 ( $\Delta$ *hel*) transformiert wurde. Der Stamm REI1012, der aufgrund des fehlenden *hel*-Gens kein NMN nutzen kann, war auch mit Hilfe des PnuC<sup>Ec</sup> nicht in der Lage <sup>14</sup>C-NMN aufzunehmen. Andererseits konnte das Plasmid pSEpnuC<sub>E. coli</sub> die *pnuC*-Mutante komplementieren und vergleichbar viel <sup>14</sup>C-NR aufnehmen wie der Wildtyp. Dieses Ergebnis zeigt, dass auch *E. coli* PnuC eine Substratspezifität für NR, aber nicht für NMN besitzt. Da *E. coli* PnuC eine Identität von 89% mit *S. typhimurium* PnuC besitzt, ist davon auszugehen, dass auch *S. typhimurium* PnuC als Substrat NR anstelle von NMN präferiert. Mittlerweile wurde auch für *S. typhimurium* bestätigt, dass PnuC<sup>St</sup> normalerweise eine Substratspezifität für NR und nicht für NMN besitzt (89). Die frühere Annahme, *S. typhimurium* transportiere NMN, beruht nach heutigen Erkenntnissen auf PnuC\*-Punktmutanten. Diese PnuC\*-Punktmutanten konnten auf niedrigeren NMN-Konzentrationen (10 µM) wachsen, als normalerweise zum Wachstum benötigt wird (100 µM), da NMN intakt in die Zelle aufgenommen wird, ohne vorher zu NR dephosphoryliert zu werden (68, 89, 143, 226).

In dieser Arbeit wurde auch versucht PnuC\*-Punktmutanten in *H. influenzae* zu isolieren. Für diesen Versuch wurde die Doppelmutante GK04 (*nadN::cat*,  $\Delta$ *hel*), die nur noch auf NR aber nicht mehr auf NAD<sup>+</sup> oder NMN wachsen konnte (127), auf BHI-Platten mit hoher NMN-Konzentration ausplattiert (100  $\mu$ M NMN). Die meisten hochgewachsenen Kolonien haben sich allerdings als *nadN*-Revertanten herausgestellt, da sie Chloramphenicol-sensitiv waren. Jedoch trugen zwei dieser Kolonien, GK04\*<sup>1</sup> und GK04\*<sup>2</sup>, weiterhin die *nadN::cat* Insertion. GK04\*<sup>1</sup> und GK04\*<sup>2</sup> konnten auch auf Platten mit niedrigerer NMN-Konzentration (15  $\mu$ M NMN) sehr gut wachsen, verhielten sich allerdings im <sup>14</sup>C-NMN- und <sup>14</sup>C-NR-Transport genauso wie der Ausgangsstamm GK04 und konnten kein radioaktiv markiertes NMN aufnehmen, während <sup>14</sup>C-NR genauso gut aufgenommen wurde. Da die anschließende Sequenzanalyse keinerlei Mutationen im *pnuC* und dessen Promotorbereich ergab, lag der Verdacht nahe, dass eine andere Phosphatase, z. B. durch „gain of function“ für den Wachstumsphänotyp verantwortlich war. In der Dünnschicht-Chromatographie war allerdings, genauso wie beim Ausgangsstamm, kein entstandenes NR nachzuweisen. Die Tatsache, dass in *pnuC* keine Punktmutanten eingeführt worden sind, die zu einer Substratspezifitätsänderung, wie bei PnuC<sup>Ec\*</sup>, geführt haben, mag auch an der unterschiedlichen AS-Zusammensetzung in dieser Region gelegen haben. Bei *S. typhimurium* wurden PnuC\* Punktmutanten im Bereich von *pnuC*\*269 und *pnuC*\*277 isoliert (89). Eine der früher isolierten Mutanten, mit dem gleichen Phänotyp, trug die Mutation im *pnuC*\*290. Alle diese Mutationen befinden sich in einer konservierten Domäne, die zwar bei *S. typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Yersinia pestis* und *E. coli*, nicht aber bei *H. influenzae*, *Pseudomonas syringae* und *Vibrio cholerae* konserviert ist. Was zu diesem Wachstums-Phänotyp geführt hat, bleibt reine Spekulation: (i) eine Möglichkeit ist, dass ein am PnuC-Transport beteiligtes Hilfsprotein, welches nur den Durchgang von NR zulässt, eine Mutation erfahren hat und somit zwar keinen aktiven Transport, aber eine für Wachstum genügend hohe Diffusion von NMN zulässt. Für diese These sollte auch *nadR* zusätzlich sequenziert werden. (ii) Die zweite Möglichkeit wäre, dass das zweite nieder-affine Aufnahmesystem, welches auch *pnuC*-Mutanten auf Platten wachsen lässt, im Transport und *in vivo* allerdings keine Relevanz hat, eine Mutation erfahren hat, und so Wachstum auf NMN fördert. So scheint bei *S. typhimurium* ein alternativer NR-Transporter, PnuD, zu existieren, dessen eigentliches Substrat unbekannt ist, der aber eine Homologie zu bisher bekannten Nukleosid-Transportern zeigt. Im Falle einer Inaktivierung von PnuC, erfährt PnuD\* seinerseits eine Mutation und fördert das Wachstum auf NMN bzw. NR (89). Im Genom von *H. influenzae* existiert ein Gen HI0308, welches als hypothetisches, konserviertes Transmembranprotein an

der inneren Membran annotiert ist und mögliche Identität zu *S. typhimurium* PnuD aufweist. In dieser Arbeit wurden zwei PnuD<sup>Hi</sup> Knock-out-Mutanten SE04 (BRAD *nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *pnuD*) und SE05 (BRAD*nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *pnuC*,  $\Delta$ *pnuD*) hergestellt, die im Wachstum und im Transport untersucht wurden. Es konnte allerdings kein sich von den Ausgangsstämmen unterscheidender Phänotyp beobachtet werden. Aus diesem Versuch lässt sich schließen, dass PnuD<sup>Hi</sup> nicht das zweite, nieder-affine Transportsystem ist, da das Wachstum der Doppelmutante SE05 sich genauso nachweisen ließ, wie das Wachstum des Ausgangsstammes auf verschiedenen supplementierten Platten. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Annahme, dass es nicht nur ein zweites, sondern noch weitere nieder-affine Transportsysteme gibt. Eine andere Möglichkeit wäre die oben in (ii) genannte, wonach PnuD, wie bei *S. typhimurium*, normalerweise eine andere Substratspezifität besitzt, und nur im Falle von einem defekten *pnuC* seinerseits eine Spontanmutation erfährt und so die Quantität bzw. Qualität des Substrats ändert. Für diesen Fall sollten zukünftig die zwei Stämme GK04\*<sup>1</sup> und GK04\*<sup>2</sup> in der Region von *pnuD* sequenziert werden.

Nachdem keine Spontanmutationen in PnuC<sup>Hi</sup> generiert werden konnten, wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese gezielt AS ausgetauscht. Für den AS-Austausch wurde das N<sup>-</sup>-terminale Fusionsplasmid pSE*pnuC*-His<sub>6</sub>N<sup>-</sup> verwendet und es wurden AS gewählt, die geladen und konserviert sind: Lysin (K) AS 61, Asparaginsäure (D) AS 158 und Glutaminsäure (E) AS 178. Neben diesen drei AS wurde ein weiteres Arginin (R) AS 175 gewählt, alle anderen Stämme, außer *H. influenzae* und *Enterococcus faecalis*, tragen an dieser Stelle ein Lysin, und eine Position davor ein Arginin. Die Wahl fiel auf die geladenen AS, da aus früheren Studien bekannt ist, dass geladene AS eine wichtige Rolle bei der Substraterkennung spielen; so sind beim Melibiosetransporter die AS D35, D55, D59 und D124 bei der Kation-Bindung und Erkennung beteiligt (187, 261, 276, 277). Bei der Laktosepermease sind die AS Glu 126 und Arg 144 für die Substratbindung verantwortlich, Glu 269 ist an der Substratbindung und Protontranslokation beteiligt, während Arg 302, His 322 und Glu 325 eine wichtige Rolle bei der Protontranslokation spielen (1). Im Falle von PnuC<sup>Hi</sup> konnten für Glu 178 keine Punktmutanten eingeführt werden, während Lys zu Ala (K61A), Arg zu Met (R175M) und Asp zu Lys (D158K) eingeführt werden konnten, allerdings wurde bei der D158K Mutation eine zusätzliche Punktmutation bei Arg zu Met (R175M) festgestellt. Möglicherweise musste die Ladung dieses AS-Austausches wieder neutralisiert werden. So vermutet man, dass es für eine geladene AS in einer hydrophoben Umgebung energetisch ungünstig ist und deswegen diese mit AS mit umgekehrter Ladung,

gepaart sind (147). Bei dem Melibiosetransporter sind wahrscheinlich H322 und E325 gepaart, die sich in einer TMD befinden (35). Eine andere Untersuchung, bei der Melibiose-positive Revertanten untersucht wurden, ergab, dass neben der Mutation des positiv geladenen Lysins K358T, eine weitere Mutation in der negativ geladenen Asparaginsäure (D237), die durch eine neutrale ersetzt worden war, stattgefunden hatte (131). Es wurde eine Salzbrücke zwischen D237K-K358D vermutet, die für die Proteinfaltung und -stabilität verantwortlich ist (55).

Die drei Plasmide pSEpnuC<sub>K61A</sub>, pSEpnuC<sub>R175M</sub> und pSEpnuC<sub>(D158K/R175M)</sub> wurden anschließend in die *H. influenzae* *pnuC*-Mutante SE02 (BRAD, *nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *pnuC*) transformiert, im Western-Blot und im Transport-Assay getestet. Im Western-Blot konnte das *pnuC* der Punktmutanten SE02pSEpnuC<sub>(R175M)</sub> und SE02pSEpnuC<sub>(D158K/R175M)</sub> nicht detektiert werden, während das PnuC der Punktmutante SE02pSEpnuC<sub>(K61A)</sub> eindeutig exprimiert wurde. Diese Lysin-Punktmutante konnte im Transport-Assay 70% der vom Wildtyp transportierten <sup>14</sup>C-NAD<sup>+</sup>-Menge aufnehmen. Während die Punktmutante SE02pSEpnuC<sub>(R175M)</sub> noch 9,46% des eingesetzten <sup>14</sup>C-NAD<sup>+</sup> transportieren konnte, war bei der Mutante mit der doppelten Punktmutation SE02pSEpnuC<sub>(D158K/R175M)</sub> kein Transport mehr festzustellen. Der geringe, aber dennoch vorhandene Transport der Mutante SE02pSEpnuC<sub>(R175M)</sub> steht im Widerspruch zum Western-Blot, bei dem das PnuC nicht oder kaum nachgewiesen werden konnte. Ein Problem wurde beim Western-Blot und bei den Expressionsstudien von PnuC zu Tage gebracht. Demnach zeigte sich, dass die Expression von PnuC<sup>Hi</sup> und die Überexpression sich als äußerst schwierig gestaltete, weshalb nur in seltenen Fällen eine Überexpression gelang. So funktionierte die Überexpression z. B. bei der Pellet-Fraktion, die bei 20°C und ÜN inkubiert wurden. Dabei konnten mit 0,4 mM bzw. 0,8 mM IPTG ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Bei kürzeren Inkubationszeiten konnte eine stärkere Expression bei 37°C erzielt werden. Nach 4h konnte die Expression bei 20°C gesteigert werden. Des Weiteren schien die Kultivierungsart eine Rolle zu spielen. So wurde PnuC<sup>Hi</sup> besser in Reagenzgläsern als in Kolben überexprimiert. So scheint PnuC<sup>Hi</sup> sehr instabil zu sein und darüber hinaus für die Zelle toxisch, die eventuell die Expression nur unter ganz bestimmten Bedingungen toleriert.

NR wird als Substrat nicht nur von *H. influenzae*, *E. coli* und *S. typhimurium*, sondern auch von *A. actinomycetemcomitans* und *P. multocida* präferiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *A. actinomycetemcomitans* und *P. multocida* ausschließlich NR transportieren. Im Transport-Assay wurde weder <sup>14</sup>C-NAD<sup>+</sup> noch <sup>14</sup>C-NMN, aber <sup>14</sup>C-NR



transportiert. In der Protein-Datenbank von *P. multocida* wurden zwei Proteine mit unbekannter Funktion gefunden, welche zu P4<sup>Hi</sup> eine Identität von 58% und zu NadN<sup>Hi</sup> eine geringe Identität von 26% aufweisen. So ergeben sich zwei Theorien: (i) P4<sup>Pm</sup> ist inaktiv und spielte möglicherweise früher eine Rolle, als *P. multocida* vielleicht noch kein NAM verwerten konnte oder (ii) P4<sup>Pm</sup> ist wenig aktiv und spaltet das NMN zu NR, allerdings ist wahrscheinlich kein NadN<sup>Pm</sup> vorhanden und so kann daher aus NAD<sup>+</sup> kein NMN entstehen und nur unzureichend zu NR dephosphoryliert werden und folglich nicht dem PnuC (Identität 71,4%) zum Transport zur Verfügung gestellt werden. Alternativ könnte das NAD<sup>+</sup> bzw. NMN durch eine Glykohydrolase zu NAm gespalten werden, welches in die Zelle diffundiert. NAm wird auch bei *A. pleuropneumoniae* und *P. multocida* nicht transportiert; der Transport auf <sup>14</sup>C-NAm wurde getestet (Daten nicht gezeigt). Bei *A. actinomycetemcomitans* können zwei homologe Proteine mit einer Identität von 73% zu P4<sup>Hi</sup> und 82% zu NadN<sup>Hi</sup> nachgewiesen werden, folglich müssen diese Proteine inaktiv sein oder eine langsamere Kinetik aufweisen, so dass sie kaum Einfluss auf die Transportfähigkeit ausüben. Im Gegensatz dazu wurde das Substrat NR ähnlich gut von allen drei Spezies transportiert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PnuC nur NR als Substrat erkennt. Dies gilt nicht nur für *H. influenzae*, sondern auch für PnuC aus *E. coli* und anderen *Pasteurellaceae*, wie *A. actinomycetemcomitans* und *P. multocida*. Der Transport von intaktem NAD<sup>+</sup> ist bisher nur bei einem symbiontisch lebendem Stamm UWE25, der mit den Chlamydien verwandt ist, beschrieben worden (91). UWE25 besitzt einen Transporter NTT4, der NAD<sup>+</sup> intakt in die Zelle transportiert und im Gegenzug ADP aus der Zelle transportiert. Das dafür nötige ATP wird von zwei weiteren Transportern NTT1 und NTT2 aus dem Wirt bezogen (91). Allerdings sind keine anderen Bakterien bekannt, bei denen NAD<sup>+</sup> oder auch NMN intakt in die Zelle transportiert wird. Aufgrund der entfernten Verwandtschaft von *H. influenzae* und *E. coli* und deren paraloge PnuC-Proteine, wird eine generelle Substratspezifität für NR für alle PnuC postuliert.

#### 4. Wo ist PnuC im TC Klassifikationssystem einzuordnen?

Im Kapitel VI.2. wurde bereits erwähnt, dass sich der Transporter PnuC mit seinen acht TMD etwas schwieriger in das TC-System einordnen lässt, welches von Saier et al. entwickelt wurde (31, 204, 205). Das TC-System teilt die Aufnahmesysteme in zwei Hauptklassen auf: 1) Kanäle/Poren und 2) „Carrier“ vermittelte Transporter. Die zweite Hauptklasse wird ihrerseits in drei Unterklassen unterteilt: 1) Primär aktive Transporter, 2) sekundär aktive Transporter und 3) Gruppentranslokatoren. In diesem TC-System findet sich die Kategorie 9.A. Transporter mit unbekanntem Mechanismus. Diese sind weder zu dem Kanal-Typ noch in den „Carrier“ vermittelten Transporter einzuordnen. So findet sich unter der Kategorie 9.A.4. auch PnuC.

Die Frage nach der Einordnung im TC-System impliziert die Suche nach der Energetisierungsquelle des PnuC-Transporters. Bereits 1988 versuchten Cynamon et al. die Frage der Energetisierungsquelle für *H. parainfluenzae* zu beantworten (43). Damals wurde der Effekt von verschiedenen Inhibitoren auf den  $^{14}\text{C-NAD}^+$ -Transport untersucht, mit dem Ergebnis, dass 2,4-Dinitrophenol (DNP) und 2-Deoxyglukose den Transport weit aus stärker inhibierten, als es die Substanzen KCN oder Natrium-Azide taten, die als Protonen-Entkoppler gelten. Aus diesem Grund wurde der Transporter als „Carrier“ vermittelter und ATP-abhängiger Transporter eingestuft (43). Auf dem Chromosom von *H. influenzae* befindet sich 125 bp Stromaufwärts von *pnuC* ein Genkluster HI1078-HI1080, welches als Bindeprotein-abhängiger ABC-Transporter annotiert ist. In dieser Arbeit wurde ein Stamm Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta\text{HI1077.1}$ ,  $\Delta\text{ABC}$  (SE06) konstruiert, bei dem, neben einem Teil von *pnuC*, der größte Teil des ABC-Transporters deletiert wurde. Um zu untersuchen, ob dieser ABC-Transporter bzw. die ATPase-Komponente die Energie für PnuC liefert oder als eigenständiges NR-Aufnahmesystem fungiert, wurde die Doppelmutante SE06 auf Wachstum getestet. Es wurde allerdings keinerlei Wachstumsunterschied im Vergleich zum Ausgangsstamm Rd-b<sup>+</sup>,  $\Delta\text{HI1077.1}$  beobachtet, so dass der ABC-Transporter weder an der Energetisierung von PnuC, noch auf andere Art und Weise an der NR-Aufnahme beteiligt zu sein scheint.

Weitere Indizien, dass es sich bei dem PnuC-Transporter nicht um einen ABC-Transporter handelt, sind die fehlenden typischen Motive der ABC-Transporter, wie der EAA-Loop, der die Konsensus-Sequenz EAA-X(3)-G-X(9)-I-X-LP definiert und eine

Interaktion mit der ATPase Untereinheit eingeht (159). Der EAA-Loop ist bei allen BPD (binding protein-dependent) Transportern vorhanden, wie auch die ATPase Untereinheit, die ATP-Bindung mit Hilfe der Walker A Motive und Walker B Motive bewerkstelligt.

Genauso wie die ABC-Transporter gehören auch die aus Oxido-Reduktionen getriebenen Transporter zu den primär aktiven Transportern. Ein weiteres Mitglied ist die Na<sup>+</sup>-translozierende NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase (Na<sup>+</sup>-NQR), welche einen Natriumgradienten aufbauen kann (204). Während noch vor einigen Jahren die Wichtigkeit von Na<sup>+</sup>-Pumpen eher marinen Bakterien wie *Vibrio alginolyticus* zugesprochen wurde, sind heute in mehreren pathogenen Bakterien, wie z. B. *H. influenzae*, *V. cholerae* und *V. harveyi* (98, 100, 278), Na<sup>+</sup>-Pumpen nachgewiesen worden. Es wurde gezeigt, dass Na<sup>+</sup> bzw. das SMF als treibende Kraft für mehrere Transporter, für Flagellen-Rotation und ATP-Synthese genutzt wird (37, 50, 51). Der Na<sup>+</sup>-NQR-Komplex von *V. cholerae* ist bereits weitgehend erforscht. Bei der Dehydrogenase-Aktivität, bei der NADH zu NAD<sup>+</sup> und H<sup>+</sup> oxidiert wird, werden zwei Elektronen frei, die an den Na<sup>+</sup>-NQR-Komplex bzw. an den Quinon-Pool weitergegeben werden (53, 248). Diese Energie wird für die Ausscheidung von zwei Na<sup>+</sup>-Ionen genutzt, wodurch ein SMF gebildet wird, welches wiederum für Stoffwechsel-Prozesse genutzt wird (50, 51). Bei *V. cholerae* z. B. wird das entstandene SMF für den Symport von Na<sup>+</sup> und Aminosäuren genutzt (96). Da bei *H. influenzae* ein homologes Operon zu dem Na<sup>+</sup>-NQR-Komplex gefunden wurde und *H. influenzae* die Na<sup>+</sup>-Zirkulation zur Energetisierung nutzt (100) war die Überlegung, ob der NR-Transport durch den Na<sup>+</sup>-NQR-Komplex in irgendeiner Art und Weise getrieben wird. Hierfür wurde eine *nqrABC*-Deletionsmutante, SE07 (*nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta nqrABC$ ), konstruiert und im <sup>14</sup>C-NAD<sup>+</sup>-Transport getestet. Die Transportdaten zeigten keinen Unterschied im Verhältnis zum Ausgangsstamm SE01 (*nadV*<sup>+</sup>). So kann man davon ausgehen, dass der Na<sup>+</sup>-NQR-Komplex in *H. influenzae* nichts mit der Energetisierung des NR-Transportes zu tun hat. Zur weiteren Charakterisierung wurden die Mutanten SE07 und SE08 im Wachstum auf BHI- bzw. MIC-Platten und in einer Wachstumskurve untersucht. Sowohl das Wachstum auf Platten, als auch die Wachstumskurve zeigten ein signifikantes Wachstumsdefizit der Mutante auf NaCl und LiCl, sowie bei erhöhten pH-Werten (> 7,2). Im anschließenden NADH-Oxidase-Assay wurde die Oxidation von NADH zu NAD<sup>+</sup> sowohl durch Na<sup>+</sup> als auch durch K<sup>+</sup> gefördert, wobei eine Korrelation mit der Na<sup>+</sup>-Konzentration zu beobachten war. Im Gegensatz zum Wildtyp konnte bei der *nqr*-Mutante keine NADH-Oxidation beobachtet werden. Hayashi et al. konnten mit ihren Versuchen 1996 eine Redox-gekoppelte Na<sup>+</sup>-Pumpe in *H. influenzae* nur

vermuten (100). Im Unterschied zu Hayashi et al. wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe einer Mutanten-Funktionsanalyse die Existenz eines  $\text{Na}^+$ -getriebenen NQR-Komplexes bewiesen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der  $\text{Na}^+$ -NQR-Komplex nicht spezifisch für  $\text{Na}^+$ -Ionen, sondern auch für andere positive Ionen, wie  $\text{Li}^+$  und  $\text{K}^+$  ist.

In manchen Fällen lässt sich der Transporter-Typ aufgrund der Protein-Topologie vorhersagen. So besitzen die meisten Familien der integralen, Membran  $\alpha$ -Typ-Kanal Proteine nur drei oder weniger TMD, während die Familie der „Carrier“ vermittelten Transporter acht bis 14 TMD besitzen und als Monomere aktiv sind oder vier bis sieben TMD besitzen und als Dimere aktiv sind (204). Auch die bisher bekannten Nukleosid-Transporter werden entweder zu den  $\text{H}^+$ - oder  $\text{Na}^+$ -abhängigen Symportern oder den Uniportern gezählt. Bisher sind sieben Familien bekannt, davon ist ein Transporter zu den Poren zugehörig und sechs zu den sekundär aktiven Transportern (204). Diese Tatsache spricht eher dafür, dass es sich bei PnuC<sup>Hi</sup> um einen „Carrier“ vermittelten, sekundär aktiven Transporter, als um einen Kanal-Typ Transporter handelt. Weitere Argumente dafür sind, dass die meisten „Carrier“-Typ Transporter im Gegensatz zu den Kanal-Typen eine stärkere Substrat-Spezifität und eine gesättigte Transport-Kinetik aufweisen, was auf PnuC zutreffen würde. Des Weiteren transportieren die Kanal-Typ Transporter meist in einem energieunabhängigen Transport; bei *H. parainfluenzae* konnte jedoch gezeigt werden, dass der  $^{14}\text{C}$ - $\text{NAD}^+$  Transport sehr wohl ATP-abhängig war (43). PnuC lässt sich auch schwer in die Klasse der sekundär aktiven Transporter einordnen. Die meisten sekundär aktiven Transporter sind  $\text{H}^+$ - oder  $\text{Na}^+$ -abhängig, jedoch konnten Cynamon et al. zeigen, dass die  $^{14}\text{C}$ - $\text{NAD}^+$  Aufnahme nicht durch Protonen-Entkoppler gehemmt wird (43). Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der  $^{14}\text{C}$ - $\text{NAD}^+$  Transport nicht beeinflusst wird, wenn das  $\text{Na}^+$ -Gleichgewicht in der Zelle gestört wird,

Bei *S. typhimurium* wurden Mutanten beschrieben, die ein Defizit in der Aufnahme von NMN aufwiesen. Diese Mutationen befanden sich im C'-Terminus von *nadR* (71, 72, 279), die molekularen Details wurden allerdings nicht geklärt. NadR fungiert in *H. influenzae* als ein bifunktionelles Protein, welches mit der C'-terminalen Hälfte (RNK-Domäne) die Synthese von NMN aus NR und ATP katalysiert und mit der N'-terminalen Hälfte  $\text{NAD}^+$  aus NMN und ATP synthetisiert (138). Im Rahmen unserer Forschungsgruppe wurden mehrere NadR-RNK-Mutanten von M. Merdanovic konstruiert, die nicht nur ihre RNK-Kinase Aktivität verloren hatten, sondern auch ein Defizit im Transport aufwiesen (156). Dabei

waren die Transportraten mit denen der *pnuC*-Mutanten aus dieser Arbeit vergleichbar. Des Weiteren wurde die subzelluläre Lokalisation von NadR untersucht, dabei wurde NadR sowohl in der löslichen Fraktion, als auch in der Membranfraktion gefunden, wobei die RNK-Aktivität in der Membranfraktion stärker war, als in der löslichen Fraktion (156). Da NadR die Walker A und Walker B Motive aufweist, die für die ATP Bindung und Hydrolyse notwendig sind, sind die Versuche von Cynamon et al., in denen der Transport durch DNP und 2-Deoxyglukose gehemmt wurde (43), bzw. ihre Ergebnisse möglicherweise auf eine Hemmung von NadR und der dadurch indirekten Hemmung von PnuC zurückzuführen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Kopplung zwischen PnuC-Transporter und der RNK-Kinase Aktivität vorhanden ist. So könnte PnuC eine Permease darstellen, die als Uniporter funktioniert, und die NR-Aufnahme, aber auch dessen Efflux aus der Zelle erlaubt (Abb. 42). NadR wäre die treibende Kraft für die NR-Aufnahme, es würde die Dissoziation von NR von PnuC ermöglichen, indem es NR zu NMN phosphoryliert und so den Efflux aus der Zelle verhindert. Der NR-Durchtritt wäre von der NR-Phosphorylierungs-Rate abhängig. Eine hohe intrazelluläre  $\text{NAD}^+$ -Konzentration würde durch eine Feedback Inhibition, indem  $\text{NAD}^+$  an NadR bindet, zu einer reduzierten NR-Aufnahme oder zu einem „geschlossenen“ Zustand von PnuC führen und so die weitere Aufnahme und Efflux von NR stoppen. Eine Feedback Inhibition durch  $\text{NAD}^+$  konnte *in vitro* hauptsächlich für die RNK-Domäne beobachtet werden (156). Ein ähnliches aber gut untersuchtes Uniport-System stellt das Glycerinaufnahmesystem GlpF in *E. coli* dar. Hier bildet GlpF eine selektive Pore, während die Kinase (GlpK) das Glycerol zu *sn*-Glycerol-3-Phosphat phosphoryliert und so den Efflux verhindert (237, 253). Im TC-System ist GlpF als Aquapore, welche neben Glycerol auch Wasser und Harnstoff aufnimmt, zu den  $\alpha$ -Kanal-Typ-Proteinen eingeordnet (204). Aufgrund der Topologie, seiner Substrat-Spezifität und der Ähnlichkeit zu dem Uniport-System GlpF von *E. coli* ist PnuC irgendwo zwischen den zwei Hauptklassen des TC-Systems einzuordnen. Die meisten Übereinstimmungen wurden mit den „Carrier“ vermittelten, sekundär aktiven Transportern gefunden. Hierzu werden als gleichberechtigter Zweig auch die Uniporter gezählt, die ein einzelnes Substrat entweder durch erleichterte Diffusion oder durch einen vom Membranpotential abhängigen Prozess transportieren, falls das Substrat geladen ist (204). Möglicherweise müsste diese Klasse der Uniporter nochmals unterteilt werden, in Uniporter, die getrieben werden durch die Kopplung an die Aktivität eines anderen Proteins, wie im Falle von PnuC. Oder es könnte neben den zwei Hauptklassen der Kanal- und „Carrier“-Typ Transportern eine dritte Hauptklasse der „Carrier“ vermittelten Kanal-Typ Transporter hinzugefügt werden.

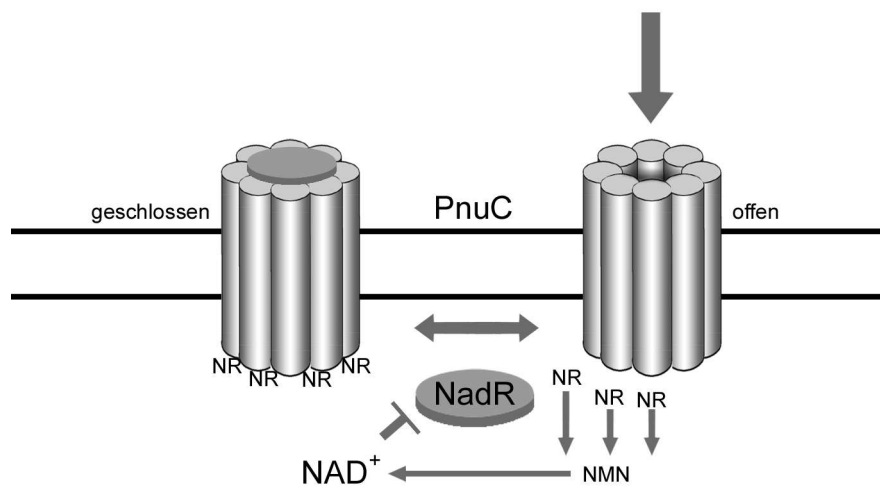


Abb. 42 NR-Aufnahme Modell von *H. influenzae*.

### 5. Die Wirkung und die Aufnahmeroute des Inhibitors 3-AAD

Seit Anfang der 90er Jahre ist bekannt, dass bestimmte  $\text{NAD}^+$ -Derivate, wie NAAD, 3'-AAD, 3'-PAAD und 3'-IodoPAD, auf *H. influenzae* wachstumsinhibierend wirken (48, 78, 124). Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass 3-Aminopyridin-Analoga auf  $\text{NAD}^+$ -abhängige Dehydrogenasen bzw.  $\text{NADP}^+$ -abhängige Enzyme, wie die Malat- und 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase, inhibierend wirken (62, 271, 272). Der genaue Mechanismus konnte bisher nicht geklärt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aufnahmeroute von 3-Aminopyridin-Derivaten (3-AADP, 3-AAD und 3-AmPR) bei mehreren *H. influenzae* Mutanten, wie SE01( $\text{nadV}^+$ ), SE02 ( $\text{nadV}^+$ ,  $\Delta\text{pnuC}$ ), SE02pSEpnuC-His<sub>6</sub>C', REI1012 ( $\Delta\text{hel}$ ), REI1010 ( $\text{nadN}::\text{cat}$ ), GK04 ( $\Delta\text{hel}$ ,  $\text{nadN}::\text{cat}$ ), *H. influenzae*  $\Delta\text{ompP2}$ , sowie bei *P. multocida* und *A. actinomycetemcomitans* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die  $\text{NAD}^+$ -Derivate nur dann wachstumsinhibierend wirken, wenn sie auch in die Zelle gelangen können. Stämme, die eine Mutation in Genen trugen, die für die  $\text{NAD}^+$ -Prozessierung, Aufnahme und Resynthese benötigt werden, wurden auch von den  $\text{NAD}^+$ -Derivaten nicht inhibiert. So wurde das Wachstum der Mutanten REI1012 ( $\Delta\text{hel}$ ), REI1010 ( $\text{nadN}::\text{cat}$ ), GK04 ( $\Delta\text{hel}$ ,  $\text{nadN}::\text{cat}$ ), und *H. influenzae*  $\Delta\text{ompP2}$  durch die Zugabe von 3-AADP und 3-AAD nicht beeinträchtigt. Allerdings wirkte 3-AmPR inhibierend, wenn NR als Faktor-V-Quelle vorhanden war. Der Aufnahmemechanismus von 3-AADP wurde mit einem ergänzenden Versuch genauer charakterisiert. Hierfür wurden die Stämme BRAD,

SE01(*nadV*<sup>+</sup>), SE03 ( $\Delta$ *pnuC*), SE02 (*nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *pnuC*) und SE01 $\Delta$ RNK mit NADP<sup>+</sup> und einem Überschuss an 3-AADP inkubiert. Auch dieser Versuch konnte zeigen, dass 3-AADP, welches vorher zu 3-AmPR gespalten wird, effektiv von PnuC aufgenommen wird. Ist PnuC nicht vorhanden, dann konnte Wachstum nur in einem *nadV*-positiven Stamm SE02 (*nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *pnuC*), aber nicht in einem *pnuC*- und *nadV*-negativen Stamm SE03 ( $\Delta$ *pnuC*) beobachtet werden. Die NadR-RNK Mutante (SE01 $\Delta$ RNK), die auch eine *nadV*-Kopie trägt, war ebenfalls resistent gegenüber 3-AADP. *nadV* wurde aus einem NAD<sup>+</sup>-unabhängigen Stamm *H. ducreyi* ATCC 27722 kloniert (E. Sauer Diplomarbeit) und funktioniert als eine Nikotinamid-Phosphoribosyltransferase (NAm-PRTase). Stämme die *nadV*-positiv sind, können direkt aus NAm, welches in die Zelle diffundiert, NMN synthetisieren. In diesen Fällen ist die alternative zweite Route der NR- bzw. 3-AmPR-Aufnahme nicht effektiv genug, um das Wachstum auf NMN via *nadV* zu inhibieren. Im Falle von SE03 ( $\Delta$ *pnuC*) ist nur das hypothetische zweite Aufnahmesystem vorhanden, welches neben NR wahrscheinlich auch 3-AmPR transportiert und so das Wachstum inhibiert. Folglich wird postuliert, dass 3-AADP, 3-AAD und 3-AmPR derselben Aufnahmeroute folgen, wie NADP<sup>+</sup>, NAD<sup>+</sup> und NR. Demnach wird 3-AADP von e(P4) zu 3-AAD phosphoryliert, welches als Substrat für NadN dient und weiter zu 3-AMN hydrolysiert wird. Anschließend wird 3-AMN von e(P4) und NadN zu 3-AmPR dephosphoryliert, welches via PnuC und durch das zweite hypothetische NR-Aufnahmesystem in die Zelle aufgenommen wird.

Die NAD<sup>+</sup>-Derivate, 3-AADP, 3-AAD und 3-AmPR, wirkten auf *P. multocida* und *A. actinomycetemcomitans* dagegen nicht inhibierend. Diese Bakterien sind NAD<sup>+</sup>-unabhängig und können NAm durch ein *nadV*-Homolog sehr gut verwerten (151). Die Tatsache, dass das Wachstum nicht durch 3-AADP und 3-AAD inhibiert wurde, ist darauf zurückzuführen, dass *P. multocida* und *A. actinomycetemcomitans* auch kein NAD<sup>+</sup> und NMN verwerten können, was wiederum auf das Fehlen von aktiven e(P4) und NadN Proteinen beruht. Wie in Kapitel V.4.3. gezeigt werden konnte, können *P. multocida* und *A. actinomycetemcomitans* NR aufnehmen. Die Tatsache, dass auch 3-AmPR nicht das Wachstum inhibiert hat, könnte folgende Gründe haben: (i) möglicherweise besitzen *P. multocida* und *A. actinomycetemcomitans* ein stärker aktives *nadV*. So wurde kürzlich das Vorhandensein von zwei Familien innerhalb der Homologen von NadV postuliert, eine NadV-Gruppe ist näher verwandt innerhalb von *Shewanella*, *Mycoplasma* und *H. ducreyi*, wohingegen die zweite NadV-Gruppe den Spezies *P. multocida* und *A. actinomycetemcomitans* zugeordnet ist (151). Eine aktivere Form von NadV könnte durch die Bildung höherer NMN-Konzentrationen zu

der erhöhten Resistenz gegenüber dem Inhibitor 3-AmPR führen. (ii) Eine andere Möglichkeit, die Resistenz von *P. multocida* und *A. actinomycetemcomitans* auf 3-AmPR zu erklären, wären unterschiedliche Spezifitäten von PnuC und NadR, die zwar NR, aber nicht 3-AmPR als Substrat erkennen. Für diese Möglichkeit würde die Tatsache sprechen, dass auch das NAm-Analogon, 3-Aminopyridin, das Wachstum nicht inhibieren konnte (Daten nicht gezeigt). So könnte das entstandene 3-AMN von NadR-NMNAT nicht als Substrat erkannt worden sein.

Um zu klären, ob anschließend 3-AmPR direkt NadR inhibiert oder ob 3-AmPR via NadR weiter zu 3-AAD synthetisiert wird, wurden weitere Versuche von M. Merdanovic und Anne Price Mortimer am Institut für organische Chemie durchgeführt. Eine HPLC-Analyse lieferte den direkten Nachweis, dass NadR in Anwesenheit von ATP und  $MgCl_2$  aus 3-AmPR 3-AAD synthetisieren kann (V.8.3. Abb. 41). Folglich wird NadR nicht durch 3-AAD gehemmt, sondern  $NAD^+$  und 3-AAD sind kompetitive Inhibitoren, die um die Besetzung des aktiven Zentrums des entsprechenden Enzyms konkurrieren. Die folgenden Biosyntheseschritte, bei denen  $NAD^+$  normalerweise als Coenzym fungiert, werden durch 3-AAD und dessen Vorläufer bis zum Stillstand des Metabolismus blockiert.

Um festzustellen, ob *H. influenzae* auch 3-AmPR-Resistenzen entwickeln kann, wurde ein Selektions-Assay mit den Stämmen SE02 (*nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *pnuC*) und SE02pSEpnuC-His<sub>6</sub>C<sup>+</sup> durchgeführt. Die Stämme SE01 und SE02 sind in der Lage sowohl auf NAm als auch auf NR zu wachsen, sind aber sensitiv in Bezug auf 3-AmPR. So wären Mutationen in der NR-Aufnahme bzw. NMN-Resynthese in diesen Stämmen möglich, da das Wachstum durch NAm via NadV gesichert wäre. Tatsächlich konnten spontan resistente Mutanten isoliert werden, die Mutationen im *nadR*-Gen, aber nicht im *pnuC*-Gen aufwiesen. Einige Stämme hatten weder im *nadR*-Gen, noch im *pnuC*-Gen eine Mutation, so dass auch andere Quellen vorhanden sind, die zu einer 3-AmPR-Resistenz führen können. Die Mutationen im *nadR*-Gen waren besonders häufig im Walker A Motiv der RNK-Domäne, aber auch in der NMNAT-Domäne geclustert. Dabei wurden sowohl Punktmutanten mit AS-Austausche, als auch Insertionen und Deletionen gefunden, die zu Leseraster-Verschiebungen führten. Die Mutationen in der RNK-Domäne von NadR sind einfach zu erklären: die Synthese von 3-AAD ist durch die fehlende Aktivität der RNK-Kinase blockiert, während das Wachstum auf NAm durch NadV sichergestellt ist. Warum jedoch auch in der essentiellen NMNAT-Domäne von NadR Punktmutationen gefunden wurden, ist unklar. Einige dieser



Punktmutanten wurden von M. Merdanovic weiter charakterisiert. Immunoblotanalysen zeigten eine stärker verminderte NadR-Menge in den Zellextrakten, als für den Wildtyp normalerweise üblich. Diese Punktmutanten waren im Transport negativ und zeigten in den Assays mit Rohextrakten kaum eine  $\text{NAD}^+$ -Synthese. Hier wurde eine Änderung der Substratspezifität oder ein NadR-Proteinstabilitäts-Effekt postuliert, wodurch das 3-AmPR bzw. 3-AMN schlechter erkannt und umgesetzt werden und so zu einer 3-AmPR Resistenz führen (Doktorarbeit M. Merdanovic). Warum keine Punktmutationen im *pnuC*-Gen gefunden wurden, zumal der Stamm SE02 (*nadV*<sup>+</sup>,  $\Delta$ *pnuC*) resistent gegen 3-AmPR war (V.8.1. Tabelle 18, Abb. 40), bleibt unklar. Möglicherweise treten Mutationen im PnuC in einer weit geringeren Frequenz auf, so dass eine viel größere Zahl an spontanen Mutanten untersucht werden müsste, um solche Mutationen zu finden.

## 6. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein wesentlicher Teil des  $\text{NAD}^+$ -Stoffwechselweges von *H. influenzae* gelöst. Der NR-Transporter PnuC von *H. influenzae* wurde identifiziert und dabei wurde festgestellt, dass PnuC *in vivo* essentiell ist. Weiterhin wurde die Aktivität, Zelllokalisierung und Membran-Topologie von PnuC aufgedeckt. Der PnuC-Transporter in *E. coli*, der als NMN-Transporter galt, wurde als NR-Transporter widerlegt. Für *P. multocida* und *A. actinomycetemcomitans* wurde ebenfalls NR als Substrat für PnuC identifiziert. Es wird postuliert, dass alle PnuC homologen Proteine NR spezifische Transporter repräsentieren. Somit würde sich PnuC als Angriffsziel für die Entwicklung von Therapeutika bei *H. influenzae* gut eignen, nicht aber bei anderen Mitgliedern der *Pasteurellaceae*, die NadV-Aktivität besitzen. Die Aufnahme-Route von dem Inhibitor 3-AAD wurde ebenfalls aufgeklärt: die Aufnahme und Synthese von 3-AAD/3-AmPR folgen dem gleichen Weg wie  $\text{NAD}^+$ /NR via PnuC. Intrazelluläres 3-AAD inhibiert die  $\text{NAD}^+$ -abhängigen Enzyme in den nachfolgenden Redox-Reaktionen. Der genaue molekulare Mechanismus ist allerdings unklar. 3-AmPR scheint ähnlich zu wirken wie die auf Nukleotide basierende Pro-Pharmaka, wie Benzamid-Ribosid, Tiazofurin und Selenazofurin. Benzamid-Ribosid wird z. B. von Krebszellen durch einen unbekanntem Mechanismus aufgenommen und als Substrat für die Herstellung von Benzamid-Adenin-Dinukleotid (BAD) verwendet. BAD inhibiert anschließend die IMP- (Inosin Monophosphat) Dehydrogenase, was wiederum zur Verringerung von GTP und dGTP und anschließend zur

---

Apoptose führt (73, 269). Ebenso inhibierend wirkt BAD auf die poly (ADP-Ribose) Polymerase, welche die Expression von p53 beeinflusst, was dann ebenfalls zur Apoptose führt (268). Da 3-AAD auch unter anaeroben Bedingungen wachstumshemmend wirkt, könnte der Anabolismus, wie z. B. die Nukleotid-Synthese ein Ziel für 3-AAD darstellen. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, insbesondere über die Wirkung von 3-AAD auf den menschlichen Körper. Weitere Untersuchungen, die das NR-Aufnahmesystem betreffen, sind auch in Bezug auf das NR-Aufnahmesystem an der äußeren Membran und in Bezug auf den zweiten, nieder-affinen NR-Transporter an der inneren Membran durchzuführen. Des Weiteren wären Experimente notwendig, welche die Interaktion von PnuC und NadR betreffen. Diesbezüglich wäre eine Co-Immunopräzipitation oder der Screen nach Mutanten, die unabhängig von (RNK)NadR auf NR wachsen können, zu empfehlen.

## VII. Literaturverzeichnis

1. **Abramson, J., I. Smirnova, V. Kasho, G. Verner, H. R. Kaback, and S. Iwata.** 2003. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science*. **301**:610-615.
2. **Adhikari, P., S. D. Kirby, A. J. Nowalk, K. L. Veraldi, A. B. Schryvers, and T. A. Mietzner.** 1995. Biochemical characterization of a *Haemophilus influenzae* periplasmic iron transport operon. *J. Biol. Chem.* **270**:25142-49.
3. **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.
4. **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**:150-158. Epub 2001 Jun 14.
5. **Akerley, B. J., E. J. Rubin, V. L. Novick, K. Amaya, N. Judson, and M. JJ.** 2002. A genome-scale analysis for identification of genes required for growth or survival of *Haemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:966-971.
6. **Akkoyunlu, M., A. Melhus, C. Capiu, O. van Opstal, and A. Forsgren.** 1997. The acylated form of protein D of *Haemophilus influenzae* is more immunogenic than the nonacylated form and elicits an adjuvant effect when it is used as a carrier conjugated to polyribosyl ribitol phosphate. *Infect. Immun.* **65**:5010-5016.
7. **Allan, I., J. S. Kroll, A. Dhir, and E. R. Moxon.** 1988. *Haemophilus influenzae* serotype a: outer membrane protein classification and correlation with DNA polymorphism at the cap locus. *Infect. Immun.* **56**:529-531.
8. **Andersen, C., E. Maier, G. Kemmer, J. Blass, A. K. Hilpert, R. Benz, and J. Reidl.** 2003. Porin OmpP2 of *Haemophilus influenzae* shows substrate specificity towards nicotinamide-derived nucleotide Substrats. *J. Biol. Chem.* **278**:24269-24276.
9. **Anderson, B. M., and N. O. Kaplan.** 1959. Enzymatic studies with analogues of diphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.* **234**:1226-1232.
10. **Anderson, P., G. Peter, R. B. Johnston, W. Jr, L.H., and D. H. Smith.** 1972. Immunization of humans with polyribophosphate, the capsular antigen of *Hemophilus influenzae*, type b. *J. Clin. Invest.* **51**:39-44.
11. **Andreoli, A. J., T. Grover, R. K. Gholson, and T. S. Matney.** 1969. Evidence for a functional pyridine nucleotide cycle in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **192**:539-541.
12. **Arai, M., M. Ikeda, and T. Shimizu.** 2003. Comprehensive analysis of transmembrane topologies in prokaryotic genomes. *Gene*. **304**:77-86.
13. **Aubrey, R., and C. Tang.** 2003. The pathogenesis of disease due to type b *Haemophilus influenzae*. *Methods Mol. Med.* **71**:29-50.
14. **Bachur, N. R., and N. O. Kaplan.** 1955. Metabolism of diphosphopyridine nucleotide and related compounds in *Haemophilus parainfluenzae*. *Bacteriol. Proc.* **55**: 116-119.
15. **Barcak, G. J., M. S. Chandler, R. J. Redfield, and J. F. Tomb.** 1991. Genetic systems in *Haemophilus influenzae*. *Methods in Enzymology.* **204**:321-342.
16. **Barenkamp, S. J.** 1996. Immunization with high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* modifies experimental otitis media in chinchillas. *Infect. Immun.* **64**:1246-1251.
17. **Barenkamp, S. J., and F. F. Bodor.** 1990. Development of serum bactericidal activity following nontypable *Haemophilus influenzae* acute otitis media. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **9**:333-339.
18. **Barenkamp, S. J., and E. Leininger.** 1992. Cloning, expression, and DNA sequence analysis of genes encoding nontypeable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* **60**:1302-1313.
19. **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**:1215-1223..of *Escherichia coli*. VI. Protein alteration in bacteriophage-resistant mutants. *J. Bacteriol.* **131**:608-622.
21. **Birnboim, H. C., and J. Doly.** 1979. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.
22. **Blachly-Dyson, E., S. Peng, M. Colombini, and M. Forte.** 1990. Selectivity changes in site-directed mutants of the VDAC ion channel: structural implications. *Science.* **247**:1233-1236.
23. **Bochner, B. R., and B. N. Ames.** 1982. Complete analysis of cellular nucleotides by two-dimensional thin layer chromatography. *J. Biol. Chem.* **257**:9759-9769.
24. **Borderon, J. C.** 1995. [*Haemophilus influenzae*: colonization and infection]. *Arch. Pediatr.* **2**:249-254.
25. **Bradford, M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilization the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
26. **Bragg, R. R., L. Coetzee, and J. A. Verschoor.** 1993. Plasmid-encoded NAD independence in some South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **60**:147-152.

27. **Bricker, J., Mulks, M., Moxon, E. R., Plaut, A. G. & Wright, and A.** 1985. *Infect. Immun.* **47**:370-374.
28. **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.
29. **Broome, C. V.** 1987. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b infections in the United States. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **6**:779-782.
30. **Buchanan, S. K.** 1999. Beta-barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**:455-461.
31. **Busch, W., and M. H. Saier, Jr.** 2002. The transporter classification (TC) system, 2002. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **37**:287-337.
32. **Buttin, G., G. N. Cohen, J. Monod, and H. V. Rickenberg.** 1956. [Galactoside-permease of *Escherichia coli*.]. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*. **91**:829-857.
33. **Calvin, N. M., and P. C. Hanawalt.** 1988. High efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* **170**:2796-2801.
34. **Campos, J., M. Hernando, F. Roman, M. Perez-Vazquez, B. Aracil, J. Oteo, E. Lazaro, and F. de Abajo.** 2004. Analysis of invasive *Haemophilus influenzae* infections after extensive vaccination against *H. influenzae* type b. *J. Clin. Microbiol.* **42**:524-529.
35. **Carrasco, N., L. M. Antes, M. S. Poonian, and H. R. Kaback.** 1986. lac permease of *Escherichia coli*: histidine-322 and glutamic acid-325 may be components of a charge-relay system. *Biochemistry.* **25**:4486-4488.
36. **Chandler, J. L., and R. K. Gholson.** 1972. Studies on the biosynthesis of NAD in *Escherichia coli*. 3. Precursors of quinolinic acid in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.* **264**:311-318.
37. **Cheng, J., A. A. Guffanti, and T. A. Krulwich.** 1997. A two-gene ABC-type transport system that extrudes Na<sup>+</sup> in *Bacillus subtilis* is induced by ethanol or protonophore. *Mol. Microbiol.* **23**:1107-1120.
38. **Chong, P., Y. P. Yang, D. Persaud, M. Haer, B. Tripet, E. Tam, C. Sia, and M. Klein.** 1995. Immunogenicity of synthetic peptides of *Haemophilus influenzae* type b outer membrane protein P1. *Infect. Immun.* **63**:3751-3758.
39. **Ciotti, M. M., N. O. Kaplan, and F. E. Stolzenbach.** 1956. Reaction of pyridine nucleotide analogues with dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **221**:833-844.
40. **Cohen, G. N., and J. Monod.** 1957. Bacterial permeases. *Bacteriol. Rev.* **21**:169-194.
41. **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**:4511-4516.
42. **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**:2644-2653.
43. **Cynamon, M. H., T. B. Sorg, and A. Patapow.** 1988. Utilization and metabolism of NAD by *Haemophilus parainfluenzae*. *J. Gen. Microbiol.* **134**:2789-2799.
44. **Danielsen, S., D. Boyd, and J. Neuhard.** 1995. Membrane topology analysis of the *Escherichia coli* cytosine permease. *Microbiology.* **141**:2905-2913.
45. **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**:1077-1082.
46. **Deich, R. A., A. Anilionis, J. Fulginiti, B. J. Metcalf, S. Quataert, T. Quinn-Dey, G. W. Zlotnick, and B. A. Green.** 1990. Antigenic conservation of the 15,000-dalton outer membrane lipoprotein PCP of *Haemophilus influenzae* and biologic activity of anti-PCP antisera. *Infect Immun.* **58**:3388-3393.
47. **Deisenhofer, J., and H. Michel.** 1991. High-resolution structures of photosynthetic reaction centers. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20**:247-266.
48. **Denicola-Seoane, A., and B. M. Anderson.** 1990. Studies of NAD kinase and NMN:ATP adenylyltransferase in *Haemophilus influenzae*. *J. Gen. Microbiol.* **136**:425-430.
49. **Detmers, F. J., F. C. Lanfermeijer, and B. Poolman.** 2001. Peptides and ATP binding cassette peptide transporters. *Res. Microbiol.* **152**:245-258.
50. **Dibrov, P. A., V. A. Kostyko, R. L. Lazarova, V. P. Skulachev, and I. A. Smirnova.** 1986. The sodium cycle. I. Na<sup>+</sup>-dependent motility and modes of membrane energization in the marine alkalotolerant *Vibrio alginolyticus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **850**:449-457.
51. **Dibrov, P. A., R. L. Lazarova, V. P. Skulachev, and M. L. Verkhovskaya.** 1986. The sodium cycle. II. Na<sup>+</sup>-coupled oxidative phosphorylation in *Vibrio alginolyticus* cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **850**:458-465.
52. **Dickinson, E. S., and T. K. Sundaram.** 1970. Chromosomal location of a gene defining nicotinamide deamidase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **101**:1090-1091.
53. **Dimroth, P.** 1997. Primary sodium ion translocating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1318**:11-51.

54. **Doern, G. V., A. B. Brueggemann, G. Pierce, H. P. Holley, Jr., and A. Rauch.** 1997. Antibiotic resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States in 1994 and 1995 and detection of beta-lactamase-positive strains resistant to amoxicillin-clavulanate: results of a national multicenter surveillance study. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **41**:292-297.
55. **Dunten, R. L., M. Sahin-Toth, and H. R. Kaback.** 1993. Role of the charge pair aspartic acid-237-lysine-358 in the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **32**:3139-3145.
56. **Ecevit, I. Z., K. W. McCrea, M. M. Pettigrew, A. Sen, C. F. Marrs, and J. R. Gilsdorf.** 2004. Prevalence of the *hifBC*, *hmw1A*, *hmw2A*, *hmwC*, and *hia* Genes in *Haemophilus influenzae* Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **42**:3065-3072.
57. **El-Adhami, W., J. M. Kyd, D. A. Bastin, and A. W. Cripps.** 1999. Characterization of the gene encoding a 26-kilodalton protein (OMP26) from nontypeable *Haemophilus influenzae* and immune responses to the recombinant protein. *Infect. Immun.* **67**:1935-1942.
58. **Evans, N. M., D. D. Smith, and A. J. Wicken.** 1974. Hemin and nicotinamide adenine dinucleotide requirements of *Haemophilus influenzae*. *J. Med. Microbiol.* **7**:359-365.
59. **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**:752-759.
60. **Fine, D. H., D. Furgang, J. Kaplan, J. Charlesworth, and D. H. Figurski.** 1999. Tenacious adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain CU1000 to salivary-coated hydroxyapatite. *Arch. Oral. Biol.* **44**:1063-1076.
61. **Fischer, K., A. Weber, S. Brink, B. Arbinger, D. Schunemann, S. Borchert, H. W. Heldt, B. Popp, R. Benz, T. A. Link, and et al.** 1994. Porins from plants. Molecular cloning and functional characterization of two new members of the porin family. *J. Biol. Chem.* **269**:25754-25760.
62. **Fisher, T. L., S. V. Vercellotti, and B. M. Anderson.** 1973. Interactions of 3-aminopyridine adenine dinucleotide with dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **248**:4293-4299.
63. **Flachmann, R., N. Kunz, J. Seifert, M. Gutlich, F. J. Wientjes, A. Laufer, and H. G. Gassen.** 1988. Molecular biology of pyridine nucleotide biosynthesis in *Escherichia coli*. Cloning and characterization of quinolinate synthesis genes *nadA* and *nadB*. *Eur. J. Biochem.* **175**:221-228.
64. **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.
65. **Flesher, A. R., and R. A. Insel.** 1978. Characterization of lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*. *J. Infect. Dis.* **138**:719-730.
66. **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**:1002-1009.
67. **Foster, J. W., and A. M. Baskowsky-Foster.** 1980. Pyridine nucleotide cycle of *Salmonella typhimurium*: in vivo recycling of nicotinamide adenine dinucleotide. *J. Bacteriol.* **142**:1032-1035.
68. **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**:1165-1175.
69. **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**:957-961.
70. **Foster, J. W., and A. G. Moat.** 1980. Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and pyridine nucleotide cycle metabolism in microbial systems. *Microbiol. Rev.* **44**:83-105.
71. **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**:4187-4196.
72. **Foster, J. W., and T. Penfound.** 1993. The bifunctional NadR regulator of *Salmonella typhimurium*: location of regions involved with DNA binding, nucleotide transport and intramolecular communication. *FEMS Microbiol. Lett.* **112**:179-183.
73. **Franchetti, P., and M. Grifantini.** 1999. Nucleoside and non-nucleoside IMP dehydrogenase inhibitors as antitumor and antiviral agents. *Curr. Med. Chem.* **6**:599-614.
74. **Frosch, M., and A. Muller.** 1993. Phospholipid substitution of capsular polysaccharides and mechanisms of capsule formation in *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **8**:483-493.
75. **Froshauer, S., G. N. Green, D. Boyd, K. McGovern, and J. Beckwith.** 1988. Genetic analysis of the membrane insertion and topology of MalF, a cytoplasmic membrane protein of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **200**:501-511.
76. **Gale, E. F., and E. S. Taylor.** 1947. The assimilation of amino-acids by bacteria 2. The action of tyrocidin and some detergent substances in releasing amino-acids from the internal environment of *Streptococcus faecalis*. *J. Gen. Microbiol.* **1**:77-84.

77. **Gingrich, W., and F. Schlenk.** 1944. Codehydrogenase I and other pyridinium compounds as V-factor for *Haemophilus influenzae* and *H. parainfluenzae*. *J. Bacteriol.*:**47**: 535-550.
78. **Godek, C. P., and M. H. Cynamon.** 1990. In vitro evaluation of nicotinamide riboside analogs against *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **34**:1473-479.
79. **Goswitz, V. C., and R. J. Brooker.** 1995. Structural features of the uniporter/symporter/antiporter superfamily. *Protein Sci.* **4**:534-537.
80. **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**:180-185.
81. **Gratten, M., and J. Montgomery.** 1991. The bacteriology of acute pneumonia and meningitis in children in Papua New Guinea: assumptions, facts and technical strategies. *P N G Med. J.* **34**:8185-198.
82. **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.
83. **Green, B. A., E. Baranyi, T. J. Reilly, A. L. Smith, and G. W. Zlotnick.** 2005. Certain site-directed, nonenzymatically active mutants of the *Haemophilus influenzae* P4 lipoprotein are able to elicit bactericidal antibodies. *Infect. Immun.* **73**:4454-4457.
84. **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**:3191-3198.
85. **Green, B. A., M. E. Vazquez, G. W. Zlotnick, G. Quigley-Reape, J. D. Swarts, I. Green, J. L. Cowell, C. D. Bluestone, and W. J. Doyle.** 1993. Evaluation of mixtures of purified *Haemophilus influenzae* outer membrane proteins in protection against challenge with nontypeable *H. influenzae* in the chinchilla otitis media model. *Infect. Immun.* **61**:1950-1957.
86. **Grimberg, J., S. Maguire, and L. Belluscio.** 1989. A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal *E. coli* DNA. *Nucleic Acids Res.* **17**:8893.
87. **Gromkova, R., and H. Koornhof.** 1990. Naturally occurring NAD-independent *Haemophilus parainfluenzae*. *J. Gen. Microbiol.* **136**:1031-1035.
88. **Grose, J. H., U. Bergthorsson, and J. R. Roth.** 2005. Regulation of NAD synthesis by the trifunctional NadR protein of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **187**:2774-2782.
89. **Grose, J. H., U. Bergthorsson, Y. Xu, J. Sternecker, B. Khodaverdian, and J. R. Roth.** 2005. Assimilation of nicotinamide mononucleotide requires periplasmic AphA phosphatase in *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **187**:4521-4530.
90. **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.
91. **Haferkamp, I., S. Schmitz-Esser, N. Linka, C. Urbany, A. Collingro, M. Wagner, M. Horn, and H. E. Neuhaus.** 2004. A candidate NAD<sup>+</sup> transporter in an intracellular bacterial symbiont related to *Chlamydiae*. *Nature.* **432**:622-625.
92. **Hagting, A., J. van der Velde, B. Poolman, and W. N. Konings.** 1997. Membrane topology of the di- and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. *Biochemistry* **36**:6777-6785.
93. **Hansen, E. J., F. R. Gonzales, N. R. Chamberlain, M. V. Norgard, E. E. Miller, L. D. Cope, S. E. Pelzel, B. Gaddy, and A. Clausell.** 1988. Cloning of the gene encoding the major outer membrane protein of *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.* **56**:2709-2716.
94. **Hanson, M. S., S. E. Pelzel, J. Latimer, U. Muller-Eberhard, and E. J. Hansen.** 1992. Identification of a genetic locus of *Haemophilus influenzae* type b necessary for the binding and utilization of heme bound to human hemopexin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **89**:1973-1977.
95. **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.
96. **Häse, C. C., and B. Barquera.** 2001. Role of sodium bioenergetics in *Vibrio cholerae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1505**:169-178.
97. **Hase, C. C., A. C. Le Dain, and B. Martinac.** 1995. Purification and functional reconstitution of the recombinant large mechanosensitive ion channel (MscL) of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**:18329-18334.
98. **Häse, C. C., and J. J. Mekalanos.** 1998. TcpP protein is a positive regulator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:730-734.
99. **Hasegawa, K., K. Yamamoto, N. Chiba, R. Kobayashi, K. Nagai, M. R. Jacobs, P. C. Appelbaum, K. Sunakawa, and K. Ubukata.** 2003. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microb. Drug. Resist.* **9**:39-46.
100. **Hayashi, M., Y. Nakayama, and T. Unemoto.** 1996. Existence of Na<sup>+</sup>-translocating NADH-quinone reductase in *Haemophilus influenzae*. *FEBS Lett.* **381**:174-176.

101. **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**:841-850.
102. **Herbert, M. A., A. Kraiß, A.-K. Hilpert, and J. Reidl.** 2003. Aerobic growth deficient *Haemophilus influenzae* mutants are non-virulent in the rat model: implications on metabolism. *J. Int. Med. Microbiol.* **293**:145-152.
103. **Herbert, M. A., E. Sauer, G. Smethurst, A. Kraiß, A.-K. Hilpert, and J. Reidl.** 2003. Identification and characterization of nicotinamide-ribosyl uptake mutants in *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **71**:5398-5401.
104. **Herriott, R. M., E. M. Meyer, and M. Vogt.** 1979. Defined nongrowth media for stage II development of competence in *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* **101**:517-524.
105. **Herriott, R. M., E. Y. Meyer, M. Vogt, and M. Modan.** 1970. Defined medium for growth of *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* **101**:513-516.
106. **Higgins, C. F.** 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res Microbiol.* **152**:205-210.
107. **Higgins, C. F., I. D. Hiles, G. P. Salmond, D. R. Gill, J. A. Downie, I. J. Evans, I. B. Holland, L. Gray, S. D. Buckel, A. W. Bell, and et al.** 1986. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature.* **323**:448-450.
108. **Higgins, C. F., and K. J. Linton.** 2001. Structural biology. The xyz of ABC transporters. *Science.* **293**:1782-1784.
109. **Hill, D. J., M. A. Toleman, D. J. Evans, S. Villullas, L. Van Alphen, and M. Virji.** 2001. The variable P5 proteins of typeable and non-typeable *Haemophilus influenzae* target human CEACAM1. *Mol. Microbiol.* **39**:850-862.
110. **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**:167-175.
111. **Hillyard, D., M. Rechsteiner, P. Manlapaz-Ramos, J. S. Imperial, L. J. Cruz, and B. M. Olivera.** 1981. The pyridine nucleotide cycle. Studies in *Escherichia coli* and the human cell line D98/AH2. *J. Biol. Chem.* **256**:8491-8497.
112. **Holley, E. A., and J. W. Foster.** 1982. Bacteriophage P22 as a vector for Mu mutagenesis in *Salmonella typhimurium*: isolation of nad-lac and pnc-lac gene fusions. *J. Bacteriol.* **152**:959-962.
113. **Holley, E. A., M. P. Spector, and J. W. Foster.** 1985. Regulation of NAD biosynthesis in *Salmonella typhimurium*: expression of nad-lac gene fusions and identification of a nad regulatory locus. *J. Gen. Microbiol.* **131**:2759-2770.
114. **Holloway de Corsier, M. A.** 1994. Ph. D. thesis. University of Berne, Switzerland. .
115. **Hosie, A. H., and P. S. Poole.** 2001. Bacterial ABC transporters of amino acids. *Res. Microbiol.* **152**:259-270.
116. **Hove-Jensen, B., K. W. Harlow, C. J. King, and R. L. Switzer.** 1986. Phosphoribosylpyrophosphate synthetase of *Escherichia coli*. Properties of the purified enzyme and primary structure of the *prs* gene. *J. Biol. Chem.* **261**:6765-6771.
117. **Jentsch, T. J., M. Pusch, A. Rehfeldt, and K. Steinmeyer.** 1993. The CIC family of voltage-gated chloride channels: structure and function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **707**:285-293.
118. **Jeter, R. M., B. M. Olivera, and J. R. Roth.** 1984. *Salmonella typhimurium* synthesizes cobalamin (vitamin B12) *de novo* under anaerobic growth conditions. *J. Bacteriol.* **159**:206-213.
119. **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**:3134-3141.
120. **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**:265-268.
121. **Jose, J., F. Jahng, and T. F. Meyer.** 1995. Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Mol. Microbiol.* **18**:378-380.
122. **Kaback, H. R., and J. Wu.** 1997. From membrane to molecule to the third amino acid from the left with a membrane transport protein. *Q. Rev. Biophys.* **30**:333-364.
123. **Kaczmarek, F. S., T. D. Gootz, F. Dib-Hajj, W. Shang, S. Hallowell, and M. Cronan.** 2004. Genetic and molecular characterization of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1630-1639.
124. **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**:6016-6025.
125. **Kasarov, L. B., and A. G. Moat.** 1973. Biosynthesis of NAD in *Haemophilus haemoglobinophilus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **320**:372-378.
126. **Kelly, D. F., E. R. Moxon, and A. J. Pollard.** 2004. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *Immunology.* **113**:163-174.

127. **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**:3974-3981.
128. **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**:441161-70.
129. **Kilian, M.** 1976. A taxonomic study of the genus *Haemophilus* with the proposal of a new species. *J. Gen. Microbiol.* **93**:9-62.
130. **Kilian, M., and K. Poulsen.** 1992. Enzymatic, serologic, and genetic polymorphism of *Haemophilus influenzae* IgA1 proteases. *J. Infect. Dis.* **165**:192-193.
131. **King, S. C., C. L. Hansen, and T. H. Wilson.** 1991. The interaction between aspartic acid 237 and lysine 358 in the lactose carrier of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1062**:177-186.
132. **Kinney, D. M., J. W. Foster, and A. G. Moat.** 1979. Pyridine nucleotide cycle of *Salmonella typhimurium*: in vitro demonstration of nicotinamide mononucleotide deamidase and characterization of *pnuA* mutants defective in nicotinamide mononucleotide transport. *J. Bacteriol.* **140**:607-611.
133. **Koster, W.** 2001. ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res. Microbiol.* **152**:291-301.
134. **Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne, and E. L. Sonnhammer.** 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**:567-580.
135. **Kroll, J. S., B. Loynds, L. N. Brophy, and E. R. Moxon.** 1990. The *bex* locus in encapsulated *Haemophilus influenzae*: a chromosomal region involved in capsule polysaccharide export. *Mol. Microbiol.* **4**:1853-1862.
136. **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**:1195-1204.
137. **Kurnasov, O., L. Jablonski, B. Polanuyer, P. Dorresteijn, T. Begley, and A. Osterman.** 2003. Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel kynurenine formamidase. *FEMS Microbiol. Lett.* **227**:219-227.
138. **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**:6906-6917.
139. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
140. **Lehman, I. R.** 1974. DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science.* **186**:790-797.
141. **Linton, K. J., and C. F. Higgins.** 1998. The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol. Microbiol.* **28**:5-13.
142. **Liu, D. F., K. W. Mason, M. Mastri, M. Pazirandeh, D. Cutter, D. L. Fink, J. W. St Geme, 3rd, D. Zhu, and B. A. Green.** 2004. The C-terminal fragment of the internal 110-kilodalton passenger domain of the Hap protein of nontypeable *Haemophilus influenzae* is a potential vaccine candidate. *Infect. Immun.* **72**:6961-6968.
143. **Liu, G., J. Foster, P. Manlapaz-Ramos, and B. M. Olivera.** 1982. Nucleoside salvage pathway for NAD biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **152**:1111-1116.
144. **Loeb, M. R., and D. H. Smith.** 1980. Outer membrane protein composition in disease isolates of *Haemophilus influenzae*: pathogenic and epidemiological implications. *Infect. Immun.* **30**:709-717.
145. **Loosmore, S. M., Y. P. Yang, D. C. Coleman, J. M. Shortreed, D. M. England, and M. H. Klein.** 1997. Outer membrane protein D15 is conserved among *Haemophilus influenzae* species and may represent a universal protective antigen against invasive disease. *Infect. Immun.* **65**:3701-3707.
146. **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**:3703-3712.
147. **Maloney, P. C., and T. H. Wilson.** 1996. Ion-coupled transport and transporters, p. 1130-1148. *In* F. C. Neidhardt (ed.), *E. coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. ASM, Washington D.C.
148. **Manoil, C.** 1991. Analysis of membrane protein topology using alkaline phosphatase and  $\beta$ -galactosidase gene fusion. *Meth. Cell. Biol.* **34**:61-75.
149. **Manoil, C., N. Sinha, and B. Alberts.** 1977. Intracellular DNA-protein complexes from bacteriophage T4-infected cells isolated by a rapid two-step procedure. Characterization and identification of the protein components. *J. Biol. Chem.* **252**:2734-2741.
150. **Martin, C., C. F. Higgins, and R. Callaghan.** 2001. The vinblastine binding site adopts high- and low-affinity conformations during a transport cycle of P-glycoprotein. *Biochemistry.* **40**:15733-15742.



151. **Martin, P. R., R. J. Shea, and M. H. Mulks.** 2001. Identification of a plasmid-encoded gene from *Haemophilus ducreyi* which confers NAD independence. *J. Bacteriol.* **183**:1168-1174.
152. **Mazur, A., J. E. Krol, M. Marczak, and A. Skorupska.** 2003. Membrane topology of PssT, the transmembrane protein component of the type I exopolysaccharide transport system in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain TA1. *J. Bacteriol.* **185**:2503-2511.
153. **McCrea, K. W., W. J. Watson, J. R. Gilsdorf, and C. F. Marrs.** 1997. Identification of two minor subunits in the pilus of *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* **179**:4227-4231.
154. **McLaren, J., D. T. Ngo, and B. M. Olivera.** 1973. Pyridine nucleotide metabolism in *Escherichia coli*. 3. Biosynthesis from alternative precursors *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **248**:5144-5149.
155. **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**:1623-1636.
156. **Merdanovic, M., E. Sauer, and J. Reidl.** 2005. Coupling of NAD<sup>+</sup> biosynthesis and nicotinamide ribosyl transport: characterization of NadR ribonucleotide kinase mutants of *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* **187**:4410-4420.
157. **Morton, D. J., J. M. Musser, and T. L. Stull.** 1993. Expression of the *Haemophilus influenzae* transferrin receptor is repressible by hemin but not elemental iron alone. *Infect. Immun.* **61**:4033-4037.
158. **Morton, D. J., and P. Williams.** 1990. Siderophore-independent acquisition of transferrin-bound iron by *Haemophilus influenzae* type b. *J. Gen. Microbiol.* **136**:927-933.
159. **Mourez, M., M. Hofnung, and E. Dassa.** 1997. Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. *Embo J.* **16**:3066-3077.
160. **Moxon, E. R., Deich, R. A. & Connelly, C.** 1984. *J. Clin. Invest.* **73**:298-306.
161. **Moxon, R. E.** 1995. *Haemophilus influenzae*. In: Principles and Practice of Infectious Diseases. ed. G.L. Mandel, J. E. Bennet, R. Dolin. Fourth Edition. :2039-2045.
162. **Munson, R. S., Jr., S. Grass, and R. West.** 1993. Molecular cloning and sequence of the gene for outer membrane protein P5 of *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **61**:4017-4020.
163. **Munson, R. S., Jr., J. L. Shenep, S. J. Barenkamp, and D. M. Granoff.** 1983. Purification and comparison of outer membrane protein P2 from *Haemophilus influenzae* type b isolates. *J. Clin. Invest.* **72**:677-684.
164. **Musser, J. M., S. J. Barenkamp, D. M. Granoff, and R. K. Selander.** 1986. Genetic relationships of serologically nontypable and serotype b strains of *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **52**:183-191.
165. **Musser, J. M., D. M. Granoff, P. E. Pattison, and R. K. Selander.** 1985. A population genetic framework for the study of invasive diseases caused by serotype b strains of *Haemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **82**:5078-5082.
166. **Musser, J. M., J. S. Kroll, E. R. Moxon, and R. K. Selander.** 1988. Clonal population structure of encapsulated *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **56**:1837-1845.
167. **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**:7758-7762.
168. **Nasu, S., and R. K. Gholson.** 1981. Replacement of the B protein requirement of the *E. coli* quinolinate synthetase system by chemically-generated iminoaspartate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**:533-539.
169. **Nieweg, A., and E. Bremer.** 1997. The nucleoside-specific Tsx channel from the outer membrane of *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes*: functional characterization and DNA sequence analysis of the tsx genes. *Microbiology.* **143**:603-615.
170. **Nikaido, H.** 1999. Microdermatology: cell surface in the interaction of microbes with the external world. *J. Bacteriol.* **181**:4-8.
171. **Noel, G. J., D. C. Love, and D. M. Mosser.** 1994. High-molecular-weight proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* mediate bacterial adhesion to cellular proteoglycans. *Infect. Immun.* **62**:4028-4033.
172. **North, B. J., and E. Verdin.** 2004. Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biol.* **5**:224. Epub 2004 Apr 28.
173. **Olivera, B. M., and I. R. Lehman.** 1967. Diphosphopyridine nucleotide: a cofactor for the polynucleotide-joining enzyme from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **57**:1700-1704.
174. **Olivera, B. M., and R. Lundquist.** 1971. DNA synthesis in *Escherichia coli* in the presence of cyanide. *J. Mol. Biol.* **57**:263-277.
175. **O'Reilly, T., and D. F. Niven.** 1986. Defining the metabolic and growth responses of porcine *Haemophilus* to exogenous pyridine nucleotides and precursors. *J. Gen. Microbiol.* **132**:807-818.
176. **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**:2173-2180.
177. **Peltola, H.** 1997. *Haemophilus influenzae* type b disease and vaccination in Latin America and the Caribbean. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **16**:780-787.

178. **Peltola, H.** 2000. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**:302-317.
179. **Penfound, T., and J. W. Foster.** 1996. Biosynthesis and recycling of NAD. In Vol. 1 **F. C. Neidhard, R. Curtis III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed), Escherichia coli and Salmonella cellular and molecular biology 2nd ed.** American Society for Mikrobiology Washington, D. C.:721-730.
180. **Penfound, T., and J. W. Foster.** 1999. NAD-dependent DNA-binding activity of the bifunctional NadR regulator of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **181**:648-655.
181. **Pichichero, M. E., M. Loeb, Anderson, and D. H. Smith.** 1982. Do pili play a role in pathogenicity of *Haemophilus influenzae* type b? *Lancet.* **2**:960-962.
182. **Pittman, M.** 1931. Variation and type specificity in the bacterial species *Hemophilus influenzae*. *J. Exptl. Med.* **53**:471-492.
183. **Plaut, A. G., J. V. Gilbert, and R. Wistar, Jr.** 1977. Loss of antibody activity in human immunoglobulin A exposed extracellular immunoglobulin A proteases of *Neisseria gonorrhoeae* and *Streptococcus sanguis*. *Infect. Immun.* **17**:130-135.
184. **Pohl, S., H. U. Bertschinger, W. Frederiksen, and W. Mannheim.** 1983. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. *Int. J. Syst. Bacteriol.*:11: 510-514.
185. **Porras, O., D. A. Caugant, B. Gray, T. Lagergard, B. R. Levin, and C. Svanborg-Eden.** 1986. Difference in structure between type b and nontypable *Haemophilus influenzae* populations. *Infect Immun.* **53**:79-89.
186. **Postma, P. W., J. W. Lengeler, and G. R. Jacobson.** 1993. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**:543-594.
187. **Pourcher, T., M. L. Zani, and G. Leblanc.** 1993. Mutagenesis of acidic residues in putative membrane-spanning segments of the melibiose permease of *Escherichia coli*. I. Effect on Na(+)-dependent transport and binding properties. *J. Biol. Chem.* **268**:3209-3215.
188. **Prasadarao, N. V., E. Lysenko, C. A. Wass, K. S. Kim, and J. N. Weiser.** 1999. Opacity-associated protein A contributes to the binding of *Haemophilus influenzae* to chag epithelial cells. *Infect. Immun.* **67**:4153-4160.
189. **Preiss, J. a. P. H.** 1958. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.* **I. Identification of intermediates.**:233: 488-492.
190. **Raffaelli, N., T. Lorenzi, P. L. Mariani, M. Emanuelli, A. Amici, S. Ruggieri, and G. Magni.** 1999. The *Escherichia coli* NadR regulator is endowed with nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase activity. *J. Bacteriol.* **181**:5509-5511.
191. **Rao, V. K., G. P. Krasan, D. R. Hendrixson, S. Dawid, and J. W. St Geme, 3rd.** 1999. Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to non-typable *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**:99-129.
192. **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**:549-558.
193. **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**:1477-1479.
194. **Reidl, J., and J. J. Mekalanos.** 1996. Lipoprotein e(P4) is essential for hemin uptake by *Haemophilus influenzae*. *J. Exp. Med.* **183**:621-629.
195. **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**:1573-1581.
196. **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**:6797-6805.
197. **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**:401-409.
198. **Riedmann, E. M., J. M. Kyd, A. M. Smith, S. Gomez-Gallego, K. Jalava, A. W. Cripps, and W. Lubitz.** 2003. Construction of recombinant S-layer proteins (rSbsA) and their expression in bacterial ghosts--a delivery system for the nontypeable *Haemophilus influenzae* antigen Omp26. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **37**:185-192.
199. **Robillard, G. T., and J. Broos.** 1999. Structure/function studies on the bacterial carbohydrate transporters, enzymes II, of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *Biochim. Biophys. Acta.* **1422**:73-104.

200. **Robillard, G. T., and J. S. Lolkema.** 1988. Enzymes II of the phosphoenolpyruvate-dependent sugar transport systems: a review of their structure and mechanism of sugar transport. *Biochim. Biophys. Acta.* **947**:493-519.
201. **Roche, R. J., and E. R. Moxon.** 1995. Phenotypic variation of carbohydrate surface antigens and the pathogenesis of *Haemophilus influenzae* infections. *Trends. Microbiol.* **3**:304-309.
202. **Rohrer, H., W. Zillig, and R. Mailhammer.** 1975. ADP-ribosylation of DNA-dependent RNA polymerase of *Escherichia coli* by an NAD<sup>+</sup>: protein ADP-ribosyltransferase from bacteriophage T4. *Eur. J. Biochem.* **60**:227-238.
203. **Rose, R. E.** 1988. The nucleotide sequence of pACYC177. *Nucleic Acids Res.* **16**:356.
204. **Saier, M. H., Jr.** 2000. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:354-411.
205. **Saier, M. H., Jr.** 1999. A functional-phylogenetic system for the classification of transport proteins. *J. Cell. Biochem. Suppl.*:84-94.
206. **Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239**:487-491.
207. **Saito, M., A. Umeda, and S. Yoshida.** 1999. Subtyping of *Haemophilus influenzae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **37**:2142-2147.
208. **Samal, B., Y. Sun, G. Stearns, C. Xie, S. Suggs, and I. McNiece.** 1994. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol. Cell. Biol.* **14**:1431-1437.
209. **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.
210. **Sanders, J. D., L. D. Cope, and E. J. Hansen.** 1994. Identification of a locus involved in the utilization of iron by *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **62**:4515-4525.
211. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* **24**:104-108.
212. **Sanno, Y., T. H. Wilson, and E. C. Lin.** 1968. Control of permeation to glycerol in cells of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **32**:344-349.
213. **Satola, S. W., P. L. Schirmer, and M. M. Farley.** 2003. Complete sequence of the *cap* locus of *Haemophilus influenzae* serotype b and nonencapsulated b capsule-negative variants. *Infect. Immun.* **71**:3639-3644.
214. **Saxton, R. E., V. Rocha, R. J. Rosser, A. J. Andreoli, M. Shimoyama, A. Kosaka, J. L. Chandler, and R. K. Gholson.** 1968. A comparative study of the regulation of nicotinamide-adenine dinucleotide biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **156**:77-84.
215. **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**:219-225.
216. **Schneider, E.** 2001. ABC transporters catalyzing carbohydrate uptake. *Res. Microbiol.* **152**:303-310.
217. **Silhavy, T. J., M. L. Berman, and L. W. Enquist.** 1984. *Experiments with gene fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
218. **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 ribosylnicotinamide kinase activities. *J. Biol. Chem.* **277**:33291-33299.
219. **Sirakova, T., P. E. Kolattukudy, D. Murwin, J. Billy, E. Leake, D. Lim, T. DeMaria, and L. Bakaletz.** 1994. Role of fimbriae expressed by nontypeable *Haemophilus influenzae* in pathogenesis of and protection against otitis media and relatedness of the fimbrin subunit to outer membrane protein A. *Infect. Immun.* **62**:2002-2020.
220. **Skorko, R., and J. Kur.** 1981. ADP-ribosylation of proteins in non-infected *Escherichia coli* cells. *Eur. J. Biochem.* **116**:317-322.
221. **Slack, M. P., H. J. Azzopardi, R. M. Hargreaves, and M. E. Ramsay.** 1998. Enhanced surveillance of invasive *Haemophilus influenzae* disease in England, 1990 to 1996: impact of conjugate vaccines. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **17**:204-207.
222. **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.
223. **Smith, H. O., J. F. Tomb, B. A. Dougherty, R. D. Fleischmann, and J. G. Venter.** 1995. Frequency and distribution of DNA uptake signal sequences in the *Haemophilus influenzae* Rd genome. *Science* **269**:538-540.
224. **Snyder, W. B., and T. J. Silhavy.** 1995. Beta-galactosidase is inactivated by intermolecular disulfide bonds and is toxic when secreted to the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**:953-963.

225. **Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **51**:503-517.
226. **Spector, M. P., J. M. Hill, E. A. Holley, and J. W. Foster.** 1985. Genetic characterization of pyridine nucleotide uptake mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* **131**:1313-1322.
227. **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**:385-392.
228. **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**:3881-3889.
229. **St Geme, J. W., 3rd.** 2000. The pathogenesis of nontypable *Haemophilus influenzae* otitis media. *Vaccine.* **19**:41-50.
230. **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**:6281-6287.
231. **St Geme, J. W., 3rd, M. L. de la Morena, and S. Falkow.** 1994. A *Haemophilus influenzae* IgA protease-like protein promotes intimate interaction with human epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **14**:217-233.
232. **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**:2875-2879.
233. **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**:11913-1918.
234. **Stool, S. E., and M. J. Field.** 1989. The impact of otitis media. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **8**:11-14.
235. **Sugiyama, Y., N. Polulyakh, and T. Shimizu.** 2003. Identification of transmembrane protein functions by binary topology patterns. *Protein Eng.* **16**:479-488.
236. **Sun, Y. H., S. Bakshi, R. Chalmers, and C. M. Tang.** 2000. Functional genomics of *Neisseria meningitidis* pathogenesis. *Nat. Med.* **6**:1269-1273.
237. **Sweet, G., C. Gandor, R. Voegele, 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**:424-430.
238. **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.
239. **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**:525-536.
240. **Tatusov, R. L., A. R. Mushegian, P. Bork, N. P. Brown, S. Hayes, M. Borodovsky, K. E. Rudd, and E. V. Koonin.** 1996. Metabolism and evolution of *Haemophilus influenzae* deduced from a whole-genome comparison with *Escherichia coli*. *Curr. Biol.* **6**:279-291.
241. **Taylor, L. A., and R. E. Rose.** 1988. A correction in the nucleotide sequence of the Tn903 kanamycin resistance determinant in pUC4K. *Nucleic Acids Res.* **16**:7762.
242. **Tokuda, H.** 1983. Isolation of *Vibrio alginolyticus* mutants defective in the respiration-coupled Na<sup>+</sup> pump. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **114**:113-118.
243. **Towbin, H., T. Staehlin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:4350-4354.
244. **Trottier, S., K. Stenberg, and C. Svanborg-Eden.** 1989. Turnover of nontypable *Haemophilus influenzae* in the nasopharynx of healthy children. *J. Clin. Microbiol.* **27**:2175-2179.
245. **Tsukihara, T., H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, and S. Yoshikawa.** 1996. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science.* **272**:1136-1144.
246. **Turk, D. C.** 1984. The pathogenicity of *Haemophilus influenzae*. *J. Med. Microbiol.* **18**:1-16.
247. **Ulmschneider M. B., S. M. S.** 2001. *Biochim. Biophys. Acta* **1512**(1).
248. **Unemoto, T., and M. Hayashi.** 1993. Na(+)-translocating NADH-quinone reductase of marine and halophilic bacteria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**:385-391.
249. **Unemoto, T., and M. Hayashi.** 1989. Sodium-transport NADH-quinone reductase of a marine *Vibrio alginolyticus*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **21**:649-662.
250. **Urwin, G., J. A. Krohn, K. Deaver-Robinson, J. D. Wenger, and M. M. Farley.** 1996. Invasive disease due to *Haemophilus influenzae* serotype f: clinical and epidemiologic characteristics in the *H. influenzae* serotype b vaccine era. The *Haemophilus influenzae* Study Group. *Clin. Infect. Dis.* **22**:1069-1076.

251. **Vachon, V., D. J. Lyew, and J. W. Coulton.** 1985. Transmembrane permeability channels across the outer membrane of *Haemophilus influenzae* type b. *J. Bacteriol.* **162**:918-924.
252. **Van der Ende, A., L. Spanjaard, and J. Dankert.** 2003. Bacterial meningitis in the Netherlands: 31th annual report of The Netherlands Reference Laboratory for Bacterial Meningitis. The Netherlands Reference Laboratory for Bacterial Meningitis, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands.:1-50.
253. **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**:1087-1094.
254. **von Heijne, G.** 1992. Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* **225**:487-494.
255. **Waggoner-Fountain, L. A., J. O. Hendley, E. J. Cody, V. A. Perriello, and L. G. Donowitz.** 1995. The emergence of *Haemophilus influenzae* types e and f as significant pathogens. *Clin. Infect. Dis.* **21**:1322-1324.
256. **Wang, Y. F., R. Dutzler, P. J. Rizkallah, J. P. Rosenbusch, and T. Schirmer.** 1997. Channel specificity: structural basis for sugar discrimination and differential flux rates in maltoporin. *J. Mol. Biol.* **272**:56-63.
257. **Ward, A., Sanderson, N. M., O'Reilly, J., Rutherford, N. G., Poolman, B. and Henderson, P. J. F.** 2000. in *Membrane Transport - A Practical Approach* (Baldwin, S. A., ed.). Blackwell, Oxford: pp. 141-166.
258. **Weiser, J. N.** 1993. Relationship between colony morphology and the life cycle of *Haemophilus influenzae*: the contribution of lipopolysaccharide phase variation to pathogenesis. *J. Infect. Dis.* **168**:672-680.
259. **White, D. C., and S. Granick.** 1963. Hemin biosynthesis in *Haemophilus*. *J. Bacteriol.* **85**:842-850.
260. **Wicks, F. D., S. Sakakibara, and R. K. Gholson.** 1978. Evidence for an intermediate in quinolinate biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **136**:136-141.
261. **Wilson, D. M., and T. H. Wilson.** 1994. Transport properties of Asp-51--&Glu and Asp-120--&Glu mutants of the melibiose carrier of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1190**:225-230.
262. **Wilson, R., D. Roberts, and P. Cole.** 1985. Effect of bacterial products on human ciliary function in vitro. *Thorax.* **40**:125-131.
263. **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.
264. **Windsor, H. M., R. C. Gromkova, and H. J. Koornhof.** 1993. Growth characteristics of V factor-independent transformants of *Haemophilus influenzae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:799-804.
265. **Windsor, H. M., R. C. Gromkova, and H. J. Koornhof.** 1991. Plasmid-mediated NAD independence in *Haemophilus parainfluenzae*. *J. Gen. Microbiol.* **137**:2415-2421.
266. **Winslow, C. E., J. Broadhurst, R. E. Buchanan, C. Krumwiede, L. A. Rogers, and G. H. Smith.** 1920. The Families and Genera of the Bacteria: Final Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. *J. Bacteriol.* **5**:191-229.
267. **Wu, T., J. Chen, T. F. Murphy, B. A. Green, and X. X. Gu.** 2005. Investigation of non-typeable *Haemophilus influenzae* outer membrane protein P6 as a new carrier for lipooligosaccharide conjugate vaccines. *Vaccine.* **23**:5177-5185.
268. **Yalowitz, J. A., and H. N. Jayaram.** 2002. Modulation of cytotoxicity of benzamide riboside by expression of NMN adenylyltransferase. *Curr. Med. Chem.* **9**:748-758.
269. **Yalowitz, J. A., and H. N. Jayaram.** 2000. Molecular targets of guanine nucleotides in differentiation, proliferation and apoptosis. *Anticancer Res.* **20**:2329-2338.
270. **Yanofsky, C.** 1954. The absence of a tryptophan-niacin relationship in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **68**:577-584.
271. **Yoon, H., and B. M. Anderson.** 1989. Site-directed inhibition of *Haemophilus influenzae* malate dehydrogenase. *J. Gen. Microbiol.* **135**:245-250.
272. **Yoon, H., C. D. Anderson, and B. M. Anderson.** 1989. Kinetic studies of *Haemophilus influenzae* 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Acta.* **994**:75-80.
273. **Young, J., and I. B. Holland.** 1999. ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on. *Biochim. Biophys. Acta.* **1461**:177-200.
274. **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**:2525-2534.
275. **Zamze, S. E., and E. R. Moxon.** 1987. Composition of the lipopolysaccharide from different capsular serotype strains of *Haemophilus influenzae*. *J. Gen. Microbiol.* **133**:1443-1451.

- 
276. **Zani, M. L., T. Pourcher, and G. Leblanc.** 1993. Mutagenesis of acidic residues in putative membrane-spanning segments of the melibiose permease of *Escherichia coli*. II. Effect on cationic selectivity and coupling properties. *J. Biol. Chem.* **268**:3216-3221.
277. **Zani, M. L., T. Pourcher, and G. Leblanc.** 1994. Mutation of polar and charged residues in the hydrophobic NH<sub>2</sub>-terminal domains of the melibiose permease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**:24883-24889.
278. **Zhou, W., Y. V. Bertsova, B. Feng, P. Tsatsos, M. L. Verkhovskaya, R. B. Gennis, A. V. Bogachev, and B. Barquera.** 1999. Sequencing and preliminary characterization of the Na<sup>+</sup>-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase from *Vibrio harveyi*. *Biochemistry.* **38**:16246-16252.
279. **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**:1311-1320.
280. **Zhu, N., B. M. Olivera, and J. R. Roth.** 1989. Genetic characterization of the *pnuC* gene, which encodes a component of the nicotinamide mononucleotide transport system in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **171**:4402-4409.

## VIII. Anhang

### 1. Abkürzungsverzeichnis

AAD/P	3-Aminopyridin-Adenin-Dinukleotid/Phosphat
Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	<u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>c</u> assette Transporter
ADP	Adenosindiphosphat
ADPR	Adenosindiphosphoribose
AM	Außenmembran
AMN	3-Aminopyridin-Mononukleotid
AMP	Adenosinmonophosphat
AmPR	3-Aminopyridin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	“brain-heart-infusion”
Bp	Basenpaare
BPD	<u>b</u> inding <u>p</u> rotein- <u>d</u> ependent
BSA	„bovine serum albumine“ (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cADPR	zyklische Adenosindiphosphoribose
CFU	„colony forming units“
CM	Cytoplasmamembran
Cm <sup>R</sup>	Chloramphenicol Resistenz
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DNP	2,4-Dinitrophenol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy Nucleosid- (Adenosin-, Cytosin-, Thymidin-, Guanosin-) triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
FAD	Flavinadenin-Dinukleotid
Faktor-V	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid und Derivate

---

Fe <sup>2+</sup>	Eisen
FMN	Flavinadenin-Mononukleotid
Fur	„ferric uptake regulator“
g	Gramm
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
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
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin Resistenz
kb	Kilobasenpaare
KCN	Kaliumcyanid
kDa	Kilo-Dalton
Kdo	2-Keto-3-Deoxyoctulosonic-Säure
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NA	Nikotinsäure
Na <sup>+</sup> -NQR	NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase
NAAD	Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte/reduzierte Form)
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NAm	Nikotinamid



---

NAMN	Nikotinsäure-Mononukleotid
NAm-PRTase	Nikotinamid-Phosphoribosyltransferase
NAPRTase	Nikotinsäure-Phosphoribosyltransferase
NBD	Nukleotid-Bindedomänen
nm	Nanometer
NMN	Nikotinamid-Mononukleotid
NMNAT	Nikotinamid-Mononukleotid-Adenylyltransferase
NR	Nikotinamidribosyl
NTHi	nicht-typisierbare <i>H. influenzae</i>
Odx	Optische Dichte bei der Wellenlänge "x" (nm)
OMP	Außenmembran Porin
P	Phosphat
PAA	Polyacrylamid
PAF	platelet-activating factor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion/ „polymerase-chain-reaction“
PMF	„proton motive force“
PNC`s	Pyridin-Nukleotid-Zyklen / „pyridine nucleotide cycles“
PRP	Polyribosyl-Ribitol-Phosphat
PRPP	Phosphoribosylpyrophosphat
PTS	Phosphotransferase-System
QA	Quinolinat
QAPRTase	Quinolinat-Phosphoribosyltransferase
RNK	Ribosylnukleotid-Kinase
rpm	„rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Sir	silent information regulator
SMF	„sodium motive force“
Str <sup>R</sup>	Streptomycin resistant/ sensitiv
sv.	Serovar
TC-System	„transporter classification system“

---

Tet <sup>R</sup>	Tetracyclin Resistenz
TM	Transmembran
TMD	Transmembrandomänen
TMS	Transmembransegmente
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
ÜN	über Nacht
V	Volt
vgl.	vergleiche
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-D-Galaktopyranosid
X-Phos	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat-Dinatriumsalz
z. B.	zum Beispiel
Δ	Deletion
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

## 2. Abbildungen

	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90						
1)	-----	--MDF	FSTH	NIL	IHI	PIGAGGYDL	SWIEAV	GTIAGLLC	IWLASLE	KISNYFFGL	VNVTLF	AIIFFQIQLY	ASR-L	72				
2)	-----	--MDF	FSVQ	NIL	VHI	PIGAGGYDL	SWIEAV	GTIAGLLC	IIGLASLE	KISNYFFGL	INVTLF	GIIFQIQLY	ASL-L	72				
3)	-----	--MDF	FSVQ	NIL	VHI	PIGAGGYDL	SWIEAV	GTIAGLLC	IIGLASLE	KISNYFFGL	INVTLF	GIIFQIQLY	ASL-L	72				
4)	-----	--MDF	LSTG	NIL	VHI	PLGAGGYDL	SWIEAI	GTLFGLLC	IWFASKE	KIINYLEGL	INVTLF	AVIFFQIQLY	ASL-L	72				
5)	-----	M	DLMTFF	DINHTL	VNI	PIGGG-YAM	SWIEAV	GTLFGLLC	IWFASQE	KTINYLEGL	INVTLF	AVIFYQIQLY	GIL-L	74				
6)	-----							AAAI	GVIAVW	LTVKQ		NPWCWPI	GLVMVVIY	IWIFFDVKLY	SDM-L	51		
7)	-----	MNDF	KGW	ETRSY	LFLALM	VGQ	LVAFAIN	PN	NWITLV	GGLAGI	ICVN	LIAQ	KVSNYIE	GLISAVII	GYFLVTRV	YAEV-L	81	
8)	MTLAARL	KQEFV	SGW	KPFEV	VVWLAL	FI	IAQ	IWAYV	QTPD	SWLAMI	SGISGIL	CVV	LVSKG	KISNYFFGL	IFAYTY	FYVWAGS	NFLGEMNT	90
	91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180						
1)	LQLEFFFAANIY	GWYA	WSRQTKDN	QAE	LKIR	WLPLPKAMAW	LAI	CV	IAIGLMTRYI	DPVFA	VLTRVA	VAIMQMLGL	QVTMPVLQ	PDAPFFW	162			
2)	LQLEFFFAANIY	GWYA	WSRQTSQNEA	E	LKIR	WLPLPKALS	WLAVCV	VSIGLMTVF	FINPVFA	FLTRVA	VIMQALGL	QVVMPELQ	PDAPFFW	162				
3)	LQLEFFFAANIY	GWYA	WSRQTSQNEA	E	LKIR	WLPLPKALS	WLAVCV	VSIGLMTVF	FINPVFA	FLTRVA	VIMQALGL	QVVMPELQ	PDAPFFW	162				
4)	LQLEFFGANIY	GWYA	WSKQTPDN	QAE	LKIR	WLSL	PKALAWA	AVCI	AGIVLMTL	LHIDTVFA	WLTRVA	VVMQSLGA	NVQMP	PELQPDAPFFW	162			
5)	LQLEFFCANIY	GWYA	WTRPNAQ	G-DTL	VVR	WMSRQK	LLLTACISV	ISII	LMTIYID	PVVF	SLANIS	VDVNL	LFGA	QLDRPVLS	PDAPFFW	163		
6)	LQVIYAGLQVY	GWLQ	WTRHG	NGL	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	116		
7)	LQSFYIIMDIT	GLYA	WLRASE	DG	SGQ	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	147		
8)	VLYVYLP	SQFI	GYFM	WKAN	MQNS	DG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	157		
	181	195	196	210	211	225	226	240	241	255	256	270						
1)	DSCMMVLS	IVAMILM	TRKYVEN	LLWV	IIN	VISVVFALQ	G----	-VYAMSLEY	LILTFI	AVNGSRL	WINSRAGA	RIARAFPL	MVMNMPG	247				
2)	DSCMMVLS	IVAMILM	TRKYVEN	LLWV	IIN	VISVVFALQ	G----	-VYAMSLEY	IILTFI	ALNGSRM	WINSARER	GSRALSH	-----	239				
3)	DSCMMVLS	IVAMILM	TRKYVEN	LLWV	IIN	VISVVFALQ	G----	-VYAMSLEY	IILTFI	ALNGSRM	WINSARER	GSRALSH	-----	239				
4)	DSTMMVLS	IAAMILM	TRKYVEN	LIVV	VID	VISVAIFAY	Q----	-VYAMALEY	AFLTLI	ALNGSWL	WIKSAARN	HSRPLSTQ	-----	241				
5)	DATMTVLS	SVVAQILM	TRKYVEN	LIZV	VIN	IISVGIYAA	Q----	-VYALSIEY	AILLFI	AANGTRA	MWQTARHN	AEKNTNEATA	-----	244				
6)	DAALTGF	SLVAQVMM	AQKR	VQC	WPLWILLD	VIFVGLFVY	KE----	-LYLTAALY	ALFTLL	AVQGWRE	WRNDLVLA	R-----	-----	187				
7)	DAITFSV	SATGMILM	IKR	QSQ	VFVLLGN	IFSILLW	FRAGTHAG	GDYAI	FVMY	CMYTFN	SIFGMFN	WLKIKNKM	EKNR	-----	226			
8)	DGLTTII	IVAAQILM	ILR	REQ	LLWIGLN	ILSIFL	WAETP	-----	-----	-AIYLMY	SAYLLN	SLYGYYN	TKLVKRT	-----	225			
	271	285	286	300	301	315	316	330	331	345								
1)	RCLIQMT	VRAVTHLI	LHLNRTA	QY	GIRASE	ILDTFQ	QRIMV	VWRN	DL	SVQRH	DRFFADHP	DMHMVY	VADFGDFPT	322				
2)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	239				
3)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	239				
4)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	241				
5)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	244				
6)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	187				
7)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	226				
8)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	225				

**Abb. 43.** Sequenzhomologien von PnuC aus 1) *S. enterica* sv. Typhimurium, 2) *E. coli*, 3) *Shigella flexneri*, 4) *Yersinia pestis*, 5) *Vibrio cholerae*, 6) *Pseudomonas syringae*, 7) *Enterococcus faecalis* und 8) *H. influenzae*

### **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, im Juni 2006

Elizabeta Sauer

#### 4. Publikationsliste

**Reidl, J., Schlör, S., Kraiß, A., Schmidt-Brauns, J., Kemmer, G. and Soleva\*, E.** 2000. NADP<sup>+</sup> and NAD<sup>+</sup> utilization in *Haemophilus influenzae*. Mol. Microbiol. **35**(6): 1573-1581.

\* Mädchenname

**Herbert\*, M.A., Sauer\*, E., Smethurst, G., Kraiß, A., Hilpert, A.-K., and Reidl, J.** 2003. Nicotinamide Ribosyl Uptake Mutants in *Haemophilus influenzae*. Infect. Immun. **71**(9): 5398-5401.

\* Diese Autoren sind gleichberechtigt.

**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<sup>+</sup> biosynthesis and nicotinamide ribosyl transport: Characterization of NadR ribonucleotide kinase mutants of *Haemophilus influenzae*. J. Bacteriol. **187**(13): 4410-4420.

## 5. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Elizabeth Sauer, geb. Šoleva  
Geburtsdatum 07. Oktober 1973  
Geburtsort Strumica, Mazedonien  
Familienstand verheiratet mit Stefan Sauer,  
ein Kind (Lara Katarina)

### Wissenschaftliche Anstellung

seit März 2002 Dissertation zum Thema: „NAD<sup>+</sup>-Abhängigkeit bei *Pasteurellaceae*: Charakterisierung der Nikotinamid-Ribosid-Aufnahme bei *Haemophilus influenzae*“ am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg bei Herrn Prof. J. Reidl

### Studium

Okt. 1995 - Feb. 2002 Studium der Biologie an der Universität Würzburg,  
Studienschwerpunkte: Mikrobiologie, Humangenetik und Tierphysiologie. Diplomarbeit (Mai 2001 – Feb. 2002) zum Thema: „NAD<sup>+</sup>-Aufnahme und NAD<sup>+</sup>-Stoffwechsel bei *Haemophilus influenzae*“ am Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg bei Herrn Prof. J. Hacker in der Arbeitsgruppe von PD J. Reidl

### Schulbildung

Sept. 80 – Juni 94 Grundschule, München bis 1981  
Grundschule s. Kukliš, Mazedonien bis 1982  
Grundschule, München bis 1984  
Luisengymnasium, München bis 1994  
Abschluss: Abitur