
BAYERISCHE JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE

LEHRSTUHL FÜR MIKROBIOLOGIE

**Charakterisierung des Hfq-Regulons
in *Bordetella pertussis* und *Bordetella bronchiseptica***



DISSERTATION

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

vorgelegt von

Kristina Keidel

aus Bamberg

Würzburg, 2011

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter : Prof. Dr. Roy Gross

2. Gutachter: Prof. Dr. Knut Ohlsen

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Kristina Keidel

Würzburg, 2011

YOU'VE GOT THREE CHOICES IN LIFE: BE GOOD, GET GOOD OR GIVE UP.

(GREGORY HOUSE)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen Menschen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Roy Gross dafür bedanken, dass er mir dieses spannende Thema überlassen hat und mir bei der Bearbeitung den nötigen Freiraum zugestanden hat, wobei er jederzeit mit guten Ratschlägen zur Seite stand.

Bei Herrn Prof. Dr. Knut Ohlsen bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens sowie bei Herrn Prof. Dr. Werner Goebel und Herrn Prof. Dr. Thomas Rudel für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Dem SFB 479 danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Mikrobiologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die fachliche Unterstützung im Laufe meiner Doktorarbeit bedanken. Ich danke den „alten“ Kollegen Frederike Fritsch, Norman Mauder, Sonja Mertins, Steffi Müller, Karin Schmitt, Regina Stoll und Sascha Stoll. Ein besonderer Dank gilt unserer technischen Assistentin Susanne Bauer, die mir viele Arbeiten ungemein erleichtert hat, und meinen Laborkollegen Heike Czotscher, Melanie Lechner, Christina Loewel und Tilo Weber, die den Arbeitsalltag abwechslungsreich gestaltet haben. Nicht zu vergessen sind unsere lieben Spülfrauen Frau Stapf und Frau Steinbrecher.

Im Laufe meiner Arbeit habe ich am Lehrstuhl viele Personen kennengelernt, die mir gute Freunde geworden sind und denen ich ungemein für ihre Unterstützung danke: Angela Baljuls, Birgit Bergmann, Linda Böhme, Jo-Ana Herweg, Maria Kupper, Franziska Lessing, Carolin Ratzka und Claudia Sibilski. Nochmals vielen Dank für eure Hilfe bei praktischen Problemen und für die zahlreichen aufmunternden Gespräche.

Bei meinen Freunden bedanke ich mich dafür, dass sie da sind und mein Privatleben ungemein bereichert haben. Lisa Meichelbeck danke ich für ihre seit der Schulzeit andauernde Freundschaft. Beate Eyrich danke ich für ihre liebe Art und die zurückliegenden Weihnachtsmarkthoppings. Eva Stürmer danke ich für ihren Witz und ihr umfangreiches Bücherwissen. Manuela Geier danke ich für ihre sonnige Art und ihr offenes Ohr bei persönlichen Problemen - ich werde unsere Fahrtgemeinschaft zur Arbeit und unsere Späße im Laboralltag vermissen. Meiner liebsten Reisegefährtin Sonja Schönfelder danke ich dafür, dass sie mich so gut versteht und dass ihre Freundschaft unerschütterlich ist.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner gesamten Familie bedanken. Insbesondere meine Eltern haben mir über die Jahre durch ihre Liebe und Unterstützung wertvollen Rückhalt gegeben - ohne sie hätte ich nur halb so viel erreicht.

Inhaltsverzeichnis

I	Zusammenfassung	1
I	Summary	3
II	Einleitung	5
1.	Das Genus <i>Bordetella</i>	5
1.1.	Phylogenie und Physiologie	5
1.2.	Das <i>Bordetella bronchiseptica</i> -Cluster	6
1.2.1.	Klinische Relevanz des <i>Bordetella bronchiseptica</i> -Clusters	7
1.2.2.	Der Keuchhustenerreger <i>Bordetella pertussis</i>	8
1.2.3.	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	9
1.2.4.	<i>Bordetella parapertussis</i>	9
1.3.	Die Virulenzfaktoren des <i>B. bronchiseptica</i> -Clusters	10
1.3.1.	Adhäsine	10
1.3.2.	Toxine	12
1.3.3.	Weitere Faktoren	14
1.4.	Das BvgAS-System	16
1.4.1.	Phasenvariation und phänotypische Modulation	16
1.4.2.	Struktur des BvgAS-Systems und Signaltransduktion	17
1.4.3.	Transkriptionelle Genregulation durch das BvgAS-System	19
1.5.	Biofilmbildung bei <i>Bordetella</i> -Arten	22
1.5.1.	Allgemeines zum Biofilm	22
1.5.2.	Biofilm bei <i>Bordetella</i> spp.	24
2.	Genregulation durch kleine nicht-kodierende RNAs	25
2.1.	Wirkungsmechanismen von sRNAs	26
2.2.	Genregulation durch <i>cis</i> -kodierte sRNAs	27
2.3.	Genregulation durch <i>trans</i> -kodierte sRNAs	28
3.	Das Hfq-Protein	29
3.1.	Regulation und zelluläre Konzentration von Hfq	29
3.2.	Struktur und RNA-Bindung	30
3.3.	Regulation durch das Hfq-Protein	32
3.4.	Beteiligung des Hfq-Proteins an Virulenz	33
3.5.	Phylogenie des Hfq-Proteins	34
4.	Zielsetzung der Arbeit	35
III	Material	37
1.	Geräte	37

2. Verbrauchsmaterialien	38
2.1. Chemikalien	38
2.2. Enzyme	38
2.3. Molekularbiologische Kits	39
2.4. Sonstige Materialien	39
3. Wachstumsmedien und Zusätze	39
3.1. Lysogeny-Broth (LB)-Medium	39
3.2. 1x Stainer-Scholte (SS)-Medium	40
3.3. Bordet-Gengou-Agar	41
3.4. Charcoal-Agar	41
3.5. Medienzusätze	41
4. Bakterienstämme	42
5. Plasmide	43
6. Oligonukleotide	44
6.1. Plasmidspezifische Oligonukleotide	44
6.2. Oligonukleotide für Klonierungen	44
6.3. Oligonukleotide für Primer Extension	45
6.4. Oligonukleotide für quantitative RT-PCR	45
IV Methoden	48
1. Molekularbiologische und genetische Methoden	48
1.1. Isolierung von DNA	48
1.1.1. Isolierung chromosomaler DNA aus Gram-negativen Bakterien	48
1.1.2. Plasmidisolierung in mittlerem Maßstab mittels Nucleobond® AX Midi Kit (=Midipräparation)	49
1.1.3. Plasmidisolierung in kleinem Maßstab mittels AxyPrep Plasmid Miniprep Kit (= Minipräparation)	49
1.2. Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50
1.2.1. Analytische PCR von Transformanten (Lysat-PCR)	50
1.2.2. Präparative PCR	51
1.3. Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese	52
1.4. Aufreinigung von DNA-Fragmenten	53
1.4.1. Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels QIAquick® PCR Purification Kit	53
1.4.2. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen mittels NucleoSpin® Extract II Kit	53
1.5. Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten	54
1.6. Klonierung von DNA-Fragmenten	54

1.6.1. Spaltung von DNA-Fragmenten mittels Restriktionsendonukleasen	54
1.6.2. Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	55
1.6.3. Ligation von DNA-Fragmenten	55
1.7. Transformation von Bakterien	56
1.7.1. Herstellung CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	56
1.7.2. Transformation	56
1.8. Konjugation	56
1.9. Sequenzierung	57
1.10. Arbeiten mit RNA	57
1.10.1. Isolierung von RNA	57
1.10.2. DNase-Behandlung der RNA	58
1.10.3. RNA-Gelelektrophorese	59
1.10.4. Konzentrationsbestimmung von RNA-Lösungen	60
1.11. Reverse Transkription von RNA in cDNA	60
1.12. Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)	60
1.13. Primer Extension	61
1.13.1. DNA-Sequenzierung mit $\alpha^{33}\text{P}$ -dATP	62
1.13.2. 5'-Markierung des Primers mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP	62
1.13.3. Primer Extension	63
1.13.4. 6 %-Polyacrylamid-Harnstoffgel	63
1.14. Sequenzierung von Transkript-5'-3'-Enden	64
1.14.1. Zirkularisierung der RNA	64
1.14.2. Genspezifische cDNA-Synthese	65
2. Proteinbiochemische Methoden	65
2.1. Isolierung von Gesamtzellprotein für 2D-Gelelektrophorese	65
2.2. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	66
2.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	67
2.4. Immunoblot	68
2.5. Zweidimensionale Gelelektrophorese	69
2.5.1. Rehydrierung der IPG-Strips	70
2.5.2. Isoelektrische Fokussierung mittels Ettan IPGphor II	70
2.5.3. Herstellung der 2D-SDS-Polyacrylamid-Gele	71
2.5.4. Äquilibration des IPG-Strips und 2D-SDS-PAGE	72
2.5.5. Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie	73
2.5.6. Auswertung der 2D-Gele mittels Progenesis SameSpots Software von Nonlinear Dynamics	74
2.5.7. Analyse ausgewählter Proteinspots mittels MALDI-TOF-MS	75

3. Mikrobiologische Methoden	75
3.1. Anzucht und Stammhaltung von Bakterien	75
3.2. Erstellung von Wachstumskurven	76
3.3. Erstellung von Wachstumskurven unter Stressbedingungen	76
3.4. Stressassay	76
3.5. Agar-Diffusions-Assay	77
3.6. Granulozyten-Survival-Assay.....	77
3.7. Biofilm-Assay	78
V Ergebnisse	80
1. Das Hfq-Protein in <i>B. pertussis</i> und <i>B. bronchiseptica</i>	80
1.1. Sequenzvergleich der Hfq-Proteine aus <i>B. pertussis</i> und <i>B. bronchiseptica</i> mit Hfq-Proteinen aus anderen Organismen	80
1.2. Genomlokalisierung des <i>hfq</i> -Gens und Transkriptionsstartpunkt bei <i>B. pertussis</i>	83
1.3. Genomlokalisierung des <i>hfq</i> -Gens und Transkriptionsstartpunkt bei <i>B. bronchiseptica</i>	85
1.4. <i>hfq</i> -Transkription unter Stressbedingungen	86
2. Konstruktion der <i>hfq</i> -Insertionsmutanten und Komplementanten in <i>B. pertussis</i> und <i>B. bronchiseptica</i>	91
2.1. Konstruktion der <i>hfq</i> -Insertionsmutanten in <i>B. pertussis</i> und <i>B. bronchiseptica</i>	91
2.2. Konstruktion der <i>hfq</i> -Komplementanten in <i>B. pertussis</i> und <i>B. bronchiseptica</i>	97
2.3. Auswirkung der Δhfq -Mutation auf das Wachstumsverhalten von <i>B. pertussis</i> und <i>B. bronchiseptica</i>	99
3. Analyse des Hfq-regulierten Proteoms in <i>B. pertussis</i> und <i>B. bronchiseptica</i>	101
3.1. Einfluss des Hfq-Proteins auf das Proteom von <i>B. pertussis</i> unter logarithmischen Wachstumsbedingungen	101
3.2. Einfluss der Δhfq -Mutation auf die Transkription der zu den regulierten Spots gehörenden Gene (logarithmische Wachstumsbedingungen)	105
3.3. Einfluss des Hfq-Proteins auf das Proteom von <i>B. pertussis</i> unter stationären Wachstumsbedingungen	107
3.4. Einfluss der Δhfq -Mutation auf die Transkription der zu den regulierten Spots gehörenden Gene (stationäre Wachstumsbedingungen)	111
3.5. Einfluss des Hfq-Proteins auf das Proteom von <i>B. bronchiseptica</i> unter stationären Wachstumsbedingungen	114
4. Auswirkung des Hfq-Proteins auf die Stresstoleranz	118
4.1. Oxidativer Stress	118

4.2. Membranstress	125
5. Beteiligung des Hfq-Proteins an der Biofilmbildung in <i>B. pertussis</i> und <i>B. bronchiseptica</i>	128
5.1. Effekt des Hfq-Proteins auf die Biofilmbildung in <i>B. pertussis</i>	129
5.2. Effekt des Hfq-Proteins auf die Biofilmbildung in <i>B. bronchiseptica</i>	132
6. Einfluss von Hfq auf die Expression von Virulenzfaktoren in <i>B. pertussis</i>	135
7. Charakterisierung einer putativen sRNA im intergenischen Bereich zwischen <i>bvgAS</i> und <i>fhaB</i> in <i>B. pertussis</i>	137
7.1. Nachweis und Transkriptionsstartpunkt der P4-sRNA	138
7.2. BvgA-abhängige Transkription der P4-sRNA	141
7.3. Überexpression des P4-Transkripts	142
VI Diskussion	146
1. Die <i>hfq</i> -Transkription in <i>B. pertussis</i> und <i>B. bronchiseptica</i>	146
2. Einfluss des Hfq-Proteins auf Wachstumsverhalten und Stresstoleranz in <i>B. pertussis</i> und <i>B. bronchiseptica</i>	148
3. Effekt von Hfq auf die Biofilmbildung in <i>B. pertussis</i> und <i>B. bronchiseptica</i>	150
4. Das Hfq-regulierte Proteom in <i>B. pertussis</i> und <i>B. bronchiseptica</i>	151
5. Einfluss von Hfq auf die Virulenz von <i>B. pertussis</i>	158
6. Rolle der P4-sRNA bei der Virulenzgenexpression in <i>B. pertussis</i>	159
7. Abschließende Betrachtungen	160
VII Verzeichnisse	162
1. Literaturverzeichnis	162
2. Abkürzungsverzeichnis	184

I Zusammenfassung

Bordetellen sind Gram-negative Kokkobazillen, die phylogenetisch zu den β -Proteobakterien zählen und in der Familie der *Alcaligenaceae* eingeordnet sind. Der bedeutendste Vertreter der Gattung, die nach heutigem Kenntnisstand neun Arten umfasst, ist *Bordetella pertussis*, der Erreger des Keuchhustens. Der Keim ist obligat humanpathogen und besitzt zahlreiche Virulenzfaktoren, um die Epithelzellen des Respirationstraktes zu besiedeln und zu zerstören, wodurch es zu dem charakteristischen Krankheitsverlauf kommt. Neben *B. pertussis* werden noch *B. bronchiseptica* und *B. parapertussis* dem sogenannten *B. bronchiseptica*-Cluster zugeteilt. Alle Vertreter des *B. bronchiseptica*-Clusters sind in der Lage, bei verschiedenen Wirtsspezies respiratorische Erkrankungen mit unterschiedlichem Schweregrad auszulösen. Dabei weist *B. bronchiseptica* ein breiteres Wirtsspektrum auf und kann Atemwegserkrankungen in einer Vielzahl von Säugetieren auslösen, wohingegen *B. parapertussis* vornehmlich Schafe und Menschen infiziert und bei letzteren eine schwächere Form des Keuchhustens bewirkt.

Das Hfq-Protein wurde ursprünglich als Wirtsfaktor identifiziert, welcher für die Replikation des RNA-Phagen Q β in *Escherichia coli* benötigt wird (host factor for Q β oder HF-1) (Franze de Fernandez *et al.*, 1968). Es ist in Struktur und Funktion homolog zu den Sm-Proteinen aus Eukaryoten, die am Splicing von mRNAs involviert sind (Wilusz & Wilusz, 2005; Séraphin, 1995). Die Beteiligung des Hfq-Proteins an regulatorischen Vorgängen, die durch kleine nicht-kodierende RNAs (sRNAs) vermittelt werden, wurde erstmals in einer Studie zum Mechanismus der *rpoS*-Regulation durch die kleine regulatorische RNA OxyS ersichtlich (Zhang *et al.*, 1998). Seitdem konnte für eine Vielzahl an sRNAs gezeigt werden, dass sie an Hfq gebunden vorliegen und die Hilfe des Proteins bei der post-transkriptionellen Kontrolle ihrer Ziel-mRNAs benötigen (Wassarman, 2002). In dieser Hinsicht übernimmt Hfq die Rolle eines RNA-Chaperons, indem es *trans*-kodierte sRNAs stabilisiert und die Basenpaarung mit ihren Ziel-mRNAs fördert (Storz *et al.*, 2004). Dabei beeinflusst die Bindung der sRNA-Regulatoren an ihre Ziel-mRNAs deren Translation, sowohl aktivierend als auch inhibierend.

Bislang wurden Hfq-Homologe in der Hälfte aller sequenzierten Gram-positiven und Gram-negativen Bakterienarten gefunden (Valentin-Hansen *et al.*, 2004). Eine BLAST-Analyse ergab, dass *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* Homologe zum Hfq-Protein aufweisen und diese in der veröffentlichten Genomsequenz bereits als Hfq-Protein annotiert sind (Parkhill *et al.*, 2003). Fokus dieser Arbeit war weitestgehend, die Funktion des Hfq-Proteins in *B. pertussis* und vergleichend in *B. bronchiseptica* zu charakterisieren.

Mittels Primer Extension-Analyse konnte zunächst der Startpunkt des *hfq*-Transkripts in *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* unter logarithmischen Wachstumsbedingungen bestimmt werden. Dieser Startpunkt war zudem unter stationären Wachstumsbedingungen und nach

Hitzestress aktiv, was in Diskrepanz zur Beobachtung in *E. coli* steht. Ferner konnte festgestellt werden, dass die *hfq*-Transkription nach Induktion verschiedener Stressformen in beiden Organismen erhöht war.

Nach Generierung der jeweiligen Δhfq -Mutanten in beiden Organismen wurden diese charakterisiert. Die *B. pertussis* Δhfq -Mutante zeigte ein deutliches Wachstumsdefizit gegenüber dem Wildtyp, im Gegensatz zu *B. bronchiseptica* Δhfq , die sich im Wachstum wie der Wildtyp verhielt. Beide Mutanten zeigten sich sensitiver gegenüber H_2O_2 -Stress als der Wildtyp, nicht jedoch gegenüber weiteren oxidativen Stressbedingungen oder Membranstress induzierenden Substanzen. Die Δhfq -Mutante in *B. pertussis* war zudem in ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung beeinträchtigt, was jedoch nicht für *B. bronchiseptica* Δhfq galt.

Da Hfq an sRNA-mRNA-Interaktionen, welche die Translation der mRNAs beeinflussen, beteiligt ist, sollte über 2D-Gelelektrophorese das Hfq-regulierte Proteom in *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* bestimmt werden. Auffällig war, dass viele periplasmatische Transportbindeproteine von der Δhfq -Mutation betroffen waren. Es zeigten sich aber auch Stoffwechsellzyme und wichtige Housekeeping-Faktoren, wie z. B. der Elongationsfaktor EF-Tu und das Chaperon GroEL, in der Δhfq -Mutante dereguliert. Generell scheint das Hfq-regulierte Proteom in *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* nur einen kleinen Teil des gesamten Proteoms auszumachen. Zudem ist das Hfq-regulierte Proteom variabel zwischen verschiedenen Wachstumsbedingungen, aber auch zwischen den beiden Organismen trotz der engen Verwandtschaft. Die Expression ausgewählter Virulenzfaktoren zeigte keinen Unterschied zwischen Δhfq -Mutante und *B. pertussis*-Wildtyp.

Ergänzend beschäftigte sich ein Teil dieser Arbeit mit der Charakterisierung einer putativen sRNA im intergenischen Bereich zwischen den *fhaB*- und *bvgA*-Genen in *B. pertussis*. Dabei konnte die Existenz eines zum 5'UTR-Bereich der *bvgA*-mRNA komplementären Transkripts bestätigt werden. Dieses Transkript wird BvgA-abhängig synthetisiert. Nachdem es nicht möglich war, die putative sRNA zu deletieren, zeigte die induzierbare Überexpression der sogenannten P4-sRNA keinen Effekt auf die Translation des BvgA-Proteins bzw. auf durch BvgA-regulierte Proteine.

I Summary

Bordetellae are Gram-negative coccobacilli phylogenetically belonging to the β -group of proteobacteria and therein to the family of *Alcaligenaceae*. The most prominent member of the genus comprising nine species so far is *Bordetella pertussis*, the etiological agent of whooping cough. This organism is an obligatory human pathogen and expresses a variety of virulence factors in order to colonize and destroy the epithelial cells of the respiratory tract causing the characteristic symptoms of the disease. In addition to *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* and *B. parapertussis* are assigned to the so-called *B. bronchiseptica*-cluster. All members of the *B. bronchiseptica*-cluster have the ability to cause respiratory symptoms with varying severity. *B. bronchiseptica* exhibits a broad host range causing respiratory symptoms in a variety of mammals, whereas *B. parapertussis* infects sheep and humans causing a milder form of whooping cough in the latter.

The Hfq protein was originally identified as a host factor necessary for the replication of the RNA-phage Q β in *Escherichia coli* (host factor for Q β or HF-1) (Franze de Fernandez *et al.*, 1968). It is functionally and structurally homologous to Sm-proteins involved in splicing of mRNAs in eukaryotes (Wilusz & Wilusz, 2005; Séraphin, 1995). The involvement of Hfq in regulatory processes caused by small non-coding RNAs (sRNAs) was first recognized in a study on the mechanism of *rpoS*-regulation by the small regulatory RNA OxyS (Zhang *et al.*, 1998). Since then a variety of sRNAs were shown to be bound to Hfq and require its help for post-transcriptional control of their target-mRNAs (Wassarman, 2002). In this regard, Hfq functions as an RNA-chaperone by stabilizing *trans*-encoded sRNAs and their basepairing to target-mRNAs (Storz *et al.*, 2004). Binding of the sRNA-regulators to their target-mRNAs thereby either activates or inhibits their translation.

To date Hfq homologues were identified in half of all sequenced Gram-positive and Gram-negative bacterial species (Valentin-Hansen *et al.*, 2004). BLAST analysis revealed that *B. pertussis* and *B. bronchiseptica* possess an Hfq homologue which has already been annotated as such in the published genome sequence (Parkhill *et al.*, 2003). The main focus of this work was to characterize the function of the Hfq protein in *B. pertussis* as well as in *B. bronchiseptica*.

By primer extension analysis we could identify the start of the *hfq*-transcript in *B. pertussis* and *B. bronchiseptica* under logarithmic growth conditions. This transcriptional start site was also active under stationary growth conditions and after heat shock which is discrepant from the observations in *E. coli*. Furthermore, it could be shown that the *hfq*-transcription was elevated in both *B. pertussis* and *B. bronchiseptica* under various stress conditions.

Δhfq -mutants were established and characterized in both organisms. The Δhfq -mutant of *B. pertussis* exhibited a pronounced growth deficit in comparison to the wildtype whereas the

Δhfq -mutant of *B. bronchiseptica* showed the same growth properties as the wildtype. Both Δhfq -mutants expressed a higher sensitivity to stress caused by H_2O_2 compared to the wildtype. However, there was no increased sensitivity of the Δhfq -mutants to other oxidative stress agents or membrane stress inducing agents. Furthermore, the Δhfq -mutant of *B. pertussis* but not the Δhfq -mutant of *B. bronchiseptica* was impaired in its ability to form biofilms.

Since Hfq is involved in sRNA-mRNA-interactions affecting the efficient translation of mRNAs, the Hfq-regulated proteome of *B. pertussis* and *B. bronchiseptica* was determined by 2D-gel electrophoresis. Strikingly, a variety of periplasmic binding proteins involved in transport were affected by the Δhfq -mutation. In addition, enzymes of various metabolic pathways and important housekeeping factors, such as elongation factor EF-Tu and the protein chaperone GroEL, were deregulated in the Δhfq -mutant. The Hfq-regulated proteome comprises generally only a small part of the complete proteome in *B. pertussis* and *B. bronchiseptica*. Furthermore, this Hfq-regulated proteome differs between certain growth conditions as well as between the two closely related organisms. No difference could be observed in the expression of selected virulence factors between *B. pertussis* Δhfq and wildtype.

A supplemental part of this work dealt with the characterization of a putative sRNA in the intergenic region between the *fhaB*- and *bvgA*-gene in *B. pertussis*. In this context, the existence of a transcript showing perfect complementarity to the 5'UTR of the *bvgA*-mRNA could be verified. This transcript was synthesized in dependence of the BvgAS-System. However, this sRNA could not be deleted and the inducible overexpression of the so-called P4-sRNA showed no effect on the translation of BvgA or on proteins regulated by BvgA.

II Einleitung

1. Das Genus *Bordetella*

1.1. Phylogenie und Physiologie

Die Gattung *Bordetella* wird phylogenetisch der β -Gruppe der Proteobakterien zugeordnet und bildet innerhalb dieser Gruppe zusammen mit den verwandten Gattungen *Achromobacter* und *Alcaligenes* die Familie der *Alcaligenaceae* (Vandamme *et al.*, 1996; s. Abb. 1).

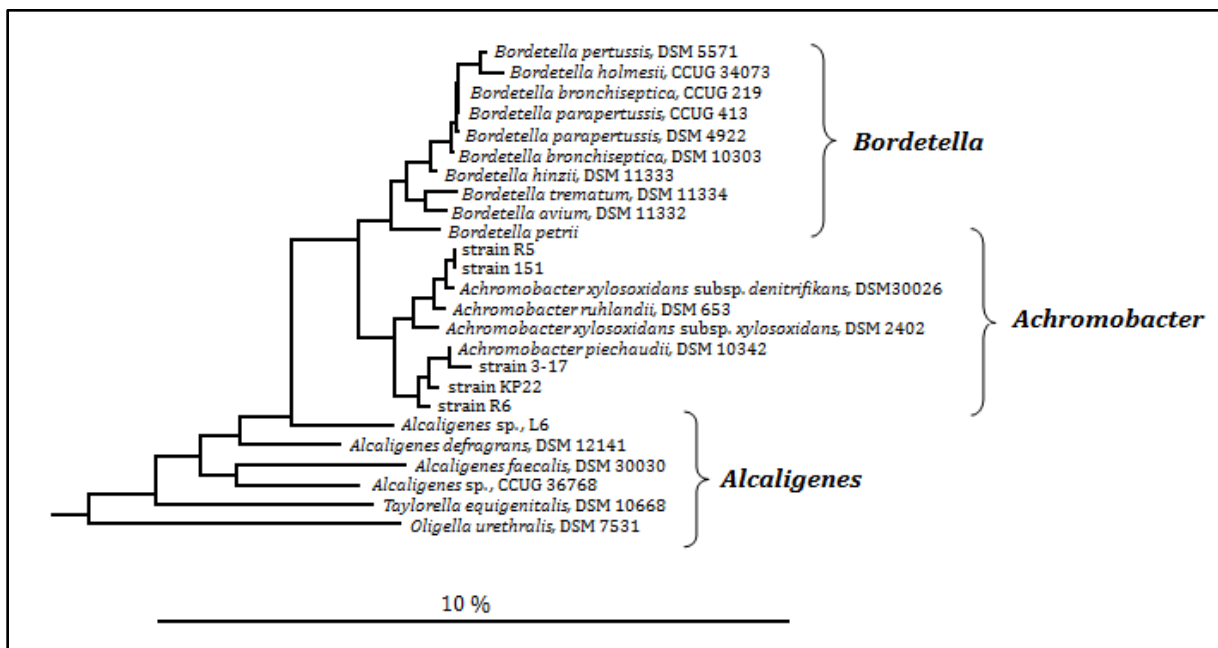


Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der Familie *Alcaligenaceae* basierend auf 16S-rDNA-Sequenzen. Der Balken entspricht 10 % geschätzter Sequenzdivergenz (Gerlach *et al.*, 2001).

Laut Genusdefinition handelt es sich bei den *Bordetella*-Arten um kleine, Gram-negative Kokkobazillen mit einer Länge von 0.5 - 2 μm , die häufig einzeln oder paarweise, selten in kurzen Ketten, vorkommen. Die meisten Arten der Gattung weisen einen nicht fermentativen, strikt aeroben Metabolismus auf. Einzig *B. petrii* besitzt die Fähigkeit, unter anaeroben Bedingungen Selenat oder Nitrat zu reduzieren. Da den Bordetellen einige Schlüsselenzyme der Glykolyse fehlen, werden Kohlenstoff- und Energiequellen vorrangig aus der Oxidation von Aminosäuren bezogen (Armstrong & Gross, 2007). Ein weiteres Merkmal der Gattung *Bordetella* ist der relativ hohe GC-Gehalt des Genoms mit 61.5 - 68 % (Gerlach *et al.*, 2001; Parkhill *et al.*, 2003).

Nach heutigem Kenntnisstand werden der Gattung neun verschiedene Arten zugeordnet: die sogenannten „klassischen“ Arten *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* und *B. parapertussis*, welche

human- bzw. säugetierpathogen sind, sowie die „neuen“ Arten *B. ansorpii*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. petrii* und *B. trematum*, die zum Teil tierpathogenes, aber auch humanpathogenes Potential besitzen (Gross *et al.*, 2010).

1.2. Das *Bordetella bronchiseptica*-Cluster

Die drei sogenannten „klassischen“ Arten der Gattung *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* und *B. parapertussis* haben das Potential, respiratorische Erkrankungen im Menschen und in verschiedenen Säugetieren zu verursachen. Diverse Vergleichsanalysen wie z. B. DNA-Hybridisierungsstudien, Multilokusenzymsequenzen, Polymorphismus von IS-Elementen, 23S-rDNA-Sequenzvergleich und Vergleich des Gesamtgenoms zeigten, dass diese drei Arten sehr nah miteinander verwandt sind (Müller & Hildebrandt, 1993; van der Zee *et al.*, 1997; Preston *et al.*, 2004). Die geringe genetische Divergenz deutet darauf hin, dass sie klonaler Herkunft sind und sich evolutiv gesehen erst vor kurzem von einem gemeinsamen Vorfahren entwickelt haben (Musser *et al.*, 1986). So geht man davon aus, dass *B. pertussis* und humane *B. parapertussis*-Isolate aus dem Menschen Klone von *B. bronchiseptica* darstellen, welche sich erst kürzlich an den Menschen angepasst haben. Humane und ovine Isolate von *B. parapertussis* haben sich zu unterschiedlichen Zeiten unabhängig voneinander aus *B. bronchiseptica* entwickelt (van der Zee *et al.*, 1997). Aufgrund dieser Überlegungen werden *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* eher als Subspezies einer Art mit unterschiedlichen Anpassungen betrachtet und unter dem Begriff *B. bronchiseptica*-Cluster zusammengefasst (Gerlach *et al.*, 2001).

Dennoch können die drei Arten aufgrund verschiedener physiologischer Merkmale voneinander unterschieden werden (s. Tab. 1).

Tab. 1: Unterscheidungsmerkmale zwischen den *Bordetella*-Arten *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* (modifiziert nach Weyant *et al.*, 1995; Gerlach *et al.*, 2001; Ko *et al.*, 2005).

	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>
Wirt	Mensch	Mensch, Schaf	Säugetiere, selten Mensch
Krankheit	Keuchhusten	milde Form des Keuchhustens	respiratorische Erkrankungen
Isolationsort	Respirationstrakt	Respirationstrakt	Respirationstrakt
GC-Gehalt (in %)	66 - 68	66 - 68	66 - 68
Genomgröße in kbp	3.880 - 4.060	> 4.400	> 4.400
Wachstum auf MacConkey-Agar	-	+/-	+
Katalaseaktivität	+	+	+
Oxidaseaktivität	+	-	+
Ureaseaktivität	-	+	+
Beweglichkeit	-	-	+
braune Pigmentierung	-	+	-

β-Hämolyse	+	+	+
Nitratreduktion	-	-	+
Citratassimilation	+	+	+

1.2.1. Klinische Relevanz des *Bordetella bronchiseptica*-Clusters

Alle Vertreter des *B. bronchiseptica*-Clusters sind in der Lage, bei verschiedenen Wirtsspezies respiratorische Erkrankungen mit unterschiedlichem Schweregrad auszulösen. Das drastischste Krankheitsbild ist dasjenige des Keuchhustens, welches durch *B. pertussis* beim Menschen ausgelöst und in drei Stadien unterteilt wird (Fuchs & Gross, 2001; Mattoo & Cherry, 2005).

Nach einer Inkubationszeit von 5 - 21 Tagen beginnt das **Stadium catarrhale**: Es zeichnet sich durch einen akuten Katarrh der Atemwege aus, welcher von unspezifischen Erkältungssymptomen begleitet wird. Die Diagnose ist in dieser Phase, welche 7 - 14 Tage andauern kann, schwierig, die Ansteckungsgefahr über Tröpfcheninfektion jedoch am größten. Daraufhin folgt das 3 - 6 Wochen andauernde **Stadium convulsivum**: Hier treten die typischen, krampfartigen Hustenanfälle auf, welche in Erbrechen resultieren können. Das schwere Atemholen nach den oftmals minutenlangen Hustenkrämpfen verursacht das charakteristische Keuchen. Das **Stadium crementii** schließt das Krankheitsbild ab: Es kommt zu einem allmählichen Abklingen der Symptome über einen wochen- bis monatelangen Zeitraum.

Nach Daten der Weltgesundheitsorganisation WHO erkranken jährlich 20 - 40 Millionen Menschen an Keuchhusten, wobei 90 % der Krankheitsfälle in den Entwicklungsländern auftreten (Crowcroft *et al.*, 2003; WHO, 2005). Bei 300.000 der betroffenen Patienten führen Folgeerscheinungen der Infektion zum Tod. Vor allem Säuglinge und Kleinkinder unter fünf Jahren zeigen einen lebensbedrohlichen Infektionsverlauf, der sich weniger durch respiratorische Symptome als durch häufige Atemstillstände und mögliches Organversagen auszeichnet (Crowcroft *et al.*, 2002; Forsyth, 2007). Bei Erwachsenen äußert sich eine *B. pertussis*-Infektion deutlich weniger gravierend in Erkältungssymptomen und leichtem bis starkem Husten, was eine korrekte Diagnose erschwert. So geht man davon aus, dass ungefähr ein Viertel aller Erwachsenen mit Hustenerkrankungen, die länger als zwei Wochen dauern, mit *B. pertussis* infiziert sind und somit als unerkannte Übertragungsquelle fungieren können (Cherry, 2005).

In den Industrieländern konnte seit den 50er Jahren die Rate der Keuchhustenfälle durch die Einführung einer Vakzinierung deutlich vermindert werden. Der damals verwendete Impfstoff enthielt durch Hitze bzw. Formaldehyd abgetötete *B. pertussis*-Isolate und wurde in Kombination mit inaktiviertem Diphtherie- und Tetanustoxin verabreicht. Da dieses Vakzin jedoch häufig Nebenwirkungen in Form von Fieber, Appetitlosigkeit und Enzephalitis verursachte, sank die Impftrate in den 70er Jahren deutlich ab und führte damit einhergehend zu

einem Anstieg der Keuchhustenfälle (Greco *et al.*, 1996). So setzten sich in den 90er Jahren vornehmlich azelluläre Antigene aus *B. pertussis* im Kombinationsimpfstoff durch: Zunächst wurde noch chemisch inaktiviertes Pertussistoxin eingesetzt, jedoch allmählich durch die Gewinnung von gentechnisch inaktiviertem Toxin abgelöst (Pizza *et al.*, 1989). Nachteil einer solchen Vorgehensweise in der Vakzinierung war, dass nur die schädliche Wirkung des Pertussistoxins gehemmt wurde, Adhäsion und Kolonisierung des Bakteriums jedoch nicht verhindert wurden. Daher werden heute Impfstoffe verwendet, welche immunogene Bestandteile wie das Filamentöse Hämagglutinin (FHA), Pertactin (PRN) und Fimbrien (FIM) enthalten (Poolmann & Hallander, 2007).

Nichtsdestotrotz konnte auch in Ländern mit hoher Immunisierungsrate in den letzten 30 Jahren ein Anstieg an Keuchhustenfällen beobachtet werden, vornehmlich bei älteren Kindern und Jugendlichen (de Melker *et al.*, 1997; Güriş *et al.*, 1999). Dies könnte zum einen darin begründet liegen, dass die Wirkung des Impfschutzes im Laufe der Zeit abnimmt. Zum anderen könnten Polymorphismen in den immunogenen Bestandteilen die Wirkung des Vakzins herabsetzen (Yih *et al.*, 2000; Halperin, 2007; Poolmann & Hallander, 2007). Aus diesem Grund werden heutzutage neue Impfprogramme erarbeitet, die z. B. die regelmäßige Impfung von Erwachsenen vorschlagen (Cherry, 2005; Forsyth *et al.*, 2007).

1.2.2. Der Keuchhustenerreger *Bordetella pertussis*

Bordetella pertussis, der Erreger des Keuchhustens, ist der wohl bekannteste Vertreter der Gattung *Bordetella*. 1640 beschrieb der französische Arzt Guillaume de Baillou eine im Jahre 1578 in Paris aufgetretene Epidemie mit dem typischen Krankheitsbild des Keuchhustens (s. II 1.2.1.). Dieser Husten wurde später vom englischen Mediziner Thomas Sydenham als Pertussis bezeichnet. Erst 1904 gelang es den belgischen Wissenschaftlern Jules Bordet und Octave Gengou den bakteriellen Erreger der Krankheit zu isolieren und unter Laborbedingungen zu kultivieren (Bordet & Gengou, 1906). Da das isolierte Bakterium für sein Wachstum Blut benötigte, erhielt es zunächst den Namen *Haemophilus pertussis*. Nach mehrmaligen Umbenennungen wurde *B. pertussis* 1952 eine eigene Gattung zugeteilt, welche zu Ehren von Jules Bordet *Bordetella* genannt wurde (Lopez-Moreno, 1952).

Da bisher kein anderer Wirtsorganismus oder ein Umweltreservoir für *B. pertussis* bekannt ist, gilt der Keim als obligat humanpathogen. Die Übertragung von Mensch zu Mensch erfolgt durch Tröpfcheninfektion. Über den Rachenraum gelangt der Keim zu den zilienträgenden Epithelzellen der oberen Atemwege, wo die Kolonisierung erfolgt und es durch die Bildung zahlreicher Toxine zur Schädigung des Respirationsepithels kommt (s. II 1.4.2.). Interessanterweise kann *B. pertussis* nur im Stadium catarrhale aus dem Respirationstrakt isoliert werden,

was darauf hindeutet, dass vor allem Toxine eine wichtige Rolle bei der Ausprägung der Symptome spielen.

1.2.3. *Bordetella bronchiseptica*

Im Gegensatz zu *B. pertussis* besitzt *B. bronchiseptica* ein breiteres Wirtsspektrum und kann respiratorische Erkrankungen in einer Vielzahl von Säugetieren wie z. B. Mäusen, Kaninchen, Katzen, Pferden, Hunden und Schweinen auslösen (Goodnow, 1980). Die am besten beschriebenen Krankheiten sind dabei der Zwingerhusten des Hundes (McCandlish *et al.*, 1978) und die atrophische Rhinitis beim Schwein (de Jong, 1992). Trotz der vornehmlichen Assoziation von *B. bronchiseptica* mit Tiererkrankungen kann der Keim auch Infektionen beim Menschen auslösen. Hierbei handelt es sich meist um immunsupprimierte oder ältere Personen bzw. um Personen, welche regelmäßigen Kontakt zu infizierten Tieren hatten (Woolfrey & Moody, 1991; Gueirard *et al.*, 1995). In diesen Fällen verläuft die *B. bronchiseptica*-Infektion meist chronisch, oft asymptomatisch und zeigt sich hartnäckig gegen Antibiotikabehandlung.

Für *B. bronchiseptica* konnte gezeigt werden, dass der Keim über einen längeren Zeitraum in PBS oder Teichwasserproben überleben kann, was auf eine effektive Antwort gegenüber Nährstoffmangelstress hindeutet (Porter & Wardlaw, 1993; Porter & Wardlaw, 1994).

1.2.4. *Bordetella parapertussis*

B. parapertussis stellt einen weiteren humanpathogenen Vertreter des *B. bronchiseptica*-Clusters dar. Dieser Erreger wurde 1937 erstmals beschrieben und konnte aufgrund physiologischer Eigenschaften von *B. pertussis* abgegrenzt werden (Bradford & Slevin, 1937; Eldering & Kendrick, 1938). Wie bei *B. pertussis* treten auch bei einer Infektion mit *B. parapertussis* schwerer Husten, Hustenkrämpfe und Erbrechen auf. Da die Symptome jedoch weniger häufig vorkommen und zudem von kürzerer Dauer sind, spricht man von einer abgeschwächten Form des Keuchhustens. Eine Differenzierung zwischen *B. pertussis* und *B. parapertussis*-Infektion wird durch die Ähnlichkeit der Symptome erschwert, weshalb man davon ausgeht, dass ein erheblicher Prozentsatz aller Keuchhustenfälle in Wirklichkeit auf *B. parapertussis* zurückzuführen ist (Mastrantonio *et al.*, 1998).

Neben den humanen Infektionen ist dieser Erreger für die chronische Pneumonie bei Schafen verantwortlich (Porter *et al.*, 1994). Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich die humanen und ovinen Isolate von *B. parapertussis* auf genomischer Ebene, so dass man davon ausgeht, dass es sich um verschiedene Klone eines *B. bronchiseptica*-Vorfahren handelt, welche sich spezifisch an ihre Wirte adaptiert haben (van der Zee *et al.*, 1997; Yuk *et al.*, 1998).

1.3. Die Virulenzfaktoren des *B. bronchiseptica*-Clusters

Um ihren Wirt erfolgreich zu infizieren, besitzen Mitglieder des Genus *Bordetella* eine Vielzahl an Virulenzfaktoren. Bei den „klassischen“ Arten, welche klinisch besonders relevant sind, sind diese molekularbiologisch am besten charakterisiert, wohingegen das Vorkommen von Virulenzfaktoren bei den neuen Arten weniger gut erforscht ist. Die Virulenzfaktoren lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Adhäsine, welche die initiale Anheftung an die Epithelzellen des Respirationstrakts vermitteln, und Toxine, welche für die Kolonisierung und Persistenz notwendig sind. Eine Übersicht über die Virulenzfaktoren in *B. pertussis* gibt Abbildung 2.

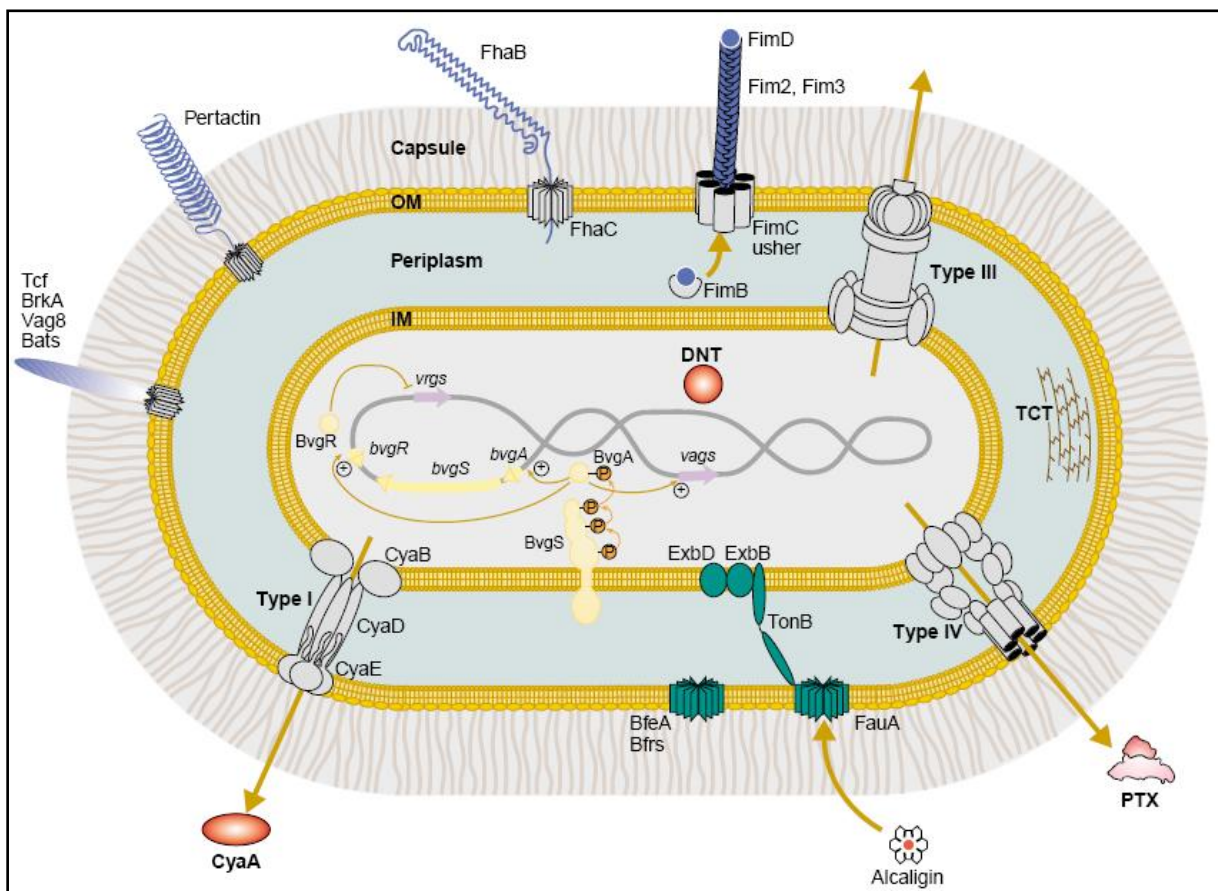


Abb. 2: Schematische Darstellung der Virulenz-assoziierten Faktoren in *B. pertussis* (Locht *et al.*, 2001).

1.3.1. Adhäsine

Das hochimmunogene **Filamentöse Hämagglutinin (FHA)** gilt als wichtigstes Adhäsiv von *B. pertussis*. Es ist Bestandteil der meisten azellulären Pertussis-Vakzine und für eine erfolgreiche Kolonisierung des Respirationstrakts unbedingt erforderlich (Cotter *et al.*, 1998; Cherry & Heiniger, 2004). Das *fhaB*-Gen, welches zwischen dem *bvgAS*-Lokus und dem *fim*-Gencluster lokalisiert ist, zählt zu den am stärksten durch das BvgAS-Zwei-Komponentensystem

aktivierten Genen. Sein Promotor weist sowohl eine hochaffine, als auch zwei weniger affine Bindestellen für den Response Regulator BvgA auf (Roy & Falkow, 1991; Boucher et al., 2003). Des Weiteren kann *fhaB* ausgehend vom *fim*-Lokus mit dem sich anschließenden *fhaC*-Gen als polycistronische mRNA transkribiert werden (Locht et al., 1993).

FHA wird als 367 kDa großes Vorläuferprotein (FhaB) im Zytoplasma gebildet und Sec-abhängig durch die Zytoplasmamembran transportiert. Im Periplasma erfolgt die Reifung des Proteins, indem das N-terminale Signalpeptid (71 AS) und ein 150 kDa großes C-terminales Fragment, welches als molekulares Chaperon fungiert, abgespalten werden (Renauld-Mongenie et al., 1996; Lambert-Buisine et al., 1998). Das prozessierte Protein weist nun eine Größe von 220 kDa auf. Für die Translokation durch die äußere Membran benötigt FHA die Hilfe des Proteins FhaC, welches eine FHA-spezifische Pore bildet. FHA und FhaC stellen damit ein TPS (two-partner secretion)-System dar (Jacob-Dubuisson et al., 1999; Jacob-Dubuisson et al., 2001). Die Verankerung an der Zelloberfläche erfolgt vermutlich über Interaktion mit FhaC (Mazar & Cotter, 2006).

FHA besitzt drei unterschiedliche, N-terminale Bindestellen für die Anheftung an eukaryotische Wirtszellen: das Arg-Gly-Asp (RGD)-Motiv vermittelt die Bindung an den CR3-Oberflächenrezeptor auf Makrophagen und Monozyten, eine Kohlenhydratbindestelle ist für die Bindung an zilientragende Epithelzellen des Respirationstrakts verantwortlich und eine Heparin-Bindestelle dient der Interaktion mit nicht-zilientragenden Epithelzellen und der extrazellulären Matrix (Menozzi et al., 1990; Relman et al., 1990; Prasad et al., 1993).

Die Gene *fhaS* und *fhaL*, welche für FHA-ähnliche Gene kodieren, wurden unlängst in *B. pertussis* und dazu orthologe Gene in *B. bronchiseptica* und *B. parapertussis* identifiziert (Antoine et al., 2000b; Parkhill et al., 2003). Ihre Relevanz für die Adhäsion bleibt noch unklar.

Fimbrien, lange filamentöse Zellanhänge, (FIM) stellen einen weiteren wichtigen Adhäsionsfaktor für *Bordetella* spp. dar. Die Hauptstrukturproteine der Fimbrien von *B. pertussis* können entweder vom *fim2*-Gen oder *fim3*-Gen kodiert werden und charakterisieren damit den entsprechenden Serotyp 2 bzw. 3. Das eigentliche Adhäsin FimD sitzt an der Spitze der Fimbrien (Locht et al., 1992; Willems et al., 1992). Stromaufwärts vom *fim*-Operon befindet sich das *fimA*-Gen, welches vermutlich ursprünglich das Hauptstrukturgen war, aus dem die anderen Strukturgene durch Duplikation entstanden sind. Die Gene *fimB* und *fimC* kodieren für ein Chaperon bzw. ein Usherprotein und spielen eine wichtige Rolle bei der Fimbrienbiogenese. Die Transkription des *fimABCD*-Clusters mit dem *fhaC*-Gen als polycistronische mRNA deutet auf eine koordinierte Synthese der beiden Adhäsine FIM und FHA hin und unterliegt wie die FHA-Transkription der Regulation durch das BvgAS-System (Willems et al., 1990; Smith et al., 2001;). FimD vermittelt die Bindung an Heparin und andere Zuckersulfate, welche ubiquitär im Respirationstrakt vorkommen, sowie an das VLA-5-Integrin auf der Oberfläche von Makrophagen. Interessanterweise aktiviert die Bindung von FimD an VLA-5 den CR3-Rezeptor,

was eine koordinierte Adhäsion durch Fimbrien und FHA gewährleistet (Hazenbos *et al.*, 1995; Geuijen *et al.*, 1996).

Weitere Adhäsionsfaktoren der Bordetellen gehören zur Familie der Autotransporter, deren Biogenese im Gegensatz zu FHA und FIM keine zusätzlichen Proteine benötigt. Nach einem Sec-abhängigen Transport über die Zytoplasmamembran bildet der C-terminale Teil des Autotransporterproteins eine Pore in der äußeren Membran, durch welche der N-Terminus zur Zelloberfläche gelangt. Das Protein kann dann entweder mit der Zelloberfläche assoziiert bleiben oder durch proteolytische Spaltung sezerniert werden (Henderson & Nataro, 2001).

Zu den eben genannten Autotransporterproteinen, welche adhäsive Eigenschaften besitzen, gehören **Pertactin** (PRN) und der **Tracheale Kolonisierungsfaktor** (TCF). Das 60 kDa große Pertactin scheint für die Immunantwort von großer Wichtigkeit zu sein, da PRN-spezifische Antikörper einen hohen Impfschutz vermitteln, zeigt jedoch auch einen ausgeprägten Polymorphismus in den immunogenen Regionen (Cherry *et al.*, 1998; Storsaeter *et al.*, 1998; Boursaux-Eude & Guiso, 2000). Auch TCF scheint eine wichtige Rolle bei der Kolonisierung des Respirationstrakts einzunehmen (Finn & Stevens, 1995). Die Adhäsion beider Proteine wird vermutlich über Prolin-reiche Regionen und RGD-Motive vermittelt, ihre Expression wird durch das BvgAS-System reguliert.

Ein weiteres oberflächenassoziiertes Autotransporterprotein ist das 73 kDa große **Brk**. Es besitzt zwei RGD-Motive für die Bindung an Zuckerverbindungen mit Sulfatresten und vermittelt über einen bisher unbekanntem Mechanismus Resistenz gegenüber dem Komplementsystem im Blutserum, das für das Abtöten von Pathogenen verantwortlich ist (Fernandez & Weiss, 1994).

Das 91 kDa große **Vag8** ist homolog zu PRN, TCF und Brk und besitzt gleichsam zu diesen ein RGD-Motiv. Vag8 scheint für die Virulenz von *B. pertussis* nicht von besonderer Bedeutung zu sein, da Vag8-defiziente Mutanten ebenso virulent wie der Wildtyp sind (Finn & Amsbaugh, 1998).

Da die Interaktion von bakteriellen Adhäsinen mit ihren Wirtsrezeptoren meist sehr spezifisch ist, scheinen molekulare Unterschiede in dieser Interaktion für die unterschiedliche Wirtsspezifität der verschiedenen *Bordetella*-Arten verantwortlich zu sein (Tuomanen *et al.*, 1983; Inatsuka *et al.*, 2005).

1.3.2. Toxine

Die eben erwähnten Adhäsine sind bei der initialen Anheftung an das Respirationsepithel von großer Bedeutung, doch für eine erfolgreiche Kolonisierung des Wirts benötigen die Vertreter des *B. bronchiseptica*-Clusters zusätzliche Virulenzfaktoren. Die Produktion von Toxinen führt zur Zerstörung des Gewebes und somit zur Freisetzung von limitierenden Nährstoffen sowie der Schwächung der Wirtsabwehr.

Das bekannteste Toxin ist das **Pertussistoxin** (PTX), welches ausschließlich von *B. pertussis* exprimiert wird. Interessanterweise besitzen sowohl *B. parapertussis* als auch *B. bronchiseptica* das *ptx*-Operon, die Gene werden aufgrund von Mutationen im Promotorbereich jedoch nicht exprimiert (Arico & Rappuoli, 1987). PTX gehört zur Gruppe der AB-Toxine: Der enzymatisch aktive A-Teil des Toxins besteht aus der S1-Untereinheit, der für die Bindung an die Wirtszelle verantwortliche B-Teil ist aus den Komponenten S2, S3, S4 und S5 im Verhältnis 1:1:2:1 zusammengesetzt (Tamura *et al.*, 1982). Die Gene für die PTX-Untereinheiten sind im *ptx/ptl*-Gencluster zusammengefasst und werden einzeln translatiert. Nach einem Sec-abhängigen Transport durch die Zytoplasmamembran fügen sich die Untereinheiten zum Holoenzym zusammen, welches in den Überstand sezerniert wird (Locht & Keith, 1986; Farizo *et al.*, 2000). Die *ptl*-Genprodukte stellen dabei ein Typ IV-Sekretionssystem dar und sind für die Sekretion des PTX-Toxins durch die äußere Membran verantwortlich (Locht & Keith, 1986; Weiss *et al.*, 1993). Nach der Bindung an den Wirtsrezeptor erfolgt die Translokation der aktiven Untereinheit ins Zytosol der Wirtszelle, vermutlich über retrograden Transport zum endoplasmatischen Retikulum und Freisetzung ins Zytoplasma. Dort wird die ADP-Ribosyltransferaseaktivität der S1-Untereinheit aktiviert: Unter NAD-Verbrauch werden wirtseigene G-Proteine ADP-ribosyliert, was deren Inaktivierung bewirkt (Tamura *et al.*, 1982). Infolgedessen kommt es zu einer unkontrollierten Aktivierung der Adenylatzyklase, zur Überproduktion des Botenstoffs cAMP und zu einer gravierenden Störung der Signaltransduktionskaskaden in der Wirtszelle (Katada *et al.*, 1986; Loch & Antoine, 1995). Das PTX-Toxin gilt als wichtigstes Antigen bei der Vakzinierung und ist deshalb Bestandteil aller azellulären Pertussis-Impfstoffe (Pizza *et al.*, 1989; Poolman & Hallander, 2007).

Das **Adenylatzyklase-Toxin** (CYA) ist ein weiteres wichtiges Toxin und wird von allen Vertretern des *B. bronchiseptica*-Clusters gebildet. Es ist 188 kDa groß und bifunktional. Die ersten 400 N-terminalen Aminosäurereste stellen den katalytischen Teil des Toxins dar und weisen eine Calmodulin-abhängige Adenylatzyklaseaktivität auf. Der übrige C-terminale Teil des Proteins zeigt Ähnlichkeit zu einer Familie von Hämolytinen, welche als RTX-Toxine bezeichnet werden, und besitzt wie diese hämolytische Aktivität (Glaser *et al.*, 1988). Ferner ist der C-Terminus verantwortlich für Bindung und Aufnahme in die Wirtszelle. Beide Domänen sind wichtig in der frühen Phase der Infektion, da sie Apoptose in Alveolarmakrophagen auslösen und die Phagozytose durch Neutrophile inhibieren (Khelef *et al.*, 1992; Gueirard *et al.*, 1998; Weingart & Weiss, 2000). CYA wird als inaktives Vorläuferprotein synthetisiert und erst durch Palmitoylierung an einem spezifischen Lysinrest aktiviert, ein Vorgang, der durch CyaC katalysiert wird (Hackett *et al.*, 1994). Anschließend erfolgt die Sekretion über ein Typ I-Sekretionssystem bestehend aus den akzessorischen Proteinen CyaB, CyaD und CyaE. Die Palmitoylierung ist von großer Bedeutung für die Bindung des C-Terminus an die Wirtszelle und die Bildung einer Pore, durch welche die katalytische Domäne in das Zytoplasma der Wirtszelle

gelangt (Gray *et al.*, 1999). Dort führt die Adenylatzyklaseaktivität des Toxins ähnlich wie das PTX-Toxin zu einer Überproduktion an cAMP, wodurch Signaltransduktionskaskaden gestört werden (Ladant & Ullmann, 1999).

Das **Dermonekrotische Toxin** (DNT) ist ein weiteres Proteintoxin und einer der ersten Virulenzfaktoren, der für *B. pertussis* beschrieben wurde (Bordet & Gengou, 1909). Im Gegensatz zu PTX und CYA wird DNT nicht sekretiert, sondern verbleibt im Zytoplasma (Cowell *et al.*, 1979). Seine Bedeutung für die Pathogenese ist noch unklar, es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Injektion von aufgereinigtem DNT in Mäusen zum Tode führt (Livey & Wardlaw, 1984). Die katalytische Untereinheit des strukturell typischen AB-Toxins zeigt *in vitro* Deaminierungs- bzw. Polyaminierungsaktivität gegenüber einem Glutaminrest der kleinen GTPase Rho, wodurch diese konstitutiv aktiviert wird (Schmidt *et al.*, 1999; Masuda *et al.*, 2000). Dies hat eine Störung der Signaltransduktion zur Folge und führt letztendlich zu extremen Veränderungen in der Morphologie und Differenzierung der Wirtszelle. Dennoch erscheinen DNT-defiziente Mutanten von *B. pertussis* im Mausmodell genauso virulent wie der Wildtyp (Weiss & Goodwin, 1989).

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Proteintoxinen ist das **Tracheale Zytotoxin** (TCT) ein Disaccharid-Tetrapeptid und ursprünglich Bestandteil des Peptidoglycans. Es entsteht beim Ab- und Umbau der Zellwand während des Zellwachstums und kann aufgrund eines Gendefekts nicht wiederverwertet werden, sondern wird in den Überstand abgegeben (Cookson *et al.*, 1989a; Cookson *et al.*, 1989b). Dadurch wird es konstitutiv gebildet und unterliegt nicht der Kontrolle durch das BvgAS-System. Die toxische Wirkung von TCT richtet sich gegen zilienträgende Epithelzellen des Respirationstrakts, indem deren DNA-Synthese inhibiert und die Produktion von Interleukin-1 α stimuliert wird, was wiederum zu einer vermehrten Bildung des toxischen Stickstoffmonoxids führt (Heiss *et al.*, 1993a; Heiss *et al.*, 1993b; Flak & Goldman, 1999).

Das **LPS** des Peptidoglycans wirkt synergistisch mit TCT und den anderen Toxinen (Flak *et al.*, 2000). Außerdem besitzt es endotoxische Aktivität und scheint eine wichtige Rolle in der Funktion der äußeren Membran und der Resistenz gegenüber Antibiotika zu spielen (Turcotte *et al.*, 1997).

1.3.3. Weitere Faktoren

Neben den Adhäsinen und Toxinen verfügen *Bordetella*-Arten noch über weitere Faktoren, welche zur Virulenz beitragen können. So ermöglicht es z. B. ein **Typ III-Sekretionssystem** Gram-negativen Pathogenen, Effektorproteine in das extrazelluläre Milieu oder direkt in das Zytoplasma der Wirtszellen zu exportieren. Strukturell besteht ein Typ III-Sekretionssystem aus einem Proteinkomplex, der beide bakterielle Membranen durchzieht und eine Verbindung mit der Membran der Zielzelle aufbaut (Cheng & Schneewind, 2000). Die transferierten

Effektorproteine können eine Vielzahl an physiologischen Prozessen der Wirtszelle stören (Galan & Collmer, 1999). Die bisher identifizierten Typ III-Sekretionssysteme der Bordetellen werden durch das BvgAS-System reguliert (Cummings *et al.*, 2006). Allerdings ist nur das Typ III-Sekretionssystem aus *B. bronchiseptica* funktional charakterisiert, da bei *B. pertussis*-Laborstämmen eine post-transkriptionelle Hemmung stattfindet (Mattoo *et al.*, 2004; Fennelly *et al.*, 2008). Die genaue Art und Funktion der Effektorproteine ist noch unzureichend charakterisiert, jedoch scheinen sie zur Immunevasion des Erregers beizutragen. So konnte gezeigt werden, dass Deletionsmutanten des Typ III-Sekretionssystems von *B. bronchiseptica* einen Defekt in der Langzeitkolonisierung der Mastrachea aufweisen (Yuk *et al.*, 2000). Außerdem sind diese Mutanten nicht mehr effektiv in der Lage, Apoptose in Makrophagen auszulösen.

Die Anwesenheit einer **Kapsel** ermöglicht es Pathogenen, spezifische Strukturen auf der Zelloberfläche, welche durch das Immunsystem erkannt werden könnten, zu maskieren. Außerdem erschweren die Polysaccharide der Kapsel es schädlichen Stoffen, in die Bakterienzelle zu gelangen. Bereits früh nach der Entdeckung von *B. pertussis* wurde beschrieben, dass der Keim eine Kapsel besitzt. Später konnte nachgewiesen werden, dass das *B. pertussis*-Genom ein komplettes Operon für die Kapselsynthese aufweist, welches Gene für den Transport der Untereinheiten und die Synthese der Polysaccharidkapsel sowie deren Lipidmodifikation enthält (Antoine *et al.*, 2000a). Die Regulation der Kapselsynthese unterliegt der Kontrolle des BvgAS-Systems (Weiss *et al.*, 1989).

Eisenaufnahmesysteme sind von großer Bedeutung für Pathogene, da der Wirt generell als eisenarme Umgebung anzusehen ist und eine effiziente Versorgung mit Eisen für eine Langzeitkolonisierung unabdingbar ist. *B. pertussis* produziert das Siderophor Alcaligin. Die an dessen Biosynthese beteiligten Gene sind im *alcABCDE*-Operon zusammengefasst (Pradel *et al.*, 1998). Die Kontrolle der Alcaligin-Produktion unterliegt nicht dem BvgAS-System, sondern dem AlcR-Regulator unter eisenarmen Bedingungen (Beaumont *et al.*, 1998; Kang & Armstrong, 1998). Das 79 kDa große Außenmembranprotein FauA dient als Rezeptor für eisenhaltiges Alcaligin (Brickman & Armstrong, 1999), die Internalisierung des Siderophors wird durch das TonB/ExbBD-System vermittelt. Interessanterweise sind TonB-defiziente Mutanten deutlich in ihrer Kolonisierungsfähigkeit beeinträchtigt, während *alcABCDE*-Mutanten genauso virulent sind wie der Wildtyp (Pradel *et al.*, 1998; Pradel *et al.*, 2000). Dies deutet darauf hin, dass die Versorgung mit Eisen nicht von Alcaligin allein abhängig ist. Das Genom von *B. pertussis* weist zehn putative Siderophorrezeptoren auf, welche vermutlich an der Eisenaufnahme aus exogenen Quellen beteiligt sind (Beall & Hoenes, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass BfeA als Enterobactinrezeptor fungiert und BhuR die Aufnahme von Hämoglobin bzw. Hämin ermöglicht (Beall & Sanden, 1995; Vanderpool & Armstrong, 2001; Mocny *et al.*, 2007).

1.4. Das BvgAS-System

Zwei-Komponentensysteme sind Signaltransduktionssysteme, welche in Eubakterien weit verbreitet sind, aber auch in Archaeobakterien und niederen Eukaryoten vorkommen können (Loomis *et al.*, 1998). Wie der Name besagt, bestehen sie aus zwei Komponenten: einer Sensor kinase und dem zugehörigen Regulatorprotein. Die Sensor kinase kann membranständig oder zytoplasmatisch vorliegen und dient der Wahrnehmung des für das System spezifischen Reizes, z. B. Veränderungen der Temperatur, des pH-Werts, der Osmolarität, des Sauerstoffpartialdrucks, der Nährstoffkonzentration etc. (Stock *et al.*, 1990). Als Antwort auf ein Umweltsignal lagern sich zwei Homodimere der Sensor kinase zusammen und katalysieren die Übertragung des γ -Phosphorylrests von ATP auf einen konservierten Histidinrest in der Transmitterdomäne der jeweils anderen Sensor kinase. Die Phosphatgruppe wird daraufhin auf einen konservierten Aspartatrest in der Receiverdomäne des Response Regulators übertragen, was zu Konformationsänderungen in dessen Outputdomäne führt. Dies beeinflusst die DNA-Bindfähigkeit des Response Regulators und macht ihn für die globale Regulation der Genexpression verantwortlich. Die Hydrolyse der Phosphatgruppe schaltet das System ab, was durch Autophosphataseaktivität innerhalb des Response Regulators oder der Sensor kinase vermittelt wird (Stock *et al.*, 2000). In diesem Sinne vermitteln Zwei-Komponentensysteme eine schnelle Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen und ermöglichen dadurch das Überleben in verschiedenen Habitaten.

Das BvgAS-(*Bordetella virulence gene*)-Zwei-Komponentensystem kontrolliert die Expression von mehr als 250 Genen, darunter die meisten der in 1.3. beschriebenen Virulenzfaktoren (Cummings *et al.*, 2006).

1.4.1. Phasenvariation und phänotypische Modulation

Schon früh in der Forschungsgeschichte der Bordetellen wurde beobachtet, dass die Expression der Virulenzeigenschaften bei *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* nicht stabil ist (Leslie & Gardner, 1931). Die Bildung dieser avirulenten Phänotypen konnte auf das BvgAS-System zurückgeführt werden und kann nach zwei unterschiedlichen Mechanismen erfolgen.

Die sogenannte **Phasenvariation** bezeichnet den spontanen Verlust der Virulenzeigenschaften in *B. pertussis*- und *B. bronchiseptica*-Isolaten, der *in vitro* mit einer Frequenz von 10^{-3} bis 10^{-6} vorkommt (Weiss & Falkow, 1984). Dieses Phänomen tritt durch verschiedene, meist irreversible Mutationen im *bvgAS*-Lokus auf. Während bei *B. bronchiseptica*-Isolaten meist kleine Deletionen (50 - 500 bp) im *bvgS*-Gen für die Phasenvariation verantwortlich sind, entstehen *B. pertussis*-Phasenvarianten durch eine Verschiebung im BvgS-Leserahmen (Monack *et al.*, 1989; Stibitz *et al.*, 1989). Molekulare Grundlage dieser

Leserahmenverschiebung sind Erweiterungen und Reduktionen in einem homopolymeren Bereich des *bvgS*-Gens (Gogol *et al.*, 2007).

Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der **phänotypischen Modulation** um einen reversiblen Verlust der Virulenzeigenschaften, der unter bestimmten Wachstumsbedingungen auftritt (Lacey, 1960). Diese modulierenden Bedingungen werden durch die Anwesenheit von Sulfationen oder Nikotinsäure im Nährmedium sowie bei Kultivierung der Bakterien bei niedriger Temperatur (25°C) charakterisiert (Melton & Weiss, 1989; Prugnola *et al.*, 1995). Auch dieses Phänomen ist auf das BvgAS-System zurückzuführen (Gross & Rappuoli, 1989b; Miller *et al.*, 1992). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eventuell auch die Osmolarität des Mediums eine Rolle bei der Modulation spielt (Stenson & Pepler, 2007).

1.4.2. Struktur des BvgAS-Systems und Signaltransduktion

Das BvgAS-System der Bordetellen zählt zu den unorthodoxen Zwei-Komponentensystemen, da es im Gegensatz zu den klassischen Zwei-Komponentensystemen strukturell komplexer aufgebaut ist. So weist es einen vierstufigen His-Asp-His-Asp-Phosphotransfer zwischen der Sensor kinase BvgS und dem Response Regulator BvgA auf (s. Abb. 3; Uhl & Miller, 1994; Uhl & Miller, 1996a; Perraud *et al.*, 1999).

BvgS ist die zum System gehörige Histidinkinase. Sie ist 135 kDa groß, membranständig und aus mehreren Domänen aufgebaut. Der N-terminale Inputbereich ist über zwei Transmembransegmente im Periplasma verankert und besitzt zwei Domänen, welche Homologie zu bakteriellen, periplasmatischen Bindeproteinen aufweisen und sich durch die Ausbildung von zweilappigen, Venusfliegenfallen-artigen (VFT) Strukturen auszeichnen (Herrou *et al.*, 2009). Der C-terminale Teil von BvgS befindet sich im Zytoplasma und beinhaltet eine PAS-, eine Transmitter-, eine Receiver- und eine Histidin-beinhaltende Phosphotransfer-(HPt)-Domäne (Stibitz & Yang, 1991; Beier *et al.*, 1996). PAS ist ein Akronym aus den Proteinen, in welchen eine solche Domäne zuerst entdeckt wurde: dem PER-Protein in *Drosophila*, dem ARNT-Protein in Vertebraten und dem SIM-Protein in *Drosophila*. Es sind ubiquitär verbreitete, zytosolische Signaldomänen, die auf so vielfältige Reize wie Licht, Sauerstoffpartialdruck, kleine Liganden (z. B. FAD) und Redoxzustand reagieren können (Taylor & Zhulin, 1999). Für das BvgS-Protein von *B. pertussis* konnte gezeigt werden, dass es *in vitro* in der Lage ist, den Oxidationszustand von Ubichinon wahrzunehmen, was auf eine Verknüpfung mit der Atmungskette und dem Energiezustand der Zelle hindeutet (Bock & Gross, 2002). Die Transmitter-Domäne von BvgS enthält den konservierten Histidinrest H⁷²⁹, an welchem es *in vitro* unter nicht-modulierenden Bedingungen zur ATP-abhängigen Autophosphorylierung der beiden BvgS-Homodimere kommt. Die Phosphatgruppe wird anschließend auf den Aspartatrest D¹⁰²³ in der Receiver-Domäne von BvgS übertragen (Uhl & Miller, 1994). An dieser Stelle erfolgt

die Feinregulation des Signals: die Phosphatgruppe kann entweder auf den Histidinrest H¹¹⁷² der HPT-Domäne übertragen oder durch Hydrolyse als Orthophosphat freigesetzt werden (Uhl & Miller, 1996a). Die C-terminale HPT-Domäne ist für die spezifische Übertragung der Phosphatgruppe auf den Aspartatrest D⁵⁴ der BvgA-Receiver-Domäne zuständig (Uhl & Miller, 1996b; Perraud *et al.*, 1998).

Der Response Regulator **BvgA** ist 23 kDa groß und besitzt eine N-terminale Receiver-Domäne sowie eine C-terminale DNA-Bindedomäne mit Helix-Turn-Helix-(HTH)-Motiv (Arico *et al.*, 1989). BvgA liegt unabhängig vom Phosphorylierungszustand als Dimer vor, bindet jedoch in phosphorylierter Form mit erhöhter Affinität an spezifische Zielsequenzen in BvgAS-abhängigen Promotoren (Boucher *et al.*, 1994; Steffen *et al.*, 1996; Perraud *et al.*, 2000). Abbildung 3 zeigt den schematischen Aufbau des BvgAS-Systems.

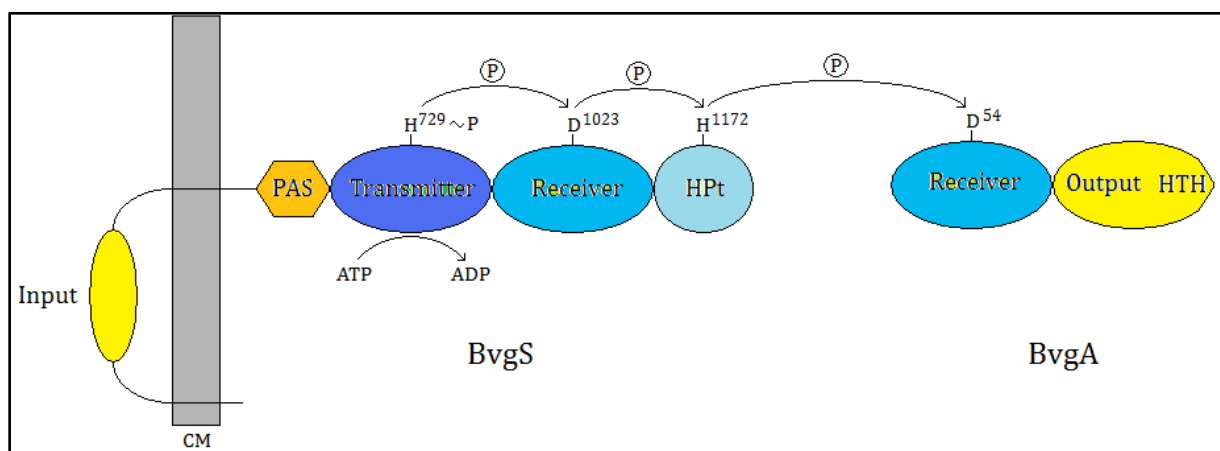


Abb. 3: Schematische Darstellung des BvgAS-Systems und des Phosphorelays. Die Histidinkinase BvgS ist über zwei Transmembrandomänen in der Zytoplasmamembran (CM) verankert. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen den vierstufigen His-Asp-His-Asp-Transfer der Phosphatgruppe (P) auf den Response Regulator BvgA. Beide Proteine sind als Monomer dargestellt. PAS: PAS-Domäne, HPT: Histidin-beinhaltende Phosphotransfer-Domäne, HTH: Helix-Turn-Helix-Motiv.

Wie bereits erwähnt (s. II 1.4.1.), reagiert das BvgAS-System *in vitro* auf Temperaturänderungen und auf die Anwesenheit von Sulfationen bzw. Nikotinsäure. Durch strukturelle Analysen konnte gezeigt werden, dass die VFT2-Domäne konstitutiv geschlossen ist und somit die Fähigkeit zur Bindung von agonistischen Liganden verloren hat, wodurch die Histidinkinase im aktiven Zustand verbleibt (Herrou *et al.*, 2010). Die Bindung antagonistischer Faktoren, wie z. B. Sulfationen und Nikotinsäure, bewirkt das Öffnen der VFT2-Domäne und damit eine negative Modulation der Histidinkinase. Welche Signale das BvgAS-System *in vivo* wahrnimmt und wie diese in Zusammenhang mit den Beobachtungen *in vitro* zu bringen sind, muss noch geklärt werden.

1.4.3. Transkriptionelle Genregulation durch das BvgAS-System

Das BvgAS-System ist direkt und indirekt an der Aktivierung und Repression einer Reihe von Genen beteiligt wie z. B. der bereits aufgezählten Virulenzfaktoren. Expressionsanalysen haben für *B. bronchiseptica* und *B. pertussis* insgesamt 288 Bvg-aktivierte und 250 Bvg-reprimierte Gene identifiziert, was auf eine große Komplexität des BvgAS-Regulons schließen lässt. Zusätzlich weist *B. bronchiseptica* noch 262 Gene auf, welche in einem intermediären Stadium exprimiert werden (Cummings *et al.*, 2006). Je nach Aktivität des BvgAS-Systems lassen sich demnach drei phänotypische Phasen charakterisieren: die virulente Bvg⁺-Phase, die intermediäre Bvgⁱ-Phase und die avirulente Bvg⁻-Phase (Cotter & Miller, 1997; Cotter & Jones, 2003).

Die **Bvg⁺-Phase** zeichnet sich durch die Expression der sogenannten *vag*-(*v*irulence *a*ctivated *g*enes)-Gene aus. Hierzu zählen die Virulenzfaktoren FHA, PRN, FIM, BrkA, CYA, das Typ III-Sekretionssystem sowie in *B. pertussis* die Toxine PTX und TCF (Antoine *et al.*, 2000a/b). Das *bvgAS*-Operon gehört ebenfalls zu den *vag*-Genen und unterliegt der Autoregulation (Roy *et al.*, 1990; Scarlato *et al.*, 1990; Roy & Falkow, 1991). In der Bvg⁺-Phase wird zudem der BvgR-Repressor exprimiert, welcher an der Repression der sogenannten *vrg*-(*v*irulence *r*epressed *g*enes) beteiligt ist (Merkel *et al.*, 1998a; Merkel *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu *B. pertussis* scheint in *B. bronchiseptica* die Beteiligung des BvgAS-Systems an Stoffwechselfvorgängen von größerer Bedeutung zu sein. Hier kommt es in der Bvg⁺-Phase zur Expression von Glutamin- und Ammonium-Transportern, Enzymen des Laktat- und Fettsäure-Stoffwechsels sowie von Genen der Elektronentransportkette (Cummings *et al.*, 2006).

Die phosphorylierte Form des BvgA-Response Regulators (BvgA~P) ermöglicht in der Bvg⁺-Phase die Aktivierung der *vag*-Gene (Steffen *et al.*, 1996). Die Bindung von BvgA~P an die Promotorregion erfolgt an spezifischen DNA-Stellen mit der Konsensussequenz 5'-T/A T T C C/T T A -3'. Dieses Heptamer kann variieren und entweder als direct repeat (DR) oder inverted repeat (IR) vorliegen, wobei der Abstand zwischen den beiden Halbseiten unterschiedlich lang sein kann (Roy & Falkow, 1991; Karimova & Ullmann, 1997; Marques & Carbonetti, 1997). Die Varianz innerhalb dieser Bindestelle ist vermutlich Grundlage für die unterschiedliche Affinität gegenüber BvgA~P (Cummings *et al.*, 2006). Die meisten Bvg-abhängigen Promotoren weisen mehrere BvgA-Bindestellen auf: eine primäre und eine bzw. mehrere sekundäre Bindestellen. Die primäre Bindestelle wird zuerst mit hoher Affinität besetzt, was zu einer Oligomerisierung und Akkumulation weiterer BvgA-Dimere führt (Boucher & Stibitz, 1995; Boucher *et al.*, 1997). Diese binden daraufhin an die weniger affinen, sekundären Bindestellen (Boucher *et al.*, 2001a/b). Das BvgA-Dimer, welches an die sekundäre Bindestelle gekoppelt ist, vermittelt die Interaktion mit der α -Untereinheit der RNA-Polymerase und führt somit zur Transkriptionsaktivierung (Boucher *et al.*, 1997).

Je nach Affinität der Bindestellen weisen die Promotoren unterschiedliche Aktivierungskinetik auf und lassen sich danach in „frühe“ bzw. „späte“ Gene einteilen (Scarlato *et al.*, 1991). Späte Gene zeichnen sich dadurch aus, dass ihre BvgA-Bindestellen tendenziell von der Konsensussequenz abweichen und in variablen Abständen liegen (Karimova *et al.*, 1996; Zu *et al.*, 1996). Für die Aktivierung ihrer Promotoren wird eine zehnfach höhere Konzentration an BvgA~P benötigt als bei Promotoren mit hochaffinen BvgA-Bindestellen, wie sie die frühen Gene aufweisen. Zu den frühen Genen zählen *fhaB*, *bvgAS* und *bvgR*, welche bereits wenige Minuten nach einem Shift von modulierenden zu nicht-modulierenden Bedingungen transkribiert werden. Dies könnte mit der Funktion der zugehörigen Proteine in der frühen Phase der Infektion zusammenhängen. Im Gegensatz dazu erfordert die Expression der späten Gene, wie z. B. *ptx* und *cya*, erhöhte Mengen an BvgA~P, wie sie erst nach mehreren Stunden vorkommen. Die Funktion dieser Genprodukte ist demnach bei der Etablierung der Infektion in späteren Phasen von Bedeutung (Scarlato *et al.*, 1991; Veal-Carr & Stibitz, 2005).

Eine weitere phänotypische Phase ist die avirulente **Bvg-Phase**, welche unter modulierenden Bedingungen, d.h. Wachstum bei niedrigen Temperaturen bzw. in Anwesenheit von Sulfationen oder Nikotinsäure, auftritt. In dieser Phase kommt es zur Aktivierung der *vrg*- (*v*irulence *r*epressed *g*enes)-Gene. Die Induktion der *vrg*-Gene erfolgt dabei indirekt durch den Abbau des BvgR-Repressors. Dieser wird BvgA-abhängig exprimiert und reprimiert manche *vrg*-Gene in der Bvg⁺-Phase durch Bindung an entsprechende Konsensussequenzen (Merkel *et al.*, 1998a). Bei Übergang in die Bvg-Phase wird das *bvgR*-Transkript schnell abgebaut und es kommt zur Expression der *vrg*-Gene unter modulierenden Bedingungen (Merkel *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zu den *vag*-Genen sind die *vrg*-Genprodukte kaum charakterisiert. In *B. pertussis* konnten bislang 22 BvgAS-reprimierte Faktoren mittels 2D-Gelelektrophorese und Transposonmutagenese aufgezeigt werden. Dazu zählen die Oberflächenproteine VraA und VraB, deren Funktion unklar ist (Knapp & Mekalanos, 1988; Stenson & Peppler, 1995). Über die Funktion der *vrg*-Gene bei *B. bronchiseptica* ist dagegen mehr bekannt. Einige der *vrg*-Genprodukte sind wichtige Faktoren des Stoffwechsels, z. B. im Fettsäuremetabolismus, im Glyoxylatzyklus oder im Abbau aromatischer Aminosäuren (Cotter & Miller, 2000; Schneider *et al.*, 2002). Auch die Urease und einige Enzyme der Alcaligin-Biosynthese werden vermehrt in der Bvg-Phase gebildet (Giardina *et al.*, 1995; McMillan *et al.*, 1996). Die Motilität ist in *B. bronchiseptica* ein typisches Merkmal für die Bvg-Phase. Dabei wird die BvgA-vermittelte Reprimierung des *frlAB*-Operons inhibiert, welches für den Masterregulator der Flagellenexpression kodiert (Akerley *et al.*, 1993; Akerley *et al.*, 1995).

Die intermediäre **Bvgi-Phase** tritt bei submodulierenden Bedingungen auf, z. B. durch Anwesenheit von 0.4 mM bis zu 20 mM Nikotinsäure im Kulturmedium (Cotter & Miller, 2000; Cummings *et al.*, 2006). Bei zunehmender Nikotinsäurekonzentration nimmt dabei die Konzentration an BvgA~P ab, was zu einer interessanten Kinetik der Bvg-regulierten Gene führt:

Es kommt zur Expression der frühen *vag*-Gene, zur Repression der *vrg*-Gene, sowie zur Aktivierung einiger Bvgⁱ-spezifischer Faktoren (Cotter & Miller, 1997; Jones *et al.*, 2005). Hierzu zählt das BipA-Protein (Bvg intermediate phase protein A), dessen Funktion bislang noch unklar ist. Sein N-Terminus weist jedoch Ähnlichkeit zu Intimin, einem Adhäsion aus enteropathogenen *E. coli*, und zum Invasin von *Yersinia* spp. auf (Stockbauer *et al.*, 2001). Die *bipA*-Promotorregion weist insgesamt fünf BvgA-Bindestellen auf: zwei hochaffine Bindestellen stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts und drei niedrigaffine Bindestellen stromabwärts des Transkriptionsstartpunkts. In der Bvgⁱ-Phase wird die Transkription von *bipA* über BvgA~P-Bindung an dessen hochaffine Bindestellen aktiviert. Dagegen akkumuliert BvgA~P in der Bvg⁺-Phase und bindet an die niedrigaffinen Bindestellen, wodurch die Transkription reprimiert wird (Cotter & DiRita, 2000; Deora *et al.*, 2001; Deora *et al.*, 2002; Mishra & Deora, 2005). In *B. pertussis* ist die Zahl der intermediären Gene deutlich geringer als in *B. bronchiseptica*, wo die Phase nochmals in zwei regulatorische Klassen unterteilt werden kann. Bvgⁱ-a tritt bei einer Nikotinsäurekonzentration von 0.4 bis 0.6 mM auf. Hier kommt es zur Expression der frühen *vag*-Gene, sowie 69 weiterer Gene (Cummings *et al.*, 2006). In Bvgⁱ-b (0.8 bis 1.2 mM Nikotinsäure) kommt es zur Expression von 193 weiteren Genen.

Welche Rolle die drei phänotypischen Phasen im Infektionszyklus von *Bordetella* spp. spielen, ist noch unklar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Aktivierung der *vag*-Gene sowie die Repression der *vrg*-Gene essentiell für eine erfolgreiche Kolonisierung des Respirationstrakts sind (Akerley *et al.*, 1995; Merkel *et al.*, 1998b). Versuche mit Mutanten, welche in der Bvg⁺-Phase arretiert waren, zeigten, dass diese Phase notwendig und auch ausreichend für die Etablierung einer Infektion im Tiermodell ist (Cotter & Miller, 1994; Martinez de Tejada *et al.*, 1998). Deshalb stellt sich die Frage, welche *in vivo*-Relevanz die Bvgⁱ- und die Bvg⁺-Phase aufweisen.

B. bronchiseptica ist im Gegensatz zu *B. pertussis* und *B. parapertussis* in der Lage, außerhalb eines Wirtsorganismus, wie z. B. in PBS oder in Teichwasser, kurzzeitig zu überleben (Porter & Wardlaw, 1993). Dabei hat sich gezeigt, dass Phasenvarianten von *B. bronchiseptica* resistenter gegen widrige Umweltbedingungen sind. Da die Bvg⁺-Phase *in vitro* auch durch niedrige Temperaturen eingeleitet wird, scheint diese Phase bzw. die Expression der *vrg*-Gene, zu denen bei *B. bronchiseptica* zahlreiche Stoffwechsellzyme, Motilitätsfaktoren etc. gehören, dem Organismus beim Überleben im Umweltreservoir und unter Nährstoffmangel zu helfen (Cotter & Miller, 1997; Banemann *et al.*, 1998; Bock & Gross, 2002). Dies spricht dem BvgAS-System die Rolle eines Sensors zu, welcher es einem fakultativ pathogenen Vorfahren der Bordetellen ermöglichen könnte, zwischen dem Aufenthalt in der Umwelt und im Wirt zu unterscheiden (Gerlach *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu *B. bronchiseptica* sind die humanpathogenen Erreger *B. pertussis* und *B. parapertussis* aufgrund ihres größeren Virulenzpotentials nicht mehr darauf angewiesen, längere Zeit außerhalb eines Wirts zu

überleben. Demnach war der Selektionsdruck zur Erhaltung der Bvg-Phase in diesen Arten gering und stellt vermutlich nur ein evolutives Überbleibsel dar (Cotter & Miller, 2000; Stockbauer *et al.*, 2001).

Für die Bvg-Phase wird vermutet, dass diese Phase eventuell bei der Transmission über Aerosolbildung und damit der Etablierung neuer Infektionen von Bedeutung ist (Cotter & Jones, 2003; Vergara-Irigaray *et al.*, 2005). Die intermediäre Phase bei *B. bronchiseptica* ist deutlich komplexer, was vermutlich die Kolonisierung eines breiteren Spektrums an Wirtsnischen erleichtert, z. B. im Nasen-Rachenraum, wo Temperaturschwankungen auftreten, oder im Schleim des Respirationsepithels, wo mikroaerophile Bedingungen herrschen können (Beier & Gross, 2006; Cummings *et al.*, 2006).

1.5. Biofilmbildung bei *Bordetella*-Arten

Ein Biofilm ist generell definiert als ein sessiler Zusammenschluss von Mikroorganismen, der aus irreversibel an Oberflächen oder aneinander gebundenen Zellen einer oder mehrerer Arten besteht (Donlan & Costerton, 2002). Eingebettet ist der Biofilm in einer von den Zellen selbst produzierten, extrazellulären polymeren Substanz (EPS), welche aus vielfältigem, organischem Material aufgebaut sein kann (Branda *et al.*, 2005). Ferner wird den Biofilmen immer mehr Bedeutung im Lebenszyklus verschiedener Bakterien eingeräumt und sie scheinen die bevorzugte Lebensform der meisten Mikroorganismen in natürlichen Habitaten zu sein (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

1.5.1. Allgemeines zum Biofilm

Die Bildung eines Biofilms wird in fünf diskrete Schritte eingeteilt und ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

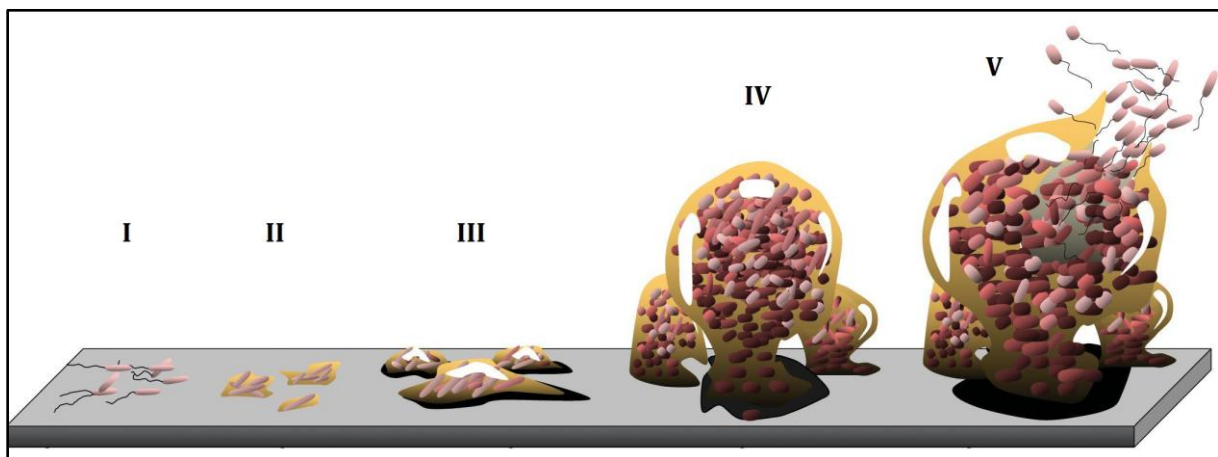


Abb. 4: Schematische Darstellung der Phasen in der Biofilmbildung (Monroe, 2007). I = initiale Anheftung, II = irreversible Anheftung, III = Bildung von Mikrokolonien, IV = Biofilmmreifung, V = Biofilmbilösung.

Die initiale Anheftung (I) ist die reversible Bindung planktonischer Zellen an ein Substrat, welche durch zufällige Kollision oder durch aktive Bewegung der Mikroorganismen zum Substrat hin hervorgerufen werden kann. Daraufhin erfolgt die irreversible Anheftung (II) der Mikroorganismen, ein Prozess, der durch verschiedenartige Oberflächenstrukturen vermittelt werden kann (Davey & O'Toole, 2000). Die Umweltbedingungen, welche den Wechsel von planktonischer zu oberflächengebundener Lebensweise auslösen, variieren zwischen verschiedenen Organismen. Als Umweltsignale konnten bereits Oberflächenart, Osmolarität, pH-Wert, Eisenverfügbarkeit, Sauerstoffpartialdruck und Temperatur nachgewiesen werden (Fletcher, 1996; O'Toole & Kolter, 1998). Nach der Anlagerung an das Substrat beginnen sich die Zellen zu teilen und sogenannte Mikrokolonien auf dem Substrat zu bilden (III). Wichtig dabei ist die stabile Verbindung der Zellen untereinander durch Adhäsine oder durch extrazelluläre polymere Substanzen. Hauptbestandteile dieser Biofilmmatrix sind meist Polysaccharide und Proteine, es konnten jedoch auch extrazelluläre DNA und Lipide als zusätzliche Faktoren nachgewiesen werden (Sutherland, 2001; Whitchurch *et al.*, 2002). Im Anschluss folgt die Biofilmreifung (IV). Die Mikrokolonien können dabei zu verschiedenartigen Formen auswachsen, welche nach ihrer Form als Pilze, Pfeiler oder Sphären bezeichnet werden (Costerton *et al.*, 1995; Klausen *et al.*, 2003). Dabei ist die Struktur nicht kompakt, sondern von Wasserkanälen und Poren durchzogen, die als eine Art Kreislauf den Transport von Nährstoffen und Sauerstoff sowie den Abtransport von Abfallstoffen aus den unteren Schichten gewährleisten (Stoodley *et al.*, 1994; Stoodley *et al.*, 1999). Die Biofilmbilösung (V) schließt den Zyklus ab und bezeichnet das Ablösen und Streuen von Zellen aus dem Biofilm. Dieser Prozess kann entweder durch physikalische Scherkräfte, die zur Disruption des Biofilms führen, ausgelöst werden oder durch den Abbau der Biofilmmatrix durch EPS-degradierende Enzyme oder Proteasen, welche endogen im Biofilm produziert werden und damit einen aktiven Prozess darstellen (Boyd & Chakrabarty, 1994; Kaplan *et al.*, 2003a; Kaplan *et al.*, 2003b).

Für Mikroorganismen bietet das Leben im Biofilm einige Vorteile (Davey & O'Toole, 2000). So herrscht im Biofilm ein gewisses Maß an Homöostase und dieser bietet den dort lebenden Mikroorganismen Schutz vor feindlichen Umweltsubstanzen, u.a. Antibiotika, was vor allem durch die den Biofilm umgebende Matrix und das darin enthaltene EPS gewährleistet wird. So konnte nachgewiesen werden, dass Bakterien sich in Biofilmen bis zu 1.000fach resistenter gegenüber Antibiotikabehandlung zeigen als planktonische Zellen (Gilbert *et al.*, 1997). Dies ist in Hinblick auf diverse Krankheiten, welche durch in Biofilmen lebende Bakterien ausgelöst werden, ein bedeutendes Faktum. Als Beispiele dienen Lungeninfektionen in Zystischer Fibrose-Patienten durch *Pseudomonas aeruginosa*, Mittelohrentzündungen ausgelöst durch *Haemophilus influenzae* und dentale Plaques durch *Streptococcus* spp. (Pier, 1998; Post, 2001; Marsh, 2003). Erschwerend kommt hinzu, dass Biofilminfektionen selten vom Immunsystem beseitigt werden können. Obwohl die Bakterien Antigene freisetzen und die Produktion von Antikörpern

stimulieren, sind sie vor dem Immunsystem geschützt (Costerton *et al.*, 1999). So konnte für *P. aeruginosa* gezeigt werden, dass Zellen im Biofilm durch die umgebende Matrix vor der Phagozytose durch Neutrophile und der Komplementaktivierung geschützt sind (Jensen *et al.*, 1993; Jesaitis *et al.*, 2003; Vuong *et al.*, 2004).

1.5.2. Biofilm bei *Bordetella* spp.

Als erstem Vertreter der Gattung *Bordetella* konnte 2004 für *B. bronchiseptica* nachgewiesen werden, dass der Keim *in vitro* zur Biofilmbildung fähig ist (Irie *et al.*, 2004). Der Biofilm ist dabei in der Bvg⁺-Phase nur schwach, in der Bvgⁱ-Phase dagegen stärker ausgeprägt, was auf eine Beteiligung des BvgAS-Systems bei der Regulation hindeutet. *B. bronchiseptica*-Zellen im Biofilm zeigten sich zudem um 160 bis 1.000fach resistenter gegenüber diversen Antibiotika (Mishra *et al.*, 2005). Auch für die weiteren Mitglieder des *B. bronchiseptica*-Clusters, *B. parapertussis* und *B. pertussis* konnte gezeigt werden, dass sie zur Biofilmbildung fähig sind und diese durch das BvgAS-System reguliert wird.

Die Biofilmmatrix von *B. bronchiseptica* besteht größtenteils aus dem Kohlenhydrat Xylose (70 Mol %), es können jedoch auch Glukose, Lipide, Proteine und in sehr geringen Mengen extrazelluläre dsDNA nachgewiesen werden (Irie *et al.*, 2006). Die Produktion von Xylose geschieht dabei in Abhängigkeit von der Wachstumsphase und kumuliert in der stationären Phase. Da das für die asaccharolytischen *Bordetella*-Arten verwendete Stainer-Scholte-Medium keine Kohlenhydrate enthält, liegt die Vermutung nahe, dass *B. bronchiseptica* die Zuckerbestandteile der Matrix *de novo* aus anderen Kohlenstoffquellen im Medium, z. B. Glutamat und Casaminsäuren, mittels Glukoneogenese synthetisieren muss.

N-Acetyl-Glukosamin (GlcNAc) ist ein weiterer Bestandteil der Biofilmmatrix, vor allem in β -1,6-glykosidisch polymerisierter Form (Parise *et al.*, 2007). Durch Homologievergleich mit Loki aus anderen Organismen, welche für die Synthese von β -1,6-GlcNAc verantwortlich sind, z. B. *icaADBC* in *Staphylococcus* spp., *pgaABCD* in *E. coli* und *hmsHFRS* in *Yersinia pestis*, wurde der *bpsABCD*-Lokus in *B. bronchiseptica* (*Bordetella polysaccharide*) entdeckt. *bpsA* codiert, basierend auf der Vorhersage, für ein 661 AS großes Protein mit 4 Transmembrandomänen, welches 23 % Ähnlichkeit zu *hmsH* und *pgaA* auf Aminosäureebene aufweist. *bpsB* codiert für ein 701 AS-großes Protein mit Signalsequenz, welches wie das homologe IcaB aus *S. epidermidis* eine putative Polysaccharid-N-Deacetylase Domäne aufweist. BpsC gehört wie seine homologen Proteine PgaC und IcaA zur Glykosyltransferase 2-Familie. Die für die Glykosyltransferaseaktivität in IcaA wichtigen Aminosäuren sind auch in BpsC konserviert. *bpsD* zeigt keine signifikante Ähnlichkeit zu *icaD* und *pgaD*, scheint aber wie diese für ein kleines Protein zu kodieren. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Expression des *bpsABCD*-Lokus wichtig für die Bildung und/oder die Aufrechterhaltung der Mikrokolonien im Biofilm ist, nicht jedoch für die

initiale Anheftung. Die Wichtigkeit des *bpsABCD*-Lokus konnte durch *in vivo*-Experimente an Mäusen bestätigt werden (Sloan *et al.*, 2007). Dabei zeigte eine Δbps -Mutante eine deutlich verminderte Kolonisierungsfähigkeit der Lunge und Nasenhöhle.

Sowohl *B. pertussis* als auch *B. parapertussis* besitzen Homologe des *bpsABCD*-Lokus im Genom. In *B. pertussis* ist die Expression des *bpsABCD*-Lokus wichtig für die Bildung von Poly- β -1,6-GlcNAc und die Ausbildung eines Biofilms *in vitro* (Conover *et al.*, 2010). In dieser Studie konnte auch gezeigt werden, dass *B. pertussis* fähig ist, Biofilme im Nasenrachenraum von Mäusen auszubilden. Dabei scheint das exprimierte Bps essentiell für die Biofilmbildung im Nasenrachenraum und in der Trachea, jedoch nicht in der Lunge zu sein.

Durch Proteomvergleich zwischen planktonischen Zellen und Biofilm-Zellen von *B. pertussis* konnte gezeigt werden, dass ca. 8 % an zytosolischen Proteinen und 10 % an Membranproteinen differentiell zwischen den beiden Bedingungen exprimiert werden (Serra *et al.*, 2008). Bei den zytosolischen Proteinen waren dies vor allem Proteine, welche am zentralen oder intermediären Metabolismus, an Adaption und Stressantwort, sowie an regulatorischen Prozessen beteiligt sind. Zu den differentiell exprimierten Membranproteinen zählten Proteine, welche an Adhäsion, Transport und Substratbindung beteiligt sind. Zwei Proteine, welche für eine UDP-N-Acetyl-D-Galaktosamin Dehydrogenase (BP3150) und Phospho-Glukomutase (BP3141) kodieren, könnten an der Polysaccharidsynthese beteiligt sein. Diese Proteine sind homolog zu Vi-Antigen-Biosynthese-Enzymen in *S. Typhi* und können damit potentiell ein extrazelluläres N-Acetyl-Galaktosamuronsäure-ähnliches Polysaccharid produzieren (Virlogeux *et al.*, 1995). Interessanterweise konnte in dem Proteomvergleich auch eine Veränderung im Phosphorylierungsstatus des Response Regulators BvgA festgestellt werden, was wiederum eine Beteiligung des BvgAS-Systems bei der Regulation der Biofilmbildung impliziert.

Für *P. aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass auf Transkriptionsebene 1 % differentielle Expression zwischen planktonischer und Biofilm-Lebensweise besteht, jedoch zwischen 10 und 40 % auf Proteomebene (Whiteley *et al.*, 2001; Jouenne *et al.*, 2004). Diese Diskrepanz scheint auf post-transkriptionelle und post-translationale Regulationsmechanismen hinzudeuten.

2. Genregulation durch kleine nicht-kodierende RNAs

Kleine nicht-kodierende RNAs (sRNAs) sind in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt, da sie eine neue Klasse an Regulatoren der Genexpression darstellen, welche vornehmlich auf post-transkriptioneller Ebene wirkt (Storz *et al.*, 2004). Sie weisen eine durchschnittliche Länge von 50 - 400 Nukleotiden auf, deren Sequenz nicht für ein Protein kodiert. Neben tRNAs, rRNAs und mRNAs stellen sie eine weitere Klasse an RNA-Molekülen der

Zelle dar. Als RNA-Regulatoren vermitteln sie die Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen, indem Stoffwechselwege und Stressantworten moduliert werden (Waters & Storz, 2009). Dabei weisen die RNA-Regulatoren Vorteile gegenüber Proteinregulatoren auf: Sie sind schneller und unter weniger Energieaufwand für die Zelle zu produzieren, da sRNAs üblicherweise eine geringere Anzahl an Nukleotiden im Vergleich zu mRNAs aufweisen und der Translationsschritt entfällt. *Cis*-kodierte sRNAs vermitteln über ihre ausgeprägte Komplementarität hohe Spezifität der Regulation, während *trans*-kodierte sRNAs die Regulation verschiedener Gene und damit den Eingriff in physiologische Netzwerke ermöglichen. Ferner wirken RNA-Regulatoren ergänzend zu Proteinregulatoren und ermöglichen damit eine Vielfalt an regulatorischen Antworten. Transkriptionsfaktoren aktivieren bzw. inhibieren die Transkription und wirken somit vor den RNA-Regulatoren, während modifizierende Enzyme wie Kinasen und Proteasen nach den RNA-Regulatoren agieren (Waters & Storz, 2009).

2.1. Wirkungsmechanismen von sRNAs

Die Regulation der Genexpression durch sRNAs erfolgt generell über Basenpaarung der sRNA mit der jeweiligen Ziel-mRNA (Storz *et al.*, 2005). Dabei unterscheidet man zwei Klassen an sRNAs: *cis*-kodierte sRNAs, welche an demselben genetischen Locus wie die Ziel-mRNA, jedoch vom Gegenstrang, transkribiert werden und deshalb perfekte Basen-Komplementarität aufweisen. *Trans*-kodierte sRNAs hingegen werden von einem anderen genetischen Locus als ihre Ziel-mRNAs transkribiert und besitzen deswegen generell keine perfekte Komplementarität. Die Basenpaarung der jeweiligen sRNAs mit ihren Ziel-mRNAs hat vielfältige Auswirkungen wie Translationsinhibierung, Translationsaktivierung, Transkriptionstermination und mRNA-Degradation zur Folge (Waters & Storz, 2009).

Im 5'-untranslatierten Bereich (5'UTR) von mRNA-Molekülen kann es zudem oftmals zur Bildung regulatorischer Strukturen kommen, welche in Abhängigkeit von diversen Umweltsignalen, wie z. B. festgesetzte Ribosomen, unbeladene tRNAs, erhöhte Temperaturen oder Bindung kleiner Liganden, verschiedene Konformationen annehmen können (Grundy & Henkin, 2006). Leader-Sequenzen, welche kleine Metabolite binden und damit eine Konformationsänderung bewirken, werden als Riboswitches bezeichnet und sind oftmals an Aufnahme und Verbrauch des jeweiligen Metabolits beteiligt (Nudler & Mironov, 2004). Riboswitches bestehen aus zwei Teilen: der Aptamer-Region, welche die Ligandenbindung vermittelt, und der sogenannten Expressionsplattform, welche in der Lage ist, die Genexpression durch alternative RNA-Strukturen zu regulieren (Mandal & Breaker, 2004). Die Expressionsplattform bildet oftmals Haarnadelstrukturen, welche sich nach der Bindung des Liganden an der Aptamer-Region alternativ falten, was zur Bildung bzw. zum Aufbrechen von

transkriptionellen Terminatorstrukturen oder zur Freisetzung bzw. Blockade der Ribosomenbindestelle führen kann (Waters & Storz, 2009). Abbildung 5 stellt dies schematisch dar.

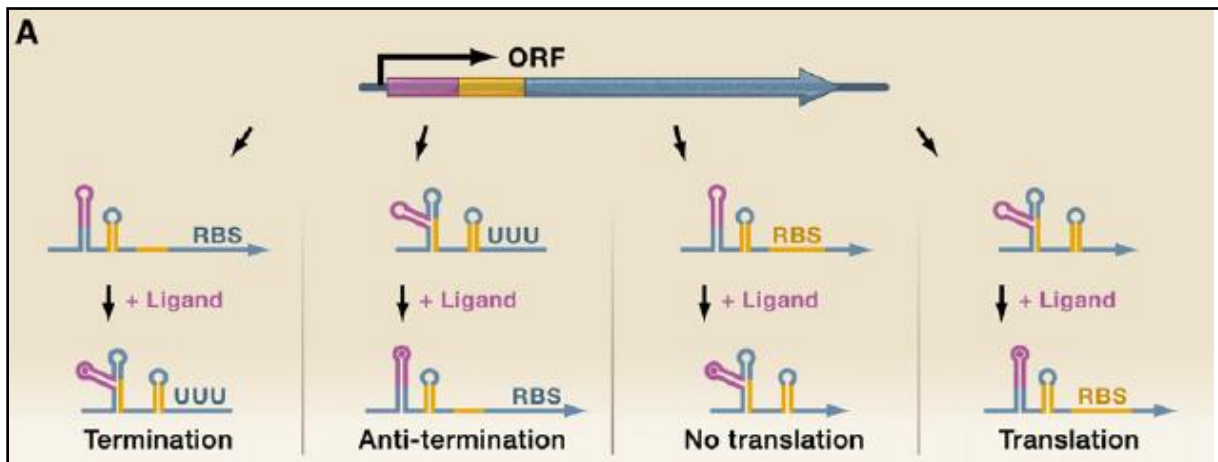


Abb. 5: Schematische Darstellung der Transkriptions- bzw. Translationskontrolle durch Ligandenbindung an Riboswitches im 5'-untranslatierten Bereich von mRNAs (Waters & Storz, 2009).

Im Folgenden soll nun näher auf sRNAs, welche über Basenpaarung an der Genregulation beteiligt sind, eingegangen werden.

2.2. Genregulation durch *cis*-kodierte sRNAs

Cis-kodierte sRNAs werden vom entgegengesetzten Strang der Ziel-mRNA transkribiert und weisen ausgeprägte Regionen (75 Nukleotide und mehr) mit perfekter Komplementarität auf. Am besten erforscht sind antisense-sRNAs, welche durch Bakteriophagen, Plasmide und Transposons exprimiert werden und über vielfältige Mechanismen zur Aufrechterhaltung einer konstanten Kopienzahl des jeweiligen genetischen Elements beitragen (Brantl, 2007; Wagner *et al.*, 2002). Über chromosomal *cis*-kodierte sRNAs ist weniger bekannt. Einige von ihnen üben eine inhibierende Wirkung auf mRNAs aus, welche für Proteine kodieren, die in hohen Mengen toxisch für die Zelle sind (Fozo *et al.*, 2008). Daneben gibt es antisense sRNAs, welche die Expression von Genen in einem Operon modulieren, so führt z. B. in *E. coli* die Basenpaarung der GadY-sRNA zur Spaltung der *gadXW*-mRNA und zu erhöhten Mengen an *gadX*-Transkript (Opdyke *et al.*, 2004).

Cis-kodierte sRNAs wirken im Allgemeinen, indem sie über Basenpaarung die Ribosomenbindestelle der Ziel-mRNA bedecken (s. Abb. 6). Dies inhibiert deren Translation und führt zum Abbau der Ziel-mRNA. In Operonstrukturen kann die Expression von *cis*-kodierten sRNAs zur Spaltung der Ziel-mRNA führen bzw. zur Transkriptionshinhibition der im Operon stromabwärts gelegenen Gene (Waters & Storz, 2009).

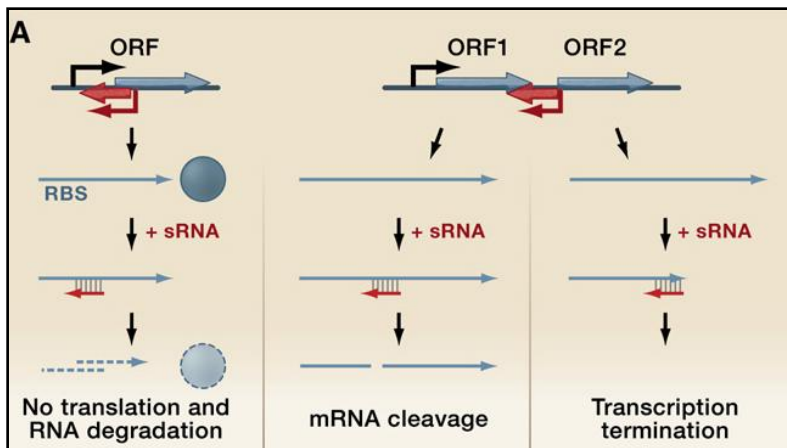


Abb. 6: Schematische Darstellung der Transkriptions- bzw. Translationskontrolle durch *cis*-kodierte sRNAs gegenüber ihren Ziel-mRNAs (Waters & Storz, 2009).

2.3. Genregulation durch *trans*-kodierte sRNAs

Da der chromosomale Locus von *trans*-kodierten sRNAs nicht in Zusammenhang mit demjenigen der Ziel-mRNA besteht, weisen jene nur vereinzelte Regionen mit geringer Komplementarität zu ihren Ziel-mRNAs auf. Typischerweise sind die Bereiche, welche potentiell Basenpaarungen eingehen können, 10 - 25 Nukleotide lang, wobei meist nur der innerste Bereich essentiell für eine erfolgreiche Regulation ist.

Die Mehrheit der *trans*-kodierten sRNAs übt eine negative Regulation aus (Aiba, 2007; Gottesman, 2005). So binden die bisher untersuchten sRNAs vornehmlich an die 5'UTR der zugehörigen mRNA, was oftmals zur Blockade der Ribosomenbindestelle führt und damit in einer Translationsinhibition resultiert. Der sRNA-mRNA-Komplex wird anschließend der Degradation durch RNase E zugeführt, was die Regulation irreversibel macht (Morita *et al.*, 2005). In einigen Fällen konnte jedoch eine Translationsaktivierung der mRNA beobachtet werden, indem die sRNA über Basenpaarung die Ausbildung einer Anti-Terminationsstruktur förderte (Prevost *et al.*, 2007). Mögliche Wirkungsmechanismen von *trans*-kodierten sRNAs sind in Abbildung 7 dargestellt.

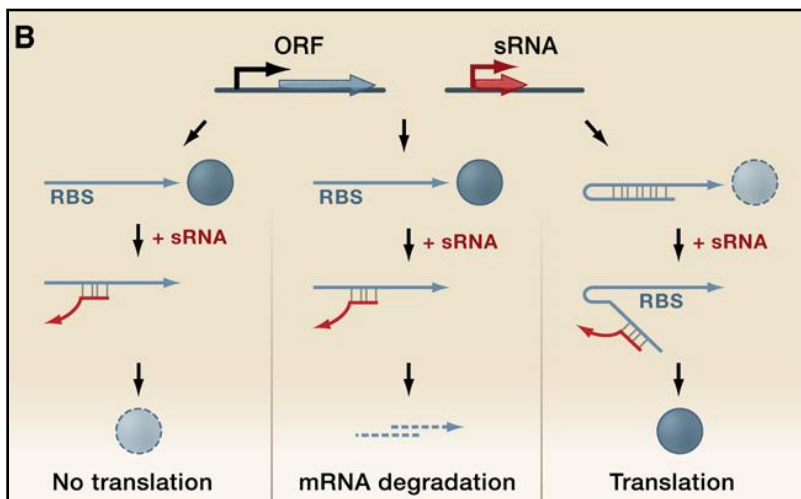


Abb. 7: Schematische Darstellung der Transkriptions- bzw. Translationskontrolle durch *trans*-kodierte sRNAs gegenüber ihren Ziel-mRNAs (Waters & Storz, 2009).

Die meisten *trans*-kodierte sRNAs werden unter spezifischen Wachstumsbedingungen synthetisiert und stehen damit im Gegensatz zu *cis*-kodierte sRNAs, welche oftmals konstitutiv exprimiert werden. So werden manche sRNAs nur unter geringen Eisenkonzentrationen, bei oxidativem Stress, bei Außenmembranstress oder veränderter Glukosekonzentration induziert (Johansen *et al.*, 2008; Görke & Vogel, 2008; Gottesman, 2005; Wassarman, 2002). Dies sind Bedingungen, welche meist von einem globalen Transkriptionsfaktor, wie z. B. Fur, OxyR etc., reguliert werden. So ist es denkbar, dass jeder bedeutende Transkriptionsfaktor die Expression eines bzw. mehrerer sRNA-Regulatoren kontrolliert (Waters & Storz, 2009).

Trans-kodierte sRNAs gehen typischerweise Basenpaarungen mit mehreren Ziel-mRNAs ein und beeinflussen deren Expression. Dadurch übernehmen sie die Rolle von globalen Modulatoren in bestimmten physiologischen Antworten. Im Gegensatz zu Transkriptionsfaktoren üben sie diese Kontrolle auf post-transkriptioneller Ebene aus (Massé *et al.*, 2007; Wassarman, 2002; Beisel & Storz, 2010).

Wie bereits erwähnt, weisen *trans*-kodierte sRNAs nur geringe Komplementarität mit ihren Ziel-mRNAs auf. Für eine erfolgreiche sRNA-mRNA-Interaktion wird deshalb oft die Hilfe des RNA-Chaperons Hfq benötigt.

3. Das Hfq Protein

Hfq wurde ursprünglich als Wirtsfaktor identifiziert, welcher für die Replikation des RNA-Phagen Q β in *E. coli* benötigt wird (host factor for Q β oder HF-1)(Franze de Fernandez *et al.*, 1968). Es handelt sich um ein RNA-bindendes Protein, das *trans*-kodierte sRNAs und ihre Ziel-mRNAs bindet und die Interaktion zwischen beiden Partnern fördert, wodurch es die Funktion eines RNA-Chaperons einnimmt.

3.1. Regulation und zelluläre Konzentration von Hfq

Die Expression von Hfq in *E. coli* umfasst sowohl transkriptionelle als auch post-transkriptionelle Regulation (Valentin-Hansen *et al.*, 2004). Das Gen ist Teil eines Superoperons, welches drei σ^{32} -abhängige Hitzeschock-Promotoren sowie vier σ^{70} -abhängige Promotoren besitzt (Tsui & Winkler, 1994a; Tsui *et al.*, 1996). Die Hitzeschockpromotoren stellen sicher, dass der zelluläre Level an Hfq unter Stressbedingungen aufrechterhalten wird. So konnte gezeigt werden, dass Hfq essentiell für Wachstum und Lebensfähigkeit bei Temperaturen über 45°C ist (Tsui *et al.*, 1994b). Hfq autoreguliert seine Expression, indem bei Überschuss des Proteins die Stabilität der *hfq*-mRNA herabgesetzt wird (Tsui *et al.*, 1997). Ferner wird durch

Bindung von Hfq an zwei Stellen innerhalb seiner eigenen mRNA die Bildung des Translationskomplexes inhibiert (Večerek *et al.*, 2005).

Wenn sich die Zellen in der logarithmischen Phase befinden, ist Hfq in *E. coli* mit einer geschätzten Konzentration von 50.000 - 60.000 Molekülen (ca. 10.000 Hexamere) pro Zelle beinahe ebenso zahlreich vorhanden wie ribosomale Proteine (Kajitani *et al.*, 1994). Diese Menge an Hfq erhöht sich, wenn die Zellen langsam wachsen bzw. in die stationäre Phase übergehen (Vytvytska *et al.*, 1998). Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von Hfq ergaben, dass sich der größte Teil in enger Assoziation mit dem Translationsapparat befindet (Kajitani *et al.*, 1994). Ein geringer Teil liegt assoziiert mit dem Nukleoid vor, was auf eine nicht-spezifische Bindung von Hfq an DNA oder auf das Vorhandensein von RNA-Transkripten im Nukleoid schließen lässt (Azam *et al.*, 2000). Des Weiteren befindet sich ein geringer Teil von Hfq in Nachbarschaft zur Zytoplasmamembran, wo das Protein an der translationalen Kontrolle von Außenmembranproteinen beteiligt sein könnte (Diestra *et al.*, 2009).

3.2. Struktur und RNA-Bindung

Hfq-Proteine in verschiedenen Bakterienarten variieren in ihrer Länge zwischen 70 - 110 Aminosäuren, das Hfq-Protein von *E. coli* weist z. B. eine Größe von 102 Aminosäuren auf (11.2 kDa). Bislang sind die Strukturen des Apoproteins aus *S. aureus*, *E. coli* und *P. aeruginosa* aufgelöst worden sowie die Struktur von Hfq aus *S. aureus* gebunden an das Oligoribonukleotid AU₅G (Schumacher *et al.*, 2002; Sauter *et al.*, 2003; Nikulin *et al.*, 2005). Hfq ist homolog zu Proteinen der Sm und Sm-like Familie, welche in Archaea und Eukaryoten vorkommen und in letzteren am RNA-Metabolismus, wie z. B. Splicing und mRNA-Abbau, beteiligt sind (Wilusz & Wilusz, 2005; Seraphin, 1995). Proteine dieser Familie zeichnen sich durch zwei hoch konservierte Regionen, die sogenannten Sm1- und Sm2-Motive, aus. Obwohl in Hfq eine Sequenzhomologie zum Sm2-Motiv fehlt, konnte es anhand der Röntgenstruktur in die Sm und Sm-like Superfamilie eingeordnet werden. Während Sm-Proteine aus Eukaryoten jedoch als Homoheptamer aktiv sind, bildet Hfq ein Homohexamer aus.

Hfq nimmt die Form eines Toroids mit einem äußeren Durchmesser von ca. 70 Å und einer Dicke von ca. 25 Å ein (Brennan & Link, 2007). Die zentrale Pore ist 8 bis 12 Å breit und weitet sich nach RNA-Bindung auf ca. 15 Å. Die dreidimensionale Struktur einer einzelnen Untereinheit wird durch eine N-terminale α -Helix gefolgt von fünf β -Faltblättern mit der Topologie $\beta_5\alpha_1\beta_1\beta_2\beta_3\beta_4$ gebildet. Das Sm1-Motiv befindet sich dabei in den ersten drei β -Faltblättern, das Sm2-Motiv auf den β -Faltblättern 4 und 5. Das zyklische Hexamer bildet sich durch Interaktion von Aminosäureresten in β_4 mit Aminosäureresten in β_5 der benachbarten Untereinheit aus. Die α -Helix sitzt am oberen Ende der Struktur und definiert die sogenannte

distale Seite, während die von der α -Helix abgewandte Seite als proximale Seite bezeichnet wird. Die Struktur von Hfq ist in Abbildung 8 dargestellt.

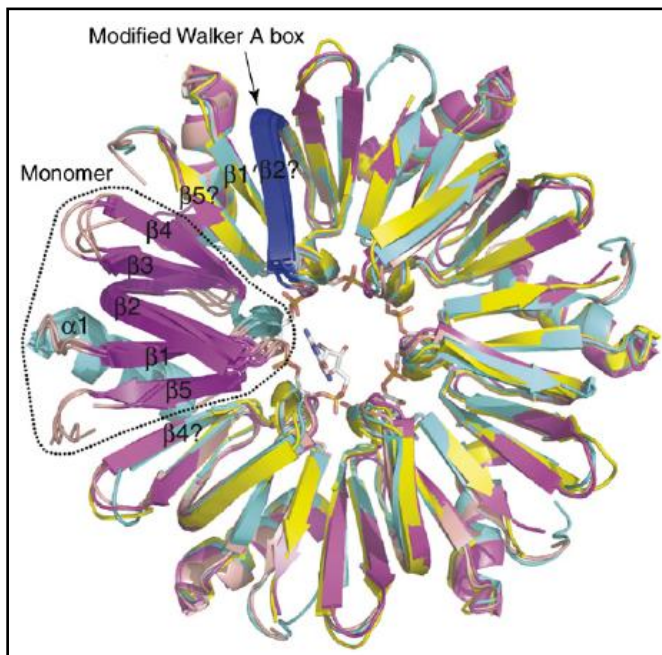


Abb. 8: Struktur von Hfq aus *P. aeruginosa*, *E. coli* und *S. aureus* überlappend dargestellt. Die gestrichelte Linie umgrenzt ein Hfq-Monomer mit den β -Faltblättern in Magenta und der α -Helix in Hellblau. Blickrichtung ist auf die proximale Seite des Hfq-Hexamers (Brennan & Link, 2007).

Frühe Studien des Hfq-Proteins zeigten, dass es eine hohe Affinität für einzelsträngige AU-reiche Regionen aufweist (Senear & Steitz, 1976; de Haseth & Uhlenbeck, 1980a; de Haseth & Uhlenbeck, 1980b). In den letzten Jahren konnten die Bindungseigenschaften weiter charakterisiert werden, so dass mittlerweile davon ausgegangen wird, dass Hfq eine größere Affinität zu kurzen, einzelsträngigen Bereichen mit Uridin- und Adenosinresten besitzt, wenn diesen eine Stamm-Schleife-Struktur vorausgeht oder folgt (Brescia *et al.*, 2003; Moll *et al.*, 2003; Mikulecky *et al.*, 2004; Sun & Wartell, 2006). Die Struktur des Hfq-Proteins aus *S. aureus* mit dem gebundenen Hepta-Oligoribonukleotid AU₅G ergab, dass die Hauptfaktoren für die RNA-Bindung im Sm1- und Sm2-Motiv liegen (Schumacher *et al.*, 2002). Dabei sind vor allem Aminosäurereste (Tyr⁴², Lys⁴¹, Lys⁵⁷ und Gln⁸) in den Schleifen zwischen β 2, β 3, β 4 und β 5, welche die zentrale Pore an der proximalen Seite auskleiden, von Bedeutung. Die untersuchte RNA wird dabei gestreckt und kreisförmig an der Pore gebunden.

Ferner ist das Hfq-Protein in der Lage, an Poly(A)-Bereiche am 3'-Ende von bakteriellen mRNAs zu binden (Hajnsdorf *et al.*, 2000; Folichon *et al.*, 2003; Mohanty *et al.*, 2004). Deren Bindung erfolgt jedoch an der distalen Seite des Proteins an dreiteiligen Bindemotiven (Link *et al.*, 2009). Diese bestehen aus einer sogenannten A-Stelle, welche für die Spezifität gegenüber Adenosinresten verantwortlich ist und aus den Aminosäuren Gln³³, Leu³² und Gln⁵² in β 2 und β 4 besteht, einer sogenannten R-Stelle, welche Purinreste (G oder A) bindet und aus den Aminosäuren Tyr²⁵ und Leu²⁶, Ile³⁰ und Leu³² der benachbarten Untereinheit besteht, und zuletzt der E-Stelle, welche nicht zwischen verschiedenen Nukleobasen unterscheidet und daher unspezifische RNA-Bindung vermittelt.

Die Fähigkeit des Hfq-Proteins unterschiedliche RNA-Strukturen an zwei Bereichen innerhalb des Homohexamers zu binden, lässt Vermutungen über seinen Wirkmechanismus zu, welche im Folgenden erläutert werden.

3.3. Regulation durch das Hfq-Protein

Die Beteiligung des Hfq-Proteins an sRNA-vermittelter Genregulation wurde erstmals in einer Studie zum Mechanismus der *rpoS*-Regulation durch die kleine regulatorische RNA OxyS ersichtlich (Zhang *et al.*, 1998). Seitdem konnte für eine Vielzahl an sRNAs gezeigt werden, dass sie an Hfq gebunden vorliegen und die Hilfe des Proteins bei der post-transkriptionellen Kontrolle ihrer Ziel-mRNAs benötigen (Wassarman, 2002). In der Tat wird die Co-Immunopräzipitation mit Hfq als eine Screening Methode für die Suche nach neuartigen sRNAs verwendet (Zhang *et al.*, 2003). Für 22 sRNAs aus *E. coli* konnte nachgewiesen werden, dass sie an Hfq binden (Majdalani *et al.*, 2005).

Eine Hfq-Mutante in *E. coli* zeigt pleiotrope Effekte wie verlangsamtes Wachstum, erhöhte Sensitivität gegenüber UV-Licht, Mutagenen und Oxidantien sowie eine längere Zellform (Tsui *et al.*, 1994b). Dabei aktiviert oder inhibiert eine Hfq-Mutation die Synthese von mehr als 50 Proteinen, was teilweise damit zusammen hängt, dass Hfq für eine effiziente Translation des *rpoS*-Gens benötigt wird (Muffler *et al.*, 1996; Muffler *et al.*, 1997). Dessen Produkt, der σ^s -Faktor, wird unter verschiedenen Stresssituationen und in der stationären Phase exprimiert und reguliert die Synthese mehrerer wichtiger Proteine der Stressantwort.

Generell bestimmt die Art der sRNA und der zugehörigen Ziel-mRNA(s), an deren Interaktion das Hfq-Protein beteiligt ist, welche Auswirkung eine Hfq-Mutation hat. Für den Wirkmechanismus von Hfq bei der Basenpaarung zwischen sRNA und Ziel-mRNA sind jedoch zwei Möglichkeiten denkbar. Zum einen könnte Hfq aktiv inhibitorische Strukturen in sRNA und Ziel-mRNA umstrukturieren, wodurch die Basenpaarung zwischen beiden Partnern erleichtert wird. Dafür würde sprechen, dass Hfq eine intrinsische ATPase-Aktivität aufweist, deren Funktion bislang noch unbekannt ist (Sukhodolets & Garges, 2003). Zum anderen könnte Hfq passiv als Plattform für die Bindung von sRNA und Ziel-mRNA dienen, wodurch die lokale Konzentration der beiden Partner erhöht wird (Storz *et al.*, 2004). Dafür würden die unterschiedlichen Bindestellen an proximaler und distaler Seite mit ihrer jeweiligen Spezifität für AU-reiche Sequenzen mit Stamm-Schleife-Struktur bzw. Poly(A)-Bereichen sprechen (Brennan & Link, 2007).

Die Bindung von Hfq an Poly(A)-Bereiche schützt zudem mRNAs vor Degradation durch die Exoribonuklease RNase II, die Polynukleotidphosphorylase PN-Pase und die Endoribonuklease RNase E (Folichon *et al.*, 2003). Andererseits stimuliert diese Bindung die weitere Adenylierung der mRNAs durch die Poly(A)-Polymerase PAP I, was deren Degradation verstärkt

(Hajnsdorf & Régnier, 2000; Mohanty *et al.*, 2004). Wie diese beiden antagonistischen Mechanismen in Einklang zu bringen sind, muss noch geklärt werden.

Während in manchen Arten, wie z. B. *E. coli*, Hfq für eine Vielzahl an sRNA-mRNA-Interaktionen benötigt wird, scheint Hfq für *S. aureus* nicht von Bedeutung zu sein. So hat ein Hfq-Knockout in *S. aureus* keinen ersichtlichen Effekt, obwohl der Keim bekanntermaßen einige sRNAs exprimiert (Bohn *et al.*, 2007). Jouselin *et al.* stellten die Hypothese auf, dass es von einigen Faktoren abhängt, ob Hfq für sRNA-mRNA-Interaktionen benötigt wird (Jouselin *et al.*, 2009). Zum einen scheint dabei der GC-Gehalt des untersuchten Organismus eine Rolle zu spielen. So beträgt der GC-Gehalt von *E. coli* 50 %, während das Genom von *S. aureus* einen GC-Gehalt von 32 % aufweist. Dies könnte darin begründet liegen, dass ein höherer GC-Gehalt in sRNAs und mRNAs zu stabileren Konformationen führt, welche erst durch ein Chaperon gelöst werden müssen, um eine produktive Interaktion herbeizuführen. Des Weiteren spielt die freie Energie der sRNA-mRNA-Interaktion eine Rolle. So besitzen Interaktionen von sRNAs mit ihren Ziel-mRNAs, welche ausgedehnte Basenpaarungen umfassen, einen hohen ΔG -Wert und benötigen oftmals keine Hilfe durch Hfq, während Interaktionen mit wenigen Basenpaarungen einen geringen ΔG -Wert haben und daher auf die Chaperonaktivität von Hfq angewiesen sind. Als dritter Faktor scheinen strukturelle Unterschiede in den Hfq-Proteinen zwischen den Arten von Bedeutung zu sein. So weist z. B. Hfq aus *E. coli* eine positive elektrostatische Ladung an der Oberfläche zwischen proximaler und distaler Seite auf, während Hfq aus *S. aureus* dort negative elektrostatische Ladung besitzt.

3.4. Beteiligung des Hfq-Proteins an Virulenz

Pathogene Bakterien müssen sich nach der Aufnahme in den Wirt schnell an sich verändernde Bedingungen anpassen. Während eine Vielzahl dieser regulatorischen Vorgänge durch Proteine auf Transkriptionsebene realisiert wird, wird seit kurzem sRNAs eine große Rolle bei der adaptiven Antwort zugesprochen (Romby *et al.*, 2006). In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von sRNAs in Pathogenen, wie z. B. in *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae* und manchen *E. coli*-Stämmen, entdeckt. Einige dieser sRNAs regulieren entweder direkt oder indirekt Virulenzgene oder beeinflussen die adaptive Stressantwort, welche für das Überleben im Wirt wichtig ist.

Es ist bekannt, dass antisense RNAs essentielle Funktionen von Plasmiden, welche oftmals Virulenzgene tragen, regulieren (Wagner *et al.*, 2002). In *E. coli* ist die sRNA RyhB an der Regulation der Eisenaufnahme und Lagerung beteiligt, indem unter eisenlimitierenden Bedingungen die Expression von 18 Operons, welche vornehmlich für eisenbindende Proteine kodieren, beeinflusst wird (Massé *et al.*, 2005). Die sRNAs MicA, MicC und MicF aus *E. coli* regulieren die Expression der Außenmembranproteine OmpA, OmpC und OmpF, welche als

Angriffspunkte für das Immunsystem des Wirts wirken könnten (Rasmussen *et al.*, 2005; Andersen *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 2004). RNAIII aus *S. aureus* kontrolliert den Wechsel von der Expression von Oberflächenproteinen zu sezernierten Toxinen (Novick, 2003).

Bei vielen Virulenzprozessen, welche durch sRNAs vermittelt werden, könnte das Hfq-Protein beteiligt sein. In der Tat zeigen einige Hfq-Mutanten stark attenuierte Virulenzphänotypen im Maus- bzw. Rattenmodell. Dazu zählen *Brucella abortus*, *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Neisseria meningitidis*, *Yersinia pestis*, *Listeria monocytogenes* uvm. (Robertson & Roop, 1999; Sittka *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2004; Sonnleitner *et al.*, 2003; McNealy *et al.*, 2005; Fantappiè *et al.*, 2009; Geng *et al.*, 2009; Christiansen *et al.*, 2004). In *in vitro*-Versuchen mit Epithelzellen oder Makrophagen zeigen *S. Typhimurium* oder *Y. pestis* Δhfq sowohl eine reduzierte Adhärenz als auch eine reduzierte Invasions- und Überlebensrate, während *N. meningitidis* eine höhere Sensibilität gegenüber der humoralen Immunantwort aufweist (Sittka *et al.*, 2007; Geng *et al.*, 2009; Fantappiè *et al.*, 2009). Motilität verleiht vielen Pathogenen einen Vorteil in der Kolonisation des Wirts und ist bei *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium* und UPEC von Hfq abhängig (Sonnleitner *et al.*, 2003; Sittka *et al.*, 2007; Kulesus *et al.*, 2008). In UPEC fördert Hfq zudem die Bildung von Biofilmen.

Hfq ist in mehreren Arten an der Toxinproduktion beteiligt. So hängt die Enterotoxinproduktion in *Yersinia enterocolitica*, die Exotoxinproduktion in *P. aeruginosa* und die Hämolysinproduktion in *Vibrio parahaemolyticus* von Hfq ab (Nakao *et al.*, 1995; Sonnleitner *et al.*, 2008; Nakano *et al.*, 2008).

Typ III-Sekretionssysteme vermitteln die Übertragung von Effektoren in die Wirtszelle und spielen damit eine wichtige Rolle bei der Virulenz. In *S. Typhimurium* ist die Expression von zwei Typ III-Sekretionssystemen, welche von den Pathogenitätsinseln 1 und 2 kodiert werden, von Hfq abhängig, was teilweise die verminderte Pathogenität von *Salmonella* Δhfq erklärt (Sittka *et al.*, 2008; Ansong *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu scheint Hfq in EHEC die Typ III-Sekretion negativ zu regulieren. So produzieren und sezernieren EHEC Δhfq -Stämme vermehrt Effektoren, welche von der LEE-Pathogenitätsinsel kodiert werden (Hansen & Kaper, 2009).

3.5. Phylogenie des Hfq-Proteins

Bislang wurden Hfq-Homologe in der Hälfte aller sequenzierten Gram-positiven und Gram-negativen Bakterienarten gefunden (Valentin-Hansen *et al.*, 2004). Die Länge des Proteins variiert dabei zwischen 70 und 100 Aminosäuren, wobei das Sm-Motiv in allen Fällen am N-Terminus lokalisiert ist. Somit liegt die Vermutung nahe, dass der C-Terminus vernachlässigbar für die Hfq-Funktion ist. Dies wurde durch Versuche bestätigt, in denen eine C-terminal trunke Version von Hfq aus *E. coli* (75 AS) bzw. Hfq aus *P. aeruginosa* (82 AS) das intakte Hfq aus *E. coli* (102 AS) komplementieren konnten (Sonnleitner *et al.*, 2002). Zwei Arten, *Bacillus*

anthracis und *Ralstonia* spp., enthalten zwei Kopien eines Hfq-Homologs, während *Novosphingium aromaticivorans* eine Tandem-Hfq-Sequenz innerhalb eines einzigen 193-AS-großen Proteins besitzt (Sun *et al.*, 2002).

Basierend auf standardmäßigen BLAST-Suchen konnte bislang in mehreren Phyla kein ORF, welcher für ein Hfq-Protein kodiert, detektiert werden (Sun *et al.*, 2002). Dazu zählen Cyanobakterien, grüne Schwefelbakterien, *Chlamydia*, einige Proteobakterien, wie z. B. *Bruchnera* sp. und *Campylobacter* sp. und einige Gram-positive Bakterien, wie z. B. *Streptococcus* spp. und *Mycoplasma* spp. Nimmt man als Suchkriterien jedoch Sequenzlänge, Aminosäurekonservation und Sequenzähnlichkeit, so konnte im Cyanobakterium *Anabaena* PCC7120 ein Hfq-Ortholog entdeckt werden (Valentin-Hansen *et al.*, 2004). Auf der Basis von dessen Sequenz wurden weitere Hfq-Orthologe in *Synechocystis*, *Synechococcus* und *Prochlorococcus* identifiziert. Dabei ist interessant, dass mehrere hoch-konservierte Aminosäurereste im Sm1-Motiv der konventionellen Hfq-Proteine in diesen Orthologen fehlen. Das Archaeobakterium *Methanococcus jannaschii* weist keinen ORF kodierend für ein Sm-like-Protein, wie es üblicherweise in Archaeen vorkommt, auf, sondern enthält ein mit Hfq-verwandtes Protein (Valentin-Hansen *et al.*, 2004).

Bei Arten, in denen scheinbar kein Hfq-Protein vorhanden ist, stellt sich die Frage, ob andere Proteine die Funktion eines RNA-Chaperons übernehmen oder ob die Basenpaarung von sRNAs mit ihren Ziel-mRNAs eventuell keine Hilfe benötigt.

4. Zielsetzung der Arbeit

BLAST-Analysen ergaben, dass *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* Homologe zum Hfq-Protein aufweisen und diese in der veröffentlichten Genomsequenz bereits als Hfq-Protein annotiert sind (Parkhill *et al.*, 2003). Um einen ersten Überblick über das Hfq-Protein in diesen beiden Organismen zu gewinnen, sollte zunächst dessen Transkriptionsstartpunkt bestimmt und damit auch die Anwesenheit eines *hfq*-Transkripts nachgewiesen werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob die *hfq*-Transkription unter verschiedenen Stressbedingungen verstärkt ist, wie es z. B. bei *L. monocytogenes* der Fall ist (Christiansen *et al.*, 2004).

Um die Funktion des Hfq-Proteins in *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* zu bestimmen, sollte das *hfq*-Gen deletiert werden, um anschließend eine Charakterisierung der gewonnenen Δhfq -Mutanten durchzuführen. Zunächst sollte das Augenmerk auf das Wachstumsverhalten der Δhfq -Mutanten gerichtet werden, da z. B. für *E. coli* nachgewiesen werden konnte, dass die Δhfq -Mutante ein Wachstumsdefizit gegenüber dem Wildtyp zeigt (Tsui *et al.*, 1994b). Da sich bei vielen anderen Organismen gezeigt hat, dass die jeweilige Δhfq -Mutante sensitiver gegenüber

Stresssubstanzen ist, sollte zudem untersucht werden, ob dies auch für *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* zutrifft (Tsui *et al.*, 1994; Christiansen *et al.*, 2004; Fantappiè *et al.*, 2009).

Ein großer Fokus der Arbeit sollte auf die Bestimmung des Hfq-regulierten Proteoms gerichtet werden, indem Wildtyp und Δhfq -Mutante mittels 2D-Gelelektrophorese miteinander verglichen und Unterschiede aufgedeckt werden sollten. Da Hfq als RNA-Chaperon primär an sRNA-mRNA-Interaktionen, welche die Translation der zugehörigen mRNA beeinflussen, beteiligt ist, stellen in der Δhfq -Mutante differentiell regulierte Proteine putative Kandidaten für eine Regulation durch sRNAs dar.

Da es sich bei *B. pertussis* um einen humanpathogenen Organismus handelt, sollte zudem analysiert werden, ob die Expression diverser Virulenzfaktoren über sRNAs reguliert wird und damit ein Unterschied zwischen Δhfq -Mutante und Wildtyp besteht.

III Material

1. Geräte

Gerät	Name/Hersteller
2D-Gelelektrophorese	Hoefer DALT Vertical System (Pharmacia)
2D-Gelschüttler	SM-30 control (Edmund Bühler)
Autoklav	Webeco
Blotkammer	N2021-2110 (StarLab)
Brutschränke	Heraeus
Bunsenbrenner	Fireboy Eco (DVGW)
Elektrophoresekammer	Wide Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad)
ELISA-Reader	Infinite M200 (Tecan)
FACS-Gerät	accuri® C6 Flow Cytometer (Accuri Cytometers)
Flüssigkeitskühler	MultiTempIII (Pharmacia)
Geldokumentation	Dark Hood DH-40/50 (Biostep)
Heizblöcke	Thermostat 5320 (Eppendorf); 2099DA (Liebisch)
IEF-Gerät	Ettan™ IPGphor™ (Amersham)
Kühl-/Gefrierschränke	Privileg; Ultra Low Freezer (New Brunswick)
Magnetrührer	RCTbasic (IKA Labortechnik); TMA2071 (Assistent); ANS-005 (SBS)
Mikrowelle	Privileg
Netzgeräte	Power Supply Model 1000/500 (Bio-Rad); PowerPac Basic (Bio-Rad); E452 (Consort); ECPS 3000/150 (Pharmacia)
PCR-Gerät	T3 Thermocycler (Biometra)
pH-Meter	pH 720 Inolab (WTW)
Photometer	Ultrospec 2100pro & 3100pro (Amersham)
Pipetten	Abimed; Eppendorf; Gilson
Pipettierhilfe	accu-jet® (Brand)
Realtime-PCR	StepOnePlus Real-Time PCR-System (Applied Biosystems)
Roller	Roller Mixer SRT9 (Stuart)
Röntgenfilme	Konica Minolta; Super RX (Fujifilm)
Röntgenfilmentwickler	EcoMax™ (Protec)
Röntgenfilmkassetten	Dr. Goos Suprema; Molecular Dynamics
Scanner	ImageScanner III (GE Healthcare)
Schüttelinkubator	HT (Infors AG)
Spektrophotometer	NanoDrop™ ND-100 (Peqlab)

SpeedVac	Concentrator 5301 (Eppendorf); SpeedVac Concentrator (Savant)
Sterilbänke	NuAire; GelAire; Herasafe (Thermo Scientific)
Szintillationszähler	1214 Rackbeta (LKM Wallac)
Taumler	Duomax 1030 (Heidolph)
UV-Lichtquelle	Vilber (Courmat)
Vakuumpumpe	Integra Vacusafe
Videoprinter	UP 860 CE (Sony); P93D (Mitsubishi)
Vortexer	Reax 2000 (Heidolph)
Waagen	EW 1500-2M & ABS 80-4 (Kern)
Wasserbad-Inkubator	GFL
Zellaufschluss	FastPrep®-24 (MP)
Zentrifugen	
Kühlzentrifugen	Avanti™ J-25I & Allegra™ 25R (Beckman Coulter); Megafuge 1.0R (Heraeus); Centrifuge 5417R (Eppendorf); CT15RE (himac)
Tischzentrifugen	Biofuge 15 (Heraeus); 5415C (Eppendorf); MicroCentrifuge IR (Carl Roth); Mikroliter Zentrifuge & Rotanta 460R (Hettich)

2. Verbrauchsmaterialien

2.1. Chemikalien

Alle nicht explizit aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich, Applichem, Bio-Rad, Boehringer Mannheim, Eppendorf, Fluka, GE Healthcare, Greiner, Invitrogen, Merck, MWG, New England Biolabs (NEB), Oxoid, Riedel de Haan, Roche, Roth, Serva und Sigma bezogen. Nährstoffe und Agar lieferten die Firmen Difco und Gibco. Radiochemikalien wurden bei Hartmann Analytic und PerkinElmer bestellt.

2.2. Enzyme

Enzyme wurden über die Firmen Applichem, Boehringer Mannheim, Fermentas, GE Healthcare, Molzym, New England Biolabs, Invitrogen, Promega und Roche bezogen.

2.3. Molekularbiologische Kits

AxyPrep Plasmid Miniprep Kit (Axygen)
Bradford Protein Assay (Bio-Rad)
DNA-free™ DNase Kit (Ambion)
Nucleobond® AX Midi Kit (Macherey-Nagel)
NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel)
Pierce® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific)
QIAquick® Nucleotide Removal Kit (Qiagen)
QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen)
SuperScript™ II RT (Invitrogen)
T7 Sequencing Kit (usb)

2.4. Sonstige Materialien

Alle sonstigen Materialien wurden über die Firmen Amersham, BD Biosciences, Corning, Greiner Bio-One, MP Bio, Sarstedt, Thermo Scientific und VWR bezogen.

3. Wachstumsmedien und Zusätze

Medien für Flüssigkulturen und Agarplatten werden für 20 min bei 120°C autoklaviert. Hitzelabile Substanzen werden sterilfiltriert. Medienzusätze werden den autoklavierten Lösungen erst nach deren Abkühlen auf 40 - 50°C zugegeben.

3.1. Lysogeny-Broth (LB)-Medium

- LB-Flüssigmedium:

10 g Bactotrypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
ad 1 l dH₂O

- LB-Agar:

10 g Bactotrypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
15 g Agar
ad 1 l dH₂O

3.2. 1x Stainer-Scholte (SS)-Medium

- 5x SS-Lösung:

53.5 g Natrium-Glutamat
 1.2 g L-Prolin
 12.5 g KH_2PO_4
 1 g KCl
 0.5 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
 7.5 g Tris
 ad 1 l dH_2O
 → mit HCl auf pH 7.6 einstellen
 → alle Lösungen sterilfiltrieren

- CaCl_2 -Lösung:

0.13 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
 ad 10 ml dH_2O

- Casaminoacids-Lösung:

5 g Casaminoacids
 ad 50 ml dH_2O

- Cyclodextrin-Lösung:

2.5 g Cyclodextrin
 ad 50 ml 62.5 mM NaOH

- 100x SS-Supplement:

0.05 g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
 0.1 g Ascorbinsäure
 0.004 g Nikotinsäure
 0.1 g Glutathion
 ad 45 ml dH_2O
 → beide Lösungen mischen, sterilfiltrieren

- 1x SS-Medium-Flüssigmedium:

2 ml CaCl_2 -Lösung
 200 ml 5x SS-Lösung
 10 ml 100x SS-Supplement
 10 ml Casaminoacids-Lösung
 10 ml Cyclodextrin-Lösung
 ad 1 l dH_2O
 → sterilfiltrieren; 1x SS-Medium ist bei 4°C nur ca. 3 Monate haltbar

- 1x SS-Agar:

1 ml CaCl_2 -Lösung
 100 ml 5x SS-Lösung
 5 ml 100x SS-Supplement
 5 ml Casaminoacids-Lösung
 5 ml Cyclodextrin-Lösung
 ad 250 ml dH_2O
 → sterilfiltrieren, auf 37°C erwärmen
 → beides gut mischen und schnell zu Platten verarbeiten

8.5 g Agar
 ad 250 ml dH_2O
 → autoklavieren und auf ca. 50°C abkühlen lassen

3.3. Bordet-Gengou-Agar

30 g Bordet-Gengou-Agar-Basis

10 g Glycerin

ad 1 l dH₂O

→ nach dem Abkühlen des Agars auf ca. 45°C werden 100 ml defibriniertes Pferdeblut zugegeben

3.4. Charcoal-Agar

62.5 g Charcoal-Agar

ad 1 l dH₂O

→ erst Wasser vorlegen und Agar unter Rühren einrieseln lassen

3.5. Medienzusätze

Zusatz	Konzentration der Stocklösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in dH ₂ O	100 µg/ml
Chloramphenicol	30 mg/ml in 100 % Ethanol	30 µg/ml
Gentamycin	15 mg/ml in dH ₂ O	15 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in dH ₂ O	50 µg/ml
Nalidixinsäure	20 mg/ml in dH ₂ O	20 µg/ml
Spectinomycin	100 mg/ml in dH ₂ O	100 µg/ml
Streptomycin	100 mg/ml in dH ₂ O	100 µg/ml
Tetracyclin	12.5 mg/ml in 50 % Ethanol	12.5 µg/ml
IPTG	12 mg/ml in dH ₂ O	12 µg/ml
X-Gal	20 mg/ml in Dimethylformamid	30 µg/ml

4. Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung/Genotyp	Referenz/Herkunft
<i>B. pertussis</i> Tohama I	Wildtypderivat ; Sm ^R , Nal ^R	DSMZ
<i>B. pertussis</i> Tohama I Δ <i>tox</i>	Wildtypderivat; <i>ptx</i> -Operon durch eine Kan ^R -Kassette ersetzt; Sm ^R , Kan ^R , Nal ^R	Pizza <i>et al.</i> , 1989
<i>B. pertussis</i> 347	TI-Derivat; <i>bvgS</i> ::Tn5; Sm ^R ,Nal ^R ,Kan ^R	Weiss & Falkow, 1983
<i>B. pertussis</i> 359	TI-Derivat; <i>bvgA</i> ::Tn5; Sm ^R ,Nal ^R ,Kan ^R	Weiss & Falkow, 1983
<i>B. bronchiseptica</i> 7865	Wildtyp; Humanisolat; Sm ^R , Spec ^R , Nal ^R	Arico & Rappuoli, 1987
<i>B. bronchiseptica</i> 7866	Phasenvariante von Bb 7865 (241 bp Deletion in <i>bvgS</i>); Sm ^R , Nal ^R	Monack <i>et al.</i> , 1989
<i>E. coli</i> DH5 α	Wildtypisches Isolat (Typ1); für effiziente Transformation; F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>deoR</i> , <i>nupG</i> , Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (r ^K m ^K ⁺), λ -	Bethesda Research Laboratories (BRL)
<i>E. coli</i> SM10	<i>lacY</i> , <i>tonA</i> , <i>recA</i> , <i>Muc+</i> , <i>thi</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>supE</i> , RP4-2-Tc::Mu, Kan ^R , λ pir; zur Konjugation mit <i>Bordetella</i> geeignet	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>B. pertussis</i> Tohama I Δ <i>hfq</i>	<i>B. pertussis</i> Tohama I, <i>hfq</i> -Leserahmen durch Tetracyclin-Resistenzkassette zerstört; Tc ^R	diese Arbeit
<i>B. pertussis</i> Tohama I Δ <i>hfq</i> complemented	<i>B. pertussis</i> Tohama I, <i>hfq</i> -Leserahmen durch Tetracyclin-Resistenzkassette zerstört; durch Plasmid mit wildtypischem <i>hfq</i> -Leserahmen komplementiert; Tc ^R , Cm ^R	diese Arbeit
<i>B. pertussis</i> Tohama I Δ <i>tox</i> Δ <i>hfq</i>	<i>B. pertussis</i> Tohama I Δ <i>tox</i> , <i>hfq</i> -Leserahmen durch Tetracyclin-Resistenzkassette zerstört; Tc ^R	diese Arbeit
<i>B. bronchiseptica</i> 7865 Δ <i>hfq</i>	<i>B. bronchiseptica</i> 7865, <i>hfq</i> -Leserahmen durch Chloramphenicol-Resistenzkassette zerstört; Cm ^R	diese Arbeit
<i>B. bronchiseptica</i> 7865 Δ <i>hfq</i> complemented	<i>B. bronchiseptica</i> 7865, <i>hfq</i> -Leserahmen durch Tetracyclin-Resistenzkassette zerstört; durch Plasmid mit wildtypischem <i>hfq</i> -Leserahmen komplementiert; Tc ^R , Cm ^R	diese Arbeit
<i>B. pertussis</i> Tohama I pMMB _{p4} term	<i>B. pertussis</i> Tohama I mit pMMBP _{4Bp} term-Konstrukt; Sm ^R , Nal ^R , Cm ^R	diese Arbeit

5. Plasmide

Vektor/Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBluescript II SK (pSK)	Phagemid, CoIE1-Replikation, pUC19-Derivat, high copy-Klonierungsvektor, Amp ^R	Stratagene
pSORTP1	pRTP1-Derivat, low copy-Klonierungsvektor, ermöglicht den Allelaustausch in Bordetella-Arten, Gen ^R , Amp ^R	Stibitz <i>et al.</i> , 1986
pMMB208	pMMBHE-Derivat, „broad range“ Klonierungsvektor, Cm ^R	Morales <i>et al.</i> , 1991
pACYC184	Rep-Replicon, p15A-Derivat, trägt <i>cat</i> -Kassette und <i>tet</i> -Kassette, Tc ^R , Cm ^R	Chang & Cohen, 1978
pSKhfqtet	upstream-flankierender Bereich (447bp), <i>tet</i> -Kassette (1272 bp) und downstream-flankierender Bereich (378 bp) des <i>hfq</i> -Gens über <i>HindIII/KpnI/XbaI</i> -Restriktion in pSK kloniert	diese Arbeit
pSKhfqcat	upstream-flankierender Bereich (447bp), <i>cat</i> -Kassette (747 bp) und downstream-flankierender Bereich (378 bp) des <i>hfq</i> -Gens über <i>HindIII/KpnI/XbaI</i> -Restriktion in pSK kloniert	diese Arbeit
pSORTP1hfqtet	upstream-flankierender Bereich, <i>tet</i> -Kassette und downstream-flankierender Bereich des <i>hfq</i> -Gens aus pSKhfqtet (2109 bp) über <i>HindIII</i> -Restriktion in pSORTP1 kloniert	diese Arbeit
pSORTP1hfqcat	upstream-flankierender Bereich, <i>cat</i> -Kassette und downstream-flankierender Bereich des <i>hfq</i> -Gens aus pSKhfqcat (1584 bp) über <i>HindIII</i> -Restriktion in pSORTP1 kloniert	diese Arbeit
pSKhfq _{BpTI}	wildtypischer <i>hfq</i> _{BpTI} -Bereich (385 bp) über <i>KpnI</i> -Restriktion in pSK kloniert	diese Arbeit
pSKhfq _{Bb7865}	wildtypischer <i>hfq</i> _{Bb7865} -Bereich (385 bp) über <i>KpnI</i> -Restriktion in pSK kloniert	diese Arbeit
pSKhfq _{Bb7865} tet	wildtypischer <i>hfq</i> _{Bb7865} -Bereich (385 bp) und <i>tet</i> -Kassette (1385 bp) über <i>KpnI/EcoRI/PstI</i> -Restriktion in pSK kloniert	diese Arbeit
pMMBhfq _{BpTI}	wildtypischer <i>hfq</i> _{BpTI} -Bereich (389 bp) über <i>KpnI/PstI</i> -Restriktion in pMMB208 kloniert	diese Arbeit
pMMBhfq _{Bb7865} tet	wildtypischer <i>hfq</i> _{Bb7865} -Bereich und <i>tet</i> -Kassette aus pSKhfq _{Bb7865} tet (1776 bp) über <i>KpnI/PstI</i> -Restriktion in pMMB208 kloniert	diese Arbeit
pSKP4 _{Bp}	Fragment, das den putativen P4-Promotor umfasst (511 bp), über <i>KpnI/HindIII</i> -Restriktion in pSK kloniert	diese Arbeit

pSKP4 _{Bp} term	P4-Transkript (242 bp) und Terminatorregion aus pQE30 (96 bp) über <i>HindIII/PstI/BamHI</i> -Restriktion in pSK kloniert	diese Arbeit
pMMB _{P4} term	P4 _{Bp} /term-Fusion aus pSKP4 _{Bp} term über <i>HindIII/BamHI</i> -Restriktion in pMMB208 kloniert	diese Arbeit

6. Oligonukleotide

6.1. Plasmidspezifische Oligonukleotide

Name	Sequenz
Blue T7	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C
Blue T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG
pMMB208_1	GTT GAC AAT TAA TCA TCG GCT CGT AT
pMMB208_2	CTG ATT TAA TCT GTA TCA GGC TGA A

6.2. Oligonukleotide für Klonierungen

Name	Sequenz
cat-5'-KpnI	<u>ATTT</u> GGTACC GTT ATC GAG ATT TTC AGG AGC
cat-3'-XbaI	<u>TTTT</u> TCTAGA AGG CGT TTA AGG GCA CCA ATA AC
hfq-down-fw-XbaI	<u>TATT</u> TCTAGA CCA GCA TTA CCC TTG ATT G
hfq-down-rev-HindIII	<u>AAAA</u> AAGCTT CCA GGA TCA ATG CCA CGC
hfq_fw_KpnI	<u>TTTT</u> GGTACC TGA CAC GCA CCG GGG AAT TTC
hfq_rev_EcoRI	<u>TTAA</u> GAATTC GAG CGA GGC GAT TAT TCA GCG G
hfq_rev_PstI	<u>TTTA</u> CTGCAG GAG CGA GGC GAT TAT TCA GCG G
hfq-up-fw-HindIII	<u>ATTA</u> AAGCTT ATT CCT ACC CCA TAG ACC G
hfq-up-rev-KpnI	<u>TAAA</u> GGTACC ACA GTG CGC CGA AAT CAG
P4_5'_KpnI	<u>CCGA</u> GGTACC TTC TCG TGT TTG CAC ACG AAG
P4_3'_HindIII	<u>CCGA</u> AAGCTT TGC CAG CGC AGG AAT TCA GAC
P4_xpress_fw_HindIII	<u>GTGC</u> AAGCTT TTC GTG GCG AGA AAA AAA TCC TG
P4_xpress_rev_PstI	<u>CCCC</u> CTGCAG CTT AGT CAA ACC ATC AAA CCC
pQE30_term_fw_PstI	<u>GAGA</u> CTGCAG GAC TCC TGT TGA TAG ATC CAG
pQE30_term_rev_BamHI	<u>CCCT</u> GGATCC GAT TCT CAC CAA TAA AAA ACG C
tet-5'-EcoRI	<u>CCGA</u> GAATTC ATT CTC ATG TTT GAC AGC TT

tet-5'-KpnI	<u>TTTA</u> GGTACC ATG CGG TAG TTT ATC ACA G
tet-3'-PstI	<u>CCGA</u> CTGCAG ATA TGT TCT GCC AAG GGT
tet-3'-XbaI	<u>TAAT</u> TCTAGA GAA TCC GTT AGC GAG GTG

Unterstrichene Nukleotide gehen keine Basenpaarung ein und dienen als Überhang beim Restriktionsverdau. Fett geschriebene Nukleotide sind palindromische Sequenzen für Restriktionsenzyme.

6.3. Oligonukleotide für Primer Extension

Name	Sequenz
hfq_PE_Primer	CGC AGC AGC ACG ACA TAC TG
P4_PE_Primer2	CAC TCA TGC CCG TAT CGT TGC
P4-PE-Primer5	CTT AGT CAA ACC ATC AAA CCC

6.4. Oligonukleotide für quantitative RT-PCR

Name	Sequenz
BP0102_RT_fw	AAG ATC ATG ACC GCC TAT GTG
BP0102_RT_rev	ATC ATG CCC TGG TTC AGT TCG
BP0131_RT_fw	ATC ATC GTC CTG ACC CAG TC
BP0131_RT_rev	TCG CCA TGT ACT GCT TGA CC
BP0301_RT_fw	GAT TCA ACC TGG CCA TCA AG
BP0301_RT_rev	ATC GGA CCG GTG AAG AAA TC
BP0612_RT_fw	TGT TCA AGC AGT TGC CGT TC
BP0612_RT_rev	TGA GCA CCT TGC CTG ACT TC
BP0665_RT_fw	CGG ATA TCT TCA CCG TCA AC
BP0665_RT_rev	CTG ATG CCG TAC AGC GTT TC
BP1112_RT_fw	AAC GGC TTC CTG GAT TAC G
BP1112_RT_rev	TTC CTC GCG ACG ATT ATT G
BP1126_RT_fw	AGC ACT ACG AAC AGG CCA AC
BP1126_RT_rev	CGT GGA AAT ACG TGA CCT TG
BP1487_RT_fw	GCC AAA TAC GTA AGC GAA GC
BP1487_RT_rev	GGA TCC TTG CCG AAG TAG TAG
BP1499_RT_fw	ACC GAG TTT CCC GAT CTG AC

BP1499_RT_rev	TTT CGA GGA TCG CGT TCA G
BP1573_RT_fw	CCA AGG AGC TGA ACC TGA AG
BP1573_RT_rev	CAG GCC GCT CTC ATA ATA GG
BP1818_RT_fw	ATT GGG CAG TGG CAT CAT AG
BP1818_RT_rev	TGG AAC ATC CAC TTC AGC AG
BP1948_RT_fw	ACG GCA ACC GCT ATA CCT AC
BP1948_RT_rev	TCA TCA GGG TCT TGA AGG TG
BP2014_RT_fw	TCG ACC TGA ACA TGA AGC TG
BP2014_RT_rev	ACG TCG TTG TTC TTG TCA CG
BP2066_RT_fw	CGG CTA CAC CTT CTT CAT GG
BP2066_RT_rev	AAC TCC TGC AGC GAC TTG AC
BP2271_RT_fw	ACG GCA TCA TCT ACA ACA CG
BP2271_RT_rev	CTT GCA GGA TCG TTT CCA C
BP2352_RT_fw	GCG AAC GTG AGG TTA TCG AG
BP2352_RT_rev	TCC TGG CCT ATC TTG CTG TC
BP2361_RT_fw	GGT GCT GTC CAA AGT GTT CC
BP2361_RT_rev	AGC TCA TAC ACG GCA TTG G
BP2909_RT_fw	TCA CGC ACA AGG TCG ATT AC
BP2909_RT_rev	GCT ATC GGA ATA GGC AAA CG
BP2936_RT_fw	ATC CCC TCT CAT CTC CCA TC
BP2936_RT_rev	GCG ATA CAG CAA CAG GAA GC
BP2963_RT_fw	GTT CAA TAT CCG CCA GTT CC
BP2963_RT_rev	ACA TCC AGG CAT TCA TCT GG
BP3441_RT_fw	GGT CGA CCT GAA TCT GAA GG
BP3441_RT_rev	TCG TAC ACA TGC TTG CCA TAG
BP3471_RT_fw	GGT GTC CGA TTT CGA GTA CG
BP3471_RT_rev	ACG GAA AGA CGA ACT TGC TG
BP3495_RT_fw	CTC CAA GAC CTC CGA CAA C
BP3495_RT_rev	ATT TCC TTG CTG GTG GTG AC
BP3597_RT_fw	AAG GCT TCA AGG TCA TGG TG
BP3597_RT_rev	TGA TCG ATG ATC AGG CGT AG
BP3611_RT_fw	ACG TGG GTA CGA TTG GTC AC
BP3611_RT_rev	TCC GTC TCG TAC TCA ACG TG
BP3831_RT_fw	CGT GAA GAA GAA GGG CTT TG
BP3831_RT_rev	GCG TGA CCT TGA ACT TCG AC

BP3977_RT_fw	CTA CTC GAT CCT GCT CAT GC
BP3977_RT_rev	TGT CGG CGT TCT TCT TGA C
bpsA_RT_fw	GAT GGC TGG CAA CTG CTC
bpsA_RT_rev	CGA AAC CAG CAC GTA GGG
bvgA_RT_fw	TTC CCA ACC TCG TCG TAC TC
bvgA_RT_rev	ATG ACC TCG TGC AGG TTC TC
cyaA_RT_fw	GAC AAC GAC GTC AAC AGC AG
cyaA_RT_rev	GTT TCC TTC ACG CGA AAC TC
fhaB_RT_fw	GTC TTC AAC AAC GGC CTG AC
fhaB_RT_rev	CCC TTG CCA TAG ACT TCG AG
fimD_RT_fw	CTG AAA ACC TGC CGC TAT AC
fimD_RT_rev	CGC TCA TGT ACA CCG ATA CC
hfq_RT_fw	CAT CTA CCT GGT AAA CGG CAT C
hfq_RT_rev	GGA GAT GGC ATG TTT GTA CAC C
rpoB_RT_fw	TTT GAT GTC AAG GAA TGT CAG C
rpoB_RT_rev	GAA TTT CGC CCA TGT AGA CTT C

IV Methoden

1. Molekularbiologische und genetische Methoden

1.1. Isolierung von DNA

1.1.1. Isolierung chromosomaler DNA aus Gram-negativen Bakterien

Verwendete Lösungen:

- Lyse-Puffer:

100 mM Tris-HCl (pH 8.0)

5 mM EDTA

200 mM NaCl

- Lysozym-Lösung:

120 mg/ml in dH₂O

→ Lagerung in Aliquots bei -20°C

- RNase-Lösung:

10 mg/ml in dH₂O

→ Lagerung in Aliquots bei -20°C

- TE-Puffer:

10 mM Tris

1 mM EDTA

→ pH 7.4

- Proteinase K-Lösung:

20 mg/ml in dH₂O

→ Lagerung in Aliquots bei -20°C

- 10 % (w/v) SDS-Lösung

Durchführung:

1.5 ml ÜNK werden für 3 min bei 12.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 490 µl Lyse-Puffer resuspendiert. Dem Ansatz werden 10 µl Lysozym-Lösung zugegeben, bevor er für 15 min auf Eis inkubiert wird. Anschließend werden 20 µl 10%ige SDS-Lösung und 10 µl Proteinase K-Lösung hinzugefügt und der Ansatz bei 55°C solange inkubiert, bis die Lösung klar erscheint (ca. 1 h). Sollte die Lösung noch eine Trübung aufweisen, können dem Ansatz nochmals 10 µl 10%ige SDS-Lösung und 5 µl Proteinase K-Lösung hinzugefügt werden, bevor eine weitere Inkubation bei 55°C für 2 - 3 h erfolgt.

Dem Ansatz werden 500 µl Isopropanol zur Präzipitation der DNA hinzugegeben und dieser leicht geschwenkt, bis die chromosomale DNA als weißliche Wolke erscheint. Diese wird mit Hilfe einer Pipettenspitze in ein Reaktionsgefäß mit 500 µl 100%igem Ethanol überführt und für 10 min bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird mit 70%igem Ethanol durch erneute Zentrifugation gewaschen und anschließend entweder luftgetrocknet oder durch 5minütige Inkubation bei 37°C von Ethanolresten befreit. Die Lösung der DNA erfolgt in 500 µl TE-Puffer, dem 1 µl RNase-Lösung zugegeben wird. Dabei sollte beachtet werden, dass die DNA

weder durch Vortexen noch durch zu starkes Resuspendieren Scherkräften ausgesetzt wird. Die Lagerung der chromosomalen DNA erfolgt bei 4°C.

1.1.2. Plasmidisolierung in mittlerem Maßstab mittels Nucleobond® AX Midi Kit (= Midipräparation)

Verwendete Lösungen:

- alle verwendeten Lösungen sind im Kit enthalten

Durchführung:

100 - 200 ml ÜNK werden in 50 ml-Röhrchen überführt, für 15 min bei 6.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und die Pellets in je 4 ml S1-Puffer resuspendiert. Es werden je 4 ml S2-Puffer hinzugegeben, der Ansatz durch Invertieren vorsichtig gemischt und für 3 min bei RT inkubiert. Anschließend fügt man je 4 ml S3-Puffer hinzu, invertiert den Ansatz wiederum vorsichtig und inkubiert ihn für 5 min auf Eis, bevor er für 15 min bei 6.000 rpm und 4°C abzentrifugiert wird.

Nach Äquilibrierung der Säule mit 2.5 ml N2-Puffer gibt man die Probe über einen mit dH₂O angefeuchteten Filter auf die Säule, wobei der Durchfluss aufgefangen wird und ein zweites Mal auf die Säule gegeben wird. Anschließend wäscht man die Säule mit 10 ml N3-Puffer und eluiert die gebundene Plasmid-DNA mit 5 ml N5-Puffer. Dabei wird je 1 ml des Eluats in 2 ml-Reaktionsgefäßen aufgefangen, mit je 0.7 ml Isopropanol versetzt und die Plasmid-DNA durch Zentrifugation für 30 - 60 min bei 14.000 rpm und 4°C präzipitiert. Das Pellet wird mit 70%igem Ethanol gewaschen und bei 42°C getrocknet, bevor es in 50 µl dH₂O aufgenommen wird.

1.1.3. Plasmidisolierung in kleinem Maßstab mittels AxyPrep Plasmid Miniprep Kit (= Minipräparation)

Verwendete Lösungen:

- alle verwendeten Lösungen sind im Kit enthalten

Durchführung:

1 - 4 ml ÜNK werden evtl. in mehreren Schritten für 1 min bei 14.000 rpm und RT abzentrifugiert und das Pellet in 250 µl S1-Puffer resuspendiert. 250 µl S2-Puffer werden hinzugefügt und der Ansatz 4 bis 6-mal invertiert. 350 µl S3-Puffer werden zu dem Ansatz gegeben, dieser 6 bis 8-mal invertiert und bei 14.000 rpm und RT für 10 min abzentrifugiert. Der klare Überstand wird in die bereitgestellte Säule gegeben und die Plasmid-DNA durch 1-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und RT an die Säulenmatrix gebunden. Durch erneute 1-

minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und RT mit 700 µl W2-Puffer wird die Säule gewaschen und anschließend trocken zentrifugiert.

Die Elution der Plasmid-DNA erfolgt, indem 30 - 80 µl des Eluent-Puffers auf die Säule gegeben werden, diese 1 min bei RT inkubiert wird und anschließend für 1 min bei 14.000 rpm und RT zentrifugiert wird.

1.2. Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht eine exponentielle Vervielfältigung eines definierten DNA-Bereichs in einem automatisierten Verfahren. Dabei wechseln sich in einem Zyklus DNA-Denaturierung (bei 95°C), Primer-Hybridisierung (bei einer Annealingtemperatur, die von der Sequenz der verwendeten Primer abhängig ist) und Elongation (bei 72°C) ab. Die Spezifität der Amplifikation wird durch die Sequenz der Oligonukleotide gewährleistet, die zu den Endregionen der zu amplifizierenden DNA komplementär sind und gegenläufig an diese binden. Die Oligonukleotide werden nach folgenden Kriterien ausgewählt und mit den Softwareprogrammen GeneRunner und FastPCR auf Sekundärstrukturen und Spezifität untersucht:

17 - 28 Nukleotide

50 - 60 % GC-Gehalt

55 - 70°C Schmelztemperatur → Differenz zwischen den Oligonukleotiden nicht mehr als 4°C

GC-Klammer am 3'-Ende

keine Komplementärsequenzen zwischen Primern und Primerpaaren

Durch das Anhängen von Schnittstellen für Restriktionsenzyme an die spezifische Primersequenz können die amplifizierten Bereiche für Klonierungen verwendet werden. Die Annealingtemperatur der Oligonukleotide wird mit folgender Formel näherungsweise bestimmt:

$$T_m = (A + T) \times 2^\circ\text{C} + (G + C) \times 4^\circ\text{C}$$

Bei unterschiedlichen Schmelztemperaturen der Oligonukleotide wird jene Annealingtemperatur als optimale gewählt, welche 2°C unter der niedrigsten Annealingtemperatur liegt.

1.2.1. Analytische PCR von Transformanten (Lysat-PCR)

Zur Überprüfung von Transformanten wird eine analytische PCR angewandt. Dabei werden Zellen einer Bakterienkolonie mit einer sterilen Spitze von der Platte abgenommen und in 25 µl dH₂O eingerieben. Die Suspension wird für 5 min bei 100°C inkubiert und für 3 min bei 14.000 rpm und RT zentrifugiert. 2 µl des Überstandes werden anschließend als Template für die PCR eingesetzt, wobei ein einfacher Reaktionsansatz folgende Komponenten enthält:

2 µl	Template-DNA
3 µl	10x Polymerase Puffer
0.3 µl	Enhancer
0.3 µl	20 mM dNTPs
0.3 µl	Primer 1 (100 pmol/µl)
0.3 µl	Primer 2 (100 pmol/µl)
0.1 µl	Moltag-Polymerase (1 U/µl) (Molzym)
ad 30 µl dH ₂ O	

Ein Standard-PCR-Programm für die Moltag-Polymerase enthält folgende Schritte:

Initiale Denaturierung:	94°C, 5 min	1 x
Denaturierung:	94°C, 30 s	} 29 x
Annealing:	x°C, 40 s	
Elongation:	72°C, x min	
Abschlusselongation:	72°C, 10 min	1 x

Die Elongationszeit richtet sich nach der Größe des zu amplifizierenden Fragments, wobei für die Moltag-Polymerase eine Elongationsgeschwindigkeit von 1.000 Nukleotiden pro Minute angenommen wird.

1.2.2. Präparative PCR

Für PCR-Produkte zum Zwecke der Klonierung wird das iProof-PCR-System (Biorad) verwendet, da hierbei die thermostabile Polymerase über 3'→5'-Exonukleaseaktivität verfügt. Als Template-DNA fungiert chromosomale DNA (Konzentration: 25 - 250 ng/µl). Ein typischer Reaktionsansatz enthält folgende Komponenten, die in der genannten Reihenfolge zugegeben werden sollten:

36.4 µl	dH ₂ O
2 µl	Template-DNA
10 µl	5x High Fidelity Puffer
0.5 µl	20 mM dNTPs
0.3 µl	Primer 1 (100 pmol/µl)
0.3 µl	Primer 2 (100 pmol/µl)
0.5 µl	iProof-Polymerase

Ein Standard-PCR-Programm für die iProof-Polymerase enthält folgende Schritte:

Initiale Denaturierung:	98°C, 3 min	1 x
Denaturierung:	98°C, 10 s	} 29 x
Annealing:	x°C, 20 s	
Elongation:	72°C, x min	
Abschlusselongation:	72°C, 5 min	1 x

Die Elongationszeit richtet sich nach der Größe des zu amplifizierenden Fragments, wobei für die iProof-Polymerase eine Elongationsgeschwindigkeit von 15 bis 30 Sekunden pro 1.000 Nukleotiden angenommen wird.

1.3. Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente besitzen aufgrund ihres Phosphatrückgrats eine negative Ladung und wandern im elektrischen Feld der Agarose-Gelelektrophorese mit einer Geschwindigkeit zur Anode, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts ist. Der prozentuale Agarosegehalt im Gel bestimmt die Porengröße des Gels und damit den optimalen Auftrennungsbereich. 1%ige Agarosegele werden vor allem für DNA-Moleküle mit einer Größe von 1 - 10 kbp verwendet, während für kleinere Fragmente 2%ige Agarosegele zu bevorzugen sind. Die Sichtbarmachung der DNA-Fragmente erfolgt durch Zugabe des Farbstoffs Ethidiumbromid zum Agarosegel, welcher zwischen die Basen der DNA interkaliert und unter UV-Anregung fluoresziert.

Verwendete Lösungen:

- 10x TBE:	- 6x DNA Loading Dye (Fermentas)
1 M Tris	- 0.5 % (w/v) Ethidiumbromid-Lösung
1 M Borsäure	
25 mM EDTA	

Durchführung:

Zur Herstellung des Gels werden 1 - 2 % (w/v) Agarose mit 1x TBE versetzt und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wird Ethidiumbromid (3 µl auf 100 ml TBE-Gel) zugesetzt und die Agarose-Lösung in einen abgedichteten Gelschlitten mit eingesetztem Kamm gegossen. Sobald das Gel polymerisiert ist, wird es in der Gelkammer positioniert, mit 1x TBE überschichtet und der Kamm entfernt. Die mit 6x-Loading Dye versetzten Proben werden in die Geltaschen aufgetragen, sowie 5 - 7 µl Gene Ruler™ 1 kb DNA ladder (Fermentas) in eine getrennte Geltasche, was der Größen- und Mengenbestimmung der aufgetragenen

Fragmente dient. Anschließend erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente bei einer Spannung von 120 - 160 V, bevor das Gel unter UV-Licht dokumentiert wird.

1.4. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

1.4.1. Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels QIAquick® PCR Purification Kit

Das QIAquick® PCR Purification Kit wird zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus PCR- und Restriktionsansätzen verwendet. Dabei werden durch Bindung der DNA-Fragmente an die Silicamatrix der Säule Salze und Enzyme aus vorherigen Reaktionen entfernt, welche bei nachfolgenden Reaktionen störend wirken könnten.

Die Durchführung erfolgt, indem der jeweilige Ansatz mit 5 Volumen PB-Buffer versetzt und dieser auf die Säule gegeben wird. Nach Zentrifugation für 1 min bei 14.000 rpm und RT, wird der Durchfluss verworfen und die Säule durch erneute Zentrifugation mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Nach Verwerfen des Durchflusses wird die Säule zur Trocknung erneut zentrifugiert. Die Elution der gebundenen DNA-Fragmente erfolgt durch Zugabe von 30 - 50 µl EB-Puffer bzw. dH₂O (RT oder zur besseren Elution 65°C warm) auf die Säule. Nach 1 bis 5-minütiger Inkubation bei RT, erfolgt eine abschließende Zentrifugation für 1 min bei 14.000 rpm und RT. Das Eluat wird bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

1.4.2. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen mittels NucleoSpin® Extract II Kit

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgt mittels NucleoSpin® Extract II Kit. Dazu wird nach der Agarose-Gelelektrophorese die gewünschte Bande mit einem Skalpell sauber ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Je 100 mg Gel werden 200 µl Puffer NT zu dem Gelstück gegeben und dieses für ca. 10 min unter gelegentlichem Vortexen bei 50°C inkubiert, bis das Gelstück gelöst ist. Der Ansatz wird durch Zentrifugieren für 1 min bei 14.000 rpm und RT auf die Säule geladen. Der Durchfluss wird verworfen und mit 700 µl Puffer NT3 durch erneute Zentrifugation gewaschen. Die Säule wird durch Zentrifugation für 2 min bei 14.000 rpm und RT trocken zentrifugiert. Anschließend überführt man die Säule in ein frisches Reaktionsgefäß und eluiert das DNA-Fragment mit 15 - 50 µl Puffer NE, indem zunächst für 1 min bei RT inkubiert und anschließend für 1 min bei 14.000 rpm und RT zentrifugiert wird. Das Eluat wird bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

1.5. Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten in wässrigen Lösungen erfolgt mit Hilfe eines UV-Spektralphotometers durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, so dass die A_{260} -Einheit Aufschluss über die in der Lösung vorhandene Nukleinsäurekonzentration gibt. Proteine dagegen besitzen ein Absorptionsmaximum von ca. 280 nm, so dass das Verhältnis A_{260}/A_{280} Information über den Reinheitsgrad einer Nukleinsäurelösung vermitteln kann. Für DNA-Lösungen sollte das Verhältnis idealerweise bei 1.8 - 2.0 liegen.

1.6. Klonierung von DNA-Fragmenten

1.6.1. Spaltung von DNA-Fragmenten mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, welche die Spaltung von DNA-Fragmenten an spezifischen palindromischen Nukleotidsequenzen (4 - 6 bp) katalysieren und dabei entweder glatte Enden (blunt ends) oder Enden mit 5'- bzw. 3'-Überhang (sticky ends) im DNA-Doppelstrang schaffen. Sie sind Teil des Restriktions-Modifikations-Systems in Prokaryoten und vermitteln den Schutz vor artfremder DNA, indem diese abgebaut wird, wohingegen die eigene DNA an den Erkennungssequenzen durch Modifikation geschützt ist.

Ein typischer Reaktionsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

- 1 µg Plasmid-DNA bzw. PCR-Fragment
- 2 µl 10x Puffer
- 1 µl Restriktionsenzym (10 U/µl)
- ad 20 µl dH₂O

Der verwendete Restriktionspuffer und die optimale Inkubationstemperatur richten sich nach den Angaben des Herstellers für das jeweilige Enzym. Bei optimalen Reaktionsbedingungen spaltet ein Unit Enzym 1 µg DNA in einer Stunde. Zur Effizienzerhöhung kann nach einstündiger Inkubation nochmals 1 µl Enzym zum Ansatz gegeben werden und dieser eine weitere Stunde inkubiert werden (bei PCR-Produkten zu empfehlen). Die eingesetzte Enzymmenge sollte ein Zehntel des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da die Reaktion sonst durch zu hohe Glyzerinkonzentrationen inhibiert werden könnte. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgt nach Angaben des Herstellers bzw. durch Aufreinigung mittels QIAquick® PCR Purification Kit.

1.6.2. Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Eine zusätzliche Phosphatase-Behandlung nach dem Restriktionsverdau hilft im Falle von Plasmid-DNA, die Zahl von Religanden zu minimieren. Die Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) ist in den vom selben Hersteller vertriebenen Restriktionspuffern aktiv. Nach Inaktivierung des Restriktionsenzym nach Angaben des Herstellers wird 1 µl CIAP direkt zum Ansatz gegeben. Die Dephosphorylierung erfolgt durch Inkubation bei 37°C für 1 h. Für eine nachfolgende Ligation wird der Ansatz mittels QIAquick® PCR Purification Kit aufgereinigt.

1.6.3. Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-Ligase katalysiert die Verknüpfung von 3'-Hydroxyl-Enden mit 5'-Phosphatgruppen doppelsträngiger DNA unter ATP-Verbrauch, wobei sowohl glatte Enden als auch kohäsive Enden zusammengefügt werden. Ein typischer Ligationsansatz enthält ein Vektor:Insert-Verhältnis von 1:3, wobei diesem Verhältnis der Molekülgehalt der DNA-Fragmente zugrunde liegt. Mit folgender Formel kann aus Masse und Basenpaarlänge des DNA-Fragments der jeweilige Molekülgehalt ermittelt werden:

$$\text{pmol (dsDNA)} = \frac{\mu\text{g (dsDNA)} \times 1515}{\text{Anzahl an Basenpaaren (dsDNA)}}$$

Ein typischer Ligationsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

0.1 pmol	dephosphorylierter Vektor
0.3 pmol	Insert
2 µl	Ligase-Puffer
1 µl	T4-Ligase
ad 20 µl	dH ₂ O

Die Ligation erfolgt durch Inkubation des Ansatzes für 1 h bei 22°C bzw. zur Effizienzerhöhung über Nacht. Ein Ansatz, in welchem das Insert durch die jeweilige Menge an dH₂O ersetzt wird, fungiert als Kontrolle für den Restriktions- und Dephosphorylierungsgrad des Vektors. Der Ligationsansatz kann direkt für die Transformation in kompetente Zellen verwendet werden und wird bis zu seinem Gebrauch bei -20°C gelagert.

1.7. Transformation von Bakterien

Die Aufnahme freier DNA durch eine kompetente Empfängerzelle wird als Transformation bezeichnet. Neben natürlich kompetenten Bakterien (*Neisseria* etc.) müssen die meisten Bakterien erst durch chemische Behandlung kompetent gemacht werden.

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

Verwendete Lösungen:

- 0.1 M CaCl_2 -Lösung
- 0.1 M CaCl_2 -Lösung mit 20 % (v/v) Glycerin

Durchführung:

Zur Herstellung CaCl_2 -kompetenter *E. coli*-Zellen werden 50 ml LB-Medium mit 500 μl ÜNK des jeweiligen Stammes angeimpft und bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0.5 angezogen. Die Bakterien werden für 15 min auf Eis inkubiert, bevor sie für 10 min bei 5.000 rpm und 4°C abzentrifugiert werden. Das Pellet wird in 10 ml eiskalter 0.1 M CaCl_2 -Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 5.000 rpm und 4°C wird das Pellet in 2.5 ml eiskalter 0.1 M CaCl_2 -Lösung mit 20 % Glycerin resuspendiert und in Aliquots von 250 μl bei -80°C gelagert.

1.7.2. Transformation

100 μl CaCl_2 -kompetente *E. coli*-Zellen werden mit Ligationsansatz bzw. Plasmid (0.1 - 1 μg) versetzt und für 30 - 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Ansatz für 90 s auf 42°C im Wasserbad erhitzt, bevor eine zweiminütige Inkubation auf Eis erfolgt. 900 μl LB-Medium werden zu den Zellen gegeben und 1 - 2 h im Schüttelinkubator bei 37°C und 190 rpm inkubiert. 100 μl des Transformationsansatzes werden direkt auf Selektionsplatten ausplattiert, der Rest wird abzentrifugiert (3 min, 10.000 rpm, RT), in 100 μl LB-Medium resuspendiert und ebenfalls auf Selektionsplatten ausplattiert.

1.8. Konjugation

Unter Konjugation versteht man die Übertragung genetischen Materials von einem Donor zu einem Rezipienten durch direkten Zellkontakt. *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* nehmen Plasmid-DNA effizient durch Konjugation auf, wobei *E. coli* SM10 als Donorstamm fungiert.

Die Durchführung erfolgt, indem der jeweilige *Bordetella*-Stamm ca. 2 - 3 Tage, der *E. coli*-Donorstamm einen Tag vor Beginn der Konjugation großflächig auf BG- bzw. LB-Platten ausgestrichen und bei 37°C inkubiert wird. Mit einer Impföse wird reichlich Zellmaterial des *Bordetella*-Stamms von der vorinkubierten Platte abgenommen und auf einer frischen BG-Platte ohne Antibiotikum in einem runden Areal von ca. 3 cm Durchmesser übertragen. Ca. ein Fünftel an *E. coli*-Zellmaterial wird entnommen und mit den bereits übertragenen Bordetellen vermischt. Nach ca. 5 h Inkubation bei 37°C wird das Bakteriengemisch mit einer Impföse entfernt, in 500 µl 1x PBS resuspendiert und auf BG-Platten mit entsprechenden Selektionsantibiotika ausplattiert.

1.9. Sequenzierung

Die Sequenzierungen werden von der Firma SEQLAB (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) durchgeführt, wobei bis zu 900 Basenpaare durch eine Extended Hot Shot Sequenzierung identifiziert werden können. Die Sequenzierung von Plasmid-DNA benötigt 600 - 700 ng Plasmid-DNA im Ansatz, während bei PCR-Produkten generell ein Viertel der Basenpaarlänge an DNA (in ng) im Ansatz vorhanden sein sollte, also für ein 500 bp-PCR-Produkt ca. 125 ng. In den Ansatz werden 20 pmol des Sequenzierungsprimers gegeben und der Ansatz auf 7 µl mit dH₂O aufgefüllt.

1.10. Arbeiten mit RNA

Der Umgang mit RNA erfordert wegen des hohen Risikos einer RNase-Kontamination besondere Vorsicht. RNasen können leicht von Haut oder Speichel in Proben übertragen werden, weshalb das ständige Tragen von Handschuhen unbedingt zu empfehlen ist. Der Gebrauch von speziellen Pipettenspitzen, Einweg-Pipetten und Reaktionsgefäßen erhöht den Schutz vor RNasen. Des Weiteren sollten verwendete Lösungen - sofern sie kein Tris enthalten - vor Gebrauch mit dem RNase-Hemmstoff Diethylcarbonat (DEPC) behandelt werden. Dazu werden die Lösungen mit 0.1 % (v/v) DEPC über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend zweimal autoklaviert, was zum Zerfall des giftigen DEPC in Ethanol und CO₂ führt.

1.10.1. Isolierung von RNA

Verwendete Lösungen:

- 1 M Tris-HCl (pH 7.0)
- 25 % (w/v) SDS-Lösung
- Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1)
- 3 M Natriumacetat (pH 4.8)

- AE-Puffer:

20 mM Natriumacetat

1 mM EDTA

→ pH 5.5 einstellen

Durchführung:

50 ml Bakterienkultur werden bis zur gewünschten Wachstumsphase bei 37°C und 190 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Die Bakterienzellen werden in ein Röhrchen überführt und für 20 min bei 6.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7.0) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet kann nun bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden oder gleich weiterbearbeitet werden.

Dazu wird das Pellet in 10 ml 65°C-warmen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-(25:24:1)-Gemisch resuspendiert, mit 6 ml 65°C-warmen AE-Puffer und 150 µl 25%ige SDS-Lösung versetzt und 30 min unter mehrmaligem Vortexen bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Der Ansatz wird für 10 min auf Eis inkubiert, bevor er für 20 min bei 6.000 rpm und 4°C abzentrifugiert wird. Die wässrige Phase wird in ein frisches Röhrchen überführt, mit 670 µl 3 M Natriumacetat (pH 4.8) und 6 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-(25:24:1)-Gemisch versetzt und für 5 min bei 6.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wird erneut abgenommen und mit 2 ml reinem Chloroform vermengt. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 6.000 rpm und 4°C wird die wässrige Phase in ein frisches Gefäß überführt und mit 2.5 Volumen eiskaltem 100%igem Ethanol vermischt. Die Präzipitation der RNA erfolgt durch Inkubation bei -20°C über Nacht.

Am folgenden Tag wird der Ansatz für 60 - 90 min bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet mit 2 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 10.000 rpm und 4°C wird das Pellet für ca. 30 min über einem 60°C-warmen Heizblock getrocknet, anschließend in 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen und in ein RNase-freies Reaktionsgefäß überführt.

1.10.2. DNase-Behandlung der RNA

Die RNA-Lösung wird mit 0.1 Volumen 10x DNase-Puffer und 1 µl Turbo DNase (Ambion) versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Es wird erneut 1 µl Turbo DNase hinzugefügt und der Ansatz eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend gibt man 0.1 Volumen gevortextes DNase-Inaktivierungs-Reagenz dazu und vermischt es gut. Nach zweiminütiger Inkubation bei RT, wobei gelegentlich gemischt wird, wird der Ansatz für 3 min bei 14.000 rpm und RT abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches RNase-freies Reaktionsgefäß übertragen.

Die Effizienz der DNase-Behandlung wird überprüft, indem 2 µl der RNA-Lösung als Template für eine analytische PCR (s. IV 1.2.1.) mit chromosomenspezifischen Primern dienen. Ist kein PCR-Produkt nachzuweisen, dann ist die RNA frei von DNA-Resten. Sollte ein PCR-Produkt zu erkennen sein, dann muss die DNase-Behandlung so lange wiederholt werden, bis keine DNA mehr nachgewiesen werden kann.

1.10.3. RNA-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Effizienz der RNA-Isolierung (evtl. Abbau der RNA, DNA-Reste) kann die RNA-Probe auf einem speziellen RNA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Das darin enthaltene Guanidinthiocyanat garantiert die Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der RNA und ermöglicht so einheitliche Laufbedingungen.

Verwendete Lösungen:

- 10x MOPS:	- 2x RNA-Probenauftragspuffer:
0.2 M MOPS (Morpholinopropan- sulfonsäure)	50 % (v/v) Formamid
0.1 M Natriumacetat	2.2 M Formaldehyd
10 mM EDTA	10 % (v/v) 10x MOPS
→ mit NaOH auf pH 7 einstellen	4 % (w/v) Ficoll 400
→ lichtgeschützt und RNase-frei lagern	1 SpSP Bromphenolblau
	→ aliquotieren und RNase-frei bei -20°C lagern

- Guanidinthiocyanat-Gel (100 ml):

1 g	Agarose
5 ml	10x MOPS
72 ml	DEPC-H ₂ O
→ in Mikrowelle aufkochen, auf 50 - 60°C abkühlen lassen	
40 µl	1 M Guanidinthiocyanat
18.7 ml	DEPC-H ₂ O
7.5 µl	Ethidiumbromid
→ gut mischen und sofort in abgedichteten Schlitten überführen	

Ein Aliquot der RNA-Probe wird mit gleicher Menge des 2x RNA-Probenauftragspuffers versetzt und für 3 min bei 65°C erhitzt, um vorhandene Sekundärstrukturen einzelsträngiger RNA aufzubrechen. Nach Abkühlen der Probe auf Eis wird diese in die Geltaschen geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in 1x MOPS-Laufpuffer bei ca. 80 V, bevor das Gel unter UV-Licht dokumentiert werden kann.

1.10.4. Konzentrationsbestimmung von RNA-Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung von RNA-Lösungen erfolgt ähnlich wie unter IV 1.5. für DNA-Lösungen beschrieben. Das A_{260}/A_{280} -Verhältnis sollte allerdings im Falle von RNA-Lösungen idealerweise zwischen 2.0 - 2.2 liegen.

1.11. Reverse Transkription von RNA in cDNA

Bei der reversen Transkription wird RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre einzelsträngige DNA (cDNA) umgeschrieben. Dabei entspricht die Menge der synthetisierten cDNA-Moleküle der Anzahl der vorhandenen RNA-Moleküle. Durch Gebrauch von sogenannten Random Primern, die aus willkürlichen Hexameren bestehen, kann repräsentativ das gesamte Transkriptom in cDNA umgewandelt werden.

Für einen Ansatz werden 5 µg RNA mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 10 µl eingestellt. Nach Zugabe von 1 µl Random Primer (3 µg/µl; Invitrogen) wird der Ansatz für 5 min auf 65°C erhitzt. Anschließend wird der Ansatz 5 - 10 min auf Eis gehalten, bevor 9 µl Mastermix hinzugefügt werden, der sich wie folgt zusammensetzt:

- 4 µl 5x First Strand Buffer (Invitrogen)
- 2 µl 0.1 M DTT (Invitrogen)
- 1 µl 20 mM dNTPs (RNase-frei)
- 1 µl RNase Out (Invitrogen)
- 1 µl Super Script™ II (Invitrogen)

Der Ansatz wird für 10 min bei 25°C inkubiert und anschließend für 60 min bei 42°C, währenddessen die reverse Transkription erfolgt. Nach Abstoppen der Reaktion durch 15-minütige Inkubation bei 70°C, wird der Ansatz mittels QIAquick® PCR Purification Kit aufgereinigt, wobei die Elution der cDNA mit 100 µl EB-Puffer erfolgt. Geht man von einer 100%igen Effektivität der cDNA-Synthese aus, dann entsprechen 1 µl der cDNA-Lösung 50 ng eingesetzter RNA.

1.12. Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Realtime-PCR ermöglicht die Quantifizierung von Nukleinsäuren, indem durch Zugabe eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes die Amplifikation des PCR-Produkts von Zyklus zu Zyklus verfolgt wird. In den frühen Zyklen findet die Amplifikation des PCR-Produkts noch exponentiell statt, wobei die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund abhebt (C_T -Wert), als Schwellenwert gesetzt wird. Das Mitführen eines internen Standards, z. B. eines Housekeeping-Gens, das unter allen getesteten

Bedingungen gleich exprimiert sein sollte, ermöglicht den Vergleich verschiedener Ansätze, welche unter verschiedenen Bedingungen isoliert wurden, z. B. Wildtyp und Mutante. Eine Schmelzkurve im Anschluss an die PCR-Reaktion dient der Kontrolle der Spezifität der PCR-Produkte. Oligonukleotide für die qRT-PCR werden so ausgewählt, dass sie ein ca. 150 bp großes Fragment im Kernbereich des zu untersuchenden Gens amplifizieren. Vor der qRT-PCR werden die Oligonukleotide in einer Standard-PCR mit chromosomaler DNA als Template auf Effizienz und Spezifität getestet. Ein Standardreaktionsansatz besteht aus folgenden Komponenten:

- 12.5 µl Absolute™ QPCR SYBR® Green Mix (ABGene/Thermo Scientific)
- 0.25 µl Forward Primer (10 pmol/µl)
- 0.25 µl Reverse Primer (10 pmol/µl)
- 2.5 µl cDNA-Template (1:5-verdünnt)
- 9.5 µl dH₂O

Primer, Absolute™ QPCR SYBR® Green Mix und dH₂O werden dabei als Mastermix von 22.5 µl vorgelegt und zu jedem Ansatz 2.5 µl verdünnte cDNA hinzugegeben. Berücksichtigt man den Verdünnungsfaktor, dann werden jedem Ansatz ca. 25 ng eingesetzter RNA zugesetzt.

Standardbedingungen für die qRT-PCR:

- | | | |
|-------------------------|--------------|-------------|
| Initiale Denaturierung: | 95°C, 15 min | |
| Denaturierung: | 95°C, 15 s | } 40 Zyklen |
| Primer-Annealing: | 58°C, 30 s | |
| Elongation: | 72°C, 30 s | |

Die Auswertung der qRT-PCR-Daten erfolgt mit Hilfe der StepOne™ Software v2.1 und Microsoft Excel.

1.13. Primer Extension

Die Primer Extension dient der Bestimmung von Transkriptionsstartpunkt und -stärke eines Gens. Ein Oligonukleotid, welches zuvor am 5'-Ende radioaktiv markiert wurde, hybridisiert dabei an sein komplementäres mRNA-Molekül und wird so lange durch die Reverse Transkriptase verlängert, bis das 5'-Ende des jeweiligen Transkripts erreicht wird. Zusätzlich führt man die Sequenzierung eines Plasmids durch, in welches die Promotorregion und das vermutete 5'-Ende des zu untersuchenden Gens kloniert wurde, wobei derselbe Primer wie für die Primer Extension verwendet wird. Gelelektrophoretische Auftrennung des Sequenzierungsansatzes und der cDNA ermöglicht die exakte Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts.

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

Die Sequenzierungsreaktion wird mit dem T7 Sequencing Kit (usb) durchgeführt.

Zur Denaturierung des DNA-Templates werden 1.5 - 3 μg Plasmid-DNA mit dH_2O auf 32 μl aufgefüllt und mit 8 μl 2 M NaOH versetzt. Der Ansatz wird leicht gevortext, kurz abzentrifugiert und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 7 μl 3 M Natriumacetat (pH 4.8), 4 μl dH_2O und 120 μl eiskalter 100%iger Ethanol hinzugefügt, bevor der Ansatz über Nacht bei -20°C gelagert wird.

Am folgenden Tag wird die denaturierte Probe 15 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird mit 200 μl 70%igem Ethanol durch erneute Zentrifugation für 10 min bei 14.000 rpm und 4°C gewaschen und anschließend für ca. 5 min in der SpeedVac getrocknet. Das Pellet wird in 10 μl dH_2O resuspendiert und mit je 2 μl Sequenzierungsprimer (5 pmol/ μl) und 37°C -warmen Annealing-Puffer versetzt und für 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend erfolgt eine sofortige Inkubation für 10 min bei 37°C , bevor der Ansatz für 5 min bei RT inkubiert wird. Hierbei erfolgt die Hybridisierung des Sequenzierungsprimers an das DNA-Template. Währenddessen werden 0.5 μl T7-DNA-Polymerase mit 2 μl kaltem Enzyme Dilution Buffer verdünnt.

Dem Ansatz werden nun 3 μl Labelling Mix A, 1.5 μl $\alpha^{33}\text{P}$ -dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$; 3.000 Ci/mmol) und 2 μl der verdünnten T7-DNA-Polymerase hinzugefügt und für 5 min bei RT inkubiert. Je 4.5 μl der gelabelten Probe werden in getrennte Reaktionsgefäße gegeben, welche je 2.5 μl des jeweiligen, auf 37°C vorgewärmten Didesoxyribonukleosidtriphosphats (A-Mix-Short, C-Mix-Short, G-Mix-Short bzw. T-Mix-Short) enthalten. Die Ansätze werden für 5 min bei 37°C inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 5 μl Stopp-Lösung unterbrochen wird. Die Ansätze werden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

1.13.2. 5'-Markierung des Primers mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP

1 μl Primer (5 pmol/ μl) wird mit 1 μl 10x Kinase-Puffer, 4 μl DEPC- H_2O , 3 μl $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP und 1 μl Polynucleotid-Kinase versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung des gelabelten Primers erfolgt mittels QIAquick® Nucleotide Removal Kit. Dazu wird der Reaktionsansatz mit 100 μl PN-Puffer versetzt und durch 1-minütige Zentrifugation bei 6.000 rpm an die Säule gebunden. Die Säule wird anschließend zweimal mit je 500 μl PE-Puffer durch erneute Zentrifugation für 1 min bei 6.000 rpm gewaschen. Nach einem Trocken zentrifugationsschritt für 1 min bei 14.000 rpm wird der gelabelte Primer mit 50 - 60 μl DEPC- H_2O durch Zentrifugation für 1 min bei 14.000 rpm eluiert. Es ist zu beachten, dass der radioaktive Durchfluss während der Durchführung in verschließbaren 2 ml-Reaktionsgefäßen aufgefangen und verworfen wird.

Die Messung der Effektivität der radioaktiven Markierung erfolgt, indem 2 µl der gelabelten Probe auf ein rundes Whatman-Papier gegeben und dieses in einen geeigneten Behälter mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit überführt wird. Anschließend wird die Radioaktivität der Probe in der Einheit cpm/µl im Szintillationszähler ermittelt. Der Primer wird bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

1.13.3. Primer Extension

20 - 30 µg RNA und ein Volumen des gelabelten Primers, welches ca. 2.000.000 cpm entspricht, werden mit 2.5 Volumen 100%igem Ethanol und 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4.8) versetzt und über Nacht bei -20°C präzipitiert. Am nächsten Tag wird der Ansatz für 30 min bei 15.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und mit 200 µl 70%igem Ethanol durch erneute Zentrifugation für 10 min bei 15.000 rpm und 4°C gewaschen. Das Pellet wird für ca. 5 min in der SpeedVac getrocknet, bevor es in 5 µl DEPC-H₂O gelöst wird. Dem Ansatz werden 2 µl 5x Reverse Transkriptase Puffer (Roche) und 2 µl 2 mM dNTPs zugegeben und dieser für 5 min bei 70°C inkubiert. Nach Hinzufügen von 1 µl AMV Reverse Transkriptase (Roche) erfolgt eine einstündige Inkubation bei 45°C. Anschließend wird 1 µl RNase (10 mg/ml) zugegeben und der Ansatz für 10 min bei RT inkubiert, bevor durch Zugabe von 4 µl Stopp-Lösung die Reaktion abgebrochen wird.

1.13.4. 6 %-Polyacrylamid-Harnstoffgel

Sequenzierungsansatz und cDNA aus der Primer Extension werden auf einem 6 %-Polyacrylamid-Harnstoffgel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel (20 cm x 40 cm x 0,3 mm) wird nach folgenden Angaben hergestellt:

24 g	Harnstoff
10 ml	30 % Polyacrylamidlösung
5 ml	10x TBE
14 ml	dH ₂ O
200 µl	10 % APS
45 µl	TEMED

Das Gel wird dabei einen Tag vor Gebrauch liegend gegossen, nach ca. 30 - 60 min Auspolymerisierungszeit in feuchte Tücher und Frischhaltefolie gepackt und bei RT über Nacht gelagert.

Das Gel wird bei Gebrauch zusammen mit einer Bleiplatte, welche dem Schutz vor radioaktiver Strahlung während des Laufs dient, in der Kammer positioniert. Nach Ausspülen

der Geltaschen mit 1x TBE erfolgt ein halbstündiger Vorlauf des Gels in 1x TBE-Laufpuffer mit den Parametern 1500 V, 30 mA, 40 W.

Die Sequenzierungsansätze und der Primer Extension-Ansatz werden für 2 min bei 75°C inkubiert und nach erneutem Ausspülen der Geltaschen in diese geladen. Der Gellauf erfolgt für ca. 1.5 - 2 h bei 1500 V, 30 mA, 40 W, bis die Bromphenolblaufront aus dem Gel austritt. Anschließend wird das Gel mittels eines dünnen Whatman-Papiers (20 cm x 40 cm) von den Glasplatten abgezogen, in Frischhaltefolie eingewickelt und in einer Röntgenfilmkassette aufbewahrt. Die Detektion der Radioaktivität erfolgt über Exposition mit einem sensitiven Röntgenfilm ÜN bei -20°C.

1.14. Sequenzierung von Transkript-5'-3'-Enden

Mit dieser Methode ist es möglich, gleichzeitig das 5'- und 3'-Ende eines RNA-Transkripts nachzuweisen, indem die RNA zunächst durch Verknüpfung der beiden Enden zirkularisiert wird. Eine anschließende reverse Transkription in cDNA mit genspezifischen Primern ermöglicht die Gewinnung von Material für eine nachfolgende PCR und Sequenzierung.

1.14.1. Zirkularisierung der RNA

In einem ersten Schritt werden die 5'-Triphosphat-Gruppen der RNA-Transkripte durch Behandlung mit dem Enzym Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP) abgespalten. Dazu werden 8 µg RNA mit RNase-freiem dH₂O auf ein Volumen von 43.5 µl eingestellt und dem Ansatz 5 µl 10x TAP-Puffer, 0.5 µl RNase Inhibitor (Fermentas, 40 U/µl) und 1 µl TAP (Epicentre, 10 U/µl) hinzugegeben, bevor eine 30-minütige Inkubation bei 37°C erfolgt. Anschließend wird der Ansatz über Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-(PCI)-Behandlung aufgereinigt. Dazu wird der Ansatz mit RNase-freiem dH₂O auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und dieser in ein PhaseLock-Gefäß (Eppendorf) überführt. Es werden 100 µl Phenol/Chloroform/IAA-Gemisch (25:24:1) hinzugegeben und das Gefäß 30 s stark geschüttelt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 13.000 g und RT wird die wässrige Phase (100 µl) in ein frisches Gefäß überführt. Die Präzipitation der RNA erfolgt durch Zugabe von 300 µl 100%igem EtOH und 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 4.8) und anschließender Inkubation auf Eis für 1 h. Nach einem 40-minütigen Zentrifugationsschritt bei 13.000 g und 4°C wird das RNA-Pellet mit 200 µl 70%igem EtOH gewaschen, bevor es luftgetrocknet und in 13.5 µl RNase-freies dH₂O aufgenommen wird.

Die RNA wird für 2 min bei 90°C denaturiert und 5 min auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wird kurz abzentrifugiert und auf Eis die folgenden Komponenten hinzugefügt: 2 µl DMSO, 2 µl 10x RNA-Ligations-Puffer, 2 µl T4 RNA Ligase (NEB, 40 U/µl) und 0.5 µl RNase Inhibitor (Invitrogen, 20 U/µl). Der Ansatz wird für 12 h bei 17°C inkubiert, in denen die Zirkularisierung der RNA-

Transkripte erfolgt. Anschließend wird wie bereits oben beschrieben eine Aufreinigung mittels PCI-Behandlung durchgeführt. Das Pellet wird in 10 µl dH₂O aufgenommen und die Konzentration bestimmt.

1.14.2. Genspezifische cDNA-Synthese

2 µg der zirkulär ligierten RNA werden mit 20 pmol genspezifischem Primer und RNase-freiem dH₂O auf ein Volumen von 13.5 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird für 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis die folgenden Komponenten hinzugegeben: 4 µl 5x RT-Puffer, 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM) und 0.5 µl RNase Inhibitor (Invitrogen, 20 U/µl). Nach gründlichem Mischen wird für 10 min bei 25°C inkubiert, bevor 1 µl Maxima Reverse Transkriptase (Fermentas) dem Ansatz zugefügt wird. Anschließend erfolgt eine je 30-minütige Inkubation bei 42°C, 50°C, 55°C und 60°C, bevor der Ansatz weitere 5 min bei 85°C erhitzt wird. Nach Abkühlen auf 37°C wird 1 µl RNase H (1 U/µl) zugegeben und weitere 20 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wird bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2. Proteinbiochemische Methoden

2.1. Isolierung von Gesamtzellprotein für 2D-Gelelektrophorese

Verwendete Lösung:

- Lysepuffer III:

8.4 g	Harnstoff
3.04 g	Thioharnstoff
0.096 g	Tris
0.4 g	CHAPS
0.2 g	Zwittergent
160 µl	Ampholyte
ad 20 ml	dH ₂ O

→ Lagerung in Aliquots von 1 - 5 ml bei -20°C, vor Gebrauch eine kleine Spatelspitze DTT zu jedem Aliquot geben

Durchführung:

25 ml Bakterienkultur werden bis zur gewünschten Wachstumsphase bei 37°C und 190 rpm im Schüttelinkubator angezogen, in 50 ml-Röhrchen überführt und für 20 min bei 6.000 rpm

und 4°C pelletiert. Das Pellet wird in 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7.0) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Pellets können bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert oder gleich weiterbearbeitet werden. Dazu wird das Pellet in 1.5 ml Lysepuffer III resuspendiert und je 750 µl des Ansatzes in ein Shredder Tube (Lysing Matrix B [MP Bio]) überführt. Durch zweimalige Behandlung bei 6.5 für 20 s in der FastPrep werden die Zellen aufgeschlossen, wobei die Proben zwischen den Durchgängen kurze Zeit auf Eis inkubiert werden. Die Shredder Tubes werden für 5 min bei 14.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

2.2. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird der Bradford-Assay der Firma BioRad verwendet, welcher darauf beruht, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 mit Proteinen Komplexe bildet, deren Absorptionsmaximum bei 595 nm liegt. Dabei wird zunächst mittels definierter Konzentration des Proteins bovines Serumalbumin (BSA) eine Eichgerade festgelegt, welche nach folgendem Schema pipettiert wird:

Volumen BSA-Stocklösung (100 µg/ml)	Volumen dH ₂ O	Endkonzentration BSA (µg/ml)
0 µl	800 µl	0
10 µl	790 µl	1.25
20 µl	780 µl	2.5
40 µl	760 µl	5
60 µl	740 µl	7
80 µl	720 µl	10

Die zu testenden Proteinproben werden 1:50 mit dH₂O verdünnt und 40 µl der Verdünnung zu 760 µl dH₂O gegeben. Zu den Proben der Eichgerade und den zu untersuchenden Proben werden je 200 µl Bradford-Lösung gegeben, der Ansatz gut gemischt und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert, bevor die photometrische Bestimmung der Absorption bei 595 nm erfolgt. Anhand der Werte der Eichgerade mit definiertem Proteingehalt kann die Proteinkonzentration der unbekannt Probe ermittelt werden.

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

Verwendete Lösungen:

- 10x SDS-Laufpuffer:

250 mM Tris
2 M Glycin
1 % SDS
2.5 % β -Mercaptoethanol

- 2x Lämmli-Puffer:

31.25 mM Tris-HCl (pH 8.0)
5 % Glycin
1 % SDS

- Coomassie-Färbelösung:

45 % (v/v) Ethanol
10 % (v/v) Essigsäure
0.25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250

Die SDS-PAGE ermöglicht die Auftrennung von Proteinen gemäß ihrer molekularen Masse in einem elektrischen Feld. Dabei macht man sich die denaturierende Eigenschaft von Natriumdodecylsulfat (SDS) zu Nutze, welches an die Polypeptidketten der Proteine bindet und negativ geladene SDS-Protein-Komplexe ausbildet. Da hierbei die intrinsische Ladung des Proteins maskiert wird, wird ein konstantes Ladungs/Masse-Verhältnis erreicht und es ergibt sich ein lineares Verhältnis zwischen dem Molekulargewicht des Proteins und der relativen Wanderungsstrecke im SDS-Gel. Die Zugabe von β -Mercaptoethanol in den Probenpuffer führt zur Reduktion von Disulfidbrücken innerhalb des Proteins, so dass die Konformation des Proteins keine Auswirkung auf die Laufeigenschaft des Proteins ausübt. Der Auftrennungsbereich des SDS-Gels wird dabei durch die Porengröße, welche durch den prozentualen Gehalt an Polyacrylamid als vernetzender Substanz bestimmt ist, determiniert.

Trenn- und Sammelgel werden dabei nach folgendem Schema hergestellt:

	12 % Trenngel (10 ml)	8 % Sammelgel (3 ml)
dH ₂ O	3.3 ml	2.1 ml
30 % Polyacrylamid-Mix	4.0 ml	0.5 ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml	-
1.0 M Tris-HCl (pH 6.8)	-	0.38 ml
10 % SDS	100 μ l	30 μ l
10 % APS	100 μ l	30 μ l
TEMED	6 μ l	3 μ l

Nach Zugabe des Radikalbildners TEMED zum Trenngel wird dieses sofort zwischen zwei abgedichtete Glasplatten bis ca. 2 cm unterhalb des oberen Randes gegossen und zur Ausbildung einer ebenen Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wird das Sammelgel darauf gegossen und ein Kamm zur Ausbildung von Beladungstaschen eingesetzt. Das Gel wird in eine mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllte Kammer gesetzt, der Kamm entfernt und die Taschen ausgespült. Die zu untersuchenden Proben werden mit 2x Lämmli-Puffer versetzt, für 5 min bei 95°C erhitzt und in die Taschen aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard für normale SDS-Gele dienen 10 µl PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas) in einer getrennten Tasche, während bei SDS-Gelen, welche später für einen Immunoblot (s. IV 2.4.) eingesetzt werden, 10 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet werden. Die Elektrophorese erfolgt bei 150 - 220 Volt, bis die Bromphenolblaufront aus dem Gel gelaufen ist.

Im Anschluss an die Elektrophorese erfolgt die Färbung der Proteine mittels Coomassie-Blau. Dazu wird das Gel 15 - 60 min in der Färbelösung geschwenkt und anschließend so lange mit 10 % Essigsäure entfärbt, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund unterscheiden.

2.4. Immunoblot

Der Immunoblot ermöglicht den Nachweis einzelner Proteine über spezifische Interaktion mit Antikörpern.

Verwendete Lösungen:

- Blotpuffer:

5.8 g Tris
2.9 g Glycin
0.37 g SDS
200 ml Ethanol
ad 1 l dH₂O

- 1x PBST:

100 ml 10x PBS
5 ml 10 % (v/v) Tween 20
ad 1 l dH₂O

- 10x PBS:

80 g NaCl
2g KCl
11.5 g Na₂HPO₄
2 g KH₂PO₄
→ pH 7.4 einstellen

- PBST/Magermilch:

1x PBST
5 % (w/v) Magermilchpulver

Durchführung:

Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (s. IV 2.3.) erfolgt deren Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran mittels Semidry-Verfahren. Dazu werden drei auf Größe des Gels zugeschnittene Whatmanpapiere in Blotpuffer getränkt und auf die Anodenplatte der

Blotkammer gelegt. Die mit dH_2O befeuchtete, ebenfalls zurechtgeschnittene Nitrozellulosemembran wird auf den Stapel Whatmanpapiere gelegt und das SDS-PAGE-Gel nach Abschneiden des Sammelgels darauf gegeben. Drei mit Blotpuffer getränkte Whatmanpapiere kommen als Abschluss auf den Stapel, wobei mögliche Luftblasen durch sanftes Rollen mit einer Glaspipette entfernt werden. Nach Aufsetzen der Kathodenplatte und dem Verschluss der Kammer erfolgt der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran mit 0.89 mA pro cm^2 Gel für etwa 1 h bei Raumtemperatur.

Um unspezifische Bindestellen auf der Membran abzusättigen, wird sie 1 h bei RT oder ÜN bei 4°C mit PBST/Magermilch unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend folgt eine einstündige Inkubation bei RT mit dem ersten, für das Zielprotein spezifischen Antikörper, welcher nach Angaben des Herstellers in PBST/Magermilch verdünnt wird (meist 1:1.000). Diese spezifische Antikörperlösung wird nach der Inkubation aufbewahrt und kann bis zu zehnmal wieder verwendet werden.

Die Membran wird für 1 h in 10 bis 15-minütigen Intervallen mit PBST gewaschen und anschließend mit dem zweiten Antikörper für 1 h bei RT inkubiert. Der zweite Antikörper ist gegen die konstante Region des ersten Antikörpers gerichtet und an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Der zweite Antikörper wird 1:10.000 in PBST/Magermilch verdünnt und nur einmal verwendet. Nach Waschen der Membran für 1 h in 10 bis 15-minütigen Intervallen erfolgt die Detektion der spezifischen Proteine mittels Pierce® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific). Hierfür werden die beiden Detektionsreagenzien im Verhältnis 1:1 gemischt, wobei man von $125 \mu\text{l pro cm}^2$ Membran ausgeht. Die Membran wird für 1 min bei RT mit dem Gemisch inkubiert, bevor sie in Frischhaltefolie gewickelt wird und die Detektion des Signals über Exposition eines Röntgenfilmes mit unterschiedlichen Zeitintervallen erfolgt.

2.5. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale (2D-) Gelelektrophorese ermöglicht die Erstellung eines Expressionsprofils aus komplexen Proteinmischungen. Dabei erfolgt die Auftrennung der Proteine in zwei getrennten Elektrophoreseschritten: die isoelektrische Fokussierung (IEF) stellt dabei die erste Dimension dar, eine anschließende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese die zweite Dimension.

Proteine sind amphotere Moleküle, welche in Abhängigkeit vom pH-Wert der Umgebung entweder positiv geladen, negativ geladen oder ungeladen vorliegen können. Die Nettoladung eines Proteins entspricht dabei der Summe aller negativen und positiven Ladungen der AS-Seitenketten. Der isoelektrische Punkt (pI) eines Proteins definiert sich dabei als derjenige pH-Wert, an welchem die Nettoladung des Proteins Null entspricht.

Die isoelektrische Fokussierung wird durch einen immobilisierten pH-Gradienten in einem Polyacrylamid-Gel vermittelt: ein Protein mit positiver Ladung wandert im elektrischen Feld so lange Richtung Kathode, bis es den pH-Wert, welcher seinem pI entspricht, erreicht hat, ein Protein mit negativer Ladung dagegen wandert Richtung Anode. Dabei werden sogenannte immobilisierte pH-Gradienten (IPG)-Strips (GE Healthcare) verwendet. Zur Herstellung des pH-Gradienten werden dabei Immobiline mit definierten sauren bzw. basischen Gruppen verwendet, welche mit Acrylamid verknüpft sind und mit diesem kopolymerisieren. Die Immobiline™ DryStrip Gele von GE Healthcare sind in unterschiedlichen Längen und mit unterschiedlichen pH-Gradienten erhältlich.

Die anschließende SDS-PAGE ermöglicht die Trennung der Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts (s. IV 2.3.). Anstelle des β -Mercaptoethanols wird jedoch Dithiothreitol verwendet, um Disulfidbrücken innerhalb des Proteins zu reduzieren.

2.5.1. Rehydrierung der IPG-Strips

Da IPG-Strips zur besseren Lagerung und Transportfähigkeit getrocknet vorliegen, müssen sie vor Verwendung rehydriert werden. Dazu werden DeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare) mit 1 % IPG-Puffer, welcher sich nach dem pH-Bereich des verwendeten IPG-Strips richtet, gemischt und 340 μ l dieser Rehydrierungslösung in eine Mulde des Rehydrierungstabletts gegeben. Die Schutzfolie des IPG-Strips wird entfernt und dieser mit der Gelseite nach unten in die Rehydrierungslösung gelegt, wobei die Lösung möglichst gleichmäßig und luftblasenfrei unter dem Strip verteilt sein sollte. Das Tablett wird in der Rehydrierungskammer positioniert und diese luft- und lichtdicht verschlossen, bevor die Rehydrierung über Nacht bei RT erfolgt.

2.5.2. Isoelektrische Fokussierung mittels Ettan IPGphor II

Am nächsten Tag wird die zugehörige Keramikplatte (Manifold) in der Ettan IPGphor II (GE Healthcare) positioniert und der rehydrierte IPG-Strip derart in einer Mulde der Platte platziert, dass der saure Bereich des IPG-Strips über der Anode und der basische Bereich über der Kathode liegt. Je zwei dicke Whatman-Papierstücke (1 cm x 0.5 cm) werden befeuchtet, überschüssiges Wasser durch Druck entfernt und auf die IPG-Strips gegeben, so dass sie ca. 0.5 cm mit dem Gelende überlappen. Die Elektroden werden auf den Whatman-Papieren positioniert sowie ca. 1 cm unterhalb der Anode sogenannte Cups arretiert, bei welchen es sich um Vorrichtungen zum Laden der Proteine während der IEF handelt.

Dieses sogenannte Anoden-Cup-Loading ist bei Proteinmengen von 250 μ g, wie sie in dieser Arbeit verwendet werden, dem Rehydration-Loading, bei welchem die Proteinmenge direkt zur

Rehydrierungslösung gegeben wird, vorzuziehen. Der Cup wird mit der gewünschten Menge an Proteinlösung befüllt, bevor die Proteinlösung und der IPG-Strip zum Schutz vor Austrocknung mit 108 ml Mineralöl beschichtet werden, wobei sich das Öl gleichmäßig auf dem Keramikschlitten verteilt.

Die Apparatur wird daraufhin geschlossen und die IEF unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt:

Gradient	300 V	4 h
Gradient	600 V	4 h
Gradient	1.000 V	4 h
Gradient	8.000 V	4 h
Step and Hold	8.000 V	24.000 Vh

Gradient bedeutet hierbei, dass die gewünschte Voltzahl graduell erreicht wird, während bei Step and Hold die gewünschte Voltzahl konstant gehalten wird, bis eine definierte Voltstundenzahl erreicht wird. Nach der IEF wird der IPG-Strip aus der Apparatur entnommen, überschüssiges Öl entfernt und in einem geeigneten Behälter bei -20°C bis zu 3 Monate gelagert.

2.5.3. Herstellung der 2D-SDS-Polyacrylamid-Gele

Verwendete Lösungen:

- Displacing Solution:

50 ml	1.5 M Tris, pH 8.8
100 ml	Glyzerin
50 ml	dH ₂ O
2 mg	Bromphenolblau

- Storage Buffer:

250 ml	1.5 M Tris, pH 8.8
10 ml	10x SDS
ad 1 l	dH ₂ O

Das Gießen der SDS-Polyacrylamid-Gele erfolgt im DALT Gel Caster des Hoefer DALT-Systems (Pharmacia). Die Kammer wird dabei mit der Rückseite nach unten in eine Plastikwanne gelegt und zwei Dreieckschwämmchen in der vorgesehenen Aussparung positioniert. Die Gelkassetten werden mit dem Silikonbuckrücken nach links zeigend in die Kammer gelegt, wobei zwischen zwei Gelkassetten ein sogenanntes Separator-Sheet, welches den späteren Abbau und Trennen der Gelkassetten erleichtert, positioniert wird. Zum Markieren der Gele können kleine Papieretiketten mit Gelnummer und Gießdatum zwischen die Glasplatten einer Gelkassette gegeben werden. Der Freiraum im Caster wird durch Plexiglasblöcke aufgefüllt, bis der Stapel eben mit der Caster-Kante ist. Die mit Silikon eingefettete Gummidichtung wird in die vorgesehene Rille im Caster gelegt, die Frontplatte aufgesetzt und fest zugeschraubt. Der Caster

wird nun aufgestellt und in die Seitenkammer ein Trichter zum besseren Einfließen der Polyacrylamid-Lösung gesteckt.

Gelzahl	1	4	10	14	18	20
30 % Polyacrylamid-Mix	30 ml	120 ml	300 ml	420 ml	540 ml	600 ml
dH ₂ O	24.7 ml	98.8 ml	247 ml	345.8 ml	444.6 ml	494 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	18.75 ml	75 ml	187.5 ml	262.5 ml	337.5 ml	375 ml
10 % SDS	0.75 ml	3 ml	7.5 ml	10.5 ml	13.5 ml	15 ml
10 % APS	0.75 ml	3 ml	7.5 ml	10.5 ml	13.5 ml	15 ml
TEMED	7.5 µl	30 µl	75 µl	105 µl	135 µl	150 µl

Nach obigem Schema wird die jeweilige Menge an Polyacrylamidlösung hergestellt, gut verrührt und solange luftblasenfrei in den Trichter gefüllt, bis sich die obere Gelfront ca. 3 cm unterhalb der Glaskante der Gelkassette befindet. Der Trichter wird aus der Seitenkammer entfernt und in diese 150 ml Displacing Solution gefüllt, welche die Polyacrylamid-Lösung weiter in die Gelkassetten drückt. Die Gele werden mit 0.1%iger SDS-Lösung überschichtet und der Caster mit Klarsichtfolie abgedeckt. Nach 2 h, in denen die Auspolymerisierung der Polyacrylamid-Gele erfolgt, können die Gele abgebaut werden. Dabei werden die Gele mit warmem Wasser von Gelresten befreit, in mit Storage Buffer angefeuchteten Tüchern und Klarsichtfolie eingewickelt und anschließend bei 4°C bis zu 3 Monate gelagert.

2.5.4. Äquilibration des IPG-Strips und 2D-SDS-PAGE

Die Äquilibration der fokussierten IPG-Strips erleichtert den Übergang der Proteine von der ersten Dimension in die anschließende 2D-SDS-PAGE. Dabei werden die Proteine durch Inkubation mit DTT zunächst vollständig reduziert. Die nachfolgende Inkubation mit Iodacetamid vermittelt die irreversible Alkylierung der Thiolgruppen innerhalb der Proteine, so dass eine Reoxidation während der Elektrophorese verhindert wird. Die zweite Dimension entspricht einer normalen SDS-PAGE, in welcher die Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden.

Verwendete Lösungen:

- Äquilibrierungspuffer:

6 M Harnstoff
 35 % (v/v) Glycerin
 2 % (w/v) SDS
 75 mM Tris-HCl, pH 8.8
 1 SpSP Bromphenolblau

→ Lagerung in Aliquots von 40 ml bei
 -20°C

- Agarose Sealing Solution:

10 ml 10x SDS-Laufpuffer
 0.5 g Agarose
 1 SpSP Bromphenolblau
 ad 100 ml dH₂O

Durchführung:

Der Strip wird zunächst 15 min in 20 ml Äquilibrierungspuffer mit 1 % (w/v) DTT inkubiert, bevor eine weitere 15-minütige Inkubation in Äquilibrierungspuffer mit 2.5 % (w/v) Iodacetamid erfolgt. Anschließend wird der Strip sofort in das vorbereitete 2D-SDS-Gel eingebettet. Dazu wird das SDS-Gel mit dem Silikonrücken nach links in einem Ständer aufgestellt und der Strip nach kurzem Befeuchten in 1x SDS-Laufpuffer zwischen die Glasplatten der Gelkassette gebracht, wobei die Gelseite des Strips nach vorne und das mit einem Plus markierte Ende nach links zeigen sollte. Der Strip wird mit einem angefeuchteten Spatel luftblasenfrei und mittig auf dem SDS-Gel positioniert und anschließend mit der erwärmten Agarose Sealing Solution überschichtet, was der Fixierung des Strips an der Geloberfläche dient. Nach Aushärten der Agarose Sealing Solution wird die Gelkassette in die Elektrophoresekammer des Hoefer DALT-Systems gegeben. Dabei sollte der 1x SDS-Laufpuffer in der Kammer nicht über den Silikonrücken hinausreichen. Die Elektrophorese erfolgt bei 80 V und 18°C für ca. 20 h über Nacht, bis die Bromphenolblaufront das untere Ende der Gele erreicht.

2.5.5. Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie

Verwendete Lösungen (für 4 Gele):

- Fixierungslösung:

70 ml Essigsäure
 400 ml Methanol
 ad 1 l dH₂O

- Färbelösung A:

19 ml Phosphorsäure
 80 g Ammoniumsulfat
 ad 800 ml dH₂O

- Neutralisierungslösung:

12 g Tris
 1 l dH₂O
 → mit Phosphorsäure pH 6.5 einstellen

- Waschlösung:

250 ml Methanol
 ad 1 l dH₂O

- Färbelösung B:

1 g Coomassie G250
ad 20 ml dH₂O

Durchführung:

Nach Beendigung der 2D-SDS-PAGE werden die Gele vorsichtig aus der Gelkassette entfernt und mindestens 1 h in der Fixierungslösung bei RT geschwenkt. Die Färbelösung wird kurz vor Färbung frisch angesetzt, indem 20 ml Färbelösung B unter Rühren zu 800 ml Färbelösung A gegeben werden und anschließend langsam 200 ml Methanol zum Färbeansatz gegossen werden. Die Gele werden kurz in dH₂O gespült und langsam in die Färbelösung gegeben. Die Färbung der Gele erfolgt durch Schwenken bei RT über Nacht oder mehrere Tage. Nach der Färbung werden die Gele für 5 min in der Neutralisierungslösung geschwenkt, bevor die Gele zweimal für jeweils 15 min in der Waschlösung inkubiert werden. Die Gele werden daraufhin für 30 min bei 4°C in dH₂O inkubiert und anschließend gescannt.

2.5.6. Auswertung der 2D-Gele mittels Progenesis SameSpots Software von Nonlinear Dynamics

Gele, welche mit unterschiedlichen Proteinproben beladen wurden, z. B. aus Wildtyp und Mutante, oder in unterschiedlichen Gelläufen generiert wurden, zeigen unterschiedliche Spotmuster. Die SameSpots Software ermöglicht den Vergleich dieser Gele, indem sie übereinander gelagert werden, und erkennt Unterschiede in Spotmuster und -stärke. Gele, welche zu jeweils einer biologischen Gruppe gehören, werden dabei aus drei unabhängigen Proteinproben gewonnen und diese in jeweils drei getrennten Gelläufen aufgetrennt, was neun Gelen pro biologischer Gruppe entspricht.

Für die Auswertung werden nun die Gele einer biologischen mit denen einer anderen biologischen Gruppe verglichen - in dieser Arbeit vornehmlich das Proteinmuster des Wildtyps mit dem der Mutante. Während der Analyse entwickelt die Software ein repräsentatives Proteinmuster anhand eines Referenzgels und wendet diesen Grundriss auf jedes weitere Gel des Experiments an, so dass nach Anpassen durch automatische Vektoren die Proteinmuster der verschiedenen Gele annähernd gleich sind.

Nach einer automatischen Normalisierung der Spots und der statistischen Auswertung durch die Software erhält man eine Liste an Proteinspots, welche zwischen Wildtyp und Mutante differentiell exprimiert sind. Für die Charakterisierung der Spots wurde die differentielle Expression durch visuelle Analyse des jeweiligen Spots in den einzelnen Gelen bestätigt und folgende Kriterien angewendet: der Spot sollte einen ANOVA p-Wert von weniger als 0.05 besitzen, der Power-Wert sollte über 0.8 liegen und die differentielle Regulation sollte bei mindestens 1.8 bzw. -1.8 liegen.

2.5.7. Analyse ausgewählter Proteinspots mittels MALDI-TOF-MS

Der Ausdruck MALDI-TOF-MS steht für Matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight mass-spectrometry und bezeichnet ein Verfahren zur Massenanalyse chemischer Verbindungen.

Die zu analysierenden Proteine, welche meist zuvor tryptisch in kleinere Peptide gespalten werden, werden dabei in eine Matrix mit UV-absorbierenden Molekülen eingebaut, welche Protonen auf die Peptide übertragen und damit ionisieren. Durch Bestrahlung der Proteinmatrix mit Laserimpulsen gehen die Proteine in die Gasphase über und werden in einer Vakuum-Flugröhre durch Anlegen eines elektronischen Feldes beschleunigt. Die Flugzeit der Ionen ist dabei abhängig vom Masse/Ladungs-Verhältnis, bevor sie auf den Detektor treffen.

Aus Geschwindigkeit und Ladung wird die Masse des Peptids ermittelt und durch Abgleich mit diversen Datenbanken die Identität des Proteins bestimmt.

Die zu analysierenden Proteinspots werden aus mit kolloidalem Coomassie gefärbten Gelen gepickt und zur Analyse zum ISAS in Dortmund geschickt. Die MS-Ergebnisse werden in einer Tabelle zusammengefasst.

3. Mikrobiologische Methoden

3.1. Anzucht und Stammhaltung von Bakterien

E. coli-Zellen werden in Lysogeny-Broth (LB)-Medium mit dem entsprechenden Zusatz an Antibiotikum bei 37°C und 190 rpm angezogen. Das Wachstum der Zellen wird über photometrische Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt, wobei eine OD_{600nm} von 0.5 einer Zelldichte von ca. 5×10^8 Bakterien pro ml entspricht. Eine mittelfristige Lagerung von *E. coli*-Zellen erfolgt auf LB-Agarplatten, welche bei 4°C aufbewahrt werden. Längerfristig werden *E. coli*-Zellen gelagert, indem 1 ml einer ÜN-Flüssigkultur mit 500 µl 70%igem Glycerin versetzt und bei -80°C aufbewahrt wird.

Die Anzucht von *B. pertussis*- bzw. *B. bronchiseptica*-Zellen erfolgt in Stainer-Scholte (SS)-Medium bei 37°C und 190 rpm. Das Wachstum der *B. pertussis/bronchiseptica*-Zellen wird über photometrische Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt, wobei eine OD_{600nm} von 0.5 einer Zelldichte von ca. 2×10^9 Bakterien pro ml entspricht. Eine mittelfristige Lagerung von *B. pertussis/bronchiseptica*-Zellen erfolgt auf Bordet-Gengou (BG)-Agarplatten supplementiert mit 5 % Pferdeblut, welche bei 4°C aufbewahrt werden. Längerfristig werden *B. pertussis/bronchiseptica*-Zellen gelagert, indem Bakterienmaterial von einer BG-Platte in 0.75 ml SS-

Medium resuspendiert wird. Dieser Ansatz wird mit 0.75 ml 1x SS-Medium + 50 % Glycerin vermengt und bei -80°C gelagert.

3.2. Erstellung von Wachstumskurven

Für die Erstellung einer Wachstumskurve für *B. pertussis*- und *B. bronchiseptica*-Stämme wird Bakterienmaterial von einer BG-Platte abgenommen, in 1 ml 1x SS-Medium resuspendiert und 20 ml 1x SS-Medium unter Zusatz von Antibiotika mit diesem Aliquot beimpft. Der Ansatz wird über Nacht bei 37°C und 190 rpm im Schüttelinkubator inkubiert.

Am nächsten Morgen wird die OD_{600nm} der ÜNK bestimmt und die Bakterienkulturen auf eine definierte OD_{600nm} in 50 ml 1x SS-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum eingestellt: bei *B. bronchiseptica*-Kulturen OD_{600nm} von 0.1, bei *B. pertussis*-Kulturen OD_{600nm} von 0.2. In definierten Zeitintervallen wird 1 ml der Bakterienkultur entnommen und die OD_{600nm} bestimmt. Die Auswertung erfolgt über Auftragung der OD_{600nm} gegen die Zeit in Stunden.

3.3. Erstellung von Wachstumskurven unter Stressbedingungen

Die Erstellung einer Wachstumskurve unter Stressbedingungen erfolgt zunächst wie unter IV 3.2. für eine normale Wachstumskurve beschrieben. Sobald die Kulturen jedoch die mittlere logarithmische Phase erreicht haben (ca. OD_{600nm} 0.5 – 0.7) werden die Kulturen für 15 min bei 5.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die Pellets werden in 1 ml 1x SS-Medium mit dem jeweiligen Zusatz an Stresssubstanz resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Daraufhin werden die Pellets in 35 ml 1x SS-Medium mit dem jeweiligen Zusatz an Stresssubstanz resuspendiert und die OD_{600nm} der Suspension bestimmt. Die Kulturen werden in 50 ml-Kulturkölbchen auf eine OD_{600nm} von ca. 0.6 eingestellt und bei 37°C und 190 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. In definierten Zeitintervallen wird 1 ml der Bakterienkultur entnommen und die OD_{600nm} bestimmt. Die Auswertung erfolgt über Auftragung der OD_{600nm} gegen die Zeit in Stunden.

3.4 Stressassay

Für den Stressassay mit diversen inhibitorischen Substanzen wird, wie unter IV 3.2. beschrieben, eine ÜNK erstellt, am nächsten Morgen die OD_{600nm} der ÜNK bestimmt und die Bakterienansätze in frischem 1x SS-Medium auf eine OD_{600nm} von 0.1 bei *B. bronchiseptica*-Kulturen bzw. 0.3 bei *B. pertussis*-Kulturen eingestellt.

Nach dem Erreichen einer OD_{600nm} von 0.5, was ca. 2×10^9 CFU/ml entspricht, werden die Zellen in 20 ml vorgewärmtem 1x SS-Medium auf ca. 5×10^5 CFU/ml eingestellt. Von diesem

Ansatz wird eine dreifache Verdünnungsreihe in 1x PBS bis zur Verdünnungsstufe 10^{-6} erstellt und je 100 μl der Verdünnungsstufen 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} auf BG-Agar ausplattiert.

Die restliche Kultur wird in Kulturkölbchen überführt, die jeweilige Stresssubstanz in der gewünschten Konzentration zum Ansatz gegeben und dieser bei 37°C und 190 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Zum jeweiligen Zeitpunkt wird 1 ml des Ansatzes entnommen und eine dreifache Verdünnungsreihe in 1x PBS bis zur Verdünnungsstufe 10^{-2} erstellt. Je 100 μl des unverdünnten Ansatzes sowie der Verdünnungsstufen 10^{-1} und 10^{-2} werden auf BG-Agar ausplattiert.

Die Platten werden solange bei 37°C inkubiert, bis einzelne Kolonien sichtbar werden. Die Auswertung des Stressassays erfolgt über Zählen der Kolonien und die Bestimmung der CFU/ml zum jeweiligen Zeitpunkt.

3.5. Agar-Diffusions-Assay

Der Agar-Diffusions-Assay erfolgt nur bei *B. bronchiseptica*-Kulturen, da diese im Stande sind, auf 1x SS-Agarplatten ohne Zugabe von Blut, welches puffernde Eigenschaften besitzt und damit den inhibitorischen Effekt der Stresssubstanzen abmildert, zu wachsen.

Für den Assay wird Bakterienmaterial von einer BG-Platte abgenommen und in 5 ml 2x SS-Medium resuspendiert. Von der Suspension wird die $\text{OD}_{600\text{nm}}$ bestimmt und auf eine $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 4 in 1 ml 1x SS-Medium eingestellt. 100 μl dieses Ansatzes werden zu 5 ml 37°C -warmem 2x SS-Medium gegeben und 5 ml 50°C -warmer 1.6%iger Topagar hinzugefügt. Der Ansatz wird durch Invertieren vorsichtig gemischt, auf eine gut getrocknete 1x SS-Platte überführt, so dass der Ansatz die gesamte Platte einheitlich bedeckt, und trocknen gelassen.

In der Zwischenzeit werden verschiedene Konzentrationen an inhibitorischen Substanzen hergestellt. Je 15 μl der Stresssubstanz-Lösungen werden auf runde Whatman-Disks (\varnothing 6 mm) getropft und per Pinzette auf die Platten gelegt, bevor diese mit Deckel nach oben über Nacht bei 37°C inkubiert werden.

Am nächsten Morgen sind um die Disks herum kreisrunde Hemmhöfe im Bakterienwachstum zu erkennen. Die Auswertung erfolgt über Bestimmung des Durchmessers der Hemmhöfe.

3.6. Granulozyten-Survival-Assay

Verwendete Lösungen:

- | | |
|--|----------------------------|
| - Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) | - RPMI 1640 (GIBCO) |
| (GIBCO) | - Saponinlösung: |
| - Polymorphprep™ (Axis-Shield) | 10 % (w/v) Saponin in RPMI |

- ACK-Puffer:

4.14 g NH₄Cl

0.5 g KHCO₃

0.02 g EDTA

ad 500 ml dH₂O

→ pH 7.3 einstellen

Durchführung:

Die Granulozyten für den Survival Assay werden am Tag des Versuchs frisch aus Probandenblutproben isoliert. Das entnommene Blut wird mit 37°C-warmen HBSS auf geradzahlige Aliquots von 5 ml gestreckt. 5 ml Polymorphprep™-Lösung werden bei RT in Röhrchen vorgelegt und darauf 5 ml der Blutprobe langsam aufgeschichtet, wobei das Blut sich nicht mit der Polymorphprep™-Lösung durchmischen sollte. Die Röhrchen werden für 35 min bei 1600 rpm und RT ohne Bremse abzentrifugiert. Zunächst werden die Monozyten abgenommen und verworfen, bevor die Granulozyten in ein frisches Röhrchen überführt und mit mindestens demselben Volumen an HBSS gestreckt werden. Die Granulozyten werden für 10 min bei 1700 rpm und RT abzentrifugiert. Vorhandene Erythrozyten im Pellet werden lysiert, indem das Pellet in 5 ml eiskaltem ACK-Puffer resuspendiert wird und für 3 min bei RT inkubiert wird. Der Ansatz wird für 2 min bei 1800 rpm und RT abzentrifugiert. Sollte das Pellet nun noch nicht weißlich sein, also auf noch vorhandene Erythrozyten hindeuten, wird die ACK-Behandlung wiederholt. Die Granulozyten werden in einem geeigneten Aliquot an RPMI aufgenommen und im FACS-Gerät auf ihre Zellzahl bestimmt.

Die Bakterien werden von der Platte abgenommen und nach Resuspendieren in RPMI auf 4×10^4 CFU/ml eingestellt. Die Granulozyten werden auf eine Zellzahl von 8×10^5 /ml eingestellt. Pro Zeitpunkt werden 100 µl der Bakterienlösung mit 100 µl Granulozytenlösung gemischt, was einem Bakterien/Granulozyten-Verhältnis von 1:20 entspricht. Ein Ansatz mit 100 µl RPMI statt Granulozytenlösung dient als Kontrollansatz für die Viabilität der Bakterien. Zu jedem Zeitpunkt werden dem Kontroll- und Versuchsansatz 20 µl Saponinlösung zugegeben und für 7 min bei 37°C inkubiert. Zu jedem Ansatz werden 800 µl 1x PBS gegeben, gevortext und je 50 µl in Doppelbestimmung auf geeigneten Platten ausplattiert. Die Auswertung des Granulozyten Survival-Assays erfolgt über Zählen der Koloniezahl der Bakterien auf den Platten.

3.7. Biofilm-Assay

Für den Biofilm-Assay wird Bakterienmaterial von *B. bronchiseptica* und *B. pertussis* von einer BG-Platte abgenommen und in 5 ml 1x SS-Medium resuspendiert. Die OD_{600nm} des Ansatzes wird bestimmt und in 5 ml 1x SS-Medium auf eine definierte OD_{600nm} eingestellt: für Ansätze mit

B. pertussis auf eine OD_{600nm} von 0.1, bei *B. bronchiseptica* auf eine OD_{600nm} von 0.05. Je 200 μ l des jeweiligen Ansatzes werden in 4 Wells einer 24 Well-Platte mit flachem Boden (Greiner) gegeben. Dabei beimpft man so viele Platten, wie man Zeitpunkte für die Messung benötigt, und inkubiert sie bei 37°C.

Zum jeweiligen Zeitpunkt werden nicht-adhärenente Zellen dreimal mit 200 μ l 1x PBS abgewaschen und anschließend mit 200 μ l 0.1%-Kristallviolett-Lösung überschichtet. Der Ansatz wird für 30 min bei RT inkubiert und anschließend dreimal mit 300 μ l 1x PBS gewaschen. In die Wells werden 200 μ l 96%iger Ethanol gegeben und 150 μ l des Überstandes in eine 96-Well-Platte mit flachem Boden gegeben. Die OD_{540nm} der Überstände wird bestimmt und gegen den Zeitpunkt aufgetragen.

V Ergebnisse

1. Das Hfq-Protein in *B. pertussis* und *B. bronchiseptica*

Bislang wurden Hfq-Homologe in der Hälfte aller sequenzierten Gram-positiven und Gram-negativen Bakterienarten gefunden (Valentin-Hansen *et al.*, 2004). Die Länge des Proteins variiert dabei zwischen 70 und 100 Aminosäuren. Eine erste Recherche mittels BLAST-Analyse ergab, dass *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* Homologe zum Hfq-Protein aufweisen und diese in der veröffentlichten Genomsequenz bereits als Hfq-Protein annotiert sind (Parkhill *et al.*, 2003). Die Hfq-Proteine aus *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* sind mit jeweils 78 Aminosäuren Länge vergleichsweise klein.

1.1. Sequenzvergleich der Hfq-Proteine aus *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* mit Hfq-Proteinen aus anderen Organismen

Um einen ersten Überblick über die Hfq-Funktion im *B. bronchiseptica*-Cluster zu gewinnen, wurde zunächst ein Sequenzvergleich innerhalb des Clusters auf Nukleotid- und Aminosäuresequenzebene sowie mit anderen Organismen auf Aminosäuresequenzebene durchgeführt. Innerhalb des *B. bronchiseptica*-Clusters ist Hfq sowohl auf Nukleotid- als auch Aminosäuresequenzebene hoch konserviert (s. Abb. 9 und 10).

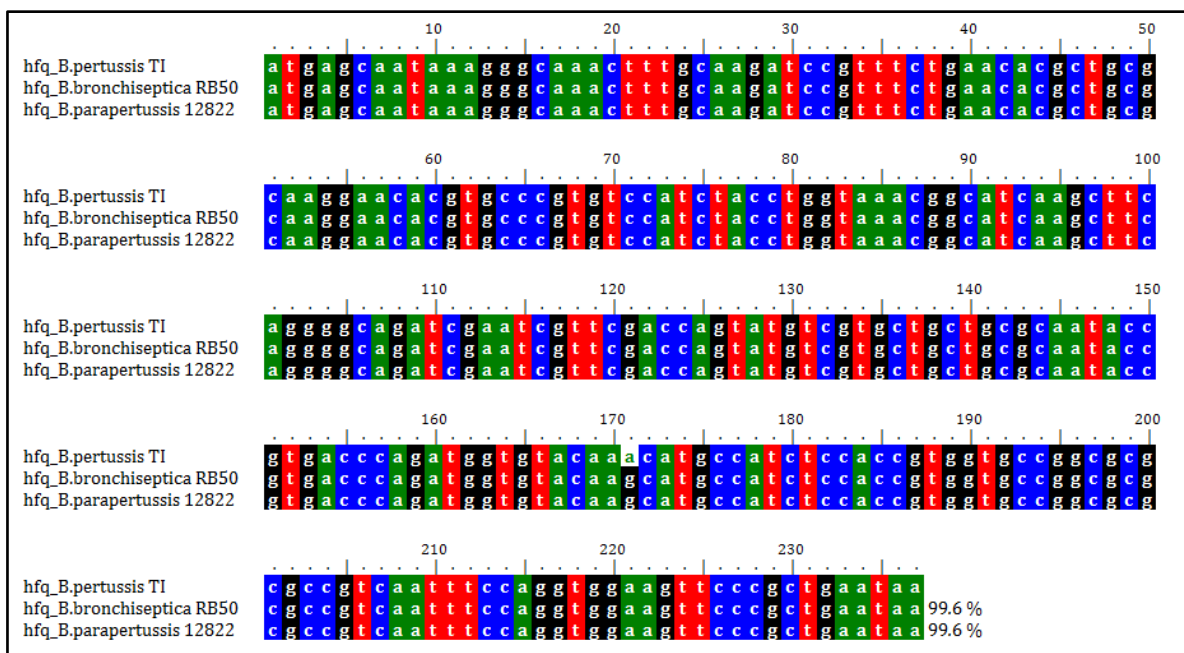


Abb. 9: Sequenzvergleich der *hfq*-Nukleotidsequenzen aus *B. pertussis* Tohama I, *B. bronchiseptica* RB50 und *B. paraptussis* 12822. Die Sequenzinformationen entstammen der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Identische Nukleotide sind farbig markiert. Die Prozentzahlen geben die Sequenzähnlichkeit mit dem *hfq*-Gen aus *B. pertussis* an.

Abbildung 9 zeigt, dass sich das *hfq*-Gen von *B. pertussis* nur in einem Nukleotid an Position 171 von den *hfq*-Genen aus *B. bronchiseptica* und *B. parapertussis* unterscheidet (A>G), was eine Sequenzähnlichkeit von 99.6 % ergibt. Die *hfq*-Gene aus *B. bronchiseptica* und *B. parapertussis* sind untereinander zu 100 % identisch.

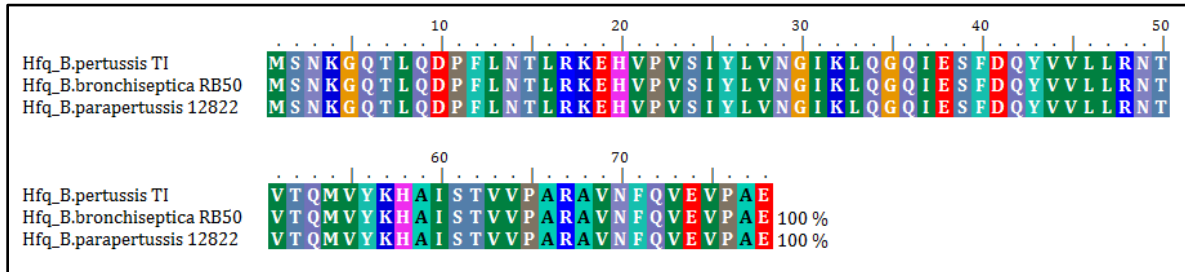


Abb. 10: Sequenzvergleich der Hfq-Aminosäuresequenzen aus *B. pertussis* Tohama I, *B. bronchiseptica* RB50 und *B. parapertussis* 12822. Die Sequenzinformationen entstammen der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Identische Aminosäuren sind farbig markiert. Die Prozentzahlen geben die Sequenzähnlichkeit des jeweiligen Hfq-Proteins mit dem Hfq-Protein aus *B. pertussis* an.

Betrachtet man die Aminosäuresequenz der Hfq-Proteine aus *B. pertussis* Tohama I, *B. bronchiseptica* RB50 und *B. parapertussis* 12822, so ergibt sich eine Identität von 100 % (s. Abb. 10). Folglich handelt es sich bei dem Basenaustausch an Position 171 im *hfq*-Gen von *B. pertussis* um eine stille Mutation und die kodierte Aminosäure (Lysin) bleibt identisch in den drei Hfq-Proteinen.

Für den Aminosäuresequenzvergleich mit Hfq-Proteinen aus anderen Organismen wurden letztere danach ausgewählt, ob in diesen Hfq hinreichend charakterisiert ist und bereits Daten publiziert worden sind. Da die Hfq-Proteine aus *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* identisch sind, wurde im Folgenden mit Hfq aus *B. pertussis* verglichen. In Abbildung 11 sind Hfq-Proteine aus anderen Gram-negativen Bakterienarten aufgelistet, während Abbildung 12 den Vergleich mit Hfq aus Gram-positiven Bakterienarten zeigt.

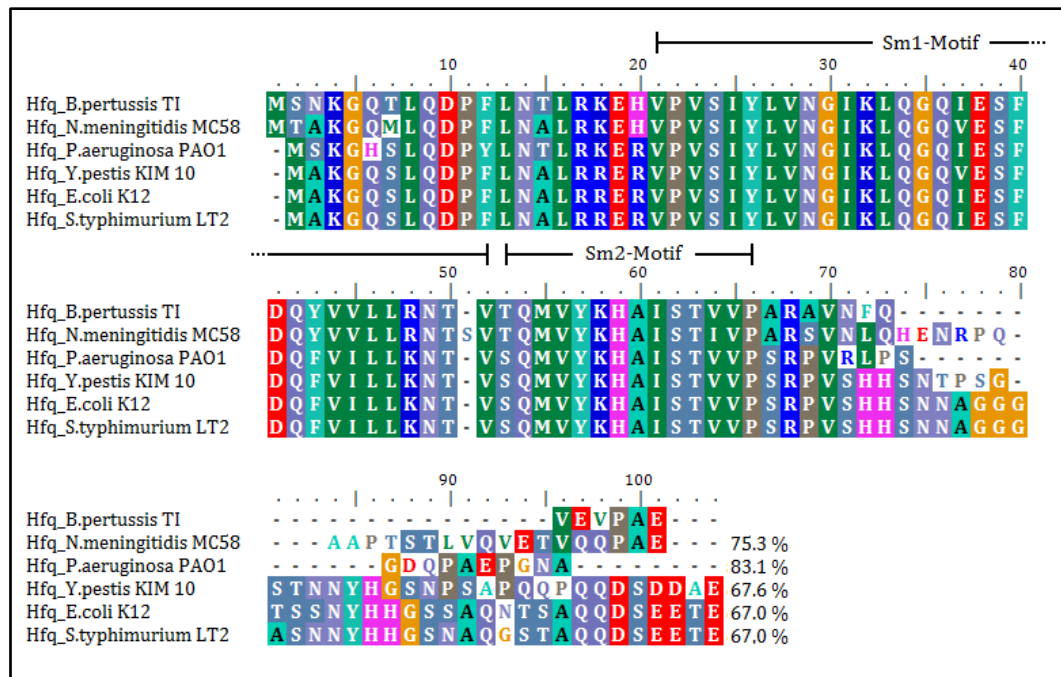


Abb. 11: Sequenzvergleich der Hfq-Aminosäuresequenzen aus *B. pertussis* Tohama I, *N. meningitidis* MC58, *P. aeruginosa* PAO1, *Y. pestis* KIM10, *E. coli* K12 und *S. Typhimurium* LT2. Die Sequenzinformationen entstammen der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Das Clustal-Alignment der Aminosäuresequenzen wurde mit dem Programm BioEdit durchgeführt. Identische oder ähnliche Aminosäuren in mindestens zwei Organismen sind dabei farblich markiert. Die Prozentzahlen geben die Sequenzähnlichkeit des jeweiligen Hfq-Proteins mit dem Hfq-Protein aus *B. pertussis* an. Die schwarzen Balken stellen das Sm1- und Sm2-Motif innerhalb der Proteinsequenz dar.

Das Hfq-Protein aus *B. pertussis* weist eine hohe Sequenzähnlichkeit mit allen hier getesteten Hfq-Proteinen aus Gram-negativen Bakterienarten auf, welche zwischen 67 und 83 % liegt. Die Bereiche, welche das Sm1- und Sm2-Motif umfassen, sind dabei in fast allen Hfq-Proteinen identisch (s. Abb. 11). Einzig bei Hfq aus *N. meningitidis* kommt im Sm1-Motiv an Position 51 zusätzlich die Aminosäure Serin vor. Der C-Terminus der Proteine erscheint variabler und bedingt die unterschiedlichen Sequenzähnlichkeiten.

N. meningitidis wird wie *B. pertussis* der Gruppe der β -Proteobacteria zugeordnet und ist näher zu diesem verwandt als die anderen Bakterienarten, deren Hfq-Proteine für den Sequenzvergleich herangezogen wurden. Das Hfq-Protein aus *N. meningitidis* ist mit 97 AS größer als dasjenige aus *B. pertussis* (78 AS) und weist eine Sequenzähnlichkeit von 75.3 % zu diesem auf. *P. aeruginosa* zählt wie auch *Y. pestis*, *E. coli* und *S. Typhimurium* zu den γ -Proteobacteria. Das Hfq-Protein aus *P. aeruginosa* ist mit 82 AS ähnlich dem von *B. pertussis* relativ klein und besitzt mit 83.1 % die höchste Ähnlichkeit zu Hfq aus *B. pertussis*. Hfq aus *Y. pestis* ist mit 101 AS relativ groß und 67.6 % ähnlich zu dem von *B. pertussis*. *E. coli* ist der Organismus, in welchem das Hfq-Protein erstmals beschrieben wurde (Franze de Fernandez *et al.*, 1968). Die Struktur des mit 102 AS vergleichsweise großen Proteins wurde unlängst aufgelöst (Schumacher *et al.*, 2002). Hfq aus *B. pertussis* und *E. coli* weisen eine Ähnlichkeit von

67 % auf. Gleichsam verhält es sich mit dem ebenfalls 102 AS großen Hfq-Protein aus *S. Typhimurium*. Auch hier beträgt die Ähnlichkeit zum Hfq-Protein aus *B. pertussis* 67 %.

Beim Vergleich des Hfq-Proteins aus *B. pertussis* mit Hfq-Proteinen aus ausgewählten Gram-positiven Bakterienarten ergeben sich nicht ganz so hohe Ähnlichkeitsgrade wie bei den Gram-negativen Arten, liegen mit einer Spannweite zwischen 48 % und 63 % jedoch im signifikanten Bereich (s. Abb. 12).

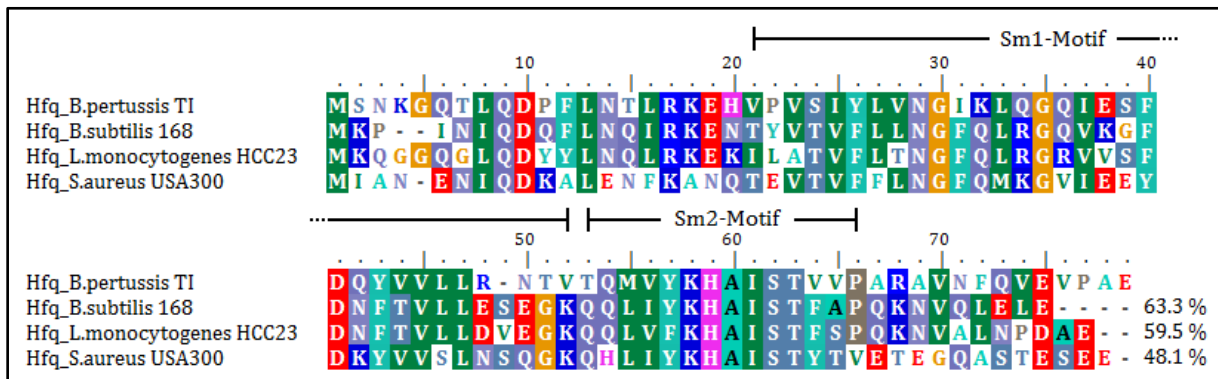


Abb. 12: Sequenzvergleich der Hfq-Aminosäuresequenzen aus *B. pertussis* Tohama I, *B. subtilis* 168, *L. monocytogenes* HCC23 und *S. aureus* USA300. Die Sequenzinformationen entstammen der PubMed-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Das Clustal-Alignment der Aminosäuresequenzen wurde mit dem Programm BioEdit durchgeführt. Identische oder ähnliche Aminosäuren in mindestens zwei Organismen sind dabei farbig markiert. Die Prozentzahlen geben die Sequenzähnlichkeit des jeweiligen Hfq-Proteins mit dem Hfq-Protein aus *B. pertussis* an. Die schwarzen Balken stellen das Sm1- und Sm2-Motif innerhalb der Proteinsequenz dar.

Das Hfq-Protein aus *B. subtilis* (74 AS) weist mit 63.3 % die höchste Sequenzähnlichkeit zum Hfq aus *B. pertussis* unter den untersuchten Gram-positiven Arten auf. Für das 77 AS-große Hfq aus *L. monocytogenes* ergibt sich eine Ähnlichkeit von 59.5 %. Das Hfq-Protein aus *S. aureus* ist das strukturell am besten charakterisierte Hfq-Protein, da von diesem bereits die Röntgenstruktur sowohl als Holoenzym als auch mit dem gebundenen Oligonukleotid AU₅G vorliegt (Schumacher *et al.*, 2002). Das 77 AS große Protein besitzt mit 48.1 % die geringste Ähnlichkeit der hier erwähnten Beispiele. Auffällig bei den Sequenzunterschieden zwischen Hfq aus *B. pertussis* und denjenigen aus *B. subtilis*, *L. monocytogenes* und *S. aureus* ist, dass sich diese über die gesamte Breite der Proteine erstrecken (s. Abb. 12). Das Sm2-Motif scheint dabei relativ konserviert zwischen den Arten zu sein, während der Bereich mit dem Sm1-Motif eine größere Variabilität zeigt.

1.2. Genomlokalisierung des *hfq*-Gens und Transkriptionsstartpunkt bei *B. pertussis*

Bei *B. pertussis* befindet sich das *hfq*-Gen am Genlokus BP2193 zwischen den Koordinaten 2314946 (Start) und 2314710 (Stopp). Laut Vorhersage weist das *hfq*-Gen eine Größe von 237 bp auf und kodiert für ein Protein mit 78 Aminosäuren (8.8 kDa). Es wird stromaufwärts

vom *hisC*-Gen, das für eine Histidinolphosphat-Aminotransferase kodiert, und stromabwärts vom *hflX*-Gen, das für ein putatives GTP-Bindeprotein kodiert, flankiert. Alle drei Gene werden in derselben Richtung abgelesen.

Für diese Arbeit wurde zunächst eine Primer Extension-Analyse durchgeführt, um den Startpunkt des *hfq*-Transkripts zu ermitteln und dessen Existenz in *B. pertussis* nachzuweisen. Als Template für die parallel zur Primer Extension laufenden Sequenzierungsreaktion wurde der Vektor pSKhfq generiert. Dafür wurde in einer präparativen PCR mit der Primerkombination *hfq_fw_KpnI/hfq_rev_EcoRI* ein Bereich amplifiziert, welcher ca. 150 bp stromaufwärts und ca. 220 bp stromabwärts vom Startcodon des *hfq*-Gens umfasst. Dieses Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *EcoRI* verdaut und mit dem *KpnI/EcoRI*-verdauten Vektor pSK ligiert. Die Transformation erfolgte in *E. coli* DH5 α , die Selektion auf LB-Platten + Amp. Erhaltene Klone wurden mittels analytischer PCR mit der Primerkombination Blue T7/Blue T3 auf die erfolgreiche Insertion des *hfq*-Bereichs getestet. Von einem positiven Klon wurde die Plasmid-DNA präpariert und als Template für die Sequenzierungsreaktion (s. IV 1.13.1) mit dem *hfq*_PE-Primer verwendet. Für die Primer Extension-Reaktion wurde eine Kultur von *Bp* TI bis zu einer OD_{600nm} von 0.6 angezogen und aus dieser RNA isoliert (s. IV 1.10.1). 30 μ g der RNA wurden mit radioaktiv markierten *hfq*_PE-Primer in cDNA umgeschrieben und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. IV 1.13.2.-4.). Abbildung 13 zeigt einen Ausschnitt aus dem nach der Exposition mit dem Primer Extension-Gel entwickelten Röntgenfilm.

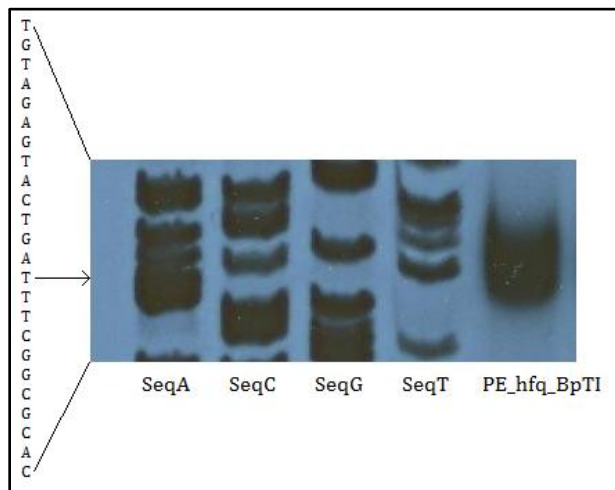


Abb. 13: Primer Extension-Analyse zur Identifizierung des *hfq*-Transkriptionsstartpunkts in *B. pertussis*. SeqA, SeqC, SeqG und SeqT sind Sequenzierungsreaktionen mit ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP und dem Vektor pSKhfq als Template, aus welchen die links im Bild ersichtliche Sequenzfolge abzulesen ist. PE_hfq_BpTI bezeichnet die RNA aus *Bp* TI (OD_{600nm} 0.6), die mit dem radioaktiv gelabelten *hfq*_PE-Primer in cDNA umgeschrieben wurde. Der schwarze Pfeil markiert den ermittelten Transkriptionsstartpunkt mit dem dazugehörigen Nukleotid.

Anhand des Laufverhaltens der mit dem radioaktiv markierten *hfq*_PE-Primer in cDNA umgeschriebenen Gesamt-RNA von *Bp* TI aus der logarithmischen Phase im Vergleich zu den Sequenzierungsreaktionen mit ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP ergibt sich der in Abbildung 13 mit einem schwarzen Pfeil markierte Startpunkt der *hfq*-Transkription. Das *hfq*-Transkript beginnt somit 49 bp vor dem Startcodon ATG. In Abbildung 14 ist die Lage des Transkriptionsstartpunkts der *hfq*-mRNA relativ zum Translationsstart schematisch dargestellt. Ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt wurde über Vergleich mit der Konsensussequenz für

PE-Primer in cDNA umgeschrieben und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Für die Sequenzierungsreaktion diente der bereits beschriebene Vektor pSKhfq als Template (s. V 1.12). Abbildung 15 zeigt einen Ausschnitt aus dem nach der Exposition mit dem Primer Extension-Gel entwickelten Röntgenfilm.

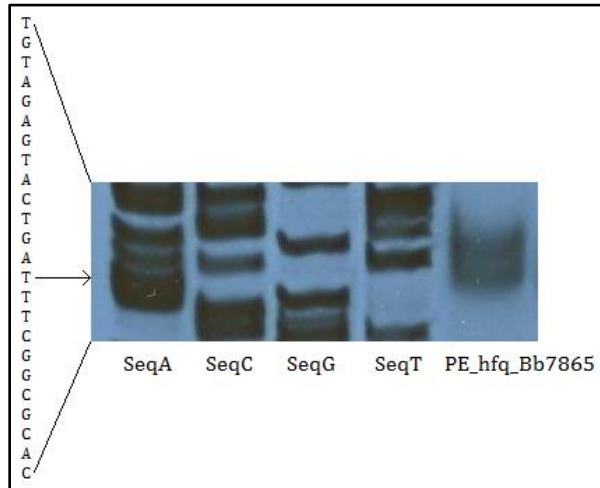


Abb. 15: Primer Extension-Analyse zur Identifizierung des *hfq*-Transkriptionsstartpunkts in *B. bronchiseptica*. SeqA, SeqC, SeqG und SeqT sind Sequenzierungsreaktionen mit ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP und dem Vektor pSKhfq als Template, aus welchen die links im Bild ersichtliche Sequenzfolge abzulesen ist. PE_hfq_Bb7865 bezeichnet die RNA aus *Bb* 7865 (OD_{600nm} 0.6), die mit dem radioaktiv gelabelten hfq_PE_Primer in cDNA umgeschrieben wurde. Der schwarze Pfeil markiert den ermittelten Transkriptionsstartpunkt mit dem dazugehörigen Nukleotid.

Anhand des Laufverhaltens der mit dem radioaktiv markierten hfq_PE_Primer in cDNA umgeschriebenen Gesamt-RNA von *Bb* 7865 aus der logarithmischen Phase im Vergleich zu den Sequenzierungsreaktionen mit ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP ergibt sich der in Abbildung 15 mit einem schwarzen Pfeil markierte Startpunkt der *hfq*-Transkription. Wie bereits bei *Bp* TI liegt auch bei *Bb* 7865 das 5'-Ende des *hfq*-Transkripts 49 bp vor dem Startcodon ATG. Da die intergenische Region zwischen dem *hfq*-Gen und dem stromaufwärts liegenden *hisC*-Gen zwischen *Bp* TI und *Bb* 7865 konserviert ist, ergibt sich für den *hfq*-Promotor von *Bb* 7865 dieselbe -35- und -10-Box wie bereits für *Bp* TI ermittelt (s. V 1.2.).

1.4. *hfq*-Transkription unter Stressbedingungen

Das *hfq*-Gen in *E. coli* ist Teil eines Superoperons, welches vier σ^{70} -abhängige sowie drei σ^{32} -abhängige Hitzeschock-Promotoren besitzt (Valentin-Hansen *et al.*, 2004). Das *hfq*-Gen selbst besitzt zwei σ^{32} -abhängige Promotoren und einen σ^{70} -abhängigen Promotor (Tsui *et al.*, 1996). Letztere stellen sicher, dass der zelluläre Level an Hfq unter Stressbedingungen aufrechterhalten wird. Ferner wird Hfq für eine effiziente Translation des *rpoS*-Gens benötigt, dessen Produkt, der σ^s -Faktor, unter verschiedenen Stresssituationen und in der stationären Phase exprimiert wird und dadurch die Synthese mehrerer Komponenten der Stressantwort ermöglicht (Muffler *et al.*, 1996; Muffler *et al.*, 1997). In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob sich die Transkriptionsrate des *hfq*-Gens in *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* unter verschiedenen Stressbedingungen erhöht und ob das *hfq*-Gen unterschiedliche Promotoren aufweist.

Zu diesem Zweck wurden Kulturen von *Bp* TI und *Bb* 7865 bis zu einer OD_{600nm} von 0.6 angezogen und anschließend für die verschiedenen Stressansätze je 50 ml Kultur in getrennte Kolben überführt. Ethanolstress wurde dadurch ausgelöst, dass der Kultur 1 ml 100%iger EtOH zugegeben wurde, was einer Endkonzentration von 2 % EtOH entspricht, und die Kultur 20 min bei 37°C inkubiert wurde. Oxidativer Stress wurde durch die Zugabe von 0.25 ml 30%iger H_2O_2 -Lösung (Endkonzentration 0.15 % H_2O_2) bewirkt, woraufhin die Kultur weitere 20 min bei 37°C inkubiert wurde. Die Inkubation eines Ansatzes für 20 min bei 45°C sollte die Kultur einem Hitzestress aussetzen. Kältestress wurde dadurch ausgelöst, dass ein Ansatz für 24 h bei 4°C inkubiert wurde. Die Stationärphase stellt für Bakterien wegen der Nährstofflimitierung und Anhäufung toxischer Abfallprodukte eine weitere Art von Stress dar. Aus diesem Grund wurde ein Ansatz so lange weiter inkubiert, bis die Kultur eine OD_{600nm} von ca. 1.8 für *Bp* TI bzw. ca. 2.2 für *Bb* 7865 hatte. 50 ml Kultur aus der logarithmischen Phase (OD_{600nm} von 0.6) wurden zur Untersuchung der *hfq*-Transkription unter Normalbedingungen gewonnen. Für jeden Ansatz unter Stress- und Normalbedingungen wurden drei unabhängige Kulturen angezogen.

Aus allen Ansätzen wurden nach den verschiedenen Behandlungen die Gesamt-RNA isoliert, anschließend DNase-behandelt und auf Reinheit und Effizienz der RNA-Isolierung überprüft (s. IV 1.10.1.-4.). 5 µg der Gesamt-RNA wurden anschließend in cDNA umgeschrieben (s. IV 1.11.). Diese cDNAs dienten als Template für eine quantitative RT-PCR zur Bestimmung der *hfq*-Transkriptionsrate unter den verschiedenen Testbedingungen (s. IV 1.12.). Dabei wurden ausgehend von jeder cDNA drei Ansätze mit den Primern *hfq*_RT_fw und *hfq*_RT_rev pro Lauf amplifiziert, während drei Ansätze mit den Primern *rpoB*_RT_fw und *rpoB*_RT_rev durchgeführt wurden, welche die Normalisierung gegen das Housekeeping-Gen *rpoB* ermöglichte. Aus den drei technischen Replikaten wurde ein normalisierter ΔC_T -Wert für die *hfq*-Transkription gemittelt. Aus den drei unabhängigen Kulturen unter den jeweiligen Stressbedingungen wurde anschließend ein Mittelwert gebildet und die *hfq*-Regulation im Vergleich zu Normalbedingungen mittels Student's t-test auf Signifikanz untersucht. Die Ratio der relativen Expression ($\Delta\Delta C_T$ -Wert) wurde anschließend graphisch in Microsoft Excel dargestellt (s. Abb. 16).

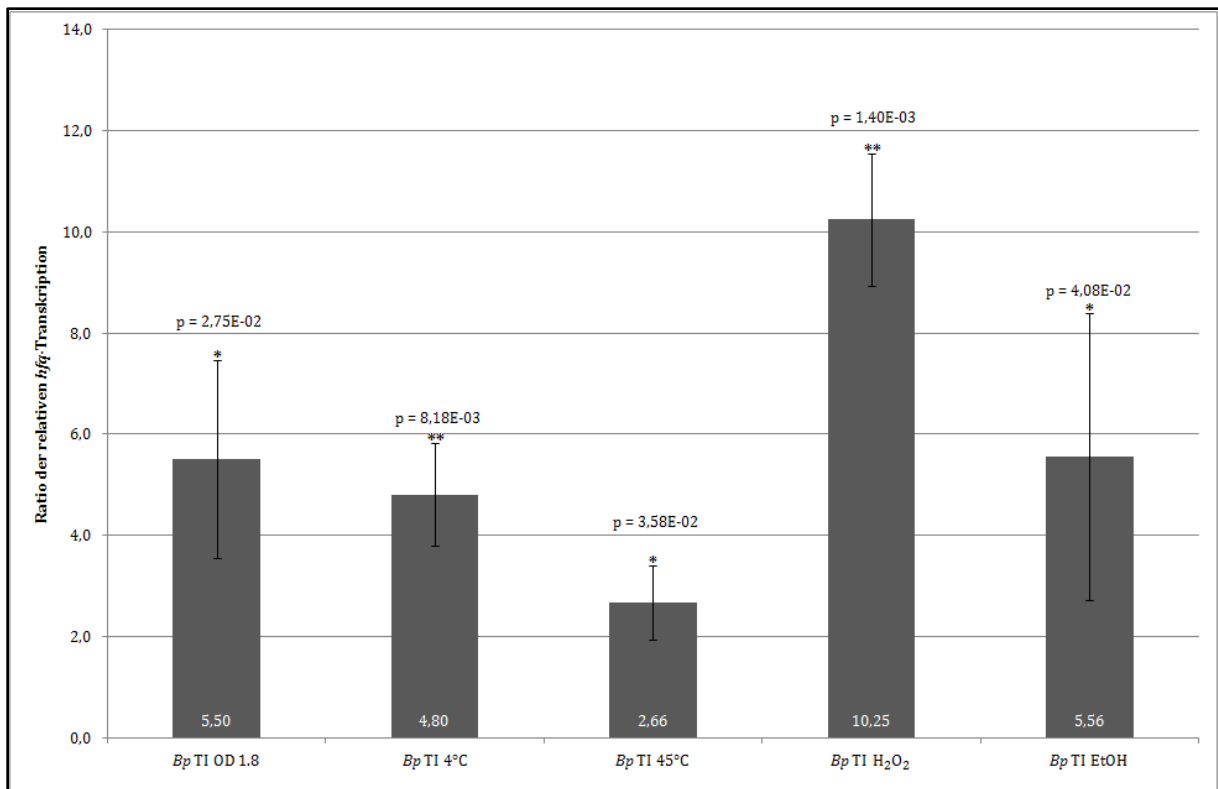


Abb. 16: Ergebnisse der qRT-PCR zur Bestimmung der *hfq*-Transkription unter verschiedenen Stressbedingungen in *Bp* TI. Aufgetragen ist das Verhältnis der *hfq*-Transkription unter der jeweiligen Stressbedingung gegenüber der *hfq*-Transkription unter Normalbedingungen (OD_{600nm} 0.6). Dabei wurde der Mittelwert aus drei unabhängigen Kulturen gebildet und die Standardabweichung bestimmt. Signifikante Hochregulation ist mit Stern und zugehörigem p-Wert gekennzeichnet (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$).

Die Auswertung der qRT-PCR-Daten ergab, dass in *Bp* TI die *hfq*-Transkription unter allen getesteten Stressbedingungen signifikant hochreguliert ist (s. Abb. 16). In der Stationärphase (*Bp* TI OD 1.8) ist die *hfq*-Transkription ca. 5.5fach höher als in der logarithmischen Phase. Auch Kältestress (*Bp* TI 4°C) und Hitzestress (*Bp* TI 45°C) bewirken einen Anstieg der *hfq*-Transkription um den Faktor 4.8 bzw. 2.6. Die Behandlung mit H₂O₂ (*Bp* TI H₂O₂), die zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffradikalen in der Bakterienzelle führt, induzierte die stärkste *hfq*-Hochregulation. Hier war die *hfq*-Transkription 10fach höher als unter normalen Bedingungen. Auch die Zugabe von Ethanol bewirkt eine verstärkte *hfq*-Transkription mit dem Faktor 5.5.

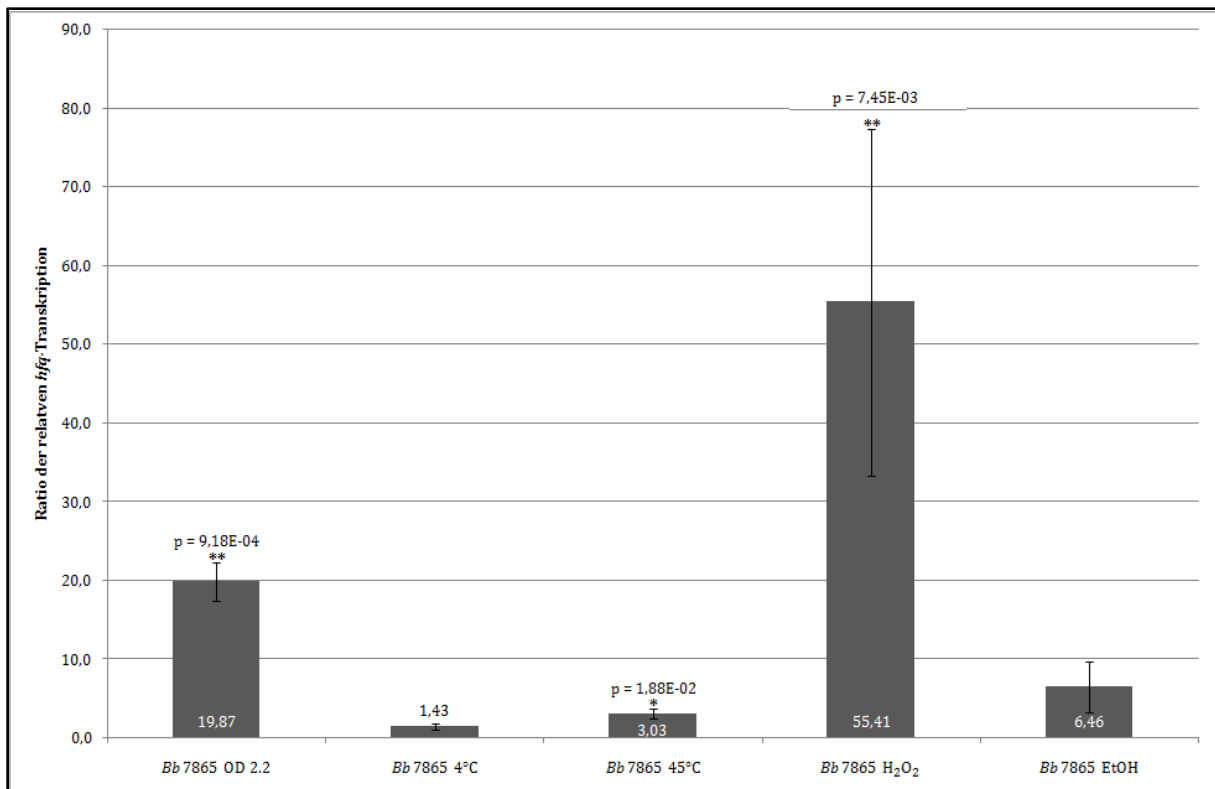


Abb. 17: Ergebnisse der qRT-PCR zur Bestimmung der *hfq*-Transkription unter verschiedenen Stressbedingungen in *Bb* 7865. Aufgetragen ist das Verhältnis der *hfq*-Transkription unter der jeweiligen Stressbedingung gegenüber der *hfq*-Transkription unter Normalbedingungen. Dabei wurde der Mittelwert aus drei unabhängigen Kulturen gebildet und die Standardabweichung bestimmt. Signifikante Hochregulation ist mit Stern und zugehörigem p-Wert gekennzeichnet (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$).

Für *Bb* 7865 ergab die Auswertung der qRT-PCR-Daten zur *hfq*-Transkription, dass diese in der Stationärphase, bei Hitze- und oxidativem Stress signifikant hochreguliert ist (s. Abb. 17). In der Kultur aus der Stationärphase (*Bb* 7865 OD 2.2) sind etwa 20-mal mehr *hfq*-mRNA-Transkripte über qRT-PCR nachzuweisen als in der Kultur aus der logarithmischen Phase. Hitzestress (*Bb* 7865 45°C) bewirkt eine um den Faktor 3 erhöhte *hfq*-Transkription. Wie im Falle von *Bp* TI ergibt sich jedoch die größte Hochregulation durch die Behandlung mit H₂O₂ (*Bb* 7865 H₂O₂). Hier ist die *hfq*-Transkription im Mittel um das 55fache höher als in Kulturen unter Normalbedingungen. Im Gegensatz zu Kulturen von *Bp* TI, welche Kälte- bzw. Ethanolstress ausgesetzt waren, ergibt sich bei *Bb* 7865 laut Statistik keine signifikante Hochregulation der *hfq*-Transkription unter diesen Bedingungen.

In der Primer Extension, welche mit RNA-Proben von Kulturen aus der logarithmischen Phase (OD_{600nm} 0.6) durchgeführt wurde, konnte nur ein Transkriptionsstartpunkt für das *hfq*-Transkript in *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* nachgewiesen werden (s. V 1.2. und 1.3.). Deshalb erschien es interessant zu untersuchen, ob unter Stressbedingungen weitere Promotoren aktiv sind und damit zu dem beobachteten Anstieg in der *hfq*-Transkription führen.

Zu diesem Zweck wurden RNA-Proben, welche aus *B. pertussis* in der Stationärphase (OD_{600nm} 1.8) und nach 20-minütigem Hitzeschock bei 45°C gewonnen wurden, einer Sequenzierung der 5'-3'-Transkriptenden unterzogen (s. IV 1.14.1-2.). Die Zirkularisierungsreaktion erfolgte dabei wie unter IV 1.14.1. beschrieben, die cDNA-Synthese wie unter IV 1.14.2. beschrieben mit dem genspezifischen hfq-PE-Primer, der bereits für die Primer Extension unter V 1.2. verwendet wurde. 1 µl dieser cDNA diente anschließend als Template für eine analytische PCR mit der Primerkombination hfq_rev_EcoRI/hfq_down_fw_XbaI und einer Elongationszeit von 1 min 30 s. Abbildung 18 stellt die Bindestellen und Sequenz der beiden Primer innerhalb des *hfq*-Gens dar.

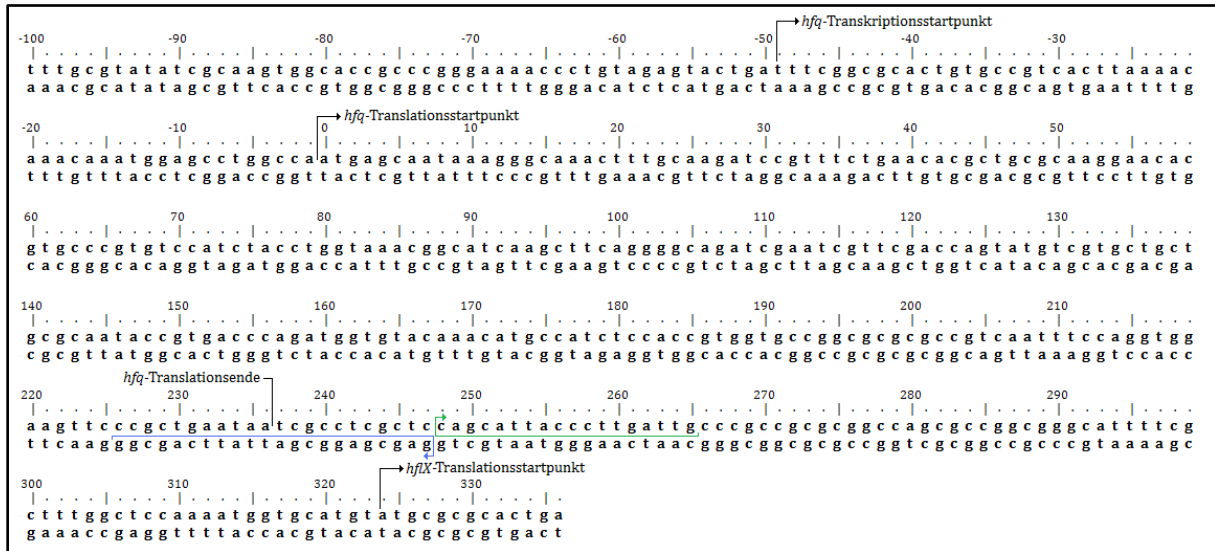


Abb. 18: DNA-Sequenz des *hfq*-Gens mit 100 bp stromaufwärts und stromabwärts liegenden Nukleotiden. Mit Pfeilen markiert sind der über Primer Extension-Analyse ermittelte Transkriptionsstartpunkt (Position -49) sowie die Translationsstartpunkte des Hfq- und HflX-Proteins. Blau unterlegt ist die Sequenz des Primers hfq_rev_EcoRI, grün unterlegt die Sequenz des Primers hfq_down_fw_XbaI.

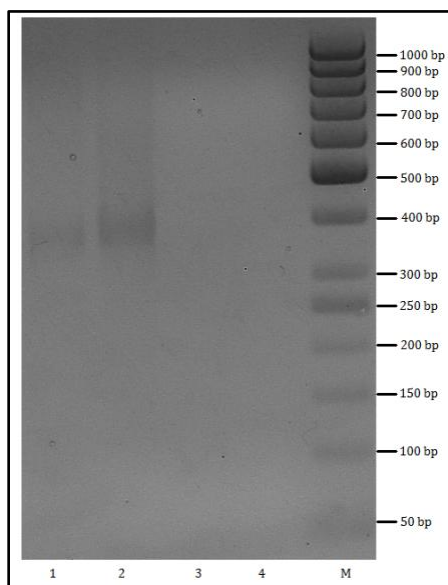


Abb. 19: Analytische PCR zur Bestimmung des 5'-Endes des hfq-Transkripts unter Stressbedingungen. Aufgetragen sind jeweils 20 µl PCR-Produkt auf ein 2%iges Agarosegel. In Spur 1 diente die in cDNA umgeschriebene RNA aus Kulturen von *Bp* TI nach Hitzestress als Template. In Spur 2 diente die in cDNA umgeschriebene RNA aus Kulturen von *Bp* TI aus der Stationärphase als Template. In Spur 3 war dH₂O Template (Negativkontrolle). In Spur 4 war das Template chromosomale DNA von *Bp* TI. M = 50 bp DNA Ladder.

Die analytische PCR mit der Primerkombination *hfq_rev_EcoRI/hfq_down_fw_XbaI* ergibt mit der cDNA aus Kulturen von *Bp* TI nach der Behandlung mit Hitzestress eine Bande in Höhe von ca. 380 bp (Spur 1, Abb. 19). Gleiches gilt für cDNA aus Kulturen von *Bp* TI aus der Stationärphase (Spur 2), aus welcher ebenfalls ein ca. 380 bp-großes PCR-Produkt amplifiziert wurde. Die chromosomale DNA von *Bp* TI in Spur 4 zeigte kein Amplifikat und diente in dieser analytischen PCR als Negativkontrolle, da die beiden verwendeten Primer zueinander gegenläufig sind und nur bei zirkulären Intermediaten ein Produkt zu erkennen sein sollte. Die PCR-Produkte aus cDNA von *Bp* TI nach Hitzestress und aus der Stationärphase wurden als Template für eine erneute analytische PCR verwendet, um ausreichend Material für eine Sequenzierungsreaktion zu erlangen. Der Primer *hfq_down_fw_XbaI* diente dabei als Sequenzierungsprimer. Die Auswertung der Sequenzierungsdaten ergab für *hfq*-Transkripte aus den hier getesteten Stressbedingungen (45°C und OD_{600nm} 1.8) das gleiche 5'-Ende wie unter logarithmischen Bedingungen (s. V 1.2.). Da der intergenische Bereich zwischen dem *hfq*-Gen und dem stromaufwärts liegenden *hisC*-Gen zwischen *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* identisch ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei *B. bronchiseptica* ebenso verhält.

2. Konstruktion der *hfq*-Insertionsmutanten und Komplementanten in *B. pertussis* und *B. bronchiseptica*

Das Hfq-Protein ist in den letzten Jahren aufgrund seiner RNA-Chaperon-Funktion gegenüber sRNAs und ihrer Ziel-mRNAs immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt (Wassarman, 2002). Da viele der bisher entdeckten sRNAs die Fähigkeit besitzen, in zahlreiche Stoffwechselwege und Stressantworten einzugreifen, wird ihnen die Rolle von globalen Modulatoren zugesprochen (Waters & Storz, 2009). Indem die Effizienz der sRNA-Regulation, vor allem bei *trans*-kodierten sRNAs, oftmals von der Chaperonfähigkeit des Hfq-Proteins abhängig ist, besitzt auch dieses die Rolle eines globalen Regulators. Um das regulatorische Potential des Hfq-Proteins in *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* zu bestimmen, musste zunächst das *hfq*-Gen in beiden Organismen deletiert werden und anschließend die Auswirkung der Deletion analysiert werden.

2.1. Konstruktion der *hfq*-Insertionsmutanten in *B. pertussis* und *B. bronchiseptica*

Für die Herstellung der *hfq*-Insertionsmutanten wurde das *hfq*-Gen mittels homologer Rekombination durch eine Tetracyclin- bzw. Chloramphenicol-Resistenzkassette ersetzt. Dazu wurden zunächst das *hfq*-Gen flankierende Bereiche mittels präparativer PCR mit chromosomaler DNA des jeweiligen Stammes als Template gewonnen. Für den upstream

flankierenden Bereich (*hfq_up*) wurde die Primerkombination *hfq_up_fw_HindIII/hfq_up_rev_KpnI* verwendet und ein 447 bp großes Fragment amplifiziert. Für den downstream flankierenden Bereich (*hfq_down*) wurde die Primerkombination *hfq_down_fw_XbaI/hfq_down_rev_HindIII* verwendet und ein 378 bp großes Fragment amplifiziert (s. Abb. 20).

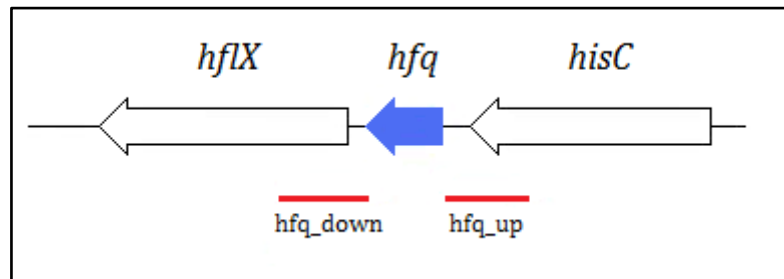


Abb. 20: Schematische Darstellung des *hfq*-Gens mit dem stromaufwärts liegenden Gen *hisC* und dem stromabwärts liegenden Gen *hflX*. Rot markiert sind die für die nachfolgende Klonierung amplifizierten, flankierenden Fragmente.

Für die Amplifikation der Chloramphenicol- und der Tetracyclin-Resistenzkassette diente der Vektor pACYC184 als Template. Dabei wurde mittels Primerkombination *tet*-5'-*KpnI*/*tet*-3'-*XbaI* das 1272 bp große *tet*-Kassettenfragment bzw. mit der Primerkombination *cat*-5'-*KpnI*/*cat*-3'-*XbaI* das 747 bp große *cat*-Kassettenfragment amplifiziert. Nach Gewinnung der einzelnen Fragmente wurden diese mit folgenden Restriktionsenzymen verdaut: das *hfq_up*-Fragment mit *HindIII* und *KpnI*, die *tet*- bzw. *cat*-Kassette mit *KpnI* und *XbaI*, sowie das *hfq_down*-Fragment mit *XbaI* und *HindIII*. Die Fragmente wurden anschließend in den mit *HindIII* verdauten Vektor pSK ligiert (s. Abb. 21) und in *E. coli* DH5 α transformiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Platten + Amp/Tet bzw. LB-Platten + Amp/Cm.

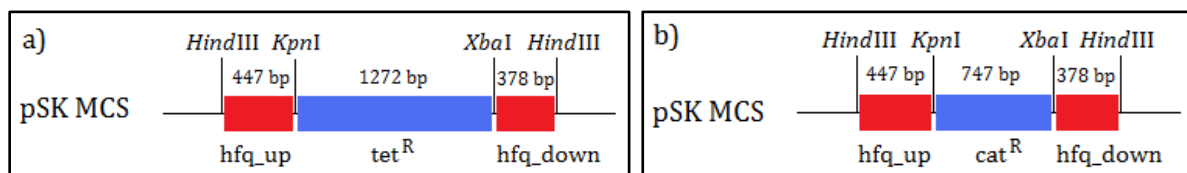


Abb. 21: a) Klonierungsschema für die flankierenden Bereiche *hfq_up* und *hfq_down* mit der Tetracyclin-Resistenzkassette (*tet*^R) in den pSK-Vektor. b) Klonierungsschema für die flankierenden Bereiche *hfq_up* und *hfq_down* mit der Chloramphenicol-Resistenzkassette (*cat*^R) in den pSK-Vektor. MCS: multiple cloning site

Transformanten wurden zunächst mittels analytischer PCR mit der Primerkombination Blue T7/ BlueT3, welche im pSK-Vektor binden, auf eine erfolgreiche Insertion der Fragmente getestet. Dabei zeigten positive Klone von DH5 α pSK $hfqtet$ eine Bande von ca. 2300 bp (*hfq_up/tet*^R/*hfq_down* + pSK-Rückgrat mit 167 bp), während positive Klone von DH5 α pSK $hfqcat$ eine Bande von ca. 1750 bp (*hfq_up/cat*^R/*hfq_down* + pSK-Rückgrat mit 167 bp) zeigten. Von positiven Klonen wurde die Plasmid-DNA im kleinen Maßstab isoliert und mittels Sequenzierung eine erfolgreiche Insertion verifiziert. Diese Plasmid-DNA diente anschließend als Template für die Amplifikation des gesamten Bereichs mit der Primerkombination

hfq_up_fw_HindIII/hfq_down_rev_HindIII. Die erhaltenen Fragmente mit einer Größe von 2109 bp im Falle von hfq_up/tet^R/hfq_down bzw. 1584 bp im Falle von hfq_up/cat^R/hfq_down wurden anschließend mit dem Restriktionsenzym *Hind*III verdaut und in den ebenfalls mit *Hind*III verdauten Vektor pSORTP1 ligiert. Die Transformation erfolgte in den zur Konjugation geeigneten Stamm *E. coli* SM10, wobei die Selektion auf LB-Platten + Gen, Amp, Tet bzw. LB-Platten + Gen, Amp, Cm erfolgte. Transformanten wurden mittels analytischer PCR mit der Primerkombination hfq_up_fw_HindIII/hfq_down_rev_HindIII auf die erfolgreiche Insertion des Bereichs in den Vektor getestet. Positive SM10 pSORTP1hfqtet-Klone wurden für die Konjugation in *B. pertussis* Tohama I (*Bp* TI) eingesetzt, während positive SM10 pSORTP1hfqcat-Klone für die Konjugation in *B. bronchiseptica* 7865 (*Bb* 7865) herangezogen wurden (s. IV 1.8.).

Das pSORTP1-Plasmid ist nicht replizierbar in Bordetellen und wird nach der Übertragung über homologe Rekombination ins bakterielle Chromosom des jeweiligen *Bordetella*-Stamms integriert. Die Integration des pSORTP1hfqtet/cat-Plasmids wird über ein erstes Rekombinationsereignis zwischen den homologen Bereichen hfq_up oder hfq_down in Plasmid und Chromosom vermittelt. Dabei sind zwei chromosomale Rearrangements möglich (s. Abb. 22).

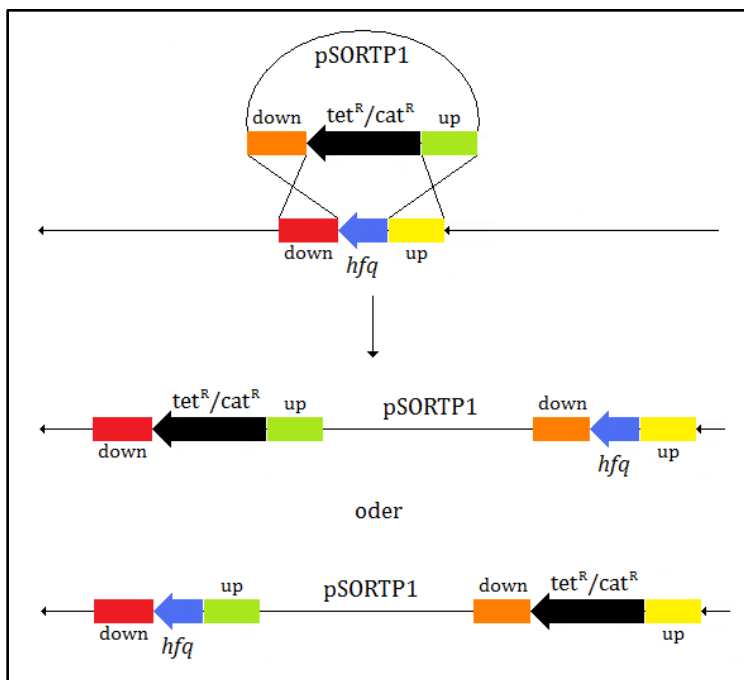


Abb. 22: Schematische Darstellung der Integration des pSORTP1hfqtet/cat-Plasmids ins Chromosom von *Bp* TI oder *Bb* 7865, welche durch homologe Rekombination zwischen den Bereichen hfq_up oder hfq_down in Plasmid und Chromosom vermittelt wird.

Über ein zweites Rekombinationsereignis wird der Vektor zusammen mit dem wildtypischen *hfq*-Gen aus dem Chromosom herausgeschnitten (s. Abb. 23).

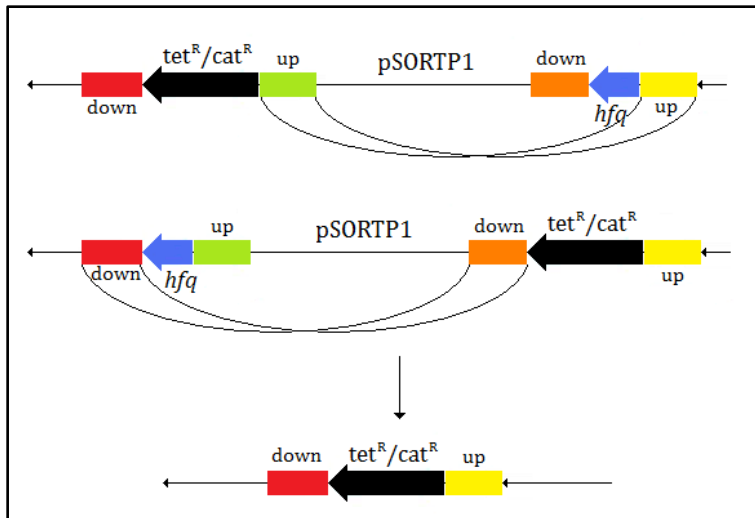
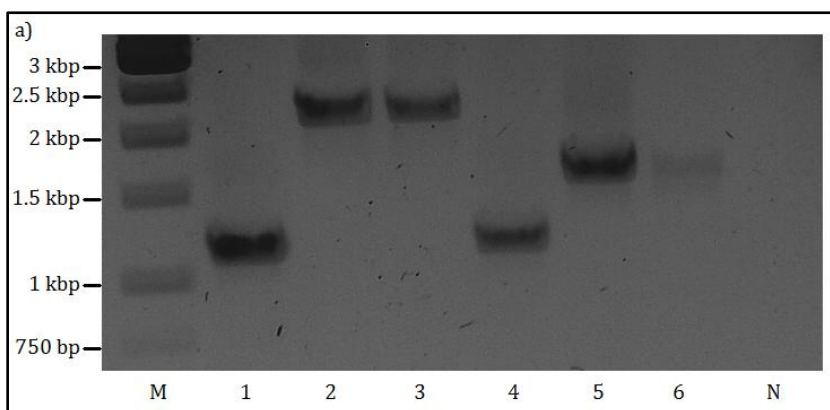


Abb. 23: Schematische Darstellung der Exzision des pSORTP1-Plasmids aus dem Chromosom, die durch homologe Rekombination zwischen den Bereichen *hfq*_up oder *hfq*_down vermittelt wird. Das wildtypische *hfq*-Gen wird mit dem pSORTP1-Rückgrat herausgeschnitten, an dessen Stelle verbleibt die Tetracyclin- bzw. Chloramphenicol-Resistenzkassette im Chromosom.

Nach der Konjugation wurde das Bakteriengemisch, bestehend aus dem Donorstamm *E. coli* Sm10 pSORTP1hfqtet und dem Rezipientenstamm *Bp* TI bzw. dem Donorstamm *E. coli* Sm10 pSORTP1hfqcat und dem Rezipientenstamm *Bb* 7865, auf BG-Platten + Sm, Tet bzw. BG-Platten + Sm, Cm selektiert. Das Wachstum des Streptomycin-sensitiven Donorstamms *E. coli* SM10 wird durch Zugabe von Streptomycin in die Selektionsplatten verhindert. Die Anwesenheit von Tetracyclin bzw. Chloramphenicol in den Platten selektiert auf *Bordetella*-Stämme, welche die pSORTP1-Konstrukte aufgenommen und ins Chromosom eingebaut haben. Hierbei kann noch nicht unterschieden werden, ob nur ein Rekombinationsereignis mit der Integration des Vektors ins Chromosom oder bereits das zweite Rekombinationsereignis mit der Exzision des Vektors unter Mitnahme des wildtypischen *hfq*-Gens stattgefunden hat. Putative *Bp* TI Δhfq - und *Bb* 7865 Δhfq -Klone wurden daher auf Gentamycin-Sensitivität untersucht, da die Gentamycin-Resistenz auf dem pSORTP1-Rückgrat kodiert ist. Außerdem wurden bei putativen Klonen zwei analytische PCRs durchgeführt, eine mit der Primerkombination *hfq*_up_fw_HindIII/*hfq*_down_rev_HindIII (Abb. 24a) und eine mit der Primerkombination *hfq*_fw_KpnI/*hfq*_rev_PstI (Abb. 24b).



M = 1kb DNA Ladder
 1 = *Bp* TI
 2 = *Bp* TI Δhfq
 3 = *Bp* TI Δhfq complemented
 4 = *Bb* 7865
 5 = *Bb* 7865 Δhfq
 6 = *Bb* 7865 Δhfq complemented
 N = Negativkontrolle

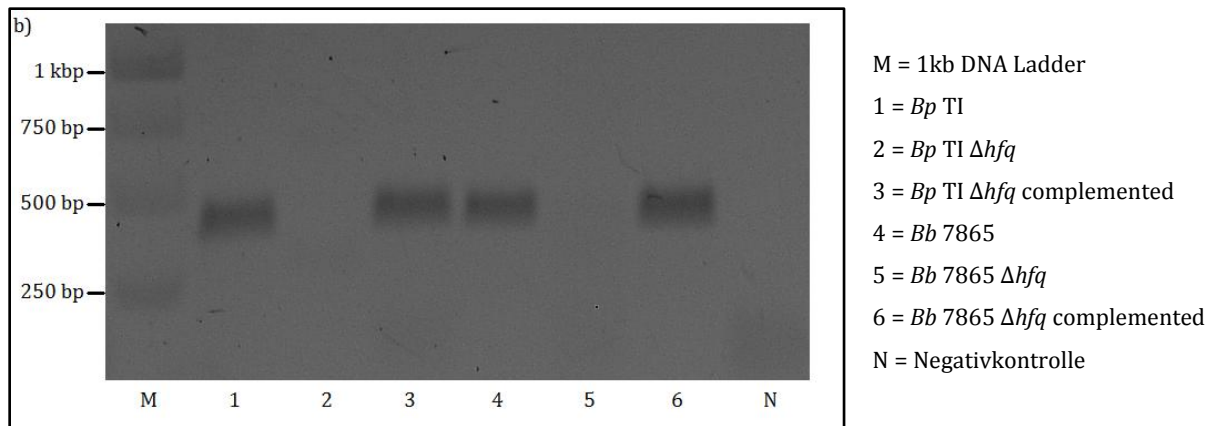


Abb. 24: Analytische PCRs zum Nachweis des *hfq*-Knockouts bzw. der *hfq*-Komplementation in *Bp* TI und *Bb* 7865. Aufgetragen sind jeweils 20 μ l PCR-Produkt auf ein 1%iges Agarosegel. a) Analytische PCR mit der Primerkombination *hfq*_up_fw_HindIII/ *hfq*_down_rev_HindIII. b) Analytische PCR mit der Primerkombination *hfq*_fw_KpnI/*hfq*_rev_PstI.

Die analytische PCR mit der Primerkombination *hfq*_up_fw_HindIII/*hfq*_down_rev_HindIII, die das *hfq*-Gen mit flankierenden Bereichen amplifiziert, ergibt für die Wildtypen *Bp* TI und *Bb* 7865 eine Bande in der Größe von ca. 1.1 kbp (Abb. 24a Spuren 1 und 4). Im Falle von *Bp* TI Δ *hfq* ergibt sich durch die Insertion der *tet*-Kassette eine deutlich größere Bande von ca. 2.1 kbp (Abb. 24a Spur 2). Ähnliches gilt für *Bb* 7865 Δ *hfq*: hier bewirkt die Insertion der *cat*-Kassette eine größere Bande von ca. 1.6 kbp (Abb. 24a Spur 5). Eine analytische PCR mit der Primerkombination *hfq*_fw_KpnI/*hfq*_rev_PstI amplifiziert das wildtypische *hfq*-Gen und ergibt in *Bp* TI und *Bb* 7865 eine Bande von ca. 400 bp (Abb. 24b Spuren 1 und 4). In *Bp* TI Δ *hfq* und *Bb* 7865 Δ *hfq* kann dagegen keine solche Bande nachgewiesen werden (Abb. 24b Spuren 2 und 5). Die in der analytischen PCR mit der Primerkombination *hfq*_up_fw_HindIII/*hfq*_down_rev_HindIII bei *Bp* TI Δ *hfq* und *Bb* 7865 Δ *hfq* amplifizierten Banden wurden zudem aufgereinigt und durch Sequenzierung das Fehlen des wildtypischen *hfq*-Gens bzw. das Vorhandensein der Tetracyclin- bzw. Chloramphenicol-Resistenzkassette bestätigt.

Das Fehlen des *hfq*-Transkripts wurde über qRT-PCR verifiziert. Zu diesem Zweck wurden Kulturen von *Bp* TI, *Bp* TI Δ *hfq*, *Bb* 7865 und *Bb* 7865 Δ *hfq* bis zur Stationärphase angezogen, in welcher die *hfq*-Transkription nach experimenteller Bestimmung erhöht ist (s. V 1.4.). Im Falle von *Bp* TI entsprach dies einer OD_{600nm} von ca. 1.8, bei *Bp* TI Δ *hfq* ca. 1.2, während Kulturen von *Bb* 7865 und *Bb* 7865 Δ *hfq* eine OD_{600nm} von ca. 2.2 aufwiesen. Von drei unabhängigen Kulturen wurde die Gesamt-RNA isoliert (s. IV 1.10.1.-4.) und in cDNA umgeschrieben (s. IV 1.11.). Diese cDNAs dienten als Template für eine quantitative RT-PCR zur Bestimmung der *hfq*-Transkriptionsrate in den jeweiligen Deletionsmutanten und dem zugehörigen Wildtyp in der Stationärphase (s. IV 1.12.). Dabei wurden ausgehend von jeder cDNA drei Ansätze mit den Primern *hfq*_RT_fw und *hfq*_RT_rev pro Lauf amplifiziert, während drei Ansätze mit den Primern *rpoB*_RT_fw und *rpoB*_RT_rev bei der Auswertung die Normalisierung gegenüber dem

Housekeeping-Gen *rpoB* ermöglichten. Aus den drei technischen Replikaten wurde ein normalisierter ΔC_T -Wert für die *hfq*-Transkription gemittelt. Die *hfq*-Regulation zwischen Wildtyp und Deletionsmutante wurde mittels Student's t-test auf Signifikanz untersucht. Die Ratio der relativen Expression ($\Delta\Delta C_T$ -Wert) wurde anschließend graphisch in Microsoft Excel dargestellt (s. Abb. 25).

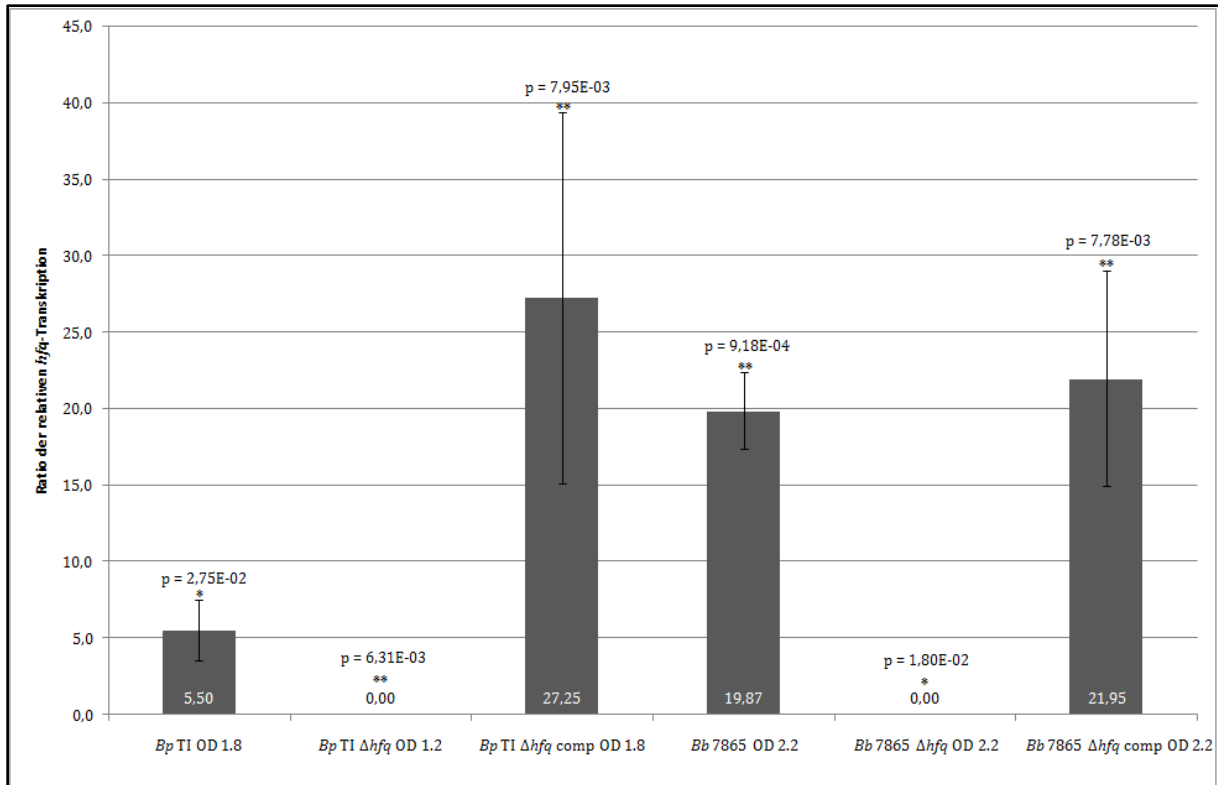


Abb. 25: Ergebnisse der qRT-PCR zur Bestimmung der *hfq*-Transkription in den Wildtypen *Bp* TI und *Bb* 7865 im Vergleich zu den jeweiligen Δhfq -Mutanten und Komplementanten. Aufgetragen ist das Verhältnis der *hfq*-Transkription im Wildtyp, der jeweiligen Δhfq -Mutante und Komplementante aus stationären Kulturen im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp unter Normalbedingungen (OD_{600nm} 0.6). Dabei wurde der Mittelwert aus drei unabhängigen Kulturen gebildet und die Standardabweichung bestimmt. Signifikante Hoch- oder Runterregulation ist mit Stern und zugehörigem p-Wert gekennzeichnet (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$).

Die Wildtypen *Bp* TI und *Bb* 7865 zeigen in der Stationärphase eine deutliche Hochregulation der *hfq*-Transkription in Relation zum jeweiligen Wildtyp aus der logarithmischen Phase, im Falle von *Bp* TI um den Faktor 5.5 bzw. im Falle von *Bb* 7865 um den Faktor 20. Im Gegensatz dazu ist in der *Bp* TI Δhfq - und *Bb* 7865 Δhfq -Mutante, ebenfalls aus stationären Kulturen gewonnen, mittels qRT-PCR kein *hfq*-Transkript nachzuweisen. Dies bestätigt einen erfolgreichen Knockout des *hfq*-Gens in den jeweiligen Mutanten.

2.2. Konstruktion der *hfq*-Komplementanten in *B. pertussis* und *B. bronchiseptica*

Die Komplementation der *hfq*-Mutante durch Allelaustausch der Tetracyclin- bzw. Chloramphenicol-Resistenzkassette mit dem wildtypischen *hfq*-Gen erwies sich als nicht durchführbar, da es schwer ist, auf das Fehlen einer Resistenz zu selektionieren. Deshalb wurde die heterologe Komplementation der jeweiligen Δhfq -Mutante durch Einbringen eines replizierfähigen Plasmids, welches das wildtypische *hfq*-Gen unter Kontrolle seines eigenen Promotors trägt, gewählt.

Für die Komplementation in *Bp* TI wurde zunächst das wildtypische *hfq*_{BpTI}-Gen mit der Primerkombination *hfq_fw_KpnI/hfq_rev_PstI* amplifiziert (389 bp) und mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *PstI* verdaut. Anschließend wurde das Fragment mit dem ebenfalls mit *KpnI* und *PstI* verdauten Vektor pMMB208 ligiert und in *E. coli* SM10 transformiert. Die Selektion erfolgte dabei auf LB-Platten + Cm. Erhaltene Klone wurden mittels analytischer PCR mit der Primerkombination pMMB208_1/pMMB208_2 auf die Existenz des Inserts getestet. Von einem positiven Klon wurde die Plasmid-DNA isoliert und durch Sequenzierung die korrekte Insertion des *hfq*_{BpTI}-Gens verifiziert. Der erhaltene Klon SM10 pMMB*hfq*_{BpTI} wurde anschließend zur Konjugation mit *Bp* TI Δhfq eingesetzt. Der Konjugationsansatz wurde auf BG-Platten + Sm, Cm, Tet selektioniert. Streptomycin und Tetracyclin unterbinden dabei das Wachstum des Donorstamms SM10 pMMB*hfq*_{BpTI}, ermöglichen aber das Wachstum der *Bp* TI Δhfq -Mutanten. Chloramphenicol selektioniert auf diejenigen *Bp* TI Δhfq -Mutanten, welche das pMMB*hfq*_{BpTI}-Konstrukt aufgenommen haben.

Die Komplementation in *Bb* 7865 Δhfq erforderte einen zusätzlichen Schritt, da es aufgrund der *cat*-Kassette im *hfq*-Bereich der Mutante schwer ist, auf die Aufnahme des Plasmids, das Chloramphenicol-Resistenz vermittelt, zu selektionieren. Deshalb wurden neben dem wildtypischen *hfq*_{Bb7865}-Gen mit der Primerkombination *hfq_fw_KpnI/hfq_rev_EcoRI* (385 bp) auch die *tet*-Kassette mittels Primerkombination *tet-5'-EcoRI/tet-3'-PstI* (1385 bp) amplifiziert. Das *hfq*_{Bb7865}-Fragment wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *EcoRI* verdaut, die *tet*-Kassette mit *EcoRI* und *PstI* und beides in den mit *KpnI* und *PstI* verdauten pSK-Vektor ligiert. Die Transformation erfolgte in *E. coli* DH5 α und die Selektion auf LB-Platten + Amp, Tet. Erhaltene Klone wurden mittels analytischer PCR mit der Primerkombination Blue T7/Blue T3 auf die Existenz des Inserts getestet. Von einem positiven Klon wurde die Plasmid-DNA isoliert und durch Sequenzierung die korrekte Insertion des *hfq*-Gens und der *tet*-Kassette verifiziert. Daraufhin wurden das *hfq*_{Bb7865}-Gen und die *tet*-Kassette zusammen mittels Primerkombination *hfq_fw_KpnI/tet-3'-PstI* mit der Plasmid-DNA als Template amplifiziert (ca. 1.8 kbp), mit *KpnI* und *PstI* verdaut und in den auf gleiche Weise verdauten pMMB208-Vektor ligiert. Die Transformation erfolgte in *E. coli* SM10 und die Selektion auf LB-Platten + Cm, Tet. Erhaltene Klone wurden mittels analytischer PCR mit der Primerkombination

pMMB208_1/pMMB208_2 auf eine korrekte Insertion des *hfq*-Gens und der *tet*-Kassette verifiziert. Der erhaltene Klon SM10 pMMBhfq_{Bb7865}tet wurde anschließend zur Konjugation mit *Bb* 7865 Δ *hfq* eingesetzt. Der Konjugationsansatz wurde auf BG-Platten + Sm, Cm, Tet selektioniert. Streptomycin unterbindet dabei das Wachstum des Donorstamms SM10 pMMBhfq_{Bb7865}tet, während Tetracyclin auf *Bb* 7865 Δ *hfq*-Mutanten selektioniert, die das pMMBhfq_{Bb7865}tet-Konstrukt aufgenommen haben.

Sowohl *Bp* TI Δ *hfq* comp- als auch *Bb* 7865 Δ *hfq* comp-Mutanten wurden einer analytischen PCR unterzogen. Mit der Primerkombination hfq_up_fw_HindIII/ hfq_down_rev_HindIII zeigen komplementierte Mutanten die gleiche Bande wie die jeweilige Δ *hfq*-Mutante. Im Falle von *Bp* TI Δ *hfq* complemented besitzt die Bande eine Größe von 2.1 kbp (Abb. 24a Spur 3), bei *Bb* 7865 Δ *hfq* complemented eine Größe von 1.6 kbp (Abb. 24a Spur 6). Testet man die Komplementanten auf das Vorhandensein des jeweiligen *hfq*-Gens mittels Primerkombination hfq_fw_KpnI/hfq_rev_PstI, so zeigen sowohl *Bp* TI Δ *hfq* complemented als auch *Bb* 7865 Δ *hfq* complemented die wildtypische Bande von ca. 400 bp (Abb. 24b Spuren 3 und 6).

Die Effizienz der *hfq*-Komplementation wurde über qRT-PCR verifiziert. Zu diesem Zweck wurden Kulturen von *Bp* TI Δ *hfq* comp und *Bb* 7865 Δ *hfq* comp bis zur Stationärphase angezogen, in welcher die *hfq*-Transkription nach experimenteller Bestimmung erhöht ist (s. V 1.4.). Im Falle von *Bp* TI Δ *hfq* comp entsprach dies einer OD_{600nm} von ca. 1.8, während Kulturen von *Bb* 7865 Δ *hfq* comp eine OD_{600nm} von ca. 2.2 aufwiesen. Die Ratio der relativen Expression ($\Delta\Delta C_T$ -Wert) wurde graphisch in Microsoft Excel dargestellt (Abb. 26).

Abbildung 25 zeigt, dass in der Komplementante *Bp* TI Δ *hfq* comp aus der stationären Phase die *hfq*-Transkription um ca. 27fach höher ist als im Wildtyp *Bp* TI aus der logarithmischen Phase. Dieser Faktor liegt höher als bei dem Wildtyp *Bp* TI aus der Stationärphase (Faktor 5.5), zeigt aber eine effiziente Komplementation des *hfq*-Gens in *Bp* TI Δ *hfq* comp an. Bei *Bb* 7865 Δ *hfq* comp aus der stationären Phase ist die *hfq*-Transkription 22fach höher als bei *Bb* 7865 aus der logarithmischen Phase und hat dabei annähernd das Niveau des Wildtyps *Bb* 7865 aus der Stationärphase (Faktor 20). Somit ist auch in *Bb* 7865 Δ *hfq* comp die Komplementation mit dem *hfq*-Gen erfolgreich gelungen.

2.3. Auswirkung der *hfq*-Mutation auf das Wachstumsverhalten von *B. pertussis* und *B. bronchiseptica*

Nach erfolgreicher Herstellung der Δ *hfq*-Mutanten in *Bp* TI und *Bb* 7865 stellte sich zunächst die Frage, ob der *hfq*-Knockout einen Effekt auf das Wachstumsverhalten der beiden Stämme ausübt. Zu diesem Zweck wurden ÜNKs von *Bp* TI und *Bb* 7865, der jeweiligen Mutanten *Bp* TI Δ *hfq* und *Bb* 7865 Δ *hfq* sowie der jeweiligen Komplementanten *Bp* TI Δ *hfq* comp und *Bb* 7865 Δ *hfq* comp angesetzt. Am folgenden Tag wurden die Kulturen in 50 ml 1x SS-Medium

auf OD_{600nm} von 0.1 - 0.2 verdünnt und in entsprechenden Zeitintervallen Proben zur photometrischen Bestimmung der OD_{600nm} entnommen. Die Auswertung erfolgte durch Auftragung der OD_{600nm} gegen den Zeitverlauf in h.

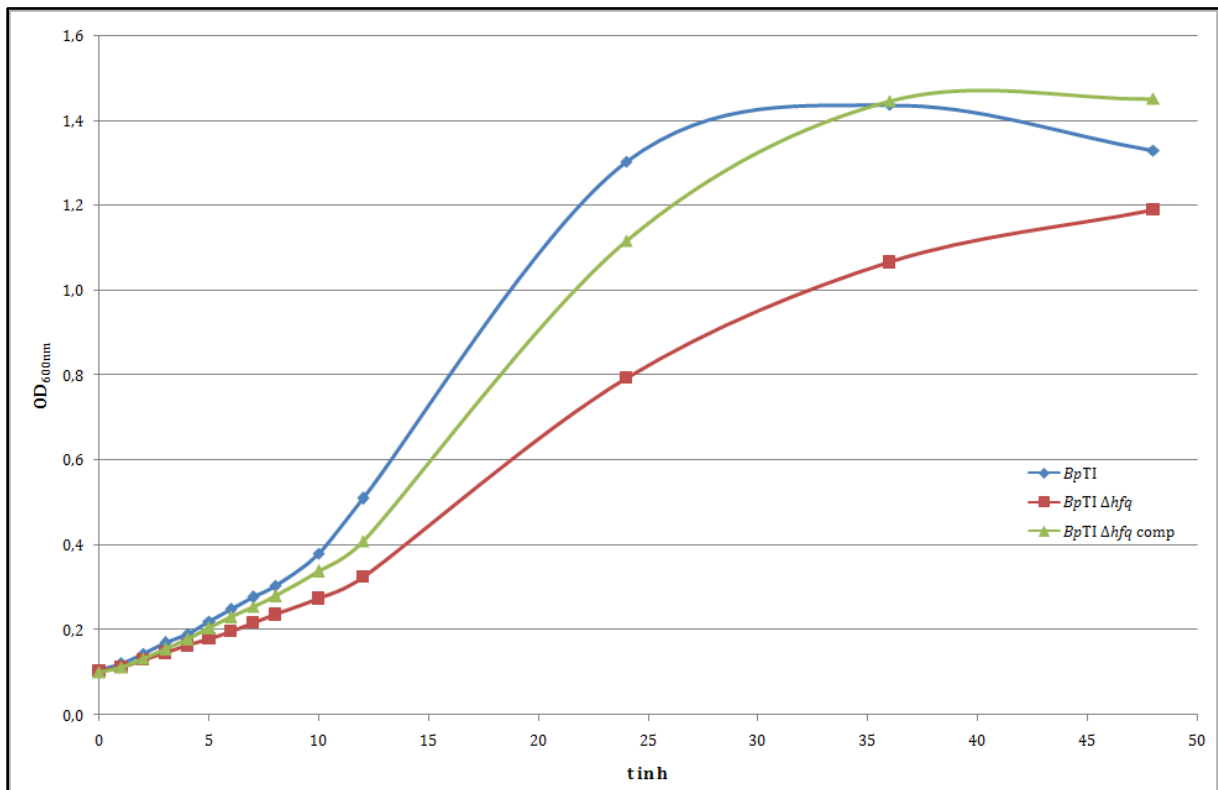


Abb. 26: Wachstumskurve von *Bp TI* (blau), *Bp TI Δhfq* (rot) und *Bp TI Δhfq comp* (grün). Aufgetragen ist die OD_{600nm} gegen den Zeitverlauf in Stunden. Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens wurde mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, wobei hier nur die Werte einer Wachstumskurve exemplarisch dargestellt sind.

Abbildung 26 zeigt, dass die *hfq*-Mutante von *Bp TI* (rote Kurve) im gemessenen Zeitraum ein langsames Wachstum aufweist als der Wildtyp *Bp TI* (blaue Kurve). Die Mutante zeichnet sich durch eine längere lag-Phase am Anfang der Kurve und eine weniger steile logarithmische Phase als der Wildtyp aus. Im gemessenen Zeitraum erreichte *Bp TI Δhfq* erst nach 48 h ein Plateau mit einer OD_{600nm} von 1.2, während der Wildtyp *Bp TI* das Plateau von ca. 1.5 bereits nach 36 h erreicht und sich beim 48 h-Wert bereits in der Absterbephase befindet. Die Komplementante *Bp TI Δhfq comp* wächst anfangs minimal langsamer als der Wildtyp, erreicht allerdings im späteren Zeitverlauf der Wachstumskurve ($t = 36\ h$ und $48\ h$) gleich hohe OD_{600nm} -Werte wie der Wildtyp *Bp TI*.

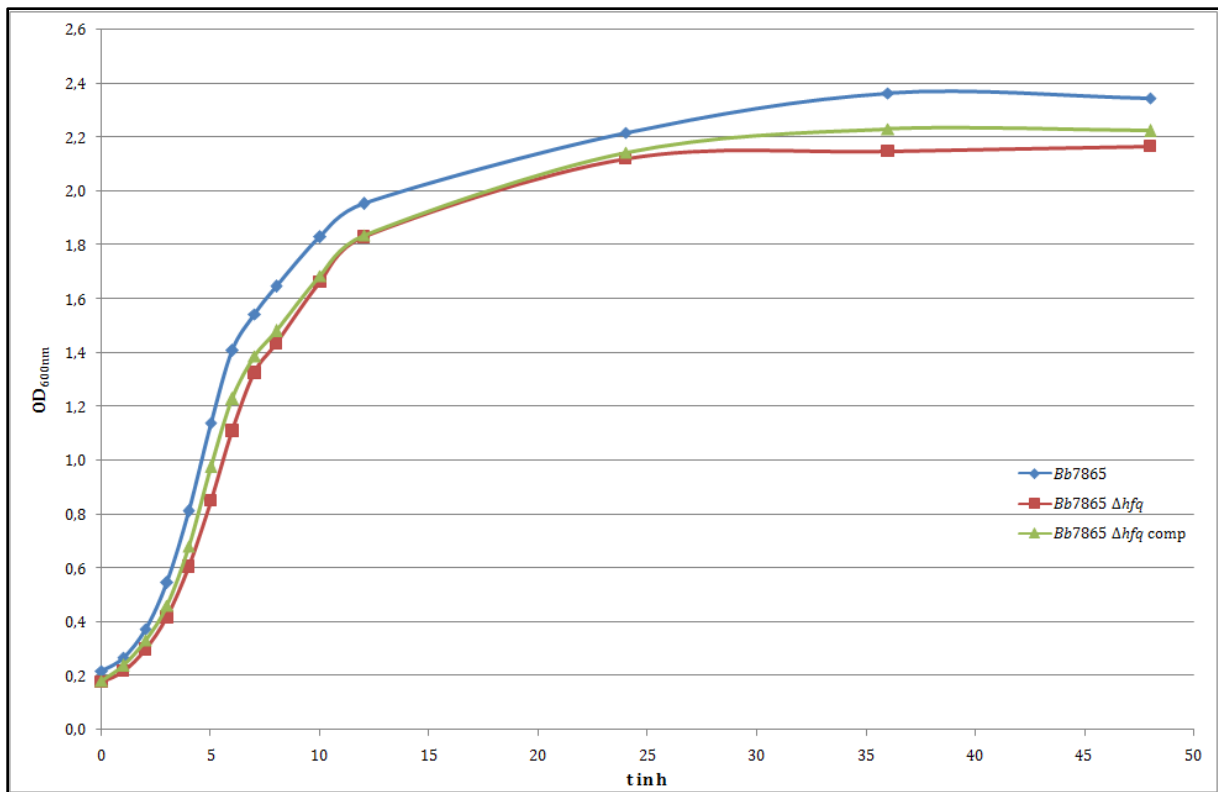


Abb. 27: Wachstumskurve von *Bb 7865* (blau), *Bb 7865 Δhfq* (rot) und *Bb 7865 Δhfq comp* (grün). Aufgetragen ist die OD_{600nm} gegen den Zeitverlauf in Stunden. Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens wurde mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, wobei hier nur die Werte einer Wachstumskurve exemplarisch dargestellt sind.

Im Gegensatz zu *Bp TI Δhfq* zeigt *Bb 7865 Δhfq* (rote Kurve) keinerlei signifikantes Wachstumsdefizit gegenüber dem zugehörigen Wildtypstamm *Bb 7865* (blaue Kurve) (s. Abb. 27). Es gibt keinen Unterschied in der Länge der lag-Phase, der logarithmischen Phase sowie im Höchstwert der OD_{600nm} in der Stationärphase zwischen Wildtyp und Δhfq -Mutante. Dementsprechend weist auch die Wachstumskurve der Komplementante *Bb 7865 Δhfq comp* (grüne Kurve) kaum eine Abweichung von derjenigen von *Bb 7865* und *Bb 7865 Δhfq* auf.

3. Analyse des Hfq-regulierten Proteoms in *B. pertussis* und *B. bronchiseptica*

Die 2D-Gelelektrophorese ermöglicht die Erstellung eines Expressionsprofils aus komplexen Proteinmischungen, welche das Proteom eines Organismus unter bestimmten Wachstumsbedingungen darstellen. Das Hfq-Protein fördert als RNA-Chaperon die Interaktion von sRNAs mit ihren jeweiligen Ziel-mRNAs, wodurch deren Translation beeinflusst wird (sowohl aktivierend als auch reprimierend). Aus diesem Grund sollte sich das Fehlen des Hfq-Proteins in der Δhfq -Mutante auf die globale Proteinzusammensetzung in *Bp* T1 und *Bb* 7865 auswirken.

3.1. Einfluss des Hfq-Proteins auf das Proteom von *B. pertussis* unter logarithmischen Wachstumsbedingungen

Um einen Hfq-Effekt auf das Proteom nachzuweisen, wurden zunächst aus logarithmischen Kulturen von *Bp* Δtox und *Bp* $\Delta tox \Delta hfq$ (OD_{600nm} 0.6) die Gesamtzellproteine isoliert (s. IV 2.1.). Je 250 μg Protein der jeweiligen Probe wurden einer isoelektrischen Fokussierung auf IPG-Strips der Länge 18 cm und pH-Range von 3 - 10 unterzogen (s. IV 2.5.2.), die Strips äquilibriert (s. IV 2.5.4.) und anschließend die fokussierten Proteine mittels SDS-Page gelelektrophoretisch aufgetrennt (2. Dimension). Die so gewonnenen 2D-Gele wurden mit kolloidalem Coomassie angefärbt (s. IV 2.5.5.) und eingescannt. Die Auswertung der 2D-Gel-Scans erfolgte mittels Progenesis SameSpots Software von Nonlinear Dynamics Inc. Dabei wurden jeweils drei technische Replikate aus drei unabhängig gewonnenen Proteinproben des jeweiligen Stammes (insgesamt 9 Gele pro Bedingung) miteinander verglichen. Proteinspots, welche nach der Statistikauswertung der Software einen ANOVA-p-Wert von ≤ 0.05 , einen Power-Wert von ≥ 0.8 , einen q-Wert von ≤ 0.1 aufwiesen und mindestens 1.5fach hoch- oder runterreguliert waren, wurden einer weiteren visuellen Überprüfung unterzogen. Abbildung 28 zeigt, welche Spots zwischen *Bp* Δtox -Wildtyp und Δhfq -Mutante differentiell reguliert erschienen. 35 Proteinspots erfüllten die zuvor beschriebenen Kriterien und erschienen nach visueller Überprüfung zwischen Wildtyp und Δhfq -Mutante differentiell reguliert. 15 Proteinspots waren dabei in der Δhfq -Mutante herunterreguliert (blau), während 20 Proteinspots in der Δhfq -Mutante stärker exprimiert waren (rot). Die Tabelle 2 gibt einen Überblick über die regulierten Spots mit den zugehörigen ANOVA-p-Werten und der Ratio der Regulation zwischen Wildtyp und Δhfq -Mutante.

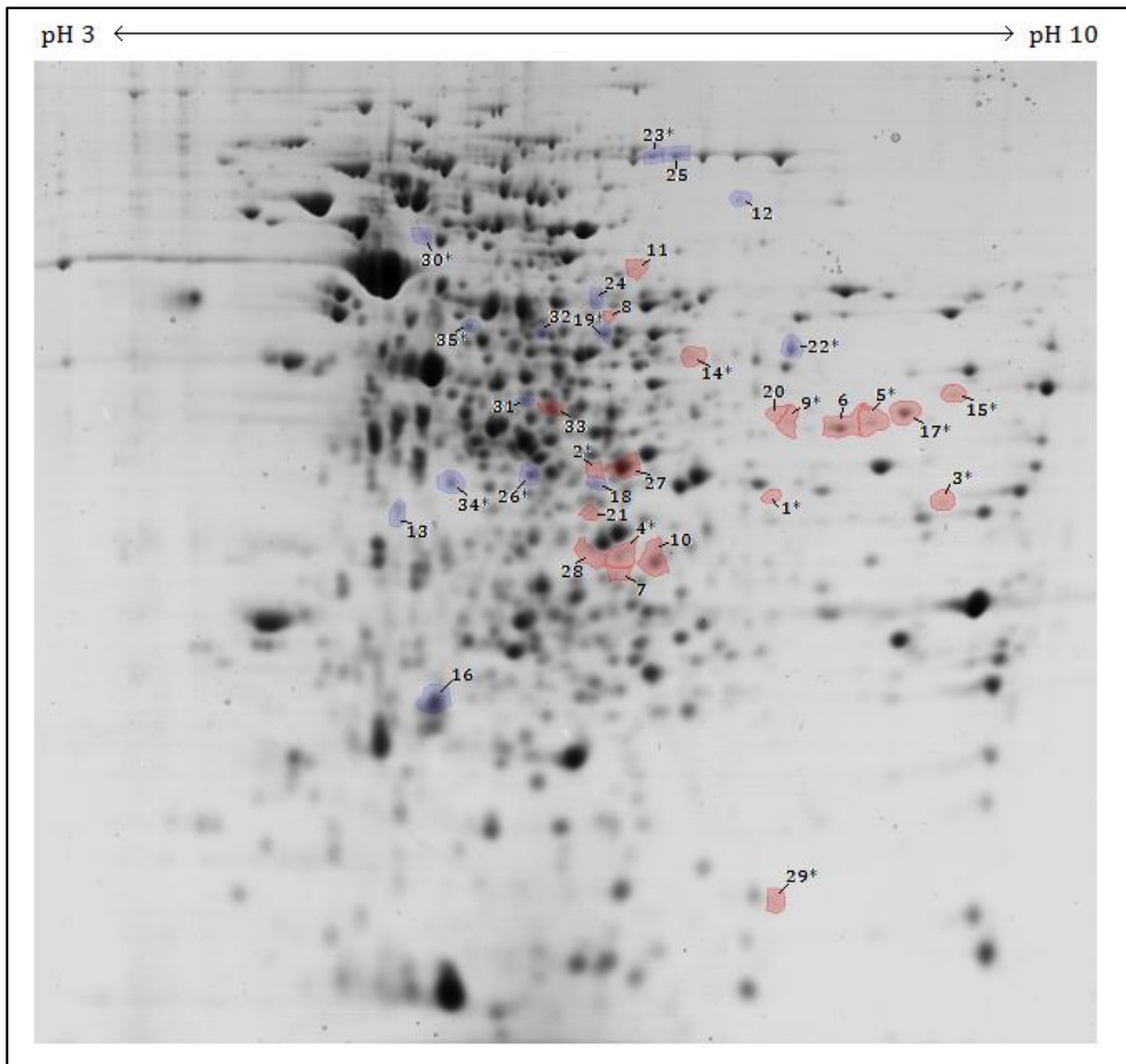


Abb. 28: Repräsentatives 2D-Gelbild von *Bp Δtox* (OD_{600nm} 0.6). Rot markiert sind Proteinspots, die nach der Auswertung durch die Progenesis SameSpot Software in der Δhfq -Mutante mindestens 1.5fach hochreguliert sind. Blau markiert sind Proteinspots, die in der Δhfq -Mutante mindestens 1.5fach herunterreguliert sind. Mit Stern markierte Proteinspots wurden per Massenspektrometrie identifiziert.

Tab. 2: Aufstellung der zwischen *Bp Δtox*-Wildtyp und Δhfq -Mutante unter logarithmischen Bedingungen differentiell regulierten Proteinspots mit dem zugehörigen ANOVA-p-Wert und der Ratio der Regulation.

Spotnr.	ANOVA-p-Wert	Ratio der Regulation $\Delta hfq/WT$	Spotnr.	ANOVA-p-Wert	Ratio der Regulation $\Delta hfq/WT$
Spot 1	1.75E-05	3	Spot 8	8.29E-03	2.2
Spot 2	4.48E-06	2.7	Spot 9	7.30E-05	2
Spot 3	3.65E-06	2.6	Spot 10	1.61E-05	2
Spot 4	5.09E-06	2.6	Spot 11	1.03E-03	1.9
Spot 5	1.95E-05	2.4	Spot 12	2.35E-02	-1.9
Spot 6	5.39E-05	2.3	Spot 13	2.34E-03	-1.9
Spot 7	1.95E-04	2.2	Spot 14	3.67E-05	1.8

Spot 15	1.99E-04	1.8		Spot 26	5.26E-03	-1.6
Spot 16	2.75E-02	-1.8		Spot 27	4.84E-05	1.6
Spot 17	1.02E-03	1.8		Spot 28	3.72E-04	1.5
Spot 18	2.22E-03	-1.8		Spot 29	1.62E-04	1.5
Spot 19	3.16E-04	-1.7		Spot 30	2.13E-03	-1.5
Spot 20	2.96E-03	1.7		Spot 31	3.11E-03	-1.5
Spot 21	8.21E-05	1.7		Spot 32	8.47E-03	-1.5
Spot 22	1.96E-03	-1.7		Spot 33	3.13E-05	1.5
Spot 23	5.69E-05	-1.7		Spot 34	2.36E-03	-1.5
Spot 24	4.05E-04	-1.6		Spot 35	2.32E-03	-1.5
Spot 25	7.19E-04	-1.6				

Zur Identifikation der differentiell regulierten Proteinspots wurden weitere präparative 2D-Gele hergestellt. Hierfür wurden 400 µg Protein, welche zu gleichen Teilen aus Proteinproben von *Bp Δtox*-Wildtyp und *Δhfq*-Mutante bestanden, auf einem IPG-Strip der Länge 18 cm und pH-Range von 3 - 10 isoelektrisch fokussiert, die Strips äquilibriert und anschließend die fokussierten Proteine mittels SDS-Page gelelektrophoretisch aufgetrennt. Auf gleiche Weise wurden zwei weitere Gele hergestellt. Nach kolloidaler Coomassie-Färbung der drei Gele wurde versucht, die differentiell regulierten Proteinspots zu picken. Dies gestaltete sich aufgrund der geringen Größe und schlechten Erkennbarkeit mancher Spots in den Gelen als schwierig, weshalb einige Spots bei der anschließenden Identifikation mittels Massenspektrometrie leider nicht weiter berücksichtigt werden konnten. 18 Proteinspots konnten jedoch gepickt werden (in Abb. 29 mit Stern markiert). Dabei wurden für den jeweiligen Spot Proben aus allen drei Gelen vereint, um ausreichend Material für die massenspektrometrische Analyse zu gewinnen. Die Identifikation erfolgte mittels MALDI-TOF am ISAS in Dortmund. Tabelle 3 zeigt die identifizierten Spots mit dem zugehörigen Mascot Score, der NCBI-Zugangsnummer, sowie Molekulargewicht, Name, Genlokus und Genname des ermittelten Proteins.

Tab. 3: Aufstellung der identifizierten Proteinspots, welche zwischen *Bp Δtox*-Wildtyp und *Δhfq*-Mutante differentiell reguliert sind. Der Mascot Score ist ein Maß für die Genauigkeit der Identifikation: Werte über 82 sind signifikant ($p < 0.05$). Ferner sind die Zugangsnummer des ermittelten Proteins in der NCBI-Datenbank angegeben, der Proteinname, das Molekulargewicht (MG) in kDa, der zugehörige Genlokus in *Bp* TI und die Annotation.

Spotnr.	Mascot Score	NCBI-Zugangsnr.	Proteinname	MG	Genlokus	Annotation
Spot 1	265	gi 33602951	hypothetical protein BP3440	34.5	BP3440	-
Spot 2	163	gi 33591858	thymidine diphosphoglucose 4,6-dehydratase	35.3	BP0665	-
Spot 3	236	gi 33591811	hypothetical protein BP0612	34.4	BP0612	-
Spot 4	90	gi 33593874	hypothetical protein BP2936	37.2	BP2936	-

Spot 5	284	gi 33592580	putative periplasmic solute-binding protein	40.0	BP1487	<i>smoM</i>
Spot 9	391	gi 33591535	putative ABC transporter substrate binding protein	41.5	BP0301	-
Spot 14	174	gi 33593269	putative regulatory lipoprotein	47.4	BP2271	-
Spot 15	227	gi 33592988	branched-chain amino acid-binding protein	44.3	BP1948	-
Spot 17	496	gi 33591535	putative ABC transporter substrate binding protein	41.5	BP0301	-
Spot 19	388	gi 33592261	dihydrolipoamide dehydrogenase	50.1	BP1126	<i>odhL</i>
Spot 22	210	gi 33596520	D-amino acid dehydrogenase small subunit	45.9	BP1818	<i>dadA</i>
Spot 23	451	gi 33593040	aconitate hydratase	97.7	BP2014	<i>acnA</i>
Spot 26	321	gi 33594685	putative ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein	36.7	BP3831	-
Spot 29	258	gi 33594350	phosphopantetheine adenylyltransferase	19.2	BP3471	<i>coaD</i>
Spot 30	636	gi 33591386	2-isopropylmalate synthase	63.0	BP0131	<i>leuA</i>
Spot 34	395	gi 33592591	glutathione synthetase	34.7	BP1499	<i>gshB</i>
Spot 35	375	gi 33593847	hypothetical protein BP2909	51.4	BP2909	-

Unter den identifizierten Proteinen befinden sich vier als hypothetisch annotierte Proteine: Spot 1 (BP3440), Spot 3 (BP0612), Spot 4 (BP2936) und Spot 35 (BP2909). Des Weiteren sind einige Bindeproteine von der Δhfq -Mutation betroffen. So stellt Spot 5 ein putatives, periplasmatisches Bindeprotein für gelöste Substanzen dar (BP1487/SmoM), während Spot 26 ein putatives, periplasmatisches ABC-Transporter-Bindeprotein für Aminosäuren darstellt (BP3831). Bei Spot 15 handelt es sich um ein Bindeprotein für verzweigt-kettige Aminosäuren (BP1948). Die Spots 9 und 17 sind beide als putatives ABC-Transporter-Substratbindeprotein identifiziert worden. Hier kann man davon ausgehen, dass dieses Protein in zwei verschiedenen Modifikationsformen vorliegt, welche den isoelektrischen Punkt des Proteins verändern (z. B. Phosphorylierungsgrad). Da beide Spots, also beide Modifikationsformen, in der Δhfq -Mutante hochreguliert sind (2fach für Spot 9 bzw. 1.8fach für Spot 17), scheint eine Δhfq -Mutation den Grundgehalt des Proteins zu beeinflussen und nicht etwa den Modifikationsstatus. Spot 14 wurde als putatives regulatorisches Lipoprotein identifiziert (BP2271). Die in Spot 23 identifizierte Aconitat-Hydratase (BP2014/AcnA) katalysiert die Umwandlung von cis-Aconitat zu Citrat bzw. Isocitrat (EC 4.2.1.3) und ist somit am Citrat-Zyklus sowie Glyoxylat- und Dicarboxylat-Metabolismus beteiligt. Spot 29 wurde als Phosphopantethein-Adenylyltransferase identifiziert (BP3471/CoaD), welche die Umwandlung von 4'-Phosphopantethein zu Pantethein bzw. Dephospho-CoA katalysiert (EC 2.7.7.3) und damit im Pantothenat- und CoA-Stoffwechsel mitwirkt. Die als Spot 34 identifizierte Glutathion-Synthetase GshB (BP1499) ist ein Schlüsselenzym des Glutathion-Metabolismus, da sie die Synthese von Glutathion (GSH) aus L- γ -

Glutamylcystein katalysiert (EC 6.3.2.3). Spot 32 wurde als 2-Isopropylmalat-Synthase LeuA (BP0131) identifiziert, welche an der Biosynthese von Valin, Leucin und Isoleucin beteiligt ist (EC 2.3.3.13). Spot 2 wurde als Thymidin-Diphosphoglucose 4,6-Dehydratase (BP0665) identifiziert. Spot 19, die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (BP1126/OdhL), ist die E3-Komponente des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes (EC 1.8.1.4) und damit an der Konversion von α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA innerhalb des Citrat-Zyklus beteiligt. Die D-Aminosäure-Dehydrogenase (BP1818/DadA), welche als Spot 22 identifiziert wurde, katalysiert die oxidative Deaminierung von D-Aminosäuren zu ihren jeweiligen Ketosäuren (EC 1.4.99.1).

3.2. Einfluss der Δhfq -Mutation auf die Transkription der zu den regulierten Spots gehörenden Gene (logarithmische Wachstumsbedingungen)

Das Hfq-Protein übt seine Wirkung vor allem auf post-transkriptioneller Ebene aus, indem die Translation der regulierten mRNAs aktiviert oder inhibiert wird (s. II 3.3). Dadurch macht sich eine Δhfq -Mutation durch Veränderungen der globalen Proteinzusammensetzung bemerkbar, wie unter V 3.1. gezeigt werden konnte. Weitergehend sollte untersucht werden, ob die zu den regulierten Spots gehörenden Gene bereits auf Transkriptionsebene von einer Δhfq -Mutation betroffen sind. In diesem Zusammenhang wurde die Transkriptionsstärke ausgewählter Gene zwischen *Bp* TI-Wildtyp und Δhfq -Mutante mittels quantitativer RT-PCR verglichen.

Zunächst wurden jeweils drei unabhängige Kulturen von *Bp* TI-Wildtyp und Δhfq -Mutante aus der logarithmischen Phase (OD_{600nm} 0.6) gewonnen. Aus diesen wurde die Gesamt-RNA isoliert, welche anschließend DNase-behandelt und auf Reinheit und Effizienz der RNA-Isolierung getestet wurden (s. IV 1.10.1.-4.). 5 μ g der Gesamt-RNA wurden anschließend in cDNA umgeschrieben (s. IV 1.11.). Diese cDNAs dienten als Template für eine quantitative RT-PCR zur Bestimmung der Transkriptionsrate des jeweiligen Gens im *Bp* TI-Wildtyp bzw. der *Bp* TI Δhfq -Mutante (s. IV 1.12.). Dabei wurden ausgehend von jeder cDNA drei Ansätze mit den jeweiligen genspezifischen Primern pro Lauf amplifiziert, während drei Ansätze mit den Primern rpoB_RT_fw und rpoB_RT_rev bei der Auswertung die Normalisierung gegenüber dem Housekeeping-Gen *rpoB* ermöglichten. Aus den drei technischen Replikaten wurde ein normalisierter ΔC_T -Wert für die jeweilige Transkription gemittelt. Aus den drei unabhängigen Kulturen des *Bp* TI-Wildtyps einerseits und der *Bp* TI Δhfq -Mutante andererseits wurde anschließend ein Mittelwert gebildet und mittels Student's t-test auf Signifikanz untersucht. Die Ratio der relativen Expression ($\Delta \Delta C_T$ -Wert) wurde anschließend graphisch in Microsoft Excel dargestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Skalierung wurden die Ergebnisse in zwei getrennten Graphiken dargestellt.

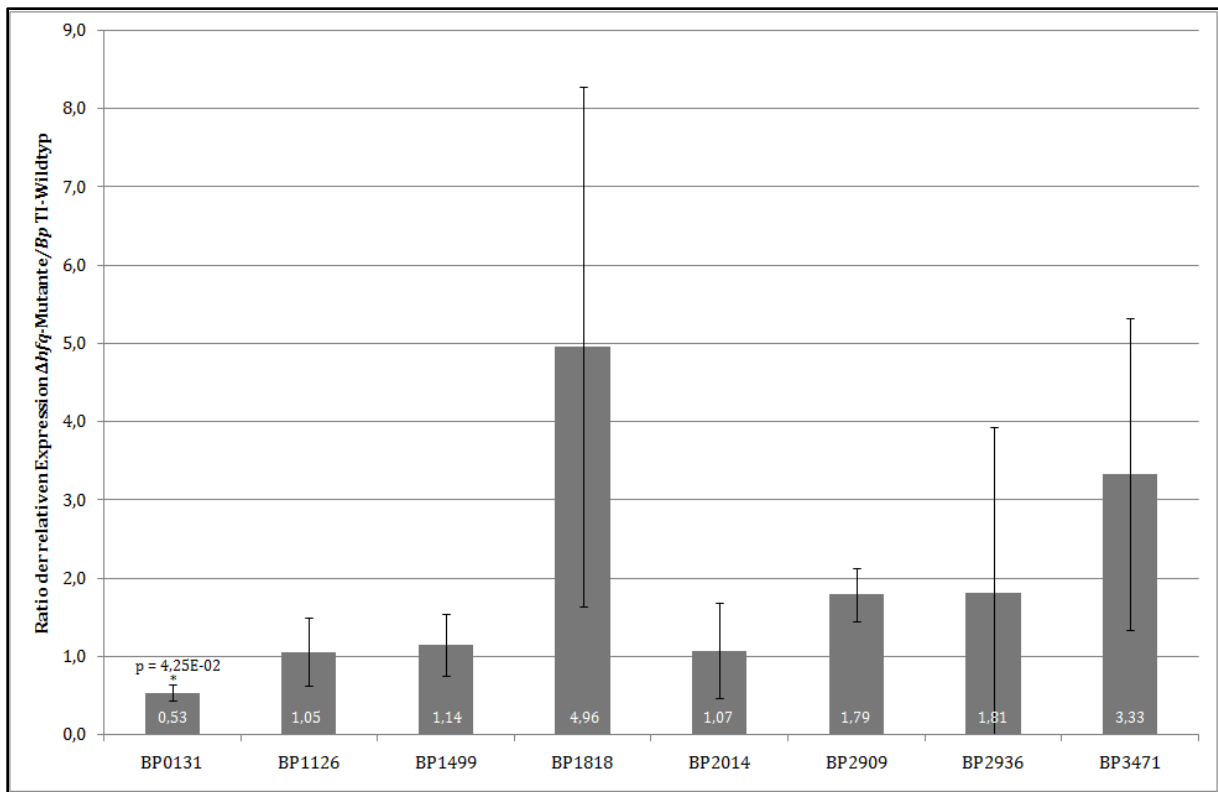


Abb. 29: Ergebnisse der qRT-PCR zur Transkription der Gene, welche zu den in der logarithmischen Phase regulierten Spots gehören. Aufgetragen ist das Verhältnis der Transkription des jeweiligen Gens zwischen Δhfq -Mutante und Bp TI-Wildtyp. Dabei wurde der Mittelwert aus drei unabhängigen Kulturen gebildet und die Standardabweichung bestimmt. Signifikante Hoch- oder Runterregulation ist mit Stern und zugehörigem p-Wert gekennzeichnet (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$).

Das Gen BP0131 (*leuA*) scheint in der Δhfq -Mutante signifikant weniger transkribiert zu werden als im zugehörigen Wildtyp Bp TI. Die Gene BP1126 (*odhL*), BP1499 (*gshB*), BP2014 (*acnA*), BP2909 und BP2936 besitzen im Mittel eine Ratio der relativen Expression zwischen 1.0 und 1.8 und erscheinen damit im Bp TI-Wildtyp und der Δhfq -Mutante gleich stark transkribiert zu werden. Die Gene BP1818 (*dada*) und BP3471 (*coaD*) scheinen zwar in der Δhfq -Mutante stärker transkribiert zu werden, jedoch sind die Werte statistisch nicht signifikant.

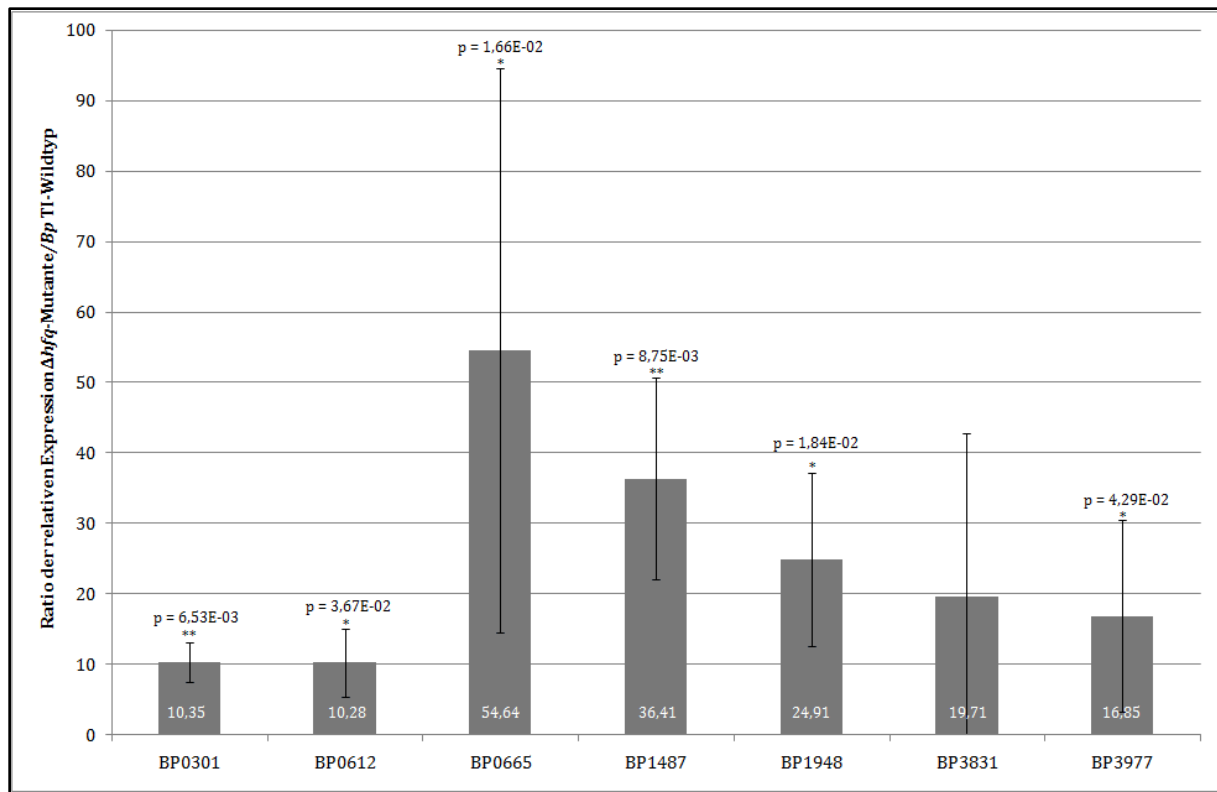


Abb. 30: Ergebnisse der qRT-PCR zur Transkription der Gene, welche zu den in der logarithmischen Phase regulierten Spots gehören. Aufgetragen ist das Verhältnis der Transkription des jeweiligen Gens zwischen *Δhfq*-Mutante und *Bp* TI-Wildtyp. Dabei wurde der Mittelwert aus drei unabhängigen Kulturen gebildet und die Standardabweichung bestimmt. Signifikante Hoch- oder Runterregulation ist mit Stern und zugehörigem p-Wert gekennzeichnet (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$).

Mit Quotienten zwischen 10 und 55 ergibt sich für die Gene BP0301, BP0612, BP0665, BP1487 (*smoM*), BP1948 und BP3977, dass in der *Δhfq*-Mutante signifikant mehr der zugehörigen Transkripte nachzuweisen sind als im Wildtyp *Bp* TI. Das Gen BP3831 scheint in der *Δhfq*-Mutante stärker transkribiert zu werden, jedoch ist die zugehörige Ratio ohne statistische Signifikanz. Mit einer gemittelten Ratio von ca. 370 können für das Gen BP2271 in der *Δhfq*-Mutante deutlich mehr Transkripte nachgewiesen werden als im *Bp* TI-Wildtyp (graphisch nicht dargestellt). Diese Daten sind zudem statistisch signifikant.

3.3. Einfluss des Hfq-Proteins auf das Proteom von *B. pertussis* unter stationären Wachstumsbedingungen

Der Proteomvergleich von *Bp Δtox* und *Bp Δtox Δhfq* mit Proteinproben, die aus der logarithmischen Phase (OD_{600nm} 0.6) gewonnen wurden, ergab eine vergleichsweise geringe Anzahl an durch die *Δhfq*-Mutation regulierte Proteine. Da gezeigt werden konnte, dass die *hfq*-Transkription in der stationären Phase erhöht ist und damit einhergehend auch die Hfq-Proteinmenge erhöht sein könnte (s. Ergebnisse 1.4.), sollte ein Hfq-Effekt auf die globale

Proteinzusammensetzung in Kulturen, welche aus der stationären Phase gewonnen wurden, deutlicher zu erkennen sein.

Zu diesem Zweck wurden Kulturen von *Bp* TI und *Bp* TI Δhfq bis zur stationären Phase herangezogen (OD_{600nm} 1.8 für *Bp* TI; OD_{600nm} 1.4 für *Bp* TI Δhfq) und aus diesen die Gesamtzellproteine isoliert (s. IV 2.1.). Die 2D-Gelelektrophorese wurde dann wie oben für die Kulturen aus logarithmischen Wachstumsbedingungen beschrieben durchgeführt. Abbildung 31 zeigt, welche Spots zwischen *Bp* TI-Wildtyp und Δhfq -Mutante in der Stationärphase differentiell reguliert erschienen. 36 Proteinspots erfüllten die beschriebenen Kriterien und erschienen nach visueller Überprüfung zwischen Wildtyp und Δhfq -Mutante differentiell reguliert. 9 Proteinspots waren dabei in der Δhfq -Mutante herunterreguliert (blau), während 27 Proteinspots in der Δhfq -Mutante stärker exprimiert waren (rot). Die Tabelle 4 gibt einen Überblick über die regulierten Spots mit den zugehörigen ANOVA-p-Werten und der Ratio der Regulation zwischen Wildtyp und Δhfq -Mutante.

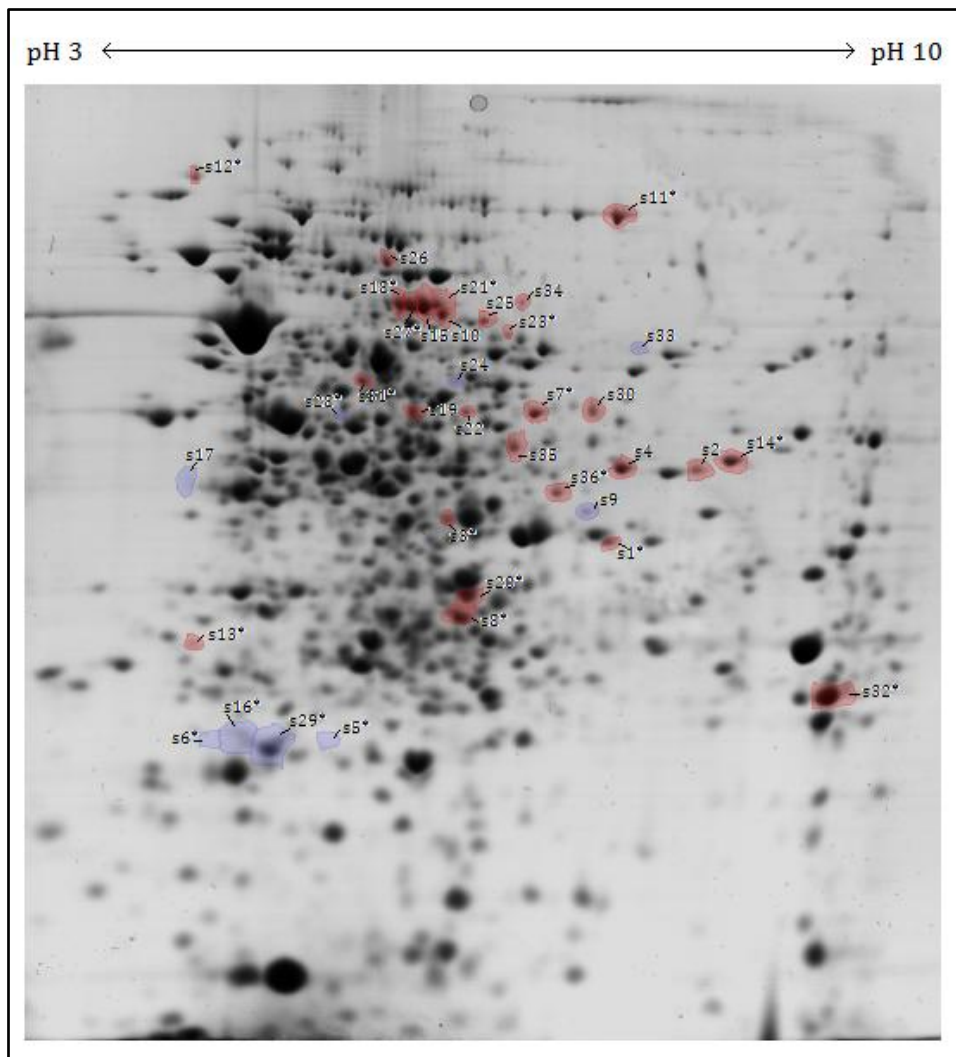


Abb. 31: Repräsentatives 2D-Gelbild von *Bp* TI Δhfq (OD_{600nm} 1.4). Rot markiert sind Proteinspots, die nach der Auswertung durch die Progenesis SameSpot Software in der Δhfq -Mutante mindestens 1.8fach hochreguliert sind. Blau markiert sind Proteinspots, die in der Δhfq -Mutante mindestens 1.8fach herunterreguliert sind. Mit Stern markierte Proteinspots wurden per Massenspektrometrie identifiziert.

Tab. 4: Aufstellung der zwischen *Bp* TI-Wildtyp und Δhfq -Mutante unter stationären Bedingungen differentiell regulierten Proteinspots mit dem zugehörigen ANOVA-p-Wert und der Ratio der Regulation. Zur Unterscheidung von den unter logarithmischen Bedingungen regulierten Spots ist den unter stationären Bedingungen regulierten Proteinspotnummern ein 's' vorgesetzt.

<i>Spotnr.</i>	<i>ANOVA-p-Wert</i>	<i>Ratio der Regulation $\Delta hfq/WT$</i>		<i>Spotnr.</i>	<i>ANOVA-p-Wert</i>	<i>Ratio der Regulation $\Delta hfq/WT$</i>
Spot s1	4.52E-06	4.4		Spot s19	4.68E-04	2.1
Spot s2	1.47E-06	4.1		Spot s20	1.07E-06	2.1
Spot s3	3.85E-06	4		Spot s21	5.97E-05	2
Spot s4	3.10E-08	3.9		Spot s22	9.88E-04	2
Spot s5	3.19E-07	-3.7		Spot s23	2.55E-04	2
Spot s6	1.44E-04	-3		Spot s24	3.33E-04	-2
Spot s7	1.68E-04	3		Spot s25	2.73E-05	2
Spot s8	2.29E-06	2.6		Spot s26	1.06E-05	1.9
Spot s9	3.64E-04	-2.6		Spot s27	1.66E-05	1.9
Spot s10	1.88E-05	2.5		Spot s28	2.05E-07	-1.9
Spot s11	8.14E-07	2.5		Spot s29	1.11E-04	-1.9
Spot s12	1.81E-04	2.4		Spot s30	4.19E-04	1.9
Spot s13	1.94E-04	2.4		Spot s31	2.57E-06	1.9
Spot s14	1.88E-04	2.4		Spot s32	1.25E-03	1.9
Spot s15	3.70E-07	2.4		Spot s33	4.99E-05	-1.8
Spot s16	1.29E-03	-2.2		Spot s34	3.99E-04	1.8
Spot s17	2.61E-04	-2.2		Spot s35	4.03E-05	1.8
Spot s18	2.16E-05	2.1		Spot s36	7.68E-07	1.8

Zur Identifikation der differentiell regulierten Proteinspots wurden wie unter V 3.1. beschrieben weitere präparative 2D-Gele hergestellt. Aus diesen konnten 23 Spots gepickt werden (in Abb. 33 mit Stern markiert). Die Identifikation erfolgte mittels MALDI-TOF am ISAS Dortmund. Tabelle 5 zeigt die identifizierten Spots mit dem zugehörigen Score, der NCBI-Zugangsnummer, sowie Molekulargewicht, Name, Genlokus und Genname des ermittelten Proteins.

Tab. 5: Aufstellung der identifizierten Proteinspots, welche zwischen *Bp* TI-Wildtyp und Δhfq -Mutante unter stationären Bedingungen differentiell reguliert sind. Der Score ist ein Maß für die Genauigkeit der Identifikation. Ferner sind die Zugangsnummer des ermittelten Proteins in der NCBI-Datenbank angegeben, der Proteinname, das Molekulargewicht (MG) in kDa, der zugehörige Genlokus in *Bp* TI und die Annotation.

<i>Spotnr.</i>	<i>Score</i>	<i>NCBI-Zugangsnr.</i>	<i>Proteinname</i>	<i>MG</i>	<i>Genlokus</i>	<i>Anno-tation</i>
Spot s1	547	gi 33593086	hypothetical protein BP2066	33.4	BP2066	-
Spot s3	1123	gi 33593898	putative exported solute binding protein	40.4	BP2963	-

Spot s5	816	gi 33594323	hypothetical protein BP3441	19.8	BP3441	-
Spot s6	806	gi 33594323	hypothetical protein BP3441	19.8	BP3441	-
Spot s7	1193	gi 33591361	putative penicillin-binding protein precursor	44.9	BP0102	-
Spot s8	904	gi 33593346	putative periplasmic substrate-binding transport protein	34.7	BP2352	-
Spot s11	1611	gi 33593040	aconitate hydratase	98.1	BP2014	<i>acnA</i>
Spot s12	2790	gi 33592249	putative outer membrane ligand binding protein	137.1	BP1112	<i>bipA</i>
Spot s13	614	gi 33594465	thiazole synthase	28.3	BP3597	<i>thiG</i>
Spot s14	1154	gi 33591535	putative ABC transporter substrate binding protein	41.7	BP0301	-
Spot s16	815	gi 33594323	hypothetical protein BP3441	19.8	BP3441	-
Spot s18	1628	gi 33593353	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	65.2	BP2361	<i>sdhA</i>
Spot s19	1062	gi 33593064	gamma-glutamyl phosphate reductase	44.6	BP2041	<i>proA</i>
Spot s20	1131	gi 33591856	hypothetical protein BP0663	32.3	BP0663	-
Spot s21	1485	gi 33593353	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	65.2	BP2361	<i>sdhA</i>
Spot s23	1551	gi 33594370	chaperonin GroEL	57.4	BP3495	<i>groEL</i>
Spot s27	1519	gi 33593353	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	65.2	BP2361	<i>sdhA</i>
Spot s28	1211	gi 33591281	elongation factor Tu	43.0	BP3611	<i>tuf</i>
Spot s29	924	gi 33594323	hypothetical protein BP3441	19.8	BP3441	-
Spot s31	1610	gi 33593847	hypothetical protein BP2909	51.4	BP2909	-
Spot s32	625	gi 33592662	glutamine ABC transporter periplasmic protein	26.8	BP1573	<i>glnH</i>
Spot s36	695	gi 33592580	putative periplasmic solute-binding protein	40.2	BP1487	<i>smoM</i>

Unter den identifizierten Proteinen befinden sich vier als hypothetisch annotierte Proteine: Spot s1 (BP2066), Spot s20, (BP0663), Spot s31 (BP2909) und die Spots s5, s6, s16 und s29 (BP3441). Bei dem hypothetischen Protein BP3441 kann man davon ausgehen, dass dieses Protein in vier verschiedenen Modifikationsformen vorliegt, welche den isoelektrischen Punkt des Proteins verändern. Da alle vier Spots, also Modifikationsformen, in der Δhfq -Mutante runterreguliert sind (-3.7fach für Spot s5, -3fach für Spot s6, -2.2fach für Spot s16 und -1.9fach für Spot s29), scheint eine Δhfq -Mutation die Grundmenge des Proteins zu beeinflussen und nicht etwa den Modifikationsstatus. Zudem betrifft eine Δhfq -Mutation die Expression einiger putativer Bindeproteine. So stellt Spot s3 ein putatives, exportiertes Bindeprotein für gelöste Substanzen dar (BP2963), während Spot s8 putativ ein periplasmatisches Substratbindeprotein eines Transporters (BP2352) darstellt. Spot s14 wurde als putatives ABC-Transporter-Substratbindeprotein (BP0301) identifiziert, Spot s36 als putatives, periplasmatisches Bindeprotein für gelöste Substanzen (BP1487/SmoM). Spot s7 wurde als putativer Penicillin-

Bindeproteinvorläufer von *B. pertussis* identifiziert (BP0102), wobei eine BLAST-Recherche ergab, dass es sich hierbei wahrscheinlich um die D-Alanyl-D-Alanin Carboxypeptidase, welche an der Biogenese der Zellhülle beteiligt ist, handelt. Spot s12 wurde als ein putatives Liganden-Bindeprotein in der äußeren Membran (BP1112/BipA) identifiziert. Interessanterweise handelt es sich hierbei um ein Protein, dessen Expression charakteristisch für die BvgI-Phase von *B. pertussis* ist (s. II 1.5.3.), dessen Funktion bislang aber noch nicht charakterisiert wurde.

Die in Spot s11 identifizierte Aconitat-Hydratase (BP2014/AcnA) katalysiert die Umwandlung von cis-Aconitat zu Citrat bzw. Isocitrat (EC 4.2.1.3) und ist somit am Citrat-Zyklus sowie Glyoxylat- und Dicarboxylat-Metabolismus beteiligt. Spot s13 wurde als Thiazol-Synthase identifiziert (BP3597/ThiG), welche die Bildung von Thiazol aus 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (DXP) und Dehydroglycin mit Hilfe des Schwefelproteins ThiS katalysiert. Die Spots s18, s21 und s27 stellen die Flavoprotein-Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase dar (BP2361/SdhA). Dieses Protein ist verantwortlich für die Oxidation von Succinat zu Fumarat, wobei Ubichinon zu Ubichinol reduziert wird (EC 1.3.5.1), und spielt eine Rolle im TCA-Zyklus sowie in der oxidativen Phosphorylierung. Die in Spot s23 identifizierte γ -Glutamyl-Phosphat-Reduktase (BP2041/ProA) katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von L- γ -Glutamyl-5-Phosphat zu L-Glutamat-5-Semialdehyd und Phosphat (EC 1.2.1.41) und ist beteiligt am Metabolismus von Arginin und Prolin. Das in Spot s23 identifizierte Chaperon GroEL (BP3495/*groEL*) ist an der korrekten Faltung von Proteinen beteiligt. Der Elongationsfaktor Tu, welcher in Spot s28 identifiziert wurde (BP3611), ist verantwortlich für den Transport von tRNAs zum Ribosom und besitzt damit eine tragende Rolle bei der Elongationsphase der Proteinbiosynthese. Spot s32 stellt die periplasmatische Komponente des Glutamin-ABC-Transporters dar (BP1573/GlnH) und ist somit am Transport von Glutamin in die Zelle beteiligt.

3.4. Einfluss der Δhfq -Mutation auf die Transkription der zu den regulierten Spots gehörenden Gene (stationäre Wachstumsbedingungen)

Analog zu den Proteinen, die unter logarithmischen Bedingungen reguliert erschienen, sollte auch für die Proteine, die unter stationären Bedingungen als reguliert erschienen, nachgewiesen werden, ob eine Δhfq -Mutation Einfluss auf die Transkription der entsprechenden Gene ausübt.

Zu diesem Zweck wurden jeweils drei unabhängige Kulturen von *Bp* TI-Wildtyp und Δhfq -Mutante aus der stationären Phase (OD_{600nm} 1.8 für *Bp* TI; OD_{600nm} 1.4 für *Bp* TI Δhfq) gewonnen. Daraufhin wurde weiter wie unter V 3.2. beschrieben verfahren. Aus den drei unabhängigen Kulturen des *Bp* TI-Wildtyps einerseits und der *Bp* TI Δhfq -Mutante andererseits wurde anschließend ein Mittelwert gebildet und mittels Student's t-test auf Signifikanz untersucht. Die Ratio der relativen Expression ($\Delta\Delta C_T$ -Wert) wurde anschließend graphisch in Microsoft Excel

dargestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Skalierung wurden die Ergebnisse in drei getrennten Graphiken dargestellt.

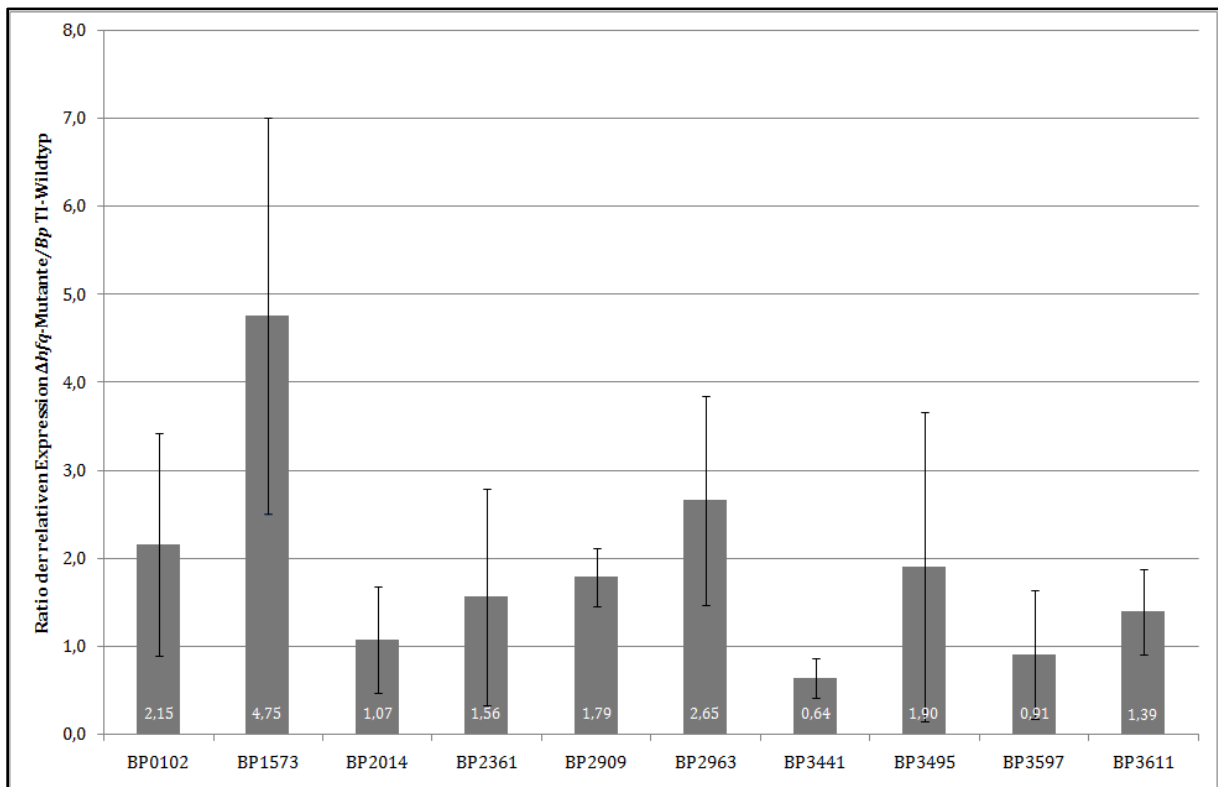


Abb. 32: Ergebnisse der qRT-PCR zur Transkription der Gene, welche zu den in der stationären Phase regulierten Spots gehören. Aufgetragen ist das Verhältnis der Transkription des jeweiligen Gens zwischen Δhfq -Mutante und *Bp* TI-Wildtyp. Dabei wurde der Mittelwert aus drei unabhängigen Kulturen gebildet und die Standardabweichung bestimmt. Signifikante Hoch- oder Runterregulation ist mit Stern und zugehörigem p-Wert gekennzeichnet (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$).

Die Gene BP2014 (*acnA*), BP2361 (*sdhA*), BP2909, BP3441, BP3495 (*groEL*), BP3597 (*thiG*) und BP3611 (*tuf*) besitzen im Mittel eine Ratio der relativen Expression zwischen 0.6 und 1.9 und scheinen damit im *Bp* TI-Wildtyp und der Δhfq -Mutante gleich stark transkribiert zu werden. Die Gene BP0102, BP1573 (*glnH*) und BP2963 scheinen zwar in der Δhfq -Mutante stärker transkribiert zu werden, jedoch sind die Werte nicht signifikant.

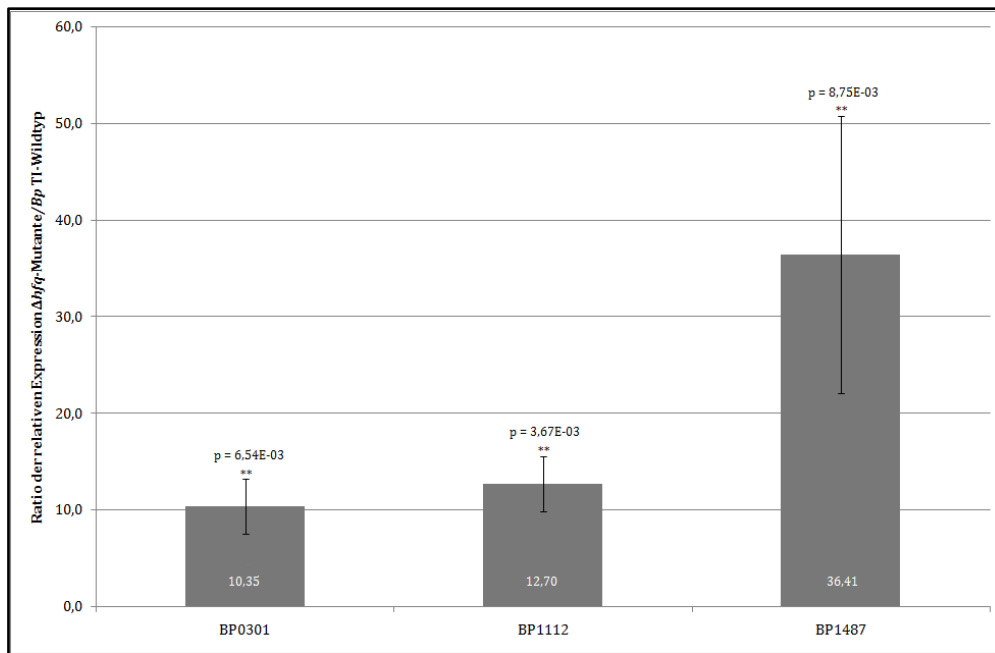


Abb. 33: Ergebnisse der qRT-PCR zur Transkription der Gene, welche zu den in der stationären Phase regulierten Spots gehören. Aufgetragen ist das Verhältnis der Transkription des jeweiligen Gens zwischen Δhfq -Mutante und Bp TI-Wildtyp. Dabei wurde der Mittelwert aus drei unabhängigen Kulturen gebildet und die Standardabweichung bestimmt. Signifikante Hoch- oder Runterregulation ist mit Stern und zugehörigem p-Wert gekennzeichnet (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$).

Mit Quotienten zwischen 10 und 37 ergibt sich für die Gene BP0301, BP1112 (*bipA*) und BP1487 (*smoM*), dass in der Δhfq -Mutante signifikant mehr der zugehörigen Transkripte nachzuweisen sind als im Wildtyp Bp TI.

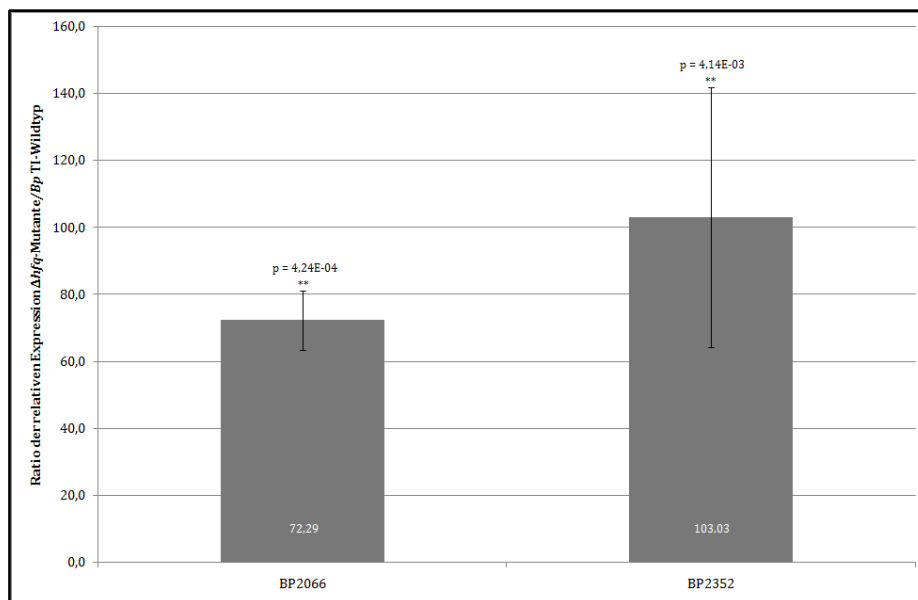


Abb. 34: Ergebnisse der qRT-PCR zur Transkription der Gene, welche zu den in der stationären Phase regulierten Spots gehören. Aufgetragen ist das Verhältnis der Transkription des jeweiligen Gens zwischen Δhfq -Mutante und Bp TI-Wildtyp. Dabei wurde der Mittelwert aus drei unabhängigen Kulturen gebildet und die Standardabweichung bestimmt. Signifikante Hoch- oder Runterregulation ist mit Stern und zugehörigem p-Wert gekennzeichnet (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$).

Mit einer gemittelten Ratio von ca. 73 bzw. ca. 103 können für die Gene BP2066 und BP2352 in der Δhfq -Mutante deutlich mehr Transkripte nachgewiesen werden als im *Bp* TI-Wildtyp. Diese Daten sind statistisch signifikant.

3.5. Einfluss des Hfq-Proteins auf das Proteom von *B. bronchiseptica* unter stationären Wachstumsbedingungen

In Korrelation zum Hfq-regulierten Proteom in *B. pertussis* sollte auch das Hfq-regulierte Proteom in der nah verwandten Art *B. bronchiseptica* untersucht werden. Da in *B. bronchiseptica* die *hfq*-Transkription in der stationären Phase ebenfalls erhöht ist und damit einhergehend auch die Hfq-Proteinmenge erhöht sein könnte (s. V 1.4.), richtete sich der Fokus der 2D-Gel-Analyse auf Proteinproben, welche aus stationären Kulturen gewonnen worden waren.

Zu diesem Zweck wurden Kulturen von *Bb* 7865 und *Bp* 7865 Δhfq bis zur stationären Phase herangezogen (OD_{600nm} 2.2) und aus diesen die Gesamtzellproteine isoliert (s. IV 2.1.). Die Durchführung der 2D-Gelelektrophorese und die Auswertung erfolgten wie bereits unter V.3.3. für *B. pertussis* beschrieben. Abbildung 35 zeigt, welche Spots zwischen *Bb* 7865-Wildtyp und Δhfq -Mutante in der Stationärphase differentiell reguliert erschienen. 22 Proteinspots erfüllten die zuvor beschriebenen Kriterien und erschienen nach visueller Überprüfung zwischen Wildtyp und Δhfq -Mutante differentiell reguliert. 5 Proteinspots waren dabei in der Δhfq -Mutante herunterreguliert (blau), während 17 Proteinspots in der Δhfq -Mutante stärker exprimiert waren (rot). Die Tabelle 6 gibt einen Überblick über die regulierten Spots mit den zugehörigen ANOVA-p-Werten und der Ratio der Regulation zwischen Wildtyp und Δhfq -Mutante.

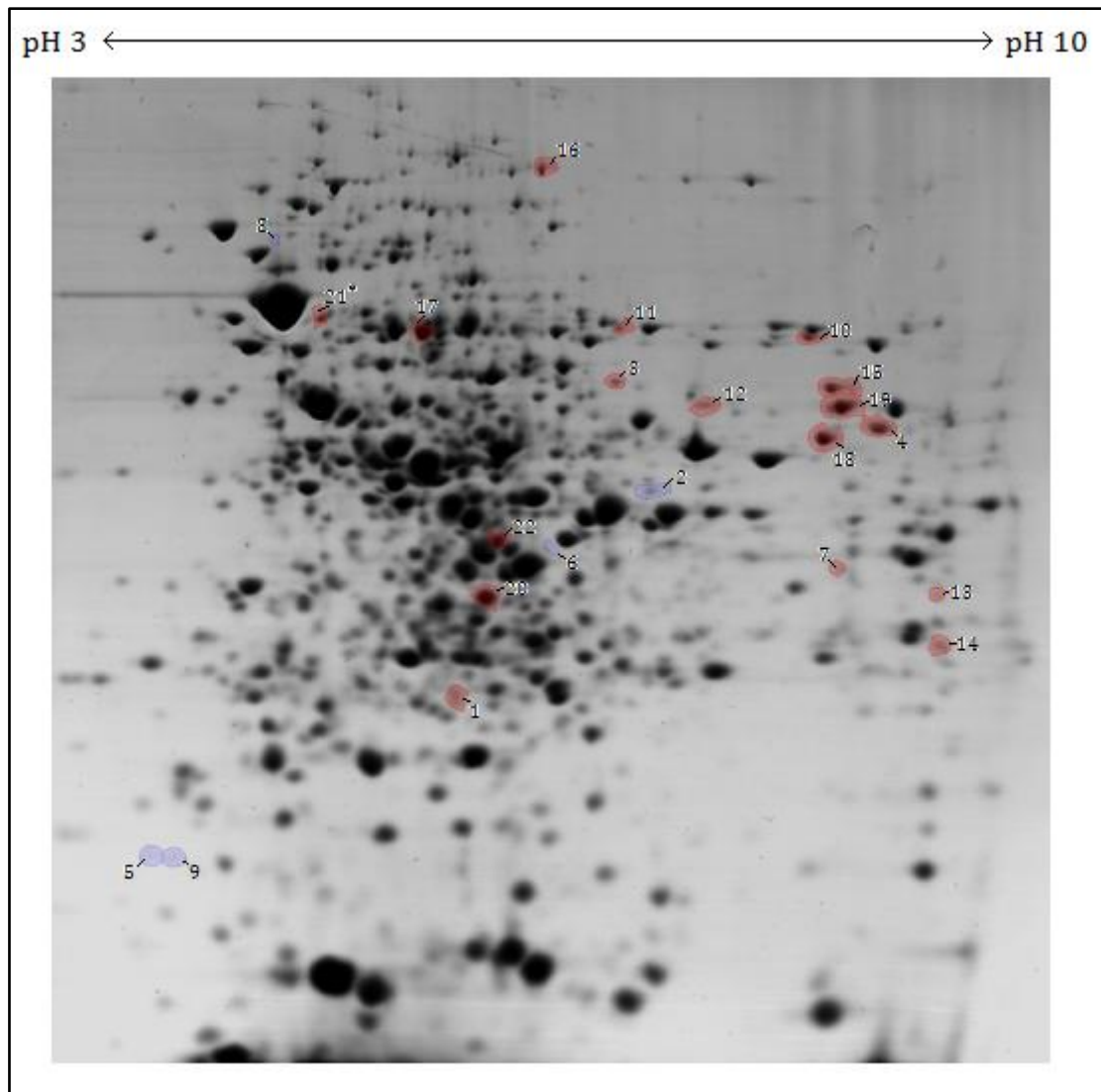


Abb. 35: Repräsentatives 2D-Gelbild von *Bb* 7865 Δhfq (OD_{600nm} 2.2). Rot markiert sind Proteinspots, die nach der Auswertung durch die Progenesis SameSpot Software in der Δhfq -Mutante mindestens 1.8fach hochreguliert sind. Blau markiert sind Proteinspots, die in der Δhfq -Mutante mindestens 1.8fach herunterreguliert sind. Mit Stern markierte Proteinspots wurden nicht per Massenspektrometrie identifiziert.

Tab. 6: Aufstellung der zwischen *Bb* 7865-Wildtyp und Δhfq -Mutante unter stationären Bedingungen differenziell regulierten Proteinspots mit dem zugehörigen ANOVA-p-Wert und der Ratio der Regulation.

Spotnr.	ANOVA-p-Wert	Ratio der Regulation $\Delta hfq/WT$	Spotnr.	ANOVA-p-Wert	Ratio der Regulation $\Delta hfq/WT$
Spot 1	2.05E-05	4.9	Spot 9	1.21E-03	-2.1
Spot 2	1.13E-02	-4.5	Spot 10	8.16E-03	2.1
Spot 3	1.37E-04	3.1	Spot 11	3.86E-03	2.1
Spot 4	3.28E-03	2.6	Spot 12	1.45E-03	2.1
Spot 5	2.43E-03	-2.6	Spot 13	1.44E-02	2.1
Spot 6	9.33E-03	-2.5	Spot 14	2.04E-04	2
Spot 7	4.48E-04	2.4	Spot 15	4.18E-03	2
Spot 8	1.57E-03	-2.2	Spot 16	6.21E-03	1.9

Spot 17	4.50E-03	1.9		Spot 20	5.53E-03	1.8
Spot 18	8.42E-03	1.8		Spot 21	2.47E-04	1.8
Spot 19	1.27E-03	1.8		Spot 22	3.96E-03	1.8

Zur Identifikation der differentiell regulierten Proteinspots wurden wie unter V 3.1. beschrieben weitere präparative 2D-Gele hergestellt. Aus diesen konnten 21 Spots gepickt werden. Die Identifikation erfolgte mittels MALDI-TOF am ISAS Dortmund. Tabelle 7 zeigt die identifizierten Spots mit dem zugehörigen Score, der NCBI-Zugangsnummer, sowie Molekulargewicht, Name, Genlokus und Annotation des ermittelten Proteins.

Tab. 7: Aufstellung der identifizierten Proteinspots, welche zwischen *Bb* 7865-Wildtyp und Δhfq -Mutante unter stationären Bedingungen differentiell reguliert sind. Der Score ist ein Maß für die Genauigkeit der Identifikation. Ferner sind die Zugangsnummer des ermittelten Proteins in der NCBI-Datenbank angegeben, der Proteinname, das Molekulargewicht (MG) in kDa, sowie der Name des zugehörigen Genlokus in *Bb* 7865 und die Annotation.

Spotnr.	Score	NCBI-Zugangsnr.	Proteinname	MG	Genlokus	Annotation
Spot 1	515	gi 9507572	chloramphenicol acetyltransferase	25.9		
Spot 2	1124	gi 33603763	hypothetical protein BB4790	36.4	BB4790	-
Spot 3	583	gi 33603899	amidase	46.0	BB4925	-
Spot 4	1479	gi 33600757	branched-chain amino acid-binding protein	44.4	BB1772	-
Spot 5	556	gi 33598993	transcription elongation factor	17.0	BB1457	<i>greA</i>
Spot 6	1051	gi 6538768	outer protein D	31.9	BB1620	<i>bopD</i>
Spot 7	663	gi 33599709	putative ABC transporter periplasmic solute-binding protein	35.1	BB0719	-
Spot 8	554	gi 33599950	chaperonin GroEL	57.4	BB0962	<i>groEL</i>
Spot 9	492	gi 33598993	transcription elongation factor	17.0	BB1457	<i>greA</i>
Spot 10	1295	gi 33601496	ABC-transport protein, solute-binding component	55.9	BB2517	-
Spot 11	1166	gi 33603790	UDP-N-acetylglucosamine synthesis bifunctional protein	48.7	BB4817	<i>glmU</i>
Spot 12	1031	gi 33602708	putative ABC transport protein, substrate-binding component	43.2	BB3733	-
Spot 13	1177	gi 33603193	hypothetical protein BB4218	26.3	BB4218	-
Spot 14	1320	gi 33568006	putative amino acid-binding periplasmic protein	28.3	BB1421	-
Spot 15	1678	gi 33600439	putative regulatory lipoprotein	47.4	BB1453	-
Spot 16	2502	gi 33603177	putative bifunctional UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase/UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide:D-alanyl-D-alanine ligase	99.9	BB4202	<i>murE</i>
Spot 17	2492	gi 33602724	serine protease	52.1	BB3749	<i>mucD</i>

Spot 18	5522	gi 33603396	putative ABC transporter substrate binding protein	41.7	BB4422	-
Spot 19	1965	gi 33599218	hypothetical protein BB0229	49.1	BB0229	-
Spot 20	3746	gi 33602394	putative periplasmic substrate-binding transport protein	34.7	BB3421	-
Spot 22	2970	gi 33600081	hypothetical protein BB1095	34.1	BB1095	-

Mit BB4790 (Spot 2), BB4218 (Spot 13), BB0229 (Spot 19) und BB1095 (Spot 22) befinden sich vier als hypothetisch annotierte Proteine unter den Hfq-regulierten Proteinen in *B. bronchiseptica*. Ähnlich zu *B. pertussis* ist auch in *B. bronchiseptica* die Expression einiger putativer Bindeproteine von einer Δhfq -Mutation betroffen. So stellt Spot 7 ein putatives, periplasmatisches ABC-Transport-Bindeprotein für lösliche Faktoren (BB0719) dar, während Spot 12 die putative Substrat-Bindekomponente eines ABC-Transportproteins (BB3733) darstellt. Spot 14 wurde als putatives, periplasmatisches Bindeprotein für Aminosäuren (BB1421) identifiziert. Des Weiteren stellt Spot 18 ein putatives ABC-Transport-Substratbindeprotein (BB4422) dar sowie Spot 20 ein putatives, periplasmatisches Substratbindeprotein (BB3421). Spot 4 wurde als Bindeprotein für verzweigt-kettige Aminosäuren (BB4925) identifiziert, Spot 10 die Bindekomponente für lösliche Faktoren eines ABC-Transportsystems. Die Identifikation von Spot 15 ergab ein putatives, regulatorisches Lipoprotein. Spot 6 stellt das sogenannte äußere Protein D dar (BB1620/*bopD*), dessen Funktion bislang unklar ist.

Das in Spot 11 identifizierte bifunktionelle UDP-N-Acetylglucosamin-Synthaseprotein (BB4817/*glmU*) katalysiert die Umwandlung von UTP und N-Acetyl-D-Glucosamin-1-Phosphat zu UDP-N-Acetylglucosamin und Diphosphat (EC 2.7.7.23). Spot 16 stellt eine putative bifunktionelle UDP-N-Acetylmuramoyl-Tripeptid:D-Alanyl-D-Alanin-Ligase (BB4202/*murE*) dar. Beide Proteine sind an der Zellwandsynthese beteiligt, indem sie einerseits wichtige Bausteine liefern bzw. die Vernetzung katalysieren. Das in Spot 8 identifizierte Chaperon GroEL (BB0962/*groEL*) ist für die korrekte Faltung von neu-synthetisierten Proteinen zuständig. Spot 5 und 9 sind der Transkriptions-Elongationsfaktor GreA (BB1457/*greA*). Mit Spot 3, einer Amidase (BB4925), und Spot 17, einer Serinprotease (BB3749/*mucD*), sind Faktoren des Protein- bzw. Peptidabbaus von der Hfq-Mutation in *Bb* 7865 betroffen.

Die in Spot 1 identifizierte Chloramphenicol-Acetyltransferase wurde durch homologe Rekombination im Zuge der Mutantengese in das Chromosom von *Bb* 7865 Δhfq eingebracht.

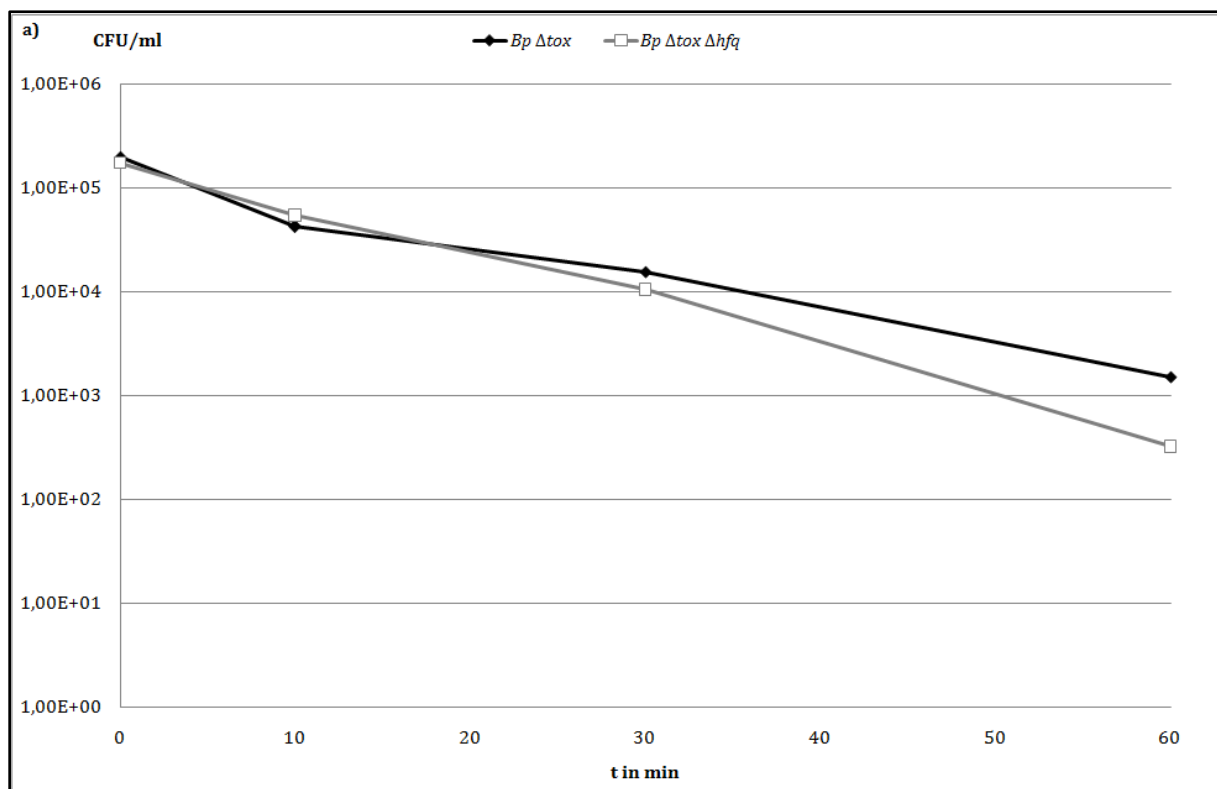
4. Auswirkung des Hfq-Proteins auf die Stresstoleranz

Von einigen Bakterienarten, wie z. B. *E. coli*, *L. monocytogenes* und *N. meningitidis*, ist bekannt, dass die jeweilige Δhfq -Mutante eine erhöhte Sensitivität gegenüber Stresssubstanzen (Oxidantien, Detergentien, Osmotika uvm.) aufweist (Tsui *et al.*, 1994; Christiansen *et al.*, 2004; Fantappiè *et al.*, 2009). Deshalb sollte auch für *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* untersucht werden, ob die zugehörigen Δhfq -Mutanten anfälliger gegenüber stressinduzierenden Substanzen sind.

4.1. Oxidativer Stress

Für die Bestimmung der Sensitivität gegenüber oxidativem Stress wurde für *Bp* Δtox und *Bp* $\Delta tox \Delta hfq$ (bzw. *Bp* TI und *Bp* TI Δhfq) ein Stressassay mit H_2O_2 durchgeführt, ebenso für *Bb* 7865 und *Bb* 7865 Δhfq (s. IV 3.4.). Bei *Bb* 7865 konnte zudem ein Agar-Diffusions-Assay mit den Substanzen H_2O_2 und Paraquat durchgeführt werden (s. IV 3.5.). Für *Bp* TI war dies leider nicht möglich, da der Stamm kein Wachstum auf 1x SS-Platten ohne Zugabe von Blut zeigte, welches die stressinduzierende Wirkung der verwendeten Substanzen abpufferte. Für *Bb* 7865 wurde zudem eine Stresswachstumskurve mit H_2O_2 durchgeführt (s. IV 3.3.)

Für den Stressassay mit *Bp* Δtox und *Bp* $\Delta tox \Delta hfq$ wurden dabei zunächst H_2O_2 -Konzentrationen von 1 mM und 2.5 mM verwendet. Abbildung 36 stellt die graphische Auswertung des Versuchs dar, wobei die CFU/ml gegen den Zeitpunkt aufgetragen wurde.



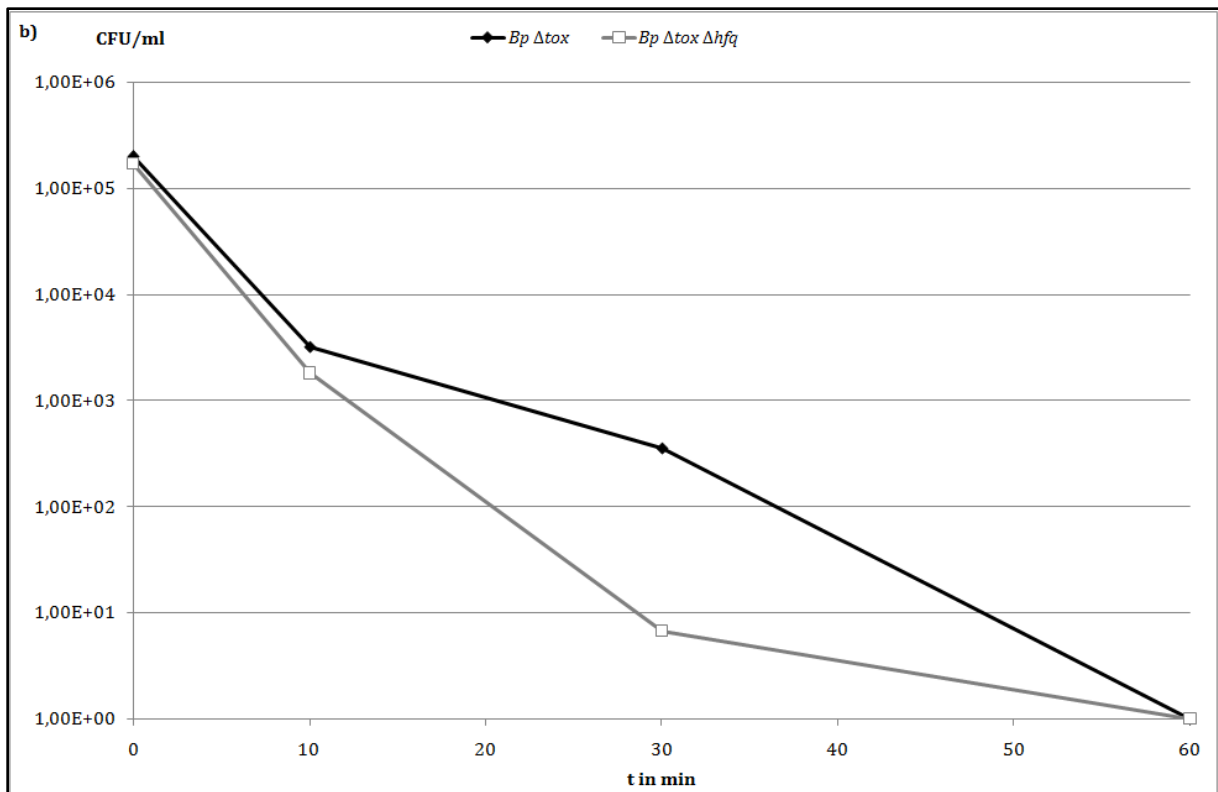


Abb. 36: Graphische Darstellung der CFU von *Bp Δtox* (schwarze Linie) und *Bp Δtox Δhfq* (graue Linie) nach Exposition mit unterschiedlichen H₂O₂-Konzentrationen. a) 1 mM H₂O₂ b) 2.5 mM H₂O₂. Aufgetragen ist der gemittelte Logarithmus der CFU/ml gegen den Zeitpunkt in min. Der jeweilige Stressassay wurde mindestens zweimal unabhängig durchgeführt. Innerhalb eines Assays wurden ausgehend von jedem Ansatz drei Verdünnungsreihen angefertigt und von den einzelnen Verdünnungsstufen die CFU/ml in Doppelbestimmung ermittelt.

Die Exposition mit 1 mM H₂O₂ führt im beobachteten Zeitrahmen von 60 min zu einer Verringerung der CFU/ml bei *Bp Δtox* und *Bp Δtox Δhfq* (s. Abb. 36a). Dabei gibt es keinen Unterschied zwischen *Bp Δtox*-Wildtyp und *Δhfq*-Mutante. Werden beide Stämme mit 2.5 mM H₂O₂ inkubiert, so führt dies bei *Bp Δtox Δhfq* zu einem anfangs etwas stärkeren Absinken der CFU/ml-Werte als beim Wildtyp (s. Abb. 36b). Besonders zum Zeitpunkt t = 30 min gibt es eine größere Diskrepanz in der CFU/ml zwischen *Δhfq*-Mutante und Wildtyp. Bei t = 60 min sind beide Stämme gleichermaßen durch die Einwirkung des H₂O₂ inhibiert worden. Der Versuch wurde daraufhin mit *Bp TI* und *Bp TI Δhfq* und einer H₂O₂-Konzentration von 5 mM wiederholt, wobei der Fokus auf die ersten 30 min der Exposition lag. Abbildung 37 stellt dies graphisch dar.

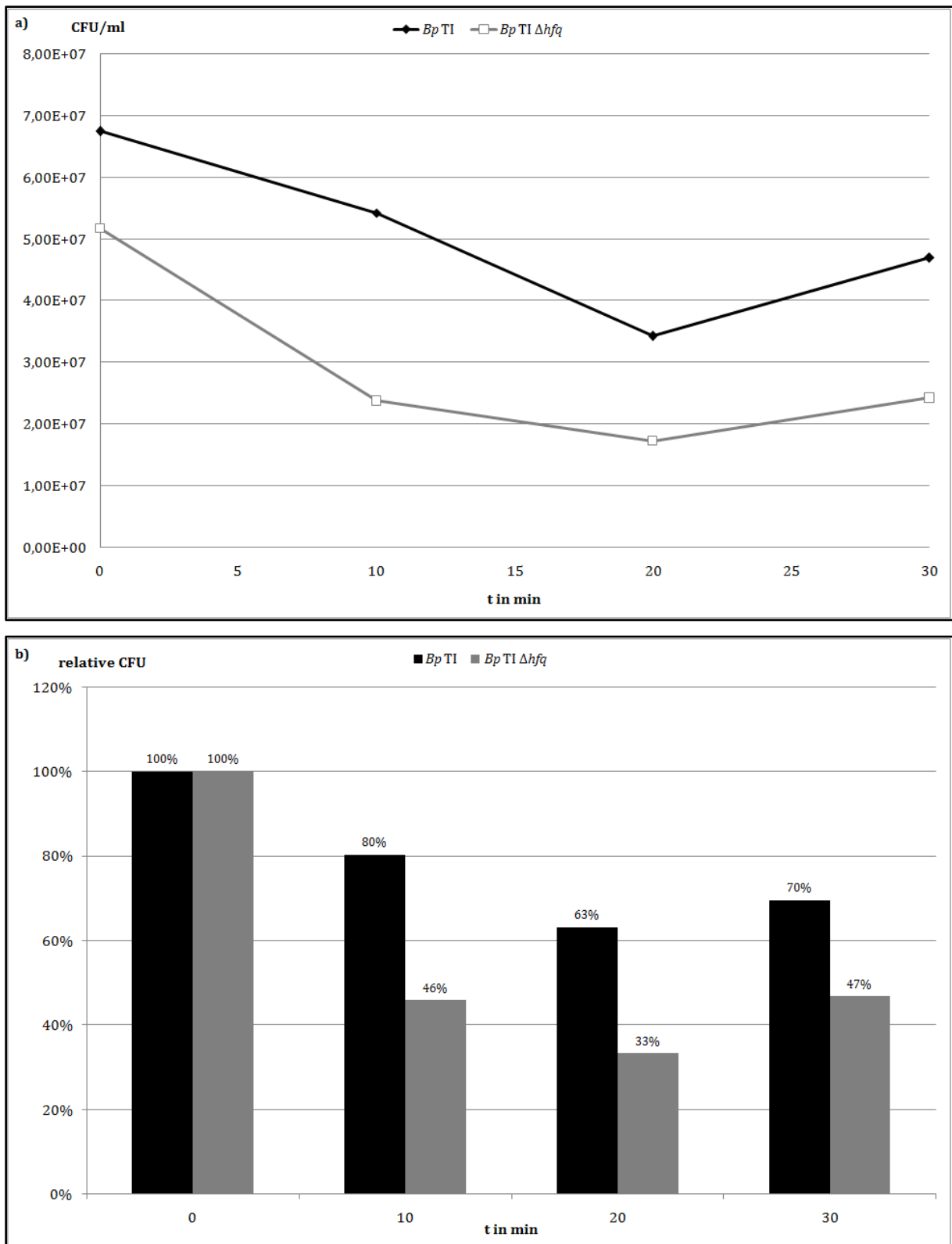


Abb. 37: Graphische Darstellung der CFU von *Bp* TI (schwarze Linie/Balken) und *Bp* TI Δhfq (graue Linie/Balken) nach Exposition mit 5 mM H_2O_2 . Der Stressassay wurde mindestens zweimal unabhängig durchgeführt. Innerhalb eines Assays wurden ausgehend von jedem Ansatz drei Verdünnungsreihen angefertigt und von den einzelnen Verdünnungsstufen die CFU/ml in Doppelbestimmung ermittelt. a) Kurvendiagramm mit Absolutwerten der CFU/ml. b) Balkendiagramm mit Relativwerten der CFU/ml. Dabei wurde die CFU/ml zum Zeitpunkt $t = 0$ min als 100 % gesetzt.

Betrachtet man die graphische Darstellung der Absolutwerte der CFU/ml nach Exposition mit 5 mM H_2O_2 , so scheint diese Konzentration auf *Bp* TI eine weniger starke Inhibition auszuüben als auf *Bp* TI Δhfq (s. Abb. 37a). Dies könnte jedoch mit der höheren Ausgangszellzahl zusammenhängen ($7.00E+07$ im Vergleich zu $5.00E+07$). Deshalb wurden die Daten nochmals ausgewertet und die CFU/ml zum jeweiligen Zeitpunkt in Relation zur Ausgangszellzahl gesetzt (s. Abb. 37b). Hier zeigt sich, dass der Wildtyp zum Zeitpunkt $t = 10$ min noch 80 % der Ausgangszellzahl aufweist und zum Zeitpunkt $t = 20$ min noch 51 %. Bei der Δhfq -Mutante sind es im Vergleich zum Zeitpunkt $t = 10$ min nur 46 %, was zum Zeitpunkt $t = 20$ min auf 33 % der Ausgangszellzahl abfällt. Zum Zeitpunkt $t = 30$ steigen die Relativwerte wieder an, wobei die Δhfq -Mutante mit 47 % jedoch hinter dem Wildtyp mit 70 % zurückbleibt.

Bei *Bb* 7865 wurde zunächst ein Stressassay mit 2.5 mM H_2O_2 durchgeführt, was in Abbildung 38 graphisch dargestellt ist.

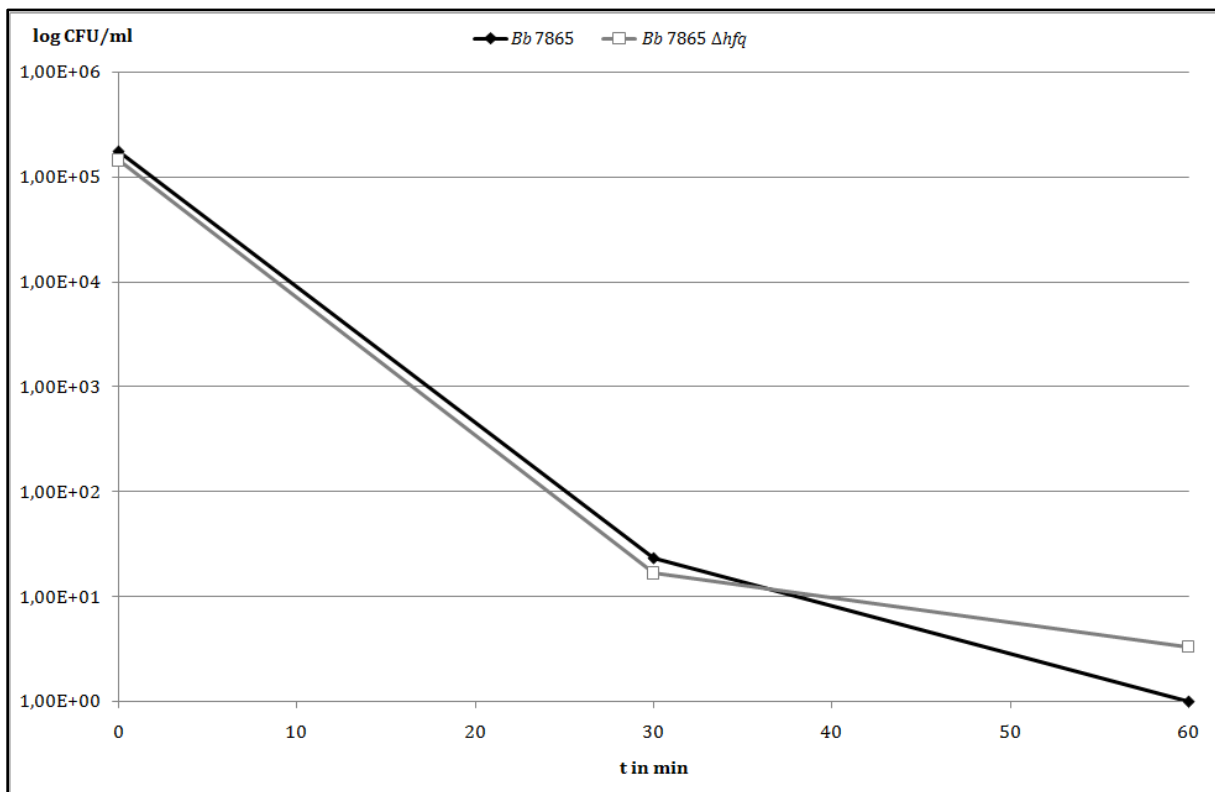


Abb. 38: Graphische Darstellung der CFU von *Bb* 7865 (schwarze Linie) und *Bb* 7865 Δhfq (graue Linie) nach Exposition mit 2.5 mM H_2O_2 . Aufgetragen ist der gemittelte Logarithmus der CFU/ml gegen den Zeitpunkt in min. Der Stressassay wurde mindestens zweimal unabhängig durchgeführt. Innerhalb eines Assays wurden ausgehend von jedem Ansatz drei Verdünnungsreihen angefertigt und von den einzelnen Verdünnungsstufen die CFU/ml in Doppelbestimmung ermittelt.

Wie aus Abbildung 38 ersichtlich wird, gibt es keinen Unterschied in der inhibierenden Wirkung von 2.5 mM H_2O_2 auf *Bb* 7865-Wildtyp und Δhfq -Mutante. Korrespondierend zu *Bp* TI wurde der Versuch nochmals mit 5 mM H_2O_2 wiederholt, wobei hier der Verlauf innerhalb der ersten 30 Minuten überprüft wurde.

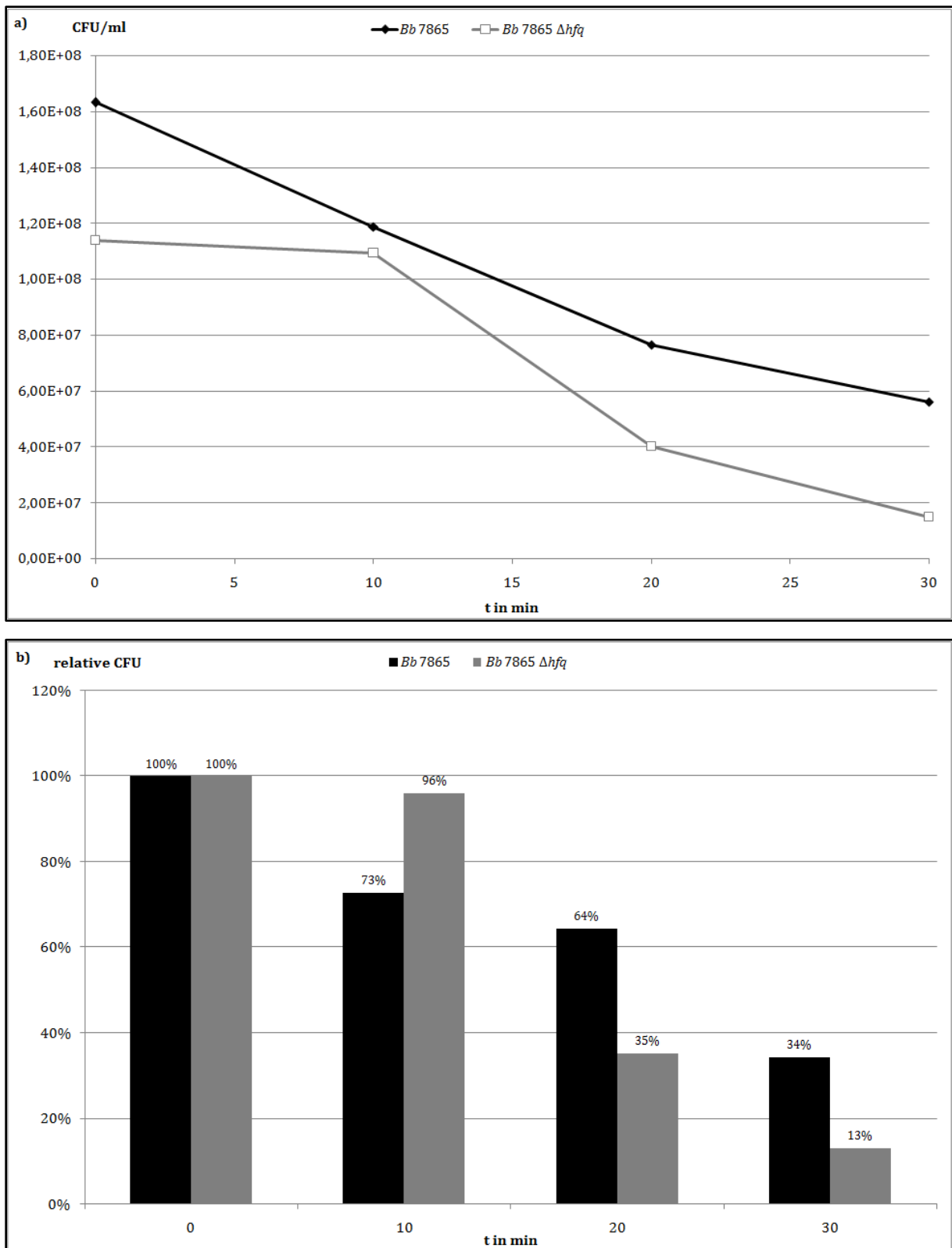
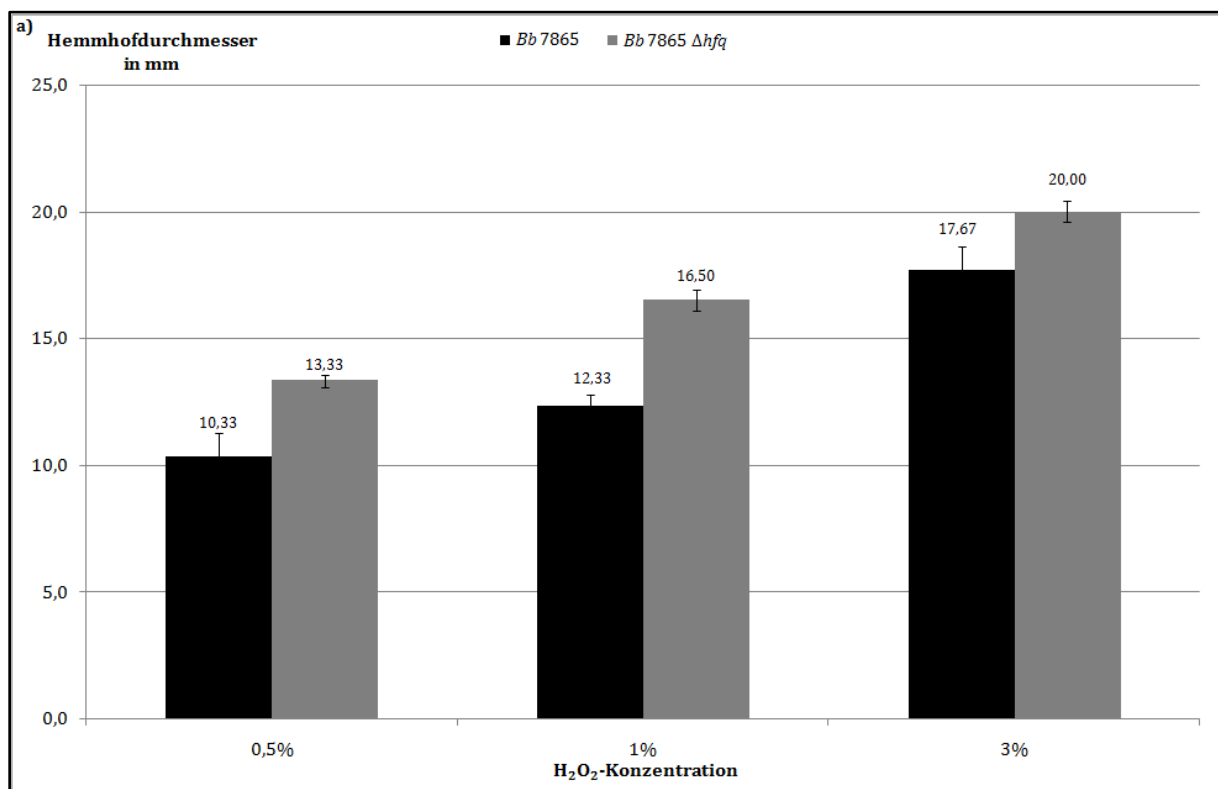


Abb. 39: Graphische Darstellung der CFU von *Bb* 7865 (schwarze Linie/Balken) und *Bb* 7865 Δhfq (graue Linie/Balken) nach Exposition mit 5 mM H_2O_2 . Der Stressassay wurde mindestens zweimal unabhängig durchgeführt. Innerhalb eines Assays wurden ausgehend von jedem Ansatz drei Verdünnungsreihen angefertigt und von den einzelnen Verdünnungsstufen die CFU/ml in Doppelbestimmung ermittelt. a) Kurvendiagramm mit Absolutwerten der CFU/ml. b) Balkendiagramm mit Relativwerten der CFU/ml. Dabei wurde die CFU/ml zum Zeitpunkt $t = 0$ min als 100 % gesetzt.

Anhand der graphischen Darstellung der Absolutwerte der CFU/ml scheint *Bb* 7865 durch die Exposition mit 5 mM H_2O_2 weniger stark inhibiert zu werden als *Bb* 7865 Δhfq (Abb. 39a), was jedoch wieder mit der höheren Ausgangszellzahl zusammenhängen könnte. Setzt man CFU/ml zum jeweiligen Zeitpunkt in Relation zur Ausgangszellzahl, so ergeben sich verlässlichere Daten (s. Abb. 39b). So weist der Wildtyp nach 20 min noch 64 % der Ausgangszellzahl auf, die Δhfq -Mutante nur noch 35 %. Zum Zeitpunkt $t = 30$ min sinkt das Niveau des Wildtyps auf 34 % ab, bei der Δhfq -Mutante auf 13 %. Auffallend ist der 10 min-Wert, bei dem die Δhfq -Mutante scheinbar weniger stark inhibiert wird (96 %) als der Wildtyp (73 %).

Für *Bb* 7865 konnten zusätzlich noch Agar-Diffusions-Assay mit H_2O_2 (0.5 %, 1 % und 3 %) sowie mit Paraquat (0.25 M, 0.5 M und 1 M) durchgeführt werden. Die Wirkungsweise von Paraquat beruht darauf, dass es durch Wechselwirkung mit der Atmungskette zur Produktion von toxischen Hyperoxiden führt. Die Auswertung des Assays erfolgte durch Auftragung des Hemmhofdurchmessers gegen die jeweilige Konzentration des Hemmstoffs und ist in Abbildung 40 dargestellt.



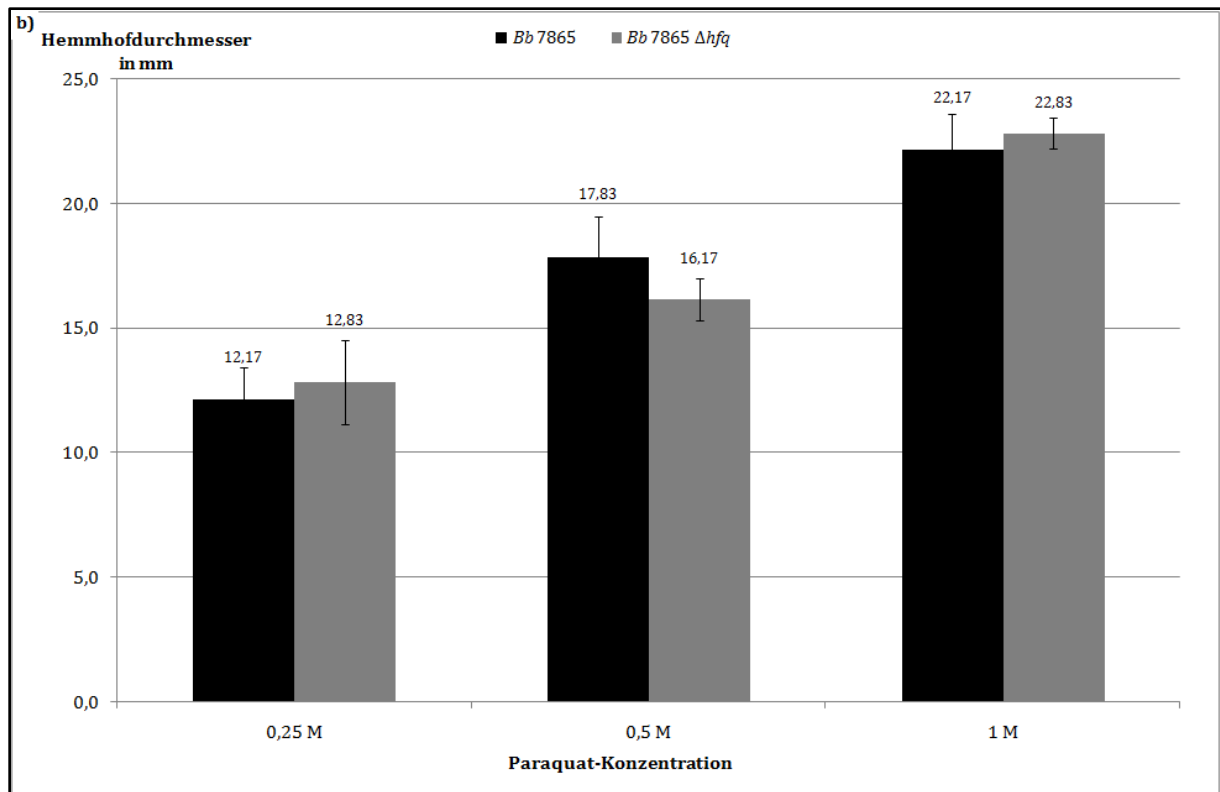


Abb. 40: Graphische Darstellung des Agar-Diffusions-Assays bei *Bb* 7865 (schwarze Balken) und *Bb* 7865 Δhfq (graue Balken). Der Agar-Diffusions-Assay wurde dreimal unabhängig durchgeführt und der jeweilige Hemmhofdurchmesser aus allen drei Assays gemittelt. a) Assay mit H_2O_2 (0.5 %, 1 % und 3 %). b) Assay mit Paraquat (0.25 M, 0.5 M und 1 M). Aufgetragen ist der Hemmhofdurchmesser in mm gegen die jeweilige Konzentration des Hemmstoffs.

Die Auswertung des Agar-Diffusions-Assays mit H_2O_2 ergibt, dass die Δhfq -Mutante bei allen verwendeten Konzentrationen einen größeren Hemmhof zeigt als der Wildtyp *Bb* 7865 (s. Abb. 40a). Der Unterschied beläuft sich dabei auf Werte von 3 mm bei 0.5 % H_2O_2 , 4.2 mm bei 1 % H_2O_2 und 2.3 mm bei 3 % H_2O_2 . Anders verhält es sich im Assay mit Paraquat: hier zeigen *Bb* 7865-Wildtyp und Δhfq -Mutante unter Berücksichtigung der Standardabweichung annähernd gleiche Hemmhofdurchmesser bei den verschiedenen Paraquat-Konzentrationen (s. Abb. 40b).

Für *Bb* 7865, *Bb* 7865 Δhfq und *Bb* 7865 Δhfq comp wurde ferner eine Stresswachstumskurve mit 0.05 % H_2O_2 durchgeführt, wobei die Auswertung über Auftragung der OD_{600nm} gegen die Zeit erfolgt (s. Abb. 41).

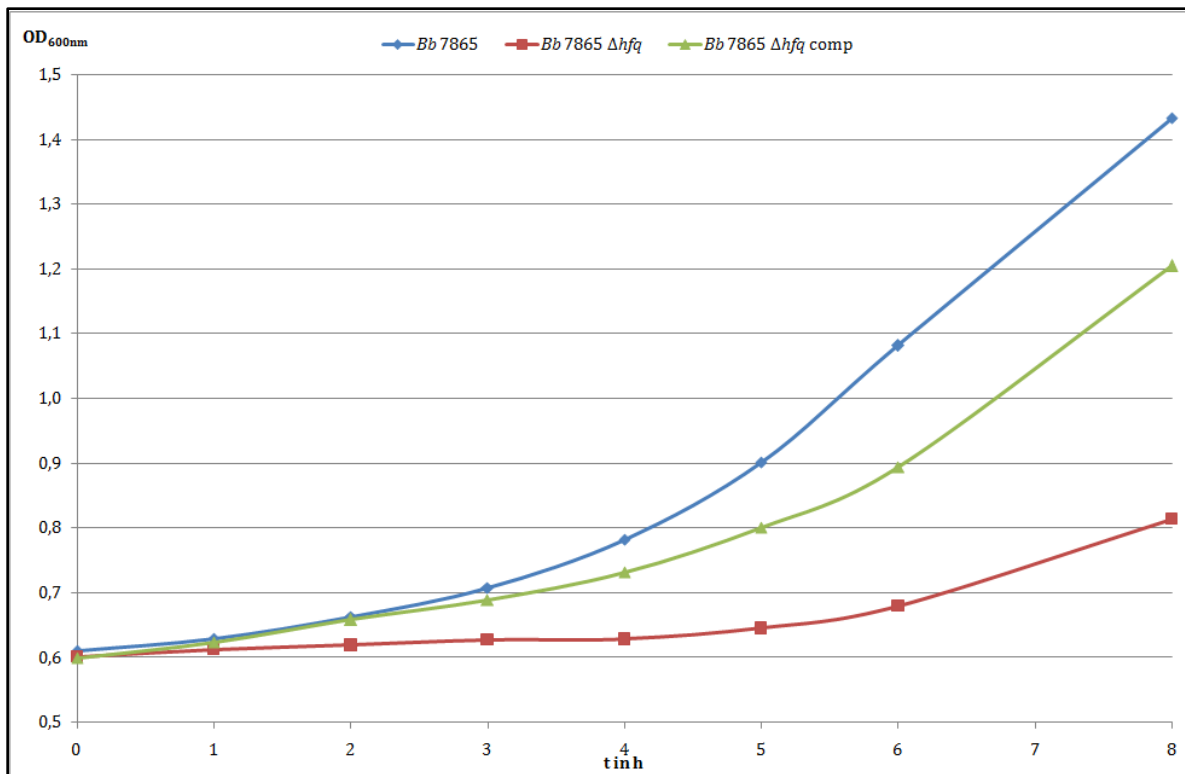


Abb. 41: Stresswachstumskurve von *Bb* 7865 (blau), *Bb* 7865 Δhfq (rot) und *Bb* 7865 Δhfq comp (grün) mit 0.05 % H₂O₂. Aufgetragen ist die OD_{600nm} gegen den Zeitverlauf in Stunden. Die Bestimmung des Stresswachstumsverhaltens wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt, wobei hier nur die Werte einer Wachstumskurve exemplarisch dargestellt sind.

Wie Abbildung 41 zeigt, kommt es nach Stressinduktion mit 0.05 % H₂O₂ bei *Bb* 7865 nach zwei Stunden zu einem merklichen Anstieg im Wachstum. Beim Endpunkt der Messung nach acht Stunden liegt die OD_{600nm} bei 1.4. Im Gegensatz dazu kommt es bei *Bb* 7865 Δhfq erst nach fünf Stunden zu einem marginalen Wachstum. Die Mutante erreicht zum Endpunkt der Messung maximal eine OD_{600nm} von 0.8. Die Komplementante *Bb* 7865 Δhfq comp verhält sich anfangs dem Wildtyp sehr ähnlich, allerdings flacht die Kurve bis zum Ende der Messung etwas ab und der Stamm erreicht maximal eine OD_{600nm} von 1.2. Dies könnte damit zusammenhängen, dass auf Zugabe von Chloramphenicol und damit auf Selektionsdruck zur Aufrechterhaltung des komplementierenden Plasmids verzichtet wurde.

4.2. Membranstress

Neben den oxidativen Stress induzierenden Substanzen H₂O₂ und Paraquat sollte ferner untersucht werden, ob eine differentielle Sensitivität zwischen Wildtyp und Δhfq -Mutante gegenüber Membranstress induzierenden Substanzen besteht. Bei *Bp* Δtox wurden dabei Stressassays mit den Detergenzien SDS und Tween 20 durchgeführt. Bei *Bb* 7865 wurden ein Stressassay und ein Agar-Diffusions-Assay mit SDS durchgeführt.

Für den Stressassay mit SDS bei *Bp Δtox* wurde eine Konzentration von 0.05 % verwendet, während beim Stressassay mit Tween 20 eine Konzentration von 0.01 % Verwendung fand. Die Auswertung beider Stressassays ist graphisch in Abbildung 42 dargestellt.

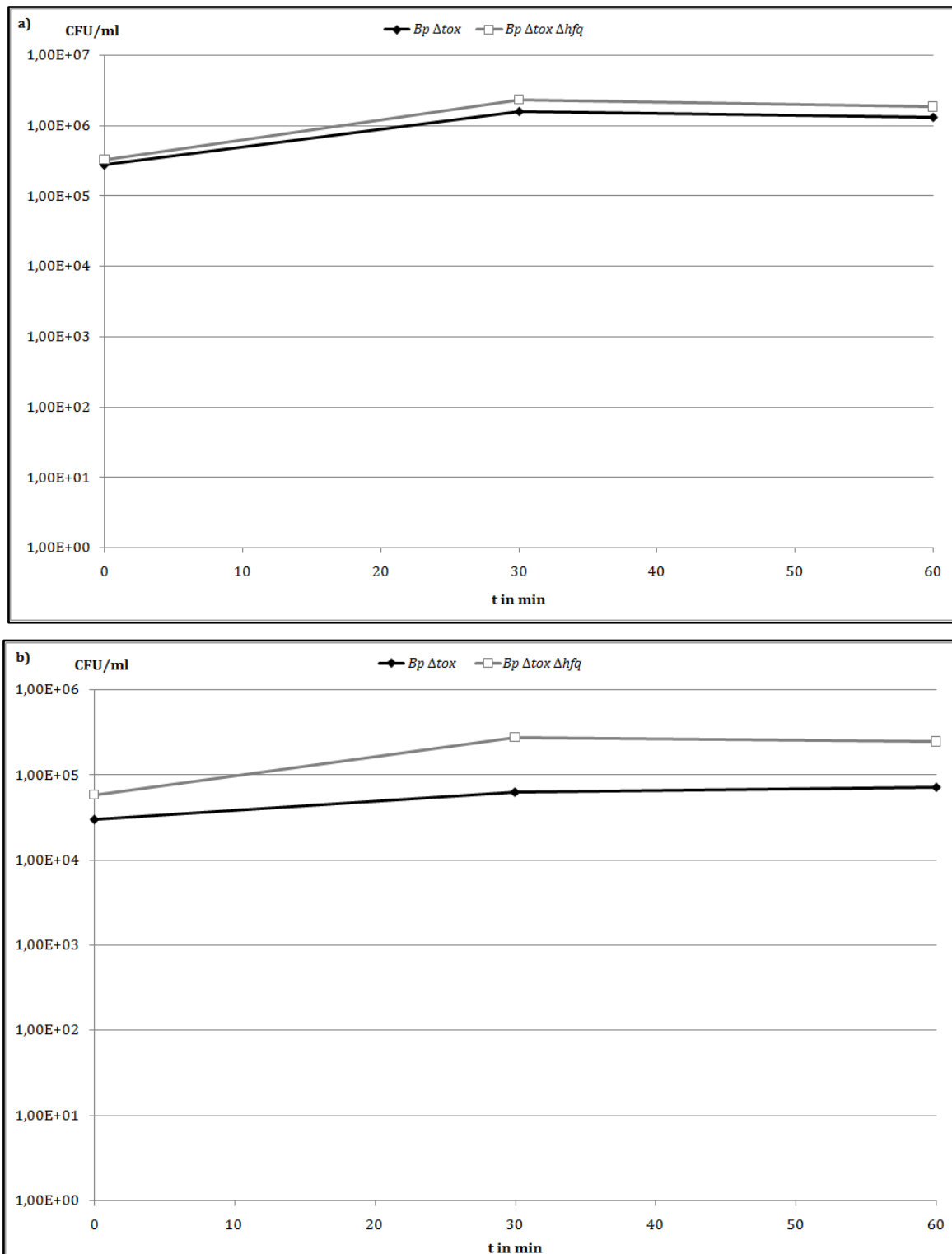


Abb. 42: Graphische Darstellung der CFU von *Bp Δtox* (schwarze Linien) und *Bp Δtox Δhfq* (graue Linien) nach Exposition mit a) 0.05 % SDS und b) 0.01 % Tween 20. Aufgetragen ist der gemittelte Logarithmus der CFU/ml gegen den Zeitpunkt in min. Der Stressassay wurde mindestens zweimal unabhängig durchgeführt. Innerhalb eines Assays wurden ausgehend von jedem Ansatz drei Verdünnungsreihen angefertigt und von den einzelnen Verdünnungsstufen die CFU/ml in Doppelbestimmung ermittelt.

Anhand der Abbildung 42 wird ersichtlich, dass mit der verwendeten Konzentration an SDS und Tween 20 keine inhibierende Wirkung auf die CFU/ml von *Bp Δtox* zu verzeichnen ist. Zudem zeigt die *Δhfq*-Mutante keine größere Sensitivität gegenüber beiden Substanzen im Vergleich zum Wildtyp.

Mit *Bb 7865* und *Bb 7865 Δhfq* wurde zum einen ein Stressassay mit 0.05 % SDS durchgeführt (s. Abb. 43), zum anderen ein Agar-Diffusions-Assay mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen (s. Abb. 43).

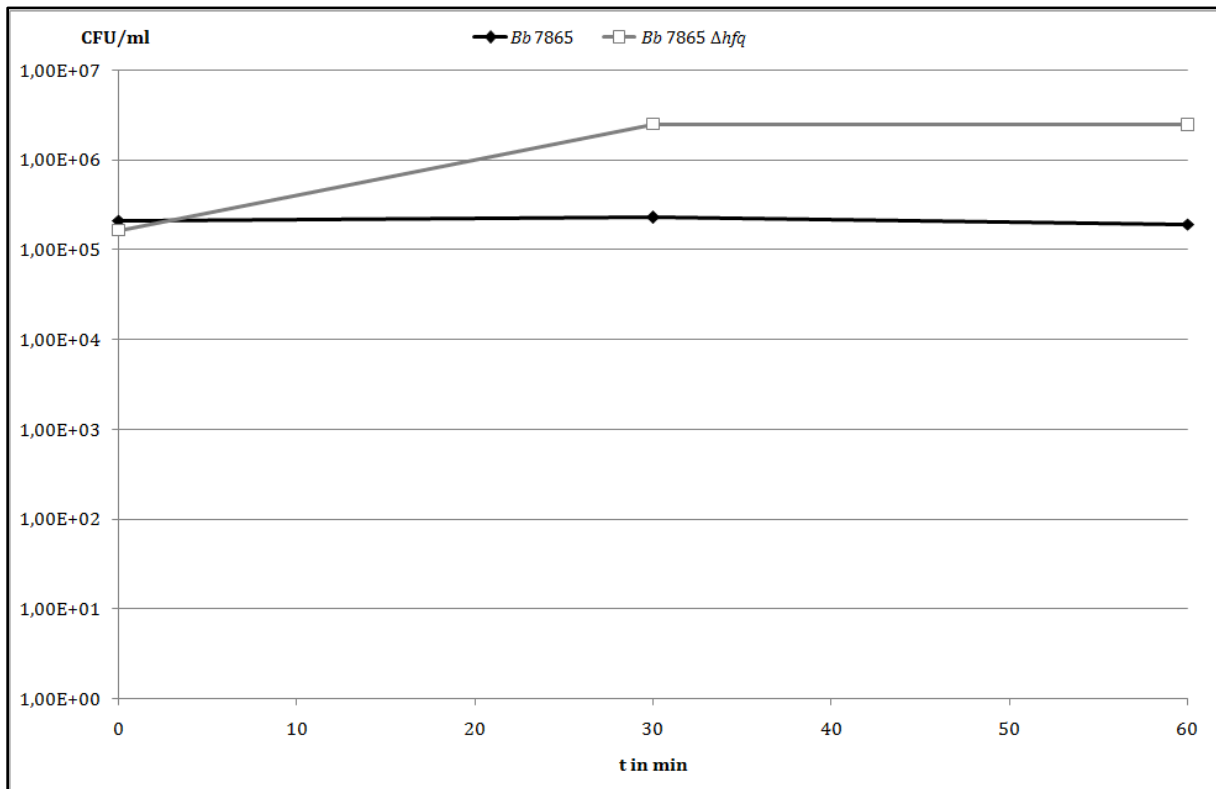


Abb. 43: Graphische Darstellung der CFU von *Bb 7865* (schwarze Linie) und *Bb 7865 Δhfq* (graue Linie) nach Exposition mit 0.05 % SDS. Aufgetragen ist der gemittelte Logarithmus der CFU/ml gegen den Zeitpunkt in min. Der Stressassay wurde mindestens zweimal unabhängig durchgeführt. Innerhalb eines Assays wurden ausgehend von jedem Ansatz drei Verdünnungsreihen angefertigt und von den einzelnen Verdünnungsstufen die CFU/ml in Doppelbestimmung ermittelt.

Wie aus Abbildung 43 ersichtlich wird, übt eine SDS-Konzentration von 0.05 % korrespondierend zum Versuch mit *Bp Δtox* keine inhibitorische Wirkung auf die CFU bei *Bb 7865* aus. Die *Δhfq*-Mutante zeigt eine leicht geringere Sensitivität gegenüber 0.05 % als der Wildtyp.

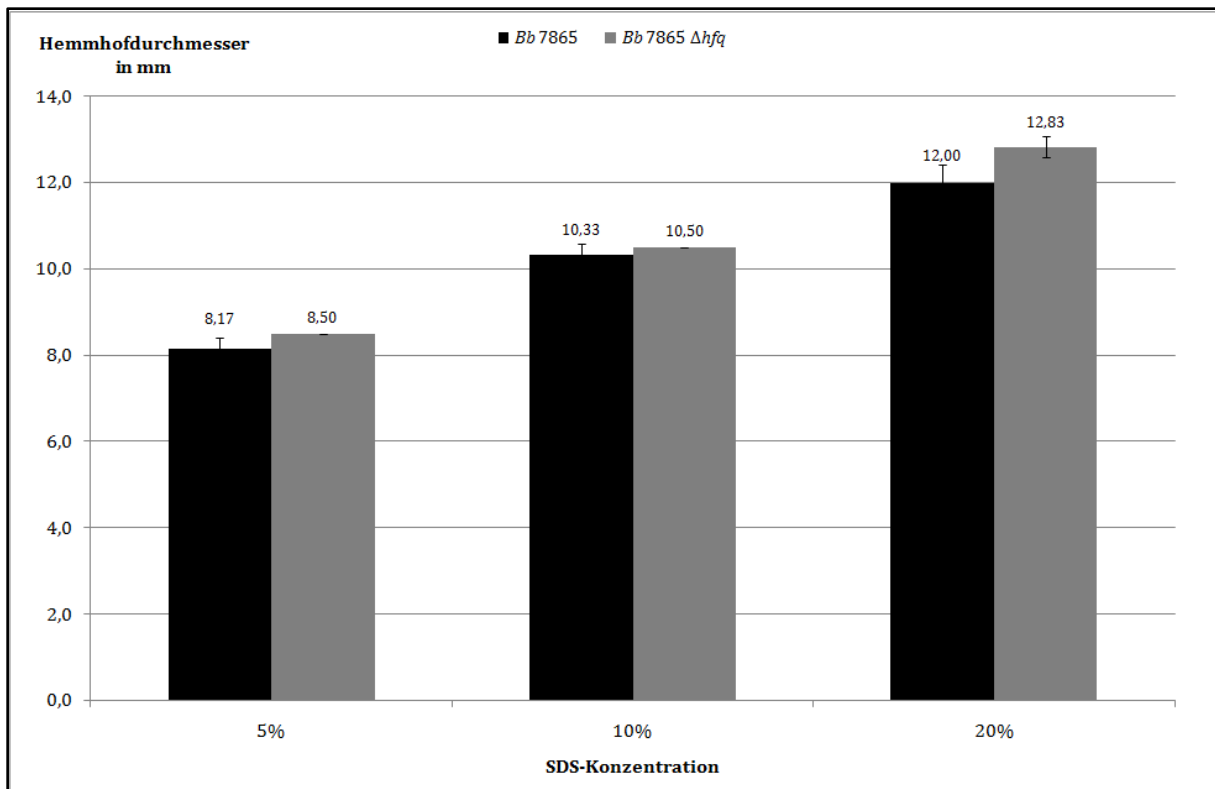


Abb. 44: Graphische Darstellung des Agar-Diffusions-Assays mit SDS bei *Bb* 7865 (schwarze Balken) und *Bb* 7865 Δhfq (blaue Balken). Als SDS-Konzentrationen wurden 5 %, 10 % und 20 % verwendet. Aufgetragen ist der Hemmhofdurchmesser in mm gegen die jeweilige Konzentration des Hemmstoffs. Der Agar-Diffusions-Assay wurde dreimal unabhängig durchgeführt und die jeweiligen Hemmhofdurchmesser aus allen drei Assays gemittelt.

Die Auswertung des Agar-Diffusions-Assays mit 5 %, 10 % und 20 % SDS bei *Bb* 7865 und *Bb* 7865 Δhfq zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied im Hemmhofdurchmesser zwischen Wildtyp und Δhfq -Mutante gibt.

5. Beteiligung des Hfq-Proteins an der Biofilmbildung in *B. pertussis* und *B. bronchiseptica*

Biofilmen wird in den letzten Jahren immer mehr Bedeutung im Lebenszyklus verschiedener Bakterienarten zugeschrieben und sie scheinen die bevorzugte Lebensform der meisten Mikroorganismen in natürlichen Habitaten zu sein (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Ferner konnte im Falle von *P. aeruginosa* gezeigt werden, dass zwischen planktonischer und Biofilm-Lebensweise 1 % differentielle Expression auf Transkriptionsebene, jedoch zwischen 10 % und 40 % auf Proteomebene besteht (Whiteley *et al.*, 2001; Jouenne *et al.*, 2004). Diese Diskrepanz scheint auf post-transkriptionelle und post-translationale Regulationsmechanismen hinzudeuten, an welchen das Hfq-Protein beteiligt sein könnte. In diesem Hinblick schien es interessant zu

untersuchen, ob sich eine Δhfq -Mutation auf die Fähigkeit von *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* auswirkt, Biofilme auszubilden.

5.1. Effekt des Hfq-Proteins auf die Biofilmbildung in *B. pertussis*

Zu diesem Zweck wurde zunächst ein Biofilm-Assay mit *Bp* TI, *Bp* TI Δhfq und *Bp* TI Δhfq comp durchgeführt (s. IV 3.7.). Dafür wurde der jeweilige Stamm zunächst großzügig auf BG-Platten mit jeweiligem Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Bakterienmaterial von der Platte abgenommen und in 1x SS-Medium auf eine OD_{600nm} von 0.1 eingestellt. Je 200 µl des jeweiligen Ansatzes wurden in vier Wells einer 24 Well-Platte mit flachem Boden (Greiner) gegeben, welche bis zum jeweiligen Zeitpunkt bei 37°C inkubiert wurde. Bei den Zeitpunkten t = 36 h und t = 48 h wurde nach 24 h je 200 µl frisches 1x SS-Medium zu den Wells gegeben und diese weiterinkubiert. Anschließend wurde weiter nach Protokoll verfahren und die OD_{540nm} des Überstands in einem ELISA-Reader bestimmt. Die Werte für den jeweiligen Stamm wurden aus den OD_{540nm} der vier Wells gemittelt und gegen den Zeitpunkt graphisch aufgetragen (s. Abb. 45). Ferner erfolgte eine statistische Auswertung auf Signifikanz der OD_{540nm}-Werte.

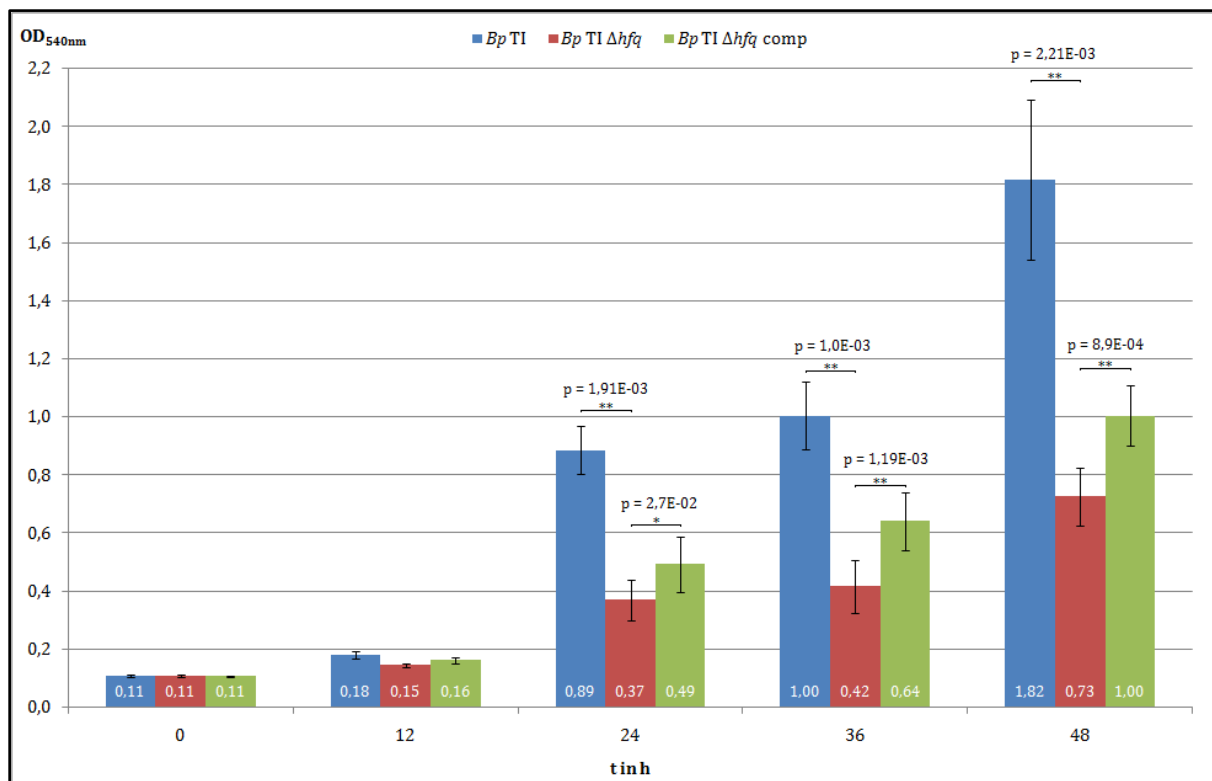


Abb. 45: Ergebnis des Biofilm-Assays von *Bp* TI (blaue Balken), *Bp* TI Δhfq (rote Balken) und *Bp* TI Δhfq comp (grüne Balken). Aufgetragen ist der gemittelte OD_{540nm}-Wert aus vier Wells gegen den Zeitpunkt in Stunden. Signifikante Abweichung zwischen den Stämmen ist mit Stern und zugehörigem p-Wert gekennzeichnet (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Wie aus Abbildung 45 ersichtlich wird, unterscheiden sich die Stämme *Bp* TI, *Bp* TI Δhfq und *Bp* TI Δhfq comp zum Zeitpunkt $t = 12$ h nicht signifikant in ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung. Erst ab einem Zeitpunkt von $t = 24$ h bis zum Endpunktzeitpunkt $t = 48$ h kommt es zu einer signifikant schwächeren Biofilmbildung in der Δhfq -Mutante im Vergleich zum Wildtyp *Bp* TI. Dabei liegt das Niveau der Δhfq -Mutante zur Biofilmbildung bei ca. 40 % in Relation zum Wildtyp *Bp* TI (41.6 % für $t = 24$ h; 42 % für $t = 36$ h; 40.1 % für $t = 48$ h). Dieser Effekt ist in der Komplementante teilweise wiederhergestellt, erreicht jedoch nicht ganz dieselben Werte wie der Wildtyp. Dies liegt vermutlich daran, dass im Laufe des Assays auf die Zugabe von Chloramphenicol und damit auf Selektionsdruck zur Aufrechterhaltung des Plasmids mit dem *hfq*-Gen in der Komplementante verzichtet wurde. Die statistische Auswertung ergab jedoch eine signifikante Reduktion der Biofilmbildung der Δhfq -Mutante in Relation zur Komplementante *Bp* TI Δhfq comp mit einem Niveau von ca. 70 % (75.5 % für $t = 24$ h; 65.6 % für $t = 36$ h; 73 % für $t = 48$ h).

Mishra *et al.* beschrieben 2005, dass *B. pertussis* nicht fähig ist, in Mikrotiterplatten zu wachsen und deshalb kein Biofilm-Assay mittels Kristallviolett durchgeführt werden konnte (Mishra *et al.*, 2005). Der Assay der Autoren beruhte allerdings auf dem Wachstum in 96 Well-Mikrotiterplatten, während der hier angewandte Assay mit 24 Well-Mikrotiterplatten durchgeführt wurde. Wie Abbildung 45 zeigt, ist *B. pertussis* im hier gewählten System in der Lage, in den 24 Well-Platten zu wachsen und einen Biofilm auszubilden, welcher mittels Kristallviolett-basiertem Assay nachgewiesen werden kann.

Bei der Wiederholung des Biofilm-Assays mit *Bp* TI, *Bp* TI Δhfq und *Bp* TI Δhfq comp wurde der Fokus auf die Zeitpunkte $t = 24$ h und $t = 48$ h gerichtet. Dabei wurden jeweils acht Wells mit dem jeweiligen Stamm beimpft. Abbildung 46 zeigt die Auswertung dieses zweiten Assays.

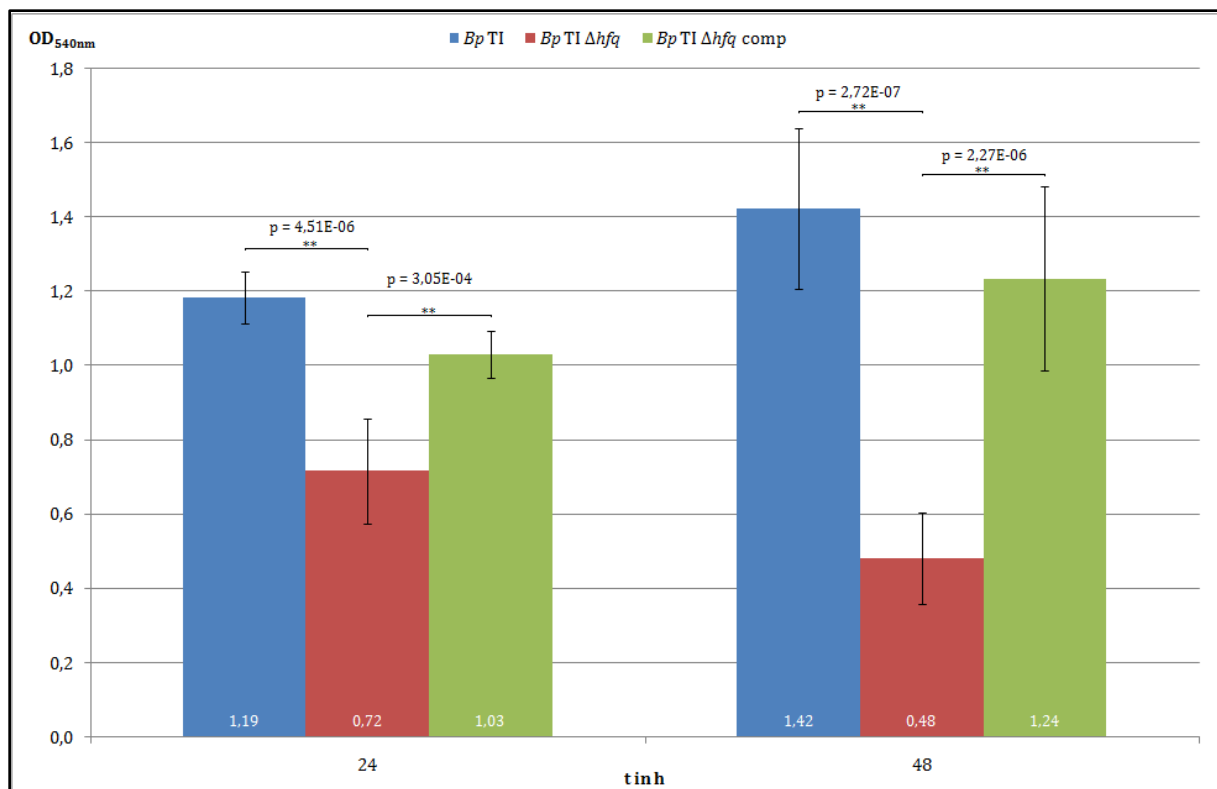


Abb. 46: Ergebnis des Biofilm-Assays von *Bp TI* (blaue Balken), *Bp TI Δhfq* (rote Balken) und *Bp TI Δhfq comp* (grüne Balken). Aufgetragen ist der gemittelte OD_{540nm}-Wert aus acht Wells gegen den Zeitpunkt in Stunden. Signifikante Abweichung zwischen den Stämmen ist mit Stern und zugehörigem p-Wert gekennzeichnet (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$).

Die Auswertung des zweiten Biofilm-Assays bestätigt den Effekt einer Δhfq -Mutation auf die Biofilmbildung. Zum Zeitpunkt $t = 24$ h zeigt die Δhfq -Mutante eine signifikant niedrigere Biofilmbildung im Bereich von 60 % in Relation zum Wildtyp *Bp TI*. Beim Zeitpunkt $t = 48$ h wird dieser Effekt noch deutlicher: hier weist die Δhfq -Mutante nur noch ca. 34 % Biofilmbildung im Vergleich zum Wildtyp auf. Die OD_{540nm}-Werte der Komplementante, die im zweiten Assay auf annähernd demselben Level wie diejenigen des Wildtyps sind und zudem signifikant höher als diejenigen der Δhfq -Mutante, bestätigen, dass die Fähigkeit zur Biofilmbildung in *B. pertussis* nachhaltig vom Vorhandensein des Hfq-Proteins abhängt.

Für *B. pertussis* konnte gezeigt werden, dass die Expression des *bpsABCD*-Lokus (*Bordetella polysaccharide*) wichtig für die Synthese von poly- β -1,6-GlcNAc und die Ausbildung eines Biofilms *in vitro* ist (Conover *et al.*, 2010; s. Einleitung 1.6.3.). Das erste Gen im *bpsABCD*-Lokus *bpsA* ist 1986 bp groß und befindet sich am Locus BP1944 (*hmsH*). Es kodiert für ein 73.8 kDa großes Protein, welches als putatives Hämin-Speicherprotein annotiert ist (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Um zu untersuchen, ob das Hfq-Protein über Regulation des *bpsABCD*-Lokus die Bildung eines Biofilms beeinflusst, wurde die Transkriptionsstärke des *bpsA*-Gens zwischen *Bp TI*-Wildtyp und Δhfq -Mutante mittels quantitativer RT-PCR verglichen. Dazu dienten diejenigen cDNAs als Template, welche bereits

für die Untersuchung des Hfq-Einflusses auf die Transkription der zu den regulierten Spots gehörenden Gene unter stationären Wachstumsbedingungen verwendet worden waren (s. V 3.4.) Dabei wurden ausgehend von jeder cDNA drei Ansätze mit genspezifischen *bpsA*-Primern pro Lauf amplifiziert, während drei Ansätze mit den Primern *rpoB_RT_fw* und *rpoB_RT_rev* bei der Auswertung die Normalisierung gegenüber dem Housekeeping-Gen *rpoB* ermöglichten. Aus den drei technischen Replikaten wurde ein normalisierter ΔC_T -Wert für die jeweilige Transkription gemittelt. Aus den drei unabhängigen Kulturen des *Bp* TI-Wildtyps einerseits und der *Bp* TI Δhfq -Mutante andererseits wurde anschließend ein Mittelwert gebildet und mittels Student's t-test auf Signifikanz untersucht.

Mit einer gemittelten Ratio von ca. 0.9 ergibt sich für die *bpsA*-Transkription kein signifikanter Unterschied zwischen *Bp* TI-Wildtyp und Δhfq -Mutante. Weitere Gene des *bpsABCD*-Lokus wurden nicht hinsichtlich Transkriptionsunterschiede zwischen *Bp* TI-Wildtyp und Δhfq -Mutante untersucht. Aufgrund fehlenden Antiserums konnte zudem nicht untersucht werden, ob es zu Expressionsunterschieden bei den zugehörigen Proteinen zwischen *Bp* TI-Wildtyp und Δhfq -Mutante kommt.

5.2. Effekt des Hfq-Proteins auf die Biofilmbildung in *B. bronchiseptica*

Nachdem für *B. pertussis* gezeigt werden konnte, dass die Fähigkeit zur Ausbildung eines Biofilms von der Expression des Hfq-Proteins abhängig ist, stellte sich die Frage, ob die gleiche Aussage auch für *B. bronchiseptica* zutrifft. Um dies zu untersuchen, wurde auch mit *Bb* 7865, *Bb* 7865 Δhfq und *Bb* 7865 Δhfq comp ein Biofilm-Assay durchgeführt (s. IV 3.7.). Die Durchführung des Assays erfolgte weitestgehend wie unter V 4.1. für *B. pertussis* beschrieben. Unter Berücksichtigung des generell schnelleren Wachstums von *B. bronchiseptica* wurden die Wells jedoch mit einer OD_{600nm} von 0.05 beimpft. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurde weiter nach Protokoll verfahren und die OD_{540nm} des Überstands in einem ELISA-Reader bestimmt. Die Werte für den jeweiligen Stamm wurden aus der OD_{540nm} der vier Wells gemittelt und gegen den Zeitpunkt graphisch aufgetragen (s. Abb. 47). Ferner erfolgte eine statistische Auswertung auf Signifikanz der OD_{540nm} -Werte.

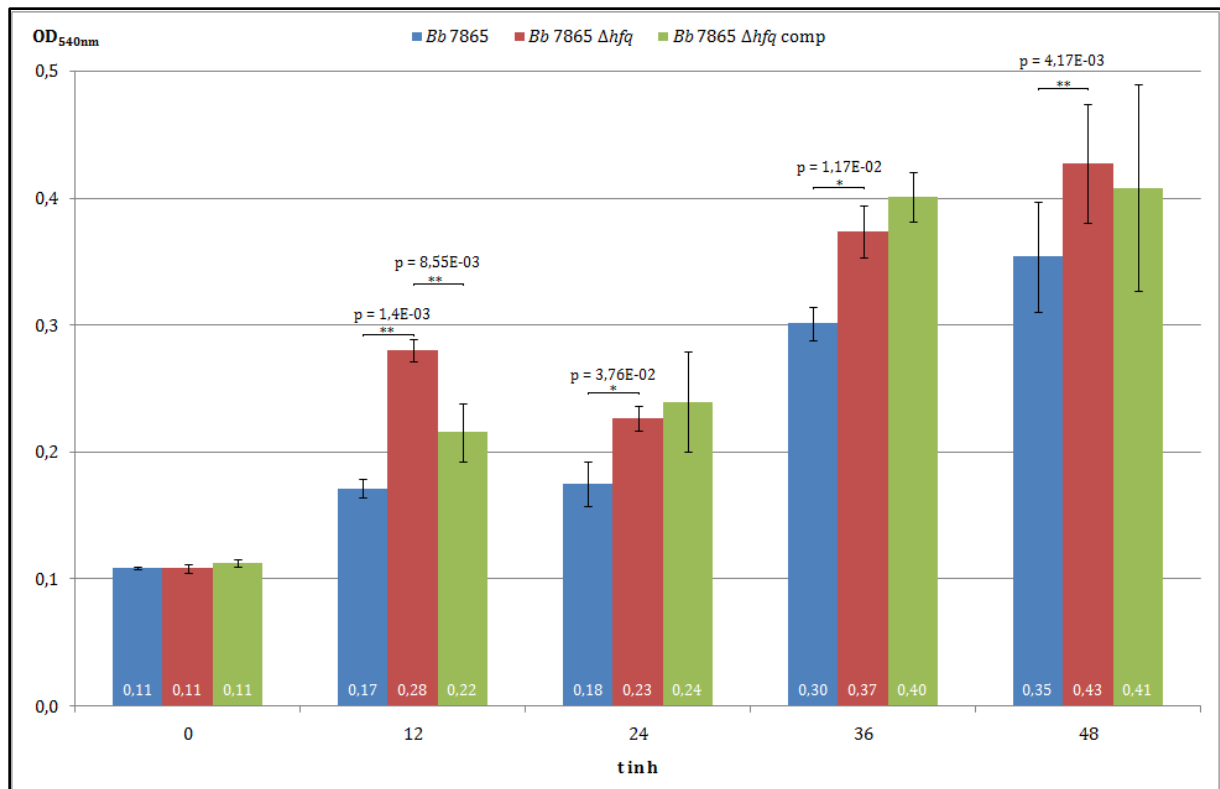


Abb. 47: Ergebnis des Biofilm-Assays von *Bb* 7865 (blaue Balken), *Bb* 7865 Δhfq (rote Balken) und *Bb* 7865 Δhfq comp (grüne Balken). Aufgetragen ist der gemittelte OD_{540nm} -Wert aus vier Wells gegen den Zeitpunkt in Stunden. Signifikante Abweichung zwischen den Stämmen ist mit Stern und zugehörigem p-Wert gekennzeichnet (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$).

Auf den ersten Blick zeigt Abbildung 47, dass die Fähigkeit zur Biofilmbildung in der Δhfq -Mutante größer ist als im Wildtyp *Bb* 7865 und liegt damit im Gegensatz zu der Beobachtung aus *B. pertussis*. Jedoch zeigt die Komplementante *Bb* 7865 Δhfq comp nur beim Zeitpunkt $t = 12$ h einen geringeren Biofilm als die Δhfq -Mutante, bei den restlichen Zeitpunkten ($t = 24$ h, $t = 36$ h, $t = 48$ h) gibt es keinen signifikanten Unterschied. Betrachtet man die Skalierung der OD_{540nm} -Werte, so ist auffällig, dass in dem hier angewandten Biofilm-Assay *B. bronchiseptica* (Werte zwischen 0.1 und 0.4) deutlich weniger Biofilm ausbildet als *B. pertussis* (Werte zwischen 0.1 und 1.8). Dadurch ergeben sich für *Bb* 7865 weniger starke Unterschiede zwischen Wildtyp, Δhfq -Mutante und Komplementante, so dass man aufgrund des ersten Assays davon ausgehen kann, dass bei *B. bronchiseptica* das Hfq-Protein keinen Effekt auf die Biofilmbildung ausübt.

Ein zweiter Biofilm-Assay mit dem Fokus auf die Zeitpunkte $t = 24$ h und $t = 48$ h sollte diese Aussage bestätigen (s. Abb. 48). Bei dem zweiten Assay wurden je 24 Wells mit 200 μ l Kultur des jeweiligen Stamms mit einer OD_{600nm} von 0.1 beimpft und zum jeweiligen Zeitpunkt der Biofilm-Assay durchgeführt (s. IV 3.7.). In Abbildung 51 ist der gemittelte Wert aus den gemessenen OD_{540nm} -Werten gegen den Zeitpunkt aufgetragen.

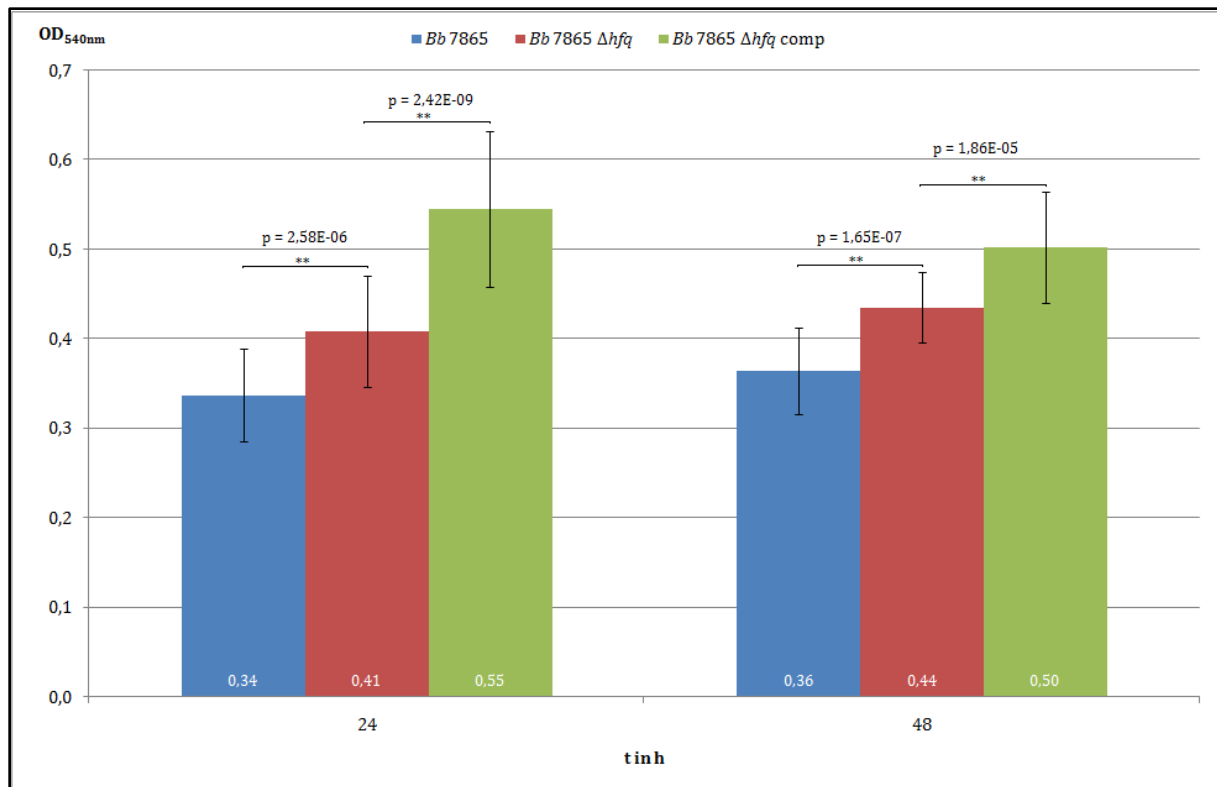


Abb. 48: Ergebnis des Biofilm-Assays von *Bb* 7865 (blaue Balken), *Bb* 7865 Δhfq (rote Balken) und *Bb* 7865 Δhfq comp (grüne Balken). Aufgetragen ist der gemittelte OD_{540nm}-Wert aus 24 Wells gegen den Zeitpunkt in Stunden. Signifikante Abweichung zwischen den Stämmen ist mit Stern und zugehörigem p-Wert gekennzeichnet (* = p < 0.05; ** = p < 0.01).

Der zweite Biofilm-Assay mit *Bb* 7865, *Bb* 7865 Δhfq und *Bb* 7865 Δhfq comp zeigt ein ähnliches Bild wie der erste Assay. Der Wildtyp *Bb* 7865 zeigt eine geringfügig schwächere Fähigkeit zur Ausbildung eines Biofilms als die Δhfq -Mutante (ca. 83 % bei t = 24 h und ca. 82 % bei t = 48 h). Diese Daten sind statistisch signifikant. Die Komplementante bildet scheinbar mehr Biofilm aus als der Wildtyp und die Δhfq -Mutante (ca. 162 % bzw. 134 % bei t = 24 h und ca. 139 % bzw. 114 % bei t = 48 h).

Es ist wiederum auffällig, dass in dem verwendeten System *B. bronchiseptica* deutlich weniger Biofilm ausbildet als *B. pertussis*, obwohl im zweiten Biofilm-Assay die gleiche OD_{600nm} von 0.1 zum Beimpfen der Wells verwendet wurde. Zudem kommt es zwischen dem 24 h-Wert und dem 48 h-Wert kaum zu einer Steigerung der Biofilmbildung in den einzelnen Kulturen. Dass die nah verwandten Arten *B. bronchiseptica* und *B. pertussis* trotz gleicher Behandlung im hier gewählten System unterschiedliche Fähigkeit zur Biofilmbildung aufweisen, deutet daraufhin, dass das hier gewählte System nicht optimal für *B. bronchiseptica* ist und evtl. noch modifiziert werden müsste. Nichtsdestotrotz zeigt die Δhfq -Mutante keine schwächere Biofilmbildung als der Wildtyp und liegt damit eindeutig im Gegensatz zur Beobachtung aus *B. pertussis*.

6. Einfluss von Hfq auf die Expression von Virulenzfaktoren in *B. pertussis*

Bei *B. pertussis* handelt es sich um ein humanpathogenes Bakterium, das zahlreiche Virulenzfaktoren exprimiert, welche primär die Infektion des Wirts und sekundär das Überleben im Wirt ermöglichen (s. II 1.4.). Für eine Vielzahl an Mikroorganismen ist bekannt, dass Δhfq -Mutanten stark attenuierte Virulenzphänotypen aufweisen (s. II 3.4.). In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob in *B. pertussis* die Expression diverser Virulenzfaktoren vom Hfq-Protein abhängt.

Zur Untersuchung der Expressionsstärke der einzelnen Virulenzfaktoren wurden die Stämme *Bp* TI, *Bp* TI Δhfq , *Bp* TI Δhfq comp, *Bp* 347 und *Bp* 359 zunächst großzügig auf BG-Platten mit jeweiligem Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Bakterienmaterial von der Platte abgenommen und in 1x PBS auf eine definierte OD_{600nm} von 1.0 eingestellt. Je 1 ml der Kulturen wurde für 3 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert, das Pellet in 100 μ l 1x Lämmli-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration der jeweiligen Probe wurden je 10 μ g Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt (s. IV 2.3.). Anschließend erfolgte die spezifische Detektion des jeweiligen Virulenzfaktors mittels Immunoblot (s. IV 2.4.).

BvgA aktiviert als Response Regulator des Bvg-Zwei-Komponentensystems die Expression beinahe aller Virulenzfaktoren in *B. pertussis* (s. II 1.4.3.). Abbildung 49 zeigt das Ergebnis des Immunoblots zur Expression des BvgA-Proteins in *Bp* TI, *Bp* TI Δhfq , *Bp* TI Δhfq comp, *Bp* 347 und *Bp* 359.

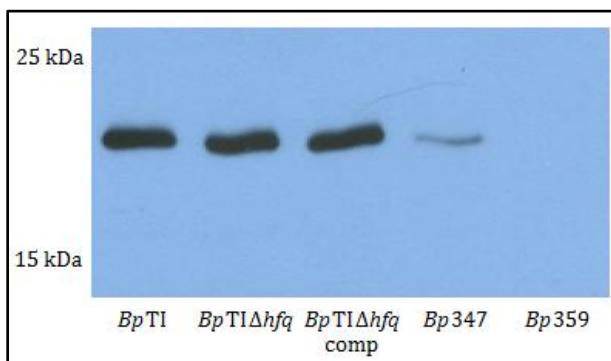


Abb. 49: Nachweis der BvgA-Expression in *Bp* TI, *Bp* TI Δhfq , *Bp* TI Δhfq comp, *Bp* 347 und *Bp* 359 durch Immunoblot.

Wie aus Abbildung 49 ersichtlich wird, gibt es keinen deutlichen Unterschied in der Expression des 23 kDa-großen BvgA-Proteins zwischen *Bp* TI und *Bp* TI Δhfq . Auch die Komplementante *Bp* TI Δhfq comp zeigt die gleiche BvgA-Expression wie Wildtyp und Δhfq -Mutante. *Bp* 347 und *Bp* 359 wurden beim Immunoblot als Kontrollen mitgeführt. Dabei zeigt *Bp* 347, die $\Delta bvgS$ -Mutante von *Bp* TI, eine sehr schwache BvgA-Expression, während bei *Bp* 359, die $\Delta bvgA$ -Mutante von *Bp* TI, erwartungsgemäß keine BvgA-Expression nachzuweisen ist.

Schon geringe Veränderungen in der Konzentration des Response Regulators können sich nachhaltig auf die Expression der regulierten Gene auswirken. Deswegen sollte auch untersucht werden, ob die Expression der BvgA-abhängigen Proteine PTX und PRN durch Hfq modifiziert wird. Diese beiden Proteine wurden deshalb ausgewählt, da hierfür primäre Antiseren vorhanden waren. Abbildung 50 zeigt das Ergebnis des Immunoblots zur PTX-Expression, während Abbildung 51 die PRN-Expression in *Bp TI*, *Bp TI Δhfq*, *Bp TI Δhfq comp*, *Bp 347* und *Bp 359* darstellt.

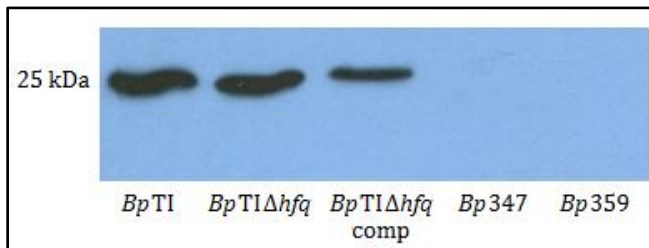


Abb. 50: Nachweis der PTX-Expression in *Bp TI*, *Bp TI Δhfq*, *Bp TI Δhfq comp*, *Bp 347* und *Bp 359* durch Immunoblot.

Abbildung 50 zeigt, dass es keinen deutlichen Unterschied in der Expression des PTX-Proteins zwischen *Bp TI* und *Bp TI Δhfq* gibt. Die Komplementante *Bp TI Δhfq comp* zeigt eine geringfügig schwächere Bande in der PTX-Expression. *Bp 347* und *Bp 359*, die $\Delta bvgS$ -Mutante bzw. die $\Delta bvgA$ -Mutante von *Bp TI*, fungieren wiederum als Kontrollen und zeigen erwartungsgemäß keine PTX-Expression.

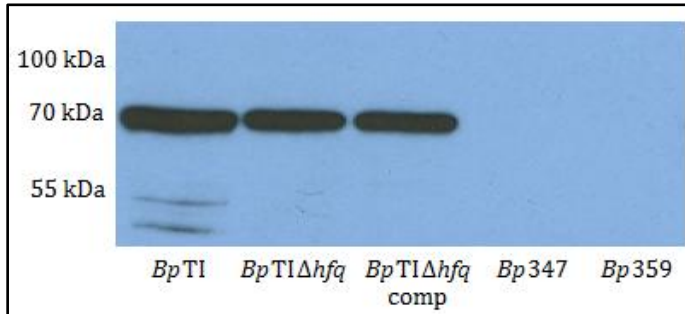


Abb. 51: Nachweis der PRN-Expression in *Bp TI*, *Bp TI Δhfq*, *Bp TI Δhfq comp*, *Bp 347* und *Bp 359* durch Immunoblot.

Ähnlich zur BvgA- und PTX-Expression gibt es auch in der PRN-Expression keinen Unterschied zwischen *Bp TI* und *Bp TI Δhfq*, wie aus Abbildung 51 ersichtlich wird. Die Komplementante zeigt wiederum die gleiche PRN-Expression wie Wildtyp und Δhfq -Mutante. In *Bp 347* und *Bp 359* ist gemäß ihrer Kontrollfunktion keine PRN-Expression nachzuweisen.

Zudem wurde bei ausgewählten Virulenzfaktoren und dem BvgA-Response Regulator mittels quantitativer RT-PCR untersucht, ob es zu Unterschieden in der Transkriptionsstärke zwischen *Bp TI*-Wildtyp und Δhfq -Mutante kommt. Dazu dienten wiederum diejenigen cDNAs als Template, welche bereits für die Transkriptionsstudien von Hfq-regulierten Spots unter stationären Wachstumsbedingungen verwendet worden waren (s. V 3.4.). Die Ratio der relativen Expression ($\Delta\Delta C_T$ -Wert) wurde graphisch in Microsoft Excel dargestellt (Abb. 52).

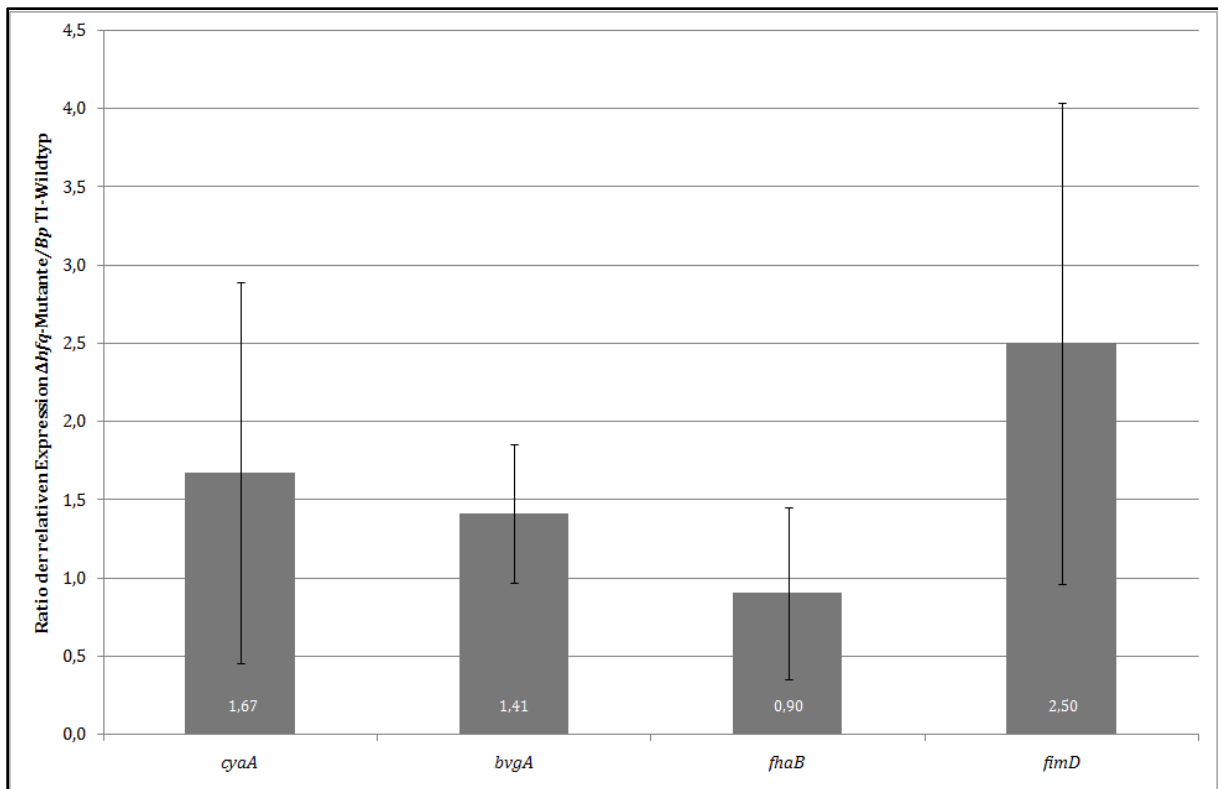


Abb. 52: Ergebnis der qRT-PCR zur Transkription der Virulenzfaktoren *cyoA*, *bvgA*, *fhaB* und *fimD*. Aufgetragen ist das Verhältnis der jeweiligen Transkription zwischen Δhfq -Mutante und *Bp* TI-Wildtyp. Dabei wurde der Mittelwert aus drei unabhängigen Kulturen gebildet und die Standardabweichung bestimmt.

Mit gemittelten Quotienten zwischen 0.9 und 1.7 ergeben sich für die Gene *cyoA*, *bvgA* und *fhaB* keine signifikanten Transkriptionsunterschiede zwischen *Bp* TI-Wildtyp und der Δhfq -Mutante. Das Gen *fimD* scheint mit einer Ratio von 2.5 in der Δhfq -Mutante leicht stärker transkribiert zu werden, jedoch ist dieser Wert nicht statistisch signifikant.

7. Charakterisierung einer putativen sRNA im intergenischen Bereich zwischen *bvgAS* und *fhaB* in *B. pertussis*

Promotorstudien des *bvgAS*-Lokus in *B. pertussis* ergaben, dass die *bvgAS*-Transkription von drei verschiedenen Promotoren, welche sich im intergenischen Bereich zwischen dem *fhaB*-Gen und dem *bvgAS*-Lokus befinden, starten kann (Scarlato *et al.*, 1990). Abbildung 53 stellt diesen Bereich mit den zugehörigen Promotoren schematisch dar. Der $P3_{bvgAS}$ -Promotor befindet sich ca. 250 bp stromaufwärts vom *BvgA*-Startcodon und wird *BvgA*-abhängig aktiviert. Der $P1_{bvgAS}$ -Promotor liegt ca. 90 bp stromaufwärts vom *BvgA*-Startcodon und wird ebenfalls *BvgA*-abhängig aktiviert. Der konstitutiv aktive $P2_{bvgAS}$ -Promotor, welcher sich ca. 140 bp stromaufwärts vom *BvgA*-Startcodon befindet, stellt eine Grundexpression an *BvgA*-Protein sicher.

Das *fhaB*-Gen wird in Gegenrichtung zum *bvgAS*-Lokus ausgehend von einem Promotor (P_{fhaB}) abgelesen, welcher sich ca. 70 bp stromaufwärts vom FhaB-Startcodon liegt.

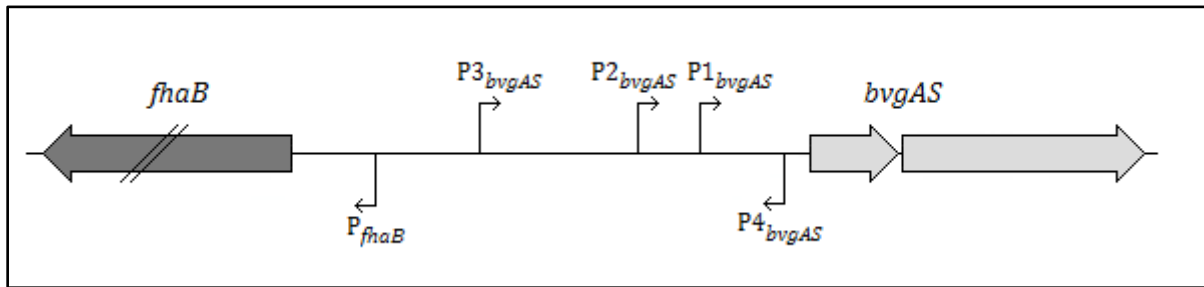


Abb. 53: Schematische Darstellung des intergenischen Bereichs zwischen dem *bvgAS*-Lokus und dem *fhaB*-Gen in *B. pertussis*. Eingezeichnet sind drei Promotoren, von denen die Transkription des *bvgAS*-Lokus erfolgt ($P1_{bvgAS}$, $P2_{bvgAS}$ und $P3_{bvgAS}$) sowie der Promotor, von dem ausgehend das *fhaB*-Gen transkribiert wird (P_{fhaB}). Der Promotor $P4_{bvgAS}$ liegt komplementär zu den *bvgAS*-Promotoren auf dem Gegenstrang.

Bei den Promotorstudien wurde mittels S1-Nuclease-Assay die Aktivität eines vierten Promotors ($P4_{bvgAS}$) nachgewiesen, welcher komplementär zu den drei *bvgAS*-Promotoren auf dem Gegenstrang ca. 20 bp stromaufwärts vom BvgA-Startcodon liegt. Dieser Promotor erwies sich zudem als BvgA-abhängig. Die Autoren stellten damals die Hypothese auf, dass ein vom $P4_{bvgAS}$ -Promotor ausgehendes Transkript perfekte Komplementarität gegenüber den untranslatierten Leader-Sequenzen der *bvgAS*-Transkripte, welche von $P1_{bvgAS}$, $P2_{bvgAS}$ und $P3_{bvgAS}$ synthetisiert werden, aufweist. Somit könnte das als antisense RNA wirkende $P4$ -Transkript die Interaktion der *bvgAS*-mRNA mit den Ribosomen fördern und damit als positiv regulatorische sRNA fungieren. Dies würde auch die Diskrepanz zwischen dem dreifachen Anstieg an *bvgA*-mRNA und dem 50fachen Anstieg an BvgA-Protein unter induzierenden Bedingungen erklären (Scarlato *et al.*, 1990).

7.1. Nachweis und Transkriptionsstartpunkt der $P4$ -sRNA

Um die Existenz des $P4$ -Transkripts, das putativ als antisense sRNA gegenüber der 5'UTR der *bvgAS*-mRNA fungieren könnte, zu bestätigen und dessen Transkriptionsstartpunkt zu ermitteln, wurde zunächst eine Primer Extension-Analyse durchgeführt. Als Template für die parallel zur Primer Extension laufende Sequenzierung wurde der Vektor pSK+ $P4_{Bp}$ generiert. Dafür wurde in einer präparativen PCR mit der Primerkombination $P4_{5'}$ _KpnI/ $P4_{3'}$ _HindIII ein ca. 510 bp großer Bereich amplifiziert, welcher ca. 340 bp stromaufwärts und ca. 170 bp stromabwärts vom postulierten $P4$ -Transkriptionsstartpunkt liegt. Dieses Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *HindIII* verdaut und mit dem *KpnI*/*HindIII*-verdauten Vektor pSK ligiert. Die Transformation erfolgte in *E. coli* DH5 α , die Selektion auf LB-Platten + Amp. Erhaltene Klone wurden mittels analytischer PCR mit der Primerkombination Blue T7/Blue T3 auf die

erfolgreiche Insertion des P4-Bereichs getestet. Von einem positiven Klon wurde die Plasmid-DNA isoliert und als Template für die Sequenzierungsreaktion (s. IV 1.13.1) mit dem Primer P4_PE_Primer2 verwendet. Für die Primer Extension-Reaktion wurde eine Kultur von *Bp* TI bis zu einer OD_{600nm} von 0.6 angezogen und aus dieser RNA isoliert (s. IV 1.10.1). 30 μ g der RNA wurden mit radioaktiv markierten P4_PE_Primer2 in cDNA umgeschrieben und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. IV 1.13.2.-4.). Abbildung 54 zeigt einen Ausschnitt aus dem nach der Exposition mit dem Primer Extension-Gel entwickelten Röntgenfilm.

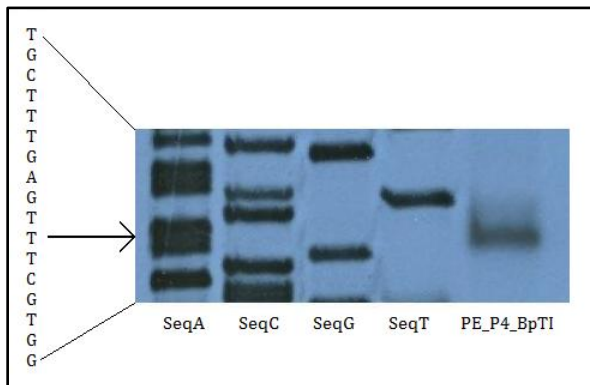


Abb. 54: Primer Extension-Analyse zur Identifizierung des P4-Transkriptionsstartpunkts in *B. pertussis*. SeqA, SeqC, SeqG und SeqT sind Sequenzierungsreaktionen mit ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP und dem Vektor pSK+P4_{Bp} als Template, aus welchen die links im Bild ersichtliche Sequenzfolge abzulesen ist. PE_P4_BpTI bezeichnet die RNA aus *Bp* TI (OD_{600nm} 0.6), die mit dem radioaktiv gelabelten Primer P4_PE_Primer2 in cDNA umgeschrieben wurde. Der schwarze Pfeil markiert den ermittelten Transkriptionsstartpunkt mit dem dazugehörigen Nukleotid.

Anhand des Laufverhaltens der mit dem radioaktiv markierten P4_PE_Primer2 in cDNA umgeschriebenen Gesamt-RNA von *Bp* TI aus der logarithmischen Phase im Vergleich zu den Sequenzierungsreaktionen mit ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP ergibt sich der in Abbildung 54 mit einem schwarzen Pfeil markierte Startpunkt des P4-Transkripts. In Abbildung 55 ist die Lage des Transkriptionsstartpunkts der putativen P4-sRNA relativ zum Translationsstart des BvgA-Proteins schematisch dargestellt.

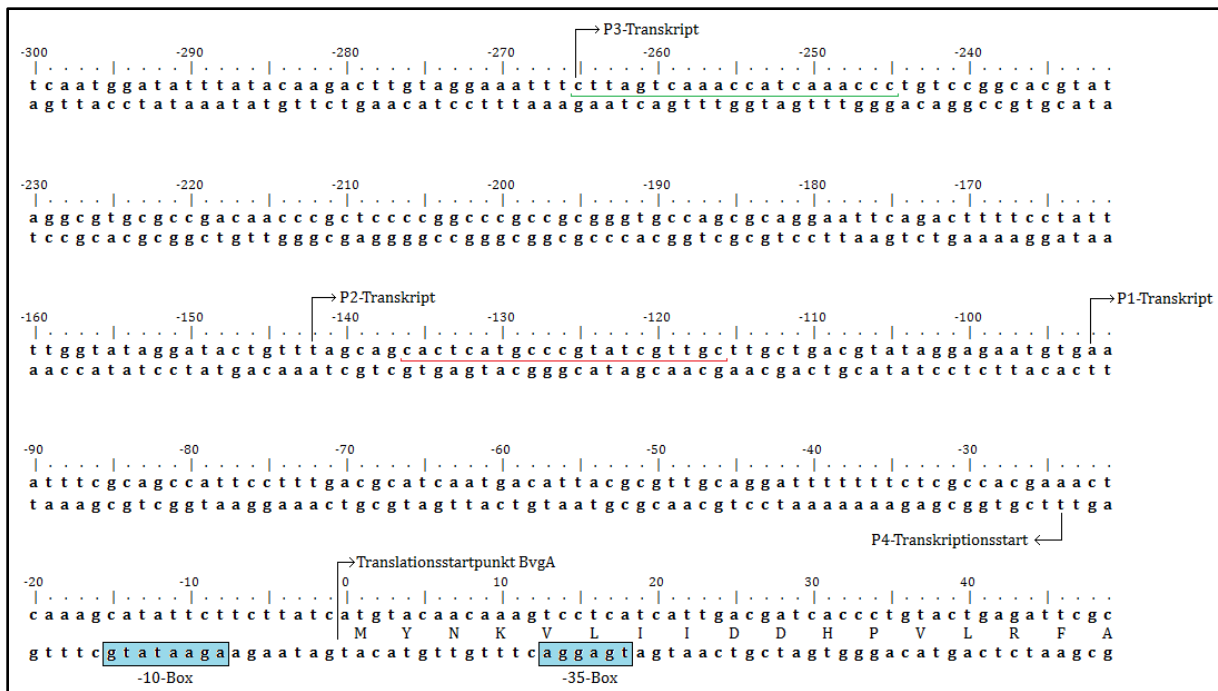


Abb. 55: DNA-Sequenz des *bvgA*-Gens mit 200 bp stromaufwärts liegenden Nukleotiden. Mit Pfeilen markiert sind der Translationsstartpunkt (Position 0) des BvgA-Proteins mit der zugehörigen Proteinsequenz, die Transkriptionsstartpunkte der *bvgA*-mRNA ausgehend vom P1-Promotor (P1-Transkript an Position -92), vom P2-Promotor (P2-Transkript an Position -142), vom P3-Promotor (P3-Transkript an Position -265) sowie der experimentell durch die Primer Extension-Analyse ermittelte Transkriptionsstartpunkt des P4-Transkripts (Position -24). Die blau hinterlegten Kästchen stellen die -10- und -35-Box des P4-Promotors dar. Rot unterlegt ist die Sequenz des für die Primer Extension verwendeten Primers P4_PE_Primer2. Grün unterlegt ist die Sequenz des für eine weitere Primer Extension verwendeten Primers P4_PE_Primer5.

Wie durch die Primer Extension-Analyse ermittelt wurde, beginnt das P4-Transkript an Position -24 relativ zum BvgA-Startcodon. Dies führt dazu, dass das P4-Transkript nicht direkt komplementär zu der Shine-Dalgarno-Sequenz der *bvgA*-mRNA ist und somit nicht inhibierend auf die Translation des BvgA-Proteins wirken sollte. Die Länge der P4-sRNA konnte leider experimentell weder über Northern Blot-Analyse noch über 3'RACE bestimmt werden. In einer zweiten Primer Extension-Analyse mit dem Primer P4_PE_Primer5 ergab sich ein größeres P4-Produkt mit dem bereits ermittelten Transkriptionsstartpunkt (Daten nicht gezeigt). Anhand der Position des verwendeten Primers P4_PE_Primer5 gegenüber dem P4-Transkriptionsstartpunkt (grün unterlegt in Abb. 55), kann man davon ausgehen, dass die P4-sRNA eine Länge von mindestens 242 Nukleotiden aufweist. Daraus folgt auch, dass die P4-sRNA zu allen *bvgA*-mRNA-Transkripten ausgehend von den drei Promotoren ($P1_{bvgAS}$, $P2_{bvgAS}$ und $P3_{bvgAS}$) komplementär ist.

Die Sekundärstruktur dieses 242 bp großen P4-Transkripts wurde mittels RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) berechnet und ist in Abbildung 56 dargestellt.

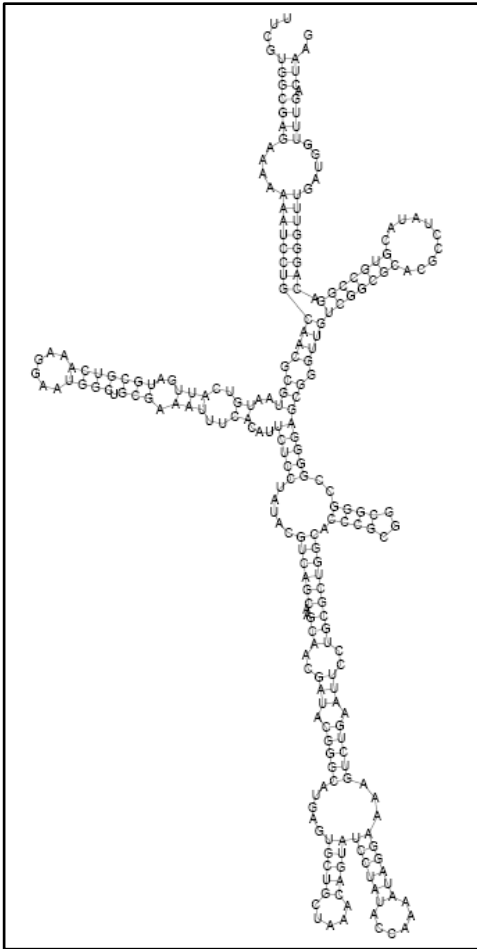


Abb. 56: Mit RNAfold ermittelte Sekundärstruktur des 242 nt großen P4-Transkripts (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>).

Wie man anhand der Abbildung 56 sehen kann, gibt es innerhalb des P4-RNA-Moleküls ausgedehnte Bereiche mit intramolekularen Basenpaarungen. Es kommen allerdings auch mehrere Schleifenstrukturen vor: vier größere und acht kleinere. Anhand der Vorhersage ist die P4-sRNA ein hoch-strukturiertes RNA-Molekül.

7.2. BvgA-abhängige Transkription der P4-sRNA

Da die P4-sRNA perfekte Komplementarität gegenüber der 5'-UTR der *bvgA*-mRNA aufweist und damit bei der Regulation der BvgA-Translation eine Rolle spielen könnte, sollte die Frage geklärt werden, ob das P4-Transkript selbst Bvg-abhängig synthetisiert wird. Zu diesem Zweck wurde eine Primer Extension-Analyse mit unterschiedlichen Ansätzen durchgeführt. Kulturen von *Bp* TI, *Bp* 347 und *Bp* 359 wurden in 1x SS-Medium bis zu einer OD_{600nm} von 0.6 angezogen, ebenso eine Kultur von *Bp* TI in 1x SS-Medium mit 50mM $MgSO_4$. Aus allen Kulturen wurde die RNA isoliert (s. IV 1.10.1). Je 30 μg RNA der verschiedenen Ansätze wurden mit radioaktiv markierten P4_PE_Primer2 in cDNA umgeschrieben und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. IV 1.13.2.-4.). Abbildung 57 zeigt einen Ausschnitt aus dem nach der Exposition mit dem Primer Extension-Gel entwickelten Röntgenfilm.

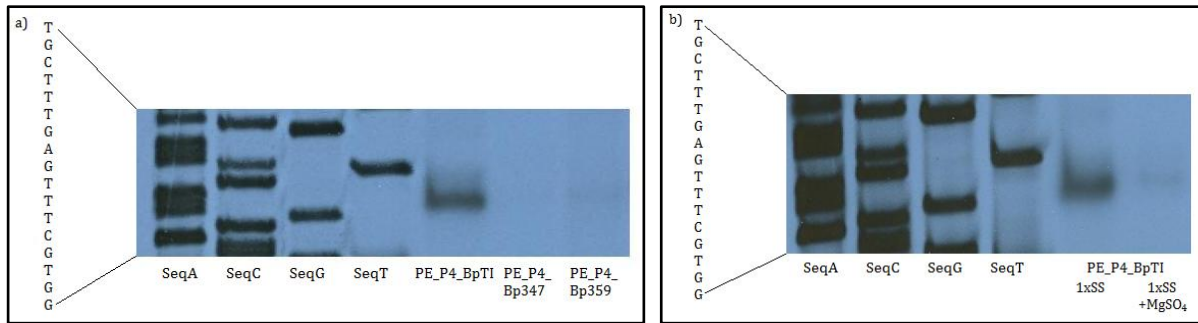


Abb. 57: Primer Extension-Analyse zur Untersuchung der Bvg-abhängigen P4-Transkription in *B. pertussis*. SeqA, SeqC, SeqG und SeqT sind Sequenzierungsreaktionen mit ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP und dem Vektor pSK+P4_{Bp} als Template, aus welchen die jeweils links im Bild ersichtliche Sequenzfolge abzulesen ist. Für jede cDNA-Synthese wurde ausgehend aus den gewonnenen RNA-Proben der radioaktiv markierte Primer P4_PE_Primer2 verwendet. a) PE_P4_BpTI, PE_P4_Bp347 und PE_P4_Bp359 bezeichnen jeweils die Ansätze mit RNA aus *Bp* TI, *Bp* 347 und *Bp* 359 (OD_{600nm} 0.6). b) PE_P4_BpTI 1xSS bezeichnet den Ansatz mit RNA aus *Bp* TI angezogen in 1x SS-Medium, PE_P4_BpTI 1xSS+MgSO₄ bezeichnet den Ansatz mit RNA aus *Bp* TI angezogen in 1xSS-Medium mit 50mM MgSO₄ (OD_{600nm} 0.6).

Der Ansatz mit RNA von *Bp* TI aus 1x SS-Medium (PE_P4_BpTI in Abb. 57a bzw. PE_P4_BpTI 1x SS in Abb. 57b) stellt eine Positivkontrolle für die P4-Transkription dar. In den Ansätzen mit RNA aus *Bp* 347, der $\Delta bvgS$ -Mutante von *Bp* TI, und *Bp* 359, der $\Delta bvgA$ -Mutante von *Bp* TI, ist kein P4-Transkript mittels Primer Extension nachzuweisen (PE_P4_Bp347 bzw. PE_P4_Bp359 in Abb. 57a). Gleiches gilt mit RNA von *Bp* TI aus 1x SS-Medium mit 50 mM MgSO₄ (PE_P4_BpTI 1x SS + MgSO₄ in Abb. 57b), wo ebenfalls kein P4-Transkript nachzuweisen ist. Dies macht deutlich, dass die P4-Transkription von einem aktiven BvgAS-System abhängig ist und bestätigt die Beobachtung von Scarlato *et al.* (Scarlato *et al.*, 1990).

7.3. Überexpression des P4-Transkripts

Um eine Funktionsanalyse des P4-Transkripts durchzuführen, wurde zunächst versucht, den Bereich, der das P4-Transkript umfasst, durch eine Resistenzkassette zu ersetzen. Anschließend sollten gezielt Mutationen im Promotorbereich der P4-sRNA eingeführt werden, welche zu einer verringerten P4-Transkription führen sollten, ohne dabei den Leserahmen des BvgA-Proteins zu verändern. Dies scheiterte jedoch daran, dass trotz verschiedener Plasmidkonstrukte und Klonierungsstrategien keine $\Delta P4$ -Mutanten gewonnen werden konnten, was darauf hindeutet, dass das P4-Transkript evtl. essentiell für *B. pertussis* ist. Da sowohl das *bvgA*-Gen als auch das *fhaB*-Gen für *B. pertussis* abkömmlich sind, erscheint es unwahrscheinlich, dass gerade das P4-Transkript essentiell sein sollte.

Um dennoch die Funktion des P4-Transkripts zu bestimmen, wurde ein Konstrukt hergestellt, dass die induzierbare Überexpression des P4-Transkripts ermöglicht. Dazu wurde zunächst ein 242 bp großes Fragment, welches das experimentell ermittelte P4-Transkript umfasst, mittels

präparativer PCR mit chromosomaler DNA von *Bp* TI als Template gewonnen. Hierfür wurde die Primerkombination P4_xpress_fw_HindIII/P4_xpress_rev_PstI verwendet. Mit der Primerkombination pQE30_term_fw_PstI/pQE30_term_rev_BamHI und dem Vektor pQE30 als Template wurde ein ca. 96 bp-großer Bereich, der die Lambda t_0 Terminatorregion umfasst, amplifiziert. Der P4-Bereich wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Pst*I verdaut, die Terminatorregion mit den Enzymen *Pst*I und *Bam*HI. Beide Fragmente wurden zusammen in den *Hind*III/*Bam*HI-verdauten Vektor pSK zwischenkloniert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Platten + Amp. Transformanten wurden mittels analytischer PCR mit der Primerkombination Blue T7/ BlueT3, welche im pSK-Vektor binden, auf eine erfolgreiche Insertion der Fragmente getestet. Positive Klone zeigten dabei eine Bande von ca. 500 bp (P4-Fragment/term + pSK-Rückgrat mit 167 bp) und wurden für eine Plasmidisolierung im kleinen Maßstab herangezogen. Diese Plasmid-DNA diente als Template für die Amplifikation der Fragmentfusion mit der Primerkombination P4_xpress_fw_HindIII/ pQE30_term_rev_BamHI. Das erhaltene PCR-Produkt mit einer Größe von ca. 340 bp wurde mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Bam*HI verdaut und in den *Hind*III/*Bam*HI-verdauten Vektor pMMB208 ligiert. Bei erfolgreicher Insertion wird das P4-Fragment derart in den Vektor eingebaut, dass es unter der Kontrolle des vektoreigenen P_{tac} -Promotors steht und damit die Transkription des P4-Fragments durch Zugabe von IPTG induziert werden kann. Die Transformation erfolgte in *E. coli* SM10, die Selektion auf LB-Platten + Cm. Transformanten wurden mittels analytischer PCR mit der Primerkombination pMMB208_1/pMMB208_2 auf die erfolgreiche Insertion des Bereichs in den Vektor getestet und anschließend durch Sequenzierung verifiziert. Der erhaltene Klon SM10 pMMBP4_{Bp}term wurde zur Konjugation mit *B. pertussis* Tohama I (*Bp* TI) eingesetzt, der Konjugationsansatz anschließend auf BG-Platten + Sm, Cm selektioniert. Streptomycin unterbindet dabei das Wachstum des Donorstamms SM10 pMMBP4_{Bp}term, während Chloramphenicol auf *Bp* TI-Mutanten selektioniert, die das pMMBP4_{Bp}term-Konstrukt aufgenommen haben. Putative *Bp* TI pMMBP4_{Bp}term-Mutanten wurden außerdem einer analytischen PCR mit der Primerkombination pMMB208_1/pMMB208_2 unterzogen und zeigten im positiven Fall eine Bande mit einer Größe von ca. 500 bp.

Die Induzierbarkeit der P4-Transkription wurde über Primer Extension-Analyse bestätigt. Zu diesem Zweck wurde eine Kultur von *Bp* TI pMMBP4_{Bp}term bis zu einer OD_{600nm} von 0.6 angezogen und dann in zwei Ansätze aufgeteilt. Ein Ansatz wurde normal weiter inkubiert und diente als nicht-induzierte Kontrolle, während zu dem anderen Ansatz IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM gegeben wurde (induzierte Probe). Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C wurden aus beiden Ansätzen Proben zur RNA-Isolierung (s IV 1.10.1) entnommen. 30 μ g der RNA wurden mit radioaktiv markierten P4_PE_Primer2 in cDNA umgeschrieben und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. IV 1.13.2.-4.). Abbildung 58 zeigt einen

Ausschnitt aus dem nach der Exposition mit dem Primer Extension-Gel entwickelten Röntgenfilm.

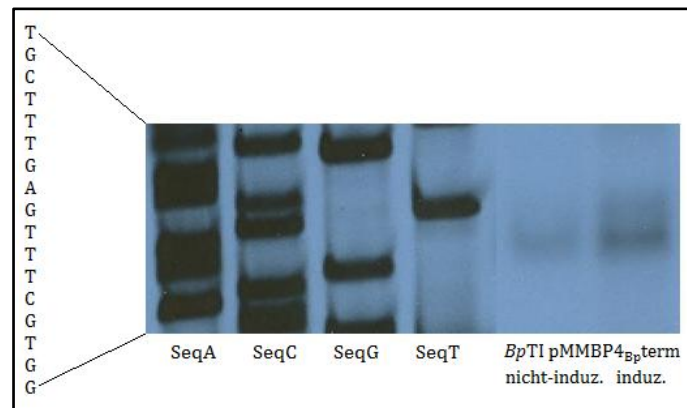


Abb. 58: Primer Extension-Analyse zur induzierbaren Überexpression des P4-Transkripts in *Bp* TI pMMBP4_{Bp}term. SeqA, SeqC, SeqG und SeqT sind Sequenzierungsreaktionen mit ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP und dem Vektor pSK+P4_{Bp} als Template. Für jede cDNA-Synthese wurde ausgehend aus den gewonnenen RNA-Proben der radioaktiv markierte Primer P4_PE_Primer2 verwendet. *Bp* TI pMMBP4_{Bp}term nicht-induz. bezeichnet dabei die nicht-induzierte Kontrolle, während *Bp* TI pMMBP4_{Bp}term induz. den Ansatz beschreibt, bei dem die P4-Transkription durch Zugabe von IPTG induziert worden war.

Wie anhand der Abbildung 58 deutlich wird, kommt es nach Zugabe von IPTG zur Kultur (*Bp* TI pMMBP4_{Bp}term induz.) zu einer gesteigerten P4-Transkription im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle (*Bp* TI pMMBP4_{Bp}term nicht-induz.).

Nach erfolgreichem Nachweis einer induzierbaren Überexpression des P4-Transkripts stellte sich zunächst die Frage, ob dies zu einer gesteigerten bzw. verminderten Translationsrate der *bvgA*-mRNA führt, da das P4-Transkript erwiesenermaßen perfekte Komplementarität zu deren 5'UTR besitzt. Dazu wurden zwei Kulturen von *Bp* TI pMMBP4_{Bp}term bis zu einer OD_{600nm} von 0.6 angezogen: eine in 1x SS-Medium, welche die normalen Wachstumsbedingungen darstellen, und eine in 1x SS-Medium mit 50 mM MgSO₄, um einen eventuellen Einfluss auf die phänotypische Modulation zu berücksichtigen. Anschließend wurden die Kulturen aus dem jeweiligen Medium in zwei Ansätze (je 30 ml) aufgeteilt. Ein Ansatz wurde wie zuvor weiter inkubiert und diente als nicht-induzierte Kontrolle, während zu dem anderen Ansatz IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM gegeben wurde (induzierte Probe). Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C wurden die vier Ansätze einer Proteinisolierung (s. IV 2.1.) unterzogen und die Proteinkonzentration bestimmt (s. IV 2.2.). Je 10 µg Protein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (s. IV 2.3.), worauf die spezifische Detektion des jeweiligen Virulenzfaktors mittels Immunoblot erfolgte (s. IV 2.4.).



Abb. 59: Nachweis der BvgA-Expression in nicht-induzierten und induzierten Kulturen von *Bp* TI pMMBP₄*Bp*term aus 1x SS-Medium bzw. 1x SS-Medium mit 50 mM MgSO₄ durch Immunoblot.

Abbildung 59 zeigt, dass die Kultur von *Bp* TI pMMBP₄term aus 1x SS-Medium, in der es zur induzierten Überexpression des 242 bp großen P₄-Transkripts kommt (*Bp* TI pMMBP₄term 1x SS induz.), keine veränderte BvgA-Expression zeigt im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle (*Bp* TI pMMBP₄term 1x SS nicht-induz.). Dies ist auch der Fall für Kulturen von *Bp* TI pMMBP₄term aus 1x SS-Medium mit 50 mM MgSO₄: auch hier kommt es zu keiner verstärkten BvgA-Expression in der induzierten Kultur (*Bp* TI pMMBP₄term 1x SS+MgSO₄ induz.) im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle (*Bp* TI pMMBP₄term 1x SS+MgSO₄ nicht-induz.). Verwunderlich ist, dass in diesem Versuch nicht die phänotypische Modulation in Form einer verringerten BvgA-Expression in Kulturen aus 1x SS-Medium mit 50 mM MgSO₄ (sowohl induziert als auch nicht-induziert) nachgewiesen werden konnte.

Da die Möglichkeit besteht, dass es durch Überexpression des P₄-Transkripts zu minimalen Unterschieden in der BvgA-Expression kommt, welche sich evtl. stärker auf die Expression von durch BvgA-regulierte Gene auswirken könnte, sollte exemplarisch die PTX-Expression analysiert werden. Dazu wurden dieselben Proben, welche bereits für die BvgA-Expression herangezogen worden waren, verwendet.

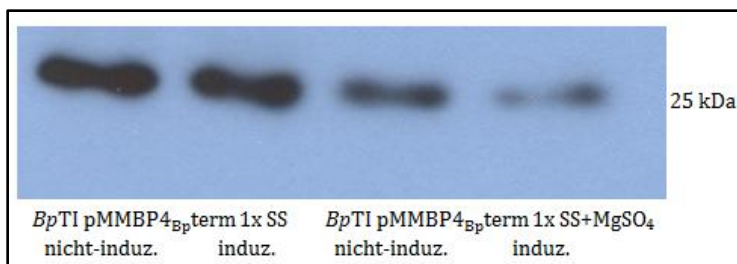


Abb. 60: Nachweis der PTX-Expression in nicht-induzierten und induzierten Kulturen von *Bp* TI pMMBP₄*Bp*term aus 1x SS-Medium bzw. 1x SS-Medium mit 50 mM MgSO₄ durch Immunoblot.

Abbildung 60 zeigt, dass es in der induzierten Kultur von *Bp* TI pMMBP₄term aus 1x SS-Medium zu einer minimal verringerten PTX-Expression im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle kommt. Ebenso verhält es sich mit den Kulturen von *Bp* TI pMMBP₄term aus 1x SS-Medium mit 50 mM MgSO₄: auch hier führt die induzierte Überexpression des P₄-Transkripts zu einer verminderten PTX-Expression im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle. Erwähnenswert ist, dass im PTX-Blot die phänotypische Modulation in den Kulturen aus 1x SS-Medium mit 50 mM MgSO₄ deutlicher ist als beim BvgA-Blot.

VI Diskussion

1. Die *hfq*-Transkription in *B. pertussis* und *B. bronchiseptica*

Das *hfq*-Gen in *E. coli* ist Teil eines Superoperons (*amiB-mutL-miaA-hfq-hflX-hflK-hflC*) mit mehreren Promotoren, was zu einem komplexen Transkriptionsmuster führt (Tsui & Winkler, 1994). Dabei weist das *hfq*-Gen zwei σ^{70} -abhängige Promotoren und einen σ^{32} -abhängigen Hitzeschock-Promotor auf, der die *hfq*-Transkription unter Stressbedingungen gewährleistet. Einer der beiden σ^{70} -abhängigen Promotoren befindet sich dabei im intergenischen Bereich zwischen *miaA* und *hfq*, während die beiden anderen Promotoren direkt im *miaA*-Gen liegen (Tsui *et al.*, 1996).

In *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* startet die *hfq*-Transkription unter logarithmischen Bedingungen an einem Startpunkt, der 49 bp vor dem Hfq-Startcodon liegt (s. V 1.2. und 1.3.). Der zugehörige Promotor besitzt große Ähnlichkeit mit der Konsensussequenz von σ^{70} -abhängigen Promotoren in *E. coli*. In einer Primer Extension-Analyse mit RNA-Proben aus stationären Kulturen bzw. Kulturen nach Hitzestress von *Bp* TI und *Bb* 7865 konnte kein weiteres *hfq*-Transkript außer dem bereits ermittelten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass das *hfq*-Gen oftmals mit dem stromaufwärts liegenden *miaA*-Gen co-transkribiert wird (Tsui & Winkler, 1994). Co-Transkripte mit dem in *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* stromaufwärts liegenden *hisC*-Gen hätten in unserem Fall über die Primer Extension-Analyse nachgewiesen werden müssen. Ferner ergab die Sequenzierung des 5'-Endes der *hfq*-Transkripte mit RNA-Proben aus stationären Kulturen und Kulturen nach Hitzestress denselben *hfq*-Transkriptionsstartpunkt wie unter logarithmischen Bedingungen (s. V 1.4.). Hierbei wurde die Elongationszeit für die analytische PCR so gewählt, dass auch größere Transkripte hätten amplifiziert werden können. Somit liegt die Vermutung nahe, dass es in *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* nur einen *hfq*-Transkriptionsstartpunkt gibt. Der Unterschied in der *hfq*-Transkription von *E. coli* und *B. pertussis* könnte in der unterschiedlichen Anpassung der beiden Organismen an ökologische Bedingungen und damit einhergehend in der unterschiedlichen Umgebung des *hfq*-Gens im Genom liegen (s. Abb. 61).



Abb. 61: Vergleichende Darstellung des *hfq*-Lokus in *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis*, *E. coli* und *N. meningitidis* mit stromaufwärts und -abwärts liegenden Genen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

Wie Abbildung 61 erkenntlich macht, ist der *hfq*-Lokus mit den umgebenden Genen im *B. bronchiseptica*-Cluster (*B. pertussis*, *B. bronchiseptica* und *B. parapertussis*) hoch konserviert. Vergleicht man das Superoperon, in dem das *hfq*-Gen in *E. coli* liegt, mit der Struktur im *B. bronchiseptica*-Cluster, so ergeben sich deutliche Unterschiede. Während die stromabwärts von *hfq* liegenden Gene (*hflX*-*hflK*-*hflC*) identisch sind, so trifft dies für die stromaufwärts liegenden Gene nicht zu. Hier befinden sich bei *E. coli* die Gene *amiB*, *mutL* und *miaA*, während bei *B. pertussis* die Gene *engA* und *hisC* liegen. Somit fehlt in *B. pertussis* das stromaufwärts liegende *miaA*-Gen, in welchem in *E. coli* zwei *hfq*-Promotoren liegen. Der *hfq*-Lokus in *N. meningitidis*, welcher wie *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* zu den β -Proteobakterien gehört, zeigt in seiner Struktur ebenfalls Unterschiede zum *hfq*-Lokus in *E. coli*. Auch hier fehlt das stromaufwärts liegende *miaA*-Gen. Für das *hfq*-Gen in *N. meningitidis* konnte nur ein Transkriptionsstartpunkt nachgewiesen werden, dessen Promotor vermutlich σ^{70} -abhängig ist (Fantappiè *et al.*, 2009). Diese Beobachtung in *N. meningitidis* deckt sich mit unserer Analyse zum *hfq*-Transkriptionsstartpunkt in *B. pertussis* und *B. bronchiseptica*.

Über die Konsensussequenz von σ^{32} -abhängigen Hitzeschock-Promotoren in *E. coli* wurde versucht, nach ebensolchen Promotoren stromaufwärts vom *hfq*-Gen zu suchen. Dabei zeigten zwei Bereiche Homologie zu der Konsensussequenz 5'-CTTGAA(N₁₅)CCCCATtTA-3' (Tsui *et al.*, 1996). Eine dieser Sequenzen befindet sich ca. 90 bp vor dem Hfq-Startcodon im intergenischen Bereich zwischen *hfq* und *hisC*, während sich die andere Sequenz im *hisC*-Gen ca. 480 bp vor dem Hfq-Startcodon befindet. Da beide putative Promotoren nicht über die Primer Extension-Analyse in Erscheinung getreten sind, scheinen sie in *B. pertussis* nicht aktiv zu sein. Über σ^{32} -abhängigen Promotoren und deren Konsensussequenz ist in *B. pertussis* relativ wenig bekannt, weshalb nicht ausgeschlossen werden kann, dass solche Promotoren weit stromaufwärts vom *hfq*-Gen liegen.

Aus *L. monocytogenes* ist bekannt, dass die *hfq*-Transkription nach Behandlung mit NaCl, EtOH, EDTA sowie nach Inkubation bei 45°C und 4°C verstärkt ist (Christiansen *et al.*, 2004). Kein *hfq*-Transkript konnte dagegen durch Primer Extension-Analyse bei Kulturen aus der exponentiellen Wachstumsphase nachgewiesen werden. Ferner zeigte sich in *L. monocytogenes* keine verstärkte Transkription nach Behandlung mit 0.15 % H₂O₂. Der für die verstärkte *hfq*-Transkription verantwortliche Promotor ist dabei σ^B -abhängig. Für *B. pertussis* konnte durch qRT-PCR gezeigt werden, dass die *hfq*-Transkription nach Behandlung mit H₂O₂ und EtOH, in der stationären Phase sowie nach Inkubation bei 45°C und 4°C verstärkt ist (s. V 1.4.). Hier stellt sich nun die Frage, welche Faktoren für die gesteigerte *hfq*-Transkription unter diesen Stressbedingungen verantwortlich sind. Da keine Hinweise auf weitere Stress-abhängige Promotoren gefunden wurden, wären zwei Möglichkeiten denkbar: zum einen könnte ein unbekannter Transkriptionsfaktor stromaufwärts vom *hfq*-Gen binden und die Aktivität des ermittelten Promotors verstärken. Zum anderen könnte sich die Halbwertszeit der *hfq*-mRNA unter den getesteten Bedingungen verlängern und damit mehr Transkripte über qRT-PCR nachgewiesen werden. Gegen letztere Hypothese spricht die Beobachtung aus *E. coli*, dass Hfq die eigene mRNA über einen RNase E-abhängigen Mechanismus destabilisiert (Tsui *et al.*, 1997).

Für *B. bronchiseptica* konnte nach Behandlung mit H₂O₂, in der stationären Phase und nach Inkubation bei 45°C eine gesteigerte *hfq*-Transkription nachgewiesen werden (s. V 1.4.). Nach EtOH-Behandlung ergab sich in den verschiedenen cDNAs eine gesteigerte *hfq*-Transkription, welche sich jedoch als statistisch nicht signifikant erwies. Nach Inkubation bei 4°C zeigte sich im Gegensatz zu *B. pertussis* keine gesteigerte *hfq*-Transkription bei *B. bronchiseptica*. Diese Diskrepanz zwischen den beiden nah verwandten Organismen ist verwunderlich, da die Kulturen für beide Versuchsansätze gleich behandelt wurden. Somit liegt die Vermutung nahe, dass in *B. pertussis* ein System bzw. Faktor vorhanden ist, der zu einer gesteigerten *hfq*-Transkription bei Kältestress führt, jedoch bei *B. bronchiseptica* fehlt.

2. Einfluss des Hfq-Proteins auf Wachstumsverhalten und Stresstoleranz in *B. pertussis* und *B. bronchiseptica*

Wie in V 2.3. dargestellt wurde, zeigt die Δhfq -Mutante im *Bp* TI-Hintergrund ein deutliches Wachstumsdefizit bei 37°C gegenüber Wildtyp und Komplementante. Dies deckt sich mit den Beobachtungen in *E. coli* (Tsui *et al.*, 1994b), *P. aeruginosa* (Sonnleitner *et al.*, 2003), *V. cholerae* (Ding *et al.*, 2004) und *S. Typhimurium* (Sittka *et al.*, 2007). Ob dieses Wachstumsdefizit der Δhfq -Mutante bei 45°C und 4°C noch deutlicher zu tragen kommt, wurde nicht untersucht. Aus *E. coli* ist bekannt, dass das Hfq-Protein für eine effiziente Translation des *rpoS*-Gens benötigt wird, dessen Produkt, der σ^S -Faktor, die Synthese mehrerer wichtiger Proteine der

Stressantwort reguliert (Muffler *et al.*, 1996; Muffler *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu wird das Hfq-Protein nicht für die σ^s -Synthese in *V. cholerae* benötigt und auch das Wachstumsdefizit von *P. aeruginosa* Δhfq ist σ^s -unabhängig (Sonnleitner *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2004). Da nicht untersucht wurde, ob es zu einem Unterschied in der σ^s -Expression zwischen *Bp* TI-Wildtyp und Δhfq -Mutante kommt, lässt sich über die Ursache des Wachstumsdefizits nur wenig sagen.

Im Gegensatz zu der Beobachtung im *Bp* TI-Hintergrund zeigt die *Bb* 7865 Δhfq -Mutante keinerlei Wachstumsdefizit gegenüber dem Wildtyp *Bb* 7865 (s. V 2.3.). Dies scheint auf den ersten Blick verwunderlich, da beide Arten sehr nahe verwandt sind und als Subspezies einer Art mit unterschiedlichen Anpassungen betrachtet werden (Gerlach *et al.*, 2001). Kürzlich konnte jedoch ein ähnliches Phänomen für die nah miteinander verwandten Arten *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis* gezeigt werden (Bai *et al.*, 2010). Hier verhält es sich so, dass *Y. pestis* Δhfq ein Wachstumsdefizit gegenüber dem Wildtyp zeigt, während dies bei *Y. pseudotuberculosis* Δhfq nicht der Fall ist. Obwohl die Autoren keine konkreten Gründe für diese Tatsache geben, ist es dennoch interessant, dass so nah verwandte Arten unterschiedlich abhängig vom Hfq-Protein sein können. Dies deutet darauf hin, dass nicht das Hfq-Protein an sich wichtig für den jeweiligen Organismus ist, sondern vielmehr die sRNA-mRNA-Interaktionen, an welchen es beteiligt ist.

Bei vielen verschiedenen Bakterienarten hat sich gezeigt, dass die jeweilige Δhfq -Mutante größere Sensitivität gegenüber Stresssubstanzen zeigt (Tsui *et al.*, 1994; Christiansen *et al.*, 2004; Fantappiè *et al.*, 2009). Für *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die zugehörige Δhfq -Mutante eine größere Sensitivität gegenüber H_2O_2 besitzt (s. V 4.1.). Hierbei ist jedoch erwähnenswert, dass bei geringeren Konzentrationen an H_2O_2 (1 mM und 2.5 mM) dieser Effekt nicht deutlich erkennbar ist, sondern erst bei einer höheren Konzentration von 5 mM H_2O_2 . Vermutlich ist ein gewisser Schwellenwert der inhibierenden Substanz nötig, um das Defizit der Δhfq -Mutante aufzuzeigen. Die Sensitivität der Δhfq -Mutante scheint sich nicht auf alle reaktiven Sauerstoffspezies zu richten und dadurch auf ein Defizit in der generellen Sauerstoffstressantwort hinzudeuten. Vielmehr zeigte sich eine erhöhte Sensitivität nur bei Behandlung mit H_2O_2 . Die Inkubation mit Paraquat, welches durch Wechselwirkung mit der Atmungskette zur Produktion von toxischen Hyperoxiden führt, zeigte keinen Unterschied in der inhibierenden Wirkung zwischen *Bb* 7865-Wildtyp und Δhfq -Mutante. Für *N. meningitidis* konnte gezeigt werden, dass die Δhfq -Mutante sensitiver gegenüber der Behandlung mit H_2O_2 und Paraquat ist, obwohl durch Proteomanalyse nachgewiesen wurde, dass mehrere Proteine der oxidativen Stressantwort in der Δhfq -Mutante hochreguliert sind (Fantappiè *et al.*, 2009). In *L. monocytogenes* ist das Hfq-Protein nicht an der Resistenz gegenüber H_2O_2 beteiligt (Christiansen *et al.*, 2004). In *V. parahaemolyticus* ist die Δhfq -Mutante sogar resistenter gegenüber oxidativen Stress als der Wildtyp (Su *et al.*, 2010). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass das Hfq-Protein nicht im Allgemeinen zur

Stressresistenz beiträgt, sondern vielmehr, indem es im Organismus vorhandene sRNA-mRNA-Interaktionen fördert.

Die Behandlung mit den Membranstress-induzierenden Substanzen SDS und Tween 20 zeigte bei *B. pertussis* und *B. bronchiseptica*, dass die Δhfq -Mutante nicht sensitiver als der zugehörige Wildtyp ist (s. V 4.2.). Dies deckt sich mit der Beobachtung in *L. monocytogenes*, steht aber im Widerspruch zu der Beobachtung in *N. meningitidis* (Christiansen *et al.*, 2004; Fantappiè *et al.*, 2009). Dabei ist zu beachten, dass für beide Analysen verschiedene Assays verwendet wurden. Erwähnenswert ist, dass für den Assay mit *B. pertussis* dieselbe Konzentration an SDS und Tween 20 verwendet wurde wie bei Fantappiè *et al.* beschrieben, welche keinen inhibitorischen Effekt auf Wildtyp und Δhfq -Mutante ausübte. Daraus ergibt sich die Frage, ob evtl. nicht die geeignete Konzentration für beide Substanzen verwendet wurde, welche ein Defizit der Δhfq -Mutante erkennen ließe. Im Agar-Diffusions-Assay von *B. bronchiseptica* mit höheren SDS-Konzentrationen konnte jedoch kein Unterschied zwischen Δhfq -Mutante und Wildtyp nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet vielmehr darauf hin, dass in *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* das Hfq-Protein nicht an der Resistenz gegenüber Membranstress-induzierenden Substanzen beteiligt ist.

3. Effekt von Hfq auf die Biofilmbildung in *B. pertussis* und *B. bronchiseptica*

Die Analyse der Biofilmbildung in *Bp* TI und *Bp* TI Δhfq mittels Kristallviolett-basierter Assay zeigte, dass die Δhfq -Mutante signifikant weniger Biofilm bildet als der Wildtyp (s. V 5.1.). Dabei ergaben sich zu Anfang der Analyse (t = 12 h) noch kaum Unterschiede zwischen Wildtyp und Δhfq -Mutante, was darauf hindeutet, dass Hfq nicht an der initialen Anheftung der Zellen bzw. an der Bildung von Mikrokolonien beteiligt ist. Erst ab t = 24 h, also ab einem Zeitpunkt zu dem die Biofilmmreifung erfolgt bzw. bereits abgeschlossen ist, zeigte die Δhfq -Mutante ein deutliches Defizit in der Biofilmbildung. Für *P. aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass die Expression von *PcoI*, die für die Herstellung des Quorum-Sensing-Moleküls *N*-Acyl-Homoserinlacton verantwortliche Synthese, von Hfq abhängig ist (Wu *et al.*, 2010). Dies ist ein Indiz, dass in anderen Organismen die Bildung von Biofilmen von sRNA-mRNA-Interaktionen und damit vom Hfq-Protein reguliert wird. Da über die Biofilmbildung in *B. pertussis* noch relativ wenig bekannt ist, lässt sich über die Ursache für das Defizit der Δhfq -Mutante nur spekulieren. So ist die Expression des *bpsABCD*-Lokus (*Bordetella polysaccharide*) wichtig für die Synthese von poly- β -1,6-GlcNAc und die Ausbildung eines Biofilms *in vitro* (Conover *et al.*, 2010). Die Transkription des *bpsA*-Gens erschien zwischen *Bp* TI und *Bp* TI Δhfq nicht differentiell reguliert, was jedoch nicht ausschließt, dass die Translation der *bpsA*-mRNA oder der mRNAs der restlichen Gene im

Lokus durch Hfq reguliert wird. Dies konnte experimentell noch nicht bestimmt werden. Denkbar wäre auch, dass das allgemein langsamere Wachstum der Δhfq -Mutante der Grund für die schwächere Biofilmbildung ist.

Im Falle von *B. bronchiseptica* lieferte die Analyse zur Biofilmbildung widersprüchliche Ergebnisse. Hier scheint es so, dass die Δhfq -Mutante stärker Biofilm ausbildet als der Wildtyp, was gegensätzlich zu den Beobachtungen in *B. pertussis* ist (s. V 5.2.). Sollte dies wirklich der Fall sein, so hätte die Komplementante weniger Biofilm bilden müssen als die Δhfq -Mutante. Im ersten Versuch ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Δhfq -Mutante und Komplementante, im zweiten Versuch schien die Komplementante sogar mehr Biofilm auszubilden als die Δhfq -Mutante. Da *Bb* 7865, *Bb* 7865 Δhfq und *Bb* 7865 Δhfq comp im hier verwendeten Assay nur eine schwache Biofilmbildung zeigten (Maximalwerte OD_{540nm} von ca. 0.5 im Vergleich zu *Bp* TI mit 1.4), lässt sich vermuten, dass das gewählte System für *B. bronchiseptica* nicht geeignet war und die erhaltenen Daten somit nicht schlüssig sind.

4. Das Hfq-regulierte Proteom in *B. pertussis* und *B. bronchiseptica*

Laut Genomsequenz besitzt *B. pertussis* 2.756 ORFs (www.uniprot.org). Mittels 2D-Gelelektrophorese konnten unter logarithmischen Wachstumsbedingungen 35 Proteinspots bestimmt werden, die zwischen Wildtyp und Δhfq -Mutante differentiell reguliert sind (s. V 3.1.), womit das Hfq-regulierte Proteom unter diesen Bedingungen bei 1.3 % liegt. Dabei erschienen 15 Proteinspots in der Δhfq -Mutante herunterreguliert und 20 Proteinspots in der Δhfq -Mutante hochreguliert. Das Hfq-Protein ist damit sowohl an die Translation inhibierenden als auch aktivierenden sRNA-mRNA-Interaktionen beteiligt, obwohl eine leichte Präferenz gegenüber Ersteren besteht. 18 der Proteinspots konnten mittels MALDI-TOF bestimmt werden, wobei zwei Spots (Spot 9 und 17 = BP0301) das gleiche Protein in unterschiedlichen Modifikationsformen darstellen.

Mit der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (OdhL) und der Aconitat-Hydratase (AcnA) stehen zwei Proteine unter Hfq-Regulation, welche am Citrat-Zyklus und damit an einem zentralen metabolischen Prozess in der Zelle beteiligt sind. Mit der Glutathion-Synthetase (GshB) und der 2-Isopropylmalatsynthase (LeuA) sind zwei Proteine vertreten, die an der Biosynthese von Glutathion, einem wichtigen Redox-Puffer für die Zelle, bzw. an der Biosynthese von Valin, Leucin und Isoleucin beteiligt sind. Die D-Aminosäure-Dehydrogenase (DadA) ist beteiligt an der oxidativen Deaminierung von D-Aminosäuren und kann somit dabei helfen, Energie für den asaccharolytischen Organismus *B. pertussis* zu liefern. Alle eben genannten Proteine erscheinen

in der Δhfq -Mutante herunterreguliert, was eine Erklärung für das schlechtere Wachstum der Δhfq -Mutante sein könnte.

Ferner sind viele Proteine Hfq-reguliert, die an Transportprozessen beteiligt sind. So zeigen die hypothetischen Proteine BP3440 und BP0612 Homologie zu Proteinen der Tripartit-Tricarboxylat-Transporter-Familie (TTTF), die primär für den Transport von Citrat und dessen Derivate verantwortlich ist (Winnen *et al.*, 2003). Das putative, periplasmatische Bindeprotein für lösliche Faktoren SmoM gehört zur Familie der Tripartit-ATP-unabhängigen, periplasmatischen Transporter (TRAP), die eine breite Substratspezifität aufweisen (Kelly & Thomas, 2001; Fischer *et al.*, 2010). BP0301 ist das putative Substratbindeprotein eines ABC-Transporters mit unbekannter Spezifität, während das als putatives regulatorisches Lipoprotein identifizierte BP2271 Homologie zum Substratbindeprotein eines ABC-Transporters in *Achromobacter piechaudii* aufweist. BP1948 fungiert als Bindeprotein für verzweigt-kettige Aminosäuren (Valin, Leucin und Isoleucin), BP3831 als Bindeprotein für L-Aminosäuren. Auffällig ist hierbei, dass zahlreiche periplasmatische Bindeproteine der Transportsysteme unter Hfq-Regulation stehen. Bis auf BP3831 sind alle genannten Proteine in der Δhfq -Mutante hochreguliert.

Die Phosphopantethein-Adenylyltransferase CoaD ist das Schlüsselenzym der CoA-Biosynthese, während die Thymidin-Diphosphoglucose-4,6-Dehydratase ein wichtiges Enzym bei der Herstellung von Untereinheiten für die Zellwandsynthese darstellt. Beide Proteine sind in der Δhfq -Mutante hochreguliert. Das hypothetische Protein BP2936 scheint über Homologievergleich zur Familie der S-Adenosylmethionin-abhängigen Methyltransferasen zu gehören und ist ebenfalls in der Δhfq -Mutante stärker exprimiert. BP2909 wird in der Δhfq -Mutante schwächer exprimiert und ist homolog zum TldD-Protein, einem putativen Modulator der DNA-Gyrase.

Neben den Daten aus der 2D-Gelelektrophorese wurde zudem mittels qRT-PCR untersucht, ob sich die Transkription der zu den Spots gehörenden Gene zwischen *Bp* TI-Wildtyp und Δhfq -Mutante unterscheidet (siehe V 3.2.). In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der 2D-Gelelektrophorese und der qRT-PCR einander gegenüber gestellt.

Tab. 8: Vergleich der Ergebnisse aus der 2D-Gelelektrophorese und der qRT-PCR zum Hfq-regulierten Proteom unter logarithmischen Wachstumsbedingungen. "+" bezeichnet dabei Hochregulation, "+/-" keine Regulation und "-" Runterregulation.

Spotnr.	Genlokus	Annotation	Proteinname	Protein-Regulation	RNA-Regulation
Spot 1	BP3440	-	hypothetical protein BP3440	3	"+"
Spot 2	BP0665	-	thymidine diphosphoglucose 4,6-dehydratase	2.7	"+"
Spot 3	BP0612	-	hypothetical protein BP0612	2.6	"+"
Spot 4	BP2936	-	hypothetical protein BP2936	2.6	" +/- "

Spot 5	BP1487	<i>smoM</i>	putative periplasmic solute-binding protein	2.4	"+"
Spot 9	BP0301	-	putative ABC transporter substrate binding protein	2	"+"
Spot 14	BP2271	-	putative regulatory lipoprotein	1.8	"+"
Spot 15	BP1948	-	branched-chain amino acid-binding protein	1.8	"+"
Spot 17	BP0301	-	putative ABC transporter substrate binding protein	1.8	"+"
Spot 19	BP1126	<i>odhL</i>	dihydrolipoamide dehydrogenase	-1.7	"+/-"
Spot 22	BP1818	<i>dadA</i>	D-amino acid dehydrogenase small subunit	-1.7	"+/-"
Spot 23	BP2014	<i>acnA</i>	aconitate hydratase	-1.7	"+/-"
Spot 26	BP3831	-	putative ABC transporter periplasmic amino acid-binding protein	-1.6	"+/-"
Spot 29	BP3471	<i>coaD</i>	phosphopantetheine adenyltransferase	1.5	"+/-"
Spot 30	BP0131	<i>leuA</i>	2-isopropylmalate synthase	-1.5	"-"
Spot 34	BP1499	<i>gshB</i>	glutathione synthetase	-1.5	"+/-"
Spot 35	BP2909	-	hypothetical protein BP2909	-1.5	"+/-"

Fast alle Gene, deren Proteinexpression in der Δhfq -Mutante runterreguliert war, zeigten auf Transkriptionsebene keinen Unterschied zwischen Δhfq -Mutante und Wildtyp. Ausnahme ist *leuA*, dessen Transkriptionsstärke in der Δhfq -Mutante niedriger war als im Wildtyp. Dies lässt die Vermutung zu, dass Hfq nicht nur die Translation der *leuA*-mRNA aktiviert, sondern evtl. deren Halbwertszeit verlängert oder sogar deren Transkription aktiviert. Umgekehrt zeigten fast alle Gene, deren Proteinexpression in der Δhfq -Mutante hochreguliert war, auch eine stärkere Transkription in der qRT-PCR. Hier bildet BP2936 die Ausnahme, bei dem kein Transkriptionsunterschied zwischen Wildtyp und Δhfq -Mutante nachgewiesen werden konnte. Diese Information lässt sich hypothetisch damit erklären, dass Hfq bei die Translation inhibierenden sRNA-mRNA-Interaktionen auch zum schnelleren Abbau der zugehörigen mRNA führt. Denkbar wäre auch, dass Hfq die Transkription der zugehörigen mRNAs fördert, scheint aber aufgrund der Vielzahl an beteiligten mRNAs unwahrscheinlich. Aus *E. coli* ist bekannt, dass Hfq an poly(A)-Bereiche bindet und damit mRNAs vor Degradation schützt (Folichon *et al.*, 2003). Andererseits stimuliert Hfq die weitere Adenylierung von mRNAs durch die Poly(A)-Polymerase PAP I, was deren Degradation verstärkt (Hajnsdorf & Régnier, 2000; Mohanty *et al.*, 2004). Welche intrinsischen Merkmale eine mRNA haben muss, um von Hfq vor Degradation geschützt zu werden bzw. zur Degradation markiert zu werden, darüber ist in der Literatur zu diesem Zeitpunkt nichts bekannt.

Unter stationären Wachstumsbedingungen konnten mittels 2D-Gelelektrophorese 36 Proteinspots bestimmt werden, die zwischen Wildtyp und Δhfq -Mutante differentiell reguliert

sind (s. V 3.3.). Somit liegt das Hfq-regulierte Proteom auch unter stationären Bedingungen bei 1.3 %. Neun Proteinspots erschienen in der Δhfq -Mutante herunterreguliert und 27 Proteinspots hochreguliert. Das Hfq-Protein ist somit unter stationären Wachstumsbedingungen öfter an die Translation inhibierenden sRNA-mRNA-Interaktionen beteiligt, jedoch nicht exklusiv. 23 Proteinspots wurden mittels MALDI-TOF identifiziert, wobei vier Spots (Spots s5, s6, s16 und s29 = BP3441) zum einen und drei Spots (s18, s21 und s27 = SdhA) zum anderen dasselbe Protein in unterschiedlichen Modifikationsformen darstellen.

Mit der FAD-Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase (SdhA) und der Aconitat-Hydratase (AcnA) stehen auch unter stationären Bedingungen zwei Enzyme des Citrat-Zyklus unter Hfq-Regulation. Beide Proteine sind in der Δhfq -Mutante hochreguliert. Auffällig ist, dass die Aconitat-Hydratase in der logarithmischen Phase in der Δhfq -Mutante schwächer exprimiert wird, in der stationären Phase jedoch stärker exprimiert wird. So ist es denkbar, dass unter den verschiedenen Bedingungen zwei distinkte sRNAs die Translation der Aconitat-Hydratase regulieren, die eine in der logarithmischen Phase aktivierend, die andere in der stationären Phase inhibierend. In *N. meningitidis* konnte gezeigt werden, dass die Aconitat-Hydratase ebenfalls unter Hfq-Regulation steht (Fantappiè et al., 2009). Allerdings war die Aconitat-Hydratase hierbei in der logarithmischen Phase (OD_{600nm} 0.5-0.6) in der Δhfq -Mutante 2.3fach hochreguliert. Dies deutet darauf hin, dass obwohl die Aconitat-Hydratase in beiden Organismen unter Hfq-Regulation steht, die Art der Regulation jedoch nicht zwingend dieselbe sein muss. Die γ -Glutamyl-Phosphat-Reduktase (ProA), welche am Metabolismus von Arginin und Prolin beteiligt ist, und die Thiazol-Synthase, welche an der Biosynthese von Thiamin-Pyrophosphat, einem wichtigen Kofaktor in Kohlenhydrat- und Aminosäuremetabolismus, beteiligt ist, stehen ebenfalls unter Hfq-Regulation und sind in der Δhfq -Mutante hochreguliert. Gleiches gilt für die D-Alanyl-D-Alanin Carboxypeptidase, welche an der Biogenese der Zellhülle beteiligt ist. Das Chaperonin GroEL, das bei der Proteinfaltung eine wichtige Rolle spielt, ist ebenfalls in der Δhfq -Mutante hochreguliert, was sich mit der Beobachtung in *N. meningitidis* deckt (Fantappiè et al., 2009). Der Elongationsfaktor Tu besitzt eine wichtige Funktion bei der Elongationsphase der Translation und ist in der Δhfq -Mutante runterreguliert. Ähnliches gilt für *N. meningitidis*, wo der Elongationsfaktor G runterreguliert ist, bzw. für *S. Typhimurium*, wo der Elongationsfaktor EF-Tu ebenfalls runterreguliert ist (Fantappiè et al., 2009; Sittka et al., 2007).

Wie bereits unter logarithmischen Bedingungen so ist auch unter stationären Bedingungen eine Vielzahl an Proteinen, welche am Transport von Substanzen beteiligt sind, unter Hfq-Kontrolle. So weist BP2066 Homologie zu Proteinen der Tripartit-Tricarboxylat-Transporter-Familie (TTTF), die wie bereits erwähnt für den Transport von Citrat und dessen Derivate verantwortlich ist (Winnen et al., 2003). Das bereits unter logarithmischen Bedingungen identifizierte putative, periplasmatische Bindeprotein für lösliche Faktoren SmoM gehört zur Familie der Tripartit-ATP-unabhängigen, periplasmatischen Transporter (TRAP), die eine breite

Substratspezifität aufweisen (Kelly & Thomas, 2001; Fischer *et al.*, 2010). Auch BP2963 ist homolog zu Bindeproteinen der TRAP-Transporter-Familie. BP2352 zeigt Homologie zum periplasmatischen 2,3-Diketo-L-Gulonat-Bindeprotein YiaO aus *Achromobacter piechaudii*, das ebenfalls zur TRAP-Familie gehört. BP0301 ist das putative Substratbindeprotein eines ABC-Transporters mit unbekannter Spezifität wie auch BP0663. Alle diese am Transport von Substanzen beteiligten Proteine sind in der Δhfq -Mutante hochreguliert. Dies trifft auch auf das periplasmatische Bindeprotein des Glutamin-ABC-Transporters GlnH zu, dass auch in *S. Typhimurium* unter Hfq-Regulation steht (Sittka *et al.*, 2007).

Die Expression des putativen Bindeproteins für Liganden der äußeren Membran BipA ist charakteristisch für die Bvgi-Phase von *B. pertussis* (s. II 1.5.3.). Unter stationären Bedingungen ist dessen Expression in der Δhfq -Mutante stärker als im Wildtyp. Interessanterweise besitzt BipA Homologie zu Adhäsinen und Invasinen aus anderen Organismen bzw. zu Biofilm-assoziierten Proteinen in *Staphylococcus* spp., seine Funktion ist jedoch noch ungeklärt. Für BP2909, einem Homolog des TldD-Proteins, wurde bereits unter logarithmischen Bedingungen nachgewiesen, dass es durch Hfq reguliert wird. Hier verhält es sich ähnlich wie bereits für die Aconitat-Hydratase beschrieben. So zeigt auch BP2909 in der logarithmischen Phase eine schwächere Expression in der Δhfq -Mutante, während in der stationären Phase eine stärkere Expression in der Δhfq -Mutante zu beobachten ist. Das in der Δhfq -Mutante runterregulierte hypothetische Protein BP3441 ist homolog zu Phasin-Proteinen, die mit Einschlüssen von Polyhydroxylalkanoaten in Bakterien assoziiert sind.

Wie bereits für die regulierten Spots unter logarithmischen Bedingungen beschrieben, so wurden auch für unter stationären Bedingungen regulierte Spots untersucht, ob die Transkription der zugehörigen Gene zwischen Wildtyp und Δhfq -Mutante differiert (siehe V.3.4.). Tabelle 9 vergleicht die Ergebnisse der 2D-Gelelektrophorese und der qRT-PCR.

Tab. 9: Vergleich der Ergebnisse aus der 2D-Gelelektrophorese und der qRT-PCR zum Hfq-regulierten Proteom unter stationären Bedingungen. "+" bezeichnet dabei Hochregulation, "+/-" keine Regulation, "-" Runterregulation und n.d. nicht bestimmt.

Spotnr.	Genlokus	Annotation	Proteinname	Protein-Regulation	RNA-Regulation
Spot s1	BP2066	-	hypothetical protein BP2066	4.4	"+"
Spot s3	BP2963	-	putative exported solute binding protein	4	" +/- "
Spot s5	BP3441	-	hypothetical protein BP3441	-3.7	" +/- "
Spot s6	BP3441	-	hypothetical protein BP3441	-3	" +/- "
Spot s7	BP0102	-	putative penicillin-binding protein precursor	3	" +/- "
Spot s8	BP2352	-	putative periplasmic substrate-binding transport protein	2.6	"+"
Spot s11	BP2014	<i>acnA</i>	aconitate hydratase	2.5	" +/- "

Spot s12	BP1112	<i>bipA</i>	putative outer membrane ligand binding protein	2.4	"+"
Spot s13	BP3597	<i>thiG</i>	thiazole synthase	2.4	"+/-"
Spot s14	BP0301	-	putative ABC transporter substrate binding protein	2.4	"+"
Spot s16	BP3441	-	hypothetical protein BP3441	-2.2	"+/-"
Spot s18	BP2361	<i>sdhA</i>	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	2.1	"+/-"
Spot s19	BP2041	<i>proA</i>	gamma-glutamyl phosphate reductase	2.1	n.d.
Spot s20	BP0663	-	hypothetical protein BP0663	2.1	n.d.
Spot s21	BP2361	<i>sdhA</i>	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	2	"+/-"
Spot s23	BP3495	<i>groEL</i>	chaperonin GroEL	2	"+/-"
Spot s27	BP2361	<i>sdhA</i>	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	1.9	"+/-"
Spot s28	BP3611	<i>tuf</i>	elongation factor Tu	-1.9	"+/-"
Spot s29	BP3441	-	hypothetical protein BP3441	-1.9	"+/-"
Spot s31	BP2909	-	hypothetical protein BP2909	1.9	"+/-"
Spot s32	BP1573	<i>glnH</i>	glutamine ABC transporter periplasmic protein	1.9	"+/-"
Spot s36	BP1487	<i>smoM</i>	putative periplasmic solute-binding protein	1.8	"+"

Wie bereits bei den Genen, deren Proteinexpression unter logarithmischen Wachstumsbedingungen in der Δhfq -Mutante runterreguliert ist, so zeigen auch die Gene, deren Proteinexpression unter stationären Bedingungen in der Δhfq -Mutante runterreguliert ist, keinen Transkriptionsunterschied zwischen Δhfq -Mutante und Wildtyp. Bei den Genen, deren Proteinexpression in der Δhfq -Mutante hochreguliert ist, lässt sich einerseits eine Gruppe einteilen, bei denen es keinen Transkriptionsunterschied zwischen Δhfq -Mutante und Wildtyp gibt (acht Gene), und andererseits eine Gruppe, bei denen auch die Transkription in der Δhfq -Mutante erhöht ist (5 Gene). Dies zeigt ein homogeneres Bild als unter logarithmischen Bedingungen beobachtet.

Vergleicht man das Hfq-regulierte Proteom unter logarithmischen Bedingungen mit demjenigen unter stationären Bedingungen, so sind vier Proteine in beiden Fällen zu finden: die Aconitat-Hydratase, das putative Substratbindeprotein BP0301, das TldD-Homolog BP2909 sowie das putative Bindeprotein SmoM. Alle anderen ermittelten Proteine differieren zwischen den beiden Bedingungen. Dies ist nicht weiter verwunderlich, wenn man in Betrachtung zieht, dass das Hfq-Protein primär an der Regulation durch *trans*-kodierte sRNAs beteiligt ist, welche unter spezifischen Wachstumsbedingungen synthetisiert werden (Waters & Storz, 2009).

Unter stationären Bedingungen sind bei *B. bronchiseptica* 17 Proteinspots differentiell zwischen Wildtyp und Δhfq -Mutante reguliert (siehe V.3.5.). Geht man von 4442 ORFs aus

(www.uniprot.org), so unterstehen ca. 0.5 % der Proteine der Hfq-Regulation. Fünf Proteinspots erschienen in der Δhfq -Mutante herunterreguliert und 17 Proteinspots in der Δhfq -Mutante hochreguliert. Das Hfq-Protein hat damit, wie bereits bei *B. pertussis* unter stationären Bedingungen beobachtet, eine stärkere Beteiligung an die Translation inhibierenden sRNA-mRNA-Interaktionen. 21 Proteinspots wurden mittels MALDI-TOF identifiziert, wobei zwei Spots (Spots 5 und 9 = GreA) dasselbe Protein in unterschiedlichen Modifikationsformen darstellen.

Mit GlmU und MurE sind zwei Enzyme in der Δhfq -Mutante stärker exprimiert, die an der Synthese von Zellwandkomponenten beteiligt sind. Die Amidase BB4925 und die Serinprotease MucD stellen Faktoren des Protein- bzw. Peptidabbaus dar und sind in der Δhfq -Mutante stärker exprimiert. Der Transkriptions-Elongationsfaktor (*greA*) ist in der Δhfq -Mutante runterreguliert. Das Chaperon GroEL ist in *Bb 7865* Δhfq runterreguliert und liegt damit im Gegensatz zu der Beobachtung in *B. pertussis*. Dies erscheint zwar inkonsequent, es wäre dennoch denkbar, dass Hfq in *B. pertussis* die GroEL-Translation inhibiert, in *B. bronchiseptica* die GroEL-Translation jedoch fördert. Die Funktion des äußeren Proteins D (*bopD*), welches in der Δhfq -Mutante runterreguliert ist, ist bislang noch unklar.

Auch in *B. bronchiseptica* sind, ähnlich wie zuvor bei *B. pertussis* beobachtet, auffallend viele Transportproteine, hierbei vor allem periplasmatische Bindeproteine, von der Δhfq -Mutation betroffen. BB4790 und BB1095 weisen Homologie zu Proteinen der Tripartit-Tricarboxylat-Transporter-Familie (TTTF) auf. BB1772 fungiert als Bindeprotein für verzweigte Aminosäuren und ist homolog zu dem unter logarithmischen Bedingungen in *B. pertussis* Hfq-regulierten BP1948. Dabei ist sowohl BB1772 als auch BP1948 in der jeweiligen Δhfq -Mutante hochreguliert. BB0719, BB2517 und BB3733, sind Bindeproteine von ABC-Transportern mit unbekannter Substratspezifität. BB1421 ist ebenfalls ein Substratbindeprotein mit Präferenz gegenüber Aminosäuren, während BB0229 ein Substratbindeprotein für verzweigt-kettige Aminosäuren darstellt. Alle diese Proteine sind in der Δhfq -Mutante hochreguliert. BB1453 ist homolog zu BP2271 und stellt wie dieses ebenfalls ein Substratbindeprotein eines ABC-Transporters dar. Gleiches gilt für BB4422, dem Homolog von BP0301, sowie für BB3421, dem Homolog von BP2352. In diesen drei Fällen ist die Hfq-abhängige Regulation in beiden Organismen gleich und die Proteine sind in der jeweiligen Δhfq -Mutante hochreguliert.

Abschließend lässt sich sagen, dass es Ähnlichkeiten im Hfq-regulierten Proteom zwischen *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* gibt. So sind in beiden Organismen auffallend viele Substratbindeproteine von Transportsystemen betroffen. Die Homologiepaare BB1453/BP2271, BB4422/BP0301 und BB3421/BP2352 sind ein besonderes Beispiel hierfür. Das Chaperon GroEL ist in beiden Organismen differentiell zwischen Δhfq -Mutante und Wildtyp reguliert: in *B. bronchiseptica* wird es in der Δhfq -Mutante schwächer exprimiert, während es in *B. pertussis* in der Δhfq -Mutante stärker exprimiert wird, was in Übereinstimmung mit der Beobachtung aus

N. meningitidis ist (Fantappiè et al., 2009). Diese Diskrepanz deutet daraufhin, dass selbst nah verwandte Arten in ihrer Hfq-abhängigen Regulation differieren können. So zeigten die restlichen Hfq-regulierten Proteine keine weitere Übereinstimmung zwischen beiden Organismen. Bislang sind nur unzureichende Informationen über die Expression von sRNAs im *B. bronchiseptica*-Cluster vorhanden. Demnach wäre es denkbar, dass es evolutive Unterschiede in der Expression von sRNAs in den sonst so nah verwandten Arten *B. bronchiseptica* und *B. pertussis* gibt und demnach auch im Hfq-regulierten Proteom.

5. Einfluss von Hfq auf die Virulenz von *B. pertussis*

Wie in V 6. gezeigt werden konnte, gibt es keinen Unterschied zwischen *Bp* TI-Wildtyp und Δhfq -Mutante in der Expression von *BvgA*, dem Master Regulator der Virulenzgenexpression. Auf *bvgA*-mRNA-Ebene gibt es ebenfalls keinen Transkriptionsunterschied zwischen Wildtyp und Δhfq -Mutante, wie mittels qRT-PCR nachgewiesen werden konnte. Die durch *BvgA*-regulierten Virulenzfaktoren PTX, das Pertussistoxin, sowie PRN, das Pertactin, zeigen keinen Hfq-abhängigen Unterschied in der Expression. Für das Adhäsion FhaB war zwar ein Antiserum vorhanden, doch zeigte dieses im Immunoblot nicht die gewünschte Proteinbande von ca. 220 kDa. Deshalb wurde untersucht, ob es zu einem Transkriptionsunterschied der *fhaB*-mRNA zwischen Wildtyp und Δhfq -Mutante kommt, was jedoch nicht der Fall ist. Auch für die fimbrielle Untereinheit FimD konnte kein signifikanter Transkriptionsunterschied zwischen Wildtyp und Δhfq -Mutante festgestellt werden, was an der relativ hohen Standardabweichung der ΔC_T -Werte der einzelnen cDNAs lag. Für die Adenylatzyklase konnte ebenfalls kein Hfq-abhängiger Unterschied in der Anzahl an *cyaA*-Transkripten nachgewiesen werden. Ein Versuch, die Hämolyse-Aktivität in Wildtyp und Δhfq -Mutante mittels eines Hämolyse-Assays zu untersuchen, war aufgrund der im Vergleich zu anderen Organismen, wie z. B. *L. monocytogenes*, schwachen Hämolyse von *B. pertussis* nicht durchführbar. Beim Wachstum auf Blutplatten war kein Unterschied in der hämolytischen Aktivität zwischen *Bp* TI und *Bp* TI Δhfq zu erkennen. All dies deutet darauf hin, dass eine Δhfq -Mutation *in vitro* nicht zu einem avirulenten Phänotyp von *B. pertussis* führt. Um diese Aussage auch *in vivo* zu bestätigen, wurde aufgrund eines mangelnden Tiermodells der Granulozyten-Survival-Assay herangezogen. Hierbei zeigten die isolierten Granulozyten jedoch keinen abtötenden Effekt gegenüber dem Wildtyp *B. pertussis* Tohama I, obwohl mit verschiedenen Quotienten zwischen Granulozytenzahl und Bakterienzahl experimentiert wurde und schlussendlich das Verhältnis sogar bei 50:1 lag (Daten nicht gezeigt). Aus der Literatur ist bekannt, dass *B. pertussis* Tohama I nach 120-minütiger Inkubation mit Granulozytenzellen ein Überleben von 85 % \pm 17.1 in Relation zur Ausgangszellzahl zeigt, wobei

die Bakterienzellen zur besseren Aufnahme sogar opsonisiert wurden (Steed *et al.*, 1991). Da der Wildtyp sich so resistent gegenüber dem Abtöten durch Granulozyten zeigte, erschien der Assay nicht geeignet, um eine vermeintliche erhöhte Sensitivität der Δhfq -Mutante nachzuweisen. Somit besteht über die *in vivo*-Relevanz des Hfq-Proteins in *B. pertussis* nach wie vor Klärungsbedarf. Denkbar wäre hierbei natürlich der Test im Tiermodell, aber auch der Versuch mit anderen Zelllinien, wie z. B. Makrophagen, könnte ein klareres Bild bezüglich der Rolle von Hfq und damit auch von sRNAs in der Pathogenese von *B. pertussis* geben.

6. Rolle der P4-sRNA bei der Virulenzgenexpression in *B. pertussis*

Bereits 1990 postulierten Scarlato *et al.* die Existenz eines Transkripts, das komplementär zum 5'-untranslatierten Bereich der *bvgA*-mRNA ist (Scarlato *et al.*, 1990). In dieser Arbeit konnte die Existenz des sogenannten P4-Transkripts oder P4-sRNA über Primer Extension-Analyse bestätigt werden und dessen Transkriptionsstartpunkt bestimmt werden, der 24 bp vor dem *BvgA*-Startcodon liegt (s. V 7.1.). Es konnte weder über Northern Blot Analyse noch über 3'RACE das 3'Ende der P4-sRNA ermittelt werden, was evtl. mit der ausgeprägten Sekundärstruktur des P4-Transkripts zusammenhängen könnte (s. Abb. 59). Über eine weitere Primer Extension-Analyse konnte jedoch bestimmt werden, dass das P4-Transkript mindestens 242 bp lang ist. Außerdem wurde mittels eines *fhaB*-spezifischen Primers nur die Aktivität des bereits ermittelten *fhaB*-Promotors nachgewiesen, so dass man davon ausgehen kann, dass es sich bei der P4-sRNA nicht um einen untranslatierten Bereich der *fhaB*-mRNA handelt (Daten nicht gezeigt).

Eine erste Funktionsanalyse der P4-sRNA zeigte, dass diese *BvgA*-abhängig transkribiert wird, nämlich in der *Bvg*⁺-Phase. So konnte in den beiden *Bvg*-Mutanten *Bp* 347 und *Bp* 359 keine P4-Transkription nachgewiesen werden. Auch unter modulierenden Bedingungen, also in Anwesenheit von Sulfationen, kommt es zu keiner P4-Transkription. Um die P4-sRNA genauer zu charakterisieren, sollte anschließend der intergenische Bereich zwischen dem *fhaB*- und dem *bvgA*-Gen deletiert werden. Trotz mehrerer Versuche und Ansätze, z. B. mit verschiedenen Vektoren, homologen Bereichen und Resistenzkassetten, war es nicht möglich, eine $\Delta P4$ -Mutante zu gewinnen. Deshalb sollte das auf dem pSORTP1-Vektor basierenden System zur Gewinnung einer Knockout-Mutante kontrolliert werden, indem eine Δhfq -Mutante generiert wurde. Wie unter V 2.1. beschrieben, war die Herstellung der Δhfq -Mutante erfolgreich, so dass wir ein fehlerhaftes Knockout-System als Grund für die erfolglose Herstellung der $\Delta P4$ -Mutante ausschließen können. Umgekehrt lässt dies nur den Schluss zu, dass es sich bei der P4-sRNA um ein essentielles Transkript handelt. So könnte es sich bei der P4-sRNA um eine strukturelle RNA

handeln oder evtl. sogar um ein proteincodierendes Transkript. Die Suche nach potentiellen ORFs in der P4-sRNA brachte zwei ORFs zu Tage: zum einen ein 25 AS großes Protein, zum anderen ein 51 AS großes Protein, wobei beide putative Proteine keine Homologie zu bekannten Proteinen aufweisen. Gegen das P4-Transkript als essentielles Gen sprechen dessen perfekte Komplementarität zur *bvgA*-mRNA, die in *B. pertussis* nicht essentiell ist, und die Bvg-abhängige Transkription der P4-sRNA.

Scarlato *et al.* postulierten, dass die P4-sRNA über die perfekte Komplementarität zu den untranslatierten Leader-Sequenzen der *bvgAS*-mRNA deren Interaktion mit den Ribosomen fördern und damit als positiv regulatorische sRNA fungieren könnte (Scarlato *et al.*, 1990). In dieser Arbeit konnte ein Konstrukt gewonnen werden, das die induzierbare Überexpression der 242 bp langen P4-sRNA ermöglicht. Anschließend wurde die Auswirkung auf die BvgA-Expression analysiert. Hierbei zeigte sich, dass es nicht wie von Scarlato *et al.* vermutet zu einer verstärkten BvgA-Expression nach P4-Induktion kommt, sondern zu einer gleich starken bzw. minimal schwächeren BvgA-Expression. Auch bei dem durch BvgA-regulierten PTX kommt es zu einer minimal schwächeren Expression nach P4-Induktion. Hierbei ist zu beachten, dass nur das experimentell bestimmte, 242 bp-lange Transkript für die Überexpression verwendet wurde. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das volle P4-Transkript mit bestimmten strukturellen Eigenschaften für eine effiziente Interaktion mit der *bvgA*-mRNA benötigt wird, welche in unserem Konstrukt nicht vorhanden waren. In dieser Hinsicht steckt bezüglich der Funktion der P4-sRNA noch dringend Klärungsbedarf.

7. Abschließende Betrachtungen

Es gibt viele verschiedene Möglichkeiten, sRNAs in Bakterien aufzufinden: bioinformatische Vorhersagen von sRNAs, direkte Detektion von sRNAs mittels Microarrays, direkte Isolation über sogenanntes Shotgun Cloning und Co-Purifikation mit Proteinen (Vogel & Sharma, 2005; Altuvia, 2007). Die Co-Immunopräzipitation von sRNAs mit Hfq über Hfq-spezifische Antikörper hat sich als nützliche Methode erwiesen, da Hfq für eine Vielzahl an sRNA-mRNA-Interaktionen benötigt wird (Wassarman *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003). *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* sind, was die Analyse von sRNAs angeht, noch Neuland. Kürzlich wurden erstmals sRNAs in *B. pertussis* detektiert (Hot *et al.*, 2011). Nach einer *in silico*-Vorhersage konnte für 13 der 20 ermittelten Kandidaten ein Transkript mittels Northern Blot nachgewiesen werden, die als *Bordetella pertussis* RNAs (Bpr) bezeichnet wurden. Die Expression von vier dieser sRNAs variierte dabei zwischen verschiedenen Wachstumsphasen, während eine sRNA, BprJ2, BvgAS-abhängig exprimiert wurde. Welche Funktion diese sRNAs nun in *B. pertussis* innehaben und

welche Ziel-mRNAs durch sie reguliert werden, ist bislang nicht charakterisiert. Ihre Existenz in *B. pertussis* ist jedoch ein erstes Indiz, dass auch in diesem Organismus regulatorische Vorgänge durch sRNAs vermittelt werden, an welchen das Hfq-Protein beteiligt sein könnte. Von den detektierten sRNAs liegt nur BprF2 in unmittelbarer Nähe zu dem in dieser Arbeit ermittelten Hfq-regulierten Protein BP2909 (Hot *et al.*, 2011). Da *trans*-kodierte sRNAs von einem anderen genetischen Locus als ihre Ziel-mRNAs transkribiert werden (s. II 2.3.), ist die Lokalisation der sRNAs alleine nicht aussagekräftig. Sollten die detektierten sRNAs von *B. pertussis* weiter charakterisiert werden, so wird es interessant sein zu sehen, ob diese bei der Expression der hier ermittelten Hfq-regulierten Proteine eine Funktion haben oder die hier beobachteten Defizite, wie z. B. im Wachstum oder in der Biofilmbildung, erklären können.

VII Verzeichnisse

1. Literaturverzeichnis

- Aiba H.** (2007) Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Curr Opin Microbiol* **10**(2):134-9.
- Akerley BJ & Miller JF.** (1993) Flagellin gene transcription in *Bordetella bronchiseptica* is regulated by the BvgAS virulence control system. *J Bacteriol* **175**(11):3468-79.
- Akerley BJ, Cotter PA & Miller JF.** (1995) Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the *Bordetella*-host interaction. *Cell* **80**(4):611-20.
- Altuvia S.** (2007) Identification of bacterial small non-coding RNAs: experimental approaches. *Curr Opin Microbiol* **10**(3):257-61.
- Anderl JN, Franklin MJ & Stewart PS.** (2000) Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **44**(7):1818-24.
- Andersen J, Forst SA, Zhao K, Inouye M & Delihans N.** (1989) The function of *micF* RNA. *micF* RNA is a major factor in the thermal regulation of OmpF protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **264**(30):17961-70.
- Ansong C, Yoon H, Porwollik S, Mottaz-Brewer H, Petritis BO, Jaitly N, Adkins JN, McClelland M, Heffron F & Smith RD.** (2009) Global systems-level analysis of Hfq and SmpB deletion mutants in *Salmonella*: implications for virulence and global protein translation. *PLoS One* **4**(3):e4809.
- Antoine R, Raze D & Loch C.** (2000a): Genomics of *Bordetella pertussis* toxins. *Int J Med Microbiol* **290**(4-5):301-5.
- Antoine R, Alonso S, Raze D, Coutte L, Lesjean S, Willery E, Loch C & Jacob-Dubuisson F.** (2000b): New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **182**(20):5902-5.
- Arico B & Rappuoli R.** (1987) *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. *J Bacteriol* **169**(6):2847-53.
- Arico B, Miller JF, Roy C, Stibitz S, Monack D, Falkow S, Gross R & Rappuoli R.** (1989) Sequences required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction proteins. *PNAS* **86**(17):6671-5.
- Armstrong S & Gross R.** (2007) *Bordetella*: Molecular Microbiology: Metabolism and physiology of *Bordetella* species. Norfolk, U.K.: Horizon Scientific Press.
- Azam TA, Hiraga S & Ishihama A.** (2000) Two types of localization of the DNA-binding proteins within the *Escherichia coli* nucleoid. *Genes Cells* **5**(8):613-26.

- Bai G, Golubov A, Smith EA & McDonough KA.** (2010) The importance of the small RNA chaperone Hfq for growth of epidemic *Yersinia pestis*, but not *Yersinia pseudotuberculosis*, with implications for plague biology. *J Bacteriol* **192**(16):4239-45.
- Banemann A, Deppisch H & Gross R.** (1998) The lipopolysaccharide of *Bordetella bronchiseptica* acts as a protective shield against antimicrobial peptides. *Infect Immun* **66**(12):5607-12.
- Beall B & Sanden GN.** (1995) A *Bordetella pertussis* *fepA* homologue required for utilization of exogenous ferric enterobactin. *Microbiology* **141**(Pt 12):3193-205.
- Beall B & Hoenes T.** (1997) An iron-regulated outer-membrane protein specific to *Bordetella bronchiseptica* and homologous to ferric siderophore receptors. *Microbiology* **143**(Pt1):135-145.
- Beaumont FC, Kang HY, Brickman TJ & Armstrong SK.** (1998) Identification and characterization of *alcR*, a gene encoding an AraC-like regulator of alcaligin siderophore biosynthesis and transport in *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol* **180**(4):862-70.
- Beier D, Deppisch H & Gross R.** (1996) Conserved sequence motifs in the unorthodox BvgS two component sensor protein of *Bordetella pertussis*. *Mol Gen Genet* **252**(1-2):169-76.
- Beier D & Gross R.** (2006) Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol* **9**(2):143-52.
- Beisel CL & Storz G.** (2010) Base pairing small RNAs and their roles in global regulatory networks. *FEMS Microbiol Rev* **34**(5):866-82.
- Bock A & Gross R.** (2001) The BvgAS two-component system of *Bordetella* spp.: a versatile modulator of virulence gene expression. *Int J Med Microbiol* **291**(2):119-30.
- Bock A & Gross R.** (2002) The unorthodox histidine kinases BvgS and EvgS are responsive to the oxidation status of a quinone electron carrier. *Eur J Biochem* **269**(14):3479-84.
- Bohn C, Rigoulay C & Boulouc P.** (2007) No detectable effect of RNA-binding protein Hfq absence in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* **7**:10.
- Bordet J & Gengou O.** (1906) Le microbe de la coqueluche. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **20**:731-741.
- Bordet J & Gengou O.** (1909) L'endotoxine coquelucheuse. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **23**:415-419.
- Boucher PE, Menozzi FD & Loch C.** (1994) The modular architecture of bacterial response regulators. Insights into the activation mechanism of the BvgA transactivator of *Bordetella pertussis*. *J Mol Biol* **241**(3), 363-77.
- Boucher PE & Stibitz S.** (1995): Synergistic binding of RNA polymerase and BvgA phosphate to the pertussis toxin promoter of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **177**(22):6486-91.

- Boucher PE, Murakami K, Ishihama A & Stibitz S.** (1997) Nature of DNA binding and RNA polymerase interaction of the *Bordetella pertussis* BvgA transcriptional activator at the *fha* promoter. *J Bacteriol* **179**(5):1755-63.
- Boucher PE, Yang MS & Stibitz S.** (2001a) Mutational analysis of the high-affinity BvgA binding site in the *fha* promoter of *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol* **40**(4):991-9.
- Boucher PE, Yang MS, Schmidt DM & Stibitz S.** (2001b) Genetic and biochemical analyses of BvgA interaction with the secondary binding region of the *fha* promoter of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **183**(2):536-44.
- Boucher PE, Maris AE, Yang MS & Stibitz S.** (2003) The response regulator BvgA and RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain bind simultaneously to different faces of the same segment of promoter DNA. *Mol Cell* **11**(1):163-73.
- Boursaux-Eude C & Guiso N.** (2000) Polymorphism of repeated regions of pertactin in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* **68**(8):4815-7.
- Boyd A & Chakrabarty AM.** (1994) Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **60**(7):2355-9.
- Bradford WL & Slavin B.** (1937) An organism resembling *Hemophilus Pertussis*: with special reference to color changes produced by its growth upon certain media. *Am J Public Health Nations Health* **27**(12):1277-82.
- Branda SS, Vik S, Friedman L & Kolter R.** (2005) Biofilms: The matrix revisited. *Trends Microbiol* **13**(1): 20-6.
- Brantl S.** (2007) Regulatory mechanisms employed by *cis*-encoded antisense RNAs. *Curr Opin Microbiol* **10**(2):102-9.
- Brennan RG & Link TM.** (2007) Hfq structure, function and ligand binding. *Curr Opin Microbiol* **10**(2):125-33.
- Brescia CC, Mikulecky PJ, Feig AL & Sledjeski DD.** (2003) Identification of the Hfq-binding site on DsrA RNA: Hfq binds without altering DsrA secondary structure. *RNA* **9**(1):33-43.
- Brickman TJ & Armstrong SK.** (1999) Essential role of the iron-regulated outer membrane receptor FauA in alcaligin siderophore-mediated iron uptake in *Bordetella* species. *J Bacteriol* **181**(19):5958-66.
- Chang AC & Cohen SN.** (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* **134**(3):1141-56.
- Chen S, Zhang A, Blyn LB & Storz G.** (2004) MicC, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**(20):6689-97.
- Cheng LW & Schneewind O.** (2000) Type III machines of Gram-negative bacteria: delivering the goods. *Trends Microbiol* **8**(5):214-20.
- Cherry JD, Gornbein J, Heining U & Stehr K.** (1998) A search for serologic correlates of immunity to *Bordetella pertussis* cough illnesses. *Vaccine* **16**(20):1901-6.

- Cherry JD & Heiniger U.** (2004) Textbook of pediatric infectious diseases: Pertussis and other *Bordetella* infections
Philadelphia: The W.B. Saunders Co.
- Cherry JD.** (2005) The epidemiology of pertussis: a comparison of the epidemiology of the disease pertussis with the epidemiology of *Bordetella pertussis* infection. *Pediatrics* **115**(5):1422-7.
- Christiansen JK, Larsen MH, Ingmer H, Sogaard-Andersen L & Kallipolitis BH.** (2004) The RNA-binding protein Hfq of *Listeria monocytogenes*: role in stress tolerance and virulence. *J Bacteriol* **186**(11):3355-62.
- Conover MS, Sloan GP, Love CF, Sukumar N & Deora R.** (2010) The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Mol Microbiol* **77**(6):1439-55.
- Cookson BT, Cho HL, Herwaldt LA & Goldman WE.** (1989a) Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **57**(7):2223-9.
- Cookson BT, Tyler AN & Goldman WE.** (1989b) Primary structure of the peptidoglycan-derived tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Biochemistry* **28**(4):1744-9.
- Costerton JW, Stewart PS & Greenberg EP.** (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**(5418):1318-22.
- Cotter PA & Miller JF.** (1994) BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model. *Infect Immun* **62**(8):3381-90.
- Cotter PA & Miller JF.** (1997) A mutation in the *Bordetella bronchiseptica* bvgS gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation, and identifies a new class of Bvg-regulated antigens. *Mol Microbiol* **24**(4):671-85.
- Cotter PA, Yuk MH, Mattoo S, Akerley BJ, Boschwitz J, Relman DA & Miller JF.** (1998): Filamentous hemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* is required for efficient establishment of tracheal colonization. *Infect Immun* **66**(12):5921-9.
- Cotter PA & Miller JF.** (2000) Principles of bacterial pathogenesis: *Bordetella* London: Academic Press, Ltd.
- Cotter PA & DiRita VJ.** (2000) Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annu Rev Microbiol* **54**:519-65.
- Cotter PA & Jones AM.** (2003) Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol* **11**(8):367-73.
- Cowell JL, Hewlett EL & Manclark CR.** (1979) Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **25**(3):896-901.

- Crowcroft NS, Andrews N, Rooney C, Brisson M & Miller E.** (2002) Deaths from pertussis are underestimated in England. *Arch Dis Child* **86**(5):336-8.
- Crowcroft NS, Stein C, Duclos P & Birmingham M.** (2003) How best to estimate the global burden of pertussis? *Lancet Infect Dis* **3**(7):413-8.
- Cummings CA, Bootsma HJ, Relman DA & Miller JF.** (2006) Species- and strain-specific control of a complex, flexible regulon by *Bordetella* BvgAS. *J Bacteriol* **188**(5):1775-85.
- Davey ME & O'Toole GA.** (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(4):847-67.
- de Haseth PL & Uhlenbeck OC.** (1980a) Interaction of *Escherichia coli* host factor protein with oligoriboadenylates. *Biochemistry* **19**(26):6138-6146.
- de Haseth PL, Uhlenbeck OC.** (1980b) Interaction of *Escherichia coli* host factor protein with Qb ribonucleic acid. *Biochemistry* **19**(26):6146-6151.
- de Jong MF.** (1992) Diseases of swine: (Progressive) atrophic rhinitis. *Iowa: Wolfe, Ames.*
- de Melker HE, Conyn-van Spaendonck MA, Rumke HC, van Wijngaarden JK, Mooi FR & Schellekens JF.** (1997) Pertussis in The Netherlands: an outbreak despite high levels of immunization with whole-cell vaccine. *Emerg Infect Dis* **3**(2):175-8.
- Deora R, Bootsma HJ, Miller JF & Cotter PA.** (2001) Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Mol Microbiol* **40**(3):669-83.
- Deora R.** (2002) Differential regulation of the *Bordetella bipA* gene: distinct roles for different BvgA binding sites. *J Bacteriol* **184**(24):6942-51.
- Ding Y, Davis BM & Waldor MK.** (2004) Hfq is essential for *Vibrio cholerae* virulence and downregulates σ^E expression. *Mol Microbiol* **53**(1):345-54.
- Diestra E, Cayrol B, Arluison V & Risco C.** (2009) Cellular electron microscopy imaging reveals the localization of the Hfq protein close to the bacterial membrane. *PLoS One* **4**(12):e8301.
- Donlan RM & Costerton JW.** (2002) Biofilms: Survival Mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**(2):167-93.
- Eldering G & Kendrick P.** (1938): *Bacillus parapertussis*, a species resembling both *Bacillus pertussis* and *Bacillus bronchiseptica* but identical with neither. *J Bacteriol* **35**(6):561-72.
- Fantappiè L, Metruccio MM, Seib KL, Oriente F, Cartocci E, Ferlicca F, Giuliani MM, Scarlato V & Delany I.** (2009) The RNA chaperone Hfq is involved in the stress response and virulence in *Neisseria meningitidis* and is a pleiotropic regulator of protein expression. *Infect Immun* **77**(5):1842-53.

- Farizo KM, Huang T & Burns DL.** (2000) Importance of holotoxin assembly in Ptl-mediated secretion of pertussis toxin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **68**(7):4049-54.
- Fennelly NK, Sisti F, Higgins SC, Ross PJ, van der Heide H, Mooi FR, Boyd A & Mills KH.** (2008) *Bordetella pertussis* expresses a functional type III secretion system that subverts protective innate and adaptive immune responses. *Infect Immun* **76**(3):1257-66.
- Fernandez RC & Weiss AA.** (1994) Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun* **62**(11):4727-38.
- Finn TM & Stevens LA.** (1995) Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol Microbiol* **16**(4):625-34.
- Finn TM & Amsbaugh DF.** (1998) Vag8, a *Bordetella pertussis* bvg-regulated protein. *Infect Immun* **66**(8):3985-9.
- Fischer M, Zhang QI, Hubbard RE & Thomas GH.** (2010) Caught in a TRAP: substrate-binding proteins in secondary transport. *Trends Microbiol* **18**(10):471-8.
- Flak TA & Goldman WE.** (1999) Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cell Microbiol* **1**(1):51-60.
- Flak TA, Heiss LN, Engle JT & Goldman WE.** (2000): Synergistic epithelial responses to endotoxin and a naturally occurring muramyl peptide. *Infect Immun* **68**(3):1235-42.
- Fletcher M.** (1996) Bacterial attachment in aquatic environments: a diversity of surfaces and adhesion strategies, p. 1-24. In *Bacterial adhesion: molecular and ecological diversity*. John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y
- Folichon M, Arluison V, Pellegrini O, Huntzinger E, Régnier P & Hajnsdorf E.** (2003) The poly(A) binding protein Hfq protects RNA from RNase E and exoribonucleolytic degradation. *Nucleic Acids Res* **31**(24):7302-10.
- Forsyth K.** (2007) Pertussis, still a formidable foe. *Clin Infect Dis* **45**(11).
- Forsyth KD, Wirsing von Konig CH, Tan T, Caro J & Plotkin S.** (2007) Prevention of pertussis: recommendations derived from the second Global Pertussis Initiative roundtable meeting. *Vaccine* **25**(14):2634-42.
- Fozo EM, Hemm MR & Storz G.** (2008) Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**(4):579-89.
- Franze de Fernandez MT, Eoyang L & August JT.** (1968) Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Q β -RNA. *Nature* **219**(5154):588-90.
- Fuchs T & Gross R.** (2001) Mechanismen bakterieller Pathogenität: Die "molekularen Talente" des Keuchhustenerregers. *Biologie in unserer Zeit* **31**(1):10-20.

- Galan JE & Collmer A.** (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**(5418):1322-28.
- Geng J, Song Y, Yang L, Feng Y, Qiu Y, Li G, Guo J, Bi Y, Qu Y, Wang W, Wang X, Guo Z, Yang R & Han Y.** (2009) Involvement of the post-transcriptional regulator Hfq in *Yersinia pestis* virulence. *PLoS One* **4**(7):e6213.
- Gerlach G, von Wintzingerode F, Middendorf B & Gross R.** (2001) Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. *Microbes Infect* **3**(1):61-72.
- Geuijen CA, Willems RJ & Mooi FR.** (1996) The major fimbrial subunit of *Bordetella pertussis* binds to sulfated sugars. *Infect Immun* **64**(7):2657-65.
- Giardina PC, Foster LA, Musser JM, Akerley BJ, Miller JF & Dyer DW.** (1995) *bvg*-Repression of alcaligin synthesis in *Bordetella bronchiseptica* is associated with phylogenetic lineage. *J Bacteriol* **177**(21):6058-63.
- Gilbert P, Das J & Foley I.** (1997) Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* **11**(1):160-7.
- Glaser P, Danchin A, Ladant D, Barzu O & Ullmann A.** (1988) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: the gene and the protein. *Tokai J Exp Clin Med* **13 Suppl**:239-52.
- Görke B & Vogel J.** (2008) Noncoding RNA control of the making and breaking of sugars. *Genes Dev* **22**(21):2914-25.
- Gogol EB, Cummings CA, Burns RC & Relman DA.** (2007) Phase variation and microevolution at homopolymeric tracts in *Bordetella pertussis*. *BMC Genomics* **8**:122.
- Goodnow RA.** (1980) Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol Rev* **44**(4):722-38.
- Gottesman S.** (2005) Micros for microbes: Non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet* **21**(7):399-404.
- Gray MC, Ross W, Kim K & Hewlett EL.** (1999) Characterization of binding of adenylate cyclase toxin to target cells by flow cytometry. *Infect Immun* **67**(9):4393-9.
- Greco D, Salmaso S, Mastrantonio P, Giuliano M, Tozzi AE, Anemona A, Ciofi degli Atti ML, Giammanco A, Panei P, Blackwelder WC, Klein DL & Wassilak SG.** (1996) A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. Progetto Pertosse Working Group. *N Engl J Med* **334**(6):341-8.
- Gross R & Rappuoli R.** (1989): Pertussis toxin promoter sequences involved in modulation. *J Bacteriol* **171**(7):4026-30.
- Gross R, Keidel K & Schmitt S.** (2010) Resemblance and divergence: the "new" members of the genus *Bordetella*. *Med Microbiol Immunol* **199**(3):155-63.
- Grundy FJ & Henkin TM.** (2006) From ribosome to riboswitch: Control of gene expression in bacteria by RNA structural rearrangements. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **41**(6):329-38.

- Geirard P, Weber C, Le Coustumier A & Guiso N.** (1995) Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. *J Clin Microbiol* **33**(8):2002-6.
- Geirard P, Druilhe A, Pretolani M & Guiso N.** (1998) Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection *in vivo*. *Infect Immun* **66**(4):1718-25.
- Güriş D, Strebel PM, Bardenheier B, Brennan M, Tachdjian R, Finch E, Wharton M & Livengood JR.** (1999) Changing epidemiology of pertussis in the United States: increasing reported incidence among adolescents and adults, 1990-1996. *Clin Infect Dis* **28**(6):1230-7.
- Hackett M, Guo L, Shabanowitz J, Hunt DF & Hewlett EL.** (1994) Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science* **266**(5184):433-5.
- Hajnsdorf E & Régnier P.** (2000) Host factor Hfq of *Escherichia coli* stimulates elongation of poly(A) tails by poly(A) polymerase I. *PNAS* **97**(4):1501-5.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW & Stoodley P.** (2004) Bacterial Biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**(2):95-108.
- Hansen AM & Kaper JB.** (2009) Hfq affects the expression of the LEE pathogenicity island in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **73**(3):446-65.
- Halperin SA.** (2007) The control of pertussis - 2007 and beyond. *N Engl J Med* **356**(2):110-3.
- Hazenbos WL, van den Berg BM, Geuijen CW, Mooi, FR & van Furth R.** (1995) Binding of FimD on *Bordetella pertussis* to very late antigen-5 on monocytes activates complement receptor type 3 via protein tyrosine kinases. *J Immunol* **155**(8):3972-8.
- Heiss LN, Flak TA, Lancaster JR Jr, McDaniel ML & Goldman WE.** (1993a) Nitric oxide mediates *Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin damage to the respiratory epithelium. *Infect Agents Dis* **2**(4):173-7.
- Heiss LN, Moser SA, Unanue ER & Goldman WE.** (1993b) Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of pertussis. *Infect Immun* **61**(8):3123-8.
- Henderson IR & Nataro JP.** (2001) Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* **69**(3):1231-43.
- Herrou J, Debrie A, Willery E, Renaud-Mongénie G, Locht C, Mooi F, Jacob-Dubuisson F & Antoine R.** (2009) Molecular evolution of the two-component system BvgAS involved in virulence regulation in *Bordetella*. *PLoS One* **4**(9):e6996.
- Herrou J, Bompard C, Wintkens R, Dupré E, Willery E, Villeret V, Locht C, Antoine R & Jacob-Dubuisson F.** (2010) Periplasmic domain of the sensor-kinase BvgS reveals a new paradigm for the Venus flytrap mechanism. *PNAS* **107**(40):17351-5.

- Hot D, Slupek S, Wulbrecht B, D'Hondt A, Hubans C, Antoine R, Loch C & Lemoine Y.** (2011) Detection of small RNAs in *Bordetella pertussis* and identification of a novel repeated genetic element. *BMC Genomics* **12**(1):207.
- Inatsuka CS, Julio SM & Cotter PA.** (2005) *Bordetella* filamentous hemagglutinin plays a critical role in immunomodulation, suggesting a mechanism for host specificity. *PNAS* **102**(51):18578-83.
- Irie Y, Mattoo S & Yuk MH.** (2004) The Bvg virulence control system regulates biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol* **186**(17):5692-8.
- Irie Y, Preston A & Yuk MH.** (2006) Expression of the primary carbohydrate component of the *Bordetella bronchiseptica* biofilm matrix is dependent on growth phase but independent of Bvg regulation. *J Bacteriol* **188**(18):6680-7.
- Jacob-Dubuisson F, El-Hamel C, Saint N, Guedin S, Willery E, Molle G & Loch C.** (1999) Channel formation by PhaC, the outer membrane protein involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Biol Chem* **274**(53):37731-5.
- Jacob-Dubuisson F, Loch C & Antoine R.** (2001) Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol Microbiol* **40**(2):306-13.
- Jensen ET, Kharazmi A, Garred P, Kronberg G, Fomsgaard A, Mollmess TE & Hoiby N.** (1993) Complement activation by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microb Pathog* **15**(5):377-88.
- Jesaitis AJ, Franklin MJ, Berglund D, Beyenal H & Lewandowski Z.** (2003) Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. *J Immunol* **171**(8):4329-39.
- Johansen J, Eriksen M, Kallipolitis B & Valentin-Hansen P.** (2008) Down-regulation of outer membrane proteins by non-coding RNAs: Unraveling the cAMP-CRP- and σ^E -dependent CyaR-*ompX* regulatory case. *J Mol Biol* **383**(1):1-9.
- Jones AM, Boucher PE, Williams CL, Stibitz S & Cotter PA.** (2005) Role of BvgA phosphorylation and DNA binding affinity in control of Bvg-mediated phenotypic phase transition in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol* **58**(3):700-13.
- Jouenne T, Vilain S, Cosette P & Junter GA.** (2004) Proteomics of biofilm bacteria. *Curr Proteomics* **1**(3): 211-9.
- Jousselin A, Metzinger L & Felden B.** (2009) On the facultative requirement of the bacterial RNA chaperone, Hfq. *Trends Microbiol* **17**(9):399-405.
- Kajitani M, Kato A, Wada A, Inokuchi Y & Ishihama A.** (1994) Regulation of the *Escherichia coli* *hfq* gene encoding the host factor for phage Q β . *J Bacteriol* **176**(2):531-4.
- Kang HY & Armstrong SK.** (1998) Transcriptional analysis of the *Bordetella* alcaligin siderophore biosynthesis operon. *J Bacteriol* **180**(4):855-61.

- Kaplan JB, Meyerhofer MF & Fine DH.** (2003) Biofilm growth and detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Bacteriol* **185**(4):1399-404.
- Kaplan JB, Ragunath C, Ramasubbu N & Fine DH.** (2003) Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. *J Bacteriol* **185**(16):4693-8.
- Karimova G, Bellalou J & Ullmann A.** (1996) Phosphorylation-dependent binding of BvgA to the upstream region of the *cyoA* gene of *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol* **20**(3):489-96.
- Karimova G & Ullmann A.** (1997) Characterization of DNA binding sites for the BvgA protein of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **179**(11):3790-2.
- Katada T, Oinuma M & Ui M.** (1986) Mechanisms for inhibition of the catalytic activity of adenylate cyclase by the guanine nucleotide-binding proteins serving as the substrate of islet-activating protein, pertussis toxin. *J Biol Chem* **261**(11):5215-21.
- Kelly DJ & Thomas GH.** (2001) The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev* **25**(4):405-24.
- Khardori N & Yassien M.** (1995) Biofilms in device-related infections. *J Ind Microbiol* **15**(3):141-7.
- Khelef N, Sakamoto H & Guiso N.** (1992) Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. *Microb Pathog* **12**(3):227-35.
- Klausen M, Aaes-Jørgensen A, Molin S & Tolker-Nielsen T.** (2003) Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* **50**(1):61-8.
- Knapp S & Mekalanos JJ.** (1988) Two *trans*-acting regulatory genes (*vir* and *mod*) control antigenic modulation in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **170**(11):5059-66.
- Ko KS, Peck KR, Oh WS, Lee NY, Lee JH & Song JH.** (2005) New species of *Bordetella*, *Bordetella ansorpii* sp. nov., isolated from the purulent exudate of an epidermal cyst. *J Clin Microbiol* **43**(5):2516-9.
- Kulesus RR, Diaz-Perez K, Slechta ES, Eto DS & Mulvey MA.** (2008) Impact of the RNA chaperone Hfq on the fitness and virulence potential of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **76**(7):3019-26.
- Lacey BW.** (1960) Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*. *J Hyg (Lond)* **58**(1):57-93.
- Ladant D & Ullmann A.** (1999) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol* **7**(4):172-6.
- Lambert-Buisine C, Willery E, Loch C & Jacob-Dubuisson F.** (1998) N-terminal characterization of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol Microbiol* **28**(6):1283-93.
- Leslie PH & Gardner AD.** (1931) The phases of *haemophilus pertussis*. *J Hyg (Lond)* **31**(3):423-55.

- Link TM, Valentin-Hansen P & Brennan RG.** (2009) Structure of *Escherichia coli* Hfq bound to polyriboadenylate RNA. *PNAS* **106**(46):19292-7.
- Lively I & Wardlaw AC.** (1984) Production and properties of *Bordetella pertussis* heat-labile toxin. *J Med Microbiol* **17**(1):91-103.
- Locht C & Keith JM.** (1986) Pertussis toxin gene: nucleotide sequence and genetic organization. *Science* **232**(4755):1258-64.
- Locht C, Geoffroy MC & Renaud G.** (1992) Common accessory genes for the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the *papC* and *papD* gene families. *EMBO J* **11**(9):3175-83.
- Locht C, Bertin P, Menozzi FD & Renaud G.** (1993) The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent *Bordetella* spp. *Mol Microbiol* **9**(4):653-60.
- Locht C & Antoine R.** (1995) A proposed mechanism of ADP-ribosylation catalyzed by the pertussis toxin S1 subunit. *Biochimie* **77**(5):333-40.
- Locht C, Antoine R & Jacob-Dubuisson F.** (2001) *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr Opin Microbiol* **4**(1):82-9.
- Loomis WF, Kuspa A & Shaulsky G.** (1998): Two-component signal transduction systems in eukaryotic microorganism. *Curr Opin Microbiol* **1**(6):643-8.
- Lopez-Moreno M.** (1952) El genero *Bordetella*. *Microbiol Esp* **5**(177-181).
- Majdalani N, Vanderpool CK & Gottesman S.** (2005) Bacterial small RNA regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**(2):93-113.
- Mandal M & Breaker RR.** (2004) Gene regulation by riboswitches. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(6):451-63.
- Marques RR & Carbonetti NH.** (1997) Genetic analysis of pertussis toxin promoter activation in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol* **24**(6):1215-24.
- Marsh PD.** (2003) Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. *Oral Dis* **9 Suppl 1**:16-22.
- Martinez de Tejada G, Cotter PA, Heininger U, Camilli A, Akerley BJ, Mekalanos JJ & Miller JF.** (1998) Neither the Bvg- phase nor the *vrg6* locus of *Bordetella pertussis* is required for respiratory infection in mice. *Infect Immun* **66**(6):2762-8.
- Massé E, Vanderpool CK & Gottesman S.** (2005) Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**(20):6962-71.

- Mastrantonio P, Stefanelli P, Giuliano M, Herrera Rojas Y, Ciofi degli Atti M, Anemona A & Tozzi AE.** (1998) *Bordetella parapertussis* infection in children: epidemiology, clinical symptoms, and molecular characteristics of isolates. *J Clin Microbiol* **36**(4):999-1002.
- Masuda M, Betancourt L, Matsuzawa T, Kashimoto T, Takao T, Shimonishi Y & Horiguchi Y.** (2000) Activation of rho through a cross-link with polyamines catalyzed by *Bordetella* dermonecrotizing toxin. *EMBO J* **19**(4):521-30.
- Mattoo S, Yuk MH, Huang LL & Miller JF.** (2004) Regulation of type III secretion in *Bordetella*. *Mol Microbiol* **52**(4):1201-14.
- Mattoo S & Cherry JD.** (2005) Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* **18**(2):326-82.
- Mazar J & Cotter PA.** (2006) Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol Microbiol* **62**(3):641-54.
- McCandlish IA, Thompson H, Cornwell HJ & Wright NG.** (1978) A study of dogs with kennel cough. *Vet Rec* **102**(14):293-301.
- McMillan DJ, Shojaei M, Chhatwal GS, Guzman CA & Walker MJ.** (1996) Molecular analysis of the *bvg*-repressed urease of *Bordetella bronchiseptica*. *Microb Pathog* **21**(5):379-94.
- McNealy TL, Forsbach-Birk V, Shi C & Marre R.** (2005) The Hfq homolog in *Legionella pneumophila* demonstrates regulation by LetA and RpoS and interacts with the global regulator CsrA. *J Bacteriol* **187**(4):1527-32.
- Melton AR & Weiss AA.** (1989) Environmental regulation of expression of virulence determinants in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **171**(11):6206-12.
- Menzio D, Jensen RT & Gardner JD.** (1990) Dispersed pancreatic acinar cells and pancreatic acini. *Methods Enzymol* **192**:271-9.
- Merkel TJ, Barros C & Stibitz S.** (1998a): Characterization of the *bvgR* locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **180**(7):1682-90.
- Merkel TJ, Stibitz S, Keith JM, Leef M & Shahin R.** (1998b): Contribution of regulation by the *bvg* locus to respiratory infection of mice by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **66**(9):4367-73.
- Merkel TJ, Boucher PE, Stibitz S & Grippe VK.** (2003) Analysis of *bvgR* expression in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **185**(23):6902-12.
- Mikulecky PJ, Kaw MK, Brescia CC, Takach JC, Sledjeski DD & Feig AL.** (2004) *Escherichia coli* Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, *rpoS* and poly(A) RNAs. *Nat Struct Mol Biol* **11**(12):1206-14.
- Miller JF, Johnson SA, Black WJ, Beattie DT, Mekalanos JJ & Falkow S.** (1992): Isolation and analysis of constitutive sensory transduction mutations in the *Bordetella pertussis bvgS* gene. *J Bacteriol* **174**(3):970-979.

- Mishra M & Deora R.** (2005) Mode of action of the *Bordetella* BvgA protein: transcriptional activation and repression of the *Bordetella bronchiseptica* *bipA* promoter. *J Bacteriol* **187**(18):6290-9.
- Mishra M, Parise G, Jackson KD, Wozniak DJ & Deora R.** (2005) The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in *Bordetella*. *J Bacteriol* **187**(4):1474-84.
- Mocny JC, Olson JS & Connell TD.** (2007) Passively released heme from hemoglobin and myoglobin is a potential source of nutrient iron for *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* **75**(10):4857-66.
- Mohanty BK, Maples VF & Kushner SR.** (2004) The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **54**(4):905-20.
- Moll I, Leitsch D, Steinhauser T & Bläsi U.** (2003) RNA chaperone activity of the Sm-like Hfq protein. *EMBO Rep* **4**(3):284-9.
- Monack DM, Arico B, Rappuoli R & Falkow S.** (1989) Phase variants of *Bordetella bronchiseptica* arise by spontaneous deletions in the *vir* locus. *Mol Microbiol* **3**(12):1719-28.
- Monroe D.** (2007) Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol* **5**(11):2458-61.
- Morales VM, Bäckman A & Bagdasarian M.** (1991) A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants. *Gene* **97**(1):39-47.
- Morita T, Maki K & Aiba H.** (2005) RNase E-based ribonucleoprotein complexes: Mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev* **19**(18):2176-86.
- Muffler A, Fischer D & Hengge-Aronis R.** (1996) The RNA-binding protein HF-I, known as host factor for phage Q_β RNA replication, is essential for *rpoS* translation in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **10**(9):1143-51.
- Muffler A, Traulsen DD, Fischer D, Lange R & Hengge-Aronis R.** (1997) The RNA-binding protein HF-I plays a global regulatory role, which is largely, but not exclusively, due to its role in expression of the σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**(1):297-300.
- Müller M & Hildebrandt A.** (1993) Nucleotide sequences of the 23S rRNA genes from *Bordetella pertussis*, *B. paraptussis*, *B. bronchiseptica* and *B. avium*, and their implications for phylogenetic analysis. *Nucleic Acids Res.* **21**(14):3320.
- Musser JM, Hewlett EL, Peppler MS & Selander RK.** (1986) Genetic diversity and relationships in populations of *Bordetella* spp. *J Bacteriol* **166**(1):230-7.
- Nakano M, Takahashi A, Su Z, Harada N, Mawatari K & Nakaya Y.** (2008) Hfq regulates the expression of the thermostable direct hemolysin gene in *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiol* **8**:155.

- Nakao H, Watanabe H, Nakayama S & Takeda T.** (1995) *yst* gene expression in *Yersinia enterocolitica* is positively regulated by a chromosomal region that is highly homologous to *Escherichia coli* host factor 1 gene (*hfq*). *Mol Microbiol* **18**(5):859-65.
- Nikulin A, Stolboushkina E, Perederina A, Vassilieva I, Bläsi U, Moll I, Kachalova G, Yokoyama S, Vassilyev D, Garber M & Nikonov S.** (2005) Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Hfq protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**(Pt 2):141-6.
- Novick RP.** (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* **48**(6):1429-49.
- Nudler E & Mironov AS.** (2004) The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem Sci* **29**(1):11-17.
- Opdyke JA, Kang JG & Storz G.** (2004) GadY, a small RNA regulator of the acid response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**(20):6698-705.
- O'Toole GA & Kolter R.** (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28**(3):449-61
- Parise G, Mishra M, Ito Y, Romeo T & Deora R.** (2007) Role of a putative polysaccharide locus in *Bordetella* biofilm development. *J Bacteriol* **189**(3):750-60.
- Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, Holden MT, Churcher CM, Bentley SD, Mungall KL, Cerdeno-Tarraga AM, Temple L, James K, Harris B, Quail MA, Achtman M, Atkin R, Baker S, Basham D, Bason N, Cherevach I, Chillingworth T, Collins M, Cronin A, Davis P, Doggett J, Feltwell T, Goble A, Hamlin N, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, Leather S, Moule S, Norberczak H, O'Neil S, Ormond D, Price C, Rabinowitsch E, Rutter S, Sanders M, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Unwin L, Whitehead S, Barrell BG & Maskell DJ.** (2003) Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet* **35**(1):32-40.
- Perraud AL, Kimmel B, Weiss V & Gross R.** (1998) Specificity of the BvgAS and EvgAS phosphorelay is mediated by the C-terminal HPT domains of the sensor proteins. *Mol Microbiol* **27**(5):875-87.
- Perraud AL, Weiss V & Gross R.** (1999) Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol* **7**(3):115-20.
- Perraud AL, Rippe K, Bantscheff M, Glocker M, Lucassen M, Jung K, Sebald W, Weiss V & Gross, R.** (2000) Dimerization of signalling modules of the EvgAS and BvgAS phosphorelay systems. *Biochim Biophys Acta* **1478**(2):341-54.
- Pier G.** (1998) *Pseudomonas aeruginosa*: a key problem in cystic fibrosis. *ASM News* **64**(6):339-47.
- Pizza M, Covacci A, Bartoloni A, Perugini M, Nencioni L, De Magistris MT, Villa L, Nucci D, Manetti R, Bugnoli M, et al.** (1989) Mutants of pertussis toxin suitable for vaccine development. *Science* **246**(4929):497-500.

- Poolman JT & Hallander HO.** (2007) Acellular pertussis vaccines and the role of pertactin and fimbriae. *Expert Rev Vaccines* **6**(1):47-56.
- Porter JF & Wardlaw AC.** (1993) Long-term survival of *Bordetella bronchiseptica* in lakewater and in buffered saline without added nutrients. *FEMS Microbiol Lett* **110**(1):33-6.
- Porter JF & Wardlaw AC.** (1994) Tracheobronchial washings from seven vertebrate species as growth media for the four species of *Bordetella*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **8**(3):259-69.
- Porter JF, Connor K & Donachie W.** (1994) Isolation and characterization of *Bordetella parapertussis*-like bacteria from ovine lungs. *Microbiology* **140**(Pt2):255-61
- Post JC.** (2001) Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. *Laryngoscope* **111**(12):2083-94.
- Pradel E, Guiso N & Locht C.** (1998) Identification of AlcR, an AraC-type regulator of alcaligin siderophore synthesis in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **180**(4):871-80.
- Pradel E, Guiso N, Menozzi FD & Locht C.** (2000) *Bordetella pertussis* TonB, a Bvg-independent virulence determinant. *Infect Immun* **68**(4):1919-27.
- Prasad SM, Yin Y, Rodzinski E, Tuomanen EI & Masure HR.** (1993) Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **61**(7):2780-5.
- Preston A, Parkhill J & Maskell DJ.** (2004) The *bordetellae*: lessons from genomics. *Nat Rev Microbiol* **2**(5):379-90.
- Prévost K, Salvail H, Desnoyers G, Jacques JF, Phaneuf E & Massé E.** (2007) The small RNA RyhB activates the translation of shiA mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. *Mol Microbiol* **64**(5):1260-73.
- Prugnola A, Arico B, Manetti R, Rappuoli R & Scarlato V.** (1995) Response of the *bvg* regulon of *Bordetella pertussis* to different temperatures and short-term temperature shifts. *Microbiology* **141** (Pt10):2529-34.
- Raffel TR, Register KB, Marks SA & Temple L.** (2002) Prevalence of *Bordetella avium* infection in selected wild and domesticated birds in the eastern USA. *J Wildl Dis* **38**(1):40-6.
- Rasmussen AA, Eriksen M, Gilany K, Udesen C, Thomas F, Petersen C & Valentin-Hansen P.** (2005) Regulation of *ompA* mRNA stability: the role of a small regulatory RNA in growth phase-dependent control. *Mol Microbiol* **58**(5):1421-9.
- Relman D, Tuomanen E, Falkow S, Golenbock DT, Saukkonen K & Wright SD.** (1990) Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell* **61**(7):1375-82.

- Renauld-Mongenie G, Cornette J, Mielcarek N, Menozzi FD & Locht C.** (1996) Distinct roles of the N-terminal and C-terminal precursor domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Bacteriol* **178**(4):1053-60.
- Robertson GT & Roop RM Jr.** (1999) The *Brucella abortus* host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice. *Mol Microbiol* **34**(4):690-700.
- Romby P, Vandenesch F & Wagner EG.** (2006) The role of RNAs in the regulation of virulence-gene expression. *Curr Opin Microbiol* **9**(2):229-36.
- Roy CR, Miller JF & Falkow S.** (1990) Autogenous regulation of the *Bordetella pertussis* *bvgABC* operon. *PNAS* **87**(10):3763-7.
- Roy CR & Falkow S.** (1991) Identification of *Bordetella pertussis* regulatory sequences required for transcriptional activation of the *fhaB* gene and autoregulation of the *bvgAS* operon. *J Bacteriol* **173**(7):2385-92.
- Sauter C, Basquin J & Suck D.** (2003) Sm-like proteins in Eubacteria: the crystal structure of the Hfq protein from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **31**(14):4091-8.
- Scarlato V, Prugnola A, Arico B & Rappuoli R.** (1990) Positive transcriptional feedback at the *bvg* locus controls expression of virulence factors in *Bordetella pertussis*. *PNAS* **87**(24):10067.
- Scarlato V, Arico B, Prugnola A & Rappuoli R.** (1991) Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J* **10**(12):3971-5.
- Schmidt G, Goehring UM, Schirmer J, Lerm M & Aktories K.** (1999) Identification of the C-terminal part of *Bordetella* dermonecrotic toxin as a transglutaminase for rho GTPases. *J Biol Chem* **274**(45):31875-81.
- Schneider B, Stubs D & Gross R.** (2002) Identification and genomic organization of gene loci negatively controlled by the virulence regulatory BvgAS two-component system in *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Genet Genomics* **267**(4):526-35.
- Schumacher MA, Pearson RF, Møller T, Valentin-Hansen P & Brennan RG.** (2002) Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *EMBO J* **21**(13):3546-56.
- Senear AW & Steitz JA.** (1976) Site-specific interaction of Q_β host factor and ribosomal protein S1 with Q_β and R17 Bacteriophage RNAs. *J Biol Chem* **251**(7):1902-12.
- Séraphin B.** (1995) Sm and Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs. *EMBO J* **14**(9):2089-98.
- Serra DO, Lücking G, Weiland F, Schulz S, Görg A, Yantorno OM & Ehling-Schulz M.** (2008) Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*. *Proteomics* **8**(23-24):4995-5010.

- Simon LD, Randolph B, Irwin N & Binkowski G.** (1983) Stabilization of proteins by a bacteriophage T4 gene cloned in *Escherichia coli*. *PNAS* **80**(7):2059-62.
- Sittka A, Pfeiffer V, Tedin K & Vogel J.** (2007) The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **63**(1):193-217.
- Sittka A, Lucchini S, Papenfort K, Sharma CM, Rolle K, Binnewies TT, Hinton JC & Vogel J.** (2008) Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator Hfq. *PLoS Genet* **4**(8):e1000163.
- Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Mishra M & Deora R.** (2007) The *Bordetella* Bps polysaccharide is critical for biofilm development in the mouse respiratory tract. *J Bacteriol* **189**(22):8270-6.
- Smith AM, Guzman CA & Walker MJ.** (2001) The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. *FEMS Microbiol Rev* **25**(3):309-33.
- Sonnleitner E, Moll I & Bläsi U.** (2002) Functional replacement of the *Escherichia coli* *hfq* gene by the homologue of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **148**(Pt3):883-91.
- Sonnleitner E, Hagens S, Rosenau F, Wilhelm S, Habel A, Jäger KE & Bläsi U.** (2003) Reduced virulence of a *hfq* mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. *Microb Pathog* **35**(5):217-28.
- Sonnleitner E, Sorger-Domenigg T, Madej MJ, Findeiss S, Hackermüller J, Hüttenhofer A, Stadler PF, Bläsi U & Moll I.** (2008) Detection of small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* by RNomics and structure-based bioinformatic tools. *Microbiology* **154**(Pt10):3175-87.
- Steed LL, Setareh M & Friedman RL.** (1991) Intracellular survival of virulent *Bordetella pertussis* in human polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol* **50**(4):321-30.
- Steffen P, Goyard S & Ullmann A.** (1996) Phosphorylated BvgA is sufficient for transcriptional activation of virulence-regulated genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J* **15**(1):102-9.
- Stenson TH & Pepler MS.** (1995): Identification of two *bvg*-repressed surface proteins of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **63**(10):3780-9.
- Stenson TH & Pepler MS.** (2007) Osmolarity affects Bvg-mediated virulence regulation by *Bordetella pertussis*. *Can J Microbiol* **53**(9):1053-61.
- Stibitz S, Black W & Falkow S.** (1986) The construction of a cloning vector designed for gene replacement in *Bordetella pertussis*. *Gene* **50**(1-3):133-40.
- Stibitz S, Aaronson W, Monack D & Falkow S.** (1989) Phase variation in *Bordetella pertussis* by frameshift mutation in a gene for a novel two-component system. *Nature* **338**(6212):266-9.

- Stibitz S & Yang MS.** (1991) Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the *vir* locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **173**(14):4288-96.
- Stock JB, Stock AM & Mottonen JM.** (1990) Signal transduction in bacteria. *Nature* **344**(6265):395-400.
- Stock AM, Robinson VL & Goudreau PN.** (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**:183-215.
- Stockbauer KE, Fuchslocher B, Miller JF & Cotter PA.** (2001) Identification and characterization of BipA, a *Bordetella* Bvg-intermediate phase protein. *Mol Microbiol* **39**(1):65-78.
- Stoodley P, de Beer D & Lewandowski Z.** (1994) Liquid flow in biofilm systems. *Appl Environ Microbiol* **60**(8):2711-16.
- Stoodley P, de Beer D, Lewandowski Z, Boyle D & Lappin-Scott HM.** (1999) Evolving perspectives of biofilm structure. *Biofouling* **14**(1):75-90.
- Storsaeter J, Hallander HO, Gustafsson L & Olin P.** (1998) Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* **16**(20):1907-16.
- Storz G, Opdyke JA & Zhang A.** (2004) Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Curr Opin Microbiol* **7**(2):140-4.
- Storz G, Altuvia S & Wassarman KM.** (2005) An abundance of RNA regulators. *Annu Rev Biochem* **74**:199-217.
- Su Z, Nakano M, Koga T, Lian X, Hamamoto A, Shimohata T, Harada Y, Mawatari K, Harada N, Akutagawa M, Nakaya Y & Takahashi A.** (2010) Hfq regulates anti-oxidative ability in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Gen Appl Microbiol* **56**(3):181-6.
- Sukhodolets MV & Garges S.** (2003) Interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with the ribosomal protein S1 and the Sm-like ATPase Hfq. *Biochemistry* **42**(26):8022-34.
- Sun X, Zhulin I & Wartell RM.** (2002) Predicted structure and phyletic distribution of the RNA-binding protein Hfq. *Nucleic Acids Res* **30**(17):3662-71.
- Sun X & Wartell RM.** (2006) *Escherichia coli* Hfq binds A₁₈ and DsrA Domain II with similar 2:1 Hfq₆/RNA stoichiometry using different surface sites. *Biochemistry* **45**(15):4875-87.
- Sutherland IW.** (2001) The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* **9**(5), 222-7
- Tamura M, Nogimori K, Murai S, Yajima M, Ito K, Katada T, Ui M & Ishii S.** (1982) Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry* **21**(22):5516-22.

- Taylor BL & Zhulin IB.** (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(2):479-506.
- Tsui HCT & Winkler ME.** (1994a) Transcriptional patterns of the *mutL-mia* superoperon of *Escherichia coli* K-12 suggest a model for posttranscriptional regulation. *Biochimie* **76**:1168-1177.
- Tsui HCT, Leung HCE & Winkler ME.** (1994b) Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an *hfq* insertion mutation in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **13**(1):35-49.
- Tsui HCT, Feng G & Winkler ME.** (1996) Transcription of the *mutL* repair, *miaA* tRNA modification, *hfq* pleiotropic regulator, and *hflA* region protease genes of *Escherichia coli* K-12 from clustered E σ^{32} -specific promoters during heat shock. *J Bacteriol* **178**(19):5719-31.
- Tsui HCT, Feng G & Winkler ME.** (1997) Negative regulation of *mutS* and *mutH* repair gene expression by the Hfq and RpoS global regulators of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **179**(23):7476-87.
- Tuomanen EI, Nedelman J, Hendley JO & Hewlett EL.** (1983) Species specificity of *Bordetella* adherence to human and animal ciliated respiratory epithelial cells. *Infect Immun* **42**(2):692-5.
- Turcotte ML, Martin D, Brodeur BR & Peppler MS.** (1997) Tn5-induced lipopolysaccharide mutations in *Bordetella pertussis* that affect outer membrane function. *Microbiology* **143**(Pt7):2381-94.
- Uhl MA & Miller JF.** (1994) Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *PNAS* **91**(3):1163-7.
- Uhl MA & Miller JF.** (1996a) Central role of the BvgS receiver as a phosphorylated intermediate in a complex two-component phosphorelay. *J Biol Chem* **271**(52):33176-80.
- Uhl MA & Miller JF.** (1996b) Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J* **15**(5):1028-36.
- Valentin-Hansen P, Eriksen M & Udesen C.** (2004) The bacterial Sm-like protein Hfq: A key player in RNA transactions. *Mol Microbiol* **51**(6):1525-33.
- Vandamme P, Heyndrickx M, Vancanneyt M, Hoste B, De Vos P, Falsen E, Kersters K & Hinz KH.** (1996) *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* R ger and Tan 1983. *Int J Syst Bacteriol* **46**(4):849-58.
- van der Zee A, Mooi F, Van Embden J & Musser J.** (1997) Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella* spp.: phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences. *J Bacteriol* **179**(21):6609-17.
- Vanderpool CK & Armstrong SK.** (2001) The *Bordetella bh* locus is required for heme iron utilization. *J Bacteriol* **183**(14):4278-87.

- Veal-Carr WL & Stibitz S.** (2005) Demonstration of differential virulence gene promoter activation *in vivo* in *Bordetella pertussis* using RIVET. *Mol Microbiol* **55**(3):788-98.
- Večerek B, Moll I & Bläsi U.** (2005) Translational autocontrol of the *Escherichia coli* *hfq* RNA chaperone gene. *RNA* **11**(6):976-84.
- Vergara-Irigaray N, Chavarri-Martinez A, Rodriguez-Cuesta J, Miller JF, Cotter PA & Martinez de Tejada G.** (2005) Evaluation of the role of the Bvg intermediate phase in *Bordetella pertussis* during experimental respiratory infection. *Infect Immun* **73**(2):748-60.
- Virlogeux I, Waxin H, Ecobichon C, Popoff MY.** (1995) Role of the *viaB* locus in synthesis, transport and expression of *Salmonella typhi* Vi antigen. *Microbiology* **141**(Pt12):3039-47.
- Vogel J & Sharma CM.** (2005) How to find small non-coding RNAs in bacteria. *Biol Chem* **386**(12):1219-38.
- Vuong C, Voyich JM, Fischer ER, Braughton KR, Whitney AR, DeLeo FR & Otto M.** (2004) Polysaccharide intercellular adhesion (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol* **6**(3):269-75.
- Vytvytska O, Jakobsen JS, Balcunaite G, Andersen JS, Baccarini M & von Gabain A.** (1998) Host factor I, Hfq, binds to *Escherichia coli* *ompA* mRNA in a growth rate dependent fashion and regulates its stability. *PNAS* **95**(24):14118-23.
- Wagner EGH, Altuvia S & Romby P.** (2002) Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements. *Adv Genet* **46**:361-98.
- Wassarman KM, Repoila F, Rosenow C, Storz G & Gottesman S.** (2001) Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes Dev* **15**(13):1637-51.
- Wassarman KM.** (2002) Small RNAs in bacteria: diverse regulators of gene expression in response to environmental changes. *Cell* **109**(2):141-4.
- Wassarman KM.** (2007) 6S RNA: A small RNA regulator of transcription. *Curr Opin Microbiol* **10**(2):164-8.
- Waters LS & Storz G.** (2009) Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell* **136**(4):615-28.
- Weingart CL & Weiss AA.** (2000) *Bordetella pertussis* virulence factors affect phagocytosis by human neutrophils. *Infect Immun* **68**(3):1735-9.
- Weiss AA & Falkow S.** (1983) Transposon insertion and subsequent donor formation promoted by Tn501 in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **153**(1):304-9.
- Weiss AA & Falkow S.** (1984) Genetic analysis of phase change in *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **43**(1):263-9.

- Weiss AA & Goodwin MS.** (1989) Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model. *Infect Immun* **57**(12):3757-64.
- Weiss AA, Melton AR, Walker KE, Andraos-Selim C & Meidl JJ.** (1989) Use of the promoter fusion transposon Tn5 *lac* to identify mutations in *Bordetella pertussis* vir-regulated genes. *Infect Immun* **57**(9):2674-82.
- Weiss AA.** (1992) The procaryotes: The Genus *Bordetella*. Berlin Heidelberg New York: Springer.
- Weiss AA, Johnson FD & Burns DL.** (1993) Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *PNAS* **90**(7):2970-4.
- Weyant RS, Hollis DG, Weaver RE, Amin MF, Steigerwalt AG, O'Connor SP, Whitney AM, Daneshvar MI, Moss CW & Brenner DJ.** (1995) *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J Clin Microbiol* **33**(1):1-7.
- Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS.** (2002) Extracellular DNA is required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**(5559):1487
- Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, Parsek MR. et al.,** (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**(6858):860-4.
- Willems RJ, Paul A, van der Heide HG, ter Avest AR & Mooi FR.** (1990) Fimbrial phase variation in *Bordetella pertussis*: a novel mechanism for transcriptional regulation. *EMBO J* **9**(9):2803-9.
- Willems RJ, van der Heide HG & Mooi FR.** (1992) Characterization of a *Bordetella pertussis* fimbrial gene cluster which is located directly downstream of the filamentous haemagglutinin gene. *Mol Microbiol* **6**(18):2661-71.
- Wilusz CJ & Wilusz J.** (2005) Eukaryotic Lsm proteins: lessons from bacteria. *Nat Struct Mol Biol* **12**(12):1031-6.
- Winnen B, Hvorup RN & Saier MH Jr.** (2003) The tripartite tricarboxylate transporter (TTT) family. *Res Microbiol* **154**(7):457-65.
- Woolfrey BF & Moody JA.** (1991) Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin Microbiol Rev* **4**(3):243-55.
- Wu XG, Duan HM, Tian T, Yao N, Zhou HY & Zhang LG.** (2010) Effect of the *hfq* gene on 2,4-diacetylphloroglucinol production and the PcoI/PcoR quorum-sensing system in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *FEMS Microbiol Lett* **309**(1):16-24.
- Yih WK, Lett SM, des Vignes FN, Garrison KM, Sipe PL & Marchant CD.** (2000) The increasing incidence of pertussis in Massachusetts adolescents and adults, 1989-1998. *J Infect Dis* **182**(5):1409- 16.
- Yuk MH, Heininger U, Martinez de Tejada G & Miller JF.** (1998) Human but not ovine isolates of *Bordetella parapertussis* are highly clonal as determined by PCR-based RAPD fingerprinting. *Infection* **26**(5):270-3.

- Yuk MH, Harvill ET, Cotter PA & Miller JF.** (2000) Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF- κ B activation by the *Bordetella* type III secretion system. *Mol Microbiol* **35**(5):991-1004.
- Zhang A, Altuvia S, Tiwari A, Argaman L, Hengge-Aronis R & Storz G.** (1998) The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the Hfq (HF-I) protein. *EMBO J* **17**(20):6061-8.
- Zhang A, Wassarman KM, Rosenow C, Tjaden BC, Storz G & Gottesman S.** (2003) Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. *Mol Microbiol* **50**(4):1111-24.
- Zu T, Manetti R, Rappuoli R & Scarlato V.** (1996) Differential binding of BvgA to two classes of virulence genes of *Bordetella pertussis* directs promoter selectivity by RNA polymerase. *Mol Microbiol* **21**(3):557-65.

2. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
α	anti
A.	<i>Achromobacter</i>
abs.	absolut
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
BG	Bordet-Gengou
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CFU	colony forming units
Ci	Curie
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
Cm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
Cm ^R	Chloramphenicol-resistent
cpm	counts per minute
CYA	Adenylatzyklase
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNT	Dermonekrotisches Toxin
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPS	Extrazelluläre, polymere Substanz
et al.	et alteri (und weitere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
FAD	Flavinadenindinukleotid
FHA	filamentöses Hämagglutinin
Fim	Fimbrien
g	Gramm

h	Stunde
His	Histidin
HTH	helix-turn-helix-Motiv
IAA	Iodacetamid
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
k	Kilo- (10^3)
Kan	Kanamycin
Kan ^R	Kanamycin-resistent
kbp	Kilobasenpaare
kDA	Kilodalton
l	Liter
Lsg	Lösung
μ	Mikro- (10^{-6})
μ l	Mikroliter
m	Milli- (10^{-3})
M	molar
mA	Milliampère
max.	maximal
MCS	multiple cloning site
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute
mind	mindestens
ml	Milliliter
mM	mikromolar
MS	Massenspektrometrie
n	Nano- (10^{-9})
Nal	Nalidixinsäure
Nal ^R	Nalidixinsäure-resistent
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
N-Terminus/N-terminal	Aminoterminus/aminoterminal
ORF	open reading frame
p	Pico (10^{-12})
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PNK	Polynukleotid-Kinase
PRN	Pertactin
PTX	Pertussis-Toxin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rpoB	RNA-Polymerase (β -Untereinheit)

RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.o.	siehe oben
<i>S. Typhimurium</i> /Typhi	<i>Salmonella enterica enterica</i> Serovar Typhimurium/Typhi
s.u.	siehe unten
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Sm	Streptomycin
Sm ^R	Streptomycin-resistent
sog	sogenannt
Spssp	Spatelspitze
spp.	Spezies pluralis
SS	Stainer-Scholte
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA-Zyklus	Tricarbonsäure-Zyklus, Citratzyklus
TCT	Tracheales Zytotoxin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
Tet ^R	Tetracyclin-resistent
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
U	Unit
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett-
V	Volt
v/v	volume per volume
VFT	Venus flytrap
vgl	vergleiche
Vhs	Voltstunden
Vol.	Volumen
W	Watt
w/v	weight per volume
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
ZKS	Zwei-Komponentensystem