
**Funktionelle Charakterisierung des
BvgAS_{BH}-Zwei-Komponentensystems aus
*Bordetella holmesii***

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

vorgelegt von

Gabriele Gerlach

aus Erlangen

Würzburg, 2004

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. R. Gross

Gutachter: Prof. Dr. J. Morschhäuser

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg vom Januar 2000 bis Juni 2004 unter Betreuung von Prof. Dr. R. Gross angefertigt.

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

Würzburg, den

.....

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Roy Gross für die Überlassung des interessanten Themas und seine ständige Gesprächsbereitschaft bedanken.

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

Frau PD Dr. Dagmar Beier danke dafür, dass sie mir auch nach meiner Diplomarbeit eine wertvolle Ansprechpartnerin geblieben ist und somit sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Roy danke ich, dass ich während meiner Zeit am Lehrstuhl zweimal in den Genuss der weltbesten Erdbeertörtchen kommen durfte, aber vor allem auch für sein Vertrauen und seine Unterstützung.

Meiner langjährigen Weggefährtin und der wahren Entdeckerin des „All-All“ Phänomens, Simone Janzen, danke ich von Herzen dafür, dass sie mir nicht nur als Arbeitskollegin, „Röfi-Betreuerin und getreuer Bodyguard, sondern auch als liebe Freundin stets zur Seite stand.

Ebenso danke ich Aleksandra Horvat für ihren Humor, ihr offenes Ohr in allen Belangen und ihre Einführung in die Köstlichkeiten der kroatischen Küche. Sollte ich noch einmal ein Labor mit Dir teilen dürfen, dann werde ich ganz bestimmt höchstpersönlich für Deinen Empfang den „roten Teppich“ ausrollen!

Eine herzliches Dankeschön an alle jene, die Tag ein Tag aus Tür an Tür mit mir gearbeitet haben. Darunter im Besonderen dem liebenswerten Energiebündel Claudia „Clle“ Lesch, meiner SFB-Genossin und Fachfrau der Tontechnik Doro Stübs, der humorvollsten „Reis mit Scheiß“ Köchin Anto Jiménez Pearson, der weltbesten Enzymbestellerin Jenni Schär, meiner Leidensgenossin in Sachen „*B. holmesii*- oder die Erforschung des Weltalls“ Steffi Link und nicht zu letzt dem „allein unter Frauen“-Bub Micheal Pflöck.

Ebenso ein liebes Dankeschön in die Ferne an die „Ehemaligen“ Patricia Dietz und Christian (Ted) Hüttinger, mit denen ich viel Spaß während den gemeinsamen McFit-Sitzungen und den obligatorischen Nachtreffen bei McDonalds hatte. Unvergesslich bleibt mir natürlich auch die alte „C204 Besetzung“ und die Herausgeber des Bestsellers „C204 oder Essen um elf...“, meine Jungs Boris Schneider und Andreas Bock.

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

Christoph danke ich von Herzen dafür, dass er mir liebevoll beiseite stand.

Meinen besonderen Dank gilt meinen Eltern, die mir durch ihr unentwegtes Vertrauen und ihre Unterstützung diese Arbeit ermöglicht haben.

Inhaltsverzeichnis

<u>A</u>	<u>Zusammenfassung</u>	1
<u>B</u>	<u>Einleitung</u>	5
1	Die Gattung <i>Bordetella</i>	5
1.1	<i>Bordetella</i>-Arten, die mit respiratorischen Erkrankungen beim Menschen in Verbindung gebracht werden	6
1.1.1	Das <i>B. bronchiseptica</i> -Cluster	6
1.1.2	<i>B. holmesii</i>	7
1.2	Evolutionäre Vorgänge in der Gattung <i>Bordetella</i>	8
2	Die Virulenzfaktoren der Gattung <i>Bordetella</i>	10
2.1	Die Virulenzfaktoren des <i>B. bronchiseptica</i>-Clusters	10
2.1.1	Nachweis der Virulenzfaktoren bei dem <i>B. bronchiseptica</i> -Cluster	12
2.2	Die Virulenzfaktoren der „neuen“ <i>Bordetella</i> -Arten	13
3	Regulation der Virulenzfaktoren durch das BvgAS-Zwei-Komponentensystem	14
3.1	Phasenvariation und phänotypische Modulation	14
3.2	Das BvgAS-Zwei-Komponentensystem	15
3.3	Transkriptionelle Kontrolle von <i>bvg</i>-regulierten Genen	17
3.3.1	Die BvgAS-vermittelte Aktivierung der <i>vag</i> -Gene; die Bvg ⁺ -Phase	17
3.3.2	BvgAS-vermittelte Repression der <i>vrg</i> -Gene; die Bvg ⁻ -Phase	21
3.3.3	Die Bvg ⁱ -Phase	22
3.4	Die Bedeutung des BvgAS-Systems im Infektionszyklus der Bordetellen	23
4	Zielsetzung der Arbeit	24
<u>C</u>	<u>Material</u>	25
1	Geräte	25
2	Bakterienstämme	26
3	Vektoren und rekombinante Plasmide	26
4	Oligonukleotide	29
5	Verbrauchsmaterialien	29
5.1	Chemikalien	29
5.2	Enzyme	29
6	Wachstumsmedien und Zusätze	30
6.1	Wachstumsmedien	30
6.2	Medienzusätze	31
7	Molekulargewichtsmarker	31
7.1	Molekulargewichtsmarker für die Agarosegelelektrophorese	31
7.2	Molekulargewichtsmarker für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	32
<u>D</u>	<u>Methoden</u>	33
1	Molekularbiologische und genetische Techniken	33
1.1	Isolierung von DNA	33
1.1.1	Isolierung chromosomaler DNA Methode 1	33
1.1.2	Isolierung chromosomaler DNA Methode 2	33
1.1.3	Plasmidpräparation im analytischen Maßstab mittels GFX Micro Plasmid Prep Kit von Amersham Biosciences (Minipräparation)	34
1.1.4	Plasmidpräparation im präparativen Maßstab mittels Nucleobond-AX-Kit von	34

	Macherey & Nagel (Midipräparation)	
1.2	Fällen von DNA	34
1.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	34
1.4	Enzymatische Modifikation von DNA	35
1.4.1	Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen	35
1.4.2	Ligation	35
1.4.2.1	Ligationsansatz	35
1.4.2.2	Ligation von PCR-Produkten in den pGEM-T-Vektor (Promega)	35
1.4.3	Alkalische Phosphatase Reaktion von DNA-Fragmenten	36
1.5	Isolierung von RNA	36
1.5.1	Isolierung von RNA aus <i>Bordetella</i> -Stämmen	36
1.5.2	Konzentrationsbestimmung von RNA	37
1.6	Auftrennung, Analyse und Aufreinigung von DNA-Molekülen und RNA-Molekülen	37
1.6.1	Agarosegelelektrophorese	37
1.6.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mittels QIAquick Gelextraktionskit (Qiagen)	37
1.6.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mittels eiskalter Phenolextraktion	38
1.7	Southernblot	38
1.8	Transformation von DNA	39
1.8.1	Transformation von DNA in CaCl ₂ -kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	39
1.8.1.1	Herstellung von CaCl ₂ -kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	39
1.8.1.2	Transformation	39
1.8.2	Transformation von DNA in elektrokompente <i>E. coli</i> -Zellen	39
1.8.2.1	Herstellung von elektrokompente <i>E. coli</i> -Zellen	39
1.8.2.2	Elektroporation	40
1.9	Konjugation und Allelaustausch	40
1.9.1	Allelaustausch	40
1.9.2	Durchführung der Konjugation	40
1.10	Die Polymerase-Ketten-Reaktion	40
1.10.1	Die PCR-Reaktion	40
1.10.2	Reinigung von PCR-Produkten über QIAquick-Säulchen (Qiagen)	41
1.11	DNA-Sequenzierung	41
1.11.1.	Automatische DNA-Sequenzierung mit dem CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit (P/N 608120) von Beckman Coulter	41
1.11.1	DNA-Sequenzierung mit $\alpha^{33}\text{P}$ -dATP	42
1.12	Primer-Extension	42
1.12.1	5'-Markierung des Oligonukleotid-Primers	43
1.12.2	Primer-Extension-Experiment	43
1.13	Genomewalking	43
2	Proteinbiochemische Methoden	44
2.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	44
2.2	Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure	45
2.3	Westernblot	45
2.4	Überproduktion von Proteinen mit dem IPTG-induzierbaren pQE30-Vektor (QIAexpress system)	46
2.5	Proteinreinigung	46
2.5.1	Zellaufschluss mittels French-Press	46
2.5.2	Proteinreinigung mittels Ni-NTA-Agarose (Affinitätschromatographie)	47
2.5.2.1	Vorbereitung der Säule	47
2.5.2.2	Reinigung von löslichen Proteinen über die Ni-NTA-Agarosesäule	47
2.5.2.3	Reinigung von unlöslichen Proteinen über die Ni-NTA-Agarosesäule	48
2.5.2.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	48
2.6	Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen	48
2.6.1	Gelretardations-Experiment	48

2.6.1.1	Radioaktive Markierung der DNA-Sonde	48
2.6.1.2	Bestimmung der spezifischen Aktivität	49
2.6.1.3	Bindungsstudien mit gereinigtem Protein	49
2.6.1.4	Elektrophoretische Auftrennung im nativen Polyacrylamidgel	50
2.6.1.5	Kompetitions-Experiment	50
2.6.2	DNaseI-Footprint-Experiment	50
2.6.2.1	Präparation radioaktiv markierter DNA-Sonden für DNaseI-Footprint-Experimente	50
2.6.2.2	DNaseI-Footprint-Experiment	51
2.7	<i>In vitro</i>-Phosphorylierungsassay (nach Bock, 2002)	52
2.7.1	Autophosphorylierung von Histidinkinasen und Phosphotransfer auf Response-Regulatoren	52
2.7.2	Analyse der Phosphorylierung von Response-Regulatoren durch ³² P-markiertem Acetylphosphat	53
E	<u>Ergebnisse</u>	54
1	Untersuchungen zur phylogenetischen Einordnung der „neuen“ <i>Bordetella</i>-Arten innerhalb der Gattung <i>Bordetella</i>	54
1.1	Untersuchungen zur Identifizierung von <i>ompA</i>-, <i>risA</i>- und <i>bvgA</i>-orthologen Genen bei <i>Bordetella</i>-Arten	54
1.1.1	Southernblot-Experimente zur Identifizierung von <i>ompA</i> -, <i>risA</i> - und <i>bvgA</i> -orthologen Genen bei <i>Bordetella</i> -Arten	54
1.1.2	PCR-Analysen zur Bestimmung der <i>ompA</i> -, <i>risA</i> - und <i>bvgA</i> -DNA- und Proteinsequenzen	55
1.2	Untersuchungen über die Verbreitung der IS-Elemente IS481, IS1001 und IS1002 sowie von <i>B. pertussis</i>- bzw. <i>B. bronchiseptica</i>-spezifischen DNA-Fragmenten innerhalb der Gattung <i>Bordetella</i>	58
2	„Genome Walk“ zur Vervollständigung der <i>bvgA</i>-Sequenz aus <i>B. holmesii</i> (<i>bvgA_{BH}</i>) sowie zur genotypischen Analyse der daran angrenzenden DNA-Bereiche	59
3	Charakterisierung des BvgAS-Zwei-Komponentensystems von <i>B. holmesii</i> (BvgAS_{BH})	62
3.1	Ermittlung und Vergleich der <i>bvgA_{BH}</i>-Nukleotidsequenzen der <i>B. holmesii</i>-Isolate G8341, No1 und ATCC51541	62
3.1.1	Bestimmung der <i>bvgA_{BH}</i> -Nukleotidsequenz aus <i>B. holmesii</i> G8341, No1 und ATCC51541	62
3.1.2	Westernblot-Experiment zum Nachweis der BvgA _{BH} -Expression bei unterschiedlichen <i>B. holmesii</i> -Isolaten	62
3.1.3	Konstruktion einer <i>bvgA_{BH}</i> -Insertionsm von <i>B. holmesii</i> G7702 (<i>B. holmesii</i> G7702 <i>bvgA_{BH}::kan</i>)	64
3.2	Phänotypische und physiologische Charakterisierung der <i>bvgA_{BH}</i>-Insertionsmutante <i>B. holmesii</i> G7702 <i>bvgA_{BH}::kan</i>, der wildtypischen <i>B. holmesii</i>-Stämme G7702 und G8341 sowie der phasenvarianten <i>B. holmesii</i>-Stämme ATCC51541 und No1	66
3.3	Klonierung des BvgAS_{BH}-Zwei-Komponentensystems aus <i>B. holmesii</i> G7702 und ATCC51541	66
3.5	Überexpression und Reinigung des Response-Regulators BvgA_{BH}	69
3.5.1	Konstruktion von pQE30- <i>bvgA_{BH}</i> und Überexpression des entsprechenden His ₆ -Fusionsproteins	69
3.5.2	Aufreinigung des Fusionsproteins His ₆ -BvgA _{BH}	69
3.6	<i>in vitro</i>-Phosphorylierung des Response-Regulators BvgA_{BH} durch	70

	<i>Acetylphosphat</i>	
3.7	Versuche zur Analyse der funktionellen Konservierung der BvgAS-Systeme von <i>B. holmesii</i> (BvgAS_{BH}) und <i>B. pertussis</i> (BvgAS)	71
3.7.1	Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenz des BvgAS-Systems von <i>B. holmesii</i> (BvgAS _{BH}) und <i>B. pertussis</i> (BvgAS)	71
3.7.2	Untersuchung der <i>in vitro</i> -Phosphorylierungseigenschaft von BvgA _{BH} durch die Histidinkinase BvgS aus <i>B. pertussis</i>	73
3.7.3	Untersuchung der <i>in vitro</i> -DNA-Bindeeigenschaften des Response-Regulators BvgA aus <i>B. holmesii</i> (BvgA _{BH}) an die <i>fhaB</i> -Promotorregion aus <i>B. pertussis</i>	73
3.7.4	Konstruktion und Charakterisierung der hybriden <i>B. pertussis</i> (BP)-Stämme BP 359 (pRK415- <i>bvgAS</i> _{BH G7702}) und BP 347 (pRK415- <i>bvgAS</i> _{BH ATCC51541})	74
3.8	Versuche zur Untersuchung der Modulierbarkeit der Histidinkinase BvgS_{BH} aus <i>B. holmesii</i>	77
3.9	Untersuchungen zur Regulation des BvgAS_{BH}-Zwei-Komponentensystems von <i>B. holmesii</i>	80
3.9.1	<i>In silico</i> -Analyse der <i>orfX</i> - <i>bvgA</i> _{BH} -intergenischen Region (<i>bvgA</i> _{BH} up)	80
3.9.2	Untersuchungen zur Regulation des <i>bvgAS</i> _{BH} -Locus in <i>B. holmesii</i>	81
3.9.2.1	Untersuchung der <i>in vitro</i> -DNA-Bindeeigenschaften des Response-Regulators BvgA _{BH} an die <i>bvgA</i> _{BH} up-Region	81
3.9.2.2	Analyse der Expression des <i>bvgAS</i> _{BH} -Locus durch Konstruktion einer <i>bvgA</i> _{BH} up-Reporterfusion	83
3.9.2.3	Versuche zur Kartierung eines Transkriptionsstartpunktes innerhalb der <i>bvgA</i> _{BH} up-Region	84
3.9.3	Untersuchungen zur Regulation des <i>bvgAS</i> _{BH} -Locus in <i>B. pertussis</i>	86
3.9.3.1	Untersuchung der <i>in vitro</i> -DNA-Bindeeigenschaften des Response-Regulators BvgA aus <i>B. pertussis</i> an die <i>bvgA</i> _{BH} up-Region	86
3.9.3.2	Analyse der Expression des <i>bvgAS</i> _{BH} -Locus mit Hilfe der <i>bvgA</i> _{BH} up-Reporterfusion	87
3.9.3.3	Versuche zur Kartierung des <i>bvgA</i> _{BH} - <i>gfp</i> -Transkriptionsstartpunktes in BP 359 (pMMB208- <i>bvgA</i> _{BH} up- <i>gfp</i>) und BP 347 (pMMB208- <i>bvgA</i> _{BH} up- <i>gfp</i>)	88
F	<u>Diskussion</u>	90
1	Phylogenetische Stellung der „neuen“ <i>Bordetella</i>-Arten innerhalb der Gattung	90
1.1	Verbreitung von einzelnen Genen und IS-Elementen innerhalb der Gattung <i>Bordetella</i>	90
1.2	Phylogenetische Einordnung der „neuen“ <i>Bordetella</i> -Arten in die Gattung <i>Bordetella</i>	91
2	Identifizierung und Charakterisierung der phasenvarianten <i>B. holmesii</i>-Stämme ATCC51541 und No1	92
2.1	Suche nach weiteren Phasenmarkern für <i>B. holmesii</i>	94
3	Charakterisierung des BvgAS_{BH}-Zwei-Komponentensystems von <i>B. holmesii</i>	95
3.1	<i>In silico</i> -Charakterisierung des BvgAS _{BH} -Systems aus <i>B. holmesii</i>	95
3.2	Funktionelle Charakterisierung des BvgAS _{BH} -System aus <i>B. holmesii</i>	97
3.3	Die Regulation des BvgAS _{BH} -Systems aus <i>B. holmesii</i>	100
G	<u>Literaturverzeichnis</u>	106
H	<u>Anhang</u>	119

1	Abkürzungsverzeichnis	119
2	Lebenslauf	122
3	Publikationsliste	123
4	DNA- und Proteinsequenzen	124

A Zusammenfassung

Zur Gattung *Bordetella* gehören mehrere zum Teil sehr eng miteinander verwandte Keime, die bislang, mit Ausnahme des Umweltisolats *B. petrii*, ausschließlich in Assoziation mit einem Wirtsorganismus nachgewiesen werden konnten. Hierzu gehören zum einen die „klassischen“ Arten, deren pathogenes Potential vom obligat humanpathogenen Erreger des Keuchhustens, *B. pertussis*, dem ebenfalls humanpathogenen Keim *B. parapertussis* bis hin zu *B. bronchiseptica*, dem Erreger von Atemwegserkrankungen in verschiedenen Säugetieren, reicht. Zum anderen wurde dieser Gattung mit *B. avium*, *B. hinzii*, *B. trematum*, *B. holmesii* und *B. petrii* in den letzten Jahren „neue“ Arten zugeordnet, die zum Teil humanpathogenes, zum Teil tierpathogenes Potential besitzen.

Da die evolutionären Beziehungen der „neuen“ *Bordetella*-Arten innerhalb der Gattung *Bordetella* bislang noch wenig untersucht wurden, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Verbreitung und Konservierung von bekannten *Bordetella*-Genen und IS-Elementen bei den „neuen“ *Bordetella*-Arten untersucht. Aufgrund der vermehrten Hinweise auf ein humanpathogenes Potential von *B. holmesii* und seiner Assoziation mit einem dem Keuchhusten ähnlichen Krankheitsbild wurde der Schwerpunkt dieser Untersuchungen auf die Analyse der phylogenetischen Beziehungen zwischen *B. holmesii* und dem *B. bronchiseptica*-Cluster gelegt. Während durch den Nachweis der bei dem *B. bronchiseptica*-Cluster vorkommenden IS-Elemente IS481 und IS1001 die durch die 16S rDNA-Sequenz ermittelte Position von *B. holmesii* innerhalb des *B. bronchiseptica*-Clusters bestätigt werden konnte, ergab eine vergleichende Sequenzanalyse der in der Gattung *Bordetella* hoch konservierten Proteine OmpA, BvgA und BvgS die interessante Beobachtung, dass dieser Organismus in dieser Hinsicht viel mehr Ähnlichkeiten zu den „neuen“ *Bordetella*-Arten besitzt und in diesem Zusammenhang phylogenetisch eher im Umfeld von *B. avium* anzusiedeln ist.

Bei der Charakterisierung von vier unterschiedlichen *B. holmesii*-Blutisolaten wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei variante *B. holmesii*-Stämme identifiziert, die sich hinsichtlich der fehlenden Expression des intakten Response-Regulators BvgA_{BH} von wildtypischen *B. holmesii*-Isolaten unterscheiden. Im weiteren konnte gezeigt werden, dass bei diesen phasenvarianten Stämmen die fehlende Expression auf eine Punktmutation innerhalb der *bvgA_{BH}*-Nukleotidsequenz zurückzuführen ist. Diese wird in beiden Fällen an der selben Nukleotidposition durch die Insertion eines Adenosinrestes hervorgerufen. Obwohl dieser Sequenzabschnitt nicht durch eine repetitive Nukleotidfolge gekennzeichnet ist und somit keinerlei Ähnlichkeiten mit einer für Frameshift-Mutationen anfälligen Stelle besitzt, könnte es sich bei der identifizierten DNA-Region dennoch um einen „hot spot“ für eine Punktmutation handeln, da die zwei varianten *B. holmesii*-Stämmen unabhängig voneinander aus unterschiedlichen Blutkulturen isoliert wurden. Von besonderer Bedeutung war zudem die Beobachtung, dass sich unter diesen varianten Stämmen auch der bei den Stammsammlungen als Referenzstamm abgelegte *B. holmesii*-Stamm ATCC51541 befindet. Da im Rahmen dieser Arbeit keinerlei offensichtliche phänotypische Unterschiede zwischen den varianten und den wildtypischen *B. holmesii*-Stämmen festgestellt werden konnten, bleibt die Bedeutung der Phasenvariation bei *B. holmesii* bislang noch ungeklärt.

Im weiteren wurde mit Hilfe eines „Genome Walks“ die an den *bvgA_{BH}*-Leserahmen angrenzenden DNA-Bereiche für *B. holmesii* ermittelt. Dabei konnte 5 bp nach dem *bvgA_{BH}*-Stoppcodon ein weiterer Leserahmen (*bvgS_{BH}*) identifiziert werden, welcher Homologien zu der Histidinkinase BvgS aus *B. pertussis* besitzt. Interessanterweise stellte sich bei der Sequenzanalyse heraus, dass der Konservierungsgrad des *bvgA_{BH}*-Locus aus *B. holmesii* und des *bvgAS*-Locus aus *B. pertussis* auf DNA-Ebene sehr gering ist. Diese Beobachtung erklärt wiederum, warum der *bvgA_{BH}*-Genlocus aus *B. holmesii* früher nicht durch DNA/DNA-Hybridisierungs-Experimente mit einer *B. pertussis* spezifischen DNA-Sonde nachgewiesen

werden konnte und sein Vorhandensein erst nach dem Einsatz von degenerierten Primern über PCR-Analysen detektiert werden konnte.

Im weiteren konnte über den „Genome Walk“ gezeigt werden, dass die an dem *bvgAS*-Locus angrenzenden DNA-Bereiche innerhalb der Gattung *Bordetella* nicht konserviert sind. Zum einen ist der *bvgAS_{BH}*-Locus aus *B. holmesii* nicht wie bei dem *B. bronchiseptica*-Cluster in 5'-Richtung von dem *fhaB*-orthologen Genlocus benachbart, da sich an dieser Stelle ein weiterer, potentieller Response-Regulator befindet. Ebenso konnten stromaufwärts von *bvgAS_{BH}* keinerlei Hinweise auf das Vorhandensein eines, dem *bvgR*-Gen der „klassischen“ Arten orthologen Leserahmens erzielt werden.

Über weitere Sequenzanalysen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass der Promotorbereich des *bvgAS_{BH}*-Genlocus überraschenderweise keinerlei offensichtliche Sequenzhomologien zu dem entsprechenden Promotorbereich der *bvgA_{up}*-Region der „klassischen“ Arten zeigt. Dennoch konnten über *in silico*-Analysen mehrere Sequenzmotive innerhalb der *bvgA_{BHup}*-Region identifiziert werden, die als „inverted repeat“-Strukturen angeordnet sind und die zum Teil eine hohe Übereinstimmung zu der für die „klassischen“ *Bordetella*-Arten beschriebene BvgA-Konsensussequenz 5'-T/A T T C C/T T A-3' besitzen. Während sich diese Wiederholungssequenzen hinsichtlich ihrer Symmetrie und ihrer Anordnung von denen innerhalb der für das *B. bronchiseptica*-Cluster beschriebenen *bvgA_{up}*-Region unterscheiden, konnten auffällige Parallelen zu der Promotorregion des *vag*- (*virulence activated gene*) Gens *bvgR* festgestellt werden.

Obwohl sowohl der Response-Regulator BvgA_{BH} aus *B. holmesii* als auch das BvgA-Protein aus *B. pertussis* *in vitro* an die „inverted repeat“ Strukturen der *bvgA_{BHup}*-Region binden kann, führte eine Analyse der GFP-Expression der Reportergenfusion *bvgA_{BHup}-gfp* zu der erstaunlichen Beobachtung, dass die Reportergenfusion in *B. pertussis* durch die Bindung des BvgA-Proteins reprimiert wird, während sie im Gegensatz dazu in *B. holmesii* durch die Bindung des BvgA_{BH}-Proteins aktiviert wird. Die molekulare Grundlage für diese unterschiedlichen Regulationsmechanismen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Trotz einer umfangreichen Sequenzkonservierung zwischen dem Response-Regulator BvgA_{BH} aus *B. holmesii* und BvgA aus *B. pertussis* ist das BvgA_{BH}-Protein nicht in Lage, die Funktion des BvgA-Proteins aus *B. pertussis* *in vitro* bzw. *in vivo* zu ersetzen.

Im Gegensatz dazu konnte mit Hilfe von Komplementationsexperimenten gezeigt werden, dass die Histidinkinase BvgS_{BH} aus *B. holmesii* in der Lage ist, die Funktion des in dem *B. pertussis* Stamm 347 mutierten BvgS-Proteins zu übernehmen. Überraschenderweise unterscheidet sich jedoch das BvgS_{BH}-Protein hinsichtlich der Wahrnehmung der Umweltstimuli von BvgS, da die Aktivität der Histidinkinase BvgS_{BH} in dem hybriden *B. pertussis* Stamm BP 347 (pRK415-*bvgAS_{BH}* ATCC51541) nicht vollständig durch Sulfationen moduliert werden kann. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass im Gegensatz zu den cytoplasmatischen Regionen die BvgS_{BH}- und BvgS- Sensorproteine vor allem in ihren sensorischen Bereichen einen sehr geringen Konservierungsgrad aufweisen.

A Summary

Members of the genus *Bordetella* form a group of closely related organisms. With the exception of the environmental isolate *B. petrii*, *Bordetella* species were known until now exclusively in close association with host organisms. The three “classical” *Bordetella* species possess different pathogenic potential, ranging from the strictly human pathogen and etiological agent of whooping cough, *B. pertussis* and the likewise human pathogen *B. parapertussis* to *B. bronchiseptica*, which causes respiratory infections in a wide range of warm-blooded animals. On the other hand, within the past few years new species have been included in the genus *Bordetella*, namely, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. trematum*, *B. holmesii* and *B. petrii*, which are pathogenic for human and/or animals. Since little is known about the phylogenetic relationship of the “new” *Bordetella* species within the genus *Bordetella*, these species were investigated considering the distribution and conservation of well-characterized *Bordetella* genes and IS elements. Because of the increasing indication of *B. holmesii* as a human pathogen and its association with pertussis-like symptoms these experiments were focused on the analysis of its phylogenetic relationship to the *B. bronchiseptica* cluster. Whereas the observation that the IS elements IS481 and IS1001, characteristic for the *B. bronchiseptica* cluster, are also found in *B. holmesii*, supports the 16S rDNA based close relationship of *B. holmesii* to the *B. bronchiseptica* cluster, the comparative analysis of OmpA, BvgA and BvgS protein sequences does not. In this regard, *B. holmesii* is more closely related to other “new” *Bordetella* species, being directly adjacent to *B. avium*.

During the characterization of four different *B. holmesii* blood isolates, two variant *B. holmesii* strains were identified which differ from *B. holmesii* wild-type strains regarding the expression of the intact response regulator BvgA_{BH}. DNA sequence analysis revealed that the lack of expression of BvgA_{BH} arises from frameshift mutations which in both cases are due to the presence of an extra A residue within the *bvgA_{BH}* nucleotide sequence. Since the sequence around the site of this point mutation is not characterized by runs of a particular nucleotide there is no evidence for a “classical” context for frameshift mutations. Nevertheless, this DNA region may represent a “hot spot” for frameshift mutations as the two variant *B. holmesii* strains were isolated independently from different blood cultures. Remarkably, the type strain of *B. holmesii* is one of the two identified phase variant strains. However, the role of phase variation in the natural biology of *B. holmesii* remains unclear since no obvious phenotypic differences could be detected between variant and wildtype strains.

Using the “genome walking” technique a *bvgS* orthologous gene (*bvgS_{BH}*) was identified 5 bp downstream of the *bvgA_{BH}* stopcodon. DNA sequence analysis revealed that the *bvgAS_{BH}* locus of *B. holmesii* and the *bvgAS* locus of *B. pertussis* have very limited similarity at the DNA level explaining previous failures to identify the *bvgAS_{BH}* loci in *B. holmesii* using DNA/DNA hybridization studies and the necessity to make use of degenerate oligonucleotide primers to detect this orthologous genelocus via PCR. The “genom walking” approach further revealed that the flanking regions of the *bvgAS* loci are not conserved within the genus *Bordetella* since the *bvgAS_{BH}* locus is not immediately 5′ to the *fhaB* gene of *B. holmesii*. Instead, an open reading frame with similarity to a putative response regulator was detected upstream of *bvgA_{BH}*. Likewise no evidence of a *bvgR* homologous genelocus was detected downstream of *bvgS_{BH}*.

Further DNA sequence analysis additionally showed no obvious sequence similarities between the potential promoter region of the *bvgAS_{BH}* locus (*bvgA_{BH}up*) and the *bvgAS* promoter region of *B. pertussis* (*bvgAup*) but revealed the presence of several “inverted repeat” structures within the *bvgA_{BH}up* region which matches the BvgA binding site consensus sequence 5′-T/A T T C C/T T A-3′.

Whereas the symmetry and the organization of those structures are significantly different from those described within the *bvgAup* region, interesting similarities to the promoter region of the *vag* (virulene activated gene) gene *bvgR* could be identified.

Although both, the response regulator BvgA_{BH} of *B. holmesii* and the BvgA protein of *B. pertussis* show nearly identical binding properties to the “inverted repeat” structures of the *bvgA_{BHup}* region *in vitro*, analysis of the reporter gene fusion *bvgA_{BHup}-gfp* leads to the observation that in *B. pertussis* binding of BvgA to the *bvgA_{BHup}* region results in repression of the reporter gene while, BvgA_{BH} binding activates GFP expression in *B. holmesii*. However, the molecular basis for these different regulatory mechanisms remain unclear.

Despite extensive sequence conservation between the response regulator BvgA_{BH} of *B. holmesii* and BvgA of *B. pertussis*, the BvgA_{BH} protein is not able to replace the function of the BvgA protein *in vitro* and *in vivo*, respectively. In contrast, as was shown by complementation experiments, the histidine kinase BvgS_{BH} of *B. holmesii* is able to replace the function of the mutated BvgS protein in the *B. pertussis* strain 347. Nevertheless, also interesting differences between the BvgS_{BH} were identified considering signal recognition since the BvgS_{BH} protein of the hybride *B. pertussis* strain BP 347 (pRK415-*bvgAS_{BH}*_{ATCC51541}) is only weakly responsive to MgSO₄. This may be due to the fact that, in contrast to the corresponding cytoplasmatic regions, the BvgS_{BH} and BvgS sensor proteins are not well conserved in their predicted sensoric regions.

B Einleitung

1 Die Gattung *Bordetella*

Die Gattung *Bordetella* gehört innerhalb der β -Gruppe der Proteobakterien zur Familie der *Alcaligenaceae* (Vandamme *et al.*, 1996a). Die Abbildung 1 zeigt schematisch einen, auf den DNA-Sequenzen der ribosomalen 16S RNA-Gene beruhenden, phylogenetischen Stammbaum der Gattung *Bordetella* sowie der eng benachbarten Gattungen *Achromobacter* und *Alcaligenes*. Laut gegenwärtiger Genusdefinition handelt es sich bei den *Bordetella* Arten um kleine, Gram-negative Kokkobazillen mit einer Länge von 0,5-2 μm , die einzeln oder paarweise, selten in kurzen Ketten, vorliegen. Sie besitzen meist einen aeroben Metabolismus, der auf die Veratmung von Aminosäuren spezialisiert ist.

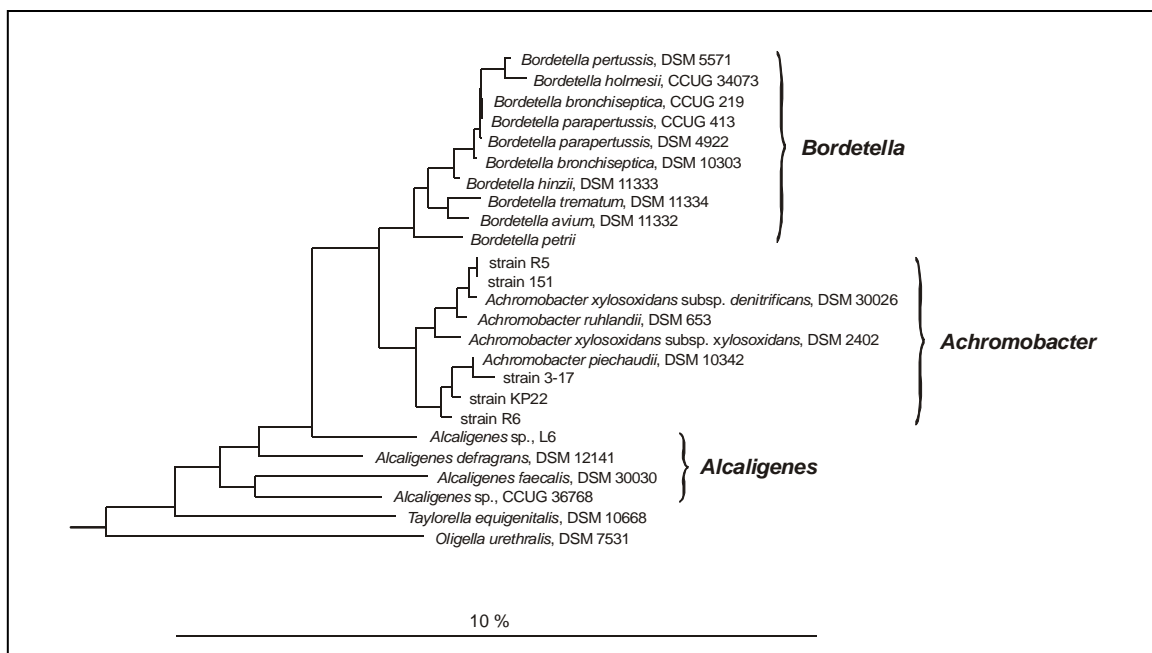


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Familie *Alcaligenaceae* basierend auf den 16S rDNA-Sequenzen (Gerlach *et al.*, 2001).

Zur Gattung *Bordetella* gehören nach heutigem Wissenstand insgesamt acht Arten. Hierzu gehören zum einen die sogenannten „klassischen“, human- bzw. säugetierpathogenen Arten *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* und *B. parapertussis*. Zum anderen wurden diesem Genus in den letzten Jahren die „neuen“ Arten *B. avium*, *B. holmesii*, *B. hinzii*, *B. trematum* und *B. petrii* zugeordnet, die zum Teil tierpathogenes, aber auch humanpathogenes Potential besitzen. Während die vier Arten *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* und *B. holmesii*, wie in Kapitel 1.1 beschrieben wird, für respiratorische Erkrankungen beim Menschen bzw. Säugetieren verantwortlich gemacht werden, konnten die weiteren *Bordetella*-Arten bislang nicht aus dem respiratorischen Trakt des Menschen isoliert werden. Hierzu gehört zum einem *B. avium*: Dieser Erreger konnte bis heute nur aus dem respiratorischen Trakt von verschiedenen Geflügelarten isoliert werden. *B. avium* gilt als der Erreger der Bordetellosis bei Vögeln (Skeeles and Arp, 1997), wobei sein klinisches und histopathologisches Krankheitsbild dem einer *B. bronchiseptica*- und *B. pertussis*-Infektion bei Säugern ähnelt (Gentry-Weeks *et al.*, 1988; Temple *et al.*, 1998). *B. hinzii* wurde vorwiegend als Kommensal aus dem respiratorischen Trakt von asymptomatischen Geflügeln isoliert. In wenigen Fällen wurde dieser Keim aus Blutkulturen von immunsupprimierten Patienten, wie z. B. AIDS-Patienten, isoliert und für Sepsisfälle verantwortlich gemacht

(Cookson *et al.*, 1994; Kattar *et al.*, 2000). Ebenso konnte *B. hinzii* aus Patienten mit einer Cystischen Fibrose isoliert werden (Funke *et al.*, 1996). *B. trematum* wurde beim Menschen bislang nur aus Wund-infektionen bzw. entzündlichen Erkrankungen des Gehörganges isoliert. Ungeklärt ist allerdings bislang, ob dieser Keim ursächlich mit diesen Erkrankungen assoziiert ist, oder ob es sich hierbei um Sekundärinfektionen handelt (Vandamme *et al.*, 1996b).

Vor der Beschreibung von *B. petrii* nahm man an, dass die Vertreter der Gattung *Bordetella* ausschließlich in enger Assoziation mit einem Wirtsorganismus vorkommen und auf einen aeroben Metabolismus beschränkt sind. Mit der Isolation von *B. pertii* aus dem Flusssediment der Saale wurde vor einigen Jahren das erste Umweltisolat dieser Gattung beschrieben (von Wintzingerode *et al.*, 2001). Das Vermögen von *B. pertrii* unter anaeroben Bedingungen durch Nitrat- oder Selenatreduktion zu wachsen unterscheidet diese Art deutlich von den anderen, obligat aeroben Vertretern seiner Gattung.

1.1 *Bordetella* Arten, die mit respiratorischen Erkrankungen beim Menschen in Verbindung gebracht werden

Im folgenden werden vier Vertreter der Gattung *Bordetella* näher vorgestellt, die beim Menschen für respiratorische Erkrankungen verantwortlich gemacht werden.

1.1.1 Das *B. bronchiseptica*-Cluster

Seit längerem ist bekannt, dass die drei Arten *B. pertussis*, *B. parapertussis* sowie *B. bronchiseptica* den respiratorischen Trakt von Säugetieren kolonisieren. In einigen wenigen in der Literatur beschriebenen Fällen konnte *B. pertussis* (Janda *et al.*, 1994) und *B. bronchiseptica* (Katzenstein *et al.*, 1984; Borrás Sans *et al.*, 1991; Qureshi *et al.*, 1992; Bauwens *et al.*, 1992) jedoch auch aus Blutkulturen von immunsupprimierten Personen isoliert und so mit Bakteriämien in Verbindung gebracht werden.

Sequenzanalysen der 23S rDNA Sequenzen (Müller and Hildebrandt, 1993), DNA/DNA-Hybridisierungen (Dobrogosz *et al.*, 1979), Multilocus-Enzym-Elektrophorese (van der Zee *et al.*, 1997) sowie die am Sanger Center ermittelten Genomsequenzen (http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_pertussis/) demonstrieren eine sehr enge verwandtschaftliche Beziehung zwischen diesen Arten. Man geht davon aus, dass es sich hierbei um Subspezies einer einzigen Art handelt. Da eine strikte Einteilung in drei unterschiedliche Arten demnach fraglich erscheint, werden sie oftmals im sogenannten *B. bronchiseptica*-Cluster zusammengefasst. Trotz dieser engen genetischen Verwandtschaft können diese drei Arten, wie der Tabelle 1 zu entnehmen ist, aufgrund einiger physiologischer Merkmale sehr leicht voneinander unterschieden werden. Der signifikanteste Unterschied liegt dabei jedoch im Bereich der Wirtsspezifität.

B. pertussis ist der Erreger des Keuchhustens beim Menschen. Da es bislang noch keinen Hinweis auf einen anderen Wirtsorganismus oder ein Reservoir in der Umwelt gibt, gilt dieses Bakterium als obligat humanpathogen. Die Infektionskrankheit befällt vorwiegend nicht immunisierte Kinder im Alter von weniger als fünf Jahren, wobei Säuglinge unter einem Jahr die größte Risikogruppe ausmachen (Cherry und Heininger 1999; Hewlett, 1997). Man teilt das typische Krankheitsbild einer Keuchhusteninfektion in drei Stadien ein. Nach einer Inkubationszeit von fünf bis 21 Tagen entsteht zunächst ein akuter Katharrh der Atemwege, der von unspezifischen, einer Erkältung ähnlichen Symptomen wie Schnupfen, Niesen, Husten und leichtem Fieber, gekennzeichnet ist. In diesem Stadium, das als *Stadium catarrhale* (Dauer 7-14 Tage) bezeichnet wird, ist die Diagnose noch sehr schwierig und die Ansteckungsgefahr am höchsten. Die Diagnose erfolgt meist erst im *Stadium convulsivum*

(Dauer 3-6 Wochen) anhand der typischen Keuchhustenanfälle. Als Begleiterscheinung dieser krampfartigen Hustenattacken tritt häufig Erbrechen auf. Im *Stadium decrementi*, das Wochen bzw. Monate andauern kann, kommt es dann zu einem allmählichen Abklingen der Symptome. Der Erreger kann interessanterweise nur während des *Stadium catarrhale* aus dem respiratorischen Trakt isoliert werden. Seine Isolation ist nach Ausbruch der Keuchhustenanfälle nicht mehr erfolgreich, was auf eine wichtige Rolle von Toxinen bei der Symptomausprägung schließen lässt (Cotter and Miller, 2000). Neben dem oben beschriebenen typischen Krankheitsbild des Keuchhustens kann man bei Jugendlichen und Erwachsenen auch einen milderen und abgeschwächten Verlauf dieser Krankheit beobachten (Cherry, 1999b). Es konnte gezeigt werden, dass zwischen 12 und 32% der auftretenden, langanhaltenden Hustenerkrankungen auf eine Pertussisinfektion zurückzuführen sind. (Deville *et al.*, 1995). Da die Schutzwirkung der Erstimpfung auf maximal neun bis zehn Jahre begrenzt ist, sind Pertussisinfektionen bei Jugendlichen und Erwachsenen vorwiegend auf eine mit den Jahren abgeschwächte Immunität zurückzuführen. Erwachsene mit untypischem und deswegen meist nicht diagnostiziertem Keuchhusten gelten heutzutage als eine bedeutende Übertragungsquelle von *B. pertussis* (Cotter and Miller, 2000).

Ein weiterer Vertreter des *B. bronchiseptica*-Clusters, *B. parapertussis*, verursacht eine mildere und nicht so lang andauernde Form des Keuchhustens beim Menschen (Heininger *et al.*, 1994). Es wird angenommen, dass die Anzahl der *B. parapertussis*-Infektionen bislang unterschätzt wurde, da einige Untersuchungen darauf hinweisen, dass zwischen 5 und 25 % der vermeintlichen Pertussis-Fälle, tatsächlich durch diesen Organismus verursacht werden (Linnemann *et al.*, 1977; Mertsola *et al.*, 1985; Mastrantonio *et al.*, 1998). Neben diesen Humaninfektionen wird *B. parapertussis* auch für chronische, nonprogressive Pneumonie in Schafen verantwortlich gemacht (Yuk *et al.*, 1998a). Die Isolate aus dem Schaf unterscheiden sich jedoch deutlich von den Humanisolaten, weshalb diese Tiere nicht als Reservoir für humanpathogene *B. parapertussis*-Stämme angesehen werden. (van der Zee *et al.*, 1997; Yuk *et al.*, 1998a).

Der dritte Vertreter des *B. bronchiseptica*-Clusters, *B. bronchiseptica*, besitzt im Gegensatz zu *B. pertussis* und *B. parapertussis* ein breiteres Wirtsspektrum. Dieses Bakterium kann aus dem respiratorischen Trakt von verschiedenen Säugetierarten isoliert werden (Goodnow, 1980). Beim Menschen wurde *B. bronchiseptica* fast ausschließlich aus dem respiratorischen Trakt von immunsupprimierten Personen, die in Kontakt mit infizierten Haustieren standen, isoliert. Dort verursacht dieser Keim chronische, oftmals asymptomatisch verlaufende, respiratorische Erkrankungen, die meist nur schwierig mit Antibiotika zu behandeln sind (Gueirard *et al.*, 1995; Woolfrey and Moody, 1991; Decker *et al.*, 1991; Amador *et al.*, 1991).

1.1.2 *B. holmesii*

Seit kurzem wird mit *B. holmesii* ein weiterer Vertreter der Gattung *Bordetella* mit respiratorischen Erkrankungen beim Menschen in Verbindung gebracht.

B. holmesii wurde 1995 von Weyant *et al.* (1995) zum erstenmal als nicht beweglicher, Gram-negativer Kokkobacillus beschrieben, der aufgrund seiner Koloniemorphologie leicht mit *B. pertussis* zu verwechseln ist. Dieser Keim lässt sich jedoch anhand von einigen biochemischen Merkmalen, wie z. B. seiner Cephaloximsensitivität und seiner fehlenden β -Hämolyse, leicht von den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters abgrenzen (siehe Tabelle 1). Im speziellen unterscheidet sich *B. holmesii* aufgrund seiner braunen Pigmentierung und einer fehlenden Oxidase-Aktivität von *B. pertussis* und *B. bronchiseptica*, aufgrund einer fehlenden Urease-Aktivität unterscheidet er sich von *B. parapertussis*.

Da *B. holmesii* bei seiner Erstbeschreibung, und auch in den darauf folgenden Jahren, zunächst fast ausschließlich aus Blutkulturen immunsupprimierter Sepsispatienten isoliert

wurde (Weyant *et al.*, 1995; Lindquist *et al.*, 1995; Morris and Myers 1998; Tang *et al.*, 1998, Shepard *et al.*, 2004), nahm man bis in das Jahr 1998 an, dass dieses Bakterium nicht in der Lage ist, den respiratorischen Trakt des Menschen zu kolonisieren. *B. holmesii* konnte dann jedoch aus dem Sputum einer Patientin mit Atemwegsbeschwerden isoliert (Tang *et al.*, 1998) und aus dem Nasenrachenraum von insgesamt 31 Personen Keuchhusten ähnlichen Symptomen isoliert (Yhi *et al.*, 1999) werden. Eine Koinfektion mit *B. pertussis* konnte dabei nicht nachgewiesen werden (Yhi *et al.*, 1999). Man vermutet, dass die Isolation von *B. holmesii* aus dem Nasenrachenraum nur deshalb erfolgreich war, da in diesen Fällen als Selektivmedium BG-Blutplatten mit Methicillin verwendet wurden, ein Antibiotikum, das im Gegensatz zu Cephalexin keinen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von *B. holmesii* besitzt. Da für den Nachweis von *Bordetella* spp. im allgemeinen BG-Blutplatten mit Cephalexin verwendet werden, könnte dies auch eine mögliche Erklärung dafür sein, weshalb dieser Keim vor diesen Untersuchungen niemals im respiratorischen Trakt vom Menschen nachgewiesen werden konnte (Mazengia *et al.*, 2000).

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

Tabelle 1: Physiologische Merkmale zur Unterscheidung der *Bordetella*-Arten *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* und *B. holmesii* (modifiziert nach Weyant *et al.*, 1995; Mazengia *et al.*, 2000).

1.2 Evolutionäre Vorgänge in der Gattung *Bordetella*

Die nächsten Verwandten der Bordetellen gehören zu den Gattungen *Alcaligenes* und *Achromobacter* (DeLey *et al.*, 1986; Yabuuchi *et al.*, 1998). Unter den *Achromobacter*-Arten findet man vor allem Umweltorganismen und einige wenige fakultativ pathogene Erreger, die eine zunehmende Bedeutung als opportunistische, nosokomiale Erreger beim Menschen haben (Granowitz and Keenholtz, 1998; Weitkamp, 2000). Aufgrund dieser engen verwandtschaftlichen Beziehungen vermutet man, dass sich die *Bordetella*-Arten ausgehend von einem gemeinsamen Vorfahren, der im Boden bzw. Wasser gelebt hat, durch den Erwerb von entsprechenden Virulenzfaktoren zu obligaten Parasiten entwickelt haben (Gerlach *et al.*, 2001). Einen Hinweis auf die ursprüngliche Herkunft aus der Umwelt liefert dabei u. a. die Isolation von *B. petrii* aus einem Flußsediment und die Beobachtung, dass *B. bronchiseptica* in der Lage ist, in Phosphatpuffer oder Teichwasser für längere Zeit zu überleben (von Wintzingerode *et al.*, 2001; Porter *et al.*, 1993). Unterstützt wird dies zudem durch die Tatsache, dass bei dem *B. bronchiseptica*-Cluster der Auslöser für die *bvgAS*-vermittelte Aktivierung der Virulenzfaktoren, der Temperaturwechsel von 20°C auf 37°C, dem Wechsel aus der Natur in einen homoiothermen Wirt entspricht. Da man bei dem Umweltbakterium *B. petrii* in der Tat einige Orthologe zu den Virulenzgenen der klassischen Bordetellen

identifizieren konnte, (siehe 2.3) nimmt man an, dass der oben erwähnte Erwerb der Virulenzgene wahrscheinlich schon in der frühen Phase der Evolution stattgefunden haben muss. Interessanterweise konnte man auch in einigen anderen Umweltbakterien, wie z. B. *Aeromonas* spp, *Xanthomas campestris*, *Pseudomonas putida* und *Pseudomonas aeruginosa*, ein der Adenylat-Cyclase ähnliches RTX-Toxin sowie Gene mit Homologien zu FhaB identifizieren (Kuhnert *et al.*, 1997; <http://www.pseudomonas.com>).

Der eigentliche evolutionäre Ursprung der für das *B. bronchiseptica*-Cluster beschriebenen Virulenzfaktoren ist bislang allerdings noch nicht bekannt. Bei vielen pathogenen Bakterien wird für die Entwicklung eines spezifischen pathogenen Phänotyps der horizontale Erwerb von genetischer Information, wie z. B. in Form von Pathogenitätsinseln, verantwortlich gemacht. Bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters gibt es allerdings kaum Hinweise auf das Vorhandensein solcher Virulenzgencluster, da zum einen die einzelnen Virulenzfaktoren meist willkürlich über das gesamte Chromosom zerstreut scheinen, zum anderen sich ihr G+C-Gehalt nicht signifikant von dem für das *B. bronchiseptica*-Cluster typischen G+C-Gehalt (67-68%) unterscheidet (Parkhill *et al.*, 2003). In der Tat konnten in den Genomsequenzen des *B. bronchiseptica*-Clusters bislang nur zwei Bereiche identifiziert werden, in denen einzelne Virulenzgene „geclustert“ vorliegen. Eines dieser Virulenzgencluster enthält die fünf Strukturgene für das Pertussistoxin (*ptxA-ptxE*) und die neun Gene, die für dessen TypIV-Sekretionsmaschine kodieren (*ptIA-ptII*) (Hausman *et al.*, 1996). Dieses Gencluster zeigt darüber hinaus typische Merkmale einer metastabilen Pathogenitätsinsel, da es zum einen stromabwärts von einem tRNA-Gen flankiert wird, zum anderen *B. bronchiseptica*-Stämme beschrieben wurden, bei denen das *ptx/ptl*-Gencluster fehlt. Bei diesen Stämmen ist das stromabwärts gelegene tRNA-Gen und die *bug-* (*bordetella unknown gene*) Sequenz, die upstream vor dem *ptx*-Operon liegt, erhalten geblieben (Antoine *et al.*, 2000a). Das zweite Virulenzgencluster kodiert für die regulatorischen Gene *bvgAS*, dem *fhaB*-Struktur- und den *fha*-Transportgenen, sowie einige Gene, die für die Biosynthese und den Export der Fimbrien verantwortlich sind (Willems *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu dem *ptx/ptl*-Gencluster gibt es allerdings gegenwärtig kein Anzeichen für eine Instabilität.

Für die im Abschnitt 1.1.1 beschriebene Anpassung und Spezialisierung an unterschiedliche Wirtsorganismen scheint der horizontale Erwerb von genetischem Material ebenfalls nicht von Bedeutung zu sein. Wichtige virulenzrelevante Unterschiede spielen sich zwischen *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* vielmehr auf der Ebene der Transkription ab. Tatsächlich kommen, wie im Abschnitt 2.2 beschrieben wird, die Gene vieler Virulenzfaktoren zwar bei allen drei Arten vor, doch werden diese oftmals nur art- bzw. stammspezifisch exprimiert. Die am Sanger Center ermittelten Genomsequenzen von *B. pertussis* und *B. parapertussis* deuten zudem daraufhin, dass diese Arten durch ihre Spezialisierung auf einen einzigen Wirt einen erheblichen Teil ihrer genetischen Information verloren haben. So ist das Genom von *B. pertussis* und *B. parapertussis* mit ca. 4,0 Mbp bzw. 4,8 Mbp deutlich kleiner als das von *B. bronchiseptica* mit 5,3 Mbp (Parkhill *et al.*, 2003). Zudem zeichnet sich das Genom von *B. pertussis* und *B. parapertussis* durch eine erhebliche Anzahl an Pseudogenen (358 Pseudogene bei *B. pertussis* bzw. 200 bei *B. parapertussis*) aus, die Spuren eines vermutlich derzeit noch weiter anhaltenden Genomdegenerationsprozesses darstellen (Parkhill *et al.*, 2003). Das Phänomen der Genomreduktion wurde auch bei anderen Krankheitserregern, wie beispielsweise Rickettsien und Mycoplasmen, aber auch bei obligat symbiontischen Bakterien, wie den Symbionten von Blattläusen, beobachtet (Andersson and Kurland, 1998; Charles and Ishikawa, 1999).

Im weiteren konnten über die Auswertung der Genomsequenzen von *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* mehrere Vermutungen über ihre evolutionären Beziehungen bestätigt werden. So konnte zum einen nachgewiesen werden, dass humane *B. parapertussis*-Isolate (*B. parapertussis*_{hu}) in der Tat eine sehr viel engere verwandtschaftliche Beziehung zu der tierpathogenen Art *B. bronchiseptica* besitzen als zu

dem ebenfalls humanpathogenen Erreger *B. pertussis*. Man nimmt deshalb an, dass es sich bei *B. parapertussis*_{hu} und *B. pertussis* um direkte Abkömmlinge von unterschiedlichen *B. bronchiseptica*-Stämmen handelt, die sich vor 0,27-1,4 bzw. 0,7-3,5 Millionen Jahren von einem dem *B. bronchiseptica*-Cluster gemeinsamen Vorfahren abgespalten haben (Parkhill *et al.*, 2003). Ebenso konnte schon seit längerem gezeigt werden, dass sich *B. parapertussis*-Isolate aus dem Schaf (*B. parapertussis*_{ov}) in ihrer Genomstruktur deutlich von den *B. parapertussis*_{hu}-Isolaten unterscheiden. Man vermutet deshalb, dass auch sie sich unabhängig voneinander von einem gemeinsamen Vorfahren aus entwickelt haben und dass Schafe kein Reservoir für humanpathogene *B. parapertussis*-Keime darstellen (van der Zee *et al.*, 1997).

Aufgrund der noch fehlenden Datenlage ist eine Aussage über die evolutionären Beziehungen der „neuen“ *Bordetella*-Arten nicht möglich.

2 Die Virulenzfaktoren der Gattung *Bordetella*

Die Mitglieder des *B. bronchiseptica*-Clusters sind in den letzten Jahren molekularbiologisch intensiv untersucht worden. Von *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* ist daher bekannt, dass für die erfolgreiche Besiedlung des respiratorischen Trakts eine Reihe von Virulenzfaktoren notwendig sind (Gross *et al.*, 1993; Mooi *et al.*, 1992; Weiss *et al.*, 1984; Weiss and Goodwin, 1989).

2.1 Die Virulenzfaktoren des *B. bronchiseptica*-Clusters

Der erste Schritt im Infektionszyklus von *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* besteht in der Kolonisierung des oberen respiratorischen Traktes. Dies wird durch die spezifische Adhäsion an das Cilienepithel gewährleistet.

Das filamentöse Hämagglutinin (FhaB) wird als der wichtigste Adhäsionsfaktor des *B. bronchiseptica*-Clusters angesehen, da seine Expression für die erfolgreiche Kolonisierung des respiratorischen Trakts unbedingt erforderlich ist (Cotter *et al.*, 1998). Das 220 kDa große, stark immunogene FhaB-Protein wird zunächst als 367 kDa großes Vorläuferprotein gebildet. In einem komplexen, post-translatorischen Reifungsprozess wird das Vorläuferprotein durch den periplasmatischen Raum auf die Oberfläche transportiert, wo es schließlich mit dem C-terminalen Ende an der Bakterienoberfläche verankert wird (Domenighini *et al.*, 1990; Locht *et al.*, 1993). Am N-terminalen Ende befinden sich mehrere Proteindomänen, die für die Anheftung an eukaryotische Zellen verantwortlich sind (Arico *et al.*, 1993). Hierzu gehören zum einen eine kohlenhydrat-bindende Domäne, welche die Bindung an das Cilienepithel des oberen respiratorischen Trakts ermöglicht (Tuomanen *et al.*, 1988; Relman *et al.*, 1989), zum anderen eine Heparin-Bindestelle, die möglicherweise für die Anlagerung an Epithelzellen oder für die Interaktion mit der extrazellulären Matrix verantwortlich ist (Sato *et al.*, 1981; Urisu *et al.*, 1986). Über das kurze Sequenzmotiv Arg-Gly-Asp (RGD-Motiv) ist FhaB zudem in der Lage, an den Integrin C3-Rezeptor von Makrophagen zu binden (Relman *et al.*, 1990). Das N-terminale Ende von FhaB kann allerdings auch von der Bakterienoberfläche abgespalten werden (Delisse-Gathoye *et al.*, 1990), was für die Verbreitung der Bakterien innerhalb des Wirtsorganismus bzw. auf einen Folgewirt erforderlich ist (Menozzi *et al.*, 1994). Dem filamentösen Hämagglutinin wird darüber hinaus eine Funktion als „Brückenadhäsion“ zugesprochen, da es die Anlagerung von anderen Mikroorganismen an das Cilienepithel erleichtert und somit schwere Sekundärinfektionen ausgelöst werden können (Tuomanen, 1986). Während FhaB somit sowohl auf der Oberfläche der Bakterien verankert als auch in einer sezernierten Form vorliegen kann, sind die anderen Adhäsionsfaktoren hauptsächlich auf der äußeren Membran

lokalisiert. Diese besitzen alle mindestens ein RGD-Motiv und gehören zum größten Teil der Familie der Autotransporterproteine an. Ein Beispiel hierfür ist das Pertaktin (Prn) (Montaraz *et al.*, 1985; Charles *et al.*, 1989; Leininger *et al.*, 1991), der tracheale Kolonisierungsfaktor (Tcf) (Finn *et al.*, 1995) und der Serumresistenz Locus *brk* (*bordetella* resistance to killing) (Fernandez and Weiss, 1994; 1998). Darüber hinaus produzieren die Mitglieder des *B. bronchiseptica*-Clusters mehrere sero-typische Fimbrien (Fim2, Fim3, FimA, FimN und FimX), denen ebenso eine Rolle bei dem Kolonisierungsprozess zugesprochen wird (Boschwitz *et al.*, 1997; Kania *et al.*, 2000).

Nach diesem ersten Schritt der Adhäsion an die Wirtszellen produzieren die Vertreter des *B. bronchiseptica*-Clusters eine Reihe von Zellgiften, die ihre Funktion vor allem in der Schwächung der Abwehrmechanismen des Wirts haben.

Das Pertussistoxin (Ptx) gilt als der wichtigste Virulenzfaktor von *B. pertussis*. Er wird für den charakteristischen Krankheitsverlauf einer Pertussis-Infektion sowie deren Begleiterscheinungen, wie Lymphozytose, Histaminsensibilisierung und die erhöhte Insulinproduktion, verantwortlich gemacht. Außerdem trägt Ptx zusätzlich als Adhäsionsfaktor zur Anlagerung an Makrophagen und an das Cilienepithel bei (Tuomanen and Weiss, 1985; van't Wout *et al.*, 1992). Dieses Toxin gehört zu der Familie der "AB-Toxine" und ist aus fünf unterschiedlichen, nicht kovalent verbundenen Untereinheiten (S1-S5) aufgebaut (Tamura *et al.*, 1982a). Der B-Teil, bestehend aus den Untereinheiten S2- S5, erleichtert die Bindung des Toxins an die Glykokonjugate der Wirtszelloberfläche und ermöglicht dadurch die Translokation des A-Teils ins Innere der Wirtszelle (Tamura *et al.*, 1982b). Der toxische Effekt wird durch den A-Teil vermittelt, der von der S1-Untereinheit gebildet wird. Diese enzymatisch aktive Untereinheit katalysiert unter NAD-Verbrauch die Übertragung von ADP-Ribose-Gruppen an G-Proteine der eukaryotischen Zellen. Die Modifikation und Inaktivierung der G-Proteine führt über eine massive und unkontrollierte Freisetzung von Botenstoffen wie cAMP letztendlich zu einer Beeinträchtigung von wichtigen Signalkaskaden in der Wirtszelle (Katada *et al.*, 1986). Ein Toxin, das von allen Vertretern des *B. bronchiseptica*-Clusters gebildet wird, ist die Adenylatcyclase (Cya), ein bifunktionales, Calmodulin-abhängiges Toxin, welches sowohl hämolytische als auch cAMP-synthetisierende Aktivität besitzt (Glaser *et al.*, 1988). Der C-Terminus von Cya vermittelt die Bindung und Internalisierung des Toxins in eukaryotische Zellen. Im Cytosol kommt es dann nach Abspaltung und Calmodulin-abhängiger Aktivierung der Adenylatcyclase-Aktivität zu einer unregulierten Synthese von cAMP. Dieser unphysiologische Anstieg von cAMP führt zu einer Beeinträchtigung der Leukozytenfunktion bzw. zum Tod der Wirtszelle durch Apoptose (Hewlett *et al.*, 1991; Rogel and Hanski, 1992). Darüber hinaus werden noch zwei weitere Toxine, das Dermonekrotische Toxin (Dnt) und das tracheale Cytotoxin (Tct), produziert. Die gereinigte Form des Dermonekrotischen Toxins verursacht in Mäusen Hautnekrosen und besitzt eine vasokonstriktive Aktivität (Endoh *et al.*, 1990). Außerdem ist dieses Toxin für die Deaminierung von GTP-bindenden Rho-Proteinen verantwortlich, wodurch diese konstitutiv aktiviert werden und es in den betroffenen Zellen zur Ausbildung von Aktin-Stressfasern kommt (Horiguchi *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 1999). Das Tct nimmt eine Sonderstellung ein, da es im Gegensatz zu den zuvor erwähnten Toxinen kein Protein, sondern als Disaccharid-Tetrapeptid ein Bestandteil der bakteriellen Zellwand ist (Cookson *et al.*, 1989a; Cookson *et al.*, 1989b). Mureinbruchstücke wie das Tct entstehen im allgemeinen während des normalen Wachstums eines Bakteriums und werden von den meisten Bakterien wieder recycelt. Bei den Bordetellen kann dieses Mureinbruchstück aufgrund eines Gendefekts allerdings nicht mehr dem Zellmetabolismus zugeführt werden und wird deshalb während der exponentiellen Wachstumsphase freigesetzt (Rosenthal, 1987). In eukaryotischen Zellen induziert Tct die Produktion von Interleukin-1, was eine Aktivierung der wirtseigenen Stickoxid-Synthetase und die massive Produktion von Stickstoffmonoxid NO zur Folge hat. Da Stickstoffmonoxid in hohen Konzentrationen ein Zellgift ist, kommt es, möglicherweise im Zusammenspiel mit

dem Lipopolysaccharid (LPS) der Bakterien, zu einer massiven Schädigung des respiratorischen Epithels (Heiss *et al.*, 1994; Flak *et al.*, 2000). Da durch den Verlust des Cilienepithels die Atemwege nicht mehr von Schleim gesäubert werden können, wird das Tct auch als Hauptursache für die krampfartigen Hustenanfälle angesehen (Luker *et al.*, 1995). Der *brk*-Locus wird neben seiner Funktion als Adhäsionsfaktor auch für die Resistenz der Bordetellen gegenüber dem Komplementsystem des menschlichen Serums verantwortlich gemacht (Fernandez und Weiss, 1994, 1998). In *B. bronchiseptica*-Stämmen konnte im weiteren ein TypIII-Sekretionssystem nachgewiesen werden, welches für die Aggregation des eukaryotischen Transkriptionsfaktor NF- κ B im Cytosol von infizierten Epithelzellen verantwortlich gemacht wird. Es wurde postuliert, dass *B. bronchiseptica* durch die Inaktivierung von NF- κ B die Immunantwort des Wirts moduliert (Yuk *et al.*, 2000).

2.1.1 Nachweis der Virulenzfaktoren bei dem *B. bronchiseptica*-Cluster

Obwohl das genetische Repertoire bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters sehr ähnlich ist (Parkhill *et al.*, 2003), unterscheiden sich diese Arten hinsichtlich ihrer Wirtsadaptation und ihres Krankheitsverlaufs. Es wird angenommen, dass die Hauptursache hierfür in der unterschiedlichen Expression der einzelnen Virulenzfaktoren liegt.

Während die Adhäsionsfaktoren FhaB und Prn, sowie die Toxine Cya, Tct und Dnt von allen Vertretern des *B. bronchiseptica*-Clusters gebildet werden, werden andere Faktoren nur Art- bzw. Stammspezifisch exprimiert (siehe Tabelle 2).

Hierzu zählt zum einen das Pertussistoxin, dessen Expression bislang nur bei allen untersuchten *B. pertussis*-Isolaten, jedoch nur bei einigen wenigen *B. parapertussis*- und *B. bronchiseptica*-Isolaten nachgewiesen werden konnte. Obwohl der entsprechende Genlocus bei *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* vorhanden ist, sind diese Arten aufgrund von Punktmutationen innerhalb der Promotorregion nicht in der Lage, dieses Toxin zu produzieren (Gross and Rappuoli, 1988; Stefanelli *et al.*, 1997; Parkhill *et al.*, 2003). Man nimmt an, dass die fehlende Ptx-Expression von *B. parapertussis* auch eine mögliche Erklärung dafür ist, weshalb das klinische Bild einer Parapertussis-Infektion zunächst dem einer Pertussis-Infektion sehr ähnlich ist, die Krankheit im Fall von *B. parapertussis* dann jedoch sehr viel kürzer und milder verläuft. Ähnlich wie das Pertussistoxin wird auch der tracheale Kolonisierungsfaktor (Tcf) nur von *B. pertussis* und nicht von *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* synthetisiert (Finn *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu kann die Expression der Urease (Mc Millan *et al.*, 1996) nur bei *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica*, jedoch nicht bei *B. pertussis*-Isolaten nachgewiesen werden. Auch hier scheint die Akkumulation von Punktmutationen innerhalb der Upstream-Region des Urease-Genclusters für die fehlende Expression der Urease verantwortlich zu sein (Mc Millan *et al.*, 1998). Im weiteren sind nur *B. bronchiseptica*-Stämme aufgrund der Expression von Flagellen beweglich, obwohl die entsprechenden Gene bei *B. pertussis* und *B. parapertussis* vorhanden sind (Akerley *et al.*, 1995).

Unterschiede hinsichtlich der Expression einzelner Virulenzfaktoren sind allerdings nicht nur unter den einzelnen Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters, sondern auch zwischen unterschiedlichen *B. bronchiseptica*-Stämmen zu beobachten. So wird zum Beispiel der Serumresistenzfaktor nur von einzelnen *B. bronchiseptica*-Stämmen exprimiert. (Rambow *et al.*, 1998). Ebenso verlieren *B. bronchiseptica* Isolate während einer Infektion des menschlichen Wirtes oftmals die Fähigkeit, das Adenylatcyclase Toxin (Gueirard *et al.*, 1995) sowie die für *B. bronchiseptica* und *B. parapertussis* charakteristischen O-spezifischen LPS-Seiten zu exprimieren (LeBlay *et al.*, 1997; Gueirard *et al.*, 1998). Auch hier wird vermutet, dass die fehlende Expression nicht auf größere genetische Veränderungen innerhalb des LPS-

Biosyntheselocus zurückzuführen ist, sondern eher durch regulatorische Mutationen innerhalb der einzelnen Promotorregionen hervorgerufen wird (Middendorf and Gross, 1999).

Virulenzfaktor	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>
Ptx			
Expression ^a	+	-	-
Gene ^b	+	+	+
Cya			
Expression ^a	+	+	+
Gene ^b	+	+	+
Tct	+	+	+
Dnt			
Expression ^a	+	+	+
Gene ^b	+	+	+
FhaB			
Expression ^a	+	+	+
Gene ^b	+	+	+
Prn			
Expression ^a	+	+	+
Gene ^b	+	+	+
Fimbrien			
Expression ^a	+	+	+
Gene ^b	+	+	+
Tcf			
Expression ^a	+	-	-
Gene ^b	+	+	+
Urease-Aktivität			
Expression ^a	-	+	+
Gene ^b	+	+	+
TypIII-Sekretionssystem			
Expression ^a	-	+	+
Gene ^b	+	+	+
BrkA			
Expression ^a	+		einige Stämme
Gene ^b	+	+	+

Tabelle 2: Verbreitung der Virulenzfaktoren innerhalb des *B. bronchiseptica*-Clusters.

^a= nach Southernblot bzw. Genomdaten

^b= nach Westernblot

2.2 Die Virulenzfaktoren der „neuen“ *Bordetella*-Arten

Im Gegensatz zu dem *B. bronchiseptica*-Cluster ist noch relativ wenig über die virulenzrelevanten Faktoren der „neuen“ *Bordetella*-Arten bekannt. Obwohl *B. holmesii* aus Patienten mit Keuchhusten ähnlichen Symptomen isoliert wurde, konnte über Southernblot- und Westernblot-Experimente bislang kein für das *B. bronchiseptica*-Cluster bekannter Virulenzfaktor eindeutig nachgewiesen werden. Dies gilt ebenso für *B. trematum* und *B. hinzii*. Auch mit *B. avium* verlief der Nachweis dieser Virulenzfaktoren über DNA/DNA-Hybridisierungs-Experimente und Immunoblots zunächst negativ. Seit längerem ist jedoch bekannt, dass *B. avium* eine dermonekrotische und hämagglutinierende Aktivität besitzt sowie ein tracheales Cytotoxin produziert (Gentry-Weeks *et al.*, 1988; Temple *et al.*, 1998). Im weiteren konnte vor kurzem gezeigt werden, dass dieses Bakterium in der Tat zu den bekannten Virulenzfaktoren des *B. bronchiseptica*-Clusters orthologe Gene besitzt. Es konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung derjenigen Gene, die Homologien zu *bvgS*, *fhaB*, *fhaC*

und *fimC* besitzen, zu einem Verlust der Virulenzeigenschaften im Tiermodell führt (Spears *et al.*, 2003). Weitere Hinweise auf zusätzliche Virulenzfaktoren werden zudem in nächster Zukunft durch die Auswertung der im Moment stattfindenden Genomsequenzierung erhofft (http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_avium/).

Eine erste Analyse der Genomsequenz von *B. petrii* zeigt, dass dieses Umweltisolat ebenso über *phaB*- und *bvgAS*- verwandte Faktoren verfügt. Im weiteren konnten mehrere Gene identifiziert werden, die Homologie zu bekannten Virulenzfaktoren besitzen. Hierzu gehört u. a. ein Gen, das vermutlich für das Transport- und Aktivierungsprotein FhaC kodiert, ein Gen mit Homologien zu dem *brk*-Locus und mehrere Gene, die für die Fimbrienbiosynthese verantwortlich gemacht werden (Gross, persönliche Mitteilung).

3 Regulation der Virulenzfaktoren durch das BvgAS-Zwei-Komponentensystem

Die Expression der unter 2.1 vorgestellten Virulenzfaktoren wird, mit Ausnahme des Tct, bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters auf transkriptioneller Ebene durch den *bvgAS* (*bordetella virulence gene*)-Locus reguliert (Gross and Cabonetti, 1993). Das BvgAS-System gehört zur Gruppe der Zwei-Komponentensysteme, die in Prokaryonten für die globale Regulation der Genexpression verantwortlich sind (Gross *et al.*, 1989a; Stock *et al.*, 1990; Arico *et al.*, 1989; Perraud *et al.*, 1999).

3.1 Phasenvariation und phänotypische Modulation

Die durch das BvgAS-System vermittelte Regulation der Virulenzfaktoren kann durch zwei unterschiedliche Mechanismen erfolgen. Zum einen durch einen, zumeist nicht reversiblen Prozess, der als Phasenvariation bezeichnet wird, zum anderen durch den reversiblen Vorgang der phänotypischen Modulation.

Das Phänomen der Phasenvariation wurde 1931 von Leslie und Gardner für *B. pertussis* zum erstenmal erwähnt und konnte dann in den späteren Jahren auch bei *B. bronchiseptica*-Isolaten beobachtet werden. Ein gemeinsames Kennzeichen der Phasenvariation ist die fehlende Expression der Virulenzfaktoren und der daraus resultierende avirulente Phänotyp. Die varianten Stämme treten vor allem während der *in vitro*-Passage im Labor auf und lassen sich aufgrund der fehlenden β -Hämolyse, ihrer erhöhten Erythromycinresistenz und der Koloniemorphologie sehr leicht von den wildtypischen Isolaten unterscheiden (Weiss and Falkow, 1984). Eine Reversion zurück zum wildtypischen Phänotyp konnte bislang nur in einigen wenigen Fällen beobachtet werden (Weiss and Falkow, 1984, Stibitz *et al.*, 1989). Die Häufigkeit, mit der das Ereignis der Phasenvariation auftritt, ist art- bzw. stammspezifisch und beträgt für *B. bronchiseptica*-Stämme zwischen 10^{-3} und 10^{-4} , für *B. pertussis*-Stämme zwischen 10^{-6} und 10^{-7} (Peppler and Schrumpf, 1984; Goldman *et al.*, 1984). Noch völlig unklar ist allerdings, ob dieses Phänomen überhaupt eine *in vivo*-Relevanz besitzt, oder ob es sich hierbei um ein Laborartefakt handelt, das keinerlei Bedeutung im normalen Lebenszyklus der Bordetellen besitzt. Als Ursache für die Phasenvariation werden verschiedenartige Mutationen innerhalb des *bvgAS*-Locus verantwortlich gemacht. Bei *B. bronchiseptica*-Isolaten konnten innerhalb der Nukleotidsequenz für die Histidinkinase BvgS kleine Deletionen in der Größenordnung von 50-500 bp beobachtet werden (Monack *et al.*, 1989). Im weiteren wurden für *B. pertussis*-Phasenvarianten, die durch eine Erythromycin-Selektion isoliert wurden, Punktmutationen in der *bvgS*-Sequenz beschrieben. Es konnte dabei gezeigt werden, dass bei diesen Mutanten in einer Region mit sechs Cytosinresten ein zusätzlicher inseriert war, was eine Verschiebung des Leserahmens zur Folge hatte (Stibitz *et al.*, 1989).

1960 beobachtete Lacey, dass es unter bestimmten Wachstumsbedingungen auch zu einem reversiblen Verlust der Virulenzgenexpression bei Bordetellen kommen kann. Diesen

Vorgang bezeichnet man als phänotypische Modulation. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Bordetellen in mindesten drei unterschiedlichen reversiblen phänotypischen Phasen vorliegen können (siehe hierzu Abschnitt 3.3.1 bis einschließlich 3.3.3), die durch unterschiedliche Kulturbedingungen induziert werden. Das Wachstum der Bakterien bei 37°C in Abwesenheit von Magnesiumsulfat oder Nikotinsäure begünstigt die virulente Bvg⁺-Phase, welche durch kleine, flache, hämolytische Kolonien und der Expression der Virulenzgene gekennzeichnet ist. Niedrige Temperaturen (25°C) oder die Anwesenheit von Magnesiumsulfat bzw. Nikotinsäure begünstigen die avirulente Bvg⁻-Phase. Diese Phase ist durch große, erhabene, nicht-hämolytische Kolonien charakterisiert. Submodulierende Bedingungen (z. B. 0,4 bis 1,6 mM Nikotinsäure im Fall von *B. bronchiseptica*) oder spezielle Mutationen in der *bvgS*-Nukleotidsequenz (Cotter and Miller, 1997) führen zur Ausprägung der Bvgⁱ-Phase.

3.2 Das BvgAS-Zwei-Komponentensystem

Genetische Analysen zeigten, dass der *bvgAS*-Locus für die in Abschnitt 3.1 beschriebenen Phänomene verantwortlich ist (Weiss and Falkow, 1984; Monack *et al.*, 1989). Das BvgAS-Zwei-Komponentensystem gehört zu den unorthodoxen Zwei-Komponentensystemen und zeichnet sich durch einen vierstufigen His-Asp-His-Asp-Phosphotransfer aus (Uhl and Miller, 1994; Uhl and Miller, 1996a; Perraud *et al.*, 1999). Die Abbildung 2 zeigt einen schematischen Aufbau des BvgAS-Systems.

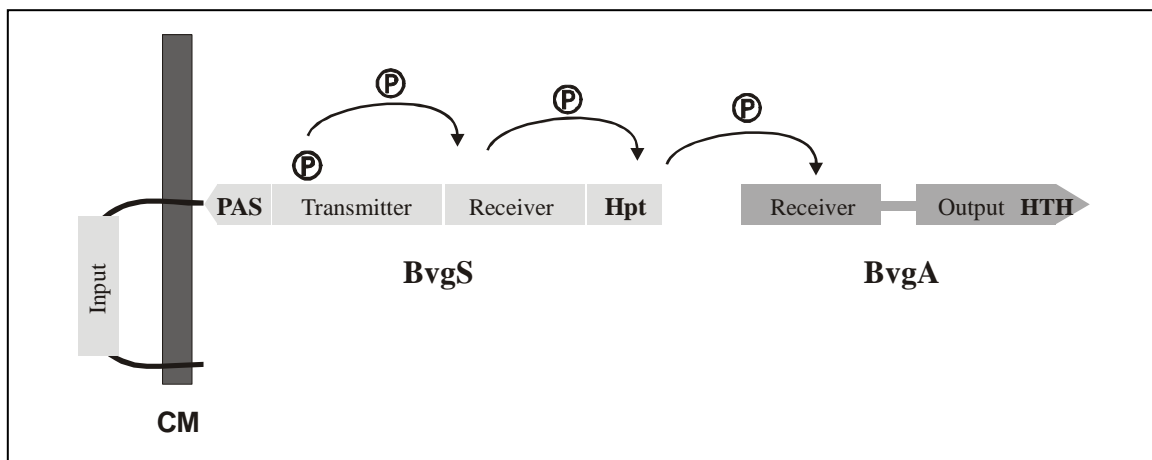


Abbildung 2: Schematische Darstellung des BvgAS-Zwei-Komponentensystems.

Die Histidinkinase BvgS ist über zwei Transmembrandomänen in der Zytoplasmamembran (CM) verankert. Die schwarzen Pfeile symbolisieren die Übertragung der Phosphatgruppe (P) auf den Response-Regulator BvgA. PAS= PAS-Domäne; Hpt= Histidin-beinhaltende Phosphotransfer-Domäne; HTH-Helix-turn-Helix-Motiv.

Bei dem BvgS-Protein handelt es sich um eine 135 kDa große, membranständige, sensorische Histidinkinase, die aus mehreren Domänen aufgebaut ist. Der N-terminale, periplasmatische Bereich von BvgS, welcher von zwei transmembranen Segmenten flankiert wird, ist über einen Linker mit dem cytoplasmatischen Bereich verbunden. Dieser setzt sich aus einer PAS-Domäne, dem Transmitter, dem Receiver und der C-terminalen Hpt-Domäne (Histidin-enthaltende Phosphotransfer-Domäne) zusammen (Stibitz and Yang, 1991; Taylor and Zhulin, 1999). Der Name "PAS" ist eine Abkürzung, die aus den Namen der Proteine gebildet wurde, bei denen diese Domäne zuerst identifiziert wurde. PAS-Domänen sind cytoplasmatische Signalmoleküle, die in allen drei Reichen des Lebens vorkommen und auf Reize wie Licht, Sauerstoff, kleine Liganden sowie den Redox- und Energiezustand der

Zellen reagieren können (Taylor and Zhulin, 1999). In der Tat konnte vor kurzem gezeigt werden, dass BvgS, über seine Fähigkeit *in vitro* den Oxidationszustand von Ubichinon wahrzunehmen, wahrscheinlich direkt mit der Atmungskette und damit dem Energiezustand der Zelle verknüpft ist (Bock *et al.*, 2002). *In vitro* kommt es unter nicht modulierenden Bedingungen (Wachstum der Bakterien bei 37°C in Abwesenheit von Magnesiumsulfat und Nikotinsäure) zu einer Aktivierung der Histidinkinase und demzufolge zu einer ATP-abhängigen Autophosphorylierung am Histidinrest H729 des Transmitters. Von dort aus wird die Phosphatgruppe zunächst auf den Aspartatrest D1023 des BvgS-Receivers übertragen (Uhl and Miller, 1994). Der Phosphotransfer kann nun zum einen weiter auf den Histidinrest H1172 in der Hpt-Domäne erfolgen, oder aber aufgrund der Autophosphatase-Aktivität des Receivers, durch Hydrolyse und Freisetzung von Orthophosphat unterbrochen werden (Uhl and Miller, 1996b). Die Hpt-Domäne ist letztendlich für die spezifische Übertragung der Phosphatgruppe auf den Aspartatrest D54 der Receiver-Domäne von BvgA verantwortlich (Uhl and Miller, 1996b; Perraud *et al.*, 1998).

Das BvgA-Protein ist ein 23 kDa großes, cytoplasmatisches Regulatorprotein, das zur FixJ-Familie der Response-Regulatoren gehört (Pao and Saier Jr, 1995). BvgA setzt sich aus einer N-terminalen Receiver- und einer C-terminalen Output-Domäne mit Helix-turn-Helix (HTH)-Motiv zusammen (Arico *et al.*, 1989) und liegt bereits im nicht phosphorylierten Zustand als Dimer vor (Perraud *et al.*, 2000). Die phosphorylierte Form des Response-Regulators bindet mit erhöhter Affinität an spezifische Zielsequenzen in *bvg*-abhängigen Promotoren (Boucher *et al.*, 1994).

Obwohl das BvgAS-System, wie beschrieben, *in vitro* auf Temperaturveränderungen sowie Sulfationen und Nikotinsäure reagiert, ist über die *in vitro*-Relevanz der durch dieses System wahrgenommenen Signale bislang noch nichts bekannt.

Das BvgAS Zwei-Komponentensystem ist bei *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* sehr stark konserviert. Dies äußert sich zum einen in dem hohen Ausmaß der Sequenzkonservierung. So betragen die Übereinstimmungen in den *bvgAS*-Nukleotidsequenzen über 95 %. Die Proteinsequenzen des Response-Regulators sind darüber hinaus zu 100 % konserviert, die der Histidinkinase zwischen 95 und 99 %. Interessanterweise zeigen die periplasmatischen Domänen von BvgS, die für die Signalwahrnehmung verantwortlich gemacht werden, die größte Variabilität (Arico *et al.*, 1991; Scarlato *et al.*, 1991a; Heininger *et al.*, 2002).

Neben dieser hohen Konservierung auf Sequenzebene findet man bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters zudem auch eine funktionelle Konservierung des BvgAS-Zwei-Komponentensystems. So konnte gezeigt werden, dass wildtypische *B. parapertussis*- und *B. bronchiseptica*-Stämme in der Lage sind, die aus *B. pertussis* klonierte *ptx*-Promotorregion *in trans* zu aktivieren (Gross *et al.*, 1989b, 1989c). Außerdem konnte gezeigt werden, dass phasenvariante *B. bronchiseptica*-Stämme durch den *bvgAS*-Locus von *B. pertussis* komplementiert werden können, wodurch sie wieder zu einer Expression ihrer Virulenzfaktoren zurückfinden (Mc Gillivray *et al.*, 1989). Die funktionelle Konservierung des BvgAS-Systems äußert sich zudem auch darin, dass diese hybriden *B. bronchiseptica*-Stämme nicht nur wieder zum wildtypischen Phänotyp revertieren, sondern dass darüber hinaus die zurückerlangte Expression der Virulenzgene, ähnlich wie beim wildtypischen *B. bronchiseptica*-Stamm, wieder moduliert werden kann (Martinez de Tejada *et al.*, 1996). Allerdings stellte sich hierbei heraus, dass sich der hybride *B. bronchiseptica*-Stamm *in vitro* hinsichtlich der Sensivität der Signalwahrnehmung vom wildtypischen *Bronchiseptica*-Stamm unterscheidet. So waren *in vitro* für eine phänotypische Modulation des hybriden Stammes, im Vergleich zum Wildtyp, eine höhere Konzentration an Magnesiumsulfat und Nikotinsäure nötig (Martinez de Tejada *et al.*, 1996).

3.3 Transkriptionelle Kontrolle von *bvg*-regulierten Genen

Das BvgAS-Zwei-Komponentensystem ist direkt und indirekt für die Aktivierung und Repression von einer Reihe von Genen verantwortlich. Auf diese Weise kontrolliert es die Expression von mindestens vier unterschiedlichen Gen-Klassen.

3.3.1 Die BvgAS-vermittelte Aktivierung der *vag* Gene; die Bvg⁺-Phase

Das BvgAS-Zwei-Komponentensystem ist direkt für die Aktivierung der *vag*-Gene (virulence activated gene), die während der Bvg⁺-Phase exprimiert werden, verantwortlich. Zu den *vag*-Genen gehören neben den in 2.1 beschriebenen Virulenzfaktoren auch einige Housekeeping-Faktoren, wie z. B. ein Porin und das Cytochrom d-629 (Ezzel *et al.*, 1981; Finn *et al.*, 1995; Antoine *et al.*, 2000b). Auch das *bvgAS*-Operon ist Teil dieser Gene und unterliegt demnach einer positiven Autoregulation (Roy *et al.*, 1990; Roy *et al.*, 1991; Scarlato *et al.*, 1990).

Unter nichtmodulierenden Bedingungen wirkt die phosphorylierte Form des Response-Regulators (BvgA-P) als Transkriptionsaktivator der *vag*-Gene. Die Promotorregionen der *vag*-Gene enthalten als BvgA-Bindestelle die Konsensussequenz 5'-T/A T T C C/T T A-3' oder Varianten davon. Diese sind entweder als "direct repeat"- oder "inverted repeat"-Strukturen mit unterschiedlichen Abständen zwischen den beiden Halbseiten angeordnet (Roy and Falkow, 1991; Karimova and Uhlmann, 1997; Marques and Carbonetti, 1997). Die Anwesenheit von mehreren BvgA-Bindestellen ist dabei ein gemeinsames Kennzeichen von allen *bvg*-abhängigen Promotoren. Es wird deshalb angenommen, dass es während der DNA-Bindung zu einer Oligomerisierung und Akkumulation von mehreren BvgA-Dimeren innerhalb der Promotorregion kommt (Boucher and Stibitz, 1995; Boucher *et al.*, 1997; Karimova *et al.*, 1996). Die *bvg*-abhängigen Promotoren besitzen dabei im allgemeinen jeweils eine primäre Bindestelle sowie eine oder mehrere sekundäre Bindestellen. Das Regulatorprotein bindet dabei zunächst mit hoher Affinität an die primäre Bindestelle. Kooperative Interaktionen ermöglichen dann die Bindung von weiteren BvgA-Dimeren an die sekundären Bindestellen. Im Vergleich zur primären Bindestelle erfolgt dies allerdings mit einer geringeren Affinität und Spezifität (Boucher *et al.*, 2001a; Boucher and Stibitz, 1995; Karimova *et al.*, 1996; Kinnear *et al.*, 1999; Roy and Falkow, 1991). Die Besetzung der sekundären Bindestelle ermöglicht letztendlich die Interaktion mit der RNA-Polymerase, wobei noch nicht geklärt ist, ob diese Wechselwirkungen mit dem C-Terminus der α -Untereinheit (Carbonetti *et al.*, 1994; Boucher and Stibitz, 1995; Boucher *et al.*, 1997; Stibitz 1998) oder mit der σ^{70} -Untereinheit (Boucher *et al.*, 2003) der RNA-Polymerase erfolgen. Die Zuordnung des Response-Regulators BvgA in die Klasse I (gekennzeichnet durch eine Interaktion des Regulatorproteins mit der α -Untereinheit der RNA-Polymerase) bzw. in die Klasse II (gekennzeichnet durch eine Interaktion des Regulatorproteins mit der σ^{70} -Untereinheit der RNA-Polymerase) der transkriptionellen Aktivatoren ist demnach noch nicht gesichert (Boucher *et al.*, 2003).

Die *vag*-Gene werden nach ihrer Induktionskinetik in zwei Klassen, den „frühen“ und den „späten“ Gene, eingeteilt. Die „frühen“ Gene werden schon wenige Minuten nach einem Shift von modulierenden zu nicht modulierenden Bedingungen transkribiert, während die „späten“ Gene erst nach mehreren Stunden transkribiert werden (Gross and Rappuoli, 1989b; Scarlato *et al.*, 1991b). Zu den frühen Genen gehören u. a. *fhaB* und *bvgAS*. In Abbildung 3 ist schematisch die genetische Anordnung dieser Gene dargestellt.

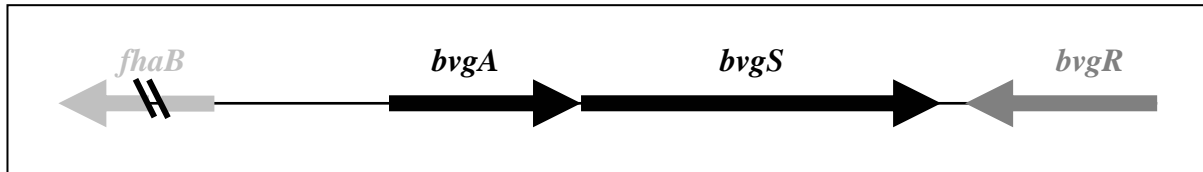


Abbildung 3: Genetische Anordnung der „frühen“ *vag*-Gene *fhaB*, *bvgAS* und *bvgR* bei den Vertretern des *B. bronchiseptica*-Clusters.

Die Gene des *bvgAS*-Locus sind in einem Operon angeordnet und werden als bicistronische RNA transkribiert (Arico *et al.*, 1989). In 5'-Richtung wird dieses Operon durch das *fhaB*-Strukturgen, in 3'-Richtung durch *bvgR* begrenzt. Sowohl *fhaB* als auch *bvgR* werden in die entgegengesetzte Richtung transkribiert, wobei die *fhaB*- und *bvgAS*-Promotorregion zum Teil miteinander überlappen. Mit Hilfe von Deletionsanalysen, Bandshift- und DNaseI-Footprint-Experimenten konnten innerhalb der 425 bp großen *fhaB*-*bvgAS*-intergenischen Region mehrere BvgA-Bindestellen identifiziert werden (Roy and Falkow, 1991). Die Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung dieser Region.

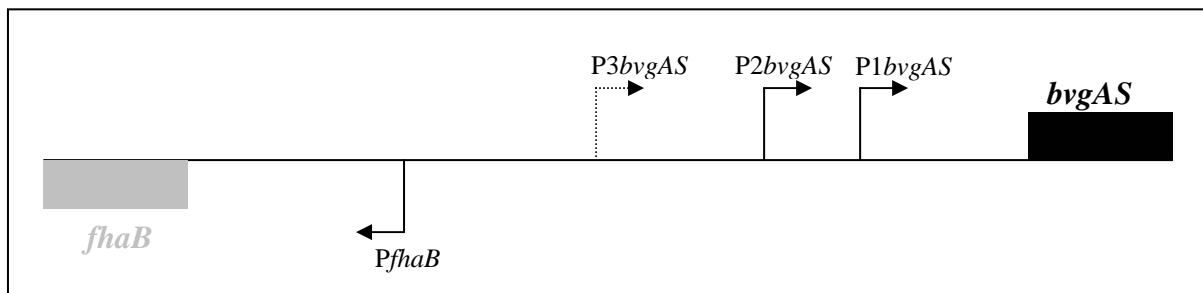


Abbildung 4: Schematische Darstellung der *fhaB*-*bvgAS*-intergenischen Region.

Die Pfeile kennzeichnen die Orientierung und Position der jeweiligen Transkriptionsstartpunkte. Der konstitutiv aktive Promotor *P2bvgAS* befindet sich 143 bp upstream, der *bvg*-abhängige Promotor *P1bvgAS* 93 bp vor dem *bvgAS*-Startcodon. Die Aktivität des Promotors *P3bvgAS* konnte bislang nur bei *B. pertussis* nachgewiesen werden. Der Promotor *PfhaB* befindet sich 70 bp vor dem *fhaB*-Startcodon.

Für die Transkription der *bvgAS*-Operons werden im wesentlichen zwei Promotoren, *P1bvgAS* und *P2bvgAS*, verantwortlich gemacht (Roy *et al.*, 1990; Scarlato *et al.*, 1990). Die Aktivität eines dritten Promotors, *P3bvgAS*, konnte bislang nur bei *B. pertussis* nachgewiesen werden (Scarlato *et al.*, 1991a). Der konstitutiv aktive Promotor *P2bvgAS* ermöglicht während der *Bvg⁻*-Phase die Transkription und Expression eines Grundlevels an *BvgAS*. Dieser Promotor befindet sich 143 bp upstream vor dem *bvgAS*-Startcodon. Unter nicht-modulierenden Bedingungen (*Bvg⁺* Phase) ist der *bvg*-abhängige Promotor *P1bvgAS* aktiv, der 93 bp upstream vor dem *bvgAS*-Startcodon liegt (Scarlato *et al.*, 1990; Roy *et al.*, 1990). Die spezielle Anordnung der *BvgA*-Zielsequenzen innerhalb der *bvgAS*-Promotorregion ermöglicht, dass durch die *BvgA*-P-Bindung die Transkription von dem *bvg*-abhängigen Promotor *P1bvgAS* aktiviert wird, während dadurch gleichzeitig die Aktivität des konstitutiven *P2bvgAS*-Promotors blockiert wird. Das Regulatorprotein übernimmt hier also gleichzeitig die Funktion eines Aktivators und eines Repressors. Die Transkription von *fhaB* erfolgt von dem Promotor *PfhaB*, der 70 bp upstream vor dem *fhaB*-Startcodon liegt (Abbildung 4). Neuere Untersuchungen deuten auf die Existenz von insgesamt fünf *BvgA*-Bindestellen innerhalb der *fhaB*-Promotoregion hin (siehe Abbildung 5). Hierzu gehören eine primäre (P), zwei sekundäre (S1 und S2) und zwei *BvgA*-Bindestellen (U1 und U2), die stromaufwärts vor der primären Bindestelle liegen (Boucher *et al.*, 2003). Die primäre *BvgA*-Bindestelle liegt an Position -88,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt. Sie setzt sich aus

einem fast perfekten „inverted repeat“ (5′-TTTCTTA-3′ auf dem kodierenden und 5′-TTTCCTA-3′ auf dem nicht-kodierenden Strang) zusammen und weist keine Nukleotide zwischen den beiden Halbseiten auf (Roy and Falkow, 1991).

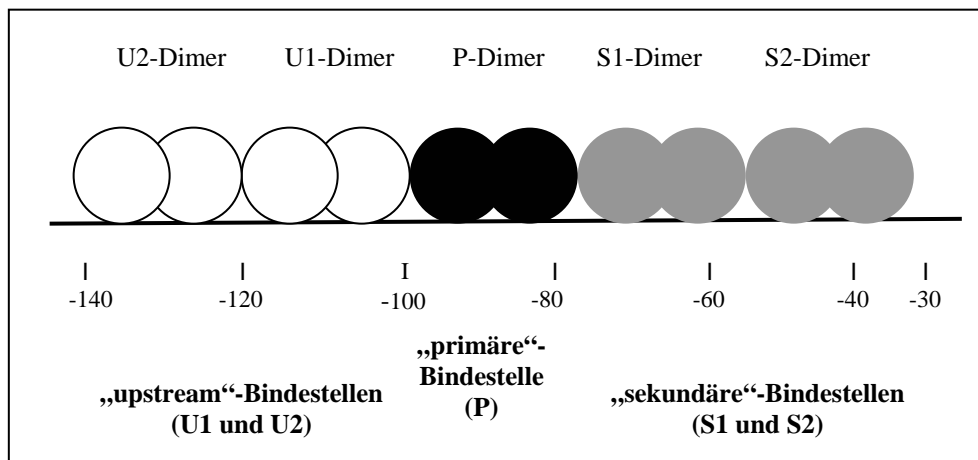


Abbildung 5: Schematische Darstellung der multiplen BvgA-Bindestellen innerhalb der *fhaB*-Promotorregion (nach Boucher *et al.*, 2003).

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

Mutationsanalysen am *fhaB*-Promotor haben gezeigt, dass die Nukleotide an den Positionen 3 (Thymidin), 4 (Cytosin) und 7 (Adenosin) für die Bindung des Response-Regulators besonders wichtig sind. Eine Veränderung des Thymidins in Position 6 zu einem Adenosin übt sich ebenso negativ auf das Bindevermögen von BvgA-P aus (Boucher *et al.*, 2001b). Im weiteren konnte gezeigt werden, dass lediglich die an die P-, S1- und S2-Bindestellen gebundenen BvgA-Dimere an der Aktivierung der *fhaB*-Transkription beteiligt sind. Die einzelnen Binderegionen sind dabei jeweils 21 bp voneinander entfernt, was zwei Umwindungen der DNA entspricht und bedeutet, dass die BvgA-Dimere bei ihrer DNA-Bindung, ausgehend von der primären Bindestelle bis zur -35-Region, eine vollständige Seite der Doppelhelix besetzen (Boucher *et al.*, 2003). Wie bereits oben erwähnt wurde, werden die „späten“ Gene im Vergleich zu den „frühen“ Genen erst mehrere Stunden nach einem Shift von modulierenden zu nicht modulierenden Bedingungen transkribiert. Die Induktion der Transkription scheint dabei mit der Akkumulation von intrazellulärem BvgA zu korrelieren, da für die Aktivierung der späten Gene eine in etwa zehnfach höhere Konzentration an BvgA-P erforderlich ist (Steffen *et al.*, 1991c; 1996; Zu *et al.*, 1996; Karimova *et al.*, 1996). Zu den späten Genen gehören u. a. *cya* und *ptx*. Die molekulare Grundlage für die differentielle Regulation der *vag*-Gene liegt in der unterschiedlichen Architektur ihrer Promotorregionen (Boucher and Stibitz, 1995) und der daraus resultierenden unterschiedlichen Affinität für BvgA (Scarlato *et al.*, 1991b). So wird zum Beispiel im *ptx*-Promotor die primäre Bindestelle aus einem „inverted repeat“ gebildet, dessen Halbseiten, im Vergleich zum *fha*-Promotor, nur an fünf der sieben Positionen mit der Konsensussequenz übereinstimmen. Die beiden Halbseiten sind zudem 10 bp voneinander getrennt, was einer Umdrehung der DNA-Helix entspricht. Außerdem liegt das Zentrum dieser „inverted repeat“-Struktur bei Position -136,5 und ist demnach, im Vergleich zu den „frühen“ Genen, sehr viel weiter stromaufwärts gelegen (Boucher and Stibitz, 1995). Der relativ große Abstand zwischen der primären Bindestelle und dem *ptx*-Transkriptionsstartpunkt deutet daraufhin, dass für eine effektive Interaktion zwischen Response-Regulator und RNA-Polymerase die

Oligomerisierung von mehreren BvgA-Dimeren und somit eine sehr hohe intrazelluläre Konzentration an BvgA-P notwendig ist, die erst mehrere Stunden nach dem Shift vorliegt (Marques and Carbonetti, 1997). Die Trennung der beiden Halbseiten und ihre degenerierten Sequenzen erklären zudem die Beobachtung, dass der Response-Regulator *in vitro* nur in seiner phosphorylierten Form an die *ptx*-Promotorregion binden kann (Boucher and Stibitz, 1995).

Im weiteren wurde vermutet, dass für die effektive Aktivierung der „späten“ *vag*-Gene neben einer höheren BvgA-P-Konzentration zusätzliche akzessorische Faktoren benötigt werden (Stibitz, 1994). So wurde zum Beispiel postuliert, dass das Baf-Protein (Bvg accessory factor) über eine direkte Interaktion mit dem C-Terminus von BvgA für die Aktivierung von *ptx-lacZ*-Fusionen *in trans* in *E. coli* benötigt wird (DeShazer *et al.*, 1995; Wood and Friedman, 2000). Allerdings konnte in *E. coli* eine Aktivierung des *ptx*-Promotors auch in Abwesenheit dieses Faktors festgestellt werden, weshalb die Funktion von Baf weiterhin im Unklaren bleibt (Scarlato *et al.*, 1993; Uhl and Miller, 1995).

Der *bvgR*-Promotor stellt eine Ausnahme zu den bisher beschriebenen *bvg*-aktivierten Promotoren dar. *bvgR* gehört zu den „frühen“ Genen und kodiert für einen putativen Repressor, welcher unter nicht modulierenden Bedingungen für die Repression der *vrg* (virulence repressed genes)-Gene (siehe 3.3.2) verantwortlich gemacht wird (Merkel and Stibitz, 1995; Merkel *et al.*, 1998). Die *bvgR*-Promotorregion verfügt, wie in der Abbildung 6 zu erkennen ist, über insgesamt drei BvgA-Bindestellen, die sich jedoch in ihrer Symmetrie und Organisation von den bislang beschriebenen BvgA-Bindestellen unterscheiden.

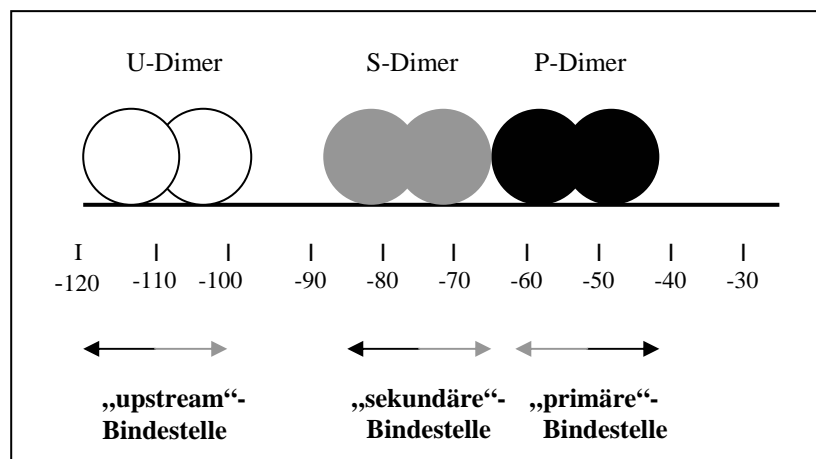


Abbildung 6: Schematische Darstellung der BvgA-Bindestellen und der BvgA-Bindung innerhalb der *bvgR*-Promotorregion (nach Merkel *et al.*, 2003).

Angegeben ist die Position der „primären“, „sekundären“, sowie der „upstream“ BvgA-Bindestelle, relativ zum *bvgR*-Transkriptionsstartpunkt. Jede Bindestelle setzt sich aus zwei Halbseiten zusammen. Die Halbseite mit einer hohen Übereinstimmung zur BvgA-Konsensussequenz ist als schwarzer Pfeil, die Halbseiten mit einer niedrigen Übereinstimmung zur Konsensussequenz ist als grauer Pfeil dargestellt. Das Kugel paar stellt jeweils ein an die DNA gebundenes BvgA-Dimer dar.

So setzen sich diese „repeat“ Strukturen in diesem speziellen Fall aus einer Halbseite mit einer hohen Übereinstimmung zur BvgA-Konsensussequenz und einer Halbseite mit einer äußerst geringen Übereinstimmung zusammen. Zudem befindet sich innerhalb der *bvgR*-Promotorregion die primäre, hoch affine BvgA-Bindestelle in direkter Nachbarschaft zu der -35-Region (Merkel *et al.*, 2003). Im Vergleich zu den anderen *bvg*-aktivierten Promotoren wird hier also zunächst die Stelle besetzt, welche die Interaktionen mit der RNA-Polymerase ermöglicht, bevor die weiter „upstream“ gelegenen sekundären Bindestellen gebunden werden. Trotz dieser struktureller Unterschiede ist die Aktivität des *bvgR*-Promotors überraschenderweise bedeutend stärker als die von *fhaB*. Zudem konnte gezeigt werden, dass

das *bvgR*-Transkript äußerst instabil ist und nach seiner Synthese schnell wieder abgebaut wird (Merkel *et al.*, 2003). Man vermutet, dass die starke Aktivität des *bvgR*-Promotors und der schnelle Turnover des *bvgR*-Transkripts letztendlich dafür verantwortlich ist, dass es in der Bvg⁺-Phase zu einer schnellen und anhaltenden Repression der *vrg*-Gene kommt, während auf der anderen Seite in der Bvg⁻-Phase die schnelle Induktion der *vrg*-Gene sichergestellt wird (Merkel *et al.*, 2003).

Ein weiterer Faktor, dem eine Funktion bei der Expression der *vag*-Gene zugesprochen wird, ist das Tex-Protein, über dessen Funktion allerdings noch wenig bekannt ist (Fuchs *et al.*, 1996). Ebenso scheint die DNA-Topologie einen Einfluss auf die Expression des Virulenzgenregulons zu haben (Scarlatto *et al.*, 1993; Graeff-Wohlleben *et al.*, 1995).

3.3.2 BvgAS-vermittelte Repression der *vrg*-Gene; die Bvg⁻-Phase

Unter modulierenden Bedingungen (d. h. heißt Wachstum bei niedrigen Temperaturen bzw. Wachstum in Anwesenheit von Sulfationen oder Nikotinsäure) findet die Autophosphorylierung der Histidinkinase BvgS und der in 3.2 beschriebene Phosphotransfer auf BvgA nicht statt. In dieser Wachstumsphase, die als Bvg⁻-Phase bezeichnet wird, werden die *vag*-Gene nicht transkribiert. Es kommt zur Expression der *vrg* (*virulence repressed genes*)-Gene. Während das BvgAS-System, wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben wurde, direkt an der Aktivierung der Transkription der *vag*-Gene beteiligt ist, beteiligt es sich nur indirekt an der Kontrolle der *vrg*-Gene. Obwohl *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* nahezu identische *vag*-Gene exprimieren, unterscheiden sich diese Arten hinsichtlich der Zusammensetzung des *vrg*-Regulons. Mit Hilfe von 2D-Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass in *B. pertussis* wenigstens 22 Proteine von dem BvgAS-System reprimiert werden. Hierzu gehören u. a. die zwei Oberflächenproteine Vir-A und Vir-B, über deren Funktion jedoch noch nichts weiteres bekannt ist (Stenson and Peppler, 1995). Über Transposonmutagenese wurden die *vrg*-Gene *vrg6*, *vrg18*, *vrg24*, *vrg53* und *vrg73* identifiziert, deren Funktion jedoch noch völlig unklar ist (Knapp and Mekalanos, 1988). Mit Hilfe einer Microarray-Analyse wurde von Loch *et al.* (2003) neben den bereits bekannten *vrg*-Genen noch zwei weitere *bvg*-reprimierte Faktoren identifiziert, die Homologien zu einem Autotransporte bzw. einer Sensorkinase besitzen. Bei vier der über Transposonmutagenese identifizierten *vrg*-Genen konnte innerhalb der kodierenden Region ein 32 bp langes, konserviertes Sequenzmotiv identifiziert werden. Man nimmt an, dass es sich hierbei um eine Bindestelle für das potentielle Repressorprotein BvgR handelt (Beattie *et al.*, 1990; 1993).

Im Gegensatz zu dem *vrg*-Regulon aus *B. pertussis* ist über die Funktion der *vrg*-Gene aus *B. bronchiseptica* sehr viel mehr bekannt. Ein phänotypisches Kennzeichen der Bvg⁻-Phase von *B. bronchiseptica* ist seine Beweglichkeit. In der Bvg⁻-Phase sorgt der Transkriptionsaktivator *frlAB* für die Transkription und Expression des Mobilitäts-Regulons. Mehrere BvgA-Bindestellen innerhalb der -10-, -35-Region sowie in der kodierenden Sequenz sorgen für die Repression von *frlAB* während der Bvg⁺-Phase (Akerley *et al.*, 1992; 1993). Zu dem *vrg*-Regulon von *B. bronchiseptica* zählen im weiteren vor allem Gene, die an wichtigen Vorgängen des Energiestoffwechsels, wie z. B. dem Elektronentransport, dem Fettsäure-Metabolismus, dem Glyoxylat-Zyklus oder dem Abbau aromatischer Aminosäuren beteiligt sind (Cotter and Miller, 2000; Schneider *et al.*, 2001). Darüber hinaus werden die *vrg*-Gene in *B. bronchiseptica* für die LPS-Variation (van den Akker, 1998), die Synthese eines alternativen Adhäsins (Register und Ackermann, 1997), die Expression der Urease (Mc Millan *et al.*, 1996) und die Expression einer sauren Phosphatase (Chhatwal, 1997) während der Bvg⁻-Phase verantwortlich gemacht.

3.3.3 Die Bvgⁱ-Phase

Unter submodulierenden Bedingungen (z. B. für *B. bronchiseptica* während des Wachstums in Anwesenheit von 0,4 bis 1,6 mM Nikotinsäure) kommt es zur Ausprägung der Bvgⁱ-Phase (Cotter and Miller, 2000). Das Regulon der Bvgⁱ-Phase scheint bei *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* sehr ähnlich zu sein. Während dieser Wachstumsphase liegt im Vergleich zur Bvg⁺-Phase nur eine mittlere Konzentration des phosphorylierten Response-Regulators BvgA (BvgA-P) vor. Aufgrund dessen kommt es zur Expression der „frühen“ *vag*-Gene (*fhaB*, *bvgAS* und *bvgR*), der Repression der *vrg*-Gene und der Aktivierung von Genen, die ausschließlich während dieser Phase exprimiert werden (Cotter and Miller, 1997). Da die BvgA-Bindestellen der „späten“ Gene (*cya*, *ptx*) nur eine geringe Affinität für den Response-Regulator besitzen, werden sie in dieser Phase nicht exprimiert. Zu den Genen, die ausschließlich während der Bvgⁱ-Phase exprimiert werden, gehört das BipA-Protein (*bvg-intermediate phase protein A*) (Stockbauer *et al.*, 2001). In der *bipA*-Promotorregion wurden insgesamt fünf BvgA-Bindestellen identifiziert (siehe Abbildung 7).

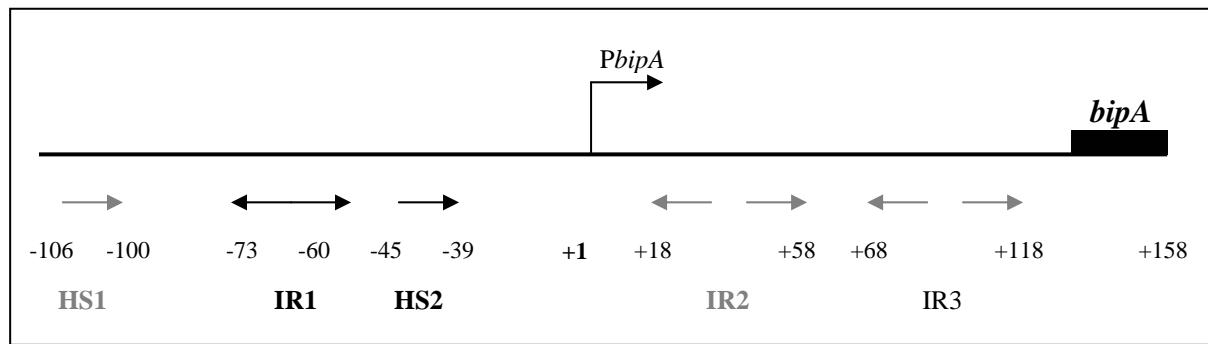


Abbildung 7: Schematische Darstellung der multiplen BvgA-Bindestellen innerhalb der *bipA*-Promotorregion (nach Deora *et al.*, 2004).

Gezeigt ist die Anordnung der BvgA-Bindestellen relativ zum *bipA*-Transkriptionsstartpunkt (+1). Die grauen Pfeile kennzeichnen die Position der Bindestellen, die nur von der phosphorylierten Form des Regulators gebunden werden. Die schwarze Pfeile kennzeichnen die Position der Bindestellen, die unabhängig von dem Phosphorylierungsgrad des Regulators gebunden werden.

Drei davon (IR1, HS1 und HS2) liegen stromaufwärts vor dem *bipA*-Transkriptionsstartpunkt, zwei davon (IR2 und IR3) befinden sich stromabwärts. Die einzelnen Bindestellen unterscheiden sich zudem hinsichtlich ihrer Affinität zu nicht-phosphoryliertem BvgA. Während die nicht-phosphorylierte Form des Response-Regulators in der Lage ist, an die hochaffinen IR1 und HS2 Bindestellen zu binden, kann nur die phosphorylierte Form des Response-Regulators an die Bindestellen IR2, IR3 und HS1 binden (Deora *et al.*, 2001). Man vermutet, dass BvgA, in Abhängigkeit von der intrazellulären BvgA-P-Konzentration, somit die Transkription von *bipA* entweder aktivieren oder reprimieren kann. Da die Bvgⁱ-Phase durch mittlere Konzentrationen an phosphoryliertem BvgA (BvgA-P) gekennzeichnet ist, wurde postuliert, dass unter diesen Bedingungen die Transkription über die Bindung an die hoch-affinen Bindestellen (IR1 und HS2) im Promotor aktiviert wird, während sie in der Bvg⁺-Phase durch die Bindung an die niedrig-affinen Bindestellen (IR2 und IR3) inhibiert wird (Deora *et al.*, 2001; 2002; Cotter and DiRita, 2000).

3.4 Die Bedeutung des BvgAS-Systems im Infektionszyklus der Bordetellen

Mit der Hilfe von phasenarretierten *B. pertussis*- und *B. bronchiseptica*-Mutanten wurde die Bedeutung des BvgAS-Systems *in vivo* untersucht.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Bvg⁺-Phase notwendig und ausreichend zur Etablierung einer Infektion im Tiermodell ist. Es konnten ferner keinerlei Unterschiede zwischen einer in der Bvg⁺-Phase arretierten Mutante und dem Wildtyp festgestellt werden. Über die Bedeutung der Bvg⁻-Phase und Bvgⁱ-Phase im Infektionszyklus ist allerdings noch wenig bekannt, wobei allerdings bereits gezeigt werden konnte, dass sich die konstitutive Expression der *vrg*-Gene nachteilig auf die Kolonisierung des respiratorischen Trakts auswirkt (Merkel *et al.*, 1998b; Cotter and Miller, 1994; Martinez *et al.*, 1998; Akerley *et al.*, 1995). Während bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters der Infektionsverlauf in der Bvg⁺-Phase sehr ähnlich verläuft, besitzen diese Organismen für die Übertragung auf einen neuen Wirt sehr unterschiedliche Überlebensstrategien.

Da *B. pertussis* und *B. parapertussis* bislang nur in obligater Assoziation mit einem Wirtsorganismus nachgewiesen werden konnten, nimmt man an, dass diese Keime ausschließlich über Tröpfcheninfektionen übertragen werden können. Neben einer Übertragung durch Tröpfcheninfektion wird für *B. bronchiseptica* jedoch auch ein Reservoir in der Umwelt vermutet. Im Gegensatz zu *B. pertussis* und *B. parapertussis* ist diese Art nämlich in der Lage, auch außerhalb des Wirtsorganismus in Phosphatpuffer oder in Teichwasser zu überleben (Porter *et al.*, 1991; 1993). Diese dort vorliegende Nährstoffknappheit könnte der des postulierten Umweltreservoirs von *B. bronchiseptica* ähneln. Obwohl der evolutionäre Ursprung des BvgAS-Zwei-Komponentensystems nicht bekannt ist, nimmt man an, dass das BvgAS-System ursprünglich dafür verantwortlich war, einem fakultativ-pathogenen Vorläufer der Bordetellen mitzuteilen, ob es sich in der Umwelt oder im Wirtsorganismus aufhält (Gerlach *et al.*, 2001). Da Phasenvarianten von *B. bronchiseptica* im Vergleich zum Wildtyp besser unter widrigen Umweltbedingungen überleben können (Cotter and Miller, 1994), vermutet man zudem, dass die Bvg⁻-Phase für das Überleben und die Vermehrung im Umweltreservoir von Bedeutung ist. Im Gegensatz dazu sind die humanpathogenen Erreger *B. pertussis* und *B. parapertussis*, möglicherweise aufgrund ihres größeren Virulenzpotentials, nicht mehr darauf angewiesen, längere Zeit außerhalb eines Wirtsorganismus zu überleben. Sie besitzen demzufolge keinen Selektionsdruck, den Phänotyp der Bvg⁻-Phase aufrechtzuerhalten (Cotter and Miller, 2000). In der Tat konnte gezeigt werden, dass bei *B. pertussis* die Tendenz besteht, die von *B. bronchiseptica* bekannten *vrg*-Gene zu verlieren bzw. diese zu inaktivieren (Schneider *et al.*, 2001). Alternativ dazu scheint es bei *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* einen starken Selektionsdruck zu geben, den konservierten Phänotyp der Bvgⁱ-Phase aufrechtzuerhalten.

Da die Übertragung über Tröpfcheninfektion ein gemeinsames Merkmal des *B. bronchiseptica*-Clusters ist, könnte die Bvgⁱ-Phase eine wichtige Bedeutung während der späten Phase der Infektion, wie z. B. bei der Freisetzung der Bakterien aus dem respiratorischen Trakt und den anfänglichen Interaktionen mit einem neuen Wirtsorganismus, haben (Cotter and Miller, 2000; Stockbauer *et al.*, 2001). Da innerhalb des Wirts in Abhängigkeit des jeweiligen Kompartiments unterschiedliche Wachstumsbedingungen vorliegen, könnte die Aufgabe des BvgAS-Systems auch darin liegen, geringe Temperaturunterschiede innerhalb des Wirtes, wie zum Beispiel zwischen dem Nasenrachenraum und dem unteren respiratorischen Trakt, zu messen und die Genaktivität entsprechend anzugleichen.

4 Zielsetzung der Arbeit

Die vor kurzem veröffentlichten Genomdaten von *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* bestätigten die schon seit langem vermuteten engen verwandtschaftlichen Beziehungen innerhalb des *B. bronchiseptica*-Clusters und erbrachten im weiteren auch wichtige Erkenntnisse über die evolutionären Vorgänge innerhalb dieser Organismengruppe (Parkhill *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt das Wissen über die evolutionären Beziehungen der „neuen“ *Bordetella*-Arten *B. avium*, *B. hinzii*, *B. trematum*, *B. holmesii* und *B. petrii* noch gering, da ihre phylogenetische Charakterisierung bislang fast ausschließlich auf die Analyse ihrer 16S rDNA-Sequenzen beschränkt war (Vandamme *et al.*, 1995; Vandamme *et al.*, 1996b; Weyant *et al.*, 1995; von Wintzingerode *et al.*, 2001).

Da zur systematischen Klassifizierung von Bakterien oftmals auch weitere experimentelle Ansätze wie z. B. DNA/DNA-Hybridisierungs-Experimente, Multilocus-Enzym Gelelektrophorese oder aber auch ein Sequenzvergleich von hochkonservierten Proteinen angewandt werden, sollte im Rahmen dieser Arbeit über Southernblot- und PCR-Analysen die Verbreitung und Konservierung von bereits bekannten *Bordetella*-Genen bei den „neuen“ *Bordetella*-Arten, und somit ihre systematische Stellung innerhalb der Gattung *Bordetella*, eingehend untersucht werden.

Aufgrund der Beobachtung, dass *B. holmesii* vermehrt aus dem Nasenrachenraum von Patienten mit Keuchhusten-ähnlichen Symptomen isoliert wurde (Yhi *et al.*, 1999; Mazengia *et al.*, 2000), und der Tatsache, dass dieser Keim bislang molekularbiologisch noch wenig untersucht wurde, sollte dieser Organismus im weiteren näher charakterisiert werden. Hierbei sollte schwerpunktmäßig untersucht werden, in wieweit die Funktionsweise des in der Gattung *Bordetella* ubiquitär verbreiteten BvgAS-Zwei-Komponentensystems zwischen den Organismen *B. holmesii* und *B. pertussis* konserviert geblieben ist.

C Material

1 Geräte

Autoklaven	Webceco
Blotkammer	R. v. Keutz
Brutschrank	Heraeus
Elektrophoresekammer	institutseigene Werkstatt; Biorad
Fraktionssammler	Gilson
French-Press	SLN-Amico
Geigerzähler	Berthold; Herfurth
Geltrockner	Biorad; Hötzel; Uniequip
Heizblöcke	Eppendorf-Thermostat 5320; Liebisch 2099DA
Magnetrührer	Gerhardt; M32 von GLW
Mikrowelle	AEG
Netzgeräte	Biorad Modell 1000/500; Consort E452; Pharmacia
PCR-Geräte	Biomed, Thermocycler 60; Techne: Progene, Techgene
Peristaltikpumpe	Pharmacia
Pipetten	Gilson; Eppendorf
pH-Meter	Hartenstein; WTW Weilheim
Photometer	Pharmacia, Gene Quant II, Ultrospec III Klett Summerson Zeiss, Spektralphotometer PM6 Spektralphotometer DM4
Proteinsäule (mit Stempel)	Biorad
Röntgenfilme	X-ray Retina
Röntgenfilmentwickler	Kodak X-Omat M35
Röntgenfilmkassette	Dr. Goos Suprema
Schüttelinkubator	Infors
Speed-Vac	Eppendorf, Concentrator 5301; Uni Equip, Univapo
Sterilbank	NuAire™; GelAire
Szintillationszähler	Beckmann LS 1800
Taumler	Heidolph
UV-Leuchtkasten	Vilber, Courmat
Vakuumpumpe	Neuberger
Videoprinter	Sony UP 860 CE
Vortexer	Heidolph Reax 2000
Waagen	Sartorius; Mettler
Zentrifugen: Kühlzentrifugen:	Beckmann J2-21 mit JA10 und JA20 Festwinkelrotoren Heraeus Minifuge RF Eppendorf 5417R
Tischzentrifugen:	Heraus Biofuge 13 und 15 Eppendorf 5417R
Ultrazentrifuge:	Beckman L8-55M Ultracentrifuge

2 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung/Genotyp	Referenz
<i>B. pertussis</i> Tohama I Δtox	Wildtypderivat; <i>ptx</i> -Operon durch eine Km ^R -Kassette ersetzt; Sm ^R , Kan ^R , Nal ^R	I.R.I.S, Siena, Italien Pizza <i>et al.</i> , 1989
<i>B. pertussis</i> 347	TI-Derivat; <i>bvgS</i> ::Tn5; Sm ^R , Nal ^R , Kan ^R	Weiss and Falkow, 1983
<i>B. pertussis</i> 359	TI-Derivat; <i>bvgA</i> ::Tn5; Sm ^R , Nal ^R , Kan ^R	Weiss and Falkow, 1984
<i>B. bronchiseptica</i> 7865	Wildtyp; Humanisolat; Sm ^R , Nal ^R	Arico and Rappuoli, 1987 Gross and Rappuoli, 1989
<i>B. paraperussis</i> P14	Wildtyp; Humanisolat; Sm ^R	Arico and Rappuoli, 1987
<i>B. avium</i> 1852	Wildtyp und Typstamm; wurde aus dem Truthahn isoliert	Laboratorium Microbiologie Rijksuniversiteit Gent
<i>B. holmesii</i> No1	Blutisolat; stammt aus einem Patienten mit einer Sichelzellenanämie	Njamkepo <i>et al.</i> , 2000
<i>B. holmesii</i> ATCC51541	Referenzstamm; Blutisolat; stammt aus einem Patienten mit einer schwachen Leukozytose und Cardiomegalie	Weyant <i>et al.</i> , 1995
<i>B. holmesii</i> G7702	Blutisolat; stammt aus einem Patienten mit Hodgkin Lymphom	Weyant <i>et al.</i> , 1995
<i>B. holmesii</i> G7702 <i>bvgA_{BH}::kan</i>	<i>B. holmesii</i> G7702, <i>bvgA_{BH}</i> -Leserahmen durch eine Kanamycin-Kassette zerstört; Kan ^R	diese Arbeit
<i>B. holmesii</i> G8341	Blutisolat; stammt aus einer Patientin mit einer Endocarditis und vorausgegangener Vorhof- und Mitralklappen Operation	Weyant <i>et al.</i> , 1995
<i>B. trematum</i>	Referenzstamm; Humanisolat	Vandamme <i>et al.</i> , 1996
<i>B. hinzii</i>	Referenzstamm; Hühnerisolat	Vandamme <i>et al.</i> , 1995
<i>B. petrii</i>	Umweltisolat	von Wintzingerode <i>et al.</i> , 2001
<i>A. xylosoxidans</i>	DSM No 11852	Yabuuchi and Ohyama, 1971
<i>E. coli</i> DH5α	Wildtypisches Isolat (TypI)	Bethesda Research Laboratories (BRL)
<i>E. coli</i> M15	<i>E. coli</i> -Stamm zur Klonierung in pQE-Vektoren und Überproduktion von „His- tag“-Proteinen	Qiagen
<i>E. coli</i> SM10	<i>lacY, tonA, recA, Muc+</i> , <i>thi, thr, leu, supE</i> , RP4-2-Tc::Mu, Kan, λpir	A. Pühler Simon <i>et al.</i> , 1983

3 Vektoren und rekombinante Plasmide

Vektor/ Plasmid	Beschreibung	Referenz
pSK	Phagemid, ColE1-Replikation, pUC19-Derivat; Amp ^R	Stratagene
pRK415	pRK404-Derivat; „broad range“-Klonierungsvektor; Tc ^R	Keen <i>et al.</i> , 1988
pSL1180	„high copy number“-Klonierungsvektor, Derivat von pUC18; Amp ^R	Pharmacia
pUC18	„high copy number“-Klonierungsvektor; Amp ^R	Pharmacia
pUC19	„high copy number“-Klonierungsvektor; Amp ^R	Pharmacia
pQE30	Expressionsvektor zur Überproduktion von N-terminal „His-getagten“ Proteinen mit IPTG-induzierbaren Promotor; Amp ^R	Qiagen
pRep4	Regulations-Vektor für pQE-Vektoren; Kan ^R , <i>lacR</i>	Qiagen

pSORTP1	pRTP1-Derivat; Klonierungsvektor; ermöglicht den Allelaustausch in <i>Bordetella</i> 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
pDM20	pBR322-Derivat, enthält ein 5996 bp großes <i>EcoRI/XhoI</i> -DNA-Fragment mit den <i>bvgAS</i> -Genen aus <i>B. pertussis</i> ; Amp ^R	Miller <i>et al.</i> , 1989
pla57vir	pLAFR2-Derivat enthält den <i>bvgAS</i> -Genlocus aus <i>B. pertussis</i> ; Tc ^R	Arico <i>et al.</i> , 1987
pProm-67	pGEM3-Derivat; enthält ein 1250 bp großes <i>PstI/PstI</i> -DNA-Fragment mit den Promotorregionen des <i>bvgAS</i> -Locus und des <i>phaB</i> -Gens; Amp ^R	Scarlato <i>et al.</i> , 1990
pUC4K	enthält das aus dem Transposon Tn903 isolierte Kanamycin-Resistenzgen; Amp ^R , Kan ^R	Pharmacia
pKEN	trägt ein <i>XbaI/PstI</i> -DNA-Fragment mit dem promotorlosen <i>gfp-mut2</i> Gen	Cormack <i>et al.</i> , 1996
pGEM-T	Klonierungsvektor, besitzt 3'-T-Überhänge zur Klonierung von PCR-Fragmenten; Amp ^R	Promega
pGEM-T- <i>bvgA_{BH}</i> receiv	trägt einen 285 bp großen Teilbereich der <i>bvgA</i> -Receiver-Domäne aus <i>B. holmesii</i> G7702	diese Arbeit
pGEM-T- <i>bvgA_{BA}</i> receiv	trägt einen 285 bp großen Teilbereich der <i>bvgA</i> -Receiver-Domäne aus <i>B. avium</i>	diese Arbeit
pGEM-T- <i>bvgA_{BHZ}</i> receiv	trägt einen 285 bp großen Teilbereich der <i>bvgA</i> -Receiver-Domäne aus <i>B. hinzii</i>	diese Arbeit
pGEM-T- <i>bvgA_{BH}</i> out	trägt einen 237 bp großen Teilbereich der <i>bvgA</i> -Output-Domäne aus <i>B. holmesii</i> G7702	diese Arbeit
pGEM-T- <i>bvgA_{BA}</i> out	trägt einen 237 bp großen Teilbereich der <i>bvgA</i> -Output-Domäne aus <i>B. avium</i>	diese Arbeit
pGEM-T- <i>bvgA_{B7}</i> out	trägt einen 237 bp großen Teilbereich der <i>bvgA</i> -Output-Domäne aus <i>B. trematum</i>	diese Arbeit
pUC18- <i>BglA</i>	trägt ein <i>BglI</i> -DNA-Fragment aus <i>B. pertussis</i> T1Δtox; Genebank-Nummer: AJ009739. besitzt Homologien zur Modifikations-Methylase EcaT aus <i>Enterobacter cloacae</i>	Middendorf and Gross, 1999
pUC18- <i>BamA</i>	trägt ein <i>BamHI</i> -DNA-Fragment aus <i>B. pertussis</i> T1Δtox; Genebank-Nummer: AJ009738. besitzt Homologien zu dem Monoamin Oxidase regulatorischen Protein aus <i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Middendorf and Gross, 1999
pUC18- <i>BamB</i>	trägt ein <i>BamHI</i> -DNA-Fragment aus <i>B. bronchiseptica</i> 7865; Genebank-Nummer: AJ009740. besitzt Homologien zur α-Untereinheit der Toluat-1,2-Dioxygenase aus <i>Pseudomonas putida</i>	Middendorf and Gross, 1999
pUC18- <i>BamC</i>	trägt ein <i>BamHI</i> -DNA-Fragment aus <i>B. bronchiseptica</i> 7865; Genebank-Nummer: AJ009741. besitzt Homologien zu dem ATB-bindenden Nodulations Protein aus <i>Rhizobium leguminosarum</i>	Middendorf and Gross, 1999
pUC18- <i>BamD</i>	trägt ein <i>BamHI</i> -DNA-Fragment aus <i>B. bronchiseptica</i> 7865; Genebank-Nummer: AJ009742. besitzt Homologien zu der UDP-Glucose-4-Epimerase aus <i>Rhizobium meliloti</i>	Middendorf and Gross, 1999
pUC18- <i>BamE</i>	trägt ein <i>BamHI</i> -DNA-Fragment aus <i>B. bronchiseptica</i> 7865; Genebank-Nummer: AJ009743. besitzt Homologien zu der dTDP-Glucose-4-6-Dehydratase aus <i>Synechocystis</i> sp.	Middendorf and Gross, 1999
pUC18- <i>BamF</i>	trägt ein <i>BamHI</i> -DNA-Fragment aus <i>B. bronchiseptica</i> 7865; Genebank-Nummer: AJ009744. besitzt Homologien zu Genen für einen Nitrat Transporter	Middendorf and Gross, 1999
pUC18- <i>BamG</i>	trägt ein <i>BamHI</i> -DNA-Fragment aus <i>B. bronchiseptica</i> 7865; Genebank-Nummer: AJ009745.	Middendorf and Gross, 1999

pUC18- <i>Bam</i> H	trägt ein <i>Bam</i> HI-DNA-Fragment aus <i>B. bronchiseptica</i> 7865; Genebank-Nummer: AJ009746. besitzt Homologien zu dem LivH-Transporter für verzweigte Aminosäuren aus <i>Synechocystis</i> sp	Middendorf and Gross, 1999
pUC18- <i>Bam</i> I	trägt ein <i>Bam</i> HI-DNA-Fragment aus <i>B. bronchiseptica</i> 7865; Genebank-Nummer: AJ009747.	Middendorf and Gross, 1999
pUC18- <i>Bam</i> 23	trägt ein <i>Bam</i> HI-DNA-Fragment aus <i>B. bronchiseptica</i> 7865; Genebank-Nummer AJ009748. besitzt Homologien zur UDP-Glucose-4-Epimerase aus <i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Middendorf and Gross, 1999
pSK- <i>Pst</i> I-Frag1	trägt ein 1074 bp großes <i>Pst</i> I-DNA-Fragment aus <i>B. holmesii</i> G7702	diese Arbeit
pUC19- <i>Nar</i> I-Frag2	trägt ein 1178 bp großes <i>Nar</i> I-DNA-Fragment aus <i>B. holmesii</i> G7702	diese Arbeit
pUC18- <i>Eco</i> RV-Frag3	trägt ein 3554 bp großes <i>Eco</i> RV-DNA-Fragment aus <i>B. holmesii</i> G7702	diese Arbeit
pSK- <i>Xho</i> I-Frag4	trägt ein ca. 3,9 kbp großes <i>Xho</i> I-DNA-Fragment aus <i>B. holmesii</i> G7702	diese Arbeit
pGEM-T-F1 _{BH} G8341	trägt ein 2378 bp großes DNA-Fragment aus <i>B. holmesii</i> G8341, das sich aus der <i>bvgA_{BH}</i> up-Region, der <i>bvgA_{BH}</i> - Sequenz und einem Teilbereich der <i>bvgS_{BH}</i> -Sequenz, zusammensetzt	diese Arbeit
pGEM-T-F1 _{BH} No1	trägt ein 2378 bp großes DNA-Fragment aus <i>B. holmesii</i> No1, das sich aus der <i>bvgA_{BH}</i> up-Region, der <i>bvgA_{BH}</i> - Sequenz und einem Teilbereich der <i>bvgS_{BH}</i> -Sequenz, zusammensetzt	diese Arbeit
pGEM-T-F1 _{BH} ATCC51541	trägt ein 2378 bp großes DNA-Fragment aus <i>B. holmesii</i> ATCC51541, das sich aus der <i>bvgA_{BH}</i> up-Region, der <i>bvgA_{BH}</i> - Sequenz und einem Teilbereich der <i>bvgS_{BH}</i> - Sequenz, zusammensetzt	diese Arbeit
pSORTP1- <i>bvgA_{BH}</i> - <i>kan</i> ^R	trägt ein 2698 bp großes <i>Bam</i> HI-DNA-Fragment, bei dem ein 353 bp großer DNA-Bereich der codierenden <i>bvgA_{BH}</i> Sequenz durch eine Kanamycin-Kassette ersetzt ist	diese Arbeit
pSL1180- <i>bvgAS_{BH}</i> G7702	trägt ein 4728 bp großes <i>Spe</i> I/ <i>Eco</i> RI-DNA-Fragment mit dem <i>bvgAS_{BH}</i> -Locus und der <i>bvgA_{BH}</i> up-Region aus <i>B. holmesii</i> G7702	diese Arbeit
pSL1180- <i>bvgAS_{BH}</i> ATCC51541	trägt ein 4729 bp großes <i>Spe</i> I/ <i>Eco</i> RI-DNA-Fragment mit den <i>bvgAS_{BH}</i> -Locus und der <i>bvgA_{BH}</i> up-Region aus <i>B. holmesii</i> ATCC51541	diese Arbeit
pRK415- <i>bvgAS_{BH}</i> G7702	trägt ein 4728 bp großes <i>Xba</i> I/ <i>Eco</i> RI-DNA-Fragment mit den <i>bvgAS_{BH}</i> -Locus und der <i>bvgA_{BH}</i> up-Region aus <i>B. holmesii</i> G7702	diese Arbeit
pRK415- <i>bvgAS_{BH}</i> ATCC51541	trägt ein 4729 bp großes <i>Xba</i> I/ <i>Eco</i> RI-DNA-Fragment mit den <i>bvgAS_{BH}</i> -Locus und der <i>bvgA_{BH}</i> up-Region aus <i>B. holmesii</i> ATCC51541	diese Arbeit
pQE30- <i>bvgA_{BH}</i>	pQE30-Derivat zur Überproduktion des His ₆ - <i>BvgA_{BH}</i> -Fusionsproteins	diese Arbeit
pGEM-T- <i>bvgA_{BH}</i> up	trägt ein 445 bp großes DNA-Fragment, das der upstream Region von <i>bvgA_{BH}</i> entspricht	diese Arbeit
pGEM-T-FP1	trägt ein 253 bp großes <i>Bam</i> HI/ <i>Kpn</i> I-DNA-Fragment mit einem Teilbereich aus der <i>bvgA_{BH}</i> up Region	diese Arbeit
pGEM-T-FP3	trägt ein 259 bp großes <i>Bam</i> HI/ <i>Kpn</i> I -DNA-Fragment mit einem Teilbereich aus der <i>bvgA_{BH}</i> up Region	diese Arbeit
pUC18- <i>bvgA_{BH}</i> up- <i>gfp</i>	trägt ein <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I-DNA-Fragment mit einer Fusion zwischen dem promotorlosen <i>gfp</i> -Gen und der <i>bvgA_{BH}</i> up-Region aus <i>B. holmesii</i> G7702; Amp ^R	diese Arbeit
pMMB208- <i>bvgA_{BH}</i> up- <i>gfp</i>	trägt ein <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I-DNA-Fragment mit einer Fusion zwischen dem promotorlosen <i>gfp</i> -Gen und der <i>bvgA_{BH}</i> up-Region aus <i>B. holmesii</i> G7702; Cm ^R	diese Arbeit

4 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech bzw. SIGMA-ARK synthetisiert und geliefert.

M13 Universal:	5'- gta aaa cga cgg cca gt - 3`
M13 Reverse:	5'- aac agc tat gac cat g - 3`
omp1e:	5'- ccc tcc aaa ttc gct ctg gcg ctt - 3`
omp2b:	5'- gtc cag ttc ggc ctg gtc tac gtt - 3`
risa1c:	5'- aaa aca cca ctc cta ccc gca aga -3`
risa2d:	5'- ccc agg ccc cag acg gtt tgg atg -3`
IS1001-5:	5'- cgc cgc ttg atg acc ttg ata - 3`
IS1001-3:	5'- cac cgc cta cga gtt gga gat -3`
IS1002:	5'- tgc aac aga act gga cga tga ggc agg cca gcc agg cgg cag -3`
IS481:	5'- tgc ccc atc aag ttt gtg tgc ctg aag cgg ccc gcg cct atg -3`
bvgA-Nde:	5'- gcg aac ata tgt aca aca aag tcc tca tc -3`
bvgA-Eco:	5'- gct agg aat tca gac ttt tcc tat ttt gg -3`
deg1-forward:	5'- cga agc ttt gat hat hga yga yca - 3`
deg1-reverse:	5'- ctt cta gaa raa ncc ngc ngc ncc - 3`
deg2- forward:	5'- cga agc ttt ggg ngc ngc ngg ntt ygt - 3`
deg2- reverse:	5'- ctt cta gaa nrc nyy xar ytt - 3`
bvgA _{BH} -kan ^{R5} :	5'- ggc cgg atc cga tct tcc cgg acg ggg cgt tgc-3`
bvgA _{BH} -kan ^{R3} :	5'- ggc cgg atc cca agc ccc atc gat aga tag cgt t-3`
bvgAS _{BH} F1-SpeI:	5'- cgc act agt gcc aat acc tga tgc tat gac - 3`
bvgAS _{BH} F1-SphI:	5'- aca tgc atg cgg gta gtg ttg aat caa c - 3`
bvgA _{BH} F1*-XbaI:	5'- aca tct aga gcc aat acc tga tgc tat gac-3`
bvgA _{BH} F1*-HindIII:	5'- gta aaa gct tct gca gca ggc ggg ttt t -3`
bvgAS _{BH} F2-SphI:	5'- aca tgc atg cgg agc ttg tgc cgg cca g - 3`
bvgAS _{BH} F2-KpnI:	5'- cgg ggt acc ggc gtg agc tgc agt ttg - 3`
bvgAS _{BH} F3-KpnI:	5'- cgg ggt acc tac cga tct gcg cgg ctt - 3`
bvgAS _{BH} F3-EcoRI:	5'- cgg gaa ttc agt cgc ggg cgg cca gcc - 3`
bvgA _{BH} -BamHI:	5'- cgc gga tcc caa aag cta cta att att - 3`
bvgA _{BH} -KpnI:	5'- aat ggt acc gca taa acc tca ccc cag - 3`
fhaBup5:	5'- cgc gga tcc gtt tga cta aga aat ttc cta -3`
fhaBup3:	5'- aat ggt acc gca ctt cgt cag tca gt -3`
pfhaB-PE:	5'- gtg caa tgc tgc ctc acg gga aca-3`
bvgA _{BH} up-BamHI:	5'- cgc gga tcc gcc aat acc tga tgc tat gac-3`
bvgA _{BH} up-KpnI:	5'- aat ggt acc ggc cgt ctg ctg cct cac aaa-3`
FP1-5:	5'- cgc gga tcc gca gat act taa act agc ctg - 3`
FP1-3:	5'- aat ggt acc aat aat tag tag ctt ttg cat ggc -3`
FP3-5:	5'- cgc gga tcc caa tat tca gta gcc aaa -3`
FP3-3:	5'- aat ggt acc cct cga aac cct ctt tct -3`
bvgA _{BH} up-5:	5'- ggc atc gga tcc cca ata cct gat cgt atg acg-3`
bvgA _{BH} up-3:	5'- ggc atc tct aga agt agc ttt tgc atg gcc gtc tg-3`
pbvgA _{BH} -PE:	5'- ctt tct cca tca agc cct tta cgg cat -3`
pgfp-PE:	5'- caa gaa ttg gga caa ctc cag tga-3`

5 Verbrauchsmaterialien

5.1 Chemikalien

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

5.2 Enzyme

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

6 Wachstumsmedien und Zusätze

Medien für Flüssigkulturen und Agarplatten wurden autoklaviert (120°C, 20 min) und hitzelabile Substanzen sterilfiltriert, nach Abkühlen der Lösungen auf 40- 50°C zugegeben.

6.1 Wachstumsmedien

LB-Medium (Luria-Bertani):	Bactotrypton	10 g
	Hefe-Extrakt	5 g
	NaCl	10 g
	dH ₂ O	ad 1,0 l
LB-Agar:	LB-Medium + Agar	15 g/l
BHI-Medium:	38 g BHI in H ₂ O lösen.	
BHI-Agar:	BHI-Medium + Agar	15 g/l
Bordet-Gengou-Platten (BG-Platten):	Bordet-Gengou-Agar Basis	30 g
	Glycerin	10 g
	dH ₂ O	ad 1,0 l

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

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

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

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

Casaminoacids: in H₂O lösen, sterilfiltrieren.

Cyclodextrin: in H₂O lösen, sterilfiltrieren.

100x Supplement:	L-Cystin	200 mg
	HCl	0,5 ml
	dH ₂ O	ad 4,5 ml
	FeSO ₄ x H ₂ O	50 mg
	Ascorbinsäure	100 mg
	Nicotinsäure	20 mg
	Glutathion	500 mg
	dH ₂ O	ad 45 ml

Beide Lösungen mischen und sterilfiltrieren.

6.2 Medienzusätze

	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Chloramphenicol	30 mg/ml in 100% EtOH	15 µg/ml
Kanamycin	25 mg/ml in H ₂ O	25 µg/ml
Streptomycin	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Tetracyclin	12,5 mg/ml in 50% EtOH	12,5 µg/ml
IPTG	100 mM	1 mM

7 Molekulargewichtsmarker

7.1 Molekulargewichtsmarker für die Agarosegelelektrophorese

DNA-Marker von Gibco: 1kb-Leiter, hergestellt aus einem Plasmid, das Wiederholungen eines 1018 bp Fragments enthält, zusätzlich noch Vektorfragmente von 75 bis 1636 bp.

Fragmentlängen: 9162 bp 5090 bp 1636 bp 344 bp 154 bp
 8144 bp 4072 bp 1018 bp 298 bp 134 bp
 7126 bp 3054 bp 506 bp 220 bp 75 bp
 6108 bp 2036 bp 396 bp 201 bp

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

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

7.2 Molekulargewichtsmarker für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

BioRad Broad-range:

200 kDa	β -Galactosidase
116,25 kDa	Phosphorylase b
97,4 kDa	Serumalbumin
66,2 kDa	Carboanhydrase
45 kDa	Trypsininhibitor
21,5 kDa	Lysozym
6,5 kDa	Aprotinin

BioRad Precision Protein Standard, Prestained:

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

D Methoden

1 Molekularbiologische und genetische Techniken

1.1 Isolierung von DNA

1.1.1 Isolierung chromosomaler DNA Methode 1

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

Mit Ausnahme der *B. holmesii*-Stämme erfolgte die Isolation der chromosomalen DNA aus Flüssigkulturen. Hierfür wird jeweils 50 ml einer logarithmischen Bakterienkultur für 15 min abzentrifugiert (6000 rpm, 4°C) und in 10 ml Lösung 1 resuspendiert. Die *B. holmesii*-Stämme wurden wegen ihres schlechten Wachstums in Flüssigmedien auf zwei BG-Blutagarplatten ausgestrichen und für 2-3 Tage bei 37°C kultiviert. Danach werden die Bakterien geerntet und in 10 ml Lösung 1 resuspendiert.

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

1.1.2 Isolierung chromosomaler DNA Methode 2 (modifiziert nach Grimberg *et al.*, 1989)

- TNE-Puffer: 10 mM Tris-HCl
 10 mM NaCl
 10 mM EDTA
- TNEX-Puffer: TNE-Puffer
 1% Triton X-100
- Guanidin-Lösung 6 M GuSCN
 20 mM EDTA
 10 mM Tris-HCl pH6,5
 40 g/l Triton X-100
 10 g/l DTT
- BIND-Mix: 4 g Silicagel (Aldrich #28,851-9) in 100 ml Guanidin-Lösung
 resuspendieren
- Waschpuffer: 25% Isopropanol
 25% Ethanol
 100 mM NaCl
 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)

Eine Impföse voll Bakterien, resuspendiert in 1 ml 1x PBS, bzw. 1 ml einer Bakterienkultur werden für 2-5 min abzentrifugiert und das Pellet einmal in 1ml TNE-Puffer gewaschen. Die pelletierten Bakterien werden in 270 µl TNEX-Puffer aufgenommen und dem Ansatz 30 µl Lysozym-Lösung (100 mg/ml) sowie 1 µl RNase-Lösung hinzugesetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C werden 25 µl ProteinaseK-Lösung (20 mg/ml)

hinzugegeben und der Ansatz für weitere 60 min bei 55°C inkubiert. Nachdem die Lösung vollständig klar ist gibt man 200 µl Guanidin-Lösung hinzu und inkubiert für 5 min bei RT. Anschließend werden 1 ml BIND-Mix zugegeben und für 3 min bei RT inkubiert. Die Silicagel-Matrix wird durch kurze Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wird im Anschluss zweimal hintereinander in 1 ml Guanidin-Lösung resuspendiert, pelletiert, zweimal mit Waschpuffer, einmal mit reinem Ethanol gewaschen, und in der SpeedVac 3 min getrocknet. Die Silicagel-Matrix wird dann in 100 µl Tris-HCl (pH 8,0) resuspendiert und die daran gebundene DNA über eine 3 minütige Inkubation bei 65°C in Lösung gebracht. Die Mischung wird resuspendiert, 10 Sekunden zentrifugiert und der DNA-haltige Überstand abgenommen.

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

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

1.1.4 Plasmidpräparation im präparativen Maßstab mittels Nucleobond-AX-Kit von Machery & Nagel (Midipräparation)

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

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

1.2 Fällern von DNA

Um DNA zu fällen, gibt man 0,1 Vol 3 M NaOAc (pH 5,2) und 2,5 Vol 100 % EtOH zu dem Ansatz, der die DNA enthält. Man mischt sorgfältig und zentrifugiert anschließend 20 min (14000 rpm, 4°C). Um noch vorhandene Salzreste zu entfernen, wird die DNA mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wird in der SpeedVac getrocknet und in einem geeigneten Volumen dH₂O aufgenommen.

1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Für eine Konzentrationsbestimmung wird die DNA-Probe 1:50 mit dH₂O verdünnt. Die Extinktion wird photometrisch bei 260 und 280 nm gemessen. Die Konzentration wird anhand der folgenden Formel berechnet:

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

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

1.4 Enzymatische Modifikation von DNA

1.4.1 Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen

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

Für die Spaltung von 0,5-2 µg Plasmid-DNA werden 1-4 Units Enzym in einem Endvolumen von 10-100 µl eingesetzt. Das Enzymvolumen sollte 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da sich das im Lagerpuffer der Restriktionsendonucleasen enthaltene Glycerin negativ auf die Effizienz und Spezifität der Spaltreaktion auswirken kann. Die Zusammensetzung des Restriktionspuffers und die Reaktionsbedingungen werden wie vom Enzym-Hersteller empfohlen gewählt. Für eine effiziente Spaltung von chromosomaler DNA werden 20-30 Units Restriktionsendonuclease eingesetzt. Die Restriktion erfolgt über Nacht.

1.4.2 Ligation

1.4.2.1 Ligationsansatz

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

Ein typischer Ligationsansatz hat ein Gesamtvolumen von 10 µl und setzt sich wie folgt zusammen. Der Klonierungsvektor und das zu klonierende DNA-Fragment werden in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:5 eingesetzt und mit 0,1 Volumen 10x Ligase-Puffer (250 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP) sowie 1 µl T4-Ligase (1U/µl) gemischt. Bei der Ligation von Fragmenten mit kohäsiven Enden ist eine etwa zweistündige Inkubation bei 23-26 °C ausreichend. Eine Inkubationszeit von mindestens 16 Stunden bei 16°C ist bei der Ligation von glatten Enden aufgrund der geringen Effizienz der Ligasereaktion erforderlich.

1.4.2.2 Ligation von PCR-Produkten in den pGEM-T-Vektor (Promega)

Der pGEM-T-Vektor besitzt 3'-terminale Thymidinüberhänge und eignet sich zur Zwischenklonierung von PCR-Produkten.

PCR-Fragmente die mit Hilfe einer Polymerase amplifiziert wurden, die 3'-terminale Adenosinüberhänge (z.B. Taq-Polymerase) erzeugt, können nach der Aufreinigung sofort für die Ligation eingesetzt werden. An PCR-Fragmenten, die mit Hilfe einer Polymerase amplifiziert wurden, die glatte Enden erzeugt (z.B. deep-Vent Polymerase, Pfu-Polymerase), muss zunächst über eine „A-tailing“-Reaktion ein 3'-terminaler Adenosinüberhang angefügt werden.

gereinigtes PCR-Produkt	7 µl
10x Taq-Polymerase Puffer mit MgCl ₂	1 µl
dATP (20 mM)	1 µl
Taq-Polymerase	1 µl

Der Ansatz wird für 15-30 min bei 70°C inkubiert.

Ein typischer Ligationsansatz hat ein Gesamtvolumen von 20 µl und setzt sich wie folgt zusammen:

2x Rapid Ligation Buffer	10 µl
pGEM-T-Vektor	1 µl
gereinigtes PCR-Produkt	8 µl
T4 DNA Ligase	1 µl

Der Ligationsansatz wird für mindestens zwei Stunden bei RT, oder über Nacht bei 16°C inkubiert.

1.4.3 Alkalische Phosphatase Reaktion von DNA-Fragmenten

Um bei einer Ligation zu verhindern, dass der Vektor mit sich selbst religiert, oder um eine DNA-Sonde für die Endmarkierung durch ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP vorzubereiten, werden durch eine alkalische Phosphatase (AP) die 5'-Phosphatgruppen an den Fragmentenden abgespalten.

Der Reaktionsansatz für eine Vektorpräparation bzw. für eine Endmarkierung von DNA-Fragmenten, die im Gelretardationsexperiment eingesetzt werden sollen, setzt sich folgendermaßen zusammen:

linearisierter Vektor/ DNA-Fragment	50 μl
10x AP-Puffer	10 μl
Alkalische Phosphatase (1U/ μl)	3 μl
dH ₂ O	ad 50 μl

Die Inkubation erfolgt bei 37°C für 45 min. Im Anschluss wird der Ansatz über ein QIAquick-Säulchen (Qiagen) gereinigt (1.7.2).

Der Reaktionsansatz für eine Endmarkierung von DNA-Fragmenten, die im DnaseI-Footprint-Experiment eingesetzt werden sollen, setzt sich folgendermaßen zusammen:

DNA-Pellet resuspendiert in H ₂ O	x μl
10x AP-Puffer	1 μl
Alkalische Phosphatase (1U/ μl)	1 μl
dH ₂ O	ad 10-100 μl

Die Inkubation erfolgt bei 37°C für 45 min. Im Anschluss wird der Ansatz zweimal mit 1 Vol Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert und die wässrige, DNA-haltige Phase mit Ethanol gefällt.

1.5 Isolierung von RNA

1.5.1 Isolierung von RNA aus *Bordetella*-Stämmen

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

- DEPC-H₂O: 100 μl DEPC
ad 1000 μl H₂O
- 10 M LiCl: 21,2 g LiCl
ad 50 ml DEPC-H₂O
- 1 M Tris-HCl : 12,1 g Tris
90 ml DEPC-H₂O
pH mit HCl auf 7,5 einstellen.
- TE-Puffer: 60 mg Tris
18,6 mg Na₂EDTA
ad 50 ml DEPC-H₂O
pH mit HCl auf 7,5 einstellen.
- 1 M KCl: 3,73 g KCl
ad 50 ml DEPC-H₂O

50 ml Bakterienkultur werden bis zum Erreichen der erwünschten Wachstumsphase angezogen und bei 6000 rpm und 4°C für 10 min sedimentiert. Nach Resuspension in 3,7 ml Lösung 1 (100 mM Tris-HCl, 2 mM

Na₂EDTA und 1% SDS) in einem Corex-Röhrchen wird die Probe 5 min bei 95°C im Wasserbad gekocht. Nach 5 minütiger Inkubation auf Eis gibt man nun 300 µl vorgekühlte 1 M KCl dazu. Nach weiteren 10 min auf Eis zentrifugiert man den Ansatz 10 min bei 8000 rpm und 4°C im JA20 Rotor, um Zelltrümmer und chromosomale DNA zu entfernen. In der Zwischenzeit werden 4,56 g Cäsiumchlorid (Endkonzentration 4 M) in 50 ml Greiner-Röhrchen abgewogen und anschließend in 3,5 ml des Überstandes gelöst. Die Lösung gibt man dann in Ultrazentrifugen-Röhrchen und tariert je zwei Röhrchen mit der Feinwaage genau gegeneinander aus. Zentrifugiert wird anschließend für 15-20 h bei 20°C und 35000 rpm in der Ultrazentrifuge (Rotor SW Ti). Das Sediment wird nach vorsichtigem Abgießen des Überstandes in 500 µl TE-Puffer aufgenommen und mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Mit 1/10 Vol 10 M LiCl und 2 Vol abs. Ethanol wird die RNA durch eine 30 minütige Inkubation bei -20°C gefällt und anschließend bei 4°C und 14000 rpm sedimentiert. Nach einem Waschschrift mit 70% Ethanol wird die RNA in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und auf einem 2 %iges Agarosegel in einer RNase-freien Gelkammer kontrolliert.

1.5.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

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

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

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

1.6 Auftrennung, Analyse und Aufreinigung von DNA- und RNA-Molekülen

1.6.1 Agarosegelelektrophorese

- 10x TBE-Puffer:

890 mM Tris-HCl
890 mM Borsäure
2 mM EDTA
- 2,5x HSE-Auftragungspuffer:

4 mM Harnstoff
50 mM EDTA
50 % Saccharose
0,1% Bromphenolblau
0,1% Xylencyanolblau

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

1.6.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mittels QIAquick Gelextraktionskit (Qiagen)

Dieses Verfahren ermöglicht die Elution von DNA-Molekülen mit einer Größe von 70 bp-10 kbp. Das entsprechende DNA-Fragment wird unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten, gewogen, mit 3 Vol QG-Puffer versetzt und für ca. 10 min bei 50°C inkubiert. Nach vollständiger Auflösung des Agarosegel-Stückes gibt man 1 Vol Isopropanol hinzu. Der Ansatz wird gevortext und im Anschluss auf eine QIA-quick-spin- Säule gegeben. Man zentrifugiert für 1 min bei 14000 rpm, verwirft den Durchfluss und gibt zum Waschen 750 µl PE-Puffer hinzu. Nach einem weiteren 1 minütigen Zentrifugationsschritt wird der Durchfluss abermals

verworfen. Um das Säulenmaterial zu trocknen wird die Säule noch einmal im leeren Zustand zentrifugiert. Die Elution der DNA erfolgt durch Zugabe von 30-50 µl dH₂O und einer 1 minütigen Zentrifugation bei 14000 rpm.

1.6.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mittels eiskalter Phenolextraktion

Diese Methode eignet sich besonders für die Isolierung von DNA-Fragmenten, die kleiner als 200 bp bzw. größer als 10 kbp sind.

Das entsprechende DNA-Fragment wird unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten, gewogen und durch eine 1 ml Spritze mit großer Kanüle gedrückt. Dann wird ca. 1 Vol Phenol zugefügt und der Ansatz bei -80°C für mindestens eine Stunde inkubiert. Am nächsten Tag vortext man das Reaktionsgefäß und zentrifugiert bei 14000 rpm für 5 min. Die wäßrige Phase wird in ein neues Gefäß überführt und mit 1 Vol Chloroform ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wird mit 0,1 Vol 2 M Natriumacetat (pH 5,5) und 2 Vol EtOH versetzt, 20 min bei -20°C inkubiert und die DNA durch Zentrifugation (20 min, 14000 rpm, 4°C) gefällt. Das Pellet wird mit 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in dH₂O aufgenommen.

1.7 Southernblot

- 20x SSC: 3 M NaCl
 0,3 M Trinatriumcitrat
- Depurinierungslösung: 0,25 N HCl
- Denaturierungslösung: 0,5 M NaOH
 1,5 M NaCl
- Neutralisierungslösung: 0,5 M Tris-HCl
 1,5 M NaCl
- Primärer-Waschpuffer: 6 M Harnstoff
 4% SDS
- Sekundärer-Waschpuffer: 2x SSC

- Gelelektrophorese und Vorbereitung des Gels

Etwa 5-10 µg chromosomaler DNA wird mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (5 U/µg) über Nacht bei 37°C gespalten. Die Proben werden am nächsten Tag auf einem 1%igen TBE-Agarosegel bei 150 V elektrophoretisch aufgetrennt, bis die Bromphenolblaufront des HSE-Auftragungspuffers ca. 2/3 der Laufstrecke erreicht hat. Die Spaltung und Auftrennung der chromosomalen DNA wird unter UV-Licht kontrolliert, und das Gel mit einem Lineal als Maßstab fotografiert. Anschließend wird das Gel für maximal 12 min in Depurinierungslösung geschwenkt, bis das Bromphenolblau nach gelb umschlägt. Das Gel wird nun kurz mit dH₂O abgespült und für 2 x 15 min in Denaturierungslösung und nach erneutem Abspülen mit dH₂O für weitere 30 min in Neutralisierungslösung inkubiert und wiederum mit dH₂O kurz gespült.

- Transfer der DNA auf Hybond N⁺-Nylonmembran

Für den Blot wird in einer mit 20x SSC gefüllten Schale ein kleines Tischchen (z.B. ein Gelschlitten) gegeben, auf das man als Brücke ein Whatman-MM3-Papier legt, das mit beiden Enden in die Flüssigkeit eintaucht. Auf das Agarosegel legt man nun luftblasenfrei eine auf die Größe des Gels zugeschnittene Nylonmembran (Hybond-N⁺), die zuvor in 20x SSC eingeweicht wurde. Es folgen 7-10 Schichten Whatman-MM3-Papier, von denen ebenfalls die ersten drei mit 20x SSC befeuchtet wurden und dann ein ca. 5 cm hoher Stapel Küchentücher mit gleichem Format. Der „Turm“ wird dann mit einem Gewicht von ca. 500 g beschwert. Der Transfer erfolgt über Nacht bei RT.

Am nächsten Tag werden auf der „DNA“-Seite der Nylonmembran die Geldaschen markiert und die Membran zur Entfernung von Agaroseresten kurz in 2x SSC gewaschen. Die DNA wird anschließend durch eine zweiminütige UV-Behandlung auf der Membran fixiert.

- Markierung der Sonde

Die Sonde wird gemäß der Anleitung des „ECL direct nucleic acid labelling and detection Kits“ (Amersham) wie folgt markiert. 100 ng DNA werden mit dH₂O auf ein Endvolumen von 10 µl verdünnt (10ng/µl) und 5 min bei 100°C inkubiert. Nach weiteren 5 min auf Eis wird die Probe kurz abzentrifugiert und mit 10 µl DNA-Labeling-Reagenz versetzt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 10 µl Glutaraldehyd und nach erneutem kurzen Abzentrifugieren wird der Ansatz 10 min bei 37°C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten.

- Vorhybridisierung und Hybridisierung

Zur Vorhybridisierung wird die Membran in eine dicht verschließbare Plastikbox mit auf 42°C vorgewärmten Hybridisierungspuffer (0,25 ml/cm²) überführt und für 1 h in einem 42°C-Wasserbad unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Membran muss dabei vollständig mit Puffer bedeckt sein. Nach der vorgegebenen Zeit wird die markierte Sonde hinzupipettiert. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht im 42°C Wasserbad unter leichtem Schütteln.

- Waschen und Entwicklung der Membran

Die Membran wird nach Beendigung der Hybridisierung entnommen und restlicher Puffer durch kurzes Schwenken der Membran in vorgewärmten Primär-Waschpuffer (42°C) entfernt. Anschließend wird die Membran in einem Überschuss an Primär-Waschpuffer (2-5 ml/cm² Membran) für 2x 20 min bei 42°C gewaschen und danach für 2x 5 min bei Raumtemperatur mit Sekundär-Waschpuffer. Die Entwicklungsreagenzien 1 und 2 werden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt (0,125 ml/cm² Membran) und die fertige Lösung für 1 min auf die Membran gegeben. Anschließend wird der Filter in Frischhaltefolie eingewickelt und die Signale durch Exposition eines Röntgenfilms detektiert.

1.8 Transformation von DNA

1.8.1 Transformation von DNA in CaCl₂-kompetente *E. coli*-Zellen

1.8.1.1 Herstellung von CaCl₂-kompetente *E. coli*-Zellen

- Lösung 1: 0,1 M CaCl₂
- Lösung 2: 0,1 M CaCl₂, 20% Glycerin

100 ml LB-Medium werden mit 500 µl einer *E. coli* Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wird bei 37°C inkubiert, bis sie eine optische Dichte (OD_{600nm}) von ca. 0,5 erreicht hat. Dann werden die Zellen für 15 min auf Eis gestellt und anschließend für 10 min zentrifugiert (6000 rpm, 4°C). Das Bakterienpellet wird in 0,2 Vol eiskalter Lösung 1 resuspendiert und dann 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren 10 minütigen Zentrifugation (4000 rpm, 4°C) wird das Pellet in 0,1 Vol eiskalter Lösung 2 resuspendiert und in Aliquots von 250 µl bei -80°C gelagert.

1.8.1.2 Transformation

Zu 100 µl CaCl₂-kompetenten Zellen werden 1-2 µl Plasmid-DNA bzw. 10 - 20 µl Ligationsansatz gegeben. Die Suspension wird für 30 min auf Eis gestellt und im Anschluss für 45 sec bei 42°C inkubiert (Hitzeschock). Anschließend wird der Ansatz für 2 min auf Eis gestellt, mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Zwischenzüchtung werden die Zellen sedimentiert, das Pellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

1.8.2 Transformation von DNA in elektrokompente *E. coli*-Zellen

1.8.2.1 Herstellung von elektrokompente *E. coli*-Zellen

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

1.8.2.2 Elektroporation

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

1.9 Konjugation und Allelaustausch

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

1.9.1 Allelaustausch

Mit einem speziell für die Gattung *Bordetella* entwickelten Klonierungsvektor (Stibitz *et al.*, 1986) ist die Möglichkeit gegeben, ortsspezifische Mutagenesen im *Bordetella*-Genom durchzuführen. Der Austausch des chromosomalen gegen das klonierte Allel („double crossover“) erfolgt durch die Selektion zweier aufeinanderfolgender Rekombinationsereignisse der homologen Genloci. Der hierfür eingesetzte Vektor pSORTP1 ist ein pRTP1-Derivat und besitzt zusätzlich ein Gentamycin-Resistenzgen.

pRTP1 besteht aus einem Gen für eine Ampicillinresistenz, dem *oriT*-Element („origin for conjugative transfer“), und einem Gen für das ribosomale *E. coli* Protein S12. Dieses Protein wird in *Bordetella* effektiv exprimiert und in die Ribosomen eingebaut, so dass streptomycinresistente Stämme in Gegenwart dieses Locus streptomycinsensitiv werden. Sowohl pRTP1 als auch pSOTP1 können in *Bordetella* nicht replizieren.

Der erste Selektionsschritt wird auf ampicillin- bzw. gentamycinhaltigen BG-Blutagarplatten durchgeführt, auf denen nur solche Bakterien wachsen, in denen das Plasmid aufgrund eines Rekombinationsvorganges („single allelic exchange“) im Chromosom integriert vorliegt. Das Wachstum des *E. coli*-Donorstammes wird durch ein geeignetes Antibiotikum, gegen das der verwendete *Bordetella*-Stamm resistent ist, unterdrückt. Enthält der *Bordetella*-Rezipient das zur Streptomycinresistenz führende Gen für das ribosomale Protein S12, enthält man durch den zweiten Selektionsschritt auf Agarplatten mit Streptomycin all jene Bakterien, die den Vektor pSOTRTP1 durch einen zweiten Rekombinationsvorgang innerhalb der klonierten Sequenz wieder verloren haben. Enthält das durch dieses „double crossover“ eingeführte Allel zusätzlich einen Selektionsmarker wie z.B. Kanamycin, kann durch entsprechende Selektion sichergestellt werden, dass alle Exkonjuganten die gewünschte Mutation eingebaut haben.

Steht für den ersten Rekombinationsschritt keine geeignete Resistenz des Rezipientenstammes zur Selektion gegen den Donor zur Verfügung und besitzt das klonierte Allel einen geeigneten Marker, so kann nach der Konjugation direkt auf einen vollständigen Allelaustausch mit zwei gleichzeitig stattfindenden Rekombinationsereignissen selektioniert werden. Die Effizienz dieses Verfahrens ist allerdings sehr gering.

1.9.2 Durchführung der Konjugation

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

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

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

Das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Die Oligonukleotid-Primer werden im Überschuß zu der DNA-Präparation gegeben. Eine automatische

Wiederholung von DNA-Denaturierung (bei 94°C), Primer-Hybridisierung (bei einer Temperatur, die von den verwendeten Primern abhängig ist) und Primer Extension (bei 72°C) ermöglicht die exponentielle Amplifikation des DNA-Fragments.

Ein typischer PCR-Ansatz enthält:

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

Die PCR wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

„first delay“ 3 min; 94°C

Es folgen 30 Zyklen aus:

Denaturierung der ds DNA	1 min; 94°C
Primer-Annealing	1 min; 50-60°C
Elongation der Primer	1,5 min; 72°C

Im Anschluss an den letzten Zyklus findet eine letzte Synthesephase statt:

„last delay“ 3 min; 72°C

Ein Aliquot von 10 µl wird zur quantitativen und qualitativen Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgt mit Hilfe der QIAquick-spin-Säulchen (1.10.2).

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

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten mit einer Größe zwischen 100 bp und 10 kbp wird der QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen verwendet.

Der PCR-Ansatz wird mit 5 Vol PB-Puffer versetzt und auf ein QIAquick-spin-Säulchen gegeben. Man zentrifugiert kurz (30 sec bei 14000 rpm), verwirft den Durchfluss und wäscht mit 750 µl PE-Puffer (30 sec bei 14000 rpm). Das Säulchen wird durch einen erneuten Zentrifugationsschritt getrocknet. Die Elution der DNA von der Matrix erfolgt mit 30-50 µl dH₂O.

1.11 DNA-Sequenzierung

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

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

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

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

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

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

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

Der Zyklus wird 30 mal wiederholt. Am Schluss wird auf 4°C abgekühlt, bis die Proben weiter verwendet werden.

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

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

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

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

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

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

1.12 Primer-Extension

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

1.12.1 5'-Markierung des Oligonukleotid-Primers

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

- 1 µl Oligonukleotid-Primer (5 pmol/µl)
- 3 µl $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (5000 Ci/mmol)
- 1 µl 10 x Kinase-Puffer (MBI)
- 4 µl dH₂O
- 1 µl T4 -PolyNukleotid-Kinase (30 U/µl; MBI)

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

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

1.12.2 Primer-Extension-Experiment

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

1.13 Genomewalking

Das Genomewalking ist eine Methode, um unbekannte DNA-Sequenzen zu finden, die benachbart zu einer bekannten Sequenz liegen.

- Erstellung einer Mini-Genbank

Zunächst wird etwa 5-10 µg chromosomaler DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen (5 U/µg) über Nacht bei 37°C gespalten. Für das G+C-reiche Genom von *Bordetella holmesii* eignen sich vor allem die Restriktionsenzyme *Pst*I, *Sph*I und *Nar*I. Die Restriktionsansätze werden am nächsten Tag auf einem 1%igen Agarosegel bei 150 V elektrophoretisch aufgetrennt, und wie unter 1.6 beschrieben auf eine Nylonmembran geblotet. Als Sonde für den anschließenden Southernblot (1.6) und den nachfolgenden Kolonieblot verwendet man ein PCR-Fragment, das, je nachdem ob man einen Genomewalk in 5'- bzw. 3'-Richtung durchführen möchte, aus dem 5'- bzw. 3'-Bereich der bislang bekannten Sequenz amplifiziert wurde. Die Sonden-DNA wird wie unter 1.6 beschrieben markiert und mit der Membran hybridisiert. Nach der Entwicklung der Membran (1.6) kann den Signalen auf dem Röntgenfilm mit Hilfe des Gelphtos eine bestimmte bp-Länge zugeordnet werden. Für die Erstellung einer Mini-Genbank sind DNA-Fragmente von einer Länge zwischen 2,0- 4,0 kbp besonders gut geeignet. Der entsprechende kbp-Bereich eines Restriktionsansatzes wird dann großzügig aus einem weiteren Agarosegel ausgeschnitten, über eine eiskalte Phenolextraktion aus dem Gel eluiert (1.5.3), gefällt und über die gewählte Restriktionsschnittstelle in einen entsprechend linearisierten und dephosphorylierten Klonierungsvektor ligiert. Die Mini-Genbank wird dann in *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert und der Transformationsansatz auf Selektionsplatten ausplattiert. Am nächsten Tag werden die einzelnen Kolonien gepickt und zusammen auf eine neue Agarplatte, jeweils als ca. 1 cm großer Strich, ausgestrichen und erneut über Nacht inkubiert.

- Kolonieblot

Am nächsten Tag wird ein Nylon-Rundfilter (Hybond-N⁺; Amersham Pharmacia) luftblasenfrei auf die Agarplatte gelegt und gemeinsam mit dem darunter liegenden Agar markiert. Das Nylon-Rundfilter wird dann zwischen zwei Whatman-Papiere gelegt, und das sichtbare Bakterienmaterial durch kräftiges Rollen mit einer Flasche vollständig von der Membran auf ein Whatman-Papier übertragen. Das nun nicht mehr sichtbare, auf dem Rundfilter verbleibende Bakterienmaterial ist ausreichend für den anschließenden Kolonieblot. Die Nylon-Membran wird dann mit der Bakterienseite nach oben für 1-3 min auf zwei Whatman-Papiere gelegt, die zuvor mit 10% SDS-Lösung getränkt wurden. Danach wird das Rundfilter kurz auf ein trockenes Whatman-Papier, und im Anschluss für 2-5 min auf zwei Whatman-Papiere gelegt, die in Denaturierungslösung (siehe 1.6) getränkt wurden. Es folgen eine weitere Inkubation auf einem trockenen sowie zwei dreiminütige Inkubationen auf zwei Whatman-Papiere, die in Neutralisierungslösung (siehe 1.6) getränkt wurden. Zum Schluss wird das Rundfilter kurz in 2x SSC gewaschen, auf einem Whatman-Papier getrocknet, und die DNA durch eine zweiminütige UV-Behandlung auf der Membran fixiert. Die Markierung der Sonde, die Hybridisierung und Entwicklung der Membran erfolgt wie unter 1.6 beschrieben. Nachdem der Nylon-Rundfilter in Frischhaltefolie eingewickelt wurde kann das Signal und somit der Klon, der das erwünschte DNA-Fragment trägt, durch die Exposition eines Röntgenfilmes detektiert werden.

2 Proteinbiochemische Methoden

2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese kann die Größe eines Proteins bestimmt werden. Die Porengröße des stark vernetzten Polyacrylamidgels kann so eingestellt werden, dass die Poren klein genug sind, um die Wanderung des gesuchten Proteins zu verzögern (z.B. liegt der optimale Trennungsbereich eines 15%igen Gels bei 12- 43 kDa).

Die Elektrophorese findet unter denaturierenden Bedingungen statt, in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) und β-Mercaptoethanol. SDS bindet sich an hydrophobe Regionen des Proteinmoleküls und führt so zur Ausbildung eines SDS-Protein-Komplex, dessen negative Ladungen dem Molekulargewicht des Proteins etwa proportional ist. β-Mercaptoethanol ist eine reduzierende Substanz, die alle S-S Bindungen im Protein löst. Auf diese Weise können Proteine, unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung und Konformation, ihrer Größe nach im Spannungsfeld aufgetrennt werden.

Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels (16 x 17 cm, 1 bis 1,5 mm Dicke):

Reagenzien	Trenngel (12 %, 25 ml)	Trenngel (6 %, 25 ml)	Sammelgel (5 %, 6 ml)
dH ₂ O	8,2 ml	13,2 ml	4,1 ml
30% Acrylamidlösung	10,0 ml	5,0 ml	1,0 ml
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	-----	-----	0,75 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	6,3 ml	6,3 ml	-----
10% SDS	0,25 ml	0,25 ml	0,06 ml
10% APS	0,25 ml	0,25 ml	0,06 ml
TEMED	0,001 ml	0,001 ml	0,006 ml

Zusammensetzung eines Polyacrylamid-Minigels (8 x 11 cm, 1 bis 1,5 mm Dicke):

Reagenzien	Trenngel (15 %, 5 ml)	Trenngel (12 %, 5 ml)	Sammelgel (5 %, 3 ml)
dH ₂ O	1,1 ml	1,6 ml	2,1 ml
30% Acrylamidlösung	2,5 ml	2,0 ml	0,5 ml
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	-----	-----	0,38 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,3 ml	1,3 ml	-----
10% SDS	0,05 ml	0,05 ml	0,03 ml
10% APS	0,05 ml	0,05 ml	0,03 ml
TEMED	0,002 ml	0,002 ml	0,003 ml

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

Nach Zugabe des Radikalbildners TEMED wird die Trennlösung sofort zwischen zwei, durch Spacer getrennte Glasplatten bis ca. 3 cm unterhalb des Glasplattenrandes gegossen und zur Ausbildung einer geraden Front mit dH₂O überschichtet. Ist das Trenngel auspolymerisiert, kann das Sammelgel gegossen und ein Kamm eingesetzt werden. Das fertige Gel wird in die mit 1x Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingeklemmt. Die pelletierten Bakterienzellen bzw. die Proteinlösungen werden mit Laemmli-Probenpuffer versetzt, kurz aufgekocht und in die Geltaschen gegeben. Die Elektrophorese wird bei 150- 200 Volt durchgeführt und beendet, nachdem die Farbstofffront aus dem Gel gelaufen ist. Als Molekulargewichtsstandard werden 10 μ l Proteinmarker mit aufgetragen.

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

Die Proteine können im Anschluss im Polyacrylamidgel durch Coomassie-Blau gefärbt werden. Hierzu wird das Gel 10-60 min in Färbelösung geschwenkt und anschließend nach Zugabe von Entfärbelösung weiter geschwenkt, bis die Proteinbanden sich deutlich vom Hintergrund absetzen. Das Gel kann in Einmachfolie zwischen zwei Lagen Whatman-Papier 90 min bei 80°C getrocknet werden.

2.2 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Proteine können mit Hilfe von Trichloressigsäure (TCA) gefällt werden. Das kann z.B. dann von Nutzen sein, wenn man größere Mengen an Protein auf ein Polyacrylamidgel auftragen möchte und es dadurch zu Problemen mit den Volumina kommt, oder aber wenn man Proteine auf ein Polyacrylamidgel auftragen möchte, die in Guanidiniumchlorid-haltigen Lösungen aufgenommen sind.

Zur Fällung wird die Proteinlösung auf 10 bis 20% TCA eingestellt und mindestens 60 min, maximal über Nacht auf Eis inkubiert. Ist die Menge an Protein sehr gering, kann die Zugabe von bovinem Serumalbumin (BSA) von Vorteil sein, weil dadurch die Effizienz der Fällung gesteigert werden kann. Das gefällte Protein wird dann abzentrifugiert (15 min, 10000 rpm, 4°C) und das Pellet ein- bis zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen. Anschließend wird das Pellet bei RT vorsichtig getrocknet und in Laemmli-Probenpuffer (2.1) aufgenommen.

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

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

- TBS/Tween/Magermilch: 1x TBS/Tween
10% Magermilchpulver

Für die Durchführung eines Westernblots (Semidry Blot) nach Towbin *et al.* (1979) trennt man die Proteine im SDS-Polyacrylamidgel (2.1) auf. Kurz bevor die Blaufront aus dem Gel läuft spült man die Graphitplatten der Blotkammer mit destilliertem Wasser und legt auf die Anodenplatte sechs mit Anodenpuffer I getränkte Whatmanpapiere. Auf diese werden nun drei Whatman-Papiere gelegt, die mit Anodenpuffer II befeuchtet wurden. Die Nitrocellulosemembran wird auf die Größe des Trenngels zugeschnitten, mit Wasser angefeuchtet und luftblasenfrei auf den Stapel gelegt. Hierauf legt man das Proteingel, von dem zuvor das Trenngel abgetrennt wurde, und auf dieses sechs Lagen Whatman-Papiere, die mit Kathodenpuffer getränkt wurden. Luftblasen werden im Anschluss durch sanftes Rollen mit einem Glasstab entfernt. Abschließend wird die Kathodenplatte aufgesetzt und die Kammer an das Netzgerät angeschlossen. Der Transfer erfolgt mit ca. 0,89 mA/cm² der Nitrocellulosemembran für ca. 1 h bei RT.

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

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

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

1 Liter LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin) wird mit 10 ml einer *E. coli* M15-Übernachtkultur, die das gewünschte pQE30-Derivat enthält angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Bakterien werden bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 angezogen. Als nicht induzierte Kontrolle werden 1 ml entnommen, die ohne IPTG-Zugabe über den gleichen Zeitraum weiter inkubiert wird. Zur Induktion der Genexpression wird der *lac*-Repressor durch Zugabe von 1 mM IPTG inaktiviert und der Ansatz für weitere drei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wird erneut 1 ml Aliquot entnommen, das gemeinsam mit der nicht-induzierten Probe abzentrifugiert wird. Die Bakterienpellets werden in 100 µl Laemmli-Puffer resuspendiert, bei 95°C gekocht und zur Überprüfung der Überexpression auf einem 15%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bakterienkultur wird nach der Induktion 15 min abzentrifugiert (bei 6000 rpm und 4°C). Das Pellet wird zweimal mit 20 ml FP-Puffer (siehe 2.5.1) gewaschen und bei -20°C eingefroren.

2.5 Proteinreinigung

2.5.1 Zellaufschluss mittels French-Press

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

Eine für Proteine schonender und effizienter Zellaufschluss wird mit Hilfe der French-Press (FP) erreicht. Aufgrund der Proteaselabilität zahlreicher Proteine sollten alle Geräte, Lösungen und die Probe selbst immer kalt gehalten werden und zügig gearbeitet werden. Hierzu wird das nach der Überproduktion eingefrorene Bakterienpellet (2.4) in 10 ml kaltem FP-Puffer aufgetaut. Die Bakteriensuspension wird in die gekühlte French-Press eingezogen und nach Anlegen eines Druckes von etwa 1000 bar aus der FP-Zelle in einen auf Eis stehenden JA20 Zentrifugenbecher durch eine schmale Öffnung gequetscht, wodurch die Bakterienzellen

mechanisch aufgebrochen werden. Um die lösliche Proteinfraction von der unlöslichen zu trennen wird die Probe 30 min bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert. Ist noch nicht bekannt, ob das Protein sich nach der Überexpression in Einschlußkörperchen („inclusion bodies“) oder in der löslichen Fraktion befindet, sollte dies durch Auftragen eines Aliquots des Überstandes sowie des Pellets auf ein Polyacrylamidgel (2.1) überprüft werden.

2.5.2 Proteinreinigung mittels Ni-NTA-Agarose (Affinitätschromatographie)

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

2.5.2.1 Vorbereitung der Säule

Man benötige für 1 Liter Überproduktionskultur 6 ml Ni-NTA-Agarose-Suspension. Das Säulenmaterial wird vorsichtig in eine Säule (Biorad) gefüllt, zweimal mit 20 ml FP-Puffer und zweimal mit 20 ml dH₂O gewaschen. Nachdem sich das Säulenmaterial vollständig abgesetzt hat, wird luftblasenfrei ein Stempel aufgesetzt, der mit einer peristaltischen Pumpe verbunden ist. Die peristaltische Pumpe ermöglicht eine genaue Einstellung der Durchflussrate.

2.5.2.2 Reinigung von löslichen Proteinen über die Ni-NTA-Agarosesäule

- Basispuffer:
 - 50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
 - 50 mM KCl
 - 5 mM MgCl₂
 - 10% Glycerin
 - 1 mM DTT
 - 1 mM PMSF

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

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

Der nach dem French-Press-Aufschluss und anschließender Zentrifugation erhaltene Überstand (2.5.1) wird über den Stempel auf die mit 50 ml Basispuffer äquilibrierten Säule aufgetragen. Die Säule wird mit 100–120 ml des gleichen Puffers gewaschen, um Verunreinigungen von der Säule zu entfernen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt durch Zugabe von Imidazol, das um die Koordinationsstellen der Nickel-Ionen kompetitiert und ab einer bestimmten Konzentration die Histidinreste vollständig verdrängt. Hierzu wird mit Hilfe eines Gradientenmischers ein linearer Gradient von 0-250 mM Imidazol angelegt. Das Eluat wird durch einen Fraktionssammler in 1,2 ml Aliquots aufgefangen, die sofort auf Eis überführt werden. Die Fraktionen werden auf einem Polyacrylamidgel (2.1) analysiert. Diejenigen, die das gereinigte Protein enthalten werden vereinigt, gegen Dialysepuffer dialysiert und bei –80 °C gelagert.

2.5.2.3 Reinigung von unlöslichen Proteinen über die Ni-NTA-Agarosesäule

- Denaturierungspuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
50 mM KCl
5 mM MgCl₂
10% Glycerin
1 mM DTT
1 mM PMSF
6 M Guanidiniumchlorid

Liegt das überproduzierte Protein nach Zellaufschluss und Zentrifugationsschritt (2.5.1) im Pellet vor, ist dies auf die Bildung von Einschlusskörperchen zurückzuführen. Diese Lipidversikel können nur unter Einsatz hoher Konzentrationen an denaturierenden Substanzen aufgeschlossen werden.

Das Pellet wird zunächst in zwei Waschschrritten behandelt, um die hydrophoben Anteile, wie Membranproteine, aus dem Pellet zu lösen. Hierzu wird das Pellet 20 min auf Eis mit 20 ml Triton-Puffer (Basispuffer mit 1% Triton-100) gerührt und der Ansatz 15 min bei 15000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Zum Aufschluss der Einschlusskörperchen wird das mit Triton behandelte Pellet mit 30 ml Denaturierungspuffer 30 min auf Eis gerührt und die Lösung abzentrifugiert (30 min, 18000 rpm, 4°C). Der klare Überstand wird dann auf die zuvor mit Denaturierungspuffer äquilibrierte Nickel-NTA-Agarosesäule aufgetragen. Der Renaturierungsschritt sollte sich über einen Zeitraum von mindestens zwei Stunden erstrecken. Hierzu wird mit Hilfe des Gradientenmischers ein Konzentrationsgradient „rückwärts“ angelegt, das bedeutet von 6 M Guanidiniumchlorid im Basispuffer auf den Basispuffer ohne denaturierende Substanz zurück. Anschließend wird die Säule noch mit 20 Vol Basispuffer gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgt wie unter 2.5.2.2. beschrieben.

2.5.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

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

2.6 Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen

2.6.1 Gelretardations-Experiment

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

2.6.1.1 Radioaktive Markierung der DNA-Sonde

- Radioaktive Markierung von PCR-Produkten

Das DNA-Fragment, das später bei den Gelretardations-Experimenten als Sonde verwendet wird, wird mit Hilfe einer PCR-Reaktion unter Verwendung der „deep Vent“-Polymerase amplifiziert. Nach der PCR-Reaktion wird der PCR-Ansatz auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen, das PCR-Produkt unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten, wie unter 1.5.2 bzw. 1.5.3 beschrieben aus dem Gel isoliert und in 30 µl H₂O aufgenommen.

Die Sonden für die Gelretardationsexperimente werden dann mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase (PNK) radioaktiv markiert, welche die Übertragung des γ -³²P von (γ -³²P)-ATP auf freie 5'-Hydroxyl-Enden katalysiert. Ein Standardmarkierungsansatz, der für 30 min bei 37°C inkubiert wird, setzt sich wie folgt zusammen:

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

Zur Abtrennung von nicht eingebautem (γ - ^{32}P)-ATP wird der QIAquick Nukleotide Removal Kit von QIAGEN verwendet (siehe 1.9.1).

- Radioaktive Markierung von Restriktionsfragmenten

Während einer PCR-Reaktion wird häufig nicht nur das erwünschte DNA-Fragment, sondern auch weitere, unerwünschte Nebenprodukte amplifiziert. Diese „Verunreinigungen“ des eigentlichen PCR-Produkts sind auf einem normalen Agarosegel nicht sichtbar, wohl aber wenn das radioaktiv markierte PCR-Produkt im Gelretardationsexperiment über ein natives Polyacrylamidgel aufgetrennt wird.

Um zu erreichen, dass die radioaktiv markierte DNA-Sonde ein eindeutiges Signal verursacht ist es deshalb oftmals sinnvoll vor der eigentlichen Markierungsreaktion das PCR-Fragment, mit der zu untersuchenden DNA-Sequenz zunächst über ein angefügtes „A-tail“ in den pGEM-T-Vektor (1.3.2.2) zu klonieren.

Die Plasmid-DNA wird mit Hilfe eines Restriktionsenzym, das in der „multi cloning site“ schneidet bzw. über Primer interne Restriktionsschnittstellen linearisiert, und die DNA-Sonde im Anschluss mit Hilfe eines zweiten Enzyms aus dem Plasmid herausgeschnitten. Der Restriktionsansatz wird auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen, die DNA-Sonde unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten, wie unter 1.5.2 bzw. 1.5.3 beschrieben aus dem Gel isoliert und in 50 µl dH₂O aufgenommen. Im Anschluss wird das DNA-Fragment mit der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert (1.3.3), erneut über eine QIAquick-spin-Säule gereinigt und in 30 µl dH₂O aufgenommen. Die radioaktive Markierung erfolgt, wie oben bereits beschrieben mit Hilfe der T4 PolyNukleotidkinase.

2.6.1.2 Bestimmung der spezifischen Aktivität

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

2.6.1.3 Bindungsstudien mit gereinigtem Protein

- 10x Bindepuffer:

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

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

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

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

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

2.6.1.4 Elektrophoretische Auftrennung im nativen Polyacrylamidgel

- 4%iges Polyacrylamidgel:

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

Die Lösung für das 4%ige native Polyacrylamidgel wird luftblasenfrei zwischen zwei gut gereinigte Glasplatten (20 cm x 30 cm x 1,5 mm) gegossen, die durch Spacer getrennt sind. Anschließend setzt man einen Kamm ein und läßt das Gel für ca. 2 h bei RT auspolymerisieren. Das Gel wird in die Elektrophoresekammer eingespannt und diese mit 0,5x TBE als Laufpuffer gefüllt. Nach Entfernen der Luftblasen und Spülen der Taschen lässt man das Gel für ca. 30 min bei 150 Volt vorlaufen. Anschließend werden die Taschen erneut gespült und die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt für 3 h bei 150 Volt.

Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Glasplatten voneinander getrennt. Das an einer Platte haftende Gel wird mit einem trockenen Whatman-Papier abgezogen, luftblasenfrei mit einer Frischhaltefolie bedeckt und auf 3 Lagen, bestehend aus Whatman-Papier/Einmachfolie/Whatman-Papier, gelegt. Nach Bedecken des Stapels mit einem Whatman-Papier trocknet man das Gel für 2,5 h bei 80°C unter Vakuum. Danach wird es in eine Röntgenkassette gegeben und mit einem Röntgenfilm sowie einer Verstärkerfolie bedeckt. Die Expositionszeit bei -20°C kann je nach Intensität des Signals zwischen 1 Stunde und 3 Tagen liegen.

2.6.1.5 Kompetitions-Experiment

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

2.6.2 DNaseI-Footprint-Experiment

2.6.2.1 Präparation radioaktiv markierter DNA-Sonden für DNaseI-Footprint-Experimente

- Probenpuffer:

45% Saccharose
100 mM EDTA
0,1% Bromphenolblau
- Elutionspuffer:

10mM Tris-HCl (pH 8,0)
1mM EDTA
300 mM NaOAc (pH 5,2)
0,2% SDS

Das Plasmid (ca. 50 µg), das die gewünschte Promotorregion enthält, wird zunächst in einem Restriktionsvolumen von 100 µl mit dem Restriktionsenzym gespalten, dessen Schnittstelle an demjenigen Fragmentende lokalisiert ist, an dem die radioaktive Markierung eingeführt werden soll. Das linearisierte Plasmid wird anschließend mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (1.3.3). Der Reaktionsansatz wird mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert und schließlich wird die DNA durch Zugabe von 0,1 Vol 3 M NaOAc (pH 5,5) und 2,5 Vol abs. Ethanol gefällt. Die DNA wird dann in einem kleinen Volumen dH₂O aufgenommen. Ein Standardmarkierungsansatz, der für 30 min bei 37°C inkubiert wird, setzt sich wie folgt zusammen:

dephosphorylierte Vektor-DNA	6-7 µg
10x Kinasepuffer	1 µl
T4-Polynukleotidkinase	1 µl
(γ - ³² P)-ATP (10 µCi/µl)	3 µl
d H ₂ O	ad 10 µl

Die DNA-Sonde wird mit einem zweiten Restriktionsenzym aus dem Plasmid herausgespalten. Dazu wird dem Kinase-Ansatz das entsprechende Restriktionsenzym zugesetzt und die Inkubation für 2 Stunden bei 37°C fortgesetzt.

Kinase-Ansatz	10 µl
10 x Restriktions-Puffer	5 µl
Restriktionsenzym 2	4 µl
dH ₂ O	ad 50 µl

Die Reaktion wird durch Zugabe von 20 µl Probenpuffer gestoppt. Die nicht eingebauten Nukleotide und die Vektor-DNA werden bei elektrophoretischen Lauf (für 1,5- 2 Stunden bei 300 Volt und 1x TBE) über ein 4%iges Polyacrylamidgel (20 cm x 30 cm x 0,2 mm) von dem radioaktiv markiertem DNA-Fragment abgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die beiden Glasplatten vorsichtig voneinander getrennt. Das an einer Platte haftende Gel wird mit Frischhaltefolie bedeckt und in eine Röntgenkassette gelegt. Nach einer Expositionsdauer von ca. 5 min ohne Verstärkerfolie sollten die Banden der Plasmid-DNA und der DNA-Sonde auf dem Autoradiogramm gut sichtbar sein. Der Röntgenfilm wird unter die Glasplatte mit dem Gel gelegt und die gewünschte Bande ausgeschnitten. Die Sonden-DNA wird UN unter Schütteln bei 30°C in einem 15 ml Röhrchen mit 4 ml Elutionspuffer eluiert.

Am nächsten Tag wird der Überstand 1x mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert und die DNA gefällt. Die DNA wird in etwa 50 µl dH₂O resuspendiert und bei -20°C gelagert. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität (2.6.1.2) der Sonde wird die Strahlung eines Aliquots von 2 ml im Szintillationszähler gemessen.

2.6.2.2 DNaseI-Footprint-Experiment

- 10x Footprintpuffer: 100 mM Tris-HCl
100 mM NaCl
20 mM MgCl₂
1 mM CaCl₂
10 mM DTT
10% Glycerin
- Verdünnungspuffer: 2 mM MgCl₂
50 mM KCl
0,1% Igepal CA 630
10 mM DTT
- Stopppuffer: 192 mM NaOAc
32 mM Na₂EDTA
0,14% SDS
64 µg/ml tRNA

Zunächst werden geeignete Verdünnungen von dem Protein in Verdünnungspuffer in einem Probevolumen von 10 µl angesetzt. Ist eine *in vitro*-Phosphorylierung des Proteins erwünscht, wird zu den einzelnen Verdünnungsstufen jeweils 1 µl 500 mM Acetylphosphat gegeben und die Ansätze für 20 min bei RT inkubiert. Zur Bindung des Proteins an die DNA-Sonde werden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl in Footprintpuffer ca. 150000 cpm der markierten Sonde mit dem Protein inkubiert. Pro Reaktionsansatz werden dann 1-2 U DNaseI (in Footprintpuffer verdünnt) zugegeben und die Inkubation 1 min bei 25°C fortgesetzt. Nach Zugabe von 140 µl Stopppuffer werden die Ansätze mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert und die DNA durch die Zugabe von abs. Ethanol ausgefällt. Die DNA wird durch Zentrifugation (14000 rpm, 20 min, 4°C) sedimentiert, im Vakuum getrocknet und schließlich in 5 µl Formamid-Farbstoffpuffer (Amersham) gelöst. Als Längenstandard für die Gelelektrophorese wird mit der verwendeten DNA-Sonde parallel eine modifizierte G+A-Sequenzierungsreaktion nach Maxam und Gilbert (Maxam and Gilbert, 1977) durchgeführt. Der Sequenzierungsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

G+A-Reaktion:	DNA-Sonde	100000 cpm
	poly[dIdC] (1 µg/µl)	1 µl
	50% Ameisensäure	1 µl
	TE-Puffer	ad 10 µl

Nach einer Inkubation von 6 min bei 37°C werden 150 µl 1 M Piperidin zum Reaktionsansatz gegeben. Anschließend wird der Ansatz 30 min auf 90°C erhitzt. Die Probe wird dann 5 min auf Eis inkubiert und es werden 3 µl tRNA-Lösung (1 µg/µl) zugegeben. Nach Zugabe von 1,2 ml Butanol und gründlichem Mischen wird 10 min bei 4°C zentrifugiert (15000 rpm). Der Überstand wird verworfen. Danach wird 150 µl 1% SDS und 1,2 ml Butanol zugegeben, der Ansatz gut durchmischt und 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet noch zweimal mit 0,5 ml Butanol gewaschen, 15 min im Vakuum getrocknet und schließlich in 5 µl Formamid-Farbstoffpuffer (Amersham) aufgenommen.

Die Sequenzierungsreaktion und die Footprint-Ansätze werden zusammen auf ein 6%iges Polyacrylamid/Harnstoffgel (20 cm x 40 cm x 0,3 mm) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 1500 V und ist beendet, wenn der Farbstoff Bromphenolblau das Gelende erreicht hat. Nach Beendigung des Laufs wird das Gel auf ein Whatmanpapier aufgezogen, mit Frischhaltefolie bedeckt und in einer Röntgenfilmkassette auf einen Röntgenfilm mit Verstärkerfolie exponiert.

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

2.7.1 Autophosphorylierung von Histidinkinasen und Phosphotransfer auf Response-Regulatoren

- 5x Phosphorylierungspuffer:

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

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

- ATP-Mix:

ATP (10 mM, Amersham Pharmacia):	10 µl
(γ - ³³ P)-ATP bzw. (γ - ³² P)-ATP (Amersham Pharmacia: 10 µCi/µl; 3000 bzw. > 50000 Ci/mmol):	25 µl
dH ₂ O	ad 40 µl
- Phosphorylierungsansatz (halber Ansatz):

5 x Phosphorylierungspuffer:	5 µl
ATP-Mix:	5 µl
Response-Regulator:	4 µM
Histidinkinase:	1 µM
dH ₂ O	ad 25 µl

Die Kinase wird zuletzt in den Ansatz gegeben, da dadurch die Phosphorylierungsreaktion gestartet wird. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT werden die Reaktionen durch Zugabe von 7,5 µl Laemmli-Puffer (2.1) gestoppt und 15 bis 20 µl der Ansätze über ein denaturierendes 15%iges Polyacrylamid-Minigel aufgetrennt (2.1). Die Elektrophorese erfolgt bei 160 V und wird kurz bevor die Bromphenolblaufront das Gel verlässt beendet, da sonst das „heiße“ ATP aus dem Gel in den Puffer läuft. Dies ist nach etwa 50 min der Fall. Am unteren Gelrand wird mit einem scharfen Skalpell ein ca. 1,5 cm breiter Streifen vorsichtig entfernt, um sicherzustellen, dass markierte Proteine nicht durch die freien, nicht eingebauten Nukleotide bei der Autoradiographie überstrahlt werden. Das Trenngel wird anschließend bei 80°C für 1,5 Stunden unter Vakuum getrocknet (von unten nach oben: trockenes Whatman-Papier, feuchtes Whatman-Papier, das Trenngel, Frischhaltefolie und abermals trockenes Whatman-Papier). Das getrocknete Gel kann dann in eine zuvor gelöschte PhosphorImager-Kassette (Molecular Dynamics) gelegt werden. In Abhängigkeit von der

Strahlungsintensität können die radioaktiv markierten Proteinbanden am PhosphoImager nach 2 bis 16 Stunden dargestellt, wenn erwünscht densitometrisch ausgewertet und mit Hilfe eines Thermodruckers dokumentiert werden. Alternativ können die Proteine auch auf eine PVDF-Membran (2.3) geblottet werden, die dann ebenfalls im getrockneten Zustand mit Hilfe des PhosphoImagers ausgewertet werden kann. Anschließend kann ein Röntgenfilm in Abhängigkeit von der Strahlungsintensität für zwei Stunden und bis zu 14 Tage bei -20°C oder -80°C exponiert werden.

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

2.7.2 Analyse der Phosphorylierung von Response-Regulatoren durch ^{32}P -markiertem Acetylphosphat

Viele Response-Regulatoren sind in Gegenwart niedermolekularer Phosphodonoren in der Lage, sich zu autophosphorylieren. Um die Fähigkeit von Proteinen zu untersuchen, Acetylphosphat als Phosphodonor zu verwenden, werden Phosphorylierungsreaktionen mit ^{32}P -markiertem Acetylphosphat (Firma NEN, $6000\ \text{Ci/mmol}$) durchgeführt. Da die Autophosphorylierung von Response-Regulatoren nicht so effizient abläuft wie der Phosphotransfer von der Kinase zum Regulator, müssen für diese Versuche größere Proteinmengen eingesetzt werden (3 bis $23\ \mu\text{M}$). Die Reaktionen laufen in 1x Phosphorylierungspuffer (2.7.1) ab, wobei je $1\ \mu\text{l}$ unverdünntes Acetylphosphat (15 bis $18,5\ \text{nM}$ Endkonzentration) eingesetzt wird. Die Inkubation der Reaktion erfolgt $30\ \text{min}$ lang bei 30°C . Aufgrund der geringeren Effizienz der Phosphorylierung und der hohen Proteinkonzentrationen werden große Reaktionansätze benötigt (40 bis $80\ \text{ml}$), deren Volumina durch das Abstoppen mit Laemmli-Puffer nochmals erhöht werden. Um solche große Mengen auf Minigele auftragen zu können, werden für diese Versuche Spacer benutzt, die Taschen mit einem Fassungsvermögen von über $60\ \mu\text{l}$ bildeten. Alternativ dazu können die Proteine nach Ablauf der Inkubationszeit auch einer TCA-Fällung (2.2) unterzogen werden, wodurch die Volumina verkleinert werden können. Gelelektrophorese, Trocknung und Auswertung erfolgen wie unter 2.7.1 beschrieben.

E Ergebnisse

1 Untersuchungen zur phylogenetischen Einordnung der „neuen“ *Bordetella*-Arten innerhalb der Gattung *Bordetella*

Der in Abbildung 1 abgebildete phylogenetische Stammbaum der Gattung *Bordetella* wurde anhand der DNA-Sequenzen der ribosomalen 16S RNA-Gene erstellt. Da zu dem *B. bronchiseptica*-Cluster, wie unter 1.1.1 angegeben, wichtige, humanpathogene Erreger zählen, wurden diese Organismusgruppe näher untersucht. Ein Fokus liegt hierbei auch seit längerem auf der Untersuchung der evolutionären Vorgänge und der Charakterisierung der Mechanismen, die zur Adaptation an unterschiedliche Wirtsorganismen geführt haben. Über die evolutionäre Beziehung und die Stellung der „neuen“ Arten ist zum heutigen Zeitpunkt noch nicht viel bekannt. Neben der Ermittlung der 16S rDNA-Sequenz werden zur exakten phylogenetischen Einordnung von Bakterien oftmals noch weitere Methoden, wie zum Beispiel DNA/DNA-Hybridisierungs-Experimente, Multilokus-Enzym-Gelelektrophorese, oder aber der Sequenzvergleich von ubiquitär verbreiteten Genen angewandt. Um die phylogenetischen Beziehungen zwischen den „neuen“ *Bordetella*-Arten und den „klassischen“ Arten zu untersuchen, sollte über Southernblot- und PCR-Analysen die Verbreitung und Konservierung von bekannten Genen und IS-Elementen analysiert werden.

1.1 Untersuchungen zur Identifizierung von *ompA*-, *risA*- und *bvgA*-orthologen Genen bei *Bordetella*-Arten

1.1.1 Southernblot-Experimente zur Identifizierung von *ompA*-, *risA*- und *bvgA*-orthologen Genen bei *Bordetella*-Arten

Mit Hilfe von Southernblot-Experimenten wurde zunächst die Verbreitung von bekannten Genen innerhalb der Gattung *Bordetella* untersucht. Hierfür wurde chromosomale DNA aus *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. trematum*, *B. holmesii* und *B. petrii* sowie aus *E. coli* DH5 α und *A. xylosoxidans* (siehe Material) isoliert und im Anschluss mit dem Restriktionsenzym *PstI* verdaut. Die Restriktionsansätze wurden über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und durch UV-Licht fixiert. Um das Vorhandensein bekannter *B. avium*-Gene bei den „neuen“ Arten zu testen, wurden Genbereiche des Regulatorproteins RisA und des Membranproteins OmpA von *B. avium* ausgesucht. Diese Proteine kommen mit identischer bzw. fast identischer Basensequenz auch bei dem *B. bronchiseptica*-Cluster vor. Die Sonden wurden mit dem Primerpaar *omp1e* und *omp2b* sowie *ris1c* und *ris2d* über PCR-Reaktionen von chromosomaler DNA aus *B. avium* amplifiziert. Da zum Zeitpunkt der Untersuchungen die *bvgA*-Nukleotidsequenzen von *B. avium* und *B. petrii* noch nicht zur Verfügung standen, wurde zum Nachweis des Response-Regulators BvgA die Nukleotidsequenz der BvgA-Receiver-Domäne aus *B. pertussis* zu Grunde gelegt. Die 611 bp große Sonde wurde mit dem Primerpaar *bvgA-Nde* und *bvgA-Eco* aus dem Plasmid pDM20, welches den *bvgAS*-Locus von *B. pertussis* trägt, amplifiziert. Die einzelnen PCR-Produkte wurden nach der Aufreinigung mit Hilfe des ECLTM-Kits markiert.

Wie in der Abbildung 8A und 8B zu erkennen ist, hybridisieren die *ompA*- und *risA*-Sonden mit der chromosomalen DNA aus allen untersuchten *Bordetella*-Arten, ebenso wie mit der aus *A. xylosoxidans*, nicht aber mit der aus *E. coli*. Die *ompA*- und *risA*-Gene scheinen also innerhalb der Gattung *Bordetella* und bei dem nah verwandten Organismus *A. xylosoxidans* ubiquitär verbreitet zu sein. Im Gegensatz dazu hybridisiert die von *B. pertussis* abgeleitete *bvgA*-Sonde lediglich mit der chromosomalen DNA aus *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*,

B. parapertussis, *B. avium*, *B. trematum* und *B. hinzii* (siehe Abbildung 8C). Für *B. petrii* und *B. holmesii* konnte über diesen experimentellen Ansatz kein Hinweis auf das Vorhandensein eines *bvgA*-orthologen Gens erzielt werden. Ebenso scheint die chromosomale DNA aus *E. coli* und *A. xylosoxidans* nicht mit der *bvgA*-Sonde aus *B. pertussis* zu hybridisieren.

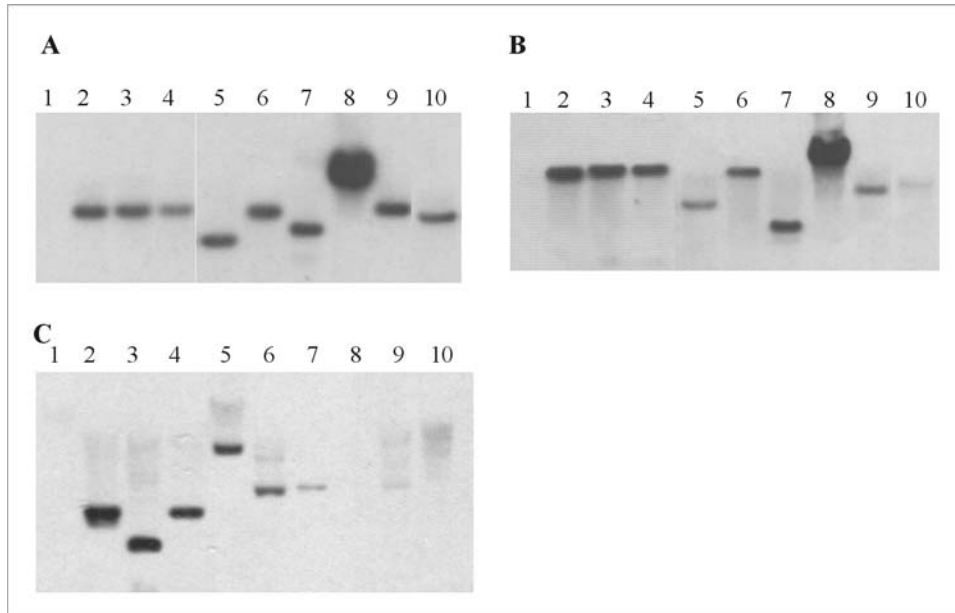


Abbildung 8: Southernblot-Experimente zum Nachweis von bekannten *Bordetella* Genen bei den „neuen“ *Bordetella*-Arten.

A + B: Chromosomale DNA aus *E. coli* (Spur1), *B. pertussis* (Spur2), *B. bronchiseptica* (Spur3), *B. parapertussis* (Spur4), *B. petrii* (Spur5), *B. trematum* (Spur6), *B. hinzii* (Spur7), *B. avium* (Spur8), *B. holmesii* (Spur9), *A. xylosoxidans* (Spur10) wurde mit *PstI* verdaut, über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nylonmembran mit der *ompA* (**A**) und *risA* (**B**) DNA-Sequenz aus *B. avium* hybridisiert.

C: Chromosomale DNA aus *E. coli* (Spur1), *B. pertussis* (Spur2), *B. bronchiseptica* (Spur3), *B. parapertussis* (Spur4), *B. avium* (Spur5), *B. trematum* (Spur6), *B. hinzii* (Spur7), *B. holmesii* (Spur8), *B. petrii* (Spur9), *Achromobacter xylosoxidans* (Spur10) wurde mit *PstI* verdaut, über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nylonmembran mit der DNA-Sequenz der *bvgA*-Receiver-Domäne aus *B. pertussis* hybridisiert.

1.1.2 PCR-Analysen zur Bestimmung der *ompA*, *risA* und *bvgA* DNA- und Proteinsequenzen

Da die Gene *ompA* und *risA* ubiquitär in der Gattung *Bordetella* verbreitet sind, wurde, um das Ausmaß der jeweiligen Sequenzhomologien zu ermitteln, ein Teilbereich dieser Gene sequenziert.

Hierzu wurde zunächst mit dem Primerpaar *omple* und *omp2b* sowie *ris1c* und *risA2d* und chromosomaler DNA aus *B. holmesii*, *B. trematum*, *B. hinzii*, *B. petrii* und *B. avium* eine PCR-Reaktion durchgeführt. Die darüber erhaltenen PCR-Fragmente wurden mit Hilfe der Oligonukleotide *omple* bzw. *ris1c* sequenziert. Die einzelnen Sequenzen wurden dann mit den in den Datenbanken bereits publizierten *ompA*- und *risA*-Sequenzen verglichen. In der Abbildung 40 im Anhang ist ein Alignment der einzelnen *ompA*-Nukleotid- und Aminosäuresequenzen sowie in Abbildung 41 ein Alignment der einzelnen *risA*-Nukleotid- und Aminosäuresequenzen abgebildet. Das Ausmaß der Übereinstimmungen in dem ermittelten Sequenzabschnitt wurde mit dem BESTFT-Programm (Altschul *et al.*, 1997) ermittelt und ist in der Tabelle 5 und 6 im Anhang aufgeführt.

Die Übereinstimmungen in der Nukleotidsequenz des Membranproteins OmpA beträgt dabei innerhalb des *B. bronchiseptica*-Clusters zwischen 99,6% und 100%, bei den „neuen“ Arten untereinander zwischen 81,8% und 93,1%, sowie beim Vergleich der „klassischen“ mit den „neuen“ Arten zwischen 87,1% und 91,3%. Die Homologien der davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen betragen innerhalb des *B. bronchiseptica*-Clusters zwischen 99,4% und 100%, bei den „neuen“ Arten untereinander zwischen 85,0 % und 96,4 %, sowie beim Vergleich der „klassischen“ mit den „neuen“ Arten zwischen 89,2 und 96,4%. Die Identität zu der entsprechenden Sequenz von *A. xylosoxidans* beträgt auf Nukleotidebene zwischen 84,6% und 91,7%, und auf Aminosäureebene zwischen 87,4% und 90,2%.

Die Übereinstimmungen in der Nukleotidsequenz des Regulatorproteins RisA beträgt innerhalb des *B. bronchiseptica*-Clusters zwischen 99,8% und 100%, bei den „neuen“ Arten untereinander zwischen 89,0% und 92,3% sowie beim Vergleich der „klassischen“ mit den „neuen“ Arten zwischen 89,7% und 100%. Die Homologie zu der *risA*-Sequenz aus *A. xylosoxidans* beträgt zwischen 86,6% und 88,7%. Die jeweiligen *RisA*-Aminosäuresequenzen sind in dem ermittelten Sequenzabschnitt innerhalb der Gattung *Bordetella*, sowie im Vergleich zu *A. xylosoxidans*, zu 100 % homolog.

Bei den zwei *Bordetella*-Arten *B. holmesii* und *B. petrii* konnte über Southernblot-Experimente kein Hinweis auf das Vorhandensein eines *bvgA*-orthologen Gens erzielt werden. Ebenso verliefen PCR-Analysen mit dem Primerpaar *bvgA*-Nde und *bvgA*-Eco, welches sich aus der *bvgA*-Sequenz aus *B. pertussis* ableitet, negativ. Allerdings konnte unter Verwendung dieses Primerpaares auch bei *B. avium*, *B. hinzii* und *B. trematum* kein PCR-Produkt nachgewiesen werden, obwohl für diese Organismen im Southernblot eine Hybridisierung zwischen ihrer chromosomalen DNA und der von *B. pertussis* abgeleiteten *bvgA*-Sonde festgestellt werden konnte. Obwohl die einzelnen *BvgA*-Proteinsequenzen möglicherweise im Laufe der Evolution konserviert geblieben sind, könnte es daher dennoch zu einer verstärkten Variation in den einzelnen *bvgA*-Nukleotidsequenzen gekommen sein. Aus diesem Grund wäre es möglich, dass ein Primerpaar, welches sich aus der *bvgA*-Nukleotidsequenz von *B. pertussis* ableiten, nicht an die chromosomale DNA der „neuen“ Arten binden kann, obwohl das entsprechende orthologe Gen vorhanden ist. Aus diesem Grund wurde eine PCR-Analyse mit degenerierten Primern durchgeführt. Da, wie bereits erwähnt wurde, zum Zeitpunkt der Untersuchungen nur die *bvgA*-Nukleotidsequenzen des *B. bronchiseptica*-Clusters zur Verfügung standen, wurden die degenerierten Primer aus der *bvgA*-Sequenz aus *B. pertussis* abgeleitet. Die degenerierten Primer wurden so gewählt, dass sie sich von funktionell wichtigen Domänen des Response-Regulators ableiten (siehe auch Abbildung 9). Eine Konservierung in den sogenannten DD- (Aminosäure: IIDDH) und K-Boxen (GAAGF) des Receivers und innerhalb des Helix-turn-Helix-Motivs (KLNA) der Output-Domäne erschien wahrscheinlich (Morel-Deville *et al.*, 1997; Pao and Saier Jr., 1995). Von diesen Aminosäuresequenzen wurde das degenerierte Primerpaar *deg1*-forward und *deg1*-reverse, sowie *deg2*-forward und *deg2*-reverse abgeleitet, unter Verwendung des UPAC-Codes synthetisiert und für PCR-Reaktionen eingesetzt, die unter folgenden Bedingungen durchgeführt wurden:

Zunächst wurden zehn Zyklen mit den Parametern 30 sek Denaturierung bei 94°C, 60 sek Annealing der Primer bei 34°C und 30 sek Elongation der Primer bei 72°C, durchgeführt. Im Anschluss folgten 30 Zyklen unter den Bedingungen 30 sek Denaturierung bei 94°C, 45 sek Annealing der Primer bei 50°C und 30 sek Elongation der Primer bei 72°C.

Die zu erwartenden PCR-Produkte hätten im Fall des *B. bronchiseptica*-Clusters für das Primer-Paar „*deg1*“ eine Länge von 285 bp und für das Primerpaar „*deg2*“ eine Länge von 291 bp. Ein PCR-Produkt der zu erwartenden Größe konnte unter Verwendung des Primerpaares „*deg1*“ von der chromosomalen DNA aus *B. holmesii*, *B. avium* und *B. hinzii* amplifiziert werden, während nur ein ca. 250 bp großes PCR-Produkte unter Verwendung des Primerpaares „*deg2*“ von der chromosomalen DNA aus *B. trematum*, *B. avium* und *B.*

holmesii amplifiziert werden konnte. Für die als Positivkontrolle eingesetzte chromosomale DNA von *B. pertussis* konnte mit keinem der beiden Primerpaare ein PCR-Produkt amplifiziert werden.

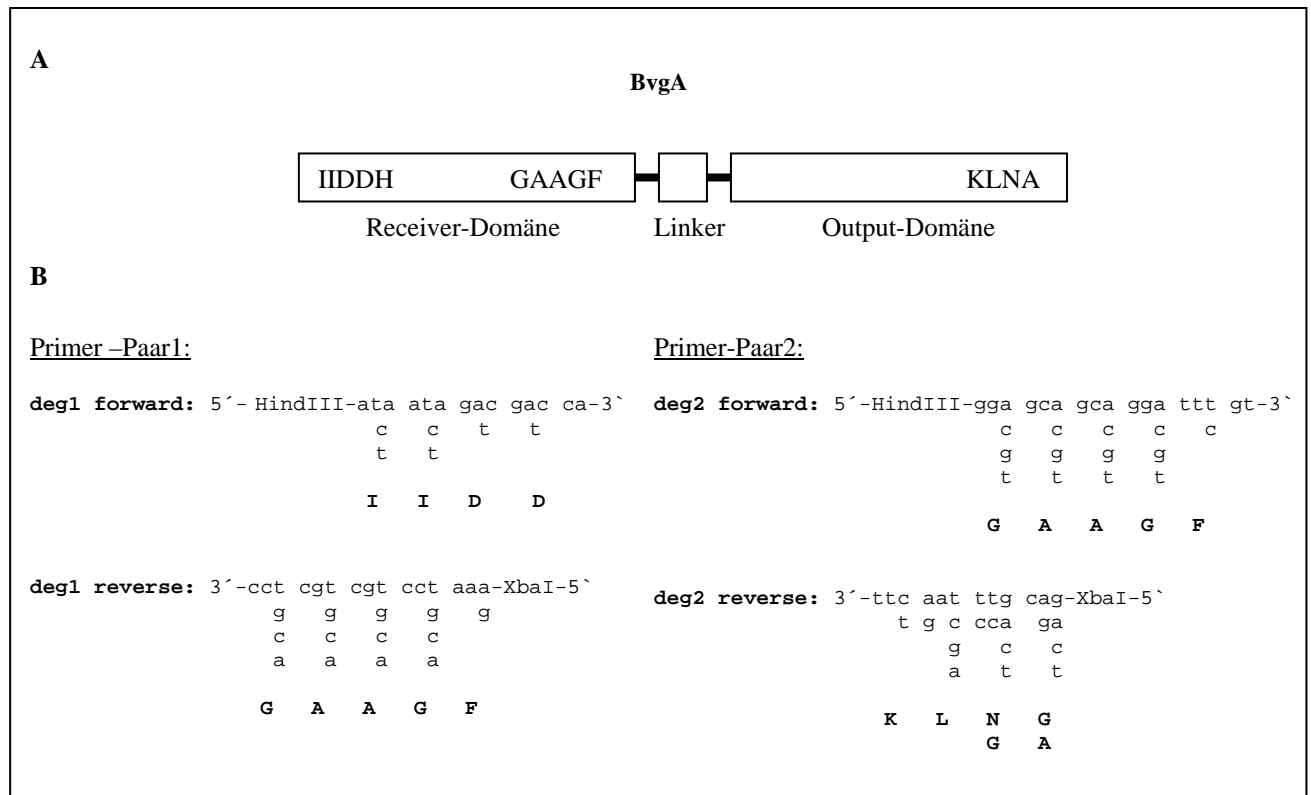


Abbildung 9A) Schematische Darstellung der BvgA-Sequenz aus *B. pertussis*.

Die Aminosäuresequenzen, von denen sich die degenerierten Primer ableiten, sind angegeben.

9B) Design der degenerierten Primer zur Amplifikation der *bvgA*-Sequenz .

Die Position der *HindIII*- bzw. *XbaI*-Schnittstelle, die an das jeweilige 5'-Ende des forward- bzw. reverse-Primers angefügt wurden, ist gekennzeichnet.

Die PCR-Produkte „deg1“ von *B. holmesii* (*BH*), *B. avium* (*BA*) und *B. hinzii* (*BHZ*) wurden in den pGEM-T-Vektor ligiert, wodurch die Plasmide pGEM-T-*bvgA_{BH}receiv*, pGEM-T-*bvgA_{BA}receiv*, pGEM-T-*bvgA_{BHZ}receiv* entstanden. Ebenfalls wurden die PCR-Produkte „deg2“ von *B. holmesii*, *B. avium* und *B. trematum* in den pGEM-T-Vektor ligiert, wodurch die Plasmide pGEM-T-*bvgA_{BH}out*, pGEM-T-*bvgA_{BA}out*, pGEM-T-*bvgA_{BT}out* entstanden. Die einzelnen Plasmide wurden im Anschluss mit Hilfe der Primer M13-Universal und M13-Reverse sequenziert. Die jeweiligen Sequenzen sind im Anhang aufgeführt. Die DNA-Sequenzen der PCR-Produkte „deg1“ (im folgenden als „*bvgA*receiv“ bezeichnet) und der PCR-Produkte „deg2“ (im folgenden als „*bvgA*out“ bezeichnet) wurden zunächst mit Hilfe von BLASTx-Analysen untersucht. Hierbei konnten Übereinstimmungen mit der Receiver- bzw. der Output-Domäne von BvgA aus *B. pertussis* festgestellt werden. Es zeigte sich dabei, dass das Oligonukleotid deg2-reverse innerhalb der jeweiligen *bvgA*-Sequenz an einen weiter stromaufwärts gelegenen Sequenzbereich gebunden hat, was zur Amplifikation der um 54 bp verkürzten PCR-Produkte „*bvgA*out“ führte. In der Abbildung 42 im Anhang ist ein Alignment der einzelnen Nukleotid- und Aminosäuresequenzen abgebildet. Das Ausmaß der Übereinstimmungen wurde erneut über BESTFIT-Analysen (Altschul *et al.*, 1997) ermittelt und ist in der Tabelle 7A und 7B im Anhang aufgeführt. Die Übereinstimmungen zu der

bekannten *bvgA*-Nukleotidsequenz aus *B. pertussis* betragen demnach für die einzelnen PCR-Produkte zwischen 70,4 und 73,4 %, während die abgeleiteten Aminosäuresequenzen eine 72,2 bis 76,8 %ige Identität mit der *BvgA*-Proteinsequenz aus *B. pertussis* besitzen. Ein höheres Ausmaß an Sequenzkonservierung ergibt sich, wenn die einzelnen DNA- und Proteinsequenzen der „neuen“ Arten untereinander verglichen werden. Hier betragen die Übereinstimmungen in den einzelnen Nukleotidsequenzen zwischen 77,6 und 97,8% und in den abgeleiteten Proteinsequenzen zwischen 89,9 und 98,9 %.

1.2 Untersuchungen über die Verbreitung der IS-Elemente IS481, IS1001 und IS1002 sowie von *B. pertussis*- bzw. *B. bronchiseptica*-spezifischen DNA-Fragmenten innerhalb der Gattung *Bordetella*

Im weiteren sollte zur systematischen Einordnung der „neuen“ *Bordetella*-Arten die Verbreitung der bei dem *B. bronchiseptica*-Cluster vorkommenden IS-Elemente IS481, IS1001 und IS1002 innerhalb der Gattung *Bordetella* untersucht werden.

Für die Southernblot-Experimente wurde *PstI* verdaut, chromosomale DNA der einzelnen Arten verwendet. Zum Nachweis des IS-Elements IS1001 wurde ein 498 bp großes PCR-Fragment eingesetzt, das mit den Oligonukleotiden IS1001-5 und IS1001-3 von chromosomaler DNA aus *B. paraptussis* P14 amplifiziert wurde. Zum Nachweis der IS-Elemente IS481 und IS1002 wurden die Oligonukleotidsonden IS481 und IS1002 eingesetzt, da eine Amplifikation der entsprechenden Genabschnitte über eine PCR erfolglos blieb. In Abbildung 10 ist die Verbreitung der einzelnen IS-Elemente innerhalb der Gattung *Bordetella* dargestellt. Das IS-Element IS481 konnte innerhalb des *B. bronchiseptica*-Clusters lediglich bei dem untersuchten *B. pertussis*-Stamm nachgewiesen werden, während IS1002 neben *B. pertussis* auch bei dem humanen *B. paraptussis*-Isolat P14 nachgewiesen werden konnte. Die Sonde für das IS-Element IS1001 hybridisierte bei den Vertretern des *B. bronchiseptica*-Clusters mit der chromosomalen DNA aus *B. bronchiseptica* 7865 und *B. paraptussis* P14. Bei den „neuen“ *Bordetella*-Arten konnte mit Hilfe der Southernblot-Experimente nur bei den vier untersuchten *B. holmesii*-Stämmen No1, ATCC51541, G7702 und G8341 das Vorkommen von IS481 und IS1001 gezeigt werden, während keines der untersuchten IS-Elemente im Genom von *B. trematum*, *B. hinzii*, *B. petrii* und *B. avium* nachgewiesen werden konnte.

Außerdem wurde in weiteren Southernblot-Experimenten die Verbreitung von *B. pertussis*- bzw. *B. bronchiseptica*-spezifischen DNA-Fragmenten unter den „neuen“ Arten untersucht. Diese artspezifischen DNA-Fragmente wurden von Barbara Middendorf im Rahmen einer vergleichenden Genomanalyse identifiziert (Middendorf and Gross, 1999).

Zur Sondensynthese der zwei *B. pertussis*-spezifischen DNA-Fragmente „*BglA*“ und „*BamA*“ wurde mit dem Primerpaar M13 Universal und M13 Reverse, sowie den Plasmiden pUC18-*BglA* bzw. -*BamA*, eine PCR-Reaktion durchgeführt. Zur Sondensynthese der *B. bronchiseptica*-spezifischen DNA-Fragmente „*BamB*“, „*BamC*“, „*BamD*“, „*BamE*“, „*BamG*“, „*BamH*“, „*BamI*“ und „*Bam23*“ wurde ebenso mit Hilfe der Primer M13-Universal und M13-Reverse, sowie den Plasmiden pUC18-*BamB*, -*BamC*, -*BamD*, -*BamE*, -*BamG*, -*BamH*, -*BamI* und -*Bam23* eine PCR-Reaktion durchgeführt. Das DNA-Fragment „*BamF*“ ließ sich nicht über eine PCR-Reaktion amplifizieren, woraufhin das Fragment über einen *EcoRI/BamHI*-Restriktionsverdau aus der „multi cloning site“ des Plasmids pUC18-*BamF* geschnitten wurde. Alle *B. bronchiseptica*-spezifischen DNA-Fragmente ließen sich über anschließende Southernblot-Experimente in dem untersuchten *B. paraptussis* Stamm P14 nachweisen (Abbildung 10). Im Gegensatz dazu konnte, mit Ausnahme des Fragments „*BamF*“, keines der artspezifischen RDA-Fragmente bei den „neuen“ *Bordetella*-Arten identifiziert werden. Das *B. bronchiseptica*-spezifische DNA-Fragment „*BamF*“, welches Homologien zu

Nitrat-Transporter-Genen besitzt, konnte bei *B. holmesii*, *B. hinzii*, *B. trematum*, *B. petrii*, nicht aber bei *B. avium* nachgewiesen werden.

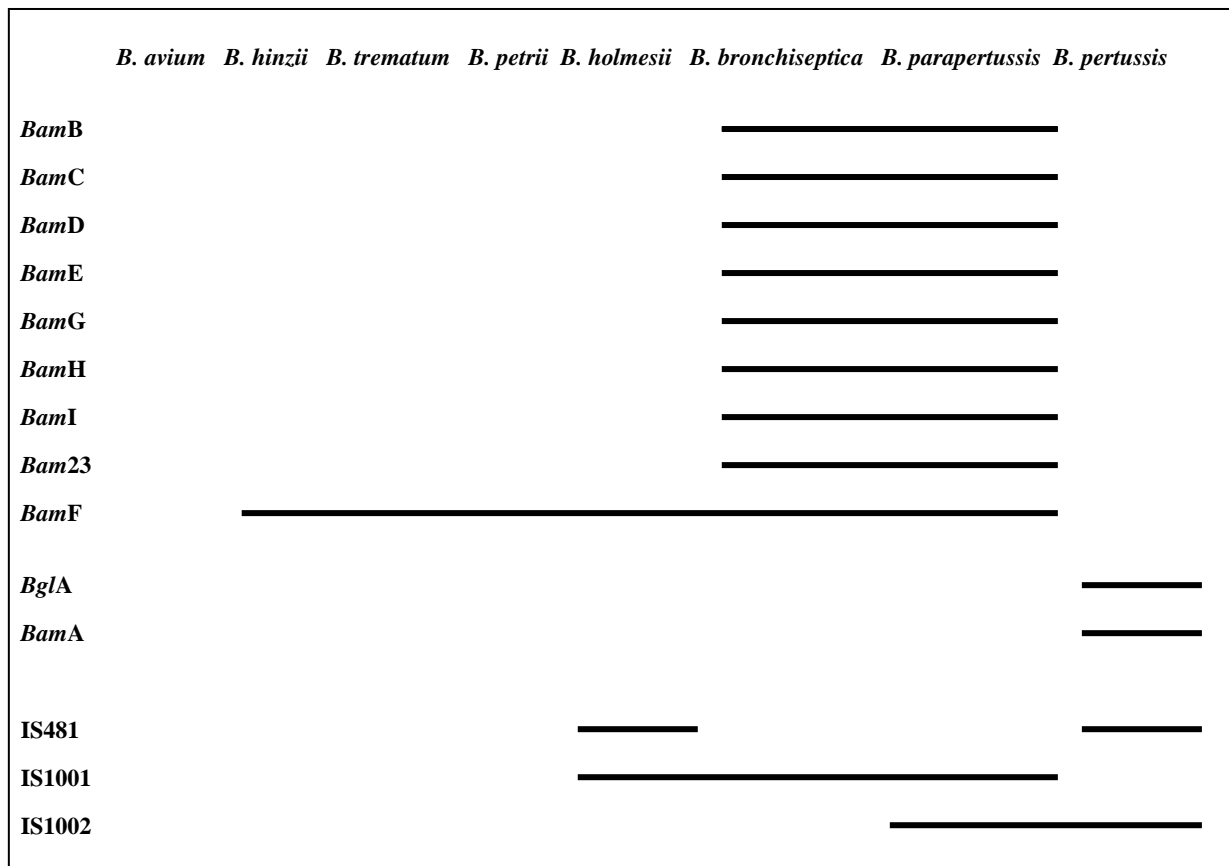


Abbildung 10: Zusammenfassung über die Verbreitung der IS-Elemente IS481, IS1001 und IS1002, sowie von *B. bronchiseptica*- (*BamB*, *Bam23*, *BamC*, *BamD*, *BamE*, *BamI*, *BamG*, *BamH*, *BamF*) bzw. *B. pertussis*-spezifischen (*BglA*, *BamA*) RDA-Fragmenten (Middendorf and Gross, 1999) innerhalb der Gattung *Bordetella*.

2 „Genome Walk“ zur Vervollständigung der *bvgA*-Sequenz aus *B. holmesii* (*bvgA_{BH}*) sowie zur genotypischen Analyse der daran angrenzenden DNA-Bereiche

Über die PCR-Analysen mit den degenerierten Primern konnte, wie in Abschnitt 1.1.2 beschrieben wurde, ein Teilbereich der Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Regulatorproteins *BvgA* aus *B. holmesii* (*BvgA_{BH}*) ermittelt werden. Um diese Sequenz zu vervollständigen und um die an die *bvgA_{BH}*-Sequenz angrenzenden DNA-Abschnitte zu ermitteln, wurde ein „Genome Walk“ mit chromosomaler DNA aus *B. holmesii* G7702 durchgeführt. Hierfür wurden mehrere, zuvor erstellte „Mini-Genbanken“, die Teilbereiche des *B. holmesii*-Genoms repräsentieren, mit DNA-Sonden „durchleuchtet“, die sich aus bereits bekannten Sequenzen ableiteten.

- „Genome Walk“ Schritt 1:

Chromosomale DNA aus *B. holmesii* G7702 wurde mit *PstI* verdaut, über ein 1 %iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Im Southernblot wurde die DNA dann mit einem *XbaI/HindIII*-DNA-Fragment aus pGEM-T-

bvgA_{BH}receiv, welches der zu diesem Zeitpunkt bekannten *bvgA*-Receiver-Sequenz von *B. holmesii* entsprach, hybridisiert. Die Sonde hybridisierte hierbei mit einem ca. 1,1 kbp und einem ca. 0,3 kbp großen *PstI*-Fragment. Das Ergebnis deutete somit auf das Vorhandensein einer *PstI*-Schnittstelle innerhalb der Nukleotidsequenz von *bvgA_{BH}receiv* hin. Das 0,3 kbp große *PstI*-Fragment erschien für einen effektiven „Genome Walk“ zu klein, weshalb auch keine Versuche unternommen wurden, für dieses Fragment eine entsprechende „Mini-Genbank“ zu erstellen. Zur Erstellung einer „Mini-Genbank“, die das ca. 1,1 kbp große *PstI*-Fragment repräsentiert, wurde ein 0,8-1,4 kbp großer Bereich eines *PstI*-Restriktionsansatzes von chromosomaler *B. holmesii* G7702 DNA aus einem Agarosegel ausgeschnitten, über eiskalte Phenolextraktion eluiert und über die *PstI*-Schnittstelle in den pSK-Vektor kloniert. Der Ligationsansatz wurde dann in *E. coli*-Zellen transformiert. Die Klone wurden am nächsten Tag gepickt und auf eine neue Platte überstrichen, mit der dann am darauffolgenden Tag ein Kolonieblot durchgeführt wurde. Zum „Durchleuchten“ dieser „Mini-Genbank“ wurde erneut das *XbaI/HindIII*-DNA-Fragment aus pGEM-T-*bvgA_{BH}receiv* verwendet. Auf diese Weise konnte ein positiver Klon identifiziert werden. Das entsprechende Plasmid, pSK-*PstI*-Frag1, wurde mit Hilfe des M13-Universal- und M13-Reverse-Primers sequenziert. Über diesen Ansatz konnte die *bvgA_{BH}*-Sequenz in 5'-Richtung bis zum Startcodon vervollständig sowie die stromaufwärts von *bvgA_{BH}* gelegene DNA-Region ermittelt werden. Mit Hilfe des BLASTp-Programmes (Altschul *et al.*, 1990) wurde 444 bp stromaufwärts des *bvgA_{BH}*-Startcodons ein weiterer Leserahmen identifiziert. Dieser Leserahmen, der Homologien zu dem potentiellen Response Regulator PA3947 (Genebank-Nummer: C83151) aus *Pseudomonas* zeigt, wird in die gleiche Richtung wie das *bvgA_{BH}*-Gen transkribiert.

- „Genome Walk“ Schritt 2:

Im weiteren sollte die Sequenz des Response-Regulators *BvgA_{BH}* in 3'-Richtung vervollständig, und der stromabwärts davon gelegene DNA-Bereich ermittelt werden.

Hierfür wurde mit *NarI* verdaute, chromosomale DNA aus *B. holmesii* im Southernblot mit einem *XbaI/HindIII*-DNA-Fragment aus pGEM-T-*bvgA_{BH}out*, welches einem Sequenzabschnitt der *bvgA_{BH}*-Output-Domäne aus *B. holmesii* entspricht, hybridisiert. Die Sonde hybridisierte dabei mit einem ca. 1,0 kbp großen *NarI*-Fragment. Zur Erstellung einer „Mini-Genbank“ wurden 0,8- 1,4 kbp große *NarI*-DNA-Fragmente wie oben beschrieben verwendet. Zum „Durchleuchten“ der entstandenen „Mini-Genbank“ wurde erneut das *XbaI/HindIII*-DNA-Fragment aus pGEM-T-*bvgA_{BH}out* eingesetzt. Auf diese Weise konnte ein positiver Klon identifiziert werden. Das erhaltene Plasmid pUC19-*NarI*-Frag2 wurde sequenziert. Über diesen Ansatz konnte zum einen die *bvgA_{BH}* Sequenz in 3'-Richtung vervollständig werden, zum anderen konnte der stromabwärts von *bvgA_{BH}* gelegenen DNA-Bereich identifiziert werden. Mit Hilfe des BLASTp-Programmes wurde 5 bp stromabwärts nach dem *bvgA_{BH}*-Stoppcodon ein weiterer Leserahmen identifiziert, welcher Homologien zu der Histidinkinase *BvgS* aus *B. pertussis* besitzt und in dieselbe Richtung wie *bvgA_{BH}* transkribiert wird. Dieser Leserahmen wird im folgenden als *bvgS_{BH}* bezeichnet.

- „Genome Walk“ Schritt 3:

Im Anschluss sollte die Nukleotidsequenz von *bvgS_{BH}* vervollständig werden. Hierfür wurde ein chromosomaler *EcoRV*-Restriktionsverdau von chromosomaler DNA aus *B. holmesii* G7702 mit einem 373 bp großem *PvuI/NarI*-DNA-Fragment aus pUC19-*NarI*-Frag2 im Southernblot hybridisiert. Die Sonde hybridisierte mit einem ca. 4,0 kbp großem *EcoRV*-Fragment. *EcoRV*-DNA-Fragmente der Größe 3-6 kbp wurden, wie oben beschrieben, zur Erstellung einer „Mini-Genbank“ verwendet. Mit Hilfe des sich anschließenden Kolonieblots konnte wieder ein positiver Klon ermittelt werden. Das entsprechende Plasmid, pUC18-*EcoRV*-Frag4, wurde sequenziert. Auf diese Weise konnte zum einen die *bvgS_{BH}*-Sequenz in 5'-Richtung vervollständig werden, zum anderen konnte die Genomsequenz von *B. holmesii*

G7702 noch um 256 bp über das *bvgS_{BH}*-Stoppcodon hinaus erweitert werden. Allerdings zeigte dieser Bereich in anschließenden Analysen mit dem BLASTn- und BLASTx-Programm (Altschul *et al.*, 1990) keine Übereinstimmungen zu einer bekannten Nukleotid- oder Aminosäuresequenz.

- „Genome Walk“ Schritt 4:

Um genauere Aussagen darüber treffen zu können, welcher Leserahmen im Anschluss an den *bvgS_{BH}*-Leserahmen codiert wird, sollte der „Genome Walk“ noch weitergeführt werden. Hierfür wurde ein chromosomaler *XhoI*-Restriktionsverdau aus *B. holmesii* G7702 mit einem 294 bp großen *BamHI/NotI*-DNA-Fragment aus pUC18-*EcoRV*-Frag3 im Southernblot hybridisiert. Das DNA-Fragment hybridisierte dabei mit einem 706 bp großem *XhoI*-Fragment mit bereits bekannter Sequenz und einem ca. 3,9 kbp großem *XhoI*-Fragment mit unbekannter Sequenz. *XhoI*-DNA-Fragmente der Größe 2,5-4 kbp wurden wie oben beschrieben zur Erstellung einer „Mini-Genbank“ verwendet. Über einen Kolonieblot konnte ein positiver Klon ermittelt werden. Das entsprechende Plasmid pSK-*XhoI*-Frag4 wurde ansequenziert. Dabei wurde im speziellen die Sequenz eines 1323 bp großen DNA-Bereichs, der auf das *bvgS_{BH}*-Stoppcodon folgt, ermittelt und über BLASTx-Analysen untersucht. Allerdings konnte bislang keine Homologie zu einer bekannten DNA- oder Aminosäuresequenz festgestellt werden.

Die einzelnen Schritte des durchgeführten „Genome Walks“ sind in Abbildung 11 zusammengefasst. Die Nukleotidsequenz des 6531 bp großen Genomabschnittes aus *B. holmesii* G7702, „GW.seq“, ist in Abbildung 43 dem Anhang angefügt.

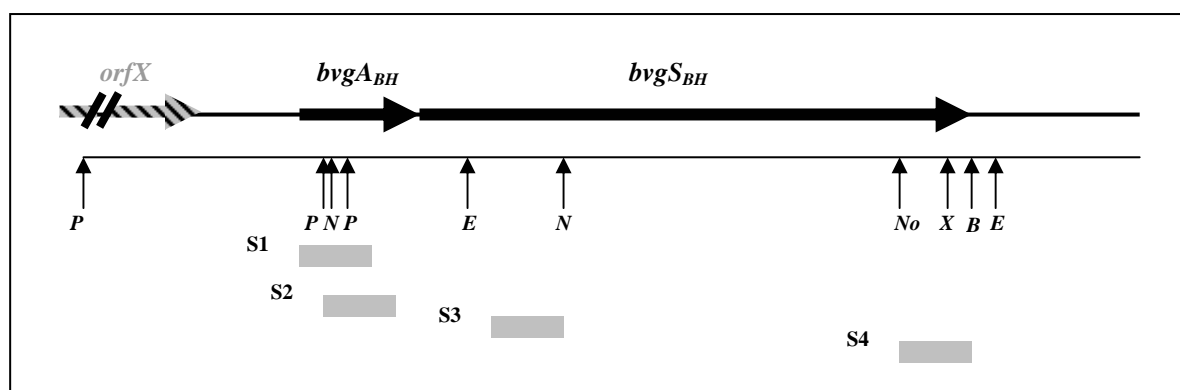


Abbildung 11: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte des „Genome Walks“.

Oben abgebildet ist eine schematische Darstellung der genetischen Anordnung von *bvgA_{BH}* und *bvgS_{BH}* sowie der stromaufwärts und stromabwärts gelegenen DNA-Bereiche. Darunter sind die für den „Genome Walk“ bedeutsamen Restriktionsschnittstellen innerhalb der Sequenz angegeben. *P* = *PstI*, *N* = *NarI*; *E* = *EcoRV*; *No* = *NotI*; *X* = *XbaI*; *B* = *BamHI*. Ebenso ist der Hybridisierungsbereich der eingesetzten Sonden (*S1*-*S4*) dargestellt. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3 Charakterisierung des BvgAS-Zwei-Komponentensystems von *B. holmesii* (BvgAS_{BH})

Das BvgAS-Zwei-Komponentensystem ist bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters für die koordinierte Expression der Virulenzgene verantwortlich. Über PCR-Analysen mit degenerierten Primern und anschließendem „Genome Walk“ konnte gezeigt werden, dass der *B. holmesii* Stamm-G7702 über ein *bvgA*- sowie ein *bvgS*-orthologes Gen verfügt. Da über die biologische Bedeutung des BvgAS_{BH}-Systems für *B. holmesii* noch nichts bekannt war, sollte dieses mit Hilfe der folgenden Experimente näher charakterisiert werden.

3.1 Ermittlung und Vergleich der *bvgA*_{BH}-Sequenzen der *B. holmesii*-Isolate G8341, No1 und ATCC51541

Mit einer Frequenz von 10^{-3} bis 10^{-7} können während der *in vitro*-Passage von *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* einzelne Klone beobachtet werden, die als Phasenvarianten bezeichnet werden und deren *bvgAS*-Sequenzen sich durch auffällige Variationen (wie z.B. Deletionen oder Frameshift Mutationen) von der der wildtypischen Isolate unterscheiden. Um zu untersuchen, ob die für *B. pertussis*- und *B. bronchiseptica*-Isolate beschriebene Metastabilität des *bvgAS*-Locus auch bei *B. holmesii* zu beobachten ist, wurde bei unterschiedlichen *B. holmesii*-Isolaten ein Sequenzbereich des *bvgAS*_{BH}-Locus ermittelt.

3.1.1 Bestimmung der *bvgA*_{BH}-Nukleotidsequenz aus *B. holmesii* G8341, No1 und ATCC51541

Zur Bestimmung der einzelnen *bvgA*_{BH}-Nukleotidsequenzen wurde mit dem Primerpaar *bvgAS*_{BH}F1-SpeI und *bvgAS*_{BH}F1-SphI sowie der „deep Vent“-DNA-Polymerase ein 2378 bp großes DNA-Fragment über eine PCR-Reaktion von der jeweiligen chromosomalen DNA amplifiziert. Die Primer ermöglichen die Amplifikation eines DNA-Fragments, das die *orfX*-*bvgA*_{BH}-intergenische Region, die codierende Region von *bvgA*_{BH} und einen ca. 1300 bp großen Bereich aus der *bvgS*_{BH}-Sequenz enthält. Das jeweilige PCR-Fragment wurde über ein angefügtes „A-tail“ in den pGEM-T-Vektor kloniert, wodurch die Plasmide pGEMT-F1_{BH} G8341, pGEMT-F1_{BH} No1 und pGEMT-F1_{BH} ATCC51541 entstanden. Die Nukleotidsequenzen wurden mit Hilfe des M13 Universal- bzw. M13 Reverse-Primers sowie sequenz-internen Primern bestimmt. Wie in der Abbildung 12 dargestellt, konnte über die anschließende Sequenzanalyse festgestellt werden, dass die Nukleotid- und damit auch die Aminosäuresequenz des Response-Regulators BvgA_{BH} aus *B. holmesii* G8341 zu 100 % mit der von *B. holmesii* G7702 übereinstimmt. Im Gegensatz dazu weicht die *bvgA*_{BH}-Nukleotidsequenz des *B. holmesii*-Referenzstammes ATCC51541 und des Isolates No1 an zwei identischen Positionen von der aus *B. holmesii* G7702 ab. Hierbei war zum einen eine G→A-Transition, zum anderen die Insertion eines Adenosinrestes zu beobachten. Die Insertion des Adenosin-restes hat, wie der Abbildung 12 zu entnehmen ist, eine Verschiebung des Leserahmens zur Folge und führt zu einem verfrühten Stoppcodon.

3.1.2 Westernblot Experimente zum Nachweis der BvgA_{BH}-Expression bei unterschiedlichen *B. holmesii*-Isolaten

Um nachzuweisen, dass die Insertion des Adenosinrestes innerhalb der *bvgA*_{BH}-Sequenz von *B. holmesii* ATCC51541 und No1 tatsächlich zu einer Verschiebung des Leserahmens führt

und dass es demzufolge zu einer fehlenden Expression des intakten Response-Regulators kommt, wurden Westernblot-Experimente durchgeführt.

Hierfür wurden die einzelnen Stämme auf BG-Blutplatten ausgestrichen. Nach 72 Stunden wurde jeweils eine Impföse voll Bakterien in 1 ml 1x PBS resuspendiert und die einzelnen Proben auf eine Zellzahl von $2,4 \cdot 10^9$ eingestellt. Anschließend wurden die Proteinlysate nach Auftrennung in einem 12%igen Polyacrylamidgel und Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit einem Bvg_{A_{BH}} spezifischen polyklonalen Antiserum inkubiert wurden. Wie in der Abbildung 13 dargestellt, konnte die Expression des Response-Regulators Bvg_{A_{BH}} in der Tat nur bei den *B. holmesii*-Stämmen G7702 und G8341, nicht aber bei dem *B. holmesii*-Referenzstamm ATCC51541 sowie *B. holmesii* No1 nachgewiesen werden.

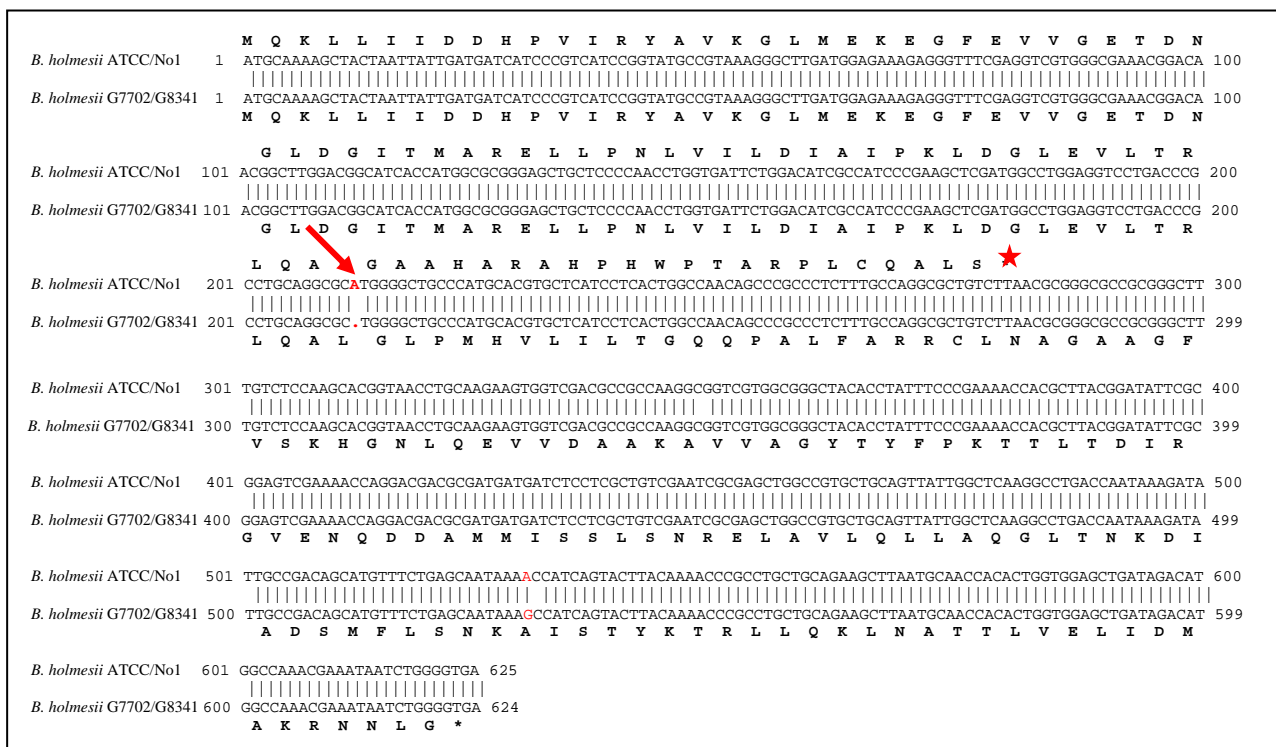
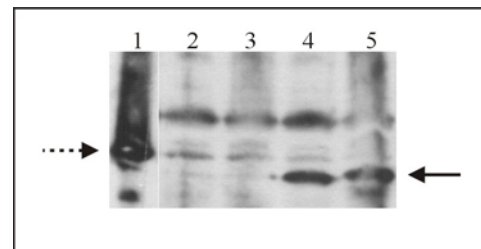


Abbildung 12: DNA- und Aminosäuresequenz des Response-Regulators Bvg_{A_{BH}} aus *B. holmesii* ATCC51541, No1, G7702 und G8341.

Der rote Pfeil und das rot markierte A (Adenosin) kennzeichnen die Position der Punktmutation innerhalb der *bvgA_{BH}*-Sequenz von *B. holmesii* ATCC51541 und No1, die zur Frameshift-Mutation führt. Der rote Stern innerhalb der Bvg_{A_{BH}}-Sequenz von *B. holmesii* ATCC51541 und No1 markiert das verfrühte Stoppcodon.

Abbildung 13: Westernblot-Experiment zum Nachweis der Bvg_{A_{BH}}-Expression bei unterschiedlichen *B. holmesii*-Isolaten.

SDS-PAGE-Proben der *B. holmesii*-Lysate wurden auf eine Nitrocellulosemembran geblotet und mit Bvg_{A_{BH}}-spezifischem Antiserum inkubiert. His₆-Bvg_{A_{BH}} (siehe 3.4) (Spur1), *B. holmesii* No1 (Spur2), *B. holmesii* ATCC51541 (Spur3), *B. holmesii* G7702 (Spur4), *B. holmesii* G8341 (Spur5). Der durchgezogene Pfeil markiert die Bande, die dem ca. 23 kDa großen Response-Regulator Bvg_{A_{BH}} entspricht, der unterbrochene Pfeil markiert die Bande, die dem ca. 24 kDa großen His₆-Bvg_{A_{BH}}-Fusionsprotein entspricht.



3.2 Konstruktion einer *bvgA_{BH}*-Insertionsmutante von *B. holmesii* G7702 (*B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan*)

Um einen Hinweis darauf zu bekommen, welche biologische Bedeutung die Expression des Response-Regulators BvgA_{BH} für *B. holmesii* G7702 hat, wurde die *bvgA_{BH}*-Insertionsmutante *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* hergestellt.

Zur Insertion einer Kanamycin-Kassette in die *bvgA_{BH}*-Sequenz von *B. holmesii* G7702 wurde zunächst das Plasmid pSORTP1-*bvgA_{BH}*-*kan^R* konstruiert. Mit den Oligonukleotiden *bvgA_{BH}*-*kan^R*⁵ und *bvgA_{BH}*-*kan^R*³ wurde hierfür ein 1811 bp großes DNA-Fragment von chromosomaler DNA aus *B. holmesii* G7702 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde nach einem *Bam*HI-Restriktionsverdau in den pACYC184-Vektor kloniert, wodurch das Plasmid pACYC184-*bvgA_{BH}* entstand. Das Plasmid wurde dann mit *Pst*I verdaut, womit es zum einen linearisiert, zum anderen, da die *bvgA_{BH}*-Sequenz insgesamt drei interne *Pst*I-Schnittstellen besitzt, ein 353 bp großer Bereich aus der *bvgA_{BH}*-Sequenz deletiert wurde. In das somit mit *Pst*I linearisierte Plasmid wurde im Anschluss eine 1240 bp große Kanamycin-Kassette (*kan^R*) ligiert, die zuvor über einen *Pst*I-Verdau aus dem Plasmid pUC4K isoliert wurde. Hierüber entstand das Plasmid pACYC184-*bvgA_{BH}*-*kan^R*. Das 2698 bp große *bvgA_{BH}*-*kan^R*-Konstrukt wurde dann über einen *Bam*HI-Verdau in den pSORTP1-Vektor umkloniert, wodurch das Plasmid pSORTP1-*bvgA_{BH}*-*kan^R* entstand. Das Plasmid pSORTP1-*bvgA_{BH}*-*kan^R* wurde dann mit Hilfe des Donorstammes *E. coli* SM10 in *B. holmesii* G7702 konjugiert. Die Abbildung 14 zeigt eine schematische Darstellung der Rekombinationsereignisse.

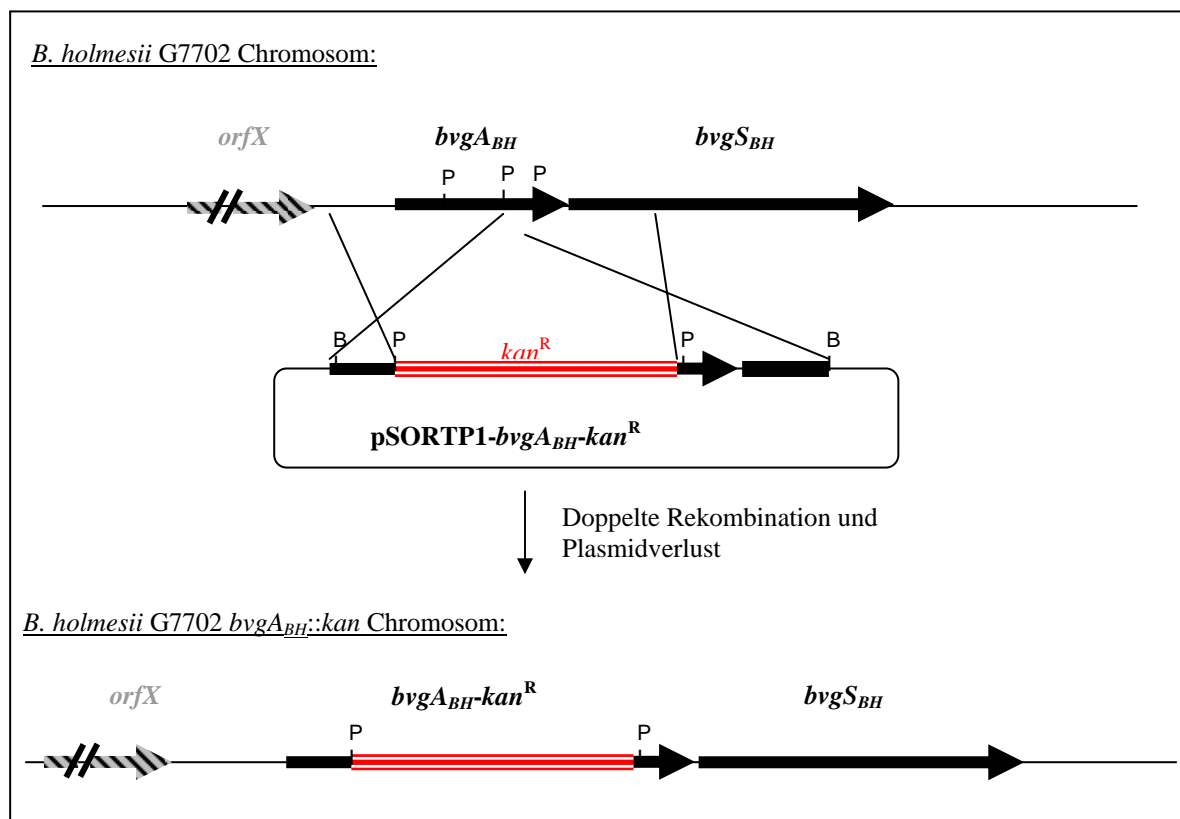


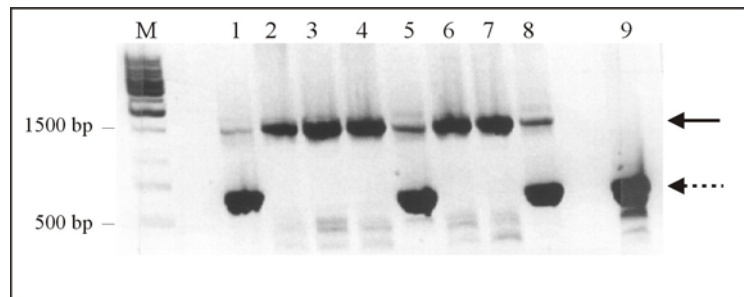
Abbildung 14: Schematische Darstellung des Rekombinationsereignisses.

Das Plasmid pSORTP1-*bvgA_{BH}*-*kan^R* wurde in *B. holmesii* G7702 konjugiert. Dabei wurde durch doppelte Rekombination die *bvgA_{BH}*-Sequenz durch *bvgA_{BH}*-*kan^R* ersetzt. Die *Pst*I-Restriktionsschnittstellen innerhalb der *bvgA_{BH}*-Sequenz sowie die *Bam*HI- und *Pst*I-Restriktionsschnittstellen in dem *bvgA_{BH}*-*kan^R*-Konstrukt sind angegeben. Die Rekombinationsorte sind durch überkreuzte Striche gekennzeichnet.

Die Selektion der *B. holmesii*-Konjuganten erfolgte auf BG-Blutplatten mit Streptomycin und Kanamycin. Acht Klone wurden zunächst daraufhin überprüft, ob lediglich eine Integration des Plasmids in das Chromosom stattgefunden hatte oder ob es durch ein „second-cross-over“-Ereignis wieder eliminiert und das *bvgA_{BH}-kan^R*-Konstrukt anstelle der intakten *bvgA_{BH}*-Sequenz in das Genom integriert wurde. Hierfür wurde mit Hilfe der Oligonukleotide *bvgA_{BH}*-BamHI und *bvgA_{BH}*-KpnI eine PCR-Analyse durchgeführt. Bei Klonen, bei denen lediglich ein „single-cross-over“ stattgefunden hat, war neben dem wildtypischen 647 bp großen PCR-Fragment noch ein 1534 bp großes PCR-Fragment zu erwarten. Bei Klonen, bei denen das Plasmid durch ein „second-cross-over“-Ereignis wieder eliminiert und die *bvgA_{BH}*-Sequenz somit durch die *bvgA_{BH}-kan^R*-Sequenz ersetzt wurde, war nur das 1534 bp große PCR-Fragment zu erwarten. Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, zeigten drei Klone ein Bandenmuster, das nach einem „single-cross-over“-Ereignis zu erwarten ist, während bei fünf Klonen nur das 1534 bp große PCR-Fragment nachgewiesen werden konnte. In einem sich anschließenden Westernblot-Experiment wurden zwei der fünf positiven Klone auf ihre *BvgA_{BH}*-Expression hin überprüft. Wie in Abbildung 16 zu erkennen ist, zeigen die hier untersuchten Klone, *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* Klon 2 und Klon 3, keine Expression des Response-Regulators *BvgA_{BH}*. Der *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* Klon 2, der im folgenden als *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kann* bezeichnet wird, wurde für weitere Experimente eingesetzt (siehe auch 3.8.3.2 und 3.8.3.3).

Abbildung 15: PCR-Analyse der *B. holmesii* G7702-Konjuganden und des *B. holmesii* G7702-Wildtyps mit den Oligonukleotiden *bvgA_{BH}*-BamHI und *bvgA_{BH}*-KpnI .

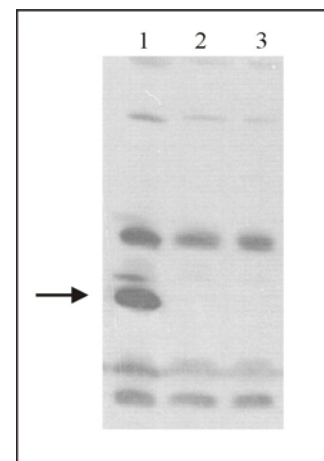
Aliquots der PCR-Ansätze wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. In Spur 1- 8 wurden die PCR-Ansätze der Konjuganden 1-8, in Spur 9 der PCR-Ansatz des *B. holmesii*-G7702



Wildtyp-Stammes aufgetragen. Der unterbrochene Pfeil markiert das PCR-Fragment, das sich von der wildtypischen *bvgA_{BH}*-Sequenz ableitet, der durchgezogene Pfeil markiert das PCR-Produkt, das sich von dem *bvgA_{BH}-kan^R*-Konstrukt ableitet. In Spur 1, 5 und 8 (entspricht Klon 1, 5 und 8) deutet das Bandenmuster auf ein „single-cross-over“-Ereignis hin, während in Spur 2, 3, 4, 6, und 7 (entspricht Klon 2, 3, 4, 6 und 7) das nach einem „second-cross-over“-Ereignis zu erwartende PCR-Fragment zu erkennen ist.

Abbildung 16: Westernblot-Experiment zur Überprüfung der *BvgA_{BH}*-Expression.

B. holmesii G7702 (Spur1), *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* Klon 2 (Spur2) und *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* Klon 3 (Spur3). SDS-PAGE-Proben der einzelnen *B. holmesii*-Lysate wurden auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit *BvgA_{BH}*-spezifischem Antiserum inkubiert. Der Pfeil markiert die Bande, die dem Response-Regulator *BvgA_{BH}* entspricht.



3.3 Phänotypische und physiologische Charakterisierung der *bvgA_{BH}*-Insertionsmutante *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan*, der wildtypischen *B. holmesii*-Stämme G7702 und G8341 sowie der Phasenvarianten *B. holmesii*-Stämme ATCC51541 und No1

Wie in den Abbildung 13 und 16 zu entnehmen, ist die *bvgA_{BH}*-Insertionsmutante *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* ähnlich wie die Phasenvarianten *B. holmesii*-Stämme No1 und ATCC51541 nicht in der Lage den intakten Response-Regulator zu exprimieren. Um zu untersuchen, ob dies eine direkte Auswirkung auf phänotypische bzw. physiologische Merkmale hat, wurden die einzelnen *B. holmesii*-Stämme näher charakterisiert.

Da *B. holmesii*-Stämme in Flüssigmedien im allgemeinen nur sehr schwer über eine OD_{600nm} von 0,3-0,4 hinaus angezogen werden können, konnten von den wildtypischen *B. holmesii* G7702- und G8341-Stämmen, der *BvgA_{BH}*-Mutante *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* sowie den Phasenvarianten *B. holmesii*-Stämmen ATCC51541 und No1 keine reproduzierbaren Wachstumskurven erstellt werden. Um dennoch einen Hinweis darauf zu bekommen, ob die Expression des Response-Regulators *BvgA_{BH}* für die Kultivierung von *B. holmesii* von Bedeutung ist, wurde das Wachstumsverhalten der einzelnen Stämme auf BG-Blutagarplatten analysiert. Für alle untersuchten *B. holmesii*-Stämme konnte erst nach einer dreitägigen Inkubation der Platten bei 37°C Einzelkolonien beobachtet werden, wobei diese hinsichtlich ihrer Koloniemorphologie, der Pigmentierung und der hämolytischen Aktivität nicht voneinander zu unterscheiden waren. Die *bvgA_{BH}*-Knock-out-Mutante und die Phasenvarianten Stämme zeigen demnach auf BG-Blutagarplatten ein mit den wildtypischen *B. holmesii*-Stämmen vergleichbares Wachstum. Da Phasenvariante *B. pertussis*-Stämme aufgrund ihrer erhöhten Erythromycinresistenz und ihrem Unvermögen, den Farbstoff Kongo-Rot zu binden, sehr leicht von den wildtypischen Stämmen unterschieden werden können, wurde überprüft, ob es möglich ist, die Phasenvarianten *B. holmesii*-Stämme mit Hilfe dieser physiologischen Kriterien von den wildtypischen Stämmen zu differenzieren. Hierzu wurden die einzelnen *B. holmesii*-Stämme sowie der wildtypische *B. pertussis*-Stamm TI und die Phasenvariante *B. pertussis* 359 zunächst auf sterilen Membranfiltern (Whatman, Cellulosenitrat, 0,45 µm) ausgestrichen, die dann zur Kultivierung auf Kongo-Rot-haltigen Blutagarplatten (0,01%) gelegt wurden. Während auf diese Weise der Phasenvarianten *B. pertussis*-Stamm 359 aufgrund seiner farblosen Kolonien sehr leicht von den rotgefärbten Kolonien des wildtypischen *B. pertussis*- Stammes TI zu unterscheiden war, bildeten alle hier untersuchten *B. holmesii* Stämme auf dem Kongo-Rot-haltigen BG-Blutagarplatten farblose Kolonien aus. Ebenso konnten durch einen auf BG-Blutagarplatten durchgeführten Erythromycin-Diffusions-Assay keine Hinweise auf eine erhöhte Erythromycinresistenz der Phasenvarianten *B. holmesii*-Stämme und der *bvgA_{BH}*-Insertionsmutante festgestellt werden. Somit konnten hinsichtlich der hier untersuchten phänotypischen und physiologischen Kriterien keinerlei Unterschiede zwischen den wildtypischen *B. holmesii*-Stämmen G7702, G8341, den Phasenvarianten Stämmen No1, ATCC51541 und der *bvgA_{BH}*-Insertionsmutante *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* festgestellt werden.

3.4 Klonierung des *BvgAS_{BH}*-Zwei-Komponentensystems aus *B. holmesii* G7702 und ATCC51541

Für eine sich anschließende funktionelle Charakterisierung des *BvgAS_{BH}*-Zwei-Komponentensystems aus *B. holmesii* war es notwendig, den *bvgAS_{BH}*-Locus aus *B. holmesii* G7702 und *B. holmesii* ATCC51541 in unterschiedliche Vektoren zu klonieren. Bei dem *B. holmesii*-Referenzstamm ATCC51541 handelt es sich, wie in Abschnitt 3.1 erläutert wurde, um eine Phasenvariante, welche aufgrund einer Frameshift-Mutation innerhalb des

bvgA_{BH} Gens nicht in der Lage ist, den intakten Response-Regulator BvgA zu exprimieren. Da in der 444 bp großen intergenischen Region von *orfX* und *bvgA_{BH}* der für den *bvgAS_{BH}*-Locus relevante Promotor vermutet wurde, wurde dieser Bereich in die Klonierung miteinbezogen. Die einzelnen Klonierungsschritte sind im folgenden beschrieben und in der Abbildung 17 schematisch dargestellt.

- Klonierung von pSL1180-*bvgAS_{BH}*_{G7702} und pSL1180-*bvgAS_{BH}*_{ATCC51541}

Ein 4728 bp großes DNA-Fragment, das sich aus der *orfX-bvgA_{BH}*-intergenischen Region und dem *bvgA_{BH}/bvgS_{BH}*-Genpaar zusammensetzt, wurde ausgehend von drei getrennten PCR-Reaktionen in Form dreier getrennter PCR-Fragmente amplifiziert und anschließend über die in der Sequenz natürlich vorkommenden *SphI*- und *KpnI*-Schnittstellen miteinander ligiert.

Das 2378 bp große PCR-Fragment 1 wurde mit den Oligonukleotiden *bvgAS_{BH}F1-SpeI* und *bvgAS_{BH}F1-SphI* von chromosomaler DNA aus *B. holmesii* G7702 und ATCC51541 amplifiziert. Über diese PCR-Reaktion wurde an das 5'-Ende des PCR-Fragments eine *SpeI*-Schnittstelle angefügt. Das gereinigte PCR-Produkt wurde mit *SpeI* und *SphI* verdaut. Das 1092 bp große PCR-Fragment 2 wurde mit den Oligonukleotiden *bvgAS_{BH}F2-SphI* und *bvgAS_{BH}F2-KpnI* von chromosomaler DNA aus *B. holmesii* G7702 und ATCC51541 amplifiziert. Das gereinigte PCR-Produkt wurde mit *SphI* und *KpnI* verdaut. Das 1300 bp große PCR-Fragment 3 wurde mit den Oligonukleotiden *bvgAS_{BH}F3-KpnI* und *bvgAS_{BH}F3-EcoRI* von chromosomaler DNA aus *B. holmesii* G7702 und ATCC51541 amplifiziert. Das gereinigte PCR-Produkt wurde mit *KpnI* und *EcoRI* verdaut. Die mit den entsprechenden Restriktionsenzymen behandelten PCR-Fragmente 1 (nach dem Verdau 2369 bp) und 2 (nach dem Verdau 1080 bp) wurden zunächst in den mit *SpeI* und *KpnI* linearisierten pSK-Vektor kloniert. Das Plasmid pSK-F1+F2 wurde dann mit *SpeI* und *KpnI* verdaut und das 3449 bp große DNA-Fragment 1+2 über ein 0,7%iges Agarosegel elektrophoretisch von dem pSK-Vektor abgetrennt. Das isolierte DNA-Fragment F1+F2 wurde im Anschluss zusammen mit dem verdauten PCR-Fragment 3 (nach dem Verdau 1289 bp) in den mit *SpeI* und *EcoRI* linearisierten pSL1180-Vektor kloniert. Die Sequenz der Plasmide pSL1180-*bvgAS_{BH}*_{G7702} und pSL1180-*bvgAS_{BH}*_{ATCC51541} wurde mit dem Primer M13-Universal und M13-Reverse sowie sequenzinternen Primern überprüft.

- Klonierung von pRK415-*bvgAS_{BH}*_{G7702} und pRK415-*bvgAS_{BH}*_{ATCC51541}

Um das *BvgAS_{BH}*-Zwei-Komponentensystem von *B. holmesii* in unterschiedlichen *Bordetella*-Stämmen exprimieren zu können, wurden die Plasmide pRK415-*bvgAS_{BH}*_{G7702} und pRK415-*bvgAS_{BH}*_{ATCC51541} hergestellt. Der pRK415-Vektor ist ein „broad host range“-Vektor, der auch in Bordetellen replizieren kann. Um den *bvgAS_{BH}*-Locus in den pRK415-Vektor klonieren zu können, musste zunächst an das 5'-Ende der Sequenz eine *XbaI*-Schnittstelle angefügt werden. Hierfür wurde über eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden *bvgA_{BH}F1*-XbaI* und *bvgA_{BH}F1*-HindIII* und dem Plasmid pSL1180-*bvgAS_{BH}*_{G7702} bzw. pSL1180-*bvgAS_{BH}*_{ATCC51541} ein 1024 bp großes DNA-Fragment 1* amplifiziert. Das gereinigte PCR-Produkt wurde mit *XbaI* und *HindIII* verdaut. Das Plasmid pSL1180-*bvgAS_{BH}*_{G7702} bzw. _{ATCC51541} wurde mit *HindIII* und *EcoRI* verdaut und das 3717 bp große DNA-Fragment über ein 0,7%iges Agarosegel elektrophoretisch von der restlichen Plasmid-DNA abgetrennt. Dieses DNA-Fragment wurde dann zusammen mit dem verdautem PCR-Fragment 1* (nach dem Verdau 1011 bp) in den mit *XbaI* und *EcoRI* linearisierten pUC18-Vektor zwischenkloniert. Die Sequenz der Plasmide pUC18-*bvgAS_{BH}*_{G7702} bzw. pUC18-*bvgAS_{BH}*_{ATCC51541} wurde, wie oben bereits beschrieben, überprüft. Über einen *XbaI/EcoRI*-Verdau und eine sich anschließende Gelelektrophorese konnte dann das 4728 bp

große DNA-Fragment in den mit *XbaI* und *EcoRI* linearisierten pRK415-Vektor umkloniert werden.

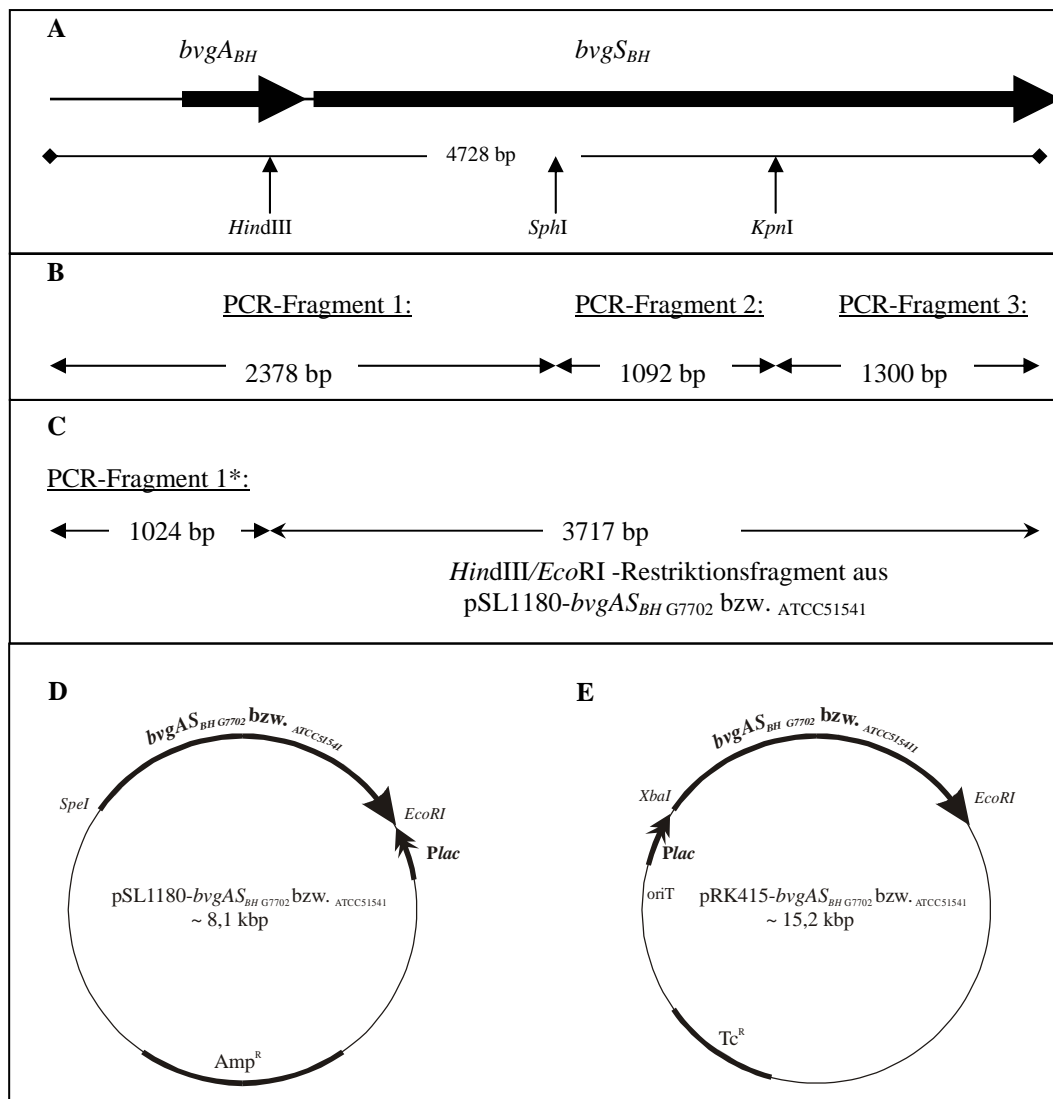


Abbildung 17 : Klonierung des BvgAS_{BH}-Zwei-Komponentensystems von *B. holmesii* G7702 und ATCC51541.

A: Schematische Darstellung des 4728 bp großen DNA-Fragments mit der *orfX-bvgA_{BH}*-intergenischen Region und dem *bvgA_{BH}/bvgS_{BH}*-Genpaar. Die Positionen der für diese Klonierungen relevanten Restriktionsschnittstellen *SphI*, *HindIII* und *KpnI* sind in der Sequenz gekennzeichnet.

B: Klonierungsstrategie für pSL1180-*bvgAS_{BH}* G7702 bzw. pSL1180-*bvgAS_{BH}* ATCC51541.

Das 4728 bp große DNA-Fragment wurde ausgehend von drei getrennten PCR-Reaktionen als drei einzelne PCR-Fragmente amplifiziert und anschließend über die nativen Restriktionsschnittstellen *SphI* und *KpnI* sowie über die durch die PCR-Reaktionen angefügten Schnittstellen *SpeI* und *EcoRI* in den pSL1180-Vektor kloniert.

C: Klonierungsstrategie für pRK415-*bvgAS_{BH}* G7702 bzw. pRK415-*bvgAS_{BH}* ATCC51541.

Hierfür wurde das 3717 bp große *HindIII/EcoRI*-Restriktionsfragment aus pSL1180-*bvgAS_{BH}* G7702 bzw. pSL1180-*bvgAS_{BH}* ATCC51541 zusammen mit dem PCR-Fragment 1* in den pRK415-Vektor kloniert.

D: Schematische Darstellung von pSL1180-*bvgAS_{BH}* G7702 bzw. pSL1180-*bvgAS_{BH}* ATCC51541.

Der Pfeil gibt die Orientierung des vektoreigenen *lac*-Promotors an. Amp^R = Ampicillinresistenz.

E: Schematische Darstellung von pRK415-*bvgAS_{BH}* G7702 bzw. pRK415-*bvgAS_{BH}* ATCC51541.

Der Pfeil gibt die Orientierung des vektoreigenen *lac*-Promotors an. Tc^R = Tetracyclinresistenz, oriT = „Ori of transfer“.

3.5 Überexpression und Reinigung des Response-Regulators Bvg_{A_{BH}}

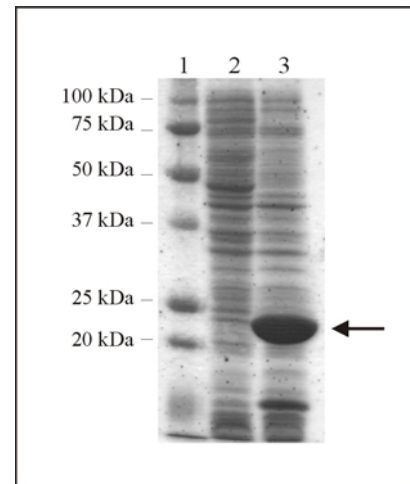
Um in späteren Experimenten die biologische Aktivität des Response-Regulators Bvg_{A_{BH}} untersuchen zu können, wurde das Protein als N-terminales His₆-Fusionsprotein aufgereinigt.

3.5.1 Konstruktion von pQE30-*bvgA_{BH}* und Überexpression des entsprechenden His₆-Fusionsproteins

Ein DNA-Fragment, das dem kompletten *bvgA_{BH}*-Gen aus *B. holmesii* G7702 entspricht, wurde mit den Oligonukleotiden Bvg_{A_{BH}}-BamHI und Bvg_{A_{BH}}-KpnI von chromosomaler DNA aus *B. holmesii* G7702 amplifiziert. Über diese PCR-Reaktion wurde am 5'-Ende des PCR-Produkts eine BamHI- und am 3'-Ende eine KpnI-Schnittstelle angefügt. Das PCR-Produkt wurden dann über seine BamHI/KpnI-Schnittstellen in den pQE30-Vektor ligiert und der Ligationsansatz in *E. coli* M15 (pRep)-Zellen transformiert. Bei einem positiven Klon wurde das in pQE30 klonierte DNA-Fragment mit den Primern M13-Universal und M13-Reverse sequenziert um sicherzustellen, dass die Gensequenz keine durch die PCR-Reaktion bedingte Frameshift-Mutation aufweist. Im Anschluss wurde die Fähigkeit von *E. coli* M15 (pRep) (pQE30-*bvgA_{BH}*)-Zellen zur Überproduktion des His₆-Bvg_{A_{BH}}-Fusionsproteins überprüft. Die Abbildung 18 zeigt das Ergebnis der IPTG-Induktion von *E. coli* M15 (pRep) (pQE30-*bvgA_{BH}*)-Zellen, wobei die Überexpression des Fusionsproteins deutlich zu erkennen ist, und das Laufverhalten des Fusionsproteins seiner theoretischen Größe von ca. 24 kDa entspricht.

Abbildung 18: Überprüfung der Fähigkeit von *E. coli* M15 (pRep) (pQE30-*bvgA_{BH}*)-Zellen zur Überproduktion des Response-Regulators Bvg_{A_{BH}} aus *B. holmesii* G7702.

30 µl des jeweiligen Proteinlysats wurden auf einem 15%igen Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteine wurden durch Coomassie-Färbung dargestellt. Proteinmarker „BioRad Precision Protein Standard, Prestained“ (Spur1), *E. coli* M15 (pRep) (pQE30-*bvgA_{BH}*) nicht induziert (Spur2), *E. coli* M15 (pRep) (pQE30-*bvgA_{BH}*) durch 1 mM IPTG induziert (Spur3). Der Pfeil markiert die Bande, die dem ca. 24 kDa großen His₆-Bvg_{A_{BH}}-Fusionsprotein entspricht.



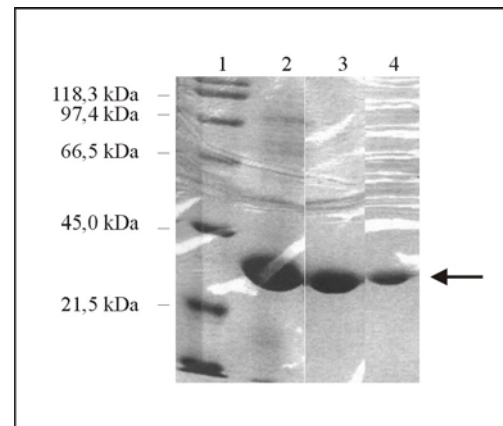
3.5.2 Aufreinigung des Fusionsproteins His₆-Bvg_{A_{BH}}

Die Reinigung des Fusionsproteins His₆-Bvg_{A_{BH}} erfolgte über eine Ni-NTA-Agarosesäule. Die Überexpressionskultur bestand aus zwei Litern LB-Medium, das mit einer Übernachtskultur von *E. coli* M15 (pRep) (pQE30-*bvgA_{BH}*) angeimpft wurde. Die Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen und die Überexpression durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die Zellen wurden im Anschluss für drei Stunden weiter inkubiert und geerntet. Nach dem Zellaufschluss durch die French-Press sowie einem Zentrifugationsschritt wurde untersucht, ob das Protein im Überstand (d.h. löslich) oder im Pellet (d.h. unlöslich) vorliegt. Das Fusionsprotein His₆-Bvg_{A_{BH}} lag löslich im Überstand vor und konnte somit direkt auf die equilibrierte Säule aufgetragen werden. Die Elution des Proteins von der Säule erfolgte über einen Imidazol-Gradienten (20 ml). Im Anschluss wurde die Säule nochmals mit 20 ml Elutions-Puffer gewaschen um sicherzustellen, dass das Protein vollständig von der Säule eluiert wurde. Das Eluat wurde in Fraktionen gesammelt und jede zweite Fraktion auf ein 15%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Fraktionen 28-34 („His₆-Bvg_{A_{BH}}1“) erwiesen sich als besonders rein und zeigten kaum Verunreinigungen mit anderen

Proteinen. Im weiteren wurden die Fraktionen 20-24 („His₆-BvgA_{BH2}“) mit mittleren Verunreinigungen und die Fraktionen 14-19 („His₆-BvgA_{BH3}“) mit stärkeren Verunreinigungen vereinigt. Die einzelnen Proteinlösungen wurden dann gegen Basispuffer mit 20% Glycerin dialysiert und im Anschluss auf ein 15%iges Polyacrylamidgel aufgetragen (siehe Abbildung 19). Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde die Fraktion His₆-BvgA_{BH1} verwendet.

Abbildung 19: Das gereinigte His₆-BvgA_{BH}-Fusionsprotein.

Gezeigt sind die vereinigten Proteinfractionen nach Dialyse und nach Auftrennung über ein 15%iges Polyacrylamidgel mit anschließender Coomassie-Färbung. Der Pfeil markiert die Banden, die dem ca. 24 kDa großen His₆-BvgA_{BH}-Fusionsprotein entspricht.



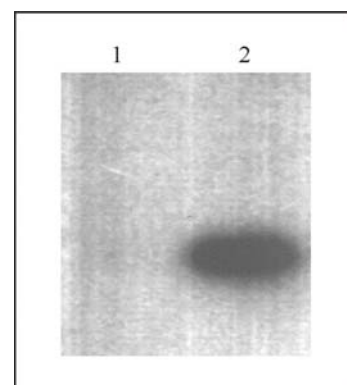
3.6 *in vitro*-Phosphorylierung des Response-Regulators BvgA_{BH} durch Acetylphosphat

In vitro kann die phosphorylierte Form eines Response-Regulators meist auch unabhängig von der zugehörigen Histidinkinase durch die Inkubation mit niedermolekularen Phosphat-Donatoren erreicht werden. So kann zum Beispiel der Response-Regulator BvgA von *B. pertussis* in Anwesenheit von Acetylphosphat die eigene Phosphorylierung katalysieren und so seine Output-Domäne aktivieren (Perraud et al., 2000). Um zu untersuchen, ob Acetylphosphat ebenso für den Response-Regulator BvgA_{BH} aus *B. holmesii* als Phosphat-Donatoren dienen kann, wurden von Andreas Bock *in vitro*-Phosphorylierungsassays mit dem His₆-BvgA_{BH}-Fusionsprotein (siehe Abschnitt 3.5) und P³²-Acetylphosphat (6000Ci/mmol; NEN Life Science Products) durchgeführt. Die Abbildung 20 zeigt das Ergebnis.

Für den Response-Regulator BvgA_{BH} aus *B. holmesii* konnte hierüber eine acetylphosphatabhängige Phosphorylierung gezeigt werden. Dies bedeutet, dass *in vitro* die phosphorylierte Form von BvgA_{BH} unabhängig von einer Kinase allein durch die Inkubation mit dem Phosphat-Donator Acetylphosphat erreicht werden kann. Die Effizienz dieser *in vitro*-Phosphorylierung entspricht dabei in etwa der Effizienz, die bei einer *in vitro*-Phosphorylierung von BvgA aus *B. pertussis* durch Acetylphosphat beobachtet wird (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 20: Phosphorylierung von His₆-BvgA_{BH} durch Acetylphosphat.

405 pmol Regulator wurden ohne (Spur1) bzw. mit P³²-Acetylphosphat (18,5 nM) (Spur2) 30 min bei 30°C inkubiert. Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm nach der Gelelektrophorese.



3.7 Versuche zur Analyse der funktionellen Konservierung der BvgAS-Systeme von *B. holmesii* (BvgAS_{BH}) und *B. pertussis* (BvgAS)

Das BvgAS-System ist bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters hoch konserviert. Dies äußert sich nicht nur in dem hohen Ausmaß der Sequenzkonservierung, sondern auch darin, dass das BvgAS-System in seiner Funktion sehr stark konserviert ist. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass phasenvariante *B. pertussis*-Stämme durch den *bvgAS*-Locus aus *B. bronchiseptica* komplementiert werden können.

Über *in silico*-Analysen sollte zunächst das Ausmaß der Sequenzkonservierung zwischen dem *bvgAS*-Locus von *B. holmesii* und *B. pertussis* näher bestimmt werden. Der *bvgAS*-Locus von *B. holmesii* wird im folgendem zur Unterscheidung von dem *bvgAS*-Locus aus *B. pertussis* durch ein tiefgestelltes „BH“ gekennzeichnet (*bvgAS*_{BH}). Dies gilt auch für die Bezeichnungen *bvgA*_{BH}, *bvgS*_{BH}, BvgA_{BH} und BvgS_{BH}. Zudem sollte untersucht werden, ob das BvgAS_{BH}- bzw. BvgA-System zwischen *B. holmesii* und *B. pertussis* ausgetauscht werden kann und ob es *in vivo* bzw. *in vitro* die Funktion des wildtypischen Systems übernehmen kann.

3.7.1 Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenz des BvgAS-Systems von *B. holmesii* (BvgAS_{BH}) und *B. pertussis* (BvgAS)

Die prozentualen Übereinstimmungen zwischen der Nukleotid- und Aminosäuresequenz des BvgAS-Systems aus *B. holmesii* (BvgAS_{BH}) und *B. pertussis* (BvgAS) wurden über ein Sequenzalignment mit dem BESTFIT-Programm (Altschul *et al.*, 1997) ermittelt (siehe Tabelle 3).

	BvgA _{BH} und BvgA	BvgS _{BH} und BvgS
Prozent identischer Nukleotide in der Nukleotidsequenz von:	72,7%	59,9%
Prozent identischer Aminosäuren in der translatierten Sequenz von:	76,0%	46,8%

Tabelle 3: Prozent identischer Nukleotide und Aminosäuren in der Nukleotid- und Aminosäuresequenz der Response-Regulatoren BvgA und der Histidinkinasen BvgS aus *B. holmesii* (BvgA_{BH} und BvgS_{BH}) und *B. pertussis* (BvgA und BvgS).

Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuresequenzen der Response-Regulatoren BvgA_{BH} und BvgA zu 76,0% übereinstimmen, während die Übereinstimmung zwischen den entsprechenden Nukleotidsequenzen lediglich 72,7% beträgt. Wie man aus dem Alignment der beiden Aminosäuresequenzen in Abbildung 21 entnehmen kann, sind dabei die Proteinsequenzen im Bereich der Receiver- und der Output-Domäne besonders stark konserviert. Im Gegensatz dazu zeigt der über Massenspektroskopie identifizierte, sogenannte Linkerbereich (Bantscheff *et al.*, 2000) eine hohe Sequenzvariabilität. Die prozentuale Übereinstimmung für die Histidinkinasen BvgS aus *B. pertussis* und BvgS_{BH} aus *B. holmesii* beträgt in den Nukleotidsequenzen 59,9% und in den Aminosäuresequenz 46,8%. Besonders bemerkenswert ist dabei, dass die Aminosäuresequenzen des cytoplasmatischen Teils der Histidinkinasen und somit der Bereich, indem die Autophosphorylierung und der Phosphorelay stattfinden zu 52,9% übereinstimmen, während die Sequenzen des periplasmatischen Teils, der für die Signalwahrnehmung verantwortlich gemacht wird, nur zu 39,5% übereinstimmen (siehe Abbildung 22 und Tabelle 4 im Abschnitt Diskussion).

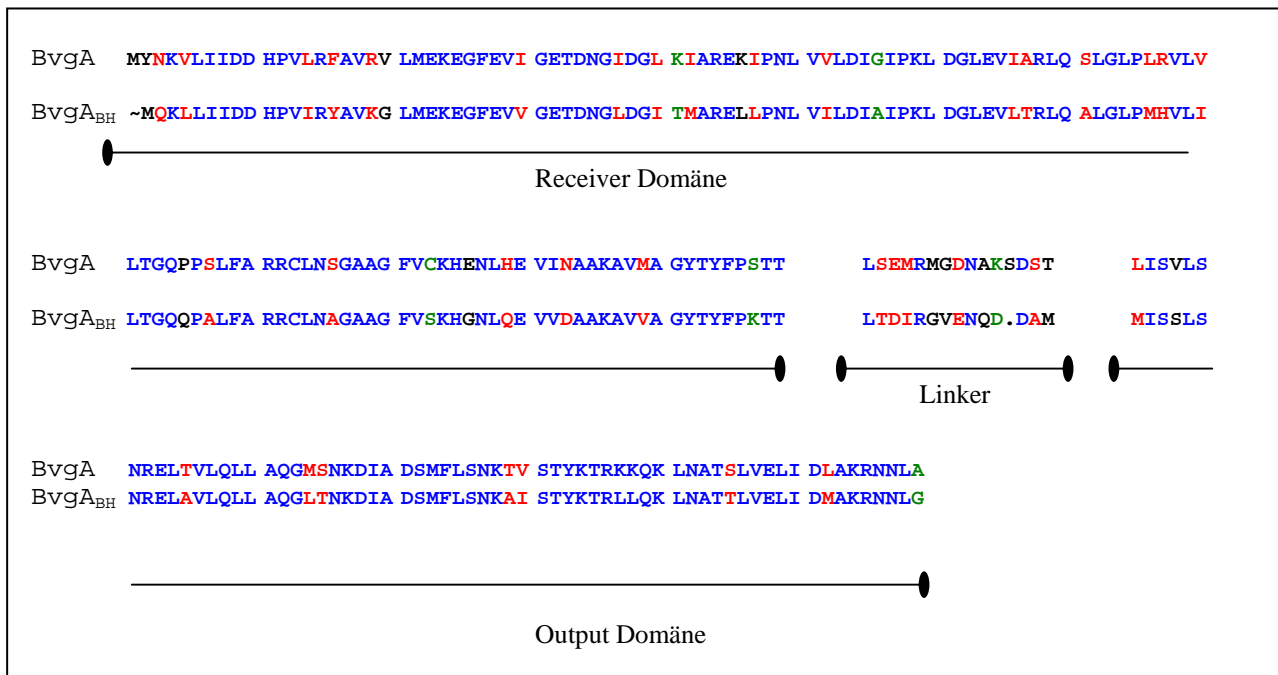


Abbildung 21: Alignment der Aminosäuresequenzen der Response-Regulatoren aus *B. pertussis* (BvgA) und *B. holmesii* (BvgA_{BH}).

Blau markierte Buchstaben kennzeichnen identische Aminosäuren, rot markierte Buchstaben kennzeichnen Aminosäuren mit einer ähnlichen chemischen Eigenschaft, grün markierte Buchstaben kennzeichnen Aminosäuren mit einer schwachen Übereinstimmung in den chemischen Eigenschaften, und schwarze Buchstaben kennzeichnen nicht verwandte Aminosäuren.

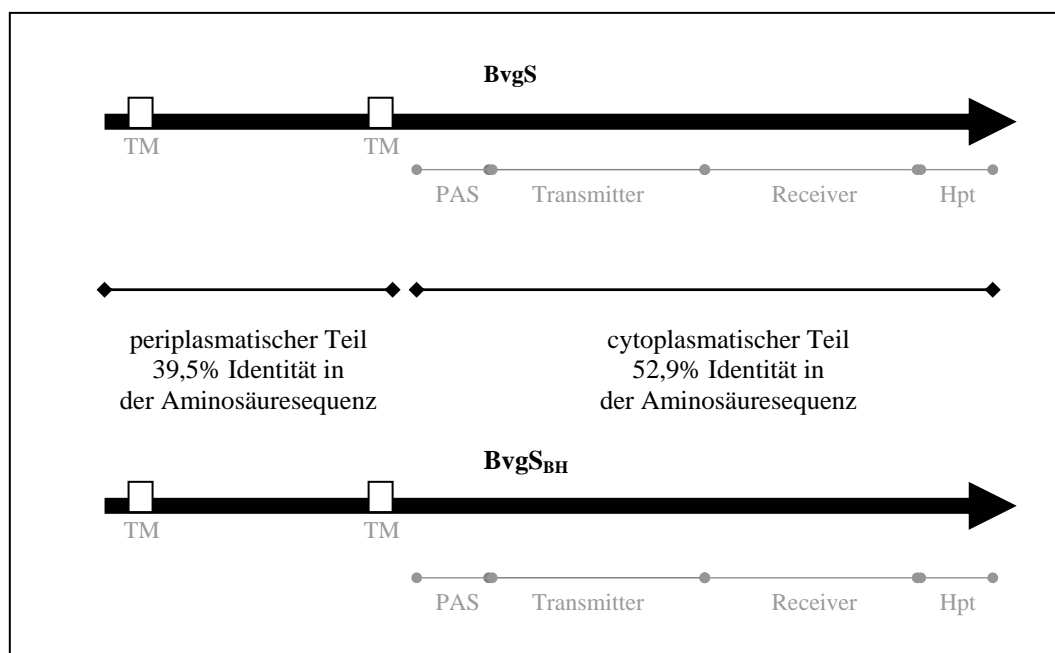


Abbildung 22: Schematisches Alignment der Histidinkinasen aus *B. pertussis* (BvgS) und *B. holmesii* (BvgS_{BH}).

PAS = PAS-Domäne; Transmitter= Transmitter-Domäne; Receiver= Receiver-Domäne; Hpt= Histidin-beinhaltende Phosphotransfer-Domäne; TM = Transmembran-Domäne. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3.7.2 Untersuchung der *in vitro*-Phosphorylierungseigenschaft von BvgA_{BH} durch die Histidinkinase BvgS aus *B. pertussis*

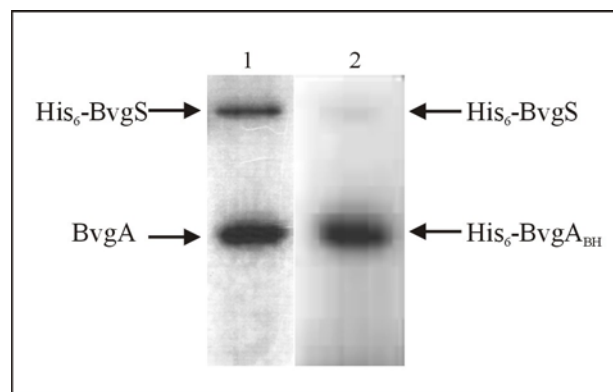
In vivo führt die Phosphorylierung des Response-Regulators durch die zugehörige Histidinkinase zu einer Aktivierung der C-terminalen Output-Domäne, wodurch letztendlich die spezifische DNA-Bindung des Regulators ermöglicht wird. Mit Hilfe von *in vitro*-Phosphorylierungsassays wurde untersucht, ob die Histidinkinase BvgS aus *B. pertussis* in der Lage ist, den Response-Regulator BvgA_{BH} aus *B. holmesii* zu phosphorylieren.

Die *in vitro*-Phosphorylierungsassays wurden von Andreas Bock durchgeführt. Die Experimente wurden mit dem in 3.5 beschriebenen His₆-Fusionsprotein von BvgA_{BH} aus *B. holmesii* G7702 durchgeführt.

Daneben wurde die von Anne-Laure Perraud gereinigte, cytoplasmatische Domäne der Histidinkinase aus *B. pertussis* (His₆-BvgS) sowie als Positivkontrolle der von Andreas Bock gereinigte Response-Regulator BvgA aus *B. pertussis* verwendet. Bei der Histidinkinase handelte es sich ebenfalls um ein N-terminales His₆-Fusionsprotein, das die cytoplasmatischen BvgS-Anteile mit den Aminosäuren 583 bis 1238 umfasst (Perraud *et al.*, 1998). Aufgrund des Fehlens der periplasmatischen Input-Domäne und der Transmembranregion liegt das Protein in einer löslichen und die Kinase in einer konstitutiv aktiven Form vor. Bei dem Response-Regulator BvgA aus *B. pertussis* handelte es sich um das native Protein, welches über eine Heparin-Sepharose-Säule gereinigt wurde. Die Regulatoren und Kinasen wurden im Verhältnis 4:1 mit einer Kinase-Endkonzentration von 1 µM verwendet. Wie in Abbildung 23 zu erkennen ist, konnte mit Hilfe des *in vitro*-Phosphorylierungsassays gezeigt werden, dass der Response-Regulator BvgA_{BH} aus *B. holmesii*, ebenso wie die Positivkontrolle BvgA durch die Histidinkinase aus *B. pertussis* phosphoryliert werden kann.

Abbildung 23: Autophosphorylierung von His₆-BvgS aus *B. pertussis* und Phosphotransfer zu BvgA aus *B. pertussis* (Spur1) und His₆-BvgA_{BH} aus *B. holmesii* (Spur2).

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



3.7.3 Untersuchung der *in vitro*-DNA-Bindeeigenschaften des Response-Regulators BvgA aus *B. holmesii* (BvgA_{BH}) an die *fhaB*-Promotorregion aus *B. pertussis*

Bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters bindet die phosphorylierte Form des Response-Regulators BvgA an die *fhaB*-Promotorsequenz und aktiviert so die Transkription von *fhaB*. Mit Hilfe von Gelretardations-Experimenten sollte untersucht werden, ob das BvgA_{BH}-Protein aus *B. holmesii* G7702 *in vitro* in der Lage ist, an die *fhaB*-Promotorsequenz zu binden. Hierfür wurde zunächst mit den Oligonukleotiden *fhaBup5* und *fhaBup3* und der „deep Vent“-DNA-Polymerase ein 77 bp großes DNA-Fragment von dem Plasmid pProm-67 amplifiziert. Das Plasmid pProm-67 enthält ein 1250 bp langes *PstI/PstI*-DNA-Fragment, das u. a. die *fhaB*-Promotorregion aus *B. pertussis* beinhaltet. Das gereinigte PCR-Fragment wurde im Anschluss radioaktiv markiert.

Für die Gelretardations-Experimente wurden zunächst geeignete Verdünnungen von dem His₆-BvgA_{BH}-Fusionsprotein (siehe 3.5) hergestellt. Als Positivkontrolle wurde der Reponse Regulator BvgA aus *B. pertussis* eingesetzt, wobei die bereits in 3.7.2 erwähnte Präparation verwendet wurde. Ein Ansatz wurde vor Zugabe der Sonde jeweils mit 50 mM Acetylphosphat versetzt, während parallel dazu ein weitere Ansatz ohne Acetylphosphat mit der Sonde inkubiert wurde. Die Ansätze wurden im Anschluss über ein natives Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch ausgewertet. Wie in der Abbildung 24 zu erkennen ist, konnte für den Response-Regulator aus *B. holmesii* (BvgA_{BH}), unabhängig vom Phosphorylierungsstatus, kein Protein-DNA-Komplex nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu bindet der Reponse Regulator BvgA aus *B. pertussis* sowohl in seiner phosphorylierten als auch in seiner nicht-phosphorylierten Form an die *fhaB*-Promotorregion.

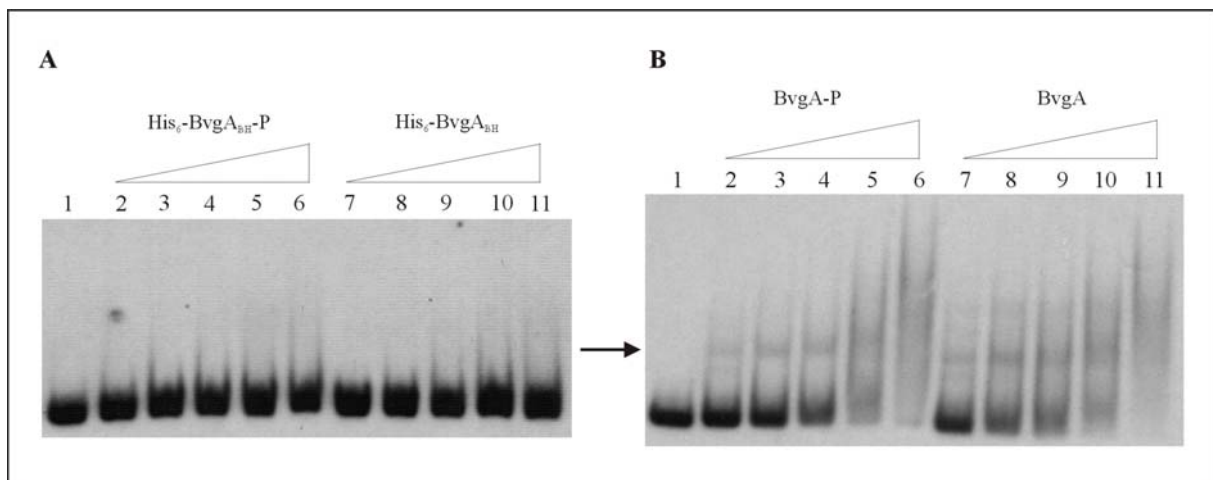


Abbildung 24: Gelretardations-Experimente zur Überprüfung der DNA-Bindeeigenschaften des Response-Regulators BvgA aus *B. holmesii* (His₆-BvgA_{BH}) und *B. pertussis* (BvgA) an die *fhaB*-Promotorregion.

15000 cpm der Sonden-DNA (Spur1) wurden jeweils mit 80, 160, 240, 360 und 600 ng His₆-BvgA_{BH} (Abbildung 24A) bzw. BvgA (Abbildung 24B) in Anwesenheit von Acetylphosphat (Spur2-6) und in Abwesenheit von Acetylphosphat (Spur7-11) inkubiert, auf einem 4%igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch ausgewertet. Der Pfeil kennzeichnet den Protein-DNA-Komplex in Abbildung 24B.

3.7.4 Konstruktion und Charakterisierung der hybriden *B. pertussis* (BP)-Stämme BP 359 (pRK415-*bvgAS*_{BH G7702}) und BP 347(pRK415-*bvgAS*_{BH ATCC51541})

Im weiteren wurde untersucht, ob das BvgAS System aus *B. holmesii* (BvgAS_{BH}) *in vivo* Funktionen des wildtypischen BvgAS-Systems in *B. pertussis* übernehmen kann. Hierfür wurden unterschiedliche hybride *B. pertussis*-Stämme konstruiert.

Als Ausgangsstämme wurden die *B. pertussis* (BP)-Stämme BP 347 bzw. BP 359 verwendet, bei denen aufgrund einer Tn5-Insertion an verschiedenen Stellen innerhalb des *bvgAS* Locus die Transkription und Expression der Virulenzgene nicht stattfinden kann. Beide Stämme bilden aufgrund der fehlenden Expression der Adenylatcyclase auf Blutagarplatten nicht-hämolytische Kolonien aus und sind deshalb leicht von wildtypischen Isolaten zu unterscheiden.

Bei BP 359 ist das Transposon in das *bvgA*-Gen inseriert, wodurch die Expression des Response-Regulators BvgA verhindert, und, aufgrund des polaren Effekts, die Expression der

Histidinkinase BvgS stark beeinträchtigt ist. Bei *BP* 347 ist das Transposon, wie in der Abbildung 27 zu erkennen ist, in das *bvgS*-Gen inseriert, wodurch die Expression der Histidinkinase BvgS, nicht aber die des Response-Regulators BvgA, verhindert wird. Aufgrund der fehlenden Expression von BvgS liegt der Response-Regulator jedoch in einer nicht phosphorylierten, inaktiven Form vor, weshalb *bvgA* nur im geringen Umfang transkribiert wird. Um zu untersuchen, ob das BvgAS_{BH}-System den inaktiven *bvgAS*-Locus in *B. pertussis* 359 ersetzen und den wildtypischen Phänotyp wieder herstellen kann, wurde der hybride *B. pertussis*-Stamm *BP* 359 (pRK415-*bvgAS*_{BH G7702}) konstruiert. Die Expression des Response-Regulators BvgA_{BH G7702} konnte für *BP* 359 (pRK415-*bvgAS*_{BH G7702}), wie der Abbildung 25A zu entnehmen ist, in Westernblot-Experimenten mit einem BvgA_{BH}-spezifischen Antiserum nachgewiesen werden. Da kein BvgS_{BH}-spezifisches Antiserum zur Verfügung stand und das *B. pertussis*-spezifische BvgS Antiserum nicht mit der Histidinkinase aus *B. holmesii* kreuzreagierte (Daten nicht gezeigt), konnte die Expression der Histidinkinase BvgS_{BH G7702} für *BP* 359 (pRK415-*bvgAS*_{BH G7702}) nicht überprüft werden. Da jedoch gezeigt werden konnte, dass *bvgS*_{BH} zusammen mit *bvgA*_{BH} transkribiert wird (Stefanie Link, persönliche Mitteilung) und sich vor dem *bvgS*_{BH}-Startcodon eine Shine-Dalgarno-Sequenz befindet konnte mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass die Histidinkinase BvgS_{BH G7702} in *BP* 359 (pRK415-*bvgAS*_{BH G7702}) exprimiert wird. Um zu untersuchen, ob die Histidinkinase BvgS_{BH} in der Lage ist, den Response-Regulator BvgA aus *B. pertussis* zu phosphorylieren und somit in *B. pertussis* 347 die fehlende Aktivität der wildtypischen Sensorkinase BvgS zu ersetzen, wurde der hybride *B. pertussis*-Stamm *BP* 347 (pRK415-*bvgAS*_{BH ATCC51541}) konstruiert. Dieser Stamm exprimiert, wie der Abbildung 27 zu entnehmen ist, noch seinen wildtypischen Response-Regulator BvgA, während aufgrund der Frameshift-Mutation innerhalb des *bvgA*_{BH ATCC51541}-Gens das intakte BvgA_{BH}-Protein in *BP* 347 (pRK415-*bvgAS*_{BH ATCC51541}) nicht gebildet wird. Die Expression der Histidinkinase BvgS_{BH ATCC51541} in *BP* 347 (pRK415-*bvgAS*_{BH ATCC51541}) konnte aus den bereits für *BP* 359 (pRK415-*bvgAS*_{BH G7702}) beschriebenen Gründen nicht überprüft werden, sie schien jedoch ebenso wie für *BP* 359 (pRK415-*bvgAS*_{BH G7702}) als wahrscheinlich.

Da die *B. pertussis*-Stämme keine natürliche Kompetenz besitzen, mussten zur Konstruktion der beiden hybriden *B. pertussis*-Stämme die in 3.4 beschriebenen Plasmide pRK415-*bvgAS*_{BH G7702} und pRK415-*bvgAS*_{BH ATCC51541} zunächst in *E. coli* SM10-Zellen transformiert werden. Die resultierenden *E. coli*-Donorstämme *E. coli* SM10 (pRK415-*bvgAS*_{BH G7702}) und *E. coli* SM10 (pRK415-*bvgAS*_{BH ATCC51541}) wurden dann zur Konjugation mit den Ausgangsstämmen *BP* 347 und *BP* 359 eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde das Plasmid *pla57vir*, welches das komplette *bvgAS*-Operon aus *B. pertussis* trägt, mit Hilfe von *E. coli* SM10 (*pla57vir*) in die oben beschriebenen *B. pertussis*-Ausgangsstämme konjugiert. Die einzelnen Konjugationsansätze wurden auf BG-Blutagarplatten mit Streptomycin und Tetracyclin selektioniert. Die *B. pertussis* Stämme wurden zunächst auf ihre Fähigkeit hin untersucht, hämolytische Kolonien auf BG-Blutagarplatten auszubilden.

Hierbei zeigte sich, dass neben den mit dem wildtypischen *bvgAS*-Locus *in trans* komplementierten *B. pertussis*-Stämmen *BP* 347 (*pla57vir*) und *BP* 359 (*pla57vir*), mit *BP* 347 (pRK415-*bvgAS*_{BH ATCC51541}) nur der *B. pertussis* Stamm eine Komplementation zum hämolytischen Phänotyp zeigte, der neben dem wildtypischen Response-Regulator BvgA die Histidinkinase BvgS_{BH} aus *B. holmesii* exprimiert. Der Stamm *BP* 359 (pRK415-*bvgAS*_{BH G7702}), welcher weder den wildtypischen Response-Regulator BvgA noch die wildtypische Histidinkinase BvgS, sondern lediglich das BvgAS-System aus *B. holmesii* G7702 (BvgAS_{BH G7702}) exprimiert, zeigte im Gegensatz dazu keine Hämolyse (siehe Abbildung 27). Mit Hilfe von Westernblot-Experimenten wurden die hybriden *B. pertussis*-Stämme außerdem hinsichtlich der Expression des filamentösen Hämagglutinins untersucht. Hierfür wurden Zelllysate der logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600nm} von 0,6) über ein 6 %iges Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit FhaB-

spezifischen polyklonalem Antiserum inkubiert. Das Ergebnis des Westernblot-Experimentes ist in der Abbildung 25B dargestellt. Entsprechend zu den Ergebnissen der Hämolyse exprimieren nur der wildtypische Stamm *B. pertussis* TI, die *B. pertussis*-Stämme BP 347 (pla57vir), BP 359 (pla57vir) und BP 347 (pRK415-*bvgAS_{BH}* ATCC51541) das filamentöse Hämagglutinin, nicht aber der hybride Stamm BP 359 (pRK415-*bvgAS_{BH}* G7702).

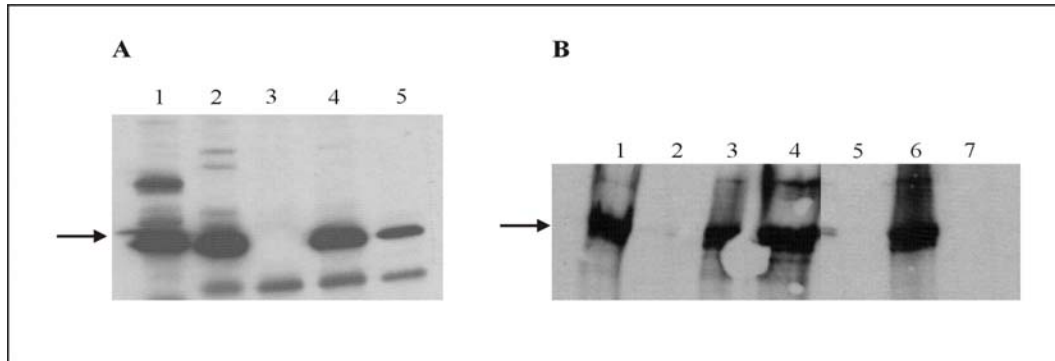


Abbildung 25: Westernblot-Experimente zum Nachweis der BvgA_{BH}- und FhaB-Expression.

25A) SDS-PAGE-Proben eines *B. holmesii* G7702-Lysats und der einzelnen *B. pertussis*-Lysate wurden auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit BvgA_{BH}-spezifischen Antiserum inkubiert. *B. holmesii* G7702 (Spur1), *B. pertussis* TI (Spur2), BP 359 (Spur3), BP 359 (pla57vir) (Spur4), BP 359 (pRK415-*bvgAS_{BH}* G7702) (Spur5). Der schwarze Pfeil markiert die Bande, die dem BvgA_{BH}-Protein entspricht. Wie den Spuren 2 und 4 zu entnehmen ist, erkennt das BvgA_{BH}-spezifische Antiserum auch den Response-Regulator BvgA aus *B. pertussis*. **25B)** SDS-PAGE-Proben der einzelnen *B. pertussis*-Lysate wurden auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit FhaB-spezifischem Antiserum inkubiert. *B. pertussis* TI (Spur1), BP 347 (Spur2), BP 347 (pla57vir) (Spur3), BP 347 (pRK415-*bvgAS_{BH}* ATCC51541) (Spur4), BP 359 (Spur5), BP 359 (pla57vir) (Spur6) und BP 359 (pRK415-*bvgAS_{BH}* G7702) (Spur7). Der schwarze Pfeil markiert die Bande, die dem filamentösen Hämagglutinin FhaB entspricht.

Um ausschließen zu können, dass es bei dem Stamm BP 359 (pRK415-*bvgAS_{BH}* G7702), trotz der offensichtlich fehlenden Expression des filamentösen Hämagglutinins, nicht doch zu einer schwachen Aktivierung der *fhaB*-Transkription durch das BvgAS_{BH}-System aus *B. holmesii* G7702 kommen kann, wurden im weiteren Primer-Extension-Experimente durchgeführt. Hierfür wurde das Oligonukleotid *fhaB*-PE sowie Gesamt-RNA der unter der Abbildung 26A und 26B aufgeführten Stämme verwendet. Bei diesen Experimenten wurde gleichzeitig eine Sequenzierungsreaktion mit auf das Gel aufgetragen, die mit Hilfe des Plasmids pProm-67 und dem Oligonukleotid *fhaB*-PE durchgeführt wurden. Das Plasmid pProm-67 enthält ein 1250 bp langes *PstI/PstI*-DNA-Fragment, das u.a. die *fhaB*-Promotorregion aus *B. pertussis* beinhaltet. Die Primer-Extension-Analysen sind in Abbildung 26 dargestellt. Sowohl in BP 347 (pla57vir) und BP 359 (pla57vir), als auch in BP 347 (pRK415-*bvgAS_{BH}* ATCC51541) konnte ein *fhaB*-Transkript nachgewiesen werden, wobei der mit Hilfe der Sequenzierungsreaktion ermittelte Transkriptionsstartpunkt dem publizierten *fhaB*-Transkriptionsstartpunkt entspricht (Scarlato *et al.*, 1991). Ein entsprechendes Transkript konnte jedoch nicht bei dem hybriden Stamm BP 359 (pRK415-*bvgAS_{BH}* G7702) nachgewiesen werden. Eine Komplementation zum wildtypischen Phänotyp, d. h. die Expression der Virulenzgene *cya* und *fhaB*, konnte demnach nicht bei dem *B. pertussis*-Stamm beobachtet werden, welcher mit dem *bvgAS_{BH}*-Locus aus *B. holmesii* G7702 *in trans* komplementiert wurde. Die Komplementation des hybriden *B. pertussis*-Stammes BP 347 (pRK415-*bvgAS_{BH}* ATCC51541) deutet im Gegensatz dazu daraufhin, dass die Histidinkinase BvgS_{BH} aus *B. holmesii* in der Lage ist, *in vivo* den Response-Regulator BvgA in *B. pertussis* zu phosphorylieren und somit die Funktion des mutierten BvgS Proteins zu ersetzen. Die einzelnen Ergebnisse sind in der Abbildung 27 zusammengefasst.

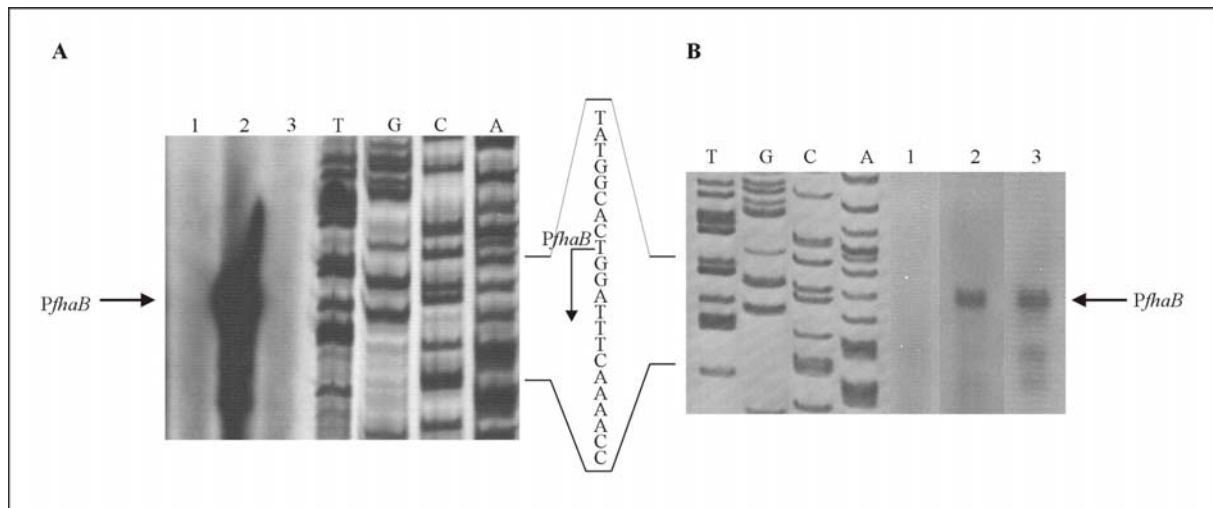


Abbildung 26: Primer-Extension-Experiment zum Nachweis eines *fhaB*-Transkripts.

Gesamt-RNA wurde in Abbildung 26A) von den *B. pertussis*-Stämmen BP 359 (Spur1), BP 359 (pla57vir) (Spur2) und BP 359 (pRK415-*bvgAS*_{BH} G7702) (Spur3), in Abbildung 26B) von den *B. pertussis* Stämmen BP 347 (Spur1), BP 347 (pla57vir) (Spur2) und BP 347 (pRK415-*bvgAS*_{BH} ATCC51541) (Spur3) isoliert und mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid *fhaB*-PE hybridisiert. Das *fhaB*-Transkript und der Transkriptionsstartpunkt *PfhaB* sind jeweils durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem Oligonukleotid *fhaB*-PE und dem Plasmid pProm-67 durchgeführt. Teile der Promotorsequenz sind dargestellt, wobei die Position des Transkriptionsstartpunktes *PfhaB* durch einen schwarzen Pfeil angegeben ist.

3.8 Versuche zur Untersuchung der Modulierbarkeit der Histidinkinase BvgS_{BH} aus *B. holmesii*

Das BvgAS System aus *B. pertussis* wird unter modulierenden Bedingungen wie zum Beispiel während des Wachstums bei niedrigen Temperaturen, sowie in Anwesenheit von Sulfationen bzw. Nikotinsäure inaktiviert. Dies äußert sich darin, dass unter diesen Bedingungen die Autophosphorylierung der Histidinkinase BvgS sowie der Phosphotransfer auf BvgA nicht stattfindet und demzufolge die Transkription der Virulenzgene nicht aktiviert wird. Im folgenden sollte untersucht werden, ob die Aktivität der Histidinkinase BvgS_{BH} aus *B. holmesii* ebenfalls durch Sulfationen moduliert werden kann.

Aufgrund der Tatsache, dass es bislang noch keinerlei Hinweise auf die Existenz und die Zusammensetzung eines *bvgA*_{BH}-Regulons in *B. holmesii* gibt, wurde die Modulierbarkeit der Histidinkinase BvgS_{BH} in dem hybriden *B. pertussis*-Stamm BP 347 (pRK415-*bvgAS*_{BH} ATCC51541) untersucht. Bei dem *B. pertussis*-Stamm 347 ist, wie in der Abbildung 27 dargestellt, aufgrund der Transposoninsertion innerhalb des *bvgS*-Gens die Expression der Histidinkinase BvgS, nicht aber die des Response-Regulators BvgA verhindert. Durch die *in trans*-Komplementierung mit dem *bvgAS*-Locus aus *B. holmesii* ATCC51541 kommt es in dem hybriden *B. pertussis*-Stamm BP 347 (pRK415-*bvgAS*_{BH} ATCC51541) zur Expression der Histidinkinase BvgS aus *B. holmesii* ATCC51541, während die Expression des zugehörigen *bvgA*_{BH}-Gens aufgrund der Frameshift-Mutation (siehe Abschnitt 3.1) nicht möglich ist. Die in Abschnitt 3.7.4 beobachtete Komplementation zum wildtypischen Phänotyp, die sich in der Aktivierung der *fhaB*-Transkription äußert, kann in diesem Stamm demnach nur durch einen Phosphorelay von BvgS_{BH} auf den wildtypischen Transkriptionsaktivator BvgA hervorgerufen werden. Da sich die Aktivität und der Phosphorylierungsstatus einer Histidinkinase im allgemeinen in der Aktivität des Response-Regulators widerspiegelt, wurde

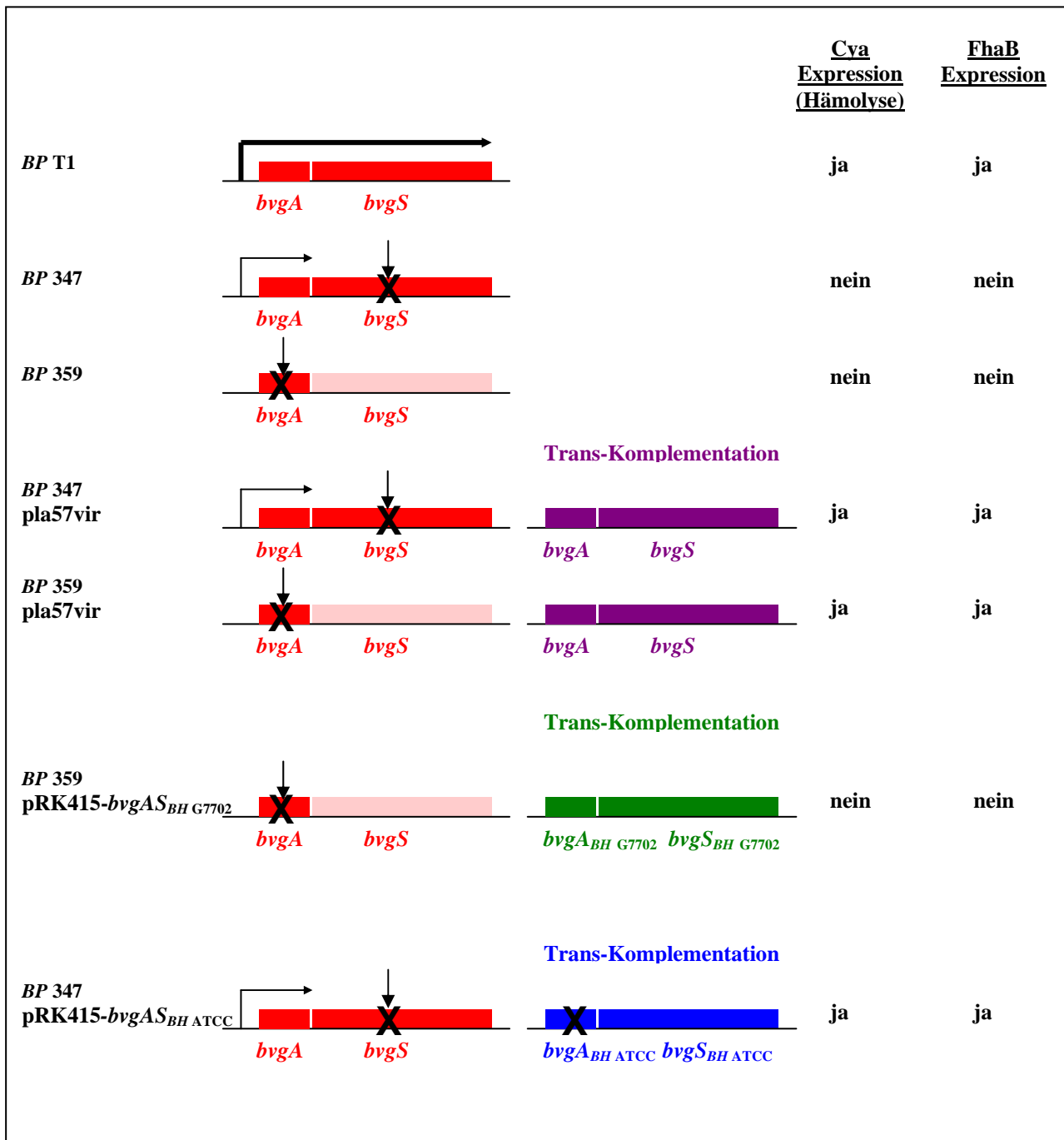


Abbildung 27 : Zusammenfassung der in 3.7.4 beschriebenen Charakterisierung der hybriden *B. pertussis*-Stämme BP 359 (pla57vir), BP 347 (pla57vir), BP 359 (pRK415-*bvgAS*_{BH G7702}) und BP 347 (pRK415-*bvgAS*_{BH ATCC51541}).

Der dicke Pfeil über dem *bvgAS*-Locus von BP T1 symbolisiert die durch die Autoregulation hervorgerufene starke Expression des BvgAS-Systems. Der auf das Kreuz deutende Pfeil kennzeichnet die Position der Tn5-Insertion in BP 347 und BP 359. Die rosa Markierung des *bvgS*-Leserahmens in dem Ausgangsstamm BP 359 sowie in den hybriden BP 359-Stämmen verweist auf eine stark eingeschränkte Expression der Histidinkinase BvgS, welche durch den polaren Effekt der Transposoninsertion in *bvgA* hervorgerufen wird. Das Kreuz innerhalb des *bvgA*_{BH ATCC51541}-Leserahmens symbolisiert die Frameshift-Mutation.

der Phosphorylierungsstatus der Histidinkinase BvgS_{BH} im folgenden indirekt über die Aktivität des durch ihn in *BP* 347 (pRK415-*bvgAS*_{BH ATCC51541}) aktivierten wildtypischen Response-Regulators BvgA untersucht. Die Aktivität des BvgA-Proteins wurde mit Hilfe von Primer-Extension-Experimenten ermittelt, in denen die Aktivierung der *fhaB*-Transkription überprüft wurde.

Hierfür wurde zunächst die Gesamt-RNA aus *BP* 347 (pRK415-*bvgAS*_{BH ATCC51541})-Zellen isoliert, die in Abwesenheit bzw. in Anwesenheit von 50 mM Magnesiumsulfat angezogen wurden. Als Positivkontrolle wurde auf gleiche Weise die Gesamt-RNA aus dem mit dem wildtypischen *bvgAS*-Locus komplementierten *B. pertussis*-Stamm *BP* 347 (*pla57vir*) isoliert. Zum Nachweis eines *fhaB*-Transkripts wurde, wie schon unter 3.7.4 beschrieben, das Oligonukleotid *fhaB*-PE verwendet. Das Ergebnis der Primer-Extension ist in Abbildung 28 dargestellt. Das *fhaB*-Transkript ist bei der RNA-Präparation, die aus den durch Sulfationen modulierten *BP* 347 (*pla57vir*)-Zellen isoliert wurde, nicht mehr nachzuweisen. Dieser Effekt kann jedoch nicht bei dem Stamm *BP* 347 (pRK415 *bvgAS*_{BH ATCC51541}) beobachtet werden, da sich das *fhaB*-Transkript unter beiden Kulturbedingungen nachweisen lässt. Für die RNA, die aus den *BP* 347 (pRK415 *bvgAS*_{BH ATCC51541})-Zellen isoliert wurde, welche in Anwesenheit von Magnesiumsulfat angezogen wurden, konnte in dem abgebildeten Experiment eine leichte Abnahme der Transkriptmenge festgestellt werden. Die Histidin Kinase aus *B. holmesii* (BvgS_{BH}) wird demzufolge im Vergleich zu dem BvgS-Protein aus *B. pertussis* nur geringfügig und nicht vollständig durch Sulfationen moduliert.

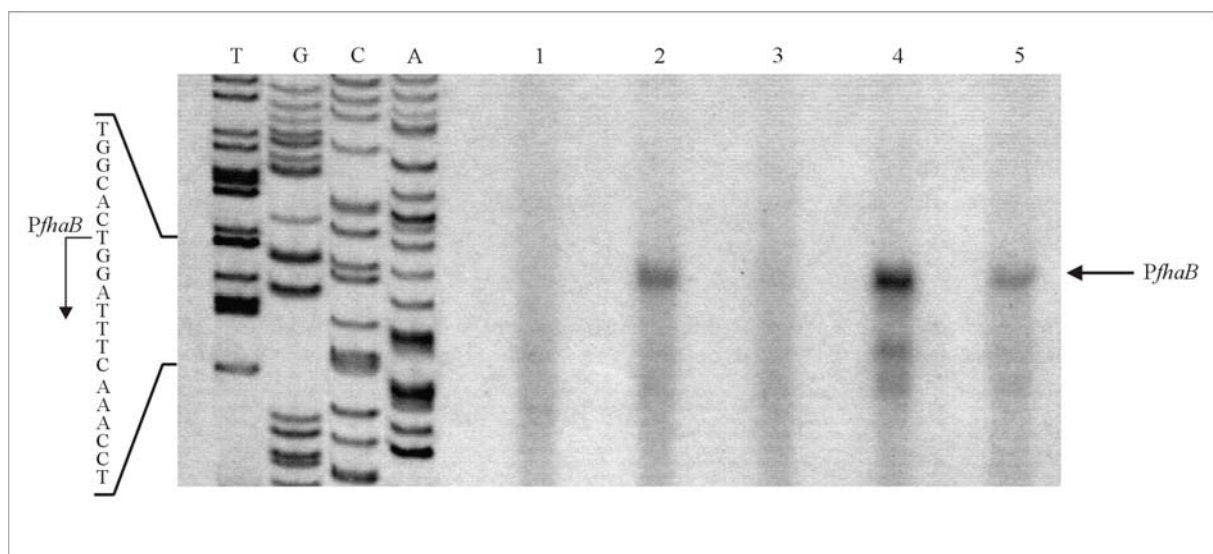


Abbildung 28: Primer-Extension-Experiment zum Nachweis eines *fhaB*-Transkripts.

Gesamt-RNA wurde von *B. pertussis* Stämmen *BP* 347 (Spur1), *BP* 347 (*pla57vir*) (Spur2 und 3) und *BP* 347 (pRK415-*bvgAS*_{BH ATCC51541}) (Spur4 und 5), die in Abwesenheit (Spur2 und 4) bzw. Anwesenheit (Spur3 und 5) von 50 mM Magnesiumsulfat angezogen wurden, isoliert und mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid *fhaB*-PE hybridisiert. Das *fhaB*-Transkript und der Transkriptionsstartpunkt (*P_{fhaB}*) ist durch den schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem Oligonukleotid *fhaB*-PE und dem Plasmid pProm-67 durchgeführt. Teile der Promotorsequenz sind dargestellt, wobei die Position des Transkriptionsstartpunktes *P_{fhaB}* durch einen schwarzen Pfeil angegeben ist

3.9 Untersuchungen zur Regulation des BvgAS_{BH}-Zwei-Komponentensystems von *B. holmesii*

Das BvgAS-System zählt bei *B. pertussis* zu den *vag*-Genen, deren Transkription unter nicht modulierenden Bedingungen aktiviert wird. Dieses System unterliegt somit einer positiven Autoregulation, wobei die phosphorylierte Form des Response-Regulators (BvgA-P) über seine Bindung an die *bvgA_{BH}*-Promotorregion als Transkriptionsaktivator wirkt. Die BvgA-Bindestellen setzen sich aus mehreren Wiederholungen der Sequenz 5'-T/A T T C C/T T A-3' zusammen. Innerhalb der Promotorregion von *bvgA* (*bvgAup*) sind diese Wiederholungssequenzen als „inverted repeat“- und „direct repeat“-Strukturen angeordnet. Man vermutet, dass die „inverted repeat“-Struktur als primäre Erkennungssequenz dient. Im folgenden wurde über *in silico*-, *in vitro*- und *in vivo*-Analysen untersucht, ob die Transkription des *bvgAS_{BH}*-Locus aus *B. holmesii* auf ähnliche Weise reguliert ist.

3.9.1 *In silico*-Analyse der *orfX-bvgA_{BH}*-intergenischen Region (*bvgA_{BH}up*)

Mit Hilfe von *in silico*-Untersuchungen wurde zunächst überprüft, ob es zwischen der *orfX-bvgA_{BH}*-intergenischen Region aus *B. holmesii*, die im folgenden als *bvgA_{BH}up*-Region bezeichnet wird, und der *bvgA*-Promotorregion aus *B. pertussis* (*bvgAup*) homologe Bereiche gibt. Der 444 bp große Abstand zwischen dem *bvgA_{BH}*-Startcodon und dem stromaufwärts davon gelegenen Leserahmen *orfX* entspricht zwar in etwa der Länge der *phaB-bvgA*-intergenischen Region (427 bp) aus *B. pertussis*. Es konnten jedoch über ein Sequenzalignment mit Hilfe von GAP- und BESTFIT-Analysen keine offensichtlichen Sequenzhomologien zwischen diesen beiden „upstream“-Regionen identifiziert werden. Im weiteren wurde die *bvgA_{BH}up*-Region auf das Vorhandensein von Sequenzmotiven untersucht, die Übereinstimmungen zu der für das *B. bronchiseptica*-Cluster beschriebenen BvgA-Zielsequenz 5'-T/A T T C C/T T A-3' besitzen. Hierbei wurden mehrere DNA-

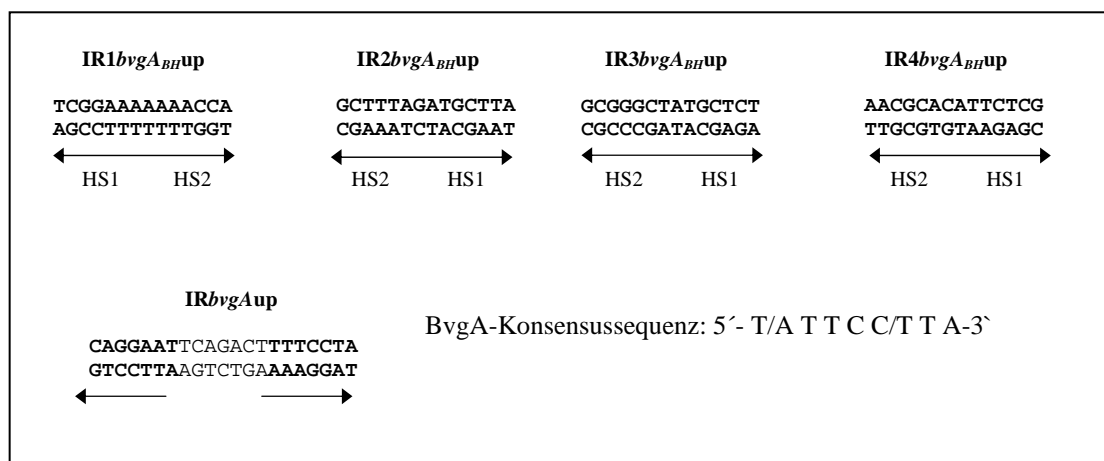


Abbildung 22: Darstellung der „inverted repeat“-Strukturen IR1, IR2, IR3 und IR4 der *bvgA_{BH}up*-Region (IR1*bvgA_{BH}up*, IR2*bvgA_{BH}up*, IR3*bvgA_{BH}up* und IR4*bvgA_{BH}up*), sowie der primären Erkennungssequenz der *bvgAup*-Region (IR*bvgAup*).

Die Halbsseite 1 (HS1) jeder „inverted repeat“-Struktur der *bvgA_{BH}up*-Region besitzt eine hohe Übereinstimmung mit der BvgA-Konsensussequenz aus *B. pertussis*, die Halbsseite 2 (HS2) besitzt dagegen kaum Sequenzspezifität.

Bereiche identifiziert, die Übereinstimmungen mit der BvgA-Konsensussequenz besitzen (siehe Abbildung 29). Erstaunlicherweise unterscheiden sich diese Wiederholungssequenzen jedoch hinsichtlich der Symmetrie und der Anordnung von der „inverted repeat“-Struktur IR $bvgA_{up}$ der $bvgA_{up}$ -Region. Die Wiederholungssequenzen der $bvgA_{BHup}$ -Region sind zwar ähnlich wie die primäre Erkennungssequenz der $bvgA_{up}$ -Region als „inverted repeat“-Strukturen angeordnet, jedoch besitzt im allgemeinen immer nur eine Halbseite der „inverted repeat“-Struktur eine hohe Übereinstimmung zu der BvgA-Konsensussequenz (HS1), während die zweite Halbseite (HS2) anscheinend keine Sequenzähnlichkeit besitzt. Interessanterweise weicht die Nukleotidfolge der Halbseite HS1 bei den am weitesten stromaufwärts gelegenen „inverted repeat“-Strukturen, IR1 $bvgA_{BHup}$ und IR2 $bvgA_{BHup}$, jeweils lediglich in einer Position von dem BvgA-Konsensus ab (siehe hierzu auch Abbildung 35).

3.9.2 Untersuchungen zur Regulation des $bvgA_{BH}$ -Locus in *B. holmesii*

3.9.2.1 Untersuchung der *in vitro*-DNA-Bindeeigenschaften des Response-Regulators Bvg A_{BH} an die $bvgA_{BHup}$ -Region

Mit Hilfe von DNaseI-Footprint-Experimenten sollte zum einen untersucht werden, ob der Response-Regulator Bvg A_{BH} *in vitro* an die $bvgA_{BHup}$ -Region bindet, und wenn ja, ob diese Bindung von dem Phosphorylierungsstatus des Response-Regulators abhängig ist.

Als Sonde für den DNaseI-Footprint wurde das 253 bp große DNA-Fragment FP1 gewählt, welches mit dem Primerpaar FP1-5 und FP1-3 von chromosomaler DNA aus *B. holmesii* G7702 amplifiziert wurde und einen Teilbereich der $bvgA_{BHup}$ -Region beinhaltet. Über die PCR-Reaktion wurde an das 5'-Ende des DNA-Fragments eine BamHI-Schnittstelle und an das 3'-Ende eine KpnI-Schnittstelle angefügt. Das PCR-Fragment wurde über ein „A-tail“ in den pGEM-T-Vektor kloniert, wodurch das Plasmid pGEM-T-FP1 entstand. Zur Sondenmarkierung wurde das Plasmid pGEM-T-FP1 zunächst mit BamHI linearisiert, dephosphoryliert, am 5'-Ende radioaktiv markiert und im Anschluss über einen KpnI-Verdau von der Vektor DNA freigesetzt. Die Abbildung 30 zeigt, dass schon bei der Zugabe von 180 ng gereinigtem, mit Acteylphosphat phosphoryliertem His₆-Bvg A_{BH} (His₆-Bvg A_{BH} -P) eine ca. 125 bp große DNA-Region vor dem DNaseI-Verdau geschützt ist. Auffällig ist hierbei, dass innerhalb dieser Region mit einer Frequenz von 10-11 Nukleotiden hypersensitive Banden auftauchen. Der entsprechende DNA-Bereich, der sich von -33 bis -158 bezüglich des in 3.9.2.3 ermittelten Transkriptionsstartpunktes P2 $bvgA_{BH}$ bzw. von -48 bis -173 bezüglich von P1 $bvgA_{BH}$ erstreckt, wird in Anwesenheit von unphosphoryliertem Bvg A_{BH} nicht gebunden. Erwähnenswert ist zudem, dass für einen effektiven Verdau der Sonden-DNA die Inkubationszeiten der einzelnen Ansätze stark variiert werden mussten. Es stellte sich heraus, dass die Ansätze mit einer hohen Konzentration an His₆-Bvg A_{BH} -P länger als die im Methodenteil angegebene Dauer von einer Minute mit der DNaseI inkubiert werden mussten. Dies wird auch in dem in Abbildung 30 dargestellten Autoradiogramm deutlich, bei dem zu erkennen ist, dass bei den Ansätzen mit 1200 bzw. 2400 ng an His₆-Bvg A_{BH} -P noch ein Großteil der DNA-Sonde unverdaut vorliegt.

Um zu untersuchen, ob die DNA-Bindung auf den mit Hilfe der Sonde FP1 ermittelten Bereich begrenzt ist, oder ob sich dieser noch weiter stromauf- bzw. stromabwärts erstreckt, wurden die Sonden FP2 bzw. FP3 in DNaseI-Footprint-Experimenten eingesetzt (siehe Abbildung 31). Als Ausgangsplasmid für die Synthese der Sonde FP2 wurde das Plasmid pGEM-T- $bvgA_{BHup}$ verwendet, das die gesamte $bvgA_{BHup}$ -Region beinhaltet. Für die Konstruktion von pGEM-T- $bvgA_{BHup}$ wurde mit dem Primerpaar $bvgA_{BHup}$ BamHI und $bvgA_{BHup}$ KpnI ein 445 bp großes DNA-Fragment von chromosomaler DNA aus *B. holmesii*

G7702 amplifiziert und über ein „A-tail“ in den pGEM-T-Vektor kloniert. Zur Synthese der 327 bp langen Sonde FP2 wurde pGEM-T-*bvgA_{BH}up* zunächst über die in der *bvgA_{BH}up*-Region natürlich vorkommende, interne *NarI*-Schnittstelle linearisiert und anschließend entsprechend der Sonde FP1 weiter präpariert. Für die Sonde FP3 wurde mit dem Primerpaar FP3-5 und FP3-3 ein 259 bp großes DNA-Fragment FP3 von chromosomaler DNA aus *B. holmesii* G7702 amplifiziert, in den pGEM-T-Vektor kloniert und entsprechend der Sonde F1 präpariert.

Mit Hilfe der Sonden FP2 und FP3 konnte in weiteren DNaseI-Footprint-Experimenten gezeigt werden, dass die Bindung des Response-Regulators BvgA_{BH} in der Tat auf den die Sonde FP1 umfassenden DNA-Bereich beschränkt ist (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 30: DNaseI-Footprint von His₆-BvgA_{BH} an die *bvgA_{BH}up*-Region.

Ein 253 bp großes *Bam*HI/*Kpn*I-DNA-Fragment, das einen Teilbereich der *bvgA_{BH}up*-Region beinhaltet, wurde mit verschiedenen Mengen an phosphoryliertem His₆-BvgA_{BH} und nicht phosphoryliertem His₆-BvgA_{BH} inkubiert. In den Spuren 2-7 wurden 0, 180, 360, 600, 1200 und 2400 ng durch Acetylphosphat *in vitro* phosphoryliertes His₆-BvgA_{BH}, in den Spuren 8-13 wurden 180, 360, 600, 1200, 2400 und 0 ng nicht-phosphoryliertes His₆-BvgA_{BH}, zugegeben. Die schwarzen Zahlen auf der linken Seite geben die Nukleotid-Position bezüglich des in 3.9.2.3 ermittelten Transkriptionsstartpunkt P2*bvgA_{BH}* an, während sich die grauen Zahlen auf die Nukleotid-Position bezüglich P1*bvgA_{BH}* beziehen. Der rechte Balken kennzeichnet den vor dem DNaseI-Verdau geschützten DNA-Bereich. In Spur 1 wurde eine G+A-Sequenzierungsreaktion der DNA-Sonde nach Maxam und Gilbert aufgetragen.

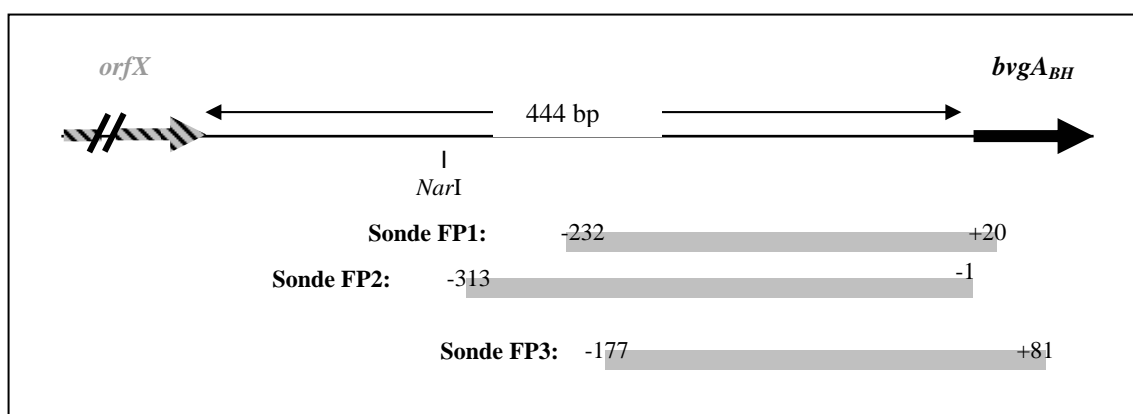
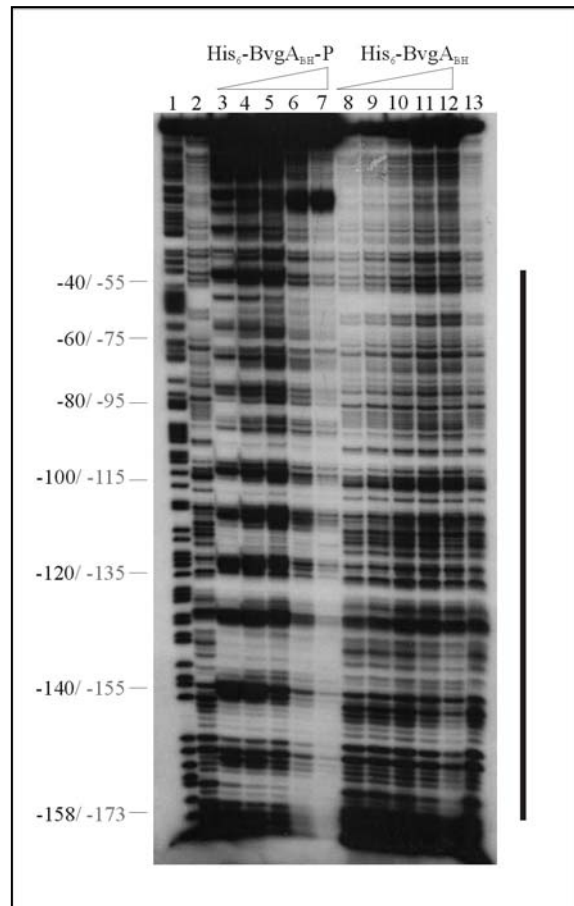


Abbildung 31: Schematische Darstellung der für die DNaseI-Footprint-Experimente eingesetzten DNA-Sonden.

Die Position der *NarI*-Schnittstelle innerhalb der *bvgA_{BH}up*-Region ist angegeben. Die Zahlen geben die Begrenzungen der jeweiligen Footprint-Sonde bezüglich des *bvgA_{BH}*-Startcodons ATG an.

3.9.2.2 Analyse der Expression des *bvgAS_{BH}*-Locus durch Konstruktion einer *bvgA_{BH}up*-Reporterengenfusion

Um zu untersuchen, welche Bedeutung die Bindung des Response-Regulators BvgA_{BH} an die *bvgA_{BH}up*-Region *in vivo* hat, wurde die Expression einer *bvgA_{BH}up*-Reporterengenfusion in Abhängigkeit von BvgA_{BH} bestimmt. Für diese Untersuchungen wurde neben dem *B. holmesii* Stamm G7702 die *bvgA_{BH}* Insertionsmutante *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* (siehe 3.2) eingesetzt. Als Reporter-gen wurde das promotorlose *gfp*-Gen verwendet, welches über einen *XbaI/PstI*-Verdau aus dem Plasmid pKEN isoliert wurde. Die *bvgA_{BH}up*-Region wurde mit den Oligonukleotiden *bvgA_{BH}up-5* und *bvgA_{BH}up-3* durch eine PCR von chromosomaler DNA aus *B. holmesii* G7702 amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *XbaI* verdaut und anschließend über die *XbaI*-Schnittstelle an das 5'-Ende des promotorlosen *gfp*-Gens ligiert. Hierdurch entstand das Plasmid pUC18-*bvgA_{BH}up-gfp*.

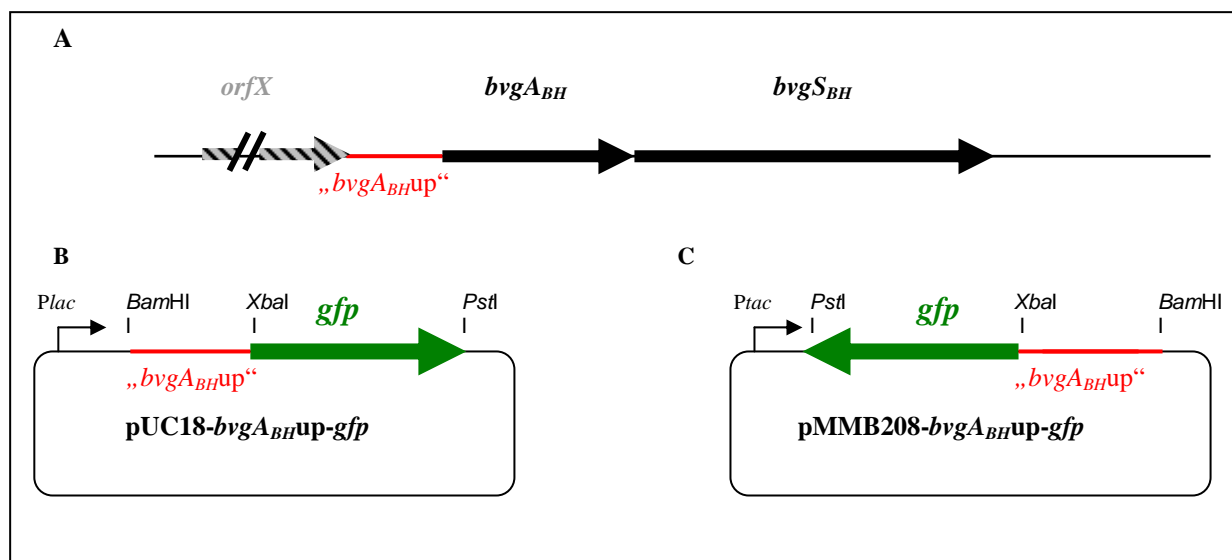


Abbildung 32A: Schematische Darstellung der *bvgA_{BH}up*-Region sowie der Leseramen *orfX*, *bvgA_{BH}* und *bvgS_{BH}*.

32B: Schematische Darstellung der Konstruktion von pUC18-*bvgA_{BH}up-gfp*.

Zur Konstruktion von pUC18-*bvgA_{BH}up-gfp* wurde zunächst das promotorlose *gfp*-Gen über einen *PstI/XbaI*-Restriktionsverdau aus dem Plasmid pKEN isoliert. Die *bvgA_{BH}up*-Region wurde von chromosomaler DNA aus *B. holmesii* G7702 amplifiziert und über die angefügte *XbaI*-Schnittstelle an das 5'-Ende des *gfp*-Gens in den pUC18-Vektor ligiert. Der Pfeil gibt die Orientierung des vektoreigenen *lac*-Promotors an.

32C: Schematische Darstellung der Konstruktion von pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*

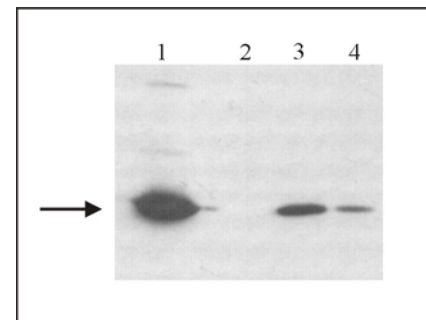
Zur Konstruktion von pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp* wurde die Reporterengenfusion *bvgA_{BH}up-gfp* über einen *BamHI/PstI*-Restriktionsverdau aus pUC18-*bvgA_{BH}up-gfp* isoliert und in pMMB208 umklontiert. Der Pfeil gibt die Orientierung des vektoreigenen *tac*-Promotors an.

Da die Reporterengenfusion in pUC18-*bvgA_{BH}up-gfp*, wie der Abbildung 32B zu entnehmen ist, in die gleiche Orientierung wie der *lac*-Promotor des pUC18-Vektors kloniert wurde, erhält man in für *E. coli* (pUC18-*bvgA_{BH}up-gfp*) eine starke GFP-Expression (siehe Abbildung 33 Spur 1). Über einen anschließenden *BamHI/PstI*-Verdau von pUC18-*bvgA_{BH}up-gfp* wurde die Reporterengenfusion in den pMMB208-Vektor in inverser Orientierung zu dem vektoreigenen *tac*-Promotor umklontiert, wodurch das Plasmid pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp* entstand (siehe Abbildung 32C). Der pMMB208-Vektor ist ähnlich wie der pRK415-Vektor ein „broad-host range“-Vektor, der im Gegensatz zu dem pUC18-Vektor auch in Bordetellen replizieren kann.

Das Plasmid pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp* wurde dann mit Hilfe des Donorstammes *E. coli* SM10 in die Stämme *B. holmesii* G7702 und *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* konjugiert. Um das Ausmaß der GFP-Expression bei den einzelnen Stämme bestimmen zu können wurden, Westernblot-Experimente durchgeführt. Hierfür wurden die aus den Konjugationen hervorgegangenen Stämme *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) und *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) zunächst auf BG-Blutagarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen. Nach 72 Stunden wurde jeweils eine Impföse voll Bakterien in 1 ml 1x PBS resuspendiert und die einzelnen Proben auf eine Zellzahl von $2,4 \cdot 10^9$ eingestellt. Anschließend wurden Proteinlysate hergestellt, die dann über ein 12%iges Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet, und mit einem polyklonalen GFP-Antikörper inkubiert wurden. Die Abbildung 33 zeigt, dass bei der Insertionsmutante *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* im Vergleich zum *B. holmesii* G7702 Wildtyp Stamm eine deutlich verminderte GFP-Expression und demnach eine verminderte Aktivierung der Reportergenfusion zu beobachten ist. Diese Ergebnisse deuten somit daraufhin, dass es in *B. holmesii* G7702 durch die Bindung des Response-Regulators BvgA_{BH} an die *bvgA_{BH}up*-Region zu einer verstärkten Transkription und Expression des *bvgA_{BH}*-Gens kommt.

Abbildung 33: Westernblot-Experimente zum Nachweis der GFP-Expression.

SDS-PAGE-Proben der einzelnen *B. holmesii*-Lysate wurden auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit einem GFP-spezifischem Antiserum inkubiert. Der schwarze Pfeil markiert die Bande, die dem GFP-Protein entspricht. *E. coli* (pUC18-*bvgA_{BH}up-gfp*) (Spur1), *B. holmesii* G7702 (Spur2), *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) (Spur3) und *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) (Spur4).



3.9.2.3 Versuche zur Kartierung eines Transkriptionsstartpunktes innerhalb der *bvgA_{BH}up*-Region

Mit Hilfe von RT-PCR-Experimenten konnte gezeigt werden, dass das *bvgA_{BH}/bvgS_{BH}*-Genpaar als bicistronische RNA transkribiert wird (Stefanie Link, persönliche Mitteilung). Um zu untersuchen, ob sich in der *bvgA_{BH}up*-Region ein Transkriptionsstartpunkt für den *bvgAS_{BH}*-Locus befindetet, wurden Primer-Extension-Experimente mit Hilfe des Oligonukleotids *bvgA_{BH}-PE* durchgeführt. Hierfür wurde Gesamt-RNA aus dem wildtypischen *B. holmesii*-Stamm G7702, der Phasenvariante *B. holmesii* ATCC51541, sowie aus einem *B. holmesii*-Stamm G7702, der zur Erhöhung der *bvgAS_{BH}*-Kopienzahl zusätzlich das Plasmid pRK415-*bvgAS_{BH} G7702* trägt, isoliert. Der Stamm *B. holmesii* G7702 (pRK415-*bvgAS_{BH} G7702*) war aus einer Konjugation von *B. holmesii* G7702 mit dem *E. coli*-Donorstamm SM10 (pRK415-*bvgAS_{BH} G7702*) hervorgegangen. Parallel dazu wurde ebenso die Gesamt-RNA aus den in 3.9.2.2 beschriebenen Stämmen *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) und *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) isoliert. Für die RNA-Präparationen wurden die einzelnen Stämme zunächst auf BG-Blutagarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen. Das Bakterienmaterial wurde nach einer zweitägigen Inkubation bei 37°C mit einer Impföse von der Platte geerntet, in jeweils 50 ml BHI-Flüssigmedium resuspendiert und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Anzucht der einzelnen Kulturen bis zu einer gemeinsamen Zelldichte war jedoch meist nicht möglich, da jeder Stamm, in wiederholten Anzuchtversuchen, ein sehr unregelmäßiges Wachstum zeigte und die Flüssigkulturen, oftmals nicht über eine OD_{600nm} von 0,3-0,4 hinaus

angezogen werden konnten. So wurde *B. holmesii* G7702 bei einem OD_{600nm}-Wert von 1,1, *B. holmesii* ATCC51541 bei OD_{600nm}= 0,7 und *B. holmesii* G7702 (pRK415-*bvgAS_{BH}* G7702) bei OD_{600nm}= 0,4, geerntet (Abbildung 34A). Die in Abbildung 34B verwendeten RNA-Präparationen stammten aus Flüssigkulturen mit den in etwa vergleichbaren OD_{600nm}-Werten von 0,322 für *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) bzw. 0,4 für *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kann* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) und *B. holmesii* G7702, sowie dem davon abweichenden OD_{600nm}-Wert von 0,9 für *B. holmesii* ATCC51541. Für alle untersuchten Stämme konnten zwei Transkriptionsstartpunkte, P1*bvgA_{BH}* und P2*bvgA_{BH}*, identifiziert werden. Der Promotor P1*bvgA_{BH}* befindet sich dabei 20 bp, der Promotor P2*bvgA_{BH}* 34 bp vor dem *bvgA_{BH}*-Startcodon. Für beide Promotoren konnte zudem eine potentielle -10-Box identifiziert werden, die mit 4 bzw. 5 Nukleotiden mit der -10-Konsensussequenz aus *E. coli* übereinstimmt. Da die Bakterien bei sehr unterschiedlichen OD_{600nm}-Werten geerntet wurden, ist eine vergleichende Aussage über die einzelnen Transkriptmengen nicht möglich. Die Abbildung 35 zeigt eine Zusammenfassung der in den Abschnitt 3.9.1, 3.9.2.1 und 3.9.2.3 ermittelten Ergebnisse.

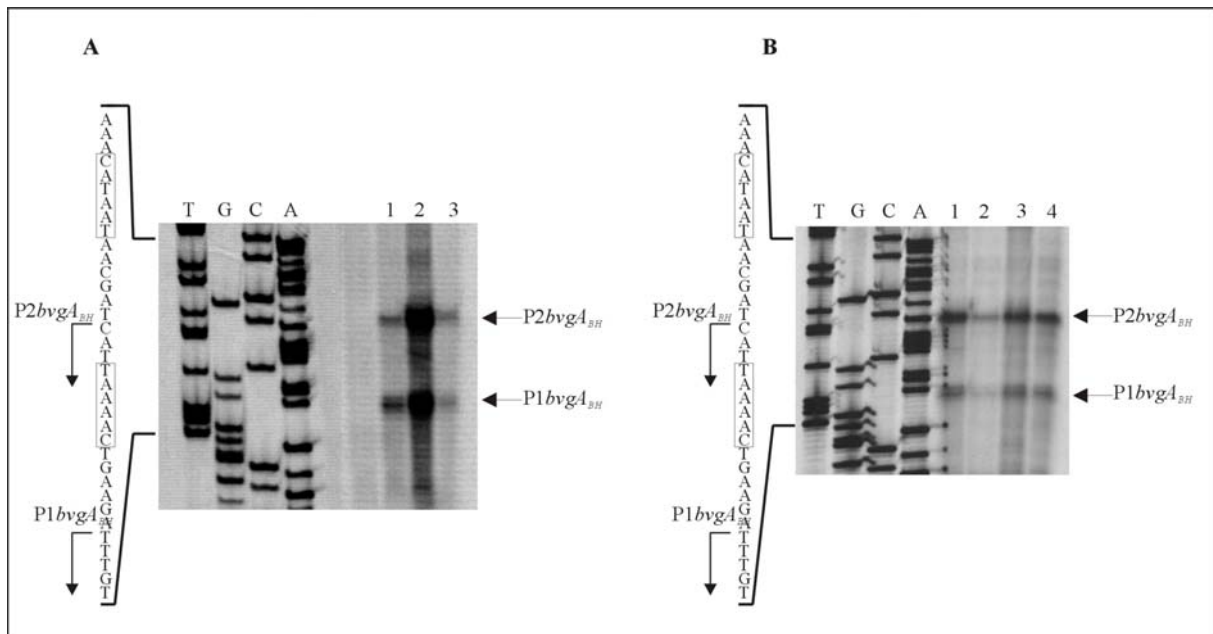


Abbildung 34: Primer-Extension-Experimente zur Kartierung eines Transkriptionsstartpunktes innerhalb der *bvgA_{BH}up*-Region.

34A) Gesamt-RNA wurde von *B. holmesii* G7702, OD_{600nm}= 1,1 (Spur1), *B. holmesii* G7702 (pRK415-*bvgAS_{BH}* G7702), OD_{600nm}= 0,4 (Spur2) und *B. holmesii* ATCC51541, OD_{600nm}= 0,7 (Spur3) isoliert und mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid *bvgA_{BH}*-PE hybridisiert.

34B) Gesamt-RNA wurde von *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*), OD_{600nm}= 0,322 (Spur1), *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*), OD_{600nm}= 0,4 (Spur2), *B. holmesii* G7702, OD_{600nm}= 0,4 (Spur3) und *B. holmesii* ATCC51541, OD_{600nm}= 0,9 (Spur4) isoliert und mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid *bvgA_{BH}*-PE hybridisiert.

Die Transkriptionsstartpunkte P1*bvgA_{BH}* und P2*bvgA_{BH}* sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem Oligonukleotid *bvgA_{BH}*-PE und dem Plasmid pSL1180-*bvgAS_{BH}* G7702 durchgeführt. Teile der Promotorsequenz sind dargestellt, wobei die Position der Transkriptionsstartpunkte P1*bvgA_{BH}* und P2*bvgA_{BH}* durch schwarze Pfeile angegeben und die jeweilige potentielle -10 Region in einem Rechteck eingefasst ist.

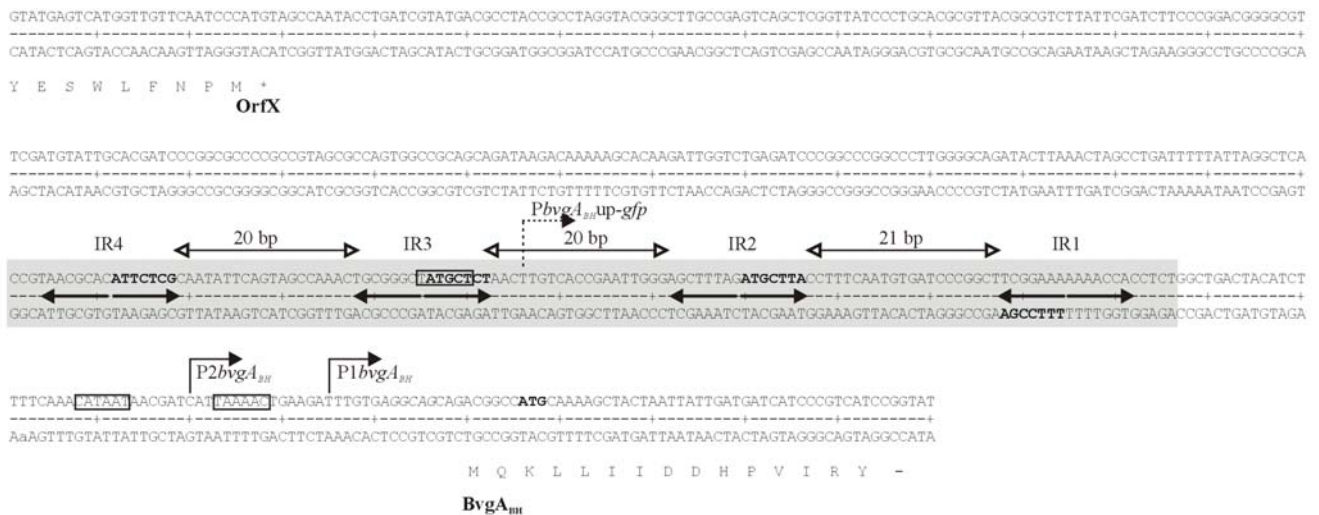


Abbildung 35: Zusammenfassung der Ergebnisse über die *in silico*- und *in vitro*- Analyse der *bvgA_{BHup}*-Region aus *B. holmesii*.

Dargestellt ist die *bvgA_{BHup}*-Region. Die Position der über *in silico*-Analysen identifizierten „inverted repeat“-Strukturen IR1*bvgA_{BHup}* (IR1), IR2*bvgA_{BHup}* (IR2), IR3*bvgA_{BHup}* (IR3) und IR4*bvgA_{BHup}* (IR4) ist durch schwarze Pfeile angegeben, wobei die Sequenz der Halbseite, die eine hohe Übereinstimmung zur BvgA-Konsensussequenz besitzt, durch fette Buchstaben hervorgehoben ist. Die DNA-Region, die *in vitro* durch die BvgA_{BH}-Bindung vor einem DNaseI-Verdau geschützt wird, ist in grau eingefasst. Die Positionen der in 3.9.2.3 ermittelten Transkriptionsstartpunkte P2*bvgA_{BH}* und P1*bvgA_{BH}* sind angegeben. Zudem ist die Position des in 3.9.3.3 ermittelten Transkriptionsstartpunktes P*bvgA_{BHup-gfp}* angegeben. Die potentiellen -10-Promotorelemente sind jeweils in einem Rechteck eingefasst, die potentielle Shine-Dalgarno Sequenz ist kursiv hervorgehoben.

3.9.4 Untersuchungen zur Regulation des *bvgAS_{BH}*-Locus in *B. pertussis*

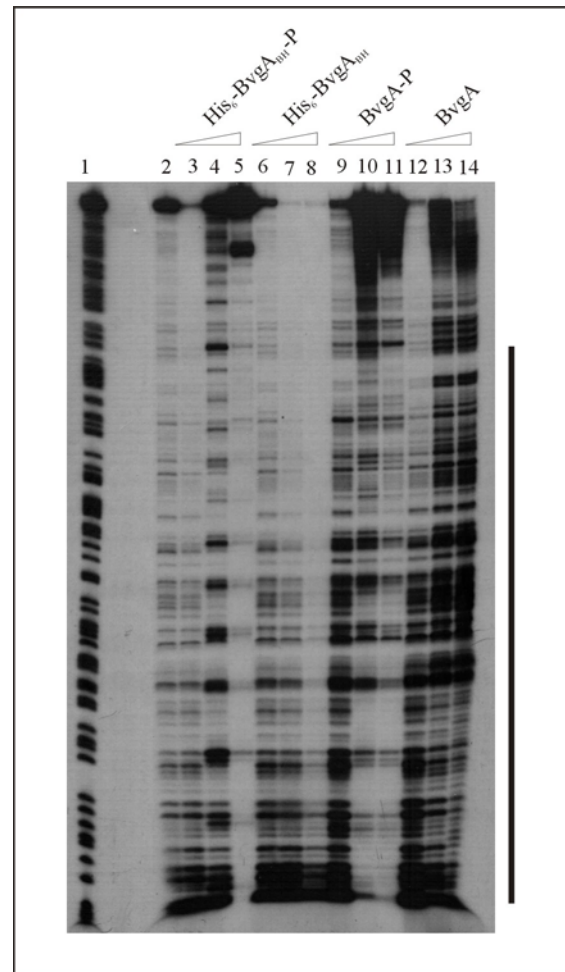
3.9.3.1 Untersuchung der *in vitro*-DNA-Bindeeigenschaften des Response-Regulators BvgA aus *B. pertussis* an die *bvgA_{BHup}*-Region

In der *bvgA_{BHup}*-Region konnten über *in silico*-Analysen mehrere DNA-Bereiche identifiziert werden, die Ähnlichkeiten zu der BvgA-Konsensussequenz besitzen (siehe 3.9.1). Im Gegensatz zu denen in der *bvgA_{up}*-Region aus *B. pertussis* sind diese „inverted repeat“-Strukturen jedoch nicht aus zwei Halbseiten, sondern lediglich aus einer Halbseite mit einer hohen Übereinstimmung zur BvgA-Konsensussequenz aufgebaut. Die zweite Halbseite zeigt hingegen kaum Sequenzspezifität (siehe Abbildung 29). Um zu untersuchen, ob der Response-Regulator BvgA aus *B. pertussis*, ähnlich wie das BvgA_{BH}-Protein, an diese außergewöhnlichen „inverted repeat“-Strukturen innerhalb der *bvgA_{BHup}*-Region binden kann, wurden DNaseI-Footprint- Experimente durchgeführt. Hierbei sollte gleichzeitig untersucht werden, ob eine Bindung vom Phosphorylierungsstatus des Regulatorproteins abhängig ist. Als Sonde wurde das in 3.9.2.1 beschriebene 253 bp große DNA-Fragment FP1 verwendet. Die Abbildung 36 zeigt das Ergebnis des DNaseI-Footprint-Experiments. Für einen Vergleich der jeweiligen Bindungsmuster wurde der Versuch parallel dazu ebenso mit dem BvgA_{BH}-Protein aus *B. holmesii* durchgeführt. Wie schon für den Response-Regulator aus *B. holmesii* gezeigt werden konnte, wird durch die Zugabe von phosphoryliertem BvgA (BvgA-P) eine ca. 125 bp große DNA-Region innerhalb der *bvgA_{BHup}*-Region vor dem DNaseI-Verdau geschützt, wobei für einen effektiven Verdau der Sonde der Ansatz mit 600 bzw. 2400 ng BvgA-P für 1,5 bzw. 2 min mit dem Enzym inkubiert werden musste. Es zeigte

sich zudem, dass innerhalb dieser Region, mit einer Frequenz von 10-11 Nukleotiden, mehrere hypersensitive Banden auftauchen. Interessanterweise stimmten dabei die Positionen dieser Banden zum größten Teil mit denen überein, die bei den Ansätzen mit dem Regulatorprotein BvgA_{BH} aus *B. holmesii* zu beobachten waren. Der entsprechende DNA-Bereich wurde in Anwesenheit des unphosphorylierten BvgA-Proteins nicht vor dem DNaseI-Verdau geschützt.

Abbildung 36: DNaseI-Footprint des gereinigten Response-Regulators His₆-BvgA_{BH} aus *B. holmesii* und BvgA aus *B. pertussis* an die *bvgA_{BH}up*-Region.

Ein 253 bp großes *Bam*HI/*Kpn*I-DNA-Fragment, das einen Teilbereich der *bvgA_{BH}up*-Region beinhaltet, wurde mit verschiedenen Mengen an phosphoryliertem His₆-BvgA_{BH} bzw. BvgA und nicht phosphoryliertem His₆-BvgA_{BH} bzw. BvgA inkubiert. In den Spuren 2-5 wurden 0, 180, 600 und 2400 ng durch Acetylphosphat *in vitro* phosphoryliertes His₆-BvgA_{BH}, in den Spuren 6-8 wurden 180, 600 und 2400 ng nicht-phosphoryliertes His₆-BvgA_{BH}, in den Spuren 9-11 wurden 180, 600 und 2400 ng durch Acetylphosphat *in vitro* phosphoryliertes BvgA und in den Spuren 12-14 wurden 180, 600 und 2400 ng nicht phosphoryliertes BvgA zugegeben. Der rechte Balken kennzeichnet den vor dem DNaseI-Verdau geschützten DNA-Bereich. In Spur 1 wurde eine G+A-Sequenzierungsreaktion der DNA-Sonde nach Maxam und Gilbert aufgetragen.



3.9.3.2 Analyse der Expression des *bvgAS_{BH}*-Locus mit Hilfe der *bvgA_{BH}up*-Reporterexpression

Mit Hilfe von DNaseI-Footprint-Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Response-Regulator BvgA aus *B. pertussis* *in vitro* an die *bvgA_{BH}up*-Region mit den in 3.9.1 beschriebenen, ungewöhnlichen „inverted repeat“ Strukturen binden kann, und dass die Bindung der von BvgA_{BH} ähnelt. Über Westernblot-Experimente sollte im folgenden überprüft werden, ob diese Bindung auch *in vivo* erfolgt, und ob dies einen direkten Einfluss auf die Expression des *bvgAS_{BH}*-Locus hat. Hierfür wurde das in 3.9.2.2 beschriebene Plasmid pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp* verwendet, welches eine Fusion zwischen der *bvgA_{BH}up*-Region und dem promotorlosen *gfp*-Gen besitzt.

Das Plasmid wurde zunächst mit Hilfe des Donatorstammes *E. coli* SM10 in den *B. pertussis*-Wildtyp-Stamm BP TI und in die zwei phasenvarianten Stämme BP 347 und BP 359 konjugiert. Die beiden phasenvarianten Stämme besitzen jeweils eine Transposoninsertion innerhalb des *bvgAS*-Locus, wobei das Transposon bei BP 347 innerhalb des *bvgS*-Gens und bei BP 359 innerhalb des *bvgA*-Gens inseriert ist. Der Stamm BP 347 besitzt im Gegensatz zu BP 359 ein intaktes *bvgA*-Gen und ist demzufolge noch in der Lage, das BvgA-Protein zu exprimieren (siehe Abbildung 27). Im Gegensatz zu dem wildtypischen *B. pertussis*-Stamm TI liegt bei BP 347 das Regulatorprotein jedoch in der nicht phosphorylierten, inaktiven Form vor. Würde die Expression der *bvgA_{BH}up*-Reporterexpression durch die Bindung des BvgA-Proteins aktiviert werden, sollte demnach die GFP-Expression bei BP TI (pMMB208-

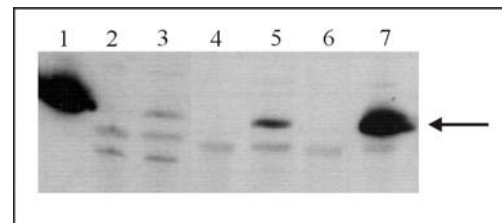
bvgA_{BH}up-gfp) am stärksten und bei *BP 359* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) am schwächsten sein. Bei einer *bvgAS*-vermittelten Repression sollten diese Verhältnisse entsprechend umgekehrt sein.

Von den aus der Konjugation hervorgegangenen Stämmen *BP TI* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*), *BP 347* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) und *BP 359* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) wurden Flüssigkulturen bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 angezchtet und Proteinlysate hergestellt. Diese wurden nach Auftrennung über ein 12%iges Polyacrylamidgel und Blotten auf eine Nitrocellulosemembran mit einem polyklonalen GFP-Antikörper inkubiert. Die Abbildung 37 zeigt, dass der Stamm *BP 359* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) eine sehr starke GFP-Expression zeigt, während bei *BP TI* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) die GFP-Expression kaum nachzuweisen ist. Im Gegensatz zu der für das *BvgA_{BH}*-Protein beobachteten positiven Autoregulation deuten dieses Ergebnis somit auf eine durch das *BvgAS*-System aus *B. pertussis* vermittelte Repression der *bvgA_{BH}*-Transkription hin. Die in 3.9.3.1 beobachtete Bindung von *BvgA* an die *bvgA_{BH}up*-Region konnte demnach bestätigt werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des Response-Regulators *BvgA* in *B. pertussis* eine Voraussetzung für eine effektive Repression ist, da in *BP 347* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) mit der nicht-phosphorylierten, inaktiven Form des *BvgA*- Proteins, noch eine signifikante Aktivierung der *bvgA_{BH}up*-Reportergenfusion nachzuweisen ist.

Abbildung 37: Westernblot-Experiment zum Nachweis der GFP-Expression.

SDS-PAGE-Proben der einzelnen *B. pertussis*-Lysate wurden auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit einem GFP-spezifischen Antiserum inkubiert.

E. coli (pUC18-*bvgA_{BH}up-gfp*) (Spur1), *BP TI* (Spur2), *BP TI* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) (Spur3), *BP 347* (Spur4), *BP 347* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) (Spur5), *BP 359* (Spur6), *BP 359* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) (Spur7). Der schwarze Pfeil markiert die Bande, die dem GFP-Protein entspricht.



3.9.4.1 Versuche zur Kartierung des *bvgA_{BH}up-gfp* Transkriptionsstartpunktes in *BP 359* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) und *BP 347* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*)

Die in 3.9.3.2 beschriebenen Ergebnisse deuten daraufhin, dass es in *BP TI* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) zu einer durch das *BvgAS*-System vermittelten Repression der *bvgA_{BH}up*-Reportergenfusion kommt. Um den Transkriptionsstartpunkt dieser Reportergenfusion in *B. pertussis* kartieren zu können, wurden Primer-Extension-Experimente durchgeführt.

Hierfür wurde zunächst Gesamt-RNA aus den *B. pertussis*-Stämmen isoliert, bei denen über die Westernblot-Experimente eine starke (*BP 359* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*)) bzw. schwache (*BP 347* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*)) GFP-Expression nachgewiesen werden konnte. Für das Primer-Extension-Experiment wurde das Oligonukleotid *gpf-PE* verwendet, das an RNA des an die *bvgA_{BH}up*-Region fusionierten *gfp*-Gens hybridisieren kann. Das Ergebnis ist in Abbildung 38 dargestellt. Für die RNA aus *BP 359* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) konnte ein Transkript nachgewiesen werden, wobei der dazugehörige Transkriptionsstartpunkt mit einem Abstand von 139 bp vor dem *bvgA_{BH}*-Startcodon innerhalb der Region liegt, die durch die Bindung des Regulatorproteins vor einem DNaseI-Verdau geschützt ist (siehe auch Abbildung 35). Die potentielle -10-Box von *PbvgA_{BH}up-gfp* stimmt dabei in 4 Nukleotiden mit dem Konsensus aus *E. coli* überein. Für *BP 347* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) konnte auch nach einer längeren Expositionsdauer des Röntgenfilms kein eindeutiges Transkript nachgewiesen werden.

Bei weiteren Primer-Extension-Analysen mit Gesamt-RNA aus dem in 3.7.4 beschriebenen Stamm *BP 359* (pRK415-*bvgAS_{BH}* ATCC51541) und dem Oligonukleotid *bvgA_{BH}*-PE wurde ebenso der für *BP 359* (pMMB208-*bvgA_{BH}*up-*gfp*) identifizierte Transkriptionsstartpunkt ermittelt (Daten nicht gezeigt).

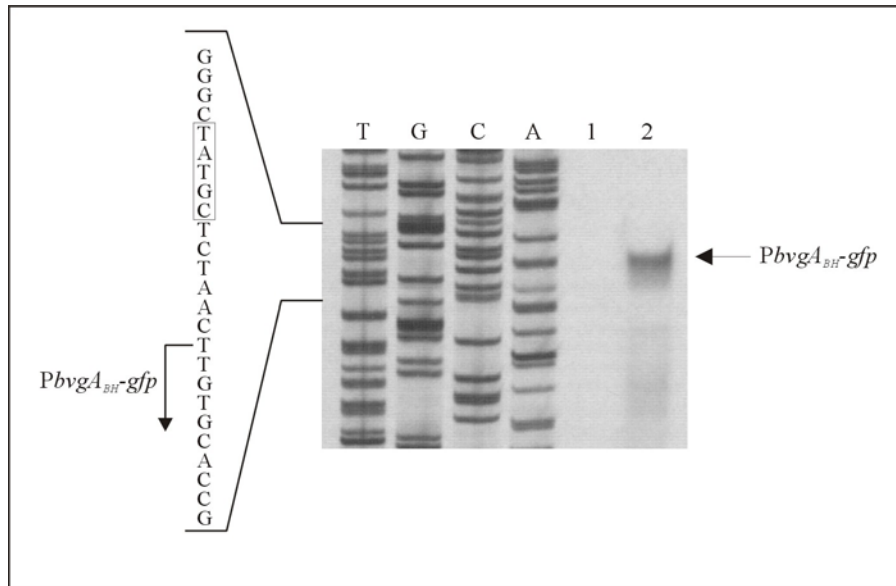


Abbildung 39: Primer-Extension-Experiment zur Kartierung des Transkriptionsstartpunktes der *bvgA_{BH}*up-Reportergenfusion.

Gesamt-RNA wurde von *BP 347* (pMMB208-*bvgA_{BH}*up-*gfp*) (Spur1) und *BP 359* (pMMB208-*bvgA_{BH}*up-*gfp*) (Spur2) isoliert und mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid *gfp*-PE hybridisiert. Der Transkriptionsstartpunkt *PbvgA_{BH}*up-*gfp* ist durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem Oligonukleotid *gfp*-PE und dem Plasmid pUC18-*bvgA_{BH}*up-*gfp* durchgeführt. Teile der Promotorsequenz sind links dargestellt, wobei die Position des Transkriptionsstartpunktes *PbvgA_{BH}*up-*gfp* durch einen schwarzen Pfeil angegeben und die potentielle -10 Region in einem Rechteck eingefasst ist.

F Diskussion

1 Phylogenetische Stellung der „neuen“ *Bordetella*-Arten innerhalb der Gattung *Bordetella*

Zur Gattung *Bordetella* gehören nach heutigem Wissensstand acht Arten. Hierzu zählen zum einen die sogenannten „klassischen“ Arten, wie der Erreger des Keuchhustens, *B. pertussis*, und zwei weitere human- bzw. säugetierpathogene Arten *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica*. Zum anderen wurden in den letzten Jahren mit *B. avium*, *B. hinzii*, *B. trematum*, *B. holmesii* und *B. petrii* „neue“ Arten der Gattung *Bordetella* klassifiziert, die zum Teil humanpathogenes, zum Teil tierpathogenes Potential besitzen. *B. petrii* ist dabei das erste beschriebene Umweltisolat dieser Gattung. Die Klassifizierung der „neuen“ Arten in die Gattung *Bordetella* erfolgte dabei vorwiegend anhand der DNA-Sequenzen ihrer ribosomalen 16S rDNA-Gene. Neben einer vergleichenden Analyse der 16S rDNA-Sequenzen kann der Verwandtschaftsgrad einzelner Bakterienarten jedoch auch durch den Vergleich von hochkonservierten Proteinen wie z. B. der β -Untereinheit der RNA-Polymerase oder der GyraseB, analysiert werden. Der Besitz eines für eine Gattung bzw. Familie charakteristischen Genes wird dabei als deutlicher Hinweis angesehen, dass diese Arten miteinander verwandt sind. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit über Southernblot-Experimente und PCR-Analysen die Verbreitung von bereits bekannten *Bordetella*-Genen bzw. IS-Elementen bei den „neuen“ *Bordetella*-Arten untersucht.

1.1 Verbreitung von einzelnen Genen und IS-Elementen innerhalb der Gattung *Bordetella*

Die Konservierung des Membranproteins OmpA und die des Regulatorproteins RisA konnte bereits für das *B. bronchiseptica*-Cluster sowie für die „neuen“ *Bordetella*-Arten *B. avium* und *B. petrii* gezeigt werden (Klein, 1999). Über DNA-Hybridisierungs-Experimente mit einer von *B. avium* abgeleiteten *ompA*- und *risA*-Sonde und chromosomaler DNA der verbleibenden „neuen“ Arten konnte im Rahmen dieser Arbeit die ubiquitäre Verbreitung dieser Gene demonstriert werden (siehe Abb. 8A und 8B). Wie über eine PCR-Analyse und einen sich anschließenden Sequenzvergleich gezeigt werden konnte, stellen sie zudem hochkonservierte Gene innerhalb der Gattung *Bordetella* dar. Im Gegensatz dazu ergaben Versuche mit Hilfe von Southernblot- Experimenten und PCR-Analysen zunächst keinen eindeutigen Hinweis auf die ubiquitäre Verbreitung des Response-Regulators BvgA (siehe Abb. 8C). Erst durch den Einsatz von degenerierten Oligonukleotiden, die sich aus hochkonservierten Bereichen des BvgA-Proteins aus *B. pertussis* ableiten, gelang es DNA-Fragmente von chromosomaler DNA aus *B. avium*, *B. holmesii*, *B. trematum* und *B. hinzii* zu amplifizieren, die für ein dem BvgA-Protein der „klassischen“ Arten homologes Protein kodieren. Es zeigte sich hierbei, dass der Konservierungsgrad der *bvgA*-Sequenzen der „neuen“ Arten auf DNA-Ebene mit der *bvgA*-Sequenz der „klassischen“ Arten gering ist, was wiederum erklärt, warum dieser Genlocus durch DNA-Hybridisierungen zunächst nicht bei allen Arten nachgewiesen werden konnte. Erste Analysen der zurzeit durchgeführten Genomsequenzierung von *B. petrii* ergaben, dass auch in diesem Umweltisolat ein dem *bvgA* orthologes Gen vorhanden ist. Das Vorhandensein der Gene *ompA*, *risA* und *bvgA* bei allen bislang bekannten *Bordetella*-Arten, sowie die Beobachtung, dass zwei dieser Gene, *ompA* und *risA*, ebenso bei der nah verwandten Art *A. xylosoxidans* nachgewiesen werden konnten, lässt die Vermutung zu, dass es sich hierbei um sehr alte Gene handelt, die bereits in einem der Familie *Alcaligenaceae* gemeinsamen Vorfahren vorhanden waren. Die Tatsache, dass

diese Gene sowohl bei dem Umweltisolat *B. petrii* als auch bei dem obligat humanpathogenen Erreger *B. pertussis* vorhanden sind, deutet zudem daraufhin, dass das Vorhandensein dieser Gene in beiden von diesen Organismen besetzten ökologischen Nischen von Bedeutung ist. Die ubiquitäre Verbreitung von *RisA*, dem Regulatorprotein eines Zwei-Komponentensystems, das u.a. für die Resistenz gegenüber oxidativen Stress benötigt wird (Jungnitz *et al.*, 1998), könnte demnach nicht nur für den obligat mikroaeroben Keim *B. pertussis*, sondern auch für einen Keim wie *B. petrii*, der fakultativ anaerob wächst und die Sauerstoffkonzentration der Luft zumindest tolerieren muss, erforderlich sein. Die hohen Übereinstimmungen zwischen den einzelnen *RisA*- und *OmpA*-Proteinsequenzen deuten zudem daraufhin, dass die Konservierung dieser Proteine für ihre Funktionalität unbedingt erforderlich ist. Einen weiteren Hinweis auf diesen evolutionären Druck liefert ebenso die Beobachtung, dass der ermittelte Bereich der *BvgA*-Proteinsequenzen, trotz starker Variabilität zwischen den *bvgA*-Sequenzen der „klassischen“ und der „neuen“ Arten, stark konserviert geblieben ist.

1.2 Phylogenetische Einordnung der „neuen“ *Bordetella*-Arten in die Gattung *Bordetella*

Für die drei „klassischen“ Arten *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* und *B. parapertussis* konnte bereits seit längerem eine sehr enge verwandtschaftliche Beziehung nachgewiesen werden (Müller and Hildebrandt, 1993; Dobrogosz *et al.*, 1979; van der Zee *et al.*, 1997). Auch über ihre evolutionären Beziehungen untereinander ist bereits einiges bekannt. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass humane *B. parapertussis*-Isolate eine sehr viel engere verwandtschaftliche Beziehung zu den tierpathogenen *B. bronchiseptica*-Stämmen besitzen als zu dem ebenfalls humanpathogenen Erreger *B. pertussis* (van der Zee *et al.*, 1996, 1997; Yuh *et al.*, 1998). Man vermutet deshalb, dass es sich bei *B. pertussis* und *B. parapertussis* um direkte Abkömmlinge von unterschiedlichen *B. bronchiseptica*-Stämmen handelt (Gross *et al.*, 1989c; Gerlach *et al.*, 2001; Parkhill *et al.*, 2003).

In Übereinstimmung mit dieser Vermutung ist die im Rahmen dieser Arbeit getätigte Beobachtung, dass sämtliche von Barbara Middendorf (1999) über eine Repräsentative Differenzanalyse (RDA) identifizierten, *B. bronchiseptica*-spezifischen RDA-Fragmente auch in dem humanpathogenen Erreger *B. parapertussis* P14, nicht aber bei dem *B. pertussis*-Stamm TI identifiziert werden konnten. Ebenso konnte mit Ausnahme des *B. bronchiseptica*-spezifischen RDA-Fragments „*BamF*“ kein *B. pertussis*- bzw. *B. bronchiseptica*-spezifisches DNA-Fragment bei den „neuen“ *Bordetella*-Arten identifiziert werden (siehe Abb. 10). Bei diesen RDA-Fragmenten, die vorwiegend Homologien zu putativen Stoffwechselgenen besitzen, könnte es sich demnach, im Gegensatz zu *ompA*, *risA* und *bvgA*, um relativ junge Gene handeln, die noch nicht in einem den *Bordetella*-Arten gemeinsamen Vorfahren vorhanden waren. Möglich wäre jedoch auch, dass die „neuen“ Arten diese biochemischen Aktivitäten nicht mehr benötigen und deshalb diese Gene im Laufe der Evolution verloren haben. Der Verlust von metabolischen Fähigkeiten wurde auch für den obligat humanpathogenen Erreger *B. pertussis* beschrieben (Schneider *et al.*, 2002; Parkhill *et al.*, 2003).

Eine Ausnahme zu den oben genannten DNA-Fragmenten stellt das *B. bronchiseptica*-spezifische DNA-Fragment „*BamF*“ dar, welches zwar nicht in *B. pertussis* und *B. avium*, jedoch in *B. parapertussis*, *B. holmesii*, *B. hinzii* und *B. trematum* nachgewiesen werden konnte. Dieses DNA-Fragment, das Homologien zu Genen für einen Nitrat-Transporter besitzt, könnte in Zukunft eine wichtige Bedeutung bei der Diagnose und der Unterscheidung von *B. avium*- bzw. *B. hinzii*-Infektionen in Geflügel haben.

Aufgrund seiner zunehmenden Bedeutung als humanpathogener Erreger ist die Stellung von *B. holmesii* innerhalb der Gattung *Bordetella* sowie seine phylogenetische Beziehung zu dem

B. bronchiseptica-Cluster von besonderem Interesse. Der in Abbildung 1 dargestellte phylogenetische Stammbaum der Gattung *Bordetella* weist *B. holmesii* eine Position innerhalb des *B. bronchiseptica*-Clusters in direkter Nachbarschaft von *B. pertussis* zu (Weyant *et al.*, 1995). Diese phylogenetische Einordnung stimmt zwar mit der Beobachtung überein, dass zwei der für das *B. bronchiseptica*-Cluster beschriebene IS-Elemente, IS481 und IS1001, auch bei *B. holmesii*, jedoch nicht bei den anderen *Bordetella*-Arten und *A. xylooxidans* nachgewiesen werden konnten. Auf der anderen Seite scheint die systematische Stellung dieser Art bei dem Vergleich von anderen Faktoren nicht so eindeutig zu sein. So weist *B. holmesii* bei der vergleichenden Analyse der ermittelten OmpA- und BvgA-Sequenzen überraschenderweise viel mehr Ähnlichkeit zu den „neuen“ Arten auf und ist in diesem Zusammenhang phylogenetisch eher im Umfeld von *B. avium* bzw. *B. hinzii* anzusiedeln. Diese auffälligen Parallelen zu *B. avium* stimmen mit der Beobachtung überein, dass die Zusammensetzung der Membranlipide von *B. holmesii* im wesentlichen mit dem CFA (cellular fatty acid)-Profil dieser tierpathogenen Art übereinstimmt (Weyant *et al.*, 1995). Auch die vergleichende Analyse der GyrB-Sequenzen konnte die von den 16S rDNA-Sequenzen abgeleitete enge verwandtschaftliche Beziehung zwischen *B. holmesii* und dem *B. bronchiseptica*-Cluster nicht bestätigen (von Wintzingerode *et al.*, 2002). Die genaue phylogenetische Zuordnung von *B. holmesii* innerhalb der Gattung *Bordetella* bleibt deshalb nach wie vor fraglich. Die Daten deuten daraufhin, dass sich die *bvgA*-, *ompA*-, *gyrB*- und 16S rDNA-Gene an sehr unterschiedliche evolutionäre Anforderungen angepasst haben. Fakt ist jedoch, dass die 16S rRNA nicht einem Anpassungsdruck an verschiedene Lebensumstände unterworfen ist, wie es bei Membranproteinen oder bei Zwei-Komponentensystemen möglicherweise der Fall ist. Deshalb erfüllt die 16S rRNA eher die Anforderungen eines phylogenetischen Markers.

2 Identifizierung und Charakterisierung der phasenvarianten *B. holmesii*-Stämme ATCC51541 und No1

Da *B. holmesii* mit Sepsisfällen und dem Keuchhusten ähnlichen Symptomen in Verbindung gebracht wurde, ist seine Erforschung vor allem von humanmedizinischer Bedeutung. Eine interessante Beobachtung war, dass dieser Organismus über ein Zwei-Komponentensystem (BvgAS_{BH}) verfügt, das Homologie zu dem Hauptregulator des Virulenzgenregulons aus *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* besitzt.

Bei der Charakterisierung von vier unterschiedlichen *B. holmesii*-Blutisolaten wurden zwei phasenvariante *B. holmesii*-Stämme identifiziert, unter denen sich neben dem *B. holmesii*-Isolat No1 auch der bei der Deutschen Stammsammlung hinterlegte *B. holmesii*-Referenzstamm ATCC51541 befindet. Diese varianten Isolate unterscheiden sich hinsichtlich ihrer fehlenden Expression des intakten Response-Regulators BvgA von den *B. holmesii*-Stämmen G7702 und G8341 (siehe Abb. 13). Über einen Sequenzvergleich der einzelnen *bvgA_{BH}*-Gene konnte gezeigt werden, dass bei beiden phasenvarianten Stämmen eine Punktmutation innerhalb der *bvgA_{BH}*-Nukleotidsequenz vorliegt (siehe Abb. 12). Diese Punktmutation, die in beiden Fällen an der selben Stelle auf die Insertion eines Adenosinrestes zurückzuführen ist, führt zu einer Verschiebung des Leserahmens und in folge dessen zu einem verfrühten Stoppcodon.

Punktmutationen werden neben größeren Veränderungen in der DNA-Struktur (wie z. B. Deletionen, Inversionen, Translokationen) als Hauptursache für eine Phasenvariation bei Bakterien angesehen (Seifert and So, 1988). Meist finden diese Punktmutationen vor allem in Bereichen des Chromosoms statt, die durch mehrere Wiederholungen einer bestimmten Base gekennzeichnet sind. Während der Replikation kommt es hier oftmals zu einer vorübergehenden Fehlpaarung der Basen und demzufolge zur Insertion bzw. Deletion einer

einigen Base (Roth, 1974). Der entsprechende chromosomale Bereich von *B. holmesii* No1 und ATCC51541 ist jedoch, wie in der Abbildung 12 dargestellt ist, nicht durch eine solche repetitive Sequenz gekennzeichnet, weshalb anzunehmen ist, dass in diesen Fällen die Insertion der Adenosinreste nicht auf diesen Mechanismus zurückzuführen ist. Da beide *B. holmesii*-Stämme unabhängig voneinander aus verschiedenen Blutkulturen isoliert wurden (siehe Material), scheint es sich hier möglicherweise um einen „hot spot“ für eine Frameshift-Mutation zu handeln.

Variante Stämme, die sich hinsichtlich ihres Antigenprofils von wildtypischen Isolaten unterscheiden, wurden auch für *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* und *B. avium* beschrieben (Peppler, 1982; Weiss and Falkow, 1984; Peppler and Schrupf, 1984; Gentry-Weeks *et al.*, 1991). Während für phasenvariante *B. bronchiseptica*-Stämme vorwiegend Deletionen in der Größenordnung von 50-500 bp innerhalb der Nukleotidsequenz des Gens der Sensorkinase BvgS beschrieben wurden (Monack *et al.*, 1989), wurden für variante *B. pertussis*-Stämme Punktmutationen in der *bvgS*-Sequenz verantwortlich gemacht. Bei diesen durch eine Erythromycin-Selektion isolierten Stämmen trat die Insertion eines einzigen Cytosinrestes in einer Region mit sechs Cytosinresten und demnach an einer für eine Frameshift-Mutation typischen Stelle auf (Weiss and Falkow, 1984).

Der Vorteil einer Punktmutation als Ursache der Phasenvariation könnte darin liegen, dass sie im Gegensatz zu einer Deletion wieder zur wildtypischen Sequenz revertieren kann. Interessant wäre demnach zu überprüfen, ob die in *B. holmesii* No1 und ATCC51541 beobachtete Punktmutation stabil ist, oder ob im Laufe von mehreren *in vitro*-Passagen eine Reversion zu der wildtypischen Sequenz beobachtet werden kann. Eine Reversion von phasenvarianten *B. pertussis*-Stämmen konnte *in vitro* in seltenen Fällen beobachtet werden (Weiss and Falkow, 1984; Stibitz *et al.*, 1989).

Aufgrund der fehlenden Erfahrung im Tiermodell ist es derzeit noch nicht möglich eine Aussage darüber zu treffen, ob das BvgAS_{BH}-System bei *B. holmesii*, ähnlich wie bei *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* (Cotter and Miller, 1994; Weiss *et al.*, 1983), für die Ausbildung der virulenten Eigenschaften von Bedeutung ist. Die Tatsache, dass es sich bei den phasenvarianten Stämmen *B. holmesii* No1 und ATCC51541 um klinische Isolate handelt, würde diese Funktion eher ausschließen. Da diese Stämme mit Sicherheit erst einige Male bevor sie in den jeweiligen Stammsammlungen abgelegt wurden auf neue Agarplatten überstrichen wurden, ist nicht zu klären, ob die Frameshift-Mutationen in den *bvgA_{BH}*-Nukleotidsequenzen bereits *in vivo* vorlag.

Einen Hinweis darauf, dass es sich bei dem Phänomen der Phasenvariation möglicherweise nicht ausschließlich um ein Laborartefakt handelt, liefert die Beobachtung, dass zu einem späteren Zeitpunkt des Infektionsverlaufes phasenvariante *B. pertussis*-Stämme aus Keuchhustenpatienten isoliert werden konnten (Lacey, 1960; Kasuga *et al.*, 1954). Obwohl auch hier nicht zu klären ist, wann der Phasenwechsel stattgefunden hat, wurde von Kasuga *et al.* (1954) postuliert, dass nur wildtypische Bakterien, die sich in der Bvg⁺-Phase befinden, in der Lage sind, eine Infektion zu etablieren. Nach einer erfolgreichen Kolonisierung des Wirtsorganismus könnten dann jedoch andere phänotypische Phasen von Bedeutung sein. Man nimmt deshalb an, dass die reversible Phasenvariation ihre Bedeutung darin haben könnte, das Antigenprofil während des Infektionsverlaufes zu variieren, um so das Überleben im Wirt bzw. während der Übertragung auf einen neuen Wirt zu gewährleisten (Weiss and Falkow, 1984). Die Bedeutung der Phasenvariation bei *B. holmesii* bleibt bislang noch ungeklärt. Da es sich bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *B. holmesii*-Stämmen ausschließlich um Blutisolate handelt, die aus Sepsispatienten isoliert wurden, wäre es interessant zu untersuchen, ob sich unter den von Yih *et al.* (1999) beschriebenen Isolaten aus dem Nasenrachenraum ebenfalls variante Stämme befinden.

2.1 Suche nach weiteren Phasenmarkern für *B. holmesii*

Da die Phasenvariation der *B. holmesii*-Stämme No1 und ATCC51541 dazu führt, dass die Expression eines Regulatorproteins beeinträchtigt ist, wurde vermutet, dass dies möglicherweise einen direkten Einfluss auf die Expression von anderen Genen hat, die durch $BvgA_{BH}$ reguliert werden. Weil dies zu der Ausprägung von unterschiedlichen physiologischen bzw. biochemischen Eigenschaften führen kann, wurden die vier unterschiedlichen *B. holmesii*-Isolate näher charakterisiert. Um stammspezifische Unterschiede ausschließen zu können, wurde die $BvgA_{BH}$ -Insertionsmutante *B. holmesii* G7702 $bvgA_{BH}::kan$ in die Untersuchungen miteinbezogen. Die einzelnen Stämme wurden dabei gezielt nach physiologischen Kriterien hin untersucht, die bei *B. bronchiseptica* bzw. *B. pertussis* als Phasenmarker ihre Verwendung finden.

Während schon durch eine einfache phänotypische Betrachtung einer *B. pertussis*- bzw. *B. bronchiseptica*-Einzelkolonie phasenvariante Stämme (große, flache Kolonien) von den wildtypischen Isolaten (kleine, erhabene Kolonien) unterschieden werden können (Peppler, 1982; Peppler and Schruppf, 1984), konnten über die Beurteilung der Koloniemorphologie und des Wachstumsverhaltens keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den einzelnen *B. holmesii*-Stämmen festgestellt werden. Sowohl die wildtypischen Isolate *B. holmesii* G7702 und G8341 als auch die Phasenvarianten *B. holmesii* No1 und ATCC51541 sowie die $BvgA_{BH}$ -Insertionsmutante *B. holmesii* G7702 $bvgA_{BH}::kan$ zeigten auf BG-Blutagarplatten konvex geformte, braun pigmentierte Einzelkolonien gleicher Größe. Ebenso scheint es unter den einzelnen *B. holmesii*-Isolate keinerlei Unterschiede hinsichtlich der Beweglichkeit und der Urease-Aktivität zu geben, da die von Weyant *et al.*, (1995) charakterisierten *B. holmesii*-Isolate G7702, G8341 und ATCC51541 alle als Urease-negativ und unbeweglich beschrieben wurden. Die Beweglichkeit und eine positive Urease-Aktivität sind phänotypische Kennzeichen der Bvg^- -Phase von *B. bronchiseptica* und können für diesen Organismus als Phasenmarker eingesetzt werden (Friedman *et al.*, 2001). Auch die von Najamkepo *et al.*, (2000) in Immunoblots beobachtete phänotypische Diversion einzelner *B. holmesii*-Stämme scheint nicht mit der Expression eines intakten Response-Regulators $BvgA_{BH}$ zu korrelieren, da die mit Hilfe eines *B. bronchiseptica*- und eines *B. holmesii*-spezifischen Patientenserum identifizierte hochmolekulare Proteine sowohl im wildtypischen Stamm G8341 als auch in der Phasenvarianten No1 identifiziert werden konnten. Hierbei handelt es sich vermutlich vielmehr um stammspezifische Unterschiede.

Andere für *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* beschriebene Phasenmarker, wie zum Beispiel die fehlende hämolytische Aktivität (Peppler, 1982; Peppler and Schruppf, 1984) sowie die erhöhte Erythromycinresistenz (Weiss and Falkow, 1984) von Phasenvarianten bzw. die Differenzierung von varianten Stämmen mit Hilfe des Farbstoffes Kongo-Rot (Parton, 1988; Friedmann *et al.*, 2001) konnten bei den *B. holmesii*-Stämmen No1, ATCC51541 und der $BvgA_{BH}$ -Insertionsmutante *B. holmesii* G7702 $bvgA_{BH}::kan$ ebenso nicht festgestellt werden. Sowohl für die wildtypischen *B. holmesii*-Isolate G8341 und G7702 als auch für No1, ATCC51541 und *B. holmesii* G7702 $bvgA_{BH}::kan$ konnten keine hämolytische Aktivität sowie keine offensichtlichen Unterschiede hinsichtlich der Erythromycinsensitivität nachgewiesen werden. Auf Kongo-Rot-haltigen BG-Blutagarplatten verhielten sich alle untersuchten *B. holmesii*-Stämme ähnlich wie die *B. pertussis*-Phasenvariante BP 359 und waren demnach nicht in der Lage den Farbstoff zu binden.

Da sich die wildtypischen *B. holmesii*-Isolate somit in keinerlei Hinsicht von den phasenvarianten Stämmen bzw. der $BvgA_{BH}$ -Insertionsmutante *B. holmesii* G7702 $bvgA_{BH}::kan$ unterscheiden, wäre es denkbar, dass ihr $BvgA_{BH}$ -System unter den gewählten Kulturbedingungen nicht vollständig aktiv ist und sich die wildtypischen Stämme deshalb ähnlich wie phasenvariante Bakterien verhalten, bei denen das $BvgA_{BH}$ -System inaktiv ist. Dagegen spricht jedoch die Beobachtung, dass für *B. holmesii* G7702 (pMMB208- $bvgA_{BH}$ up-

gfp) im Vergleich zu *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) eine stärkere Aktivität der *bvgA_{BH}up-gfp*-Reporterfusion nachgewiesen werden konnte.

Neben den oben beschriebenen physiologischen Unterschieden ist bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters durch die fehlende Expression des BvgAS-Systems auch die Expression ihrer Virulenzfaktoren beeinträchtigt (Weiss and Falkow, 1984; Monack 1989). Bislang konnte jedoch mit Hilfe von Immunoblots kein für das *B. bronchiseptica*-Cluster bekannter Virulenzfaktor bei *B. holmesii* identifiziert werden. Dies mag vielleicht darauf zurückzuführen sein, dass viele Untersuchungen möglicherweise ausschließlich mit dem *B. holmesii*-Referenzstamm ATCC51541 und somit mit einer Phasenvariante durchgeführt wurden, oder aber, dass das verwendete Serum nicht mit dem entsprechenden Faktor aus *B. holmesii* kreuzreagiert. Denkbar wäre darüber hinaus auch, dass es ähnlich wie bei dem Response-Regulator BvgA_{BH} zu einer Degeneration der Nukleotidsequenzen gekommen ist und demzufolge PCR-Analysen zum Nachweis dieser Faktoren bislang erfolglos geblieben sind, obwohl ein entsprechend orthologes Gen vorhanden ist.

Vor kurzem konnte für *B. avium* über eine Mutagenese mit einem Tn5-Derivat, mit dessen Hilfe Transkriptionsfusionen mit einem promotorlosen *gfp*-Reporter gen erzeugt werden können, ein dem *phaB*-Gen der „klassischen“ Arten orthologes Gen identifiziert werden (Marr, 2002). Auch hier waren Immunoblots mit einem anti-FhaB-Antiserum und DNA-Hybridisierungs-Experimente zunächst negativ verlaufen. In der Tat deuten nun erste Ergebnisse daraufhin, dass auch *B. holmesii* für einen dem *phaB* der „klassischen“ Arten verwandten Faktor kodiert (Stefanie Link, persönliche Mitteilung). In der Zukunft soll deshalb mit Hilfe von Expressionsstudien untersucht werden, ob dieses dem *phaB* orthologe Gen durch das BvgAS_{BH}-System von *B. holmesii* reguliert wird und ob dieser Faktor demzufolge als Marker eingesetzt werden kann um wildtypische *B. holmesii*-Isolate von phasenvarianten *B. holmesii*-Isolaten zu unterscheiden. Zudem bietet es sich an, gezielt über 2D-Gelelektrophorese-Experimente nach Proteinen zu suchen, die von *B. holmesii* G7702 bzw. *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* unterschiedlich reguliert werden.

3 Charakterisierung des BvgAS_{BH}-Zwei-Komponentensystems von *B. holmesii*

3.1 *In silico*-Charakterisierung des BvgAS_{BH}-Systems aus *B. holmesii*

Mit Hilfe von degenerierten Primern konnte im Rahmen dieser Arbeit für *B. holmesii* ein dem *bvgA* der „klassischen“ Arten orthologes Gen identifiziert werden. Über die Sequenzierung der sich anschließenden DNA-Bereiche konnte stromabwärts des *bvgA_{BH}*-Stoppcodons ein weiterer Leserahmen identifiziert werden, der Homologien zu dem *bvgS*-Gen der „klassischen“ Arten besitzt. Während die Konservierung der BvgA- und BvgS-Aminosäuresequenzen aus *B. holmesii* und *B. pertussis* relativ hoch ist, findet sich erstaunlicherweise kaum Konservierung auf der Ebene der *bvgA*- und *bvgS*-DNA-Sequenzen. Dies erklärt, warum dieser Genlocus zuvor nicht durch DNA-Hybridisierungs-Experimente mit einer *bvgA*- bzw. *bvgS*-DNA-Sonde aus *B. pertussis* nachgewiesen werden konnte.

Die von den *bvgAS*-Loci kodierten Proteine BvgA und BvgS gehören zu der Familie der Zwei-Komponentensysteme, die in Prokaryonten weit verbreitet sind und die für die globale Regulation in Abhängigkeit von äußeren Signalen verantwortlich sind (Gross *et al.*, 1989a; Stock *et al.*, 1990; Arico *et al.*, 1989). Diese Signaltransduktionssysteme setzen sich im allgemeinen aus einem in der Membran eingebauten Sensorprotein und einem cytoplasmatischen Regulatorprotein zusammen. Die Verwandlung eines Umweltsignals in ein zelluläres Signal erfolgt über den hochspezifischen Ablauf von Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen. Da dieses Prinzip unter allen Zwei-Komponentensystemen

konserviert ist, zeichnen sich die Protein-Domänen, die eine Kinase- oder DNA-bindende-Aktivität besitzen, im allgemeinen durch einen hohen Konservierungsgrad aus (Pao and Saier Jr., 1995; Arico *et al.*, 1991). Dementsprechend konnte bei einer genauen Analyse der Proteinsequenzen gezeigt werden, dass die cytoplasmatischen Bestandteile mit potentieller Kinase- ($BvgS_{\text{cyt}}$) und DNA-binde-Aktivität ($BvgA_{\text{out}}$), aber auch die Receiver-Domänen der Response-Regulatoren ($BvgA_{\text{receiv}}$) zwischen dem $BvgAS$ - und dem $BvgAS_{\text{BH}}$ -System hoch konserviert sind (siehe Tabelle 4). Im Gegensatz dazu zeigen andere Proteinbereiche dieser Zwei-Komponentensysteme ein hohes Maß an Variabilität. Dies wird zum einen bei dem Vergleich der periplasmatischen, sensorischen Domäne von $BvgS$ und $BvgS_{\text{BH}}$, zum anderen im Bereich der $BvgA$ -Linkerstrukturen deutlich, welche die Receiver- mit der Output-Domäne des Response-Regulators verbindet. Überraschenderweise zeigt *B. holmesii* trotz der durch die 16S rDNA-Sequenz begründeten nahen Verwandtschaft zu *B. pertussis* eine erstaunlich hohe Übereinstimmung mit dem vor kurzem identifizierten $BvgAS$ -System aus *B. avium* (Spears *et al.*, 2003). Anscheinend ist die Konservierung der $BvgAS$ -Sequenzen zwischen den „neuen“ Arten besonders stark ausgeprägt, da ähnliche Ergebnisse auch für *B. hinzii* und *B. trematum* beobachtet werden konnten (Simone Janzen, persönliche Mitteilung). Die leichten Abweichungen in den einzelnen $BvgA$ - bzw. $BvgS$ -Proteinsequenzen könnten daraufhin weisen, dass jede einzelne Art danach strebt, die Funktionsweise seines $BvgAS$ -Systems möglichst optimal an seine eigene Bedürfnisse anzupassen. In dieser Hinsicht wäre anzunehmen, dass die $BvgAS$ -Systeme aus *B. holmesii* und *B. avium* möglicherweise eine ähnliche Funktion ausüben. Für *B. avium* weisen erste Ergebnisse daraufhin, dass das $BvgAS$ -System, ähnlich wie bei den Vertretern des *B. bronchiseptica*-Clusters, an der Ausbildung der virulenten Eigenschaften beteiligt ist, da Mutationen in *bvgS* zu einem avirulenten Phänotyp im Tiermodell führen (Spears *et al.*, 2003). Für *B. holmesii* stehen bislang aufgrund der fehlenden Erfahrung im Tiermodell noch keine derartigen Daten zur Verfügung.

	$BvgA_{\text{receiv}}$	$BvgA_{\text{out}}$	$BvgA_{\text{link}}$	$BvgS_{\text{cyt}}$	$BvgS_{\text{peri}}$
<i>B. holmesii</i> ↔ <i>B. pertussis</i>	76,2%	85,9%	33,3%	52,9%	39,5%
<i>B. avium</i> ↔ <i>B. pertussis</i>	74,6%	87,5%	30,8%	51,7%	35,2%
<i>B. holmesii</i> ↔ <i>B. avium</i>	90,6%	98,5%	92,9%	66,4%	58,2%

Tabelle 4: Prozentuale Identität zwischen den Proteinsequenzen der $BvgA$ -Receiver-Domäne ($BvgA_{\text{receiv}}$), der $BvgA$ -Output-Domäne ($BvgA_{\text{out}}$), der $BvgA$ -Linker-Domäne ($BvgA_{\text{link}}$), der cytoplasmatischen Region von $BvgS$ ($BvgS_{\text{cyt}}$) und der periplasmatischen Region von $BvgS$ ($BvgS_{\text{peri}}$) *B. holmesii*, *B. pertussis* und *B. avium*. Die $BvgA$ -Receiver-Domäne von *B. avium* und *B. holmesii* erstreckt sich von Aminosäure 1-128, der $BvgA$ -Linker von *B. avium* und *B. holmesii* erstreckt sich von Aminosäure 129- 142 und die $BvgA$ -Output-Domäne von Aminosäure 144-207. Die $BvgA$ -Receiver-Domäne von *B. pertussis* erstreckt sich von Aminosäure 1-129, der $BvgA$ -Linker erstreckt sich von Aminosäure 130- 144 und die $BvgA$ -Output-Domäne von Aminosäure 145-209.

Die ubiquitäre Verbreitung und Konservierung des $BvgAS$ -Systems deutet daraufhin, dass dieses Zwei-Komponentensystem bereits in einem Vorläufer der pathogenen Bakterien vorhanden war. Da man vermutet, dass es sich bei diesem Vorläufer um ein Umweltbakterium gehandelt hat, könnte dieses System ursprünglich für die Regulation von „Housekeeping“-Genen verantwortlich gewesen sein (Gerlach *et al.*, 2001). Hierfür spricht zum einen die Beobachtung, dass man bei dem Umweltisolat *B. petrii* ebenfalls zu dem *bvgA*- und *bvgS*-Gen der „klassischen“ *Bordetella*-Arten homologe Gene identifizieren konnte (Roy Gross, persönliche Mitteilung), zum anderen die Tatsache, dass durch das $BvgAS$ -System nach wie vor einige wichtige Haushaltsfunktionen der Bakterienzelle reguliert werden. So konnte zum einen gezeigt werden, dass die Sensorkinase $BvgS$ aus *B. pertussis* über sein

Vermögen den Oxidationsstatus von Ubichinon wahrzunehmen, wahrscheinlich direkt mit der Atmungskette und damit mit dem Energiezustand der Zelle verknüpft ist (Bock *et al.*, 2002). Für diese Verbindung spricht auch die Beobachtung, dass die Zusammensetzung der terminalen Oxidase der Atmungskette reziprok durch das BvgAS-System kontrolliert wird. Während die Cytochrom-Oxidase d zu den *vag*-Genen zählt, wird die Cytochrom-Oxidase c nur unter modulierenden Bedingungen exprimiert (Cotter and DiRita, 2000). Vor kurzem konnte zudem gezeigt werden, dass zu dem *vrg*-Regulon aus *B. bronchiseptica* noch weitere Gene mit metabolischen Funktionen gehören, von denen *B. pertussis* aufgrund seiner Spezialisierung auf einen einzigen Wirtsorganismus einige wieder verloren hat (Schneider *et al.*, 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten auch interessante Unterschiede zwischen dem BvgAS-System und dem BvgAS_{BH}-System hinsichtlich der chromosomalen Lokalisation der *bvgAS*-Loci aufgedeckt werden. So konnte gezeigt werden, dass sich der *bvgA*_{BH}-Locus im Gegensatz zu *B. pertussis* und den anderen Vertretern des *B. bronchiseptica*-Clusters (Stibitz *et al.*, 1988) nicht in direkter Nachbarschaft zu einem *phaB*-homologen Genlocus befindet. Stattdessen findet sich an dieser Stelle ein weiterer Leserahmen der Homologien zu dem potentiellen Response-Regulator PA3947 (Genebank-Nummer: C38151) aus *Pseudomonas* besitzt und der in die gleiche Richtung wie das *bvgAS*_{BH}-Genpaar transkribiert wird. Darüber hinaus konnte bei *B. holmesii* stromaufwärts von *bvgS* kein dem *bvgR*-Gen der „klassischen“ Arten homologes Gen identifiziert werden (Merkel, 1995, 1998a). Während die chromosomale Lokalisation des *bvgAS*-Locus aus *B. holmesii* somit deutlich von der des *B. bronchiseptica*-Clusters abweicht, scheint sie unter den „neuen“ *Bordetella*-Arten wieder konserviert zu sein, da die gleiche Situation für *B. avium*, *B. hinzii* und *B. trematum* beobachtet wurde (Spears *et al.*, 2003; Simone Janzen, persönliche Mitteilung). Zwar wurde von Spears *et al.* (2003) für *B. avium* stromaufwärts des *bvgA*-Gens ein Leserahmen mit Homologie zu dem Response-Regulator VieA aus *Vibrio cholerae* identifiziert, bei einer genauen Überprüfung dieses Sequenzabschnittes konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich hierbei um eine ungenaue Annotation handelt und sich in der Tat auch bei *B. avium* ein Leserahmen mit Homologien zu dem putativen Response Regulator PA3947 in 5'-Richtung an *bvgA* anschließt (http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_avium/).

3.2 Funktionelle Charakterisierung des BvgAS_{BH}-System aus *B. holmesii*

Bei der funktionellen Charakterisierung des BvgAS_{BH}-Systems aus *B. holmesii* wurde schwerpunktmäßig untersucht, ob einige der für das BvgAS-System aus *B. pertussis* bekannten Eigenschaften ebenso bei dem verwandten Zwei-Komponentensystem vorkommen bzw. von ihm übernommen werden können.

Von den Vertretern des *B. bronchiseptica*-Clusters ist bekannt, dass das BvgAS-Zwei-Komponentensystem seine Bedeutung u.a. darin hat, während der Bvg⁺-Phase für die Aktivierung der Virulenzgene zu sorgen (Gross *et al.*, 1989a; Arico *et al.*, 1989). Dies geschieht auf molekularer Ebene dadurch, dass es nach Aktivierung des BvgAS-Systems zu einer Autophosphorylierung der Histidinkinase BvgS und in Folge dessen zu einer Transphosphorylierung auf BvgA kommt. Die phosphorylierte Form des Response-Regulators bindet daraufhin mit einer erhöhten Affinität an die Promotorregion der Virulenzgene und induziert zusammen mit der RNA-Polymerase deren Transkription. (Boucher *et al.*, 1994; Steffen *et al.*, 1996)

Wie über Analysen mit dem BESTFIT-Programm (Altschul *et al.* 1997) gezeigt werden konnte, sind die Proteinsequenzen der Response-Regulatoren BvgA und BvgA_{BH} sehr stark konserviert. Dies gilt vor allem innerhalb der Output-Domäne, die über seine HTH-Struktur für die DNA-Bindung verantwortlich ist. Trotz dieses extrem hohen Konservierungsgrades

konnte in Gelretardationsexperimenten keine Bindung des BvgA_{BH}-Proteins an die *fhaB*-Promotorsequenz aus *B. pertussis* beobachtet werden (siehe Abb. 24A). Die ausbleibende DNA-Bindung des BvgA_{BH}-Proteins kann sehr unterschiedliche Ursachen haben. Eine Möglichkeit wäre, dass der Response-Regulator in einer inaktiven Form vorliegt. Viele Response-Regulatoren können auch unabhängig von ihrer zugehörigen Histidinkinase in Anwesenheit von niedrig-molekularen Phospho-Donatoren, wie Phosphoamidat oder Acetylphosphat, die eigene Phosphorylierung katalysieren und so die für eine DNA-Bindung erforderliche Konformation einnehmen (Lukat *et al.*, 1992). So konnte zum Beispiel erst nach einer *in vitro*-Phosphorylierung des gereinigten BvgA-Proteins aus *B. pertussis* nachgewiesen werden, dass dieser Response-Regulator an die *ptx*-Promotorregion bindet (Boucher and Stibitz, 1995). Obwohl durch vorausgegangene *in vitro*-Phosphorylierungsexperimente eindeutig gezeigt werden konnte, dass das BvgA_{BH}-Protein mit einer mit dem BvgA-Protein aus *B. pertussis* vergleichbaren Effizienz (Daten nicht gezeigt) durch Acetylphosphat *in vitro* phosphoryliert werden kann, konnte auch nach der Inkubation des BvgA_{BH}-Proteins mit Acetylphosphat keine Bindung von BvgA_{BH} an den *fhaB*-Promotor nachgewiesen werden. Die Gelretardationsexperimente wurden unter Pufferbedingungen durchgeführt, unter denen das BvgA-Protein aus *B. pertussis* im Rahmen dieser Arbeit eine eindeutige Bindung an die *fhaB*-Promotorsequenz zeigt (siehe Abb. 24B). Möglich wäre, dass diese Bedingungen, welche optimal auf die DNA-Bindeeigenschaften des Response-Regulators aus *B. pertussis* abgestimmt sind, nicht die DNA-Bindung von BvgA_{BH} an die *fhaB*-Promotorregion unterstützen.

Da es sich bei dem für die Experimente eingesetzten Response-Regulator aus *B. holmesii* nicht wie im Fall von BvgA um ein natives Protein, sondern um das entsprechende His₆-Fusionsprotein handelt, wäre es auch denkbar, dass es durch dieses N-terminale „His₆-tag“ zu einer leichten Veränderung in der Raumstruktur des Proteins kommt, welche die DNA-Bindung an die *fhaB*-Promotorregion verhindert. Eine vollständige Maskierung der C-terminalen Output-Domäne von His₆-BvgA_{BH} kann in diesem Zusammenhang jedoch ausgeschlossen werden, da seine DNA-bindende Aktivität durch die in DNaseI-Footprint-Experimenten ermittelte Bindung an die *bvgA_{BH}up*-Region eindeutig nachgewiesen werden konnte (siehe hierzu auch in diesem Abschnitt Kapitel 3.3). Zudem wäre auch denkbar, dass die Response-Regulatoren von *B. holmesii* und *B. pertussis* an sehr unterschiedliche Zielsequenzen binden und demzufolge das BvgA_{BH}-Protein nicht an die für *B. pertussis* beschriebenen Erkennungssequenzen innerhalb der *fhaB*-Promotorsequenz binden kann. Die Promotorregionen der Virulenzgene aus *B. pertussis* enthalten bekanntermaßen als BvgA-Bindestelle die Konsensussequenz 5′-T/A T T C C/T T A-3′ oder Varianten davon (Roy and Falkow, 1991; Karimova and Uhlmann, 1997; Marques and Carbonetti, 1997).

Da über *in silico*-Analysen gezeigt werden konnte, dass sich innerhalb der *bvgA_{BH}up*-Region mehrere Sequenzmotive befinden, die dieser BvgA-Konsensussequenz in der Tat sehr ähnlich sind, und da über DNaseI-Footprint-Experimente und Expressionsstudien mit Hilfe der *bvgA_{BH}up-gfp*-Reporterfusion im Rahmen dieser Arbeit weiterhin nachgewiesen werden konnte, dass das BvgA_{BH}-Protein *in vitro* und *in vivo* an diese Region binden kann, ist es eher unwahrscheinlich, dass der Response-Regulator BvgA_{BH} an eine von der BvgA-Konsensussequenz vollständig abweichenden Zielsequenz bindet. Vielmehr deuten die Ergebnisse daraufhin, dass die ausbleibende DNA-Bindung darauf zurückzuführen ist, dass die Zielsequenzen des BvgA_{BH}-Response-Regulator eine andere Symmetrie bzw. eine andere relative Anordnung zueinander besitzen (siehe hierzu auch in diesem Abschnitt Kapitel 3.3).

Einen Hinweis darauf, dass das BvgA_{BH}-Protein aus *B. holmesii* auch *in vivo* nicht in der Lage ist, an die Promotorsequenzen der Virulenzgene aus *B. pertussis* zu binden, liefert zudem die Beobachtung, dass der avirulente *B. pertussis* Stamm 359, bei dem der *bvgAS*-Locus durch eine Tn5-Insertion innerhalb des *bvgA*-Gens inaktiviert ist (Weiss and Falkow, 1984), nicht durch den *bvgAS_{BH} G7702*-Locus aus *B. holmesii* G7702 komplementiert werden

kann. Eine Komplementation zum wildtypischen Phänotyp konnte dabei nur für den *B. pertussis*-Stamm 359 gezeigt werden, der mit dem wildtypischen *bvgAS*-Locus *in trans* komplementiert wurde (siehe Abb. 25B, 26A, 27). Während avirulente *B. pertussis*- und *B. bronchiseptica*-Stämme aufgrund der hohen Konservierung ihrer BvgAS-Systeme (Arico *et al.*, 1991; Heininger *et al.*, 2002) auch durch den *bvgAS*-Locus der jeweils anderen Art komplementiert werden können (Monack *et al.*, 1989; Martinez de Tejada *et al.*, 1996), scheint das BvgAS_{BH}-System aus *B. holmesii* G7702 nicht die Funktion des in *B. pertussis* 359 mutierten *bvgAS*-Locus übernehmen zu können. Die in *BP* 359 (pRK415-*bvgAS*_{BH G7702}) beobachtete ausbleibende Aktivierung der Virulenzgen-expression könnte jedoch auch damit erklärt werden, dass das BvgAS_{BH G7702}-System in dem *B. pertussis* Stamm *BP* 359 (pRK415-*bvgAS*_{BH G7702}) in einer nicht phosphorylierten, inaktiven Form vorliegt. Dagegen spricht jedoch die Beobachtung, dass in dem hybriden *B. pertussis*-Stamm *BP* 347 (pRK415-*bvgAS*_{BH ATCC51541}), der neben der Histidinkinase BvgS_{BH ATCC51541} aus *B. holmesii* seinen wildtypischen Response-Regulator BvgA exprimiert, eine Komplementation zum wildtypischen Phänotyp beobachtet werden konnte (siehe Abb. 25B, 26B, 27). Da der *bvgA*_{BH ATCC51541}-Leserahmen aufgrund einer Frameshift-Mutation zerstört ist, kann die Reversion dieses Stammes nur damit erklärt werden, dass ein Phosphotransfer von einem aktivierten BvgS_{BH ATCC51541}-Protein auf den wildtypischen Response-Regulator BvgA stattfindet. Da die Sensorkinase BvgS_{BH ATCC51541} somit in *BP* 347 (pRK415-*bvgAS*_{BH ATCC51541}) in einer phosphorylierten, aktiven Form vorliegen muss, kann man annehmen, dass das BvgAS_{BH G7702}-System in *BP* 359 (pRK415-*bvgAS*_{BH G7702}) auch in einer aktivierten Form vorliegt. Die Ergebnisse deuten demnach daraufhin, dass die geringen Abweichungen innerhalb der Proteinsequenzen der Output-Domänen dafür verantwortlich sind, dass der Response-Regulator BvgA_{BH} aus *B. holmesii* *in vivo* nicht an die *fhaB*- und *cya*-Promotorregionen aus *B. pertussis* binden kann und deshalb die Funktion des BvgA-Proteins als Transkriptionsaktivator der Virulenzgene in *B. pertussis* nicht übernehmen kann.

Weitere funktionelle Unterschiede zwischen dem BvgAS- und dem BvgAS_{BH}-System konnten in Bezug auf die Signalwahrnehmung festgestellt werden. Mit Hilfe des hybriden *B. pertussis*-Stammes *BP* 347 (pRK415-*bvgAS*_{BH ATCC51541}) konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des BvgS_{BH} Proteins im Vergleich zu der Histidinkinase aus *B. pertussis* nur im geringen Umfang durch Magnesiumsulfat moduliert werden kann (Abb. 28). Unterschiede hinsichtlich der Signalwahrnehmung wurden auch zwischen den BvgS-Proteinen aus *B. bronchiseptica* und *B. pertussis* beobachtet (Martinez de Tejada *et al.*, 1996). Zwar wird das BvgAS-System aus *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* *in vitro* gleichermaßen durch Magnesiumsulfat, Nikotinsäure oder niedrige Temperaturen inaktiviert (Pepler and Schrupf, 1984; Idigbe *et al.*, 1981; Melton and Weiss, 1989), jedoch scheint das BvgAS-System aus *B. pertussis* weniger sensitiv auf diese modulierende Signale zu reagieren. Mit Hilfe eines hybriden *B. bronchiseptica*-Stammes, der den *bvgAS*-Locus aus *B. pertussis* trägt, konnte gezeigt werden, dass für eine effektive Inaktivierung des BvgAS-Systems aus *B. pertussis* eine höhere Konzentration an Magnesiumsulfat und Nikotinsäure notwendig ist (Martinez de Tejada *et al.*, 1996). Man vermutet, dass die unterschiedlichen Sensitivitäten dieser Sensorkinasen durch Sequenzunterschiede innerhalb der Proteinsequenz der periplasmatischen sensorischen Domäne der ansonsten hochkonservierten Histidinkinasen hervorgerufen wird (Arico *et al.*, 1991; Martinez de Tejada *et al.*, 1996). Da es zwischen den periplasmatischen Bereichen von BvgS und BvgS_{BH} ein sehr hohes Maß an Variabilität beobachtet wurde, ist anzunehmen, dass auch hier die Sequenzvariationen für die unterschiedliche Sensitivität gegenüber Magnesiumsulfat verantwortlich ist. Ob eine noch höhere Konzentration an Magnesiumsulfat für die effektive Inaktivierung der Sensorkinase BvgA_{BH} notwendig ist bzw. mit Hilfe welcher Signale seine Aktivität letztendlich moduliert werden kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Interessanterweise konnte die Expression des *fhaB*-homologen Genlocus in *B. avium* jedoch durch Magnesiumsulfat

moduliert werden (Marr, 2002). Ebenso konnte für *B. avium* gezeigt werden, dass die Expression seines dermonekrotischen Toxins durch Magnesiumsulfat und Nikotinsäure moduliert werden kann (Gentry-Weeks *et al.*, 1991). Obwohl bislang nicht geklärt ist, ob diese Effekte direkt durch das BvgAS_{BA}-System verursacht werden, würde dies bedeuten, dass sich die Sensorkinase aus *B. avium*, im Gegensatz zu der aus *B. holmesii*, nicht hinsichtlich der Signalwahrnehmung von der aus *B. pertussis* unterscheidet. Ungeklärt bleibt, warum das BvgS_{BH}-Protein aus *B. holmesii* diese Eigenschaft nicht besitzt. Da bislang *B. holmesii* noch wenig erforscht und das normale Habitat dieses Organismus nach wie vor nicht bekannt ist, kann man zum heutigen Standpunkt keine Aussage treffen, ob die Sonderstellung hinsichtlich der Signalwahrnehmung eine besondere Überlebensstrategie widerspiegelt.

Ein anderer Bereich der BvgAS-Systeme scheint jedoch überraschenderweise zwischen *B. holmesii* und *B. pertussis* funktionell konserviert zu sein. So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Response-Regulator BvgA_{BH} aus *B. holmesii* *in vitro* durch die Histidinkinase BvgS aus *B. pertussis* phosphoryliert werden kann. Die Beobachtung, dass, wie in Abbildung 23 zu erkennen ist, die Histidinkinase BvgS nach dem Phosphotransfer auf BvgA_{BH} nur noch ein im Vergleich zum Phosphotransfer auf BvgA sehr schwaches Signal auf dem Autoradiogramm zeigt, könnte so gedeutet werden, dass der Phosphotransfer zwischen diesen Proteinen sehr viel effektiver verläuft als zwischen BvgS und BvgA. Da diese Abbildung jedoch die Ergebnisse von zwei getrennt voneinander durchgeführten Experimenten darstellt, ist dies eher unwahrscheinlich. Ebenso scheint auch das BvgS_{BH}-Protein aus *B. holmesii* in der Lage zu sein, den Response-Regulator BvgA aus *B. pertussis* zu aktivieren. Die Beobachtung, dass es in dem hybriden *B. pertussis*-Stamm BP 347 (pRK415-*bvgAS_{BH}* ATCC51541) zu einer Reversion zum wildtypischen Phänotyp kommt, kann, wie bereits erwähnt wurde, nur darauf zurückgeführt werden, dass das wildtypische Regulatorprotein durch die Sensorkinase aus *B. holmesii* phosphoryliert wird. Obwohl die meisten Bakterien eine sehr große Anzahl an unterschiedlichen Zwei-Komponentensystemen besitzen, verläuft die Transphosphorylierung zwischen der Histidinkinase und dem zugehörigen Response-Regulator meist sehr spezifisch ab. Einen „cross talk“ zwischen einer Histidinkinase und einem Response-Regulator aus unterschiedlichen Systemen konnte bislang nur in sehr seltenen Fällen, wie zum Beispiel bei dem ArcAB-System aus *E. coli*, und dabei meist nur unter artifiziellen Bedingungen beobachtet werden (Imamura *et al.*, 1998; Yaku *et al.*, 1997). Obwohl das EvgAS-System aus *E. coli* eine dem BvgAS-System ähnliche Domänenstruktur besitzt und es zwischen den beiden Systeme große Übereinstimmungen innerhalb der Proteinsequenzen gibt (Tanabe *et al.*, 1998), konnte gezeigt werden, dass die Transphosphorylierung ausschließlich zwischen EvgS und EvgA bzw. BvgS und BvgA erfolgt (Perraud *et al.*, 1999, 2000). Da für diese Spezifität die Hpt-Domäne der Sensorkinase verantwortlich gemacht wird (Perraud *et al.*, 1998), würde dies bedeuten, dass die Hpt-Domänen zwischen *B. holmesii* und *B. pertussis* soweit konserviert sind, dass die Transphosphorylierung zwischen der Sensorkinase aus *B. pertussis* und dem Response-Regulator aus *B. holmesii* ermöglicht wird.

3.3 Die Regulation des BvgAS_{BH}-Systems aus *B. holmesii*

Der *bvgAS*-Locus von *B. pertussis* unterliegt einer positiven Autoregulation (Scarlato *et al.*, 1990, 1991b). Wenigstens drei Promotoren regulieren die Transkription des *bvgAS*-Locus (siehe Abb. 4). In der Bvg⁻-Phase erfolgt eine schwache, konstitutive Transkription ausgehend von dem Promotor P2*bvgA*. In der Bvg⁺-Phase wird der *bvgAS*-Locus jedoch von dem starken *bvg*-abhängigen Promotor P1*bvgA* aus transkribiert (Scarlato *et al.*, 1991a). Der Response-Regulator bindet dabei vermutlich als Dimer (Perraud *et al.*, 2000) innerhalb der *bvgA*-Upstreamregion (*bvgAup*) an mehrere Wiederholungssequenzen der Konsensussequenz

5'-T/A T T C C/T T A-3' und dirigiert dadurch die RNA-Polymerase zum Transkriptionsstart. Innerhalb der *bvgAup*-Region sind diese Wiederholungssequenzen sowohl als „direct repeat“- bzw. „inverted repeat“-Strukturen angeordnet. Man vermutet jedoch, dass die „inverted repeat“-Struktur als primäres Erkennungselement für die DNA-BvgA-Interaktion dient (Karimova and Ullmann, 1997). Von den weiteren Promotoren, die in der Bvg^+ -Phase aktiv sind, ist nur P3*bvgA* direkt an der Transkription des *bvgAS*-Locus beteiligt. Ausgehend von Promotor P4*bvgA* erfolgt die Synthese einer Antisense-RNA, deren Funktion bislang jedoch nicht geklärt ist (Scarlato *et al.*, 1991a).

Mit Hilfe von *in silico*-, *in vitro*- und *in vivo*-Analysen wurde die *bvgA_{BHup}*-Region aus *B. holmesii* genauer untersucht. Der Fokus war dabei darauf gerichtet zu untersuchen, ob es Hinweise auf eine Autoregulation des *bvgAS_{BH}*-Locus gibt. Über *in silico*-Analysen der *bvgA_{BHup}*-Region konnten mehrere Sequenzmotive identifiziert werden (siehe Abb. 35), die als „inverted repeat“-Strukturen angeordnet sind und die zum Teil eine hohe Übereinstimmung zu der beschriebenen BvgA-Konsensussequenz 5'-T/A T T C C/T T A-3' besitzen (Boucher *et al.*, 2001b; Karimova *et al.*, 1996; Karimova and Ullmann 1997; Marques and Carbonetti, 1997; Roy and Falkow, 1991). Interessanterweise setzen sich die „inverted repeat“-Strukturen der *bvgA_{BHup}*-Region jeweils aus einer Halbseite mit einer hohen Übereinstimmung zu dem BvgA-Konsensus und einer Halbseite mit einer geringen Übereinstimmung zusammen. Die Beurteilung der einzelnen Sequenzmotive erfolgte dabei anhand des von Merkel *et al.* (2003) aufgestellten Algorithmus zur Identifikation von BvgA-Bindestellen. Dieser Algorithmus berücksichtigt die von Boucher *et al.* (2001b) über Mutations-Analyse getätigten Beobachtungen, dass die Nukleotide an Position 3 (Thymidin), 4 (Cytosin) und 7 (Adenosin) für die Bindung des Response-Regulators BvgA an die *fhaB*-Promotorregion besonders wichtig sind, sowie dass sich eine Veränderung des Thymidins in Position 6 zu einem Adenosin ebenso negativ auf das Bindevermögen auswirkt (Boucher *et al.*, 2001b). Die Halbseite der am weitesten stromabwärts gelegenen „inverted repeat“-Struktur IR1*bvgA_{BHup}* zeigt unter Berücksichtigung dieser Kriterien die höchste Übereinstimmung mit der BvgA-Konsensussequenz aus *B. pertussis*, die Halbseite des 20 bp stromaufwärts davon gelegenen IR2*bvgA_{BHup}* die zweit größte. Die noch weiter stromaufwärts gelegenen „inverted repeat“-Strukturen IR3*bvgA_{BHup}* und IR4*bvgA_{BHup}* besitzen im Gegensatz dazu nur eine geringe Übereinstimmung (siehe hierzu auch Abbildung 29 und 35).

Über *in vitro*-DNaseI-Footprint-Experimente konnte Arbeit gezeigt werden, dass der Response-Regulator BvgA_{BH} spezifisch an ein DNA-Fragment bindet, das diese außergewöhnlichen „inverted repeat“-Strukturen beinhaltet (Abb. 30). Durch die Bindung des BvgA_{BH}-Proteins wird ein ungewöhnlich großer DNA-Bereich der *bvgA_{BHup}* Region (ca. 125 bp) vor dem DNaseI-Verdau geschützt, der sich interessanterweise auf die oben beschriebenen „inverted repeat“-Strukturen beschränkt. Dieser Bereich wird ausschließlich durch die phosphorylierte Form des BvgA_{BH}-Proteins gebunden. Auffällig war zudem, dass innerhalb der vor dem DNaseI-Verdau geschützten Region mit einer Frequenz von 10 bis 11 Nukleotiden hypersensitive Banden auftauchen. Hypersensitive Banden, die mit einer Periodizität von 10,5 Nukleotiden auftauchen, wurden auch während DNaseI-Footprint-Experimenten mit dem Response-Regulator BvgA aus *B. pertussis* und der *ptx*- und *fha*-Promotorregion beobachtet (Boucher *et al.*, 1995, 1997). Man vermutet, dass diese erhöhte Sensitivität gegenüber der DNaseI Behandlung darauf zurückzuführen ist, dass die DNA innerhalb dieser Bereiche um den Protein-Komplex gewickelt ist (Boucher *et al.*, 1997). Da ein relativ großer DNA-Bereich innerhalb der *bvgA_{BHup}*-Region durch die BvgA_{BH}-Bindung vor dem DNaseI-Verdau geschützt wird, ist anzunehmen, dass sich dort mehrere Bindestellen dieses Response-Regulators befinden. Die Tatsache, dass die über *in silico*-Analysen identifizierten „inverted repeat“-Strukturen jeweils 20 bzw. 21 Nukleotide voneinander entfernt sind, würde bedeuten, dass daran gebundene Proteine mit einer Periodizität von

jeweils einer vollständigen Umdrehung alle auf einer Seite der DNA-Helix zu liegen kämen, was den Kontakt zwischen den einzelnen Bvg_{A_{BH}}-Dimeren erleichtern würde. Eine ähnliche Periodizität der BvgA-Bindestellen wurde auch innerhalb der *phaB*-Promotorregion aus *B. pertussis* beschrieben (Boucher *et al.*, 2003). Die Präsenz von mehreren BvgA-Bindestellen wird zudem auch als ein gemeinsames Merkmal von allen *bvg*-abhängigen Promotoren beschrieben. Für die Aktivierung der *bvg*-abhängigen Promotoren ist demnach die Bindung und Oligomerisierung von mehreren BvgA-Molekülen erforderlich (Boucher and Stibitz, 1995; Boucher *et al.*, 1997, 2003; Karimova *et al.*, 1996). Die Tatsache, dass der für die *bvgA_{BHup}*-Region ermittelte, ca. 125 bp große DNA-Bereich bereits ab einer Proteinkonzentration von 180 ng vor dem DNaseI Verdau geschützt ist und die Beobachtung, dass dieser Bereich zudem mit zunehmender Konzentration des Bvg_{A_{BH}}-Proteins auch nicht erweitert wird, deuten daraufhin, dass die Oligomerisierung der einzelnen Bvg_{A_{BH}}-Dimere *in vitro* bereits vor der eigentlichen DNA-Bindung stattgefunden hat. Da die Ansätze mit zunehmender Konzentration des phosphorylierten Bvg_{A_{BH}}-Proteins jedoch länger als für die Dauer von einer Minute mit der DNaseI behandelt werden mussten, scheint die Oligomerisierung soweit zu führen, dass der Bereich für die DNaseI immer schwerer zugänglich ist. Der abrupte Beginn einer Protektion wurde auch während *in vitro*-DNaseI-Footprint-Analysen mit dem Response-Regulator BvgA aus *B. pertussis* und der *ptx*-Promotorregion beschrieben (Zu *et al.*, 1996). Fraglich ist jedoch, ob die Oligomerisierung der Regulatorproteine auch *in vivo* bereits vor der eigentlichen DNA-Bindung stattfindet, oder ob es sich hierbei nicht um Laborartefakte handelt, die auf die vorausgegangene Acetylphosphat-Behandlung der Response-Regulatoren zurückzuführen sind. Demnach wäre es denkbar, dass *in vivo* jeweils nur ein einzelnes Dimer des Response-Regulators Bvg_{A_{BH}} an die DNA-Sequenz bindet und für die Oligomerisierung entlang der Promotorsequenz kooperative Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Molekülen verantwortlich sind, so wie es für andere *bvg*-abhängige Promotoren beschrieben wurde (Boucher *et al.*, 2003).

Man geht in diesem Zusammenhang davon aus, dass es für *B. pertussis* zwei Gruppen von BvgA-Bindestellen gibt. Bindestellen des Response-Regulators, die eine hohe Übereinstimmung mit der BvgA-Konsensussequenz besitzen, werden als „primäre“-Bindestelle angesehen, da das Regulatorprotein mit sehr hoher Affinität an diese Struktur binden kann. Die „sekundären“ Bindestellen befinden sich im allgemeinen weiter stromabwärts, wobei deren Bindung weniger sequenzspezifisch verläuft und durch die Interaktion mit anderen Dimeren und der RNA-Polymerase stabilisiert wird (Bocher *et al.*, 1997; 2001a). Bei den „inverted repeat“-Strukturen IR1*bvgA_{BHup}* und IR2*bvgA_{BHup}* der *bvgA_{BHup}*-Region könnte es sich, aufgrund der hohen Übereinstimmungen zum BvgA-Konsensus, um „primäre“ Bindestellen handeln, an die das Regulatorprotein Bvg_{A_{BH}} mit hoher Affinität binden kann. Bei den weiter stromabwärts gelegenen „inverted repeat“-Strukturen könnte es sich demnach um „sekundäre“ Bindestellen handeln. Da sie nur eine geringe Übereinstimmung zu der Konsensussequenz besitzen, könnte man vermuten, dass sie zumindest *in vivo* nur mit sehr geringer Affinität und möglicherweise erst nach kooperativen Wechselwirkungen mit den bereits gebundenen Bvg_{A_{BH}}-Molekülen besetzt werden. Dies würde allerdings bedeuten, dass durch die Bindung des Response-Regulators zunächst die DNA-Region besetzt werden würde, die der RNA-Polymerase-Bindestelle am nächsten kommt. Nicht nur die Symmetrie, sondern auch die Anordnung der in der *bvgA_{BHup}*-Region identifizierten „inverted repeat“-Strukturen würde demnach nicht dem Bild eines „klassischen“ *bvg*-abhängigen Promotors, wie zum Beispiel dem des *phaB*-, *cya*-, *ptx*- oder *prn*-Promoters, entsprechen.

Trotzdem scheint die Architektur der *bvgA_{BHup}*-Region nicht einzigartig zu sein, da eine ähnliche Symmetrie und Anordnung der BvgA-Bindestellen innerhalb der *bvgR*-Promotorregion aus *B. pertussis* beschrieben wurde (Merkel *et al.*, 2003). Das *bvgR*-Gen gehört zu den *vag*-Genen und kodiert für ein potentielles Regulatorprotein, welches für die

Repression der *vrg*-Gene während der Bvg⁺-Phase verantwortlich gemacht wird (Merkel *et al.*, 1995; 1998a). Innerhalb des *bvgR*-Promotors wurden insgesamt drei „inverted repeat“-Strukturen identifiziert, bei denen, ähnlich wie innerhalb der *bvgA_{BH}up*-Region, jeweils nur eine Halbseite eine hohe Übereinstimmung zur BvgA-Konsensussequenz besitzt (siehe Abbildung 39). DNaseI-Footprint-Experimente haben gezeigt, dass auch hier zunächst die BvgA-Bindestelle besetzt wird, die sich an die RNA-Bindestelle anschließt, bevor letztendlich die weiter stromaufwärts gelegenen BvgA-Bindestellen erkannt werden (Merkel *et al.*, 2003). Die auffällige Architektur dieses *bvg*-abhängigen Promotors scheint sich jedoch nicht negativ auf die Aktivität des *bvgR*-Promotors auszuwirken, da gezeigt werden konnte, dass dieser wesentlich stärker ist als der *phaB*-Promotor (Merkel *et al.*, 2003). Man vermutet, dass diese starke Promotoraktivität wegen der Instabilität des *bvgR*-Transkripts erforderlich ist um die fortwährende Expression des BvgR-Proteins während der Bvg⁺-Phase zu gewährleisten und um so die Repression der *vrg*-Gene während der Bvg⁺-Phase sicherzustellen (Merkel *et al.*, 2003).



Abbildung 39: Darstellung der „inverted repeat“-Strukturen IR1, IR2, IR3 und IR4 der *bvgA_{BH}up*-Region (IR1*bvgA_{BH}up*, IR2*bvgA_{BH}up*, IR3*bvgA_{BH}up* und IR4*bvgA_{BH}up*), sowie der „inverted repeat“-Strukturen IR1, IR2, IR3 der *bvgRup*-Region (IR1*bvgRup*, IR2*bvgRup* und IR3*bvgRup*).

Die Halbseite 1 (HS1) der hier dargestellten „inverted repeat“-Strukturen besitzt jeweils eine hohe Übereinstimmung mit der BvgA-Konsensussequenz aus *B. pertussis*, die Halbseite 2 (HS2) besitzt dagegen kaum Sequenzspezifität.

Die ähnliche Symmetrie und Anordnung der „inverted repeat“-Strukturen innerhalb der *bvgR*- und der *bvgA_{BH}up*-Region deutet daraufhin, dass es zwischen den Response-Regulatoren BvgA_{BH} aus *B. holmesii* und BvgA aus *B. pertussis* möglicherweise interessante Parallelen hinsichtlich ihrer Erkennungselemente gibt. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung bekräftigt, dass der Response-Regulator BvgA aus *B. pertussis* in DNaseI-Footprint-Experimenten eine eindeutige Bindung an die „inverted repeat“-Strukturen innerhalb der *bvgA_{BH}up*-Region zeigt und sich darüber hinaus innerhalb der Region, die vor dem DNaseI-Verdau geschützt ist, ein sehr ähnliches Muster an hypersensitiven Banden ergibt (siehe Abb. 36). Verwunderlich bleibt jedoch, warum der Response-Regulator aus *B. pertussis* in der Lage ist, die Erkennungselemente der *bvgA_{BH}up*-Region zu erkennen, während im umgekehrten Fall der Response-Regulator aus *B. holmesii* nicht an die *phaB*- bzw. *cya*-Promotorregionen binden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten über Primer-Extension-Experimente für *B. holmesii* G7702 zwei Transkriptionsstartpunkte innerhalb der *bvgA_{BH}up*-Region identifiziert werden (siehe Abb. 34). Der Transkriptionsstartpunkt P1*bvgA_{BH}* befindet sich dabei 20 bp, der Transkriptionsstartpunkt P2*bvgA_{BH}* 34 bp, vor dem *bvgA_{BH}*-Startcodon. Beide Promotoren befinden sich damit vor dem DNA-Bereich, der durch die Bindung des BvgA_{BH}-Proteins vor

einem DNaseI-Verdau geschützt ist und wären demnach *in vivo* in Anwesenheit des Response-Regulators frei zugänglich. Da beide Startpunkte ungewöhnlich nahe aufeinanderfolgen, könnte es sich bei P1*bvgA_{BH}* um ein spezifisches *in vivo*-Abbauprodukt des *bvgA_{BH}*-Transkripts handeln, das ausgehend von P2*bvgA_{BH}* transkribiert wird. Da jedoch nicht nur für P2*bvgA_{BH}*, sondern auch für P1*bvgA_{BH}* eine potentielle -10 Box identifiziert werden konnte, die mit 4 bzw. 5 Nukleotiden mit dem -10-Konsensus aus *E. coli* übereinstimmt, könnte es sich bei P1*bvgA_{BH}* dennoch um einen aktiven Promotor handeln, wobei anzumerken ist, dass sich dabei für P1*bvgA_{BH}* ein erstaunlich kurzer Abstand zur potentiellen Shine-Dalgarno-Sequenz ergeben würde (siehe auch Abbildung 35). Um eine Aussage treffen zu können, ob es sich bei den für P1*bvgA_{BH}* und P2*bvgA_{BH}* identifizierten Hexanukleotid-Sequenzen um reelle Bindestellen für die RNA-Polymerase aus *B. holmesii* handelt, müssten jedoch weitere DNaseI-Footprint-Experimente zusammen mit der wildtypischen RNA-Polymerase durchgeführt werden. Da die beiden beschriebenen Transkripte nicht nur für *B. holmesii* G7702, sondern auch für die *BvgA_{BH}*-Insertionsmutante *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* und die Phasenvariante *B. holmesii* ATCC51541 nachgewiesen werden konnten, würde dies bedeuten, dass es sich bei P1*bvgA_{BH}* und P2*bvgA_{BH}* um Promotoren handelt, die unabhängig von der Expression des Response-Regulators *BvgA_{BH}* aktiv sind. Da die für die Primer-Extension-Experimente verwendete RNA aus Bakterienkulturen mit einer zum Teil sehr unterschiedlichen Zelldichte isoliert wurden, ist eine vergleichende Aussage über die einzelnen Transkriptmengen nur sehr schwer möglich. Es deutet sich jedoch an, dass es zwischen den untersuchten *B. holmesii*-Stämmen keine großen Unterschiede hinsichtlich der jeweiligen Transkriptmenge gibt.

Auch für den Virulenzfaktor Pertactin konnte zunächst nur ein Transkriptionsstartpunkt identifiziert werden, dessen Existenz jedoch sowohl bei dem wildtypischen *B. pertussis*-Stamm TI, als auch bei phasenvarianten *B. pertussis*-Stämmen nachgewiesen werden konnte (Graeff-Wohlleben *et al.*, 1995; Kinnear *et al.*, 1999). Erst über 5'RACE Experimente konnte gezeigt werden, dass sich weiter stromaufwärts ein *bvg*-abhängiger Transkriptionsstartpunkt befindet, der ausschließlich bei dem wildtypischen *B. pertussis*-Stamm TI aktiv ist (Kinnear *et al.*, 1999). Man vermutete, dass die niedrige Transkriptionsrate des *prn*-Gens oder aber der hohe GC-Gehalt des *B. pertussis*-Chromosoms dafür verantwortlich ist, dass das längere *prn*-Transkript nicht über Primer-Extension-Experimenten detektiert werden kann (Kinnear *et al.*, 1999). Demnach wäre es möglich, dass es während der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Primer-Extension-Experimente zu ähnlichen Problemen gekommen ist und es innerhalb der *bvgA_{BH}up* Region einen noch weiter stromaufwärts gelegenen Transkriptionsstartpunkt gibt, der nur in dem wildtypischen *B. holmesii* Stamm G7702 aktiv ist. Die Existenz eines weiteren Transkriptionsstartpunktes innerhalb der *bvgA_{BH}up*-Region muss deshalb in Zukunft in 5'RACE-Experimenten weiter überprüft werden. Da der Abstand zwischen dem bereits identifizierten P2*bvgA_{BH}* und der ersten „inverted repeat“-Struktur IR1*bvgA_{BH}up* jedoch relativ gering ist, würde dies jedoch bedeuten, dass dieser Promotor vermutlich in dem Bereich liegt, an den das *BvgA_{BH}*-Protein bindet. Dies würde auf eine negative Autoregulation hinweisen, da durch die Bindung des *BvgA_{BH}*-Proteins die Transkription ausgehend von diesem Promotor blockiert werden würde. Die Expression einer geringen Menge des Regulatorproteins würde dann noch die Transkription ausgehend von den Promotoren P1*bvgA_{BH}* und P2 *bvgA_{BH}* gewährleisten.

Gegen diese Art der Regulation spricht jedoch, dass die GFP-Expression der Reporterfusion in dem *B. holmesii*-Stamm G7702 (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*), der den intakten Response-Regulator *BvgA_{BH}* exprimiert, stärker ist als in der *BvgA_{BH}*-Insertionsmutante *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass es durch die Bindung des *BvgA_{BH}*-Proteins an die *bvgA_{BH}up*-Region zu einer verstärkten Transkription kommt, was somit einer positiven Autoregulation des *bvgA_{BH}*-Locus entsprechen würde.

Die Aktivität der für die *B. holmesii*-Stämme identifizierten Promotoren P1*bvgA_{BH}* und P2*bvgA_{BH}* konnte erstaunlicherweise nicht in *B. pertussis*-Stämmen nachgewiesen werden, die den *bvgA_{BH}* Locus aus *B. holmesii* G7702 bzw. *B. holmesii* ATCC51541 (Daten nicht gezeigt) oder aber die Reporterfusion *bvgA_{BH}up-gfp* *in trans* tragen. Im Gegensatz dazu konnte für zwei dieser *B. pertussis*-Stämme ein alternativer Transkriptionsstartpunkt identifiziert werden, der sich innerhalb der Region befindet, die durch die Bindung des BvgA-Proteins vor einem DNaseI-Verdau geschützt ist (siehe Abb. 35, 38). Da das entsprechende Transkript nur in dem *B. pertussis*-Stamm BP 359 (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) bzw. BP 359 (pRK415-*bvgA_{BH}* ATCC51541) und somit nur in Abwesenheit des Response-Regulators BvgA nachgewiesen werden konnte, kommt es anscheinend in *B. pertussis* durch die Bindung des BvgA-Proteins an die *bvgA_{BH}up*-Region zu einer Repression der *bvgA_{BH}*-Transkription. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass nur für die *bvgA* Mutante BP 359 (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) eine starke GFP-Expression nachgewiesen werden konnte, während für BP T1 (pMMB208-*bvgA_{BH}up-gfp*) überhaupt keine GFP-Expression zu verzeichnen war (siehe Abb. 37).

Die Analyse der Expression der Reporterfusion *bvgA_{BH}up-gfp* in unterschiedlichen *B. holmesii*- und *B. pertussis*-Stämmen führte demnach zu der überraschenden Beobachtung, dass die GFP-Expression in *B. pertussis* durch die Bindung des BvgA-Proteins reprimiert wird, während sie im Gegensatz dazu in *B. holmesii* durch die Bindung des BvgA_{BH}-Proteins aktiviert wird. Die molekulare Grundlage für diese unterschiedliche Promotorerkennung innerhalb der *bvgA_{BH}up*-Region bleibt bislang ungeklärt. Obwohl durch die DNA-Bindung des Response-Regulators BvgA bzw. Bvg_{BH} in etwa der selbe Bereich innerhalb der *bvgA_{BH}up*-Region betroffen ist (siehe Abbildung 36), könnte es dennoch kleine Unterschiede in dem Ausmaß der jeweiligen DNA-Bindung geben, die auf den Autoradiogrammen der DNaseI-Footprint-Experimente nicht erkennbar sind. Diese leichten Abweichungen in den DNA-Bindeeigenschaften könnten dann, möglicherweise im Zusammenspiel mit der jeweiligen wildtypischen RNA-Polymerase, für die unterschiedliche Promotorerkennung und die unterschiedliche Regulation der *bvgA_{BH}up*-Region in *B. holmesii* und *B. pertussis* verantwortlich sein. Eine unterschiedlich ausgeprägte DNA-Bindung könnten z. B. dadurch hervorgerufen werden, wenn der Phosphorylierungsgrad der Response-Regulatoren in *B. holmesii* und *B. pertussis* unterschiedlich ausgeprägt ist und dadurch die Proteine eine unterschiedliche Affinität zu schwächeren Bindestellen zeigen. Das Ausmaß der DNA-Bindung von BvgA und BvgA_{BH} innerhalb der *bvgA_{BH}up*-Region müsste demnach in Zukunft noch eingehender untersucht werden. Hierfür bieten sich *in vitro*-DNA-Bindungsstudien mit Fe(BABE) (Eisen-1-*para*-Bromacetamidbenzyl-EDTA)-konjugierten BvgA- bzw. BvgA_{BH}-Derivaten an. Der Vorteil dieses experimentellen Ansatzes gegenüber den hier angewandten DNaseI-Footprint-Experimenten liegt darin, dass diese Methode um einiges sensitiver ist. Wie in entsprechenden Experimenten mit einem Fe(BABE)-konjugierten BvgA-Derivat und der *fhaB*-Promotorregion gezeigt werden konnte (Boucher *et al.*, 2003), können auch schwächere Protein-DNA-Interaktionen und somit auch schwächere DNA-Bindestellen detektiert werden, die möglicherweise in DNaseI-Footprint-Experimenten nicht nachzuweisen wären.

G Literaturverzeichnis

- Akerley BJ, Monack DM, Falkow S, Miller JF.** (1992): The *bvgAS* locus negatively controls motility and synthesis of flagella in *Bordetella bronchiseptica*. J Bacteriol. 1992 Feb;174(3):980-90.
- Akerley BJ, Miller JF.** (1993): Flagellin gene transcription in *Bordetella bronchiseptica* is regulated by the BvgAS virulence control system. J Bacteriol. 1993 Jun;175(11):3468-79.
- Akerley BJ, Cotter PA, Miller JF.** (1995): Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the *Bordetella*-host interaction. Cell. 1995 Feb 24;80(4):611-20.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** (1990): Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5;215(3):403-10.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1;25(17):3389-402.
- Amador C, Chiner E, Calpe JL, Ortiz de la Table V, Martinez C, Pasquau F.** (1991): Pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a patient with AIDS. Rev Infect Dis. 1991 Jul-Aug;13(4):771-2.
- Andersson SG, Kurland CG.** (1998): Reductive evolution of resident genomes. Trends Microbiol. 1998 Jul;6(7):263-8. Review.
- Antoine R, Raze D, Loch C.** (2000a): Genomics of *Bordetella pertussis* toxins. Int J Med Microbiol. 2000 Oct;290(4-5):301-5. Review.
- Antoine R, Alonso S, Raze D, Coutte L, Lesjean S, Willery E, Loch C, Jacob-Dubuisson F.** (2000b): New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella pertussis*. J Bacteriol. 2000 Oct;182(20):5902-5.
- Arico B, Rappuoli R.** (1987): *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. J Bacteriol. 1987 Jun;169(6):2847-53.
- Arico B, Miller JF, Roy C, Stibitz S, Monack D, Falkow S, Gross R, Rappuoli R.** (1989): Sequences required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Sep;86(17):6671-5.
- Arico B, Scarlato V, Monack DM, Falkow S, Rappuoli R.** (1991): Structural and genetic analysis of the *bvg* locus in *Bordetella* species. Mol Microbiol. 1991 Oct;5(10):2481-91.
- Arico B, Nuti S, Scarlato V, Rappuoli R.** (1993): Adhesion of *Bordetella pertussis* to eukaryotic cells requires a time-dependent export and maturation of filamentous hemagglutinin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Oct 1;90(19):9204-8.
- Bauwens JE, Spach DH, Schacker TW, Mustafa MM, Bowden RA.** (1992): *Bordetella bronchiseptica* pneumonia and bacteremia following bone marrow transplantation. J Clin Microbiol. 1992 Sep;30(9):2474-5.
- Beattie DT, Knapp S, Mekalanos JJ.** (1990): Evidence that modulation requires sequences downstream of the promoters of two vir-repressed genes of *Bordetella pertussis*. J Bacteriol. 1990 Dec;172(12):6997-7004.
- Beattie DT, Mahan MJ, Mekalanos JJ.** (1993): Repressor binding to a regulatory site in the DNA coding sequence is sufficient to confer transcriptional regulation of the vir-repressed genes (*vrg* genes) in *Bordetella pertussis*. J Bacteriol. 1993 Jan;175(2):519-27.
- Beier D, Schwarz B, Fuchs TM, Gross R.** (1995): In vivo characterization of the unorthodox BvgS two-component sensor protein of *Bordetella pertussis*. J Mol Biol. 1995 May 5;248(3):596-610.
- Beier D, Deppisch H, Gross R.** (1996): Conserved sequence motifs in the unorthodox BvgS two-component sensor protein of *Bordetella pertussis*. Mol Gen Genet. 1996 Aug 27;252(1-2):169-76.

- Bock A.** (1998): Isolierung und Charakterisierung konstitutiver Varianten des Transkriptionsfaktors BvgA von *B. pertussis*. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Bock A.** (2002): Unorthodoxe Zwei-Komponentensysteme: Signalwahrnehmung und Struktur-Funktionsanalysen am Beispiel der Bvg- und Evg-Systeme aus *Bordetella pertussis* und *Escherichia coli*. Doktorarbeit, Universität Würzburg.
- Bock A, Gross R.** (2002): The unorthodox histidine kinases BvgS and EvgS are responsive to the oxidation status of a quinone electron carrier. *Eur J Biochem.* 2002 Jul;269(14):3479-84.
- Borras Sans M, Bonal J, Bonet J, Arnal J, Roca F, Caralps A.** (1991): *Bordetella bronchiseptica* septicemia in a hemodialysis patient. *Nephron.* 1991;59(4):676. No abstract available.
- Boschwitz JS, van der Heide HG, Mooi FR, Relman DA.** (1997): *Bordetella bronchiseptica* expresses the fimbrial structural subunit gene *fimA*. *J Bacteriol.* 1997 Dec;179(24):7882-5.
- Boucher PE, Menozzi FD, Loch C.** (1994): The modular architecture of bacterial response regulators. Insights into the activation mechanism of the BvgA transactivator of *Bordetella pertussis*. *J Mol Biol.* 1994 Aug 19;241(3):363-77.
- Boucher PE, Stibitz S.** (1995): Synergistic binding of RNA polymerase and BvgA phosphate to the pertussis toxin promoter of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1995 Nov;177(22):6486-91.
- Boucher PE, Murakami K, Ishihama A, Stibitz S.** (1997): Nature of DNA binding and RNA polymerase interaction of the *Bordetella pertussis* BvgA transcriptional activator at the *fha* promoter. *J Bacteriol.* 1997 Mar;179(5):1755-63.
- Boucher PE, Yang MS, Schmidt DM, Stibitz S.** (2001a): Genetic and biochemical analyses of BvgA interaction with the secondary binding region of the *fha* promoter of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 2001 Jan;183(2):536-44.
- Boucher PE, Yang MS, Stibitz S.** (2001b): Mutational analysis of the high-affinity BvgA binding site in the *fha* promoter of *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol.* 2001 May;40(4):991-9.
- Boucher PE, Maris AE, Yang MS, Stibitz S.** (2003): The response regulator BvgA and RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain bind simultaneously to different faces of the same segment of promoter DNA. *Mol Cell.* 2003 Jan;11(1):163-73.
- Carbonetti NH, Fuchs TM, Patamawenu AA, Irish TJ, Deppisch H, Gross R.** (1994): Effect of mutations causing overexpression of RNA polymerase alpha subunit on regulation of virulence factors in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1994 Dec;176(23):7267-73.
- Charles H, Ishikawa H.** (1999): Physical and genetic map of the genome of *Buchnera*, the primary endosymbiont of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J Mol Evol.* 1999 Feb;48(2):142-50.
- Charles IG, Dougan G, Pickard D, Chatfield S, Smith M, Novotny P, Morrissey P, Fairweather NF.** (1989): Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 May;86(10):3554-8.
- Chhatwal GS, Walker MJ, Yan H, Timmis KN, Guzman CA.** (1997): Temperature dependent expression of an acid phosphatase by *Bordetella bronchiseptica*: role in intracellular survival. *Microb Pathog.* 1997 May;22(5):257-64.
- Cherry JD.** (1996): Historical review of pertussis and the classical vaccine. *J Infect Dis.* 1996 Nov;174 Suppl 3:S259-63. Review.
- Cherry JD, Heininger.** (1999): Pertussis. In "Textbook of Pediatric Infection Disease" (Feigin RD and Cherry JD, eds). Saunders, Philadelphia.
- Cherry JD.** (1999a): Pertussis in the preantibiotic and prevaccine era, with emphasis on adult pertussis. *Clin Infect Dis.* 1999 Jun;28 Suppl 2:S107-11.

- Cherry JD.** (1999b): Epidemiological, clinical, and laboratory aspects of pertussis in adults. *Clin Infect Dis.* 1999 Jun;28 Suppl 2:S112-7. Review.
- Cookson BT, Tyler AN, Goldman WE.** (1989a): Primary structure of the peptidoglycan-derived tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Biochemistry.* 1989 Feb 21;28(4):1744-9.
- Cookson BT, Cho HL, Herwaldt LA, Goldman WE.** (1989b): Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1989 Jul;57(7):2223-9.
- Cookson BT, Vandamme P, Carlson LC, Larson AM, Sheffield JV, Kersters K, Spach DH.** (1994): Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, "*B. hinzii*". *J Clin Microbiol.* 1994 Oct;32(10):2569-71.
- Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S.** (1996): FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP) Gene. 1996;173(1 Spec No):33-8.
- Cotter PA, Miller JF.** (1994): BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model. *Infect Immun.* 1994 Aug;62(8):3381-90.
- Cotter PA, Miller JF.** (1997): A mutation in the *Bordetella bronchiseptica* *bvgS* gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation, and identifies a new class of Bvg-regulated antigens. *Mol Microbiol.* 1997 May;24(4):671-85.
- Cotter PA, Yuk MH, Mattoo S, Akerley BJ, Boschwitz J, Relman DA, Miller JF.** (1998): Filamentous hemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* is required for efficient establishment of tracheal colonization. *Infect Immun.* 1998 Dec;66(12):5921-9.
- Cotter PA, DiRita VJ.** (2000): Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:519-65. Review.
- Cotter PA, Miller JF.** (2000): Principles of Bacterial Pathogenesis. (E. Groisman, ed),ch.13,pp 619-674. Academic Press,London.
- Decker GR, Lavelle JP, Kumar PN, Pierce PF.** (1991): Pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a patient with AIDS. *Rev Infect Dis.* 1991 Nov-Dec;13(6):1250-1.
- Delisse-Gathoye AM, Locht C, Jacob F, Raaschou-Nielsen M, Heron I, Ruelle JL, de Wilde M, Cabezon T.** (1990): Cloning, partial sequence, expression, and antigenic analysis of the filamentous hemagglutinin gene of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1990 Sep;58(9):2895-905.
- Deora R, Bootsma HJ, Miller JF, Cotter PA.** (2001): Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Mol Microbiol.* 2001 May;40(3):669-83.
- Deora R.** (2002): Differential regulation of the *Bordetella bipA* gene: distinct roles for different BvgA binding sites. *J Bacteriol.* 2002 Dec;184(24):6942-51.
- DeShazer D, Wood GE, Friedman RL.** (1995): Identification of a *Bordetella pertussis* regulatory factor required for transcription of the pertussis toxin operon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1995 Jul;177(13):3801-7.
- Devill JG, Cherry JD, Christenson PD, Pineda E, Leach CT, Kuhls TI, Viker S.** (1995): Frequency of unrecognized *Bordetella pertussis* infections in adults. *Clin Infect Dis* 21,639-642.
- Dobrogosz WJ, Ezzel JW, Kloos WE, Manclark CR.** (1979): Physiology of *Bordetella pertussis*. In: Proceedings of the third international Symposium on Pertussis. (Eds.: Manclark CR and Hill JC) U.S. Department of Health, Education and Welfare, National Institutes of Health, Bethesda, MD, pp86-93.
- Domenighini M, Relman D, Capiou C, Falkow S, Prugnola A, Scarlato V, Rappuoli R.** (1990): Genetic characterization of *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor. *Mol Microbiol.* 1990 May;4(5):787-800.
- Endoh M, Nagai M, Burns DL, Manclark CR, Nakase Y.** (1990): Effects of exogenous agents on the action of *Bordetella parapertussis* heat-labile toxin on guinea pig skin. *Infect Immun.* 1990 May;58(5):1456-60.

- Ezzel JW, Dobrogosz WJ, Kloos WE, Manclark CR.** (1981): Phase-shift markers in the genus *Bordetella*: loss of cytochrom d-629 in phase IV variants. *Mol Microbiol.* 1981; 31:171-181
- Fernandez RC, Weiss AA.** (1994): Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun.* 1994 Nov;62(11):4727-38.
- Fernandez RC, Weiss AA.** (1998): Serum resistance in bvg-regulated mutants of *Bordetella pertussis*. *FEMS Microbiol Lett.* 1998 Jun 1;163(1):57-63.
- Finn TM, Stevens LA.** (1995a): Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol Microbiol.* 1995 May;16(4):625-34.
- Finn TM, Li Z, Kocsis E.** (1995b): Identification of a *Bordetella pertussis* bvg-regulated porin-like protein. *J Bacteriol.* 1995 Feb;177(3):805-9.
- Flak TA, Heiss LN, Engle JT, Goldman WE.** (2000): Synergistic epithelial responses to endotoxin and a naturally occurring muramyl peptide. *Infect Immun.* 2000 Mar;68(3):1235-42.
- Friedman LE, de Rossi BN, Messina MT, Franco MA.** (2001): Phenotype evaluation of *Bordetella bronchiseptica* cultures by urease activity and Congo red affinity. *Lett Appl Microbiol.* 2001 Oct;33(4):285-90.
- Fuchs TM, Deppisch H, Scarlato V, Gross R.** (1996): A new gene locus of *Bordetella pertussis* defines a novel family of prokaryotic transcriptional accessory proteins. *J Bacteriol.* 1996 Aug;178(15):4445-52.
- Funke G, Hess T, von Graevenitz A, Vandamme P.** Characteristics of *Bordetella hinzii* strains isolated from a cystic fibrosis patient over a 3-year period. (1996): *J Clin Microbiol.* 1996 Apr;34(4):966-9. Review.
- Gentry-Weeks CR, Cookson BT, Goldman WE, Rimler RB, Porter SB, Curtiss R 3rd.** (1988): Dermonecrotic toxin and tracheal cytotoxin, putative virulence factors of *Bordetella avium*. *Infect Immun.* 1988 Jul;56(7):1698-707.
- Gentry-Weeks CR, Provence DL, Keith JM, Curtiss R 3rd.** (1991): Isolation and characterization of *Bordetella avium* phase variants. *Infect Immun.* 1991 Nov;59(11):4026-33.
- Gerlach G, von Wintzingerode F, Middendorf B, Gross R.** (2001): Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. *Microbes Infect.* 2001 Jan;3(1):61-72. Review.
- Glaser P, Danchin A, Ladant D, Barzu O, Ullmann A.** (1988): *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: the gene and the protein. *Tokai J Exp Clin Med.* 1988;13 Suppl:239-52.
- Goldman S, Hanski E, Fish F.** (1984): Spontaneous phase variation in *Bordetella pertussis* is a multistep non-random process. *EMBO J.* 1984; 3(6):1353-1365
- Goodnow RA.** (1980): Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol Rev.* 1980 Dec;44(4):722-38. Review.
- Graeff-Wohlleben H, Deppisch H, Gross R.** (1995): Global regulatory mechanisms affect virulence gene expression in *Bordetella pertussis*. *Mol Gen Genet.* 1995 Apr 10;247(1):86-94.
- Graeff-Wohlleben H, Killat S, Banemann A, Guiso N, Gross R.** (1997): Cloning and characterization of an Mn-containing superoxide dismutase (SodA) of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1997 Apr;179(7):2194-201.
- Granowitz EV, Keenholtz SL.** (1998): A pseudoepidemic of *Alcaligenes xylosoxidans* attributable to contaminated saline. *Am J Infect Control.* 1998 Apr;26(2):146-8.
- Greco D, Salmaso S, Mastrantonio P, Giuliano M, Tozzi AE, Anemona A, Ciofi degli Atti ML, Giammanco A, Panei P, Blackwelder WC, Klein DL, Wassilak SG.** (1996): A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. Progetto Pertosse Working Group. *N Engl J Med.* 1996 Feb 8;334(6):341-8.
- Grimberg J, Maguire S, Belluscio L.** (1989): A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal *E. coli* DNA. *Nucleic Acids Res.* 1989 Nov 11;17(21):8893.

- Gross R, Rappuoli R.** (1988): Positive regulation of pertussis toxin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jun;85(11):3913-7.
- Gross R, Arico B, Rappuoli R.** (1989a): Families of bacterial signal-transducing proteins. *Mol Microbiol.* 1989 Nov;3(11):1661-7. Review.
- Gross R, Rappuoli R.** (1989b): Pertussis toxin promoter sequences involved in modulation. *J Bacteriol.* 1989 Jul;171(7):4026-30.
- Gross R, Arico B, Rappuoli R.** (1989c): Genetics of pertussis toxin. *Mol Microbiol.* 1989 Jan;3(1):119-24.
- Gross MK, Au DC, Smith AL, Storm DR.** (1992): Targeted mutations that ablate either the adenylate cyclase or hemolysin function of the bifunctional *cyaA* toxin of *Bordetella pertussis* abolish virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jun 1;89(11):4898-902.
- Gross R, Carbonetti NH.** (1993): Differential regulation of *Bordetella pertussis* virulence factors. *Zentralbl Bakteriol.* 1993 Apr;278(2-3):177-86.
- Gueirard P, Weber C, Le Coustumier A, Guiso N.** (1995): Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. *J Clin Microbiol.* 1995 Aug;33(8):2002-6.
- Gueirard P, Le Blay K, Le Coustumier A, Chaby R, Guiso N.** (1998): Variation in *Bordetella bronchiseptica* lipopolysaccharide during human infection. *FEMS Microbiol Lett.* 1998 May 15;162(2):331-7.
- Hausman SZ, Cherry JD, Heininger U, Wirsing von Konig CH, Burns DL.** (1996): Analysis of proteins encoded by the *ptx* and *ptl* genes of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. *Infect Immun.* 1996 Oct;64(10):4020-6.
- Heininger U, Stehr K, Schmitt-Grohe S, Lorenz C, Rost R, Christenson PD, Uberall M, Cherry JD.** (1994): Clinical characteristics of illness caused by *Bordetella parapertussis* compared with illness caused by *Bordetella pertussis*. *Pediatr Infect Dis J.* 1994 Apr;13(4):306-9.
- Heininger U, Cotter PA, Fescemyer HW, Martinez de Tejada G, Yuk MH, Miller JF, Harvill ET.** (2002): Comparative phenotypic analysis of the *Bordetella parapertussis* isolate chosen for genomic sequencing. *Infect Immun.* 2002 Jul;70(7):3777-84.
- Heiss LN, Lancaster JR Jr, Corbett JA, Goldman WE.** (1994): Epithelial autotoxicity of nitric oxide: role in the respiratory cytopathology of pertussis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jan 4;91(1):267-70.
- Hewlett EL, Cowell JL.** (1989): Evaluation of the mouse model for study of encephalopathy in pertussis vaccine recipients. *Infect Immun.* 1989 Mar;57(3):661-3. Review.
- Hewlett EL, Gray L, Allietta M, Ehrmann I, Gordon VM, Gray MC.** (1991): Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Conformational change associated with toxin activity. *J Biol Chem.* 1991 Sep 15;266(26):17503-8.
- Hewlett EL.** (1997): Epidemiology of pertussis. *Pediatr Infect Dis J.* 1997 12:504-506.
- Horiguchi Y, Inoue N, Masuda M, Kashimoto T, Katahira J, Sugimoto N, Matsuda M.** (1997): *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin induces reorganization of actin stress fibers through deamidation of Gln-63 of the GTP-binding protein Rho. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Oct 14;94(21):11623-6.
- Hot D, Antoine R, Renauld-Mongenie G, Caro V, Hennuy B, Levillain E, Huot L, Wittmann G, Poncet D, Jacob-Dubuisson F, Guyard C, Rimlinger F, Aujame L, Godfroid E, Guiso N, Quentin-Millet MJ, Lemoine Y, Locht C.** (2003): Differential modulation of *Bordetella pertussis* virulence genes as evidenced by DNA microarray analysis. *Mol Genet Genomics.* 2003 Jul;269(4):475-86.
- Idigbe EO, Parton R, Wardlaw AC.** (1981): Rapidity of antigenic modulation of *Bordetella pertussis* in modified Hornibrook medium. *J Med Microbiol.* 1981 Nov;14(4):409-18.

- Imamura A, Hanaki N, Umeda H, Nakamura A, Suzuki T, Ueguchi C, Mizuno T.** (1998): Response regulators implicated in His-to-Asp phosphotransfer signaling in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Mar 3;95(5):2691-6.
- Janda WM, Santos E, Stevens J, Celig D, Terrile L, Schreckenberger PC.** (1994): Unexpected isolation of *Bordetella pertussis* from a blood culture. J Clin Microbiol. 1994 Nov;32(11):2851-3.
- Jungnitz H, West NP, Walker MJ, Chhatwal GS, Guzman CA.** (1998): A second two-component regulatory system of *Bordetella bronchiseptica* required for bacterial resistance to oxidative stress, production of acid phosphatase, and *in vivo* persistence. Infect Immun. 1998 Oct;66(10):4640-50.
- Kania SA, Rajeev S, Burns EH Jr, Odom TF, Holloway SM, Bemis DA.** (2000): Characterization of *fimN*, a new *Bordetella bronchiseptica* major fimbrial subunit gene. Gene. 2000 Oct 3;256(1-2):149-55.
- Karimova G, Bellalou J, Ullmann A.** (1996): Phosphorylation-dependent binding of BvgA to the upstream region of the *cyaA* gene of *Bordetella pertussis*. Mol Microbiol. 1996 May;20(3):489-96.
- Karimova G, Ullmann A.** (1997): Characterization of DNA binding sites for the BvgA protein of *Bordetella pertussis*. J Bacteriol. 1997 Jun;179(11):3790-2.
- Kasuga T, Nakase Y, Ukishima K, Takatsu K.** (1954): Studies on *Haemophilus pertussis*. V. Relation between the phase of bacilli and the progress of the whooping-cough. Kitasato Arch Exp Med. 1954 Sep;27(3):57-62.
- Katada T, Oinuma M, Ui M.** (1986): Mechanisms for inhibition of the catalytic activity of adenylate cyclase by the guanine nucleotide-binding proteins serving as the substrate of islet-activating protein, pertussis toxin. J Biol Chem. 1986 Apr 15;261(11):5215-21.
- Kattar MM, Chavez JF, Limaye AP, Rassoulian-Barrett SL, Yarfitz SL, Carlson LC, Houze Y, Swanzy S, Wood BL, Cookson BT.** (2000): Application of 16S rRNA gene sequencing to identify *Bordetella hinzii* as the causative agent of fatal septicemia. J Clin Microbiol. 2000 Feb;38(2):789-94.
- Katzenstein DA, Ciofalo L, Jordan MC.** *Bordetella bronchiseptica* bacteremia. (1984): West J Med. 1984 Jan;140(1):96-8.
- Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, Trollinger D.** (1988): Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. Gene. 1988 Oct 15;70(1):191-7.
- Kinnear SM, Boucher PE, Stibitz S, Carbonetti NH.** (1999): Analysis of BvgA activation of the pertactin gene promoter in *Bordetella pertussis*. J Bacteriol. 1999 Sep;181(17):5234-41.
- Klein A.** (1999): Vergleichende genetische Charakterisierung verschiedener *Bordetella* Isolate. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Knapp S, Mekalanos JJ.** (1988): Two *trans*-acting regulatory genes (*vir* and *mod*) control antigenic modulation in *Bordetella pertussis*. J Bacteriol. 1988; 170:5059-5066.
- Kuhnert P, Heyberger-Meyer B, Burnens AP, Nicolet J, Frey J.** (1997): Detection of RTX toxin genes in gram-negative bacteria with a set of specific probes. Appl Environ Microbiol. 1997 Jun;63(6):2258-65.
- Lacey BW.** (1960): Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*. J Hyg (Lond). 1960 Mar;58:57-93.
- Le Blay K, Gueirard P, Guiso N, Chaby R.** (1997): Antigenic polymorphism of the lipopolysaccharides from human and animal isolates of *Bordetella bronchiseptica*. Microbiology. 1997 Apr;143 (Pt 4):1433-41.
- Leininger E, Roberts M, Kenimer JG, Charles IG, Fairweather N, Novotny P, Brennan MJ.** (1991): Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Jan 15;88(2):345-9.
- Leslie PH, Gardner AD.** (1931): The phases of *Haemophilus pertussis*. J. Hyg. 31:423-455.

- Lindquist SW, Weber DJ, Mangum ME, Hollis DG, Jordan J.** (1995): *Bordetella holmesii* sepsis in an asplenic adolescent. *Pediatr Infect Dis J.* 1995 Sep;14(9):813-5.
- Linnemann CC, Perry EB.** (1977): *Bordetella parapertussis*. Recent experience and a review of the literature. *Am J Dis Child.* 1977 May;131(5):560-3.
- Locht C, Bertin P, Menozzi FD, Renaud G.** (1993): The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent *Bordetella* spp. *Mol Microbiol.* 1993 Aug;9(4):653-60. Review.
- Lukat GS, McCleary WR, Stock AM, Stock JB.** (1992): Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jan 15;89(2):718-22.
- Luker KE, Tyler AN, Marshall GR, Goldman WE.** (1995): Tracheal cytotoxin structural requirements for respiratory epithelial damage in pertussis. *Mol Microbiol.* 1995 May;16(4):733-43.
- Marques RR, Carbonetti NH.** (1997): Genetic analysis of pertussis toxin promoter activation in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol.* 1997 Jun;24(6):1215-24.
- Marr N.** (2002): Charakterisierung der BvgAS-Systeme und anderer Zwei-Komponenten-Systeme von *Bordetella* Arten. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Martinez de Tejada G, Miller JF, Cotter PA.** (1996): Comparative analysis of the virulence control systems of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Microbiol.* 1996 Dec;22(5):895-908.
- Martinez de Tejada G, Cotter PA, Heininger U, Camilli A, Akerley BJ, Mekalanos JJ, Miller JF.** (1998): Neither the Bvg- phase nor the vrg6 locus of *Bordetella pertussis* is required for respiratory infection in mice. *Infect Immun.* 1998 Jun;66(6):2762-8.
- Mastrantonio P, Stefanelli P, Giuliano M, Herrera Rojas Y, Ciofi degli Atti M, Anemona A, Tozzi AE.** (1998): *Bordetella parapertussis* infection in children: epidemiology, clinical symptoms, and molecular characteristics of isolates. *J Clin Microbiol.* 1998 Apr;36(4):999-1002.
- Mazengia E, Silva EA, Peppe JA, Timperi R, George H.** (2000): Recovery of *Bordetella holmesii* from patients with pertussis-like symptoms: use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize circulating strains. *J Clin Microbiol.* 2000 Jun;38(6):2330-3.
- McGillivray DM, Coote JG, Parton R.** (1989): Cloning of the virulence regulatory (vir) locus of *Bordetella pertussis* and its expression in *B. bronchiseptica*. *FEMS Microbiol Lett.* 1989 Dec;53(3):333-7.
- McMillan DJ, Shojaei M, Chhatwal GS, Guzman CA, Walker MJ.** (1996): Molecular analysis of the *bvg*-repressed urease of *Bordetella bronchiseptica*. *Microb Pathog.* 1996 Nov;21(5):379-94.
- McMillan DJ, Mau M, Walker MJ.** (1998): Characterisation of the urease gene cluster in *Bordetella bronchiseptica*. *Gene.* 1998 Feb 27;208(2):243-51.
- Melton AR, Weiss AA.** (1989): Environmental regulation of expression of virulence determinants in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1989 Nov;171(11):6206-12.
- Merkel TJ, Stibitz S.** (1995): Identification of a locus required for the regulation of *bvg*-repressed genes in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1995 May;177(10):2727-36.
- Merkel TJ, Barros C, Stibitz S.** (1998a): Characterization of the *bvgR* locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1998 Apr;180(7):1682-90.
- Merkel TJ, Stibitz S, Keith JM, Leef M, Shahin R.** (1998b): Contribution of regulation by the *bvg* locus to respiratory infection of mice by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1998 Sep;66(9):4367-73.
- Merkel TJ, Boucher PE, Stibitz S, Grippe VK.** (2003): Analysis of *bvgR* expression in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 2003 Dec;185(23):6902-12.
- Menozzi FD, Boucher PE, Riveau G, Gantiez C, Locht C.** (1994): Surface-associated filamentous hemagglutinin induces autoagglutination of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1994 Oct;62(10):4261-9.

- Mertsola J.** (1985): Mixed outbreak of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infection in Finland. *Eur J Clin Microbiol.* 1985 Apr;4(2):123-8.
- Middendorf B, Gross R.** (1999): Representational difference analysis identifies a strain-specific LPS biosynthesis locus in *Bordetella* spp. *Mol Gen Genet.* 1999 Aug;262(1):189-98.
- Miller JF, Roy CR, Falkow S.** (1989): Analysis of *Bordetella pertussis* virulence gene regulation by use of transcriptional fusions in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1989 Nov;171(11):6345-8.
- Monack DM, Arico B, Rappuoli R, Falkow S.** (1989): Phase variants of *Bordetella bronchiseptica* arise by spontaneous deletions in the *vir* locus. *Mol Microbiol.* 1989 Dec;3(12):1719-28.
- Montaraz JA, Novotny P, Ivanyi J.** (1985): Identification of a 68-kilodalton protective protein antigen from *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun.* 1985 Mar;47(3):744-51.
- Mooi FR, Jansen WH, Brunings H, Gielen H, van der Heide HG, Walvoort HC, Guinee PA.** (1992): Construction and analysis of *Bordetella pertussis* mutants defective in the production of fimbriae. *Microb Pathog.* 1992 Feb;12(2):127-35.
- Morales VM, Backman A, Bagdasarian M.** (1991): A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants. *Gene.* 1991 Jan 2;97(1):39-47.
- Morel-Deville, F., Ehrlich, S. D. & Morel, P.** (1997). Identification by PCR of genes encoding multiple response regulators. *Microbiology* **143**, 1513-20.
- Morris JT, Myers M.** (1998): Bacteremia due to *Bordetella holmesii*. *Clin Infect Dis.* 1998 Oct;27(4):912-3.
- Müller M, Hildebrandt A.** (1993): Nucleotide sequences of the 23S rRNA genes from *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* and *B. avium*, and their implications for phylogenetic analysis. *Nucleic Acids Res.* 1993 Jul 11;21(14):3320
- Mullis KB, Faloona FA.** (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
- Njamkepo E, Delisle F, Hagege I, Gerbaud G, Guiso N.** (2000): *Bordetella holmesii* isolated from a patient with sickle cell anemia: analysis and comparison with other *Bordetella holmesii* isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2000 Mar;6(3):131-6.
- Pao GM, Saier MH Jr.** (1995): Response regulators of bacterial signal transduction systems: selective domain shuffling during evolution. *J Mol Evol.* 1995 Feb;40(2):136-54.
- Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, Holden MT, Churcher CM, Bentley SD, Mungall KL, Cerdeno-Tarraga AM, Temple L, James K, Harris B, Quail MA, Achtman M, Atkin R, Baker S, Basham D, Bason N, Cherevach I, Chillingworth T, Collins M, Cronin A, Davis P, Doggett J, Feltwell T, Goble A, Hamlin N, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, Leather S, Moule S, Norberczak H, O'Neil S, Ormond D, Price C, Rabinowitsch E, Rutter S, Sanders M, Saunders D, Seeger K, Sharp S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Unwin L, Whitehead S, Barrell BG, Maskell DJ.** (2003): Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet.* 2003 Sep;35(1):32-40. Epub 2003 Aug 10.
- Parton R.** (1988): Differentiation of phase I and variant strains of *Bordetella pertussis* on Congo red media. *J Med Microbiol.* 1988 Aug;26(4):301-6.
- Peppler MS.** (1982): Isolation and characterization of isogenic pairs of domed hemolytic and flat nonhemolytic colony types of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1982 Mar;35(3):840-51.
- Peppler MS, Schrumph ME.** (1984): Phenotypic variation and modulation in *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun.* 1984; 44(3):681-687.
- Perraud AL, Kimmel B, Weiss V, Gross R.** (1998): Specificity of the BvgAS and EvgAS phosphorelay is mediated by the C-terminal HPt domains of the sensor proteins. *Mol Microbiol.* 1998 Mar;27(5):875-87.

- Perraud AL, Weiss V, Gross R.** (1999): Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. Trends Microbiol. 1999 Mar;7(3):115-20. Review.
- Perraud AL, Rippe K, Bantscheff M, Glocker M, Lucassen M, Jung K, Sebald W, Weiss V, Gross R.** (2000): Dimerization of signalling modules of the EvgAS and BvgAS phosphorelay systems. Biochim Biophys Acta. 2000 May 23;1478(2):341-54.
- Pizza M, Covacci A, Bartoloni A, Perugini M, Nencioni L, De Magistris MT, Villa L, Nucci D, Manetti R, Bugnoli M, et al.** (1989): Mutants of pertussis toxin suitable for vaccine development. Science. 1989 Oct 27;246(4929):497-500.
- Porter JF, Parton R, Wardlaw AC.** (1991): Growth and survival of *Bordetella bronchiseptica* in natural waters and in buffered saline without added nutrients. Appl Environ Microbiol. 1991 Apr;57(4):1202-6.
- Porter JF, Wardlaw AC.** (1993): Long-term survival of *Bordetella bronchiseptica* in lakewater and in buffered saline without added nutrients. FEMS Microbiol Lett. 1993 Jun 1;110(1):33-6.
- Qureshi MN, Lederman J, Neibart E, Bottone EJ.** (1992): *Bordetella bronchiseptica* recurrent bacteraemia in the setting of a patient with AIDS and indwelling Broviac catheter. Int J STD AIDS. 1992 Jul-Aug;3(4):291-3.
- Rambow AA, Fernandez RC, Weiss AA.** (1998): Characterization of BrkA expression in *Bordetella bronchiseptica*. Infect Immun. 1998 Aug;66(8):3978-80.
- Register KB, Ackermann MR.** (1997): A highly adherent phenotype associated with virulent Bvg+ phase swine isolates of *Bordetella bronchiseptica* grown under modulating conditions. Infect Immun. 1997 Dec;65(12):5295-300.
- Relman DA, Domenighini M, Tuomanen E, Rappuoli R, Falkow S.** (1989): Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Apr;86(8):2637-41.
- Relman D, Tuomanen E, Falkow S, Golenbock DT, Saukkonen K, Wright SD.** (1990): Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. Cell. 1990 Jun 29;61(7):1375-82.
- Rogel A, Hanski E.** (1992): Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane. J Biol Chem. 1992 Nov 5;267(31):22599-605.
- Rosenthal RS, Nogami W, Cookson BT, Goldman WE, Folkening WJ.** (1987): Major fragment of soluble peptidoglycan released from growing *Bordetella pertussis* is tracheal cytotoxin. Infect Immun. 1987 Sep;55(9):2117-20.
- Roth JR.** (1974): Frameshift mutations. Annu Rev Genet. 1974;8:319-46. Review.
- Roy CR, Miller JF, Falkow S.** (1989): The *bvgA* gene of *Bordetella pertussis* encodes a transcriptional activator required for coordinate regulation of several virulence genes. J Bacteriol. 1989 Nov;171(11):6338-44.
- Roy CR, Miller JF, Falkow S.** (1990): Autogenous regulation of the *Bordetella pertussis* *bvgABC* operon. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 May;87(10):3763-7.
- Roy CR, Falkow S.** (1991): Identification of *Bordetella pertussis* regulatory sequences required for transcriptional activation of the *fhaB* gene and autoregulation of the *bvgAS* operon. J Bacteriol. 1991 Apr;173(7):2385-92.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988 Jan 29;239(4839):487-91.

- Sato Y, Izumiya K, Sato H, Cowell JL, Manclark CR.** (1981): Role of antibody to leukocytosis-promoting factor hemagglutinin and to filamentous hemagglutinin in immunity to pertussis. *Infect Immun.* 1981 Mar;31(3):1223-31.
- Scarlato V, Prugnola A, Arico B, Rappuoli R.** (1990): Positive transcriptional feedback at the *bvg* locus controls expression of virulence factors in *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Dec;87(24):10067.
- Scarlato V, Prugnola A, Arico B, Rappuoli R.** (1991a): The *bvg*-dependent promoters show similar behaviour in different *Bordetella* species and share sequence homologies. *Mol Microbiol.* 1991 Oct;5(10):2493-8.
- Scarlato V, Rappuoli R.** (1991b): Differential response of the *bvg* virulence regulon of *Bordetella pertussis* to MgSO₄ modulation. *J Bacteriol.* 1991 Nov;173(22):7401-4.
- Scarlato V, Arico B, Prugnola A, Rappuoli R.** (1991c): Sequential activation and environment regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* 1991;10:3971-3975.
- Scarlato V, Arico B, Rappuoli R.** (1993): DNA topology affects transcriptional regulation of the pertussis toxin gene of *Bordetella pertussis* in *Escherichia coli* and *in vitro*. *J Bacteriol.* 1993 Aug;175(15):4764-71.
- Schmidt G, Goehring UM, Schirmer J, Lerm M, Aktories K.** (1999): Identification of the C-terminal part of *Bordetella* dermonecrotic toxin as a transglutaminase for rho GTPases. *J Biol Chem.* 1999 Nov 5;274(45):31875-81.
- Schneider B, Stubs D, Gross R.** (2002): Identification and genomic organization of gene loci negatively controlled by the virulence regulatory BvgAS two-component system in *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Genet Genomics.* 2002 Jun;267(4):526-35. Epub 2002 May 29.
- Seifert HS, So M.** (1988): Genetic mechanisms of bacterial antigenic variation. *Microbiol Rev.* 1988 Sep;52(3):327-36. Review.
- Shepard CW, Daneshvar MI, Kaiser RM, Ashford DA, Lonsway D, Patel JB, Morey RE, Jordan JG, Weyant RS, Fischer M.** (2004): *Bordetella holmesii* bacteremia: a newly recognized clinical entity among asplenic patients. *Clin Infect Dis.* 2004 Mar 15;38(6):799-804.
- Skeeles DW, Arp LH.** (1997): Diseases of poultry (Eds.: Clancy B.W., Barnes HJ, Beard CW, McDougal LR and Saif YM). Iowa State University Press, Ames: 275-288.
- Spears PA, Temple LM, Miyamoto DM, Maskell DJ, Orndorff PE.** (2003): Unexpected similarities between *Bordetella avium* and other pathogenic *Bordetellae*. *Infect Immun.* 2003 May;71(5):2591-7.
- Stefanelli P, Mastrantonio P, Hausman SZ, Giuliano M, Burns DL.** (1997): Molecular characterization of two *Bordetella bronchiseptica* strains isolated from children with coughs. *J Clin Microbiol.* 1997 Jun;35(6):1550-5.
- Steffen P, Goyard S, Ullmann A.** (1996): Phosphorylated BvgA is sufficient for transcriptional activation of virulence-regulated genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* 1996 Jan 2;15(1):102-9.
- Stenson TH, Pepler MS.** (1995): Identification of two *bvg*-repressed surface proteins of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1995 Oct;63(10):3780-9.
- Stibitz S, Black W, Falkow S.** (1986): The construction of a cloning vector designed for gene replacement in *Bordetella pertussis*. *Gene.* 1986;50(1-3):133-40.
- Stibitz S, Weiss AA, Falkow S.** (1988): Genetic analysis of a region of the *Bordetella pertussis* chromosome encoding filamentous hemagglutinin and the pleiotropic regulatory locus *vir*. *J Bacteriol.* 1988 Jul;170(7):2904-13.
- Stibitz S, Aaronson W, Monack D, Falkow S.** (1989): Phase variation in *Bordetella pertussis* by frameshift mutation in a gene for a novel two-component system. *Nature.* 1989 Mar 16;338(6212):266-9.

- Stibitz S.** (1998): Mutations affecting the alpha subunit of *Bordetella pertussis* RNA polymerase suppress growth inhibition conferred by short C-terminal deletions of the response regulator BvgA. *J Bacteriol.* 1998 May;180(9):2484-92.
- Stibitz S, Yang MS.** (1991): Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the *vir* locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1991 Jul;173(14):4288-96.
- Stibitz S.** (1994): Mutations in the *bvgA* gene of *Bordetella pertussis* that differentially affect regulation of virulence determinants. *J Bacteriol.* 1994 Sep;176(18):5615-21.
- Stibitz S, Yang MS.** (1999): Genomic plasticity in natural populations of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* 1999 Sep;181(17):5512-5.
- Stock JB, Stock AM, Mottonen JM.** (1990): Signal transduction in bacteria. *Nature.* 1990 Mar 29;344(6265):395-400. Review.
- Stockbauer KE, Fuchslocher B, Miller JF, Cotter PA.** (2001): Identification and characterization of BipA, a *Bordetella* Bvg-intermediate phase protein. *Mol Microbiol.* 2001 Jan;39(1):65-78.
- Tamura M, Nogimori K, Murai S, Yajima M, Ito K, Katada T, Ui M, Ishii S.** (1982a): Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry.* 1982 Oct 26;21(22):5516-22.
- Tamura M, Nogimori K, Yajima M, Ase K, Ui M.** (1982b): A role of the B-oligomer moiety of islet-activating protein, pertussis toxin, in development of the biological effects on intact cells. *J Biol Chem.* 1983 Jun 10;258(11):6756-61.
- Tanabe H, Masuda T, Yamasaki K, Katoh A, Yoshioka S, Utsumi R.** (1998): Molecular interaction between proteins involved in EvgAS signal transduction of *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998 Jan;62(1):78-82.
- Tang YW, Hopkins MK, Kolbert CP, Hartley PA, Severance PJ, Persing DH.** (1998): *Bordetella holmesii*-like organisms associated with septicemia, endocarditis, and respiratory failure. *Clin Infect Dis.* 1998 Feb;26(2):389-92.
- Taylor BL, Zhulin IB.** (1999): PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999 Jun;63(2):479-506. Review.
- Temple LM, Weiss AA, Walker KE, Barnes HJ, Christensen VL, Miyamoto DM, Shelton CB, Orndorff PE.** (1998): *Bordetella avium* virulence measured in vivo and in vitro. *Infect Immun.* 1998 Nov;66(11):5244-51.
- Tuomanen E, Weiss A.** (1985): Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory-epithelial cells. *J Infect Dis.* 1985 Jul;152(1):118-25.
- Tuomanen E.** (1986): Piracy of adhesins: attachment of superinfecting pathogens to respiratory cilia by secreted adhesins of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1986 Dec;54(3):905-8.
- Tuomanen E, Towbin H, Rosenfelder G, Braun D, Larson G, Hansson GC, Hill R.** (1988): Receptor analogs and monoclonal antibodies that inhibit adherence of *Bordetella pertussis* to human ciliated respiratory epithelial cells. *J Exp Med.* 1988 Jul 1;168(1):267-77.
- Uhl MA, Miller JF.** (1994): Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Feb 1;91(3):1163-7.
- Uhl MA, Miller JF.** (1995): BvgAS is sufficient for activation of the *Bordetella pertussis* *ptx* locus in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1995 Nov;177(22):6477-85.
- Uhl MA, Miller JF.** (1996a): Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J.* 1996 Mar 1;15(5):1028-36.
- Uhl MA, Miller JF.** (1996b): Central role of the BvgS receiver as a phosphorylated intermediate in a complex two-component phosphorelay. *J Biol Chem.* 1996 Dec 27;271(52):33176-80.

- Urisu A, Cowell JL, Manclark CR.** (1986): Filamentous hemagglutinin has a major role in mediating adherence of *Bordetella pertussis* to human WiDr cells. *Infect Immun.* 1986 Jun;52(3):695-701.
- Vandamme P, Hommez J, Vancanneyt M, Monsieurs M, Hoste B, Cookson B, Wirsing von König CH, Kewrster K, Blackall PJ.** (1995): *Bordetella hinzii*, sp. nov., isolated from poultry and humans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:37-45.
- Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J.** (1996a): Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.* 1996 Jun;60(2):407-38. Review.
- Vandamme P, Heyndrickx M, Vancanneyt M, Hoste B, De Vos P, Falsen E, Kersters K, Hinz KH.** (1996b): *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1983. *Int J Syst Bacteriol.* 1996 Oct;46(4):849-58.
- van den Akker WM.** (1998): Lipopolysaccharide expression within the genus *Bordetella*: influence of temperature and phase variation. *Microbiology.* 1998 Jun;144 (Pt 6):1527-35.
- van der Zee A, Groenendijk H, Peeters M, Mooi FR.** (1996): The differentiation of *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* from humans and animals as determined by DNA polymorphism mediated by two different insertion sequence elements suggests their phylogenetic relationship. *Int J Syst Bacteriol.* 1996 Jul;46(3):640-7.
- van der Zee A, Mooi F, Van Embden J, Musser J.** (1997): Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella* spp.: phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences. *J Bacteriol.* 1997 Nov;179(21):6609-17.
- van Loo IH, Heuvelman KJ, King AJ, Mooi FR.** (2002): Multilocus sequence typing of *Bordetella pertussis* based on surface protein genes. *J Clin Microbiol.* 2002 Jun;40(6):1994-2001.
- van't Wout J, Burnette WN, Mar VL, Rozdzinski E, Wright SD, Tuomanen EI.** (1992): Role of carbohydrate recognition domains of pertussis toxin in adherence of *Bordetella pertussis* to human macrophages. *Infect Immun.* 1992 Aug;60(8):3303-8.
- von Wintzingerode F, Schattke A, Siddiqui RA, Rosick U, Gobel UB, Gross R.** (2001): *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001 Jul;51(Pt 4):1257-65.
- von Wintzingerode F, Gerlach G, Schneider B, Gross R.** (2002): Phylogenetic relationships and virulence evolution in the genus *Bordetella*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2002;264(1):177-99. Review.
- Weiss AA, Falkow S.** (1983): Tn5-induced mutations affecting virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1983; 42: 33-41.
- Weiss AA, Falkow S.** (1984): Genetic analysis of phase change in *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1984 Jan;43(1):263-9.
- Weiss AA, Hewlett EL, Myers GA, Falkow S.** (1984): Pertussis toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis.* 1984 Aug;150(2):219-22.
- Weiss AA, Goodwin MS.** (1989): Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model. *Infect Immun.* 1989 Dec;57(12):3757-64.
- Weitkamp JH, Tang YW, Haas DW, Midha NK, Crowe JE Jr.** (2000): Recurrent *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia associated with persistent lymph node infection in a patient with hyper-immunoglobulin M syndrome. *Clin Infect Dis.* 2000 Nov;31(5):1183-7. Epub 2000 Nov 06.
- Weyant RS, Hollis DG, Weaver RE, Amin MF, Steigerwalt AG, O'Connor SP, Whitney AM, Daneshvar MI, Moss CW, Brenner DJ.** (1995): *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J Clin Microbiol.* 1995 Jan;33(1):1-7.

- Willems RJ, Geuijen C, van der Heide HG, Renauld G, Bertin P, van den Akker WM, Locht C, Mooi FR.** (1994): Mutational analysis of the *Bordetella pertussis fim/fha* gene cluster: identification of a gene with sequence similarities to haemolysin accessory genes involved in export of FHA. *Mol Microbiol.* 1994 Jan;11(2):337-47.
- Wood GE, Friedman RL.** (2000): The Bvg accessory factor (Baf) enhances pertussis toxin expression in *Escherichia coli* and is essential for *Bordetella pertussis* viability. *FEMS Microbiol Lett.* 2000 Dec 1;193(1):25-30.
- Woolfrey BF, Moody JA.** (1991): Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin Microbiol Rev.* 1991 Jul;4(3):243-55. Review.
- Yabuuchi E, Kawamura Y, Kosako Y, Ezaki T.** (1998): Emendation of genus *Achromobacter* and *Achromobacter xylosoxidans* (Yabuuchi and Yano) and proposal of *Achromobacter ruhlandii* (Packer and Vishniac) comb. nov., *Achromobacter piechaudii* (Kiredjian et al.) comb. nov., and *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* (Ruger and Tan) comb. nov. *Microbiol Immunol.* 1998;42(6):429-38.
- Yaku H, Kato M, Hakoshima T, Tsuzuki M, Mizuno T.** (1997): Interaction between the CheY response regulator and the histidine-containing phosphotransfer (HPt) domain of the ArcB sensory kinase in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 1997 May 26;408(3):337-40.
- Yih WK, Silva EA, Ida J, Harrington N, Lett SM, George H.** (1999): *Bordetella holmesii*-like organisms isolated from Massachusetts patients with pertussis-like symptoms. *Emerg Infect Dis.* 1999 May-Jun;5(3):441-3.
- Yuk MH, Heininger U, Martinez de Tejada G, Miller JF.** (1998a): Human but not ovine isolates of *Bordetella parapertussis* are highly clonal as determined by PCR-based RAPD fingerprinting. *Infection.* 1998 Sep-Oct;26(5):270-3.
- Yuk MH, Harvill ET, Miller JF.** (1998b): The BvgAS virulence control system regulates type III secretion in *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Microbiol.* 1998 Jun;28(5):945-59.
- Yuk MH, Harvill ET, Cotter PA, Miller JF.** (2000): Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF-kappaB activation by the *Bordetella* type III secretion system. *Mol Microbiol.* 2000 Mar;35(5):991-1004.
- Zu T, Manetti R, Rappuoli R, Scarlato V.** (1996): Differential binding of BvgA to two classes of virulence genes of *Bordetella pertussis* directs promoter selectivity by RNA polymerase. *Mol Microbiol.* 1996 Aug;21(3):557-65.

H Anhang

1 Abkürzungsverzeichnis

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

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

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

2 Lebenslauf

zur Person

Name	Gabriele Angelika Gerlach
Geboren am	21. März 1974
Geburtsort	Erlangen
Wohnhaft in	Parsevalstr. 20 97074 Würzburg
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

Schulbildung

1980-1984	Grundschule Büchenbach Dorf
1984-1993	Albert-Schweitzer-Gymnasium Erlangen. Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife

Studium

WS 93/94-SS 94	Studium der Chemie an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen
WS 94/95-WS 99	Studium der Biologie an der Julius-Maximilians Universität Würzburg Vordiplom (Sept. 1996) Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Biochemie, Zell- und Entwicklungsbiologie Diplom (Dez. 1999) Thema der Diplomarbeit: „Identifizierung von Zielgenen der <i>Helicobacter pylori</i> Zwei-Komponenten-Regulatorproteine“.

Promotion

ab WS 2000	Doktorarbeit an der Julius-Maximilians Universität Würzburg; am Lehrstuhl für Mikrobiologie von Prof. Dr. W. Goebel Betreuer der Doktorarbeit: Prof. Dr. R. Gross
------------	--

3 Publikationsliste

Originalarbeiten:

Dietz P, Gerlach G, Beier D. (2002): Identification of target genes regulated by the two-component system HP166-HP165 of *Helicobacter pylori*. J Bacteriol. 2002 Jan;184(2):350-62.

Gerlach G, Janzen S, Beier D, Gross R. (2004): Functional characterization of the *bvgAS* gene locus of *Bordetella holmesii* (submitted).

Übersichtsartikel:

Gerlach G, von Wintzingerode F, Middendorf B, Gross R. (2001): Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. Microbes Infect. 2001 Jan;3(1):61-72.

von Wintzingerode F, Gerlach G, Schneider B, Gross R. (2002): Phylogenetic relationships and virulence evolution in the genus *Bordetella*. Curr Top Microbiol Immunol. 2002;264(1):177-99.

Vortrag:

Gerlach G.: Funktionelle Charakterisierung des BvgAS-Zwei-Komponentensystems des humanpathogenen Bakteriums *B. holmesii*. Kolloquium des SFB 479 der Universität Würzburg in Würzburg (2003).

Posterpräsentation:

Gerlach G. and Gross R.: Comparative analysis of the BvgAS virulence regulatory system in different *Bordetella* species. EURESCO Conference "Bacterial neural networks", in Obernai, Frankreich (2002).

4 DNA- und Proteinsequenzen

40A

```

1
ompA A.xylos.seq GCCTATCCCC AGACGGTGGG CAACTGGCGC AATCCGTTTC GTAACGTTTG
ompA B.avium.seq GCCTCGGCTC AGACCGTGGG CAACTGGCGC AATCCGTATG GCAACGTTCTG
ompA B.bron.seq GCTTCCGCGC AAACCGTGGG CAACTGGCGC AATCCGTTTG GCGACGTTTG
ompA B.hinz.seq GCCTCGGCTC AGACGGTGGG CAACTGGCGC AATCCGTTTC GCGACGTTTG
ompA B.holm.seq GCCTCGGCTC AGACGGTGGG CAACTGGCGC AATCCGTTTC GCAACGTTTG
ompA B.para.seq GCTTCCGCGC AAACCGTGGG CAACTGGCGC AATCCGTTTG GCGACGTTTG
ompA B.pert.seq GCTTCCGCGC AAACCGTGGG CAACTGGCGC AATCCGTTTG GCGACGTTTG
ompA B.petri.seq GCTTCCGCGC AAACCGTGGG CAACTGGCGC AATCCGTTTC GCGACGTTTG
ompA B.trem.seq GCCTCGGCTC AGACGGTGGG CAACTGGCGC AATCCGTTTC GTGACGTTTG
51
ompA A.xylos.seq GAAGAACGGT ACGAACGAAC TGTGCTGGCG CGATGCGTTC TGGACCCCGG
ompA B.avium.seq GAAGAACGGC ACGAATGAAT TGTGCTGGCG CGATGCCTTC TGGACCCCGG
ompA B.bron.seq GAAGAACGGC ACCAATGAAC TGTGCTGGCG CGATGCGTTC TGGACCCCGG
ompA B.hinz.seq GAAGAACGGC ACGAATGAAC TGTGCTGGCG CGATGCGTTC TGGACCCCGG
ompA B.holm.seq GAAAAACGGC ACGAACGAAC TGTGCTGGCG CGATGCGTTC TGGACCCCGG
ompA B.para.seq GAAGAACGGC ACCAATGAAC TGTGCTGGCG CGATGCGTTC TGGACCCCGG
ompA B.pert.seq GAAGAACGGC ACCAATGAAC TGTGCTGGCG CGATGCGTTC TGGACCCCGG
ompA B.petri.seq GATGAACGGC ACGAATGAAC TGTGCTGGCG CGATGCCTTC TGGACCCCGG
ompA B.trem.seq GAAGAACGGC ACGAACGAAT TGTGCTGGCG CGACGCCTTC TGGACTCCGG
101
ompA A.xylos.seq CCACCGGCAT CCCC GGCTGC GACGGCGTTC CGGTTGCCCA ACAA...AAG
ompA B.avium.seq CCACCGGCAT CCCC GGCTGC GACGGCGTTC CGGTTGCTCA GCAACCGAAG
ompA B.bron.seq CTACCGGCAT CCCC GGTTGC GACGGCGTTC CGGTCGCTCA GAAG...GAA
ompA B.hinz.seq CTACCGGCAT CCCC GGTTGC GACGGCGTTC CGGTCGCTCA GAAG...GAA
ompA B.holm.seq CTACCGGCAT CCCC GGTTGC GACGGCGTTC CGGTCGCTCA GAAG...GAA
ompA B.para.seq CTACCGGCAT CCCC GGTTGC GACGGCGTTC CGGTCGCTCA GAAG...GAA
ompA B.pert.seq CTACCGGCAT CCCC GGTTGC GACGGCGTTC CGGTCGCTCA GAAG...GAA
ompA B.petri.seq CGACCGGCAT CCCC GGTTGC GACGGCGTTC CGGTCGCTCA GGCG...CCCG
ompA B.trem.seq CCACCGGTAT CCCC GGCTGC GACGGCGTTC CGGTCGCTCA AAAG...CAA
151
ompA A.xylos.seq GCGAAGCCCG CCCC GATGGC GGCCAAGGTC GTGTTCAACG CTGACACGTT
ompA B.avium.seq GAAAAGCCCG CCCC GATGGC CGCCAAGGTC GTCTTCAACG CTGACACCTT
ompA B.bron.seq ...AAGCCCG CTCCCATGGC CGCCAAGGTC GTGTTCAATG CTGACACCTT
ompA B.hinz.seq ...AAGCCCG CCCC GATGGC CGCTAAGGTC GTGTTCAATG CTGACACGTT
ompA B.holm.seq ...AAGCCCG CCCC GATGGC CGCTAAGGTC GTGTTCAATG CTGACACGTT
ompA B.para.seq ...AAGCCCG CTCCCATGGC CGCCAAGGTC GTGTTCAATG CTGACACCTT
ompA B.pert.seq ...AAGTCCG CTCCCATGGC CGCCAAGGTC GTGTTCAATG CTGACACCTT
ompA B.petri.seq .CCAAGCCGA CGCCGATGGC CACCAAGGTC GTCTTCAACG CCGACACGTT
ompA B.trem.seq CCAAGCCCG CTCCCATGGC CACCAAGGTC GTGTTCAACG CTGACACGTT
201
ompA A.xylos.seq CTTCGACTTC GACAAGTCTGA CGCTGAAGCC CGAAGGCCGT CAGCTGCTGG
ompA B.avium.seq CTTCGACTTC GACAAGTCCA CGCTGAAGCC CGAAGGCCGT CAGCTGCTGG
ompA B.bron.seq CTTCGACTTC GACAAGTCTGA CGCTGAAGCC GGAAGGCCGC CAGCTGCTGG
ompA B.hinz.seq CTTCGACTTC GACAAGTCCG TGCTGAAGCC GGAAGGCCGT CAACTGTTGG
ompA B.holm.seq CTTCGACTTC GACAAGTCCG TGCTGAAGCC GGAAGGCCGC CAACTGTTGG
ompA B.para.seq CTTCGACTTC GACAAGTCTGA CGCTGAAGCC GGAAGGCCGC CAGCTGCTGG
ompA B.pert.seq CTTCGACTTC GACAAGTCTGA CGCTGAAGCC GGAAGGCCGC CAGCTGCTGG
ompA B.petri.seq CTTCGACTTC GACAAGTCTGA CGCTGAAGCC GGAAGGCCGC CAGCTGCTGG
ompA B.trem.seq CTTTGAATTC GACAAAGCCA CGCTGAAGCC GGAAGGCCGT CAGCTGCTGC
251
ompA A.xylos.seq ACCAAGTCGC CCAGCAAGCT CGCGGATATCG AGCTGGAAC GATCATCGCC
ompA B.avium.seq ATCAAGTCGC GCAGCAAGCT CGCGGATATCG ATCTGGAAC CATCATCGCC
ompA B.bron.seq ATCAAGTCGC CCAGCAAGCC GGCACGATCG ATCTGGAAC GATCATCGCC
ompA B.hinz.seq ACCAAGTCGC CCAGCAAGCT GGCACGATCG ATCTGGAAC CATCATCGCC
ompA B.holm.seq ACCAAGTCGC CCAGCAAGCC AAGGCGATCG ACCTGGAAC CATCATCGCC
ompA B.para.seq ATCAAGTCGC CCAGCAAGCC GGCACGATCG ATCTGGAAC GATCATCGCC
ompA B.pert.seq ATCAAGTCGC CCAGCAAGCC GGCACGATCG ATCTGGAAC GATCATCGCC
ompA B.petri.seq ATCAAGTTGC CCAGCAAGCC CAAGGCATCG ACCTGGAAC CATCATCGCC
ompA B.trem.seq ACCAAGTCGC TCAGCAAGCC AAGGCCATCA ACCTGGAAC CATCATGCT

```

```

301
ompA A.xylos.seq GTTGGCCACA CCGACTCGAT CCGTACGGAC GCCTACAACC AGAAGCTGTC
ompA B.avium.seq GTCCGTAACA CCGACTCGAT CCGTACCGAA GCCTACAACA TGAAGCTTTC
ompA B.bron.seq GTTGGCCACA CCGACTCGAT CCGCACCAGAA GCCTACAACC AGAAGCTGTC
ompA B.hinz.seq GTCCGGCCACA CCGACTCGAT CCGTACCGAA GCCTACAACC AGAAGCTGTC
ompA B.holm.seq GTCGGCCACA CCGACTCGAT CCGTACCGAA GCCTACAACC TGAAGCTCTC
ompA B.para.seq GTTGGCCACA CCGACTCGAT CCGCACCAGAA GCCTACAACC AGAAGCTGTC
ompA B.pert.seq GTTGGCCACA CCGACTCGAT CCGCACCAGAA GCCTACAACC AGAAGCTGTC
ompA B.petri.seq GTTGNCACA CCGACTCGAT CCGTACCGAA AAGTACAACC AAGGCCTGTC
ompA B.trem.seq GTGGGCCACA CCGACTCGAT CCGTACCGAA GCCTACAACA TGAAGCTGTC
351
ompA A.xylos.seq CGAGCGTCGT GCCGCTTCGG TCAAGGCCTA CCTGGTCAGC AAGGGCATCG
ompA B.avium.seq CGAGCGCCGC GCCGCTTCGG TCAAGGCTTA CCTGGTGAGC AAGGGCATCG
ompA B.bron.seq CGAGCGCCGT GCCGCTGCGG TCAAGACCTA CCTGGTCAGC AAGGGTATCG
ompA B.hinz.seq CGAGCGCCGT GCCGCTTCGG TCAAGGCTTA CCTGGTCAGC AAGGGTATCG
ompA B.holm.seq CGACCGCCGC GCTGCTTCGG TCAAGGCTTA CCTGGTCAGC AAGGGCATCG
ompA B.para.seq CGAGCGCCGT GCCGCTGCGG TCAAGACCTA CCTGGTCAGC AAGGGTATCG
ompA B.pert.seq CGAGCGCCGT GCCGCTGCGG TCAAGACCTA CCTGGTCAGC AAGGGTATCG
ompA B.petri.seq CGAGCGCCGT GCCGCTTCGG TCAAGTCGTA CCTGGTAAGC AAGGGTTCG
ompA B.trem.seq CGTGCCTCGT GCTGACGCCG TGAAGGCTTA CCTGGTTGGC CAGGGCATCG
401
ompA A.xylos.seq ATCCGAACCG TATCTACACG GAAGGCAAGG GT~~~~~
ompA B.avium.seq ATCCGAACCG TATCTACACG GAAGGCAAGG GCAAGCTGAA CCCGATCGCC
ompA B.bron.seq ACCCAACCG TATCTACACG GAAGGCAAGG GCGAAGTGA ACCGATCGCT
ompA B.hinz.seq ACCCGAACCG TATCTACACG GAAGGCGAGC . . . . .TGCA GCCCATCGCG
ompA B.holm.seq ATCCGAACCG TATCTACACG GAAGGCAAGG GCGAAGTGA GCCCATCGCG
ompA B.para.seq ACCCAACCG TATCTACACG GAAGGCAAGG GCGAAGTGA ACCGATCGCT
ompA B.pert.seq ACCCAACCG TATCTACACG GAAGGCAAGG GCGAAGTGA ACCGATCGCT
ompA B.petri.seq ACCCAACCG T. . TACACG GAAGGCAAGG ~~~~~
ompA B.trem.seq ATCCGAACCG CATCTACACG GAAGGCAAGG GCGAAGCCA GCCGATCGCG
451
ompA A.xylos.seq ~~~~~
ompA B.avium.seq TCCAACAAGA CCGCCGAAGG CCGCGCCCGT AACCGTCGCG TGGAAATCGA
ompA B.bron.seq TCGAACAAGA CCGGTGAAGG CCGTGCCCGAG AACCGTCGCG TGGAAATCGA
ompA B.hinz.seq ACCAACAAGA CCGCCGAAGG CCGCGCCCGC AACCGCCGCG TGGAAATCGA
ompA B.holm.seq ACCAACAAGA CCGCCGAAGG CCGCGCTCGC AATCGCCGCG TGGAAATCGA
ompA B.para.seq TCGAACAAGA CCGGTGAAGG CCGTGCCCGAG AACCGTCGCG TGGAAATCGA
ompA B.pert.seq TCGAACAAGA CCGGTGAAGG CCGTGCCCGAG AACCGTCGCG TGGAAATCGA
ompA B.petri.seq ~~~~~
ompA B.trem.seq AGCAACAAGA CCGCCGAAGG TCGTGCCCGC AACCGTCGCG TGGAAATCGA
501
ompA A.xylos.seq ~~~~~
ompA B.avium.seq AATCGTCGGT AGCCGC
ompA B.bron.seq GATCGTCGGT AGCCGC
ompA B.hinz.seq AATCGTCGGC AGCCGT
ompA B.holm.seq GATCGTCGGC AGCCGT
ompA B.para.seq GATCGTCGGT AGCCGC
ompA B.pert.seq AATCGTCGGT AGCCGC
ompA B.petri.seq ~~~~~
ompA B.trem.seq GATCGTCGGC AGCCGC

```

40B

```

1
ompA A.xylos.pep AYPQTVDNWR NPFQNVWKNQ TNELCWRDAF WTPATGIPGC DGVVPAQK.Q
ompA B.avium.pep ASAQTVDNWR NPYGNVWKNQ TNELCWRDAF WTPATGIPGC DGVVPAQK.Q
ompA B.bron.pep ASAQTVDNWR NPFQDVWKNQ TNELCWRDAF WTPATGIPGC DGVVPAQK.E
ompA B.hinz.pep ASAQTVDNWR NPFQDVWKNQ TNELCWRDAF WTPATGIPGC DGVVPAQK.E
ompA B.para.pep ASAQTVDNWR NPFQNVWKNQ TNELCWRDAF WTPATGIPGC DGVVPAQK.E
ompA B.pert.pep ASAQTVDNWR NPFQDVWKNQ TNELCWRDAF WTPATGIPGC DGVVPAQK.E
ompA B.petri.pep ASAQTVDNWR NPFQDVWKNQ TNELCWRDAF WTPATGIPGC DGVVPAQA.P
ompA B.trem.pep ASAQTVDNWR NPFQDVWKNQ TNELCWRDAF WTPATGIPGC DGVVPAQK.Q
51
ompA A.xylos.pep AKPAPMAAKV VFNADTFFDF DKSTLKPEGR QLLDQVAQQA RGIELETIIA
ompA B.avium.pep EKPAPMAAKV VFNADTFFDF DKSTLKPEGR QLLDQVAQQA RAIDLETIIA
ompA B.bron.pep .KPAPMAAKV VFNADTFFDF DKSTLKPEGR QLLDQVAQQA GTIDLETIIA
ompA B.hinz.pep .KPAPMAAKV VFNADTFFDF DKSVLKPEGR QLLDQVAQQA GTIDLETIIA
ompA B.holm.pep .KPAPMAAKV VFNADTFFDF DKSVLKPEGR QLLDQVAQQA KAIIDLETIIA
ompA B.para.pep .KPAPMAAKV VFNADTFFDF DKSTLKPEGR QLLDQVAQQA GTIDLETIIA
ompA B.pert.pep .KSAPMAAKV VFNADTFFDF DKSTLKPEGR QLLDQVAQQA GTIDLETIIA
ompA B.petri.pep AKPTPMATKV VFNADTFFDF DKSTLKPEGR QLLDQVAQQA QGIDLETIIA
ompA B.trem.pep PKPAPMATKV VFNADTFFDF DKATLKPEGR QLLDQVAQQA KAINLETIIA

```

	101					150
ompA <i>A.xylos.pep</i>	VGHTDSIGTD	AYNQKLSERR	AASVKAYLVS	KGIDPNRIYT	EGKG~~~~~	
ompA <i>B.avium.pep</i>	VGNTDSIGTE	AYNMKLSERR	AASVKAYLVS	KGIDPNRIYT	EGKGKLNPIA	
ompA <i>B.bron.pep</i>	VGHTDSIGTE	AYNQKLSERR	AAAVKTYLVS	KGIDPNRIYT	EGKGELQPIA	
ompA <i>B.hinz.pep</i>	VGHTDSIGTE	AYNQKLSERR	AASVKAYLVS	KGIDPNRIYT	EG. .ELQPIA	
ompA <i>B.holm.pep</i>	VGHTDSIGTE	AYNLKLSDRR	AASVKAYLVS	KGIDPNRIYT	EGKGEAQPIA	
ompA <i>B.para.pep</i>	VGHTDSIGTE	AYNQKLSERR	AAAVKTYLVS	KGIDPNRIYT	EGKGELQPIA	
ompA <i>B.pert.pep</i>	VGHTDSIGTE	AYNQKLSERR	AAAVKTYLVS	KGIDPNRIYT	EGKGELQPIA	
ompA <i>B.petri.pep</i>	VGHTDSIGTE	KYNQGLSERR	AASVKSYLVS	KGVDP.TDYT	EG~~~~~	
ompA <i>B.trem.pep</i>	VGHTDSIGTE	AYNMKLSVRR	ADAVKAYLVG	QGIDPNRIYT	EGKGEAQPIA	
	151		172			
ompA <i>A.xylos.pep</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
ompA <i>B.avium.pep</i>	SNKTAEGRAR	NRRVEIEIVG	SR			
ompA <i>B.bron.pep</i>	SNKTREGRAQ	NRRVEIEIVG	SR			
ompA <i>B.hinz.pep</i>	TNKTAEGRAR	NRRVEIEIVG	SR			
ompA <i>B.holm.pep</i>	TNKTAEGRAR	NRRVEIEIVG	SR			
ompA <i>B.para.pep</i>	SNKTREGRAQ	NRRVEIEIVG	SR			
ompA <i>B.pert.pep</i>	SNKTREGRAQ	NRRVEIEIVG	SR			
ompA <i>B.petri.pep</i>	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
ompA <i>B.trem.pep</i>	SNKTAEGRAR	NRRVEIEIVG	SR			

Abbildung 40: Alignment der in 1.1.2 ermittelten DNA- (Abb. 40A) und Aminosäuresequenzen (Abb. 40B) des Membranproteins OmpA aus einzelnen *Bordetella*-Arten.

Die *ompA*- bzw. OmpA-Sequenzen von *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium* und *B. petrii* beziehen sich auf die in den Datenbanken veröffentlichten Daten. Die Genbank-Nummern für die *ompA*- bzw. OmpA-Sequenz aus *B. pertussis* lauten BX470248 bzw. CAE41245, aus *B. parapertussis* BX470249 bzw. CAE38420, aus *B. bronchiseptica* BX470250 bzw. CAE33966, aus *B. avium* M96550 bzw. AAA22979 und aus *B. petrii* AJ242599 bzw. CAB51905.

A. xylos. = *A. xylosoxidans*; *B. bron.* = *B. bronchiseptica*; *B. hinz.* = *B. hinzii*; *B. holm.* = *B. holmesii*; *B. para.* = *B. parapertussis*; *B. pert.* = *B. pertussis*; *B. petri.* = *B. petrii*; *B. trem.* = *B. trematum*.

	<i>B. pert.</i>	<i>B. para.</i>	<i>B. bron.</i>	<i>B. avium</i>	<i>B. holm.</i>	<i>B. hinz.</i>	<i>B. trem.</i>	<i>B. petri.</i>	<i>A. xylos.</i>
<i>B. pert.</i>	---	99,4%	99,4%	92,3%	92,4 %	95,8%	90,6%	89,2%	92,3%
	---	99,6%	99,6%	87,2%	87,2%	91,3%	84,3%	87,1%	89,9%
<i>B. para.</i>	99,4%	---	100%	92,9%	92,9%	96,4%	91,2%	89,9%	92,9%
	99,6%	---	100%	88,6%	87,6%	91,3%	84,7%	87,4%	90,2%
<i>B. bron.</i>	99,4%	100%	---	92,9%	92,9%	96,4%	91,2%	89,9%	92,9%
	99,6%	100%	---	88,6%	87,6%	91,3%	84,7%	87,4%	90,2%
<i>B. avium</i>	92,3%	92,9%	92,9%	---	94,1 %	94,0%	89,5%	87,9%	93,7%
	88,6%	88,6%	88,6%	---	89,0%	91,3%	86,3%	84,6%	90,0%
<i>B. holm.</i>	92,4%	92,9%	92,9%	94,1%	---	96,4%	92,4%	87,8%	93,0%
	87,2%	87,6%	87,6%	89,0%	---	93,1%	88,0%	83,8%	88,9%
<i>B. hinz.</i>	95,8%	96,4%	96,4%	94,0%	96,4%	---	91,1%	89,9%	92,9%
	91,3%	91,3%	91,3%	91,3%	93,1%	---	87,9%	87,0%	91,7%
<i>B. trem.</i>	90,6%	91,2%	91,2%	89,5%	92,4%	91,1%	---	85,5%	87,4%
	84,3%	84,7%	84,7%	86,3%	88,0%	87,9%	---	81,8%	86,7%
<i>B. petri.</i>	89,2%	89,9%	89,9%	87,9%	87,8%	89,9%	85,0%	---	87,9%
	87,1%	87,4%	87,4%	84,6%	83,8%	87,0%	81,8%	---	84,6%
<i>A. xylos.</i>	92,3%	92,9%	92,9%	93,7%	93,0%	92,9%	87,4%	87,9%	---
	89,9%	90,2%	90,2%	90,0%	88,9%	91,7%	86,7%	84,6%	---

Tabelle 5: Prozent identischer Nukleotide und Aminosäuren in der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der in 1.1.2 ermittelten Sequenzabschnitte des Membranproteins OmpA.

Die Identität zwischen den Nukleotidsequenzen ist in grau, die Identität zwischen den Aminosäuresequenzen ist in schwarz angegeben. Die *ompA*- bzw. OmpA-Sequenzen von *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium* und *B. petrii* beziehen sich auf die in den Datenbanken veröffentlichten Daten (siehe Abbildung 33).

A. xylos. = *A. xylosoxidans*; *B. bron.* = *B. bronchiseptica*; *B. hinz.* = *B. hinzii*; *B. holm.* = *B. holmesii*; *B. para.* = *B. parapertussis*; *B. pert.* = *B. pertussis*; *B. petri.* = *B. petrii*; *B. trem.* = *B. trematum*.

	1				50
risA A.xylos.seq	CGCCTGCGCG	ATCTGCTGCG	CCGGTATCTG	TCCGAGCAGG	GGTTCAACGT
risA B.avium.seq	CGACTGCGCG	ATCTCCTGCG	CCGCTATCTG	TCGGAACAAG	GGTTCAATGT
risA B.bron.seq	CGACTGCGCG	ATCTCCTGCG	CCGCTATCTG	TCGGAACAAG	GGTTCAATGT
risA B.hinz.seq	CGACTGCGCG	ATCTGCTGCG	CCGCTACCTG	TCGGAACAAG	GGTTCAATGT
risA B.holm.seq	CGCCTGCGCG	ATCTGCTGCG	CCGCTACCTG	TCGGAACAAG	GGTTCAATGT
risA B.para.seq	CGACTGCGCG	ATCTCCTGCG	CCGCTATCTG	TCGGAACAAG	GGTTCAATGT
risA B.pert.seq	CGACTGCGCG	ATCTCCTGCG	CCGCTATCTG	TCGGAACAAG	GGTTCAATGT
risA B.petri.seq	CGCCTGCGCG	ATCTGCTGCG	CCGCTACTTG	TCGGAACAAG	GATTCAACGT
risA B.trem.seq	CGCCTGCGGT	ATCTGCTCCG	CCGCTATCTG	TCGGAACAAG	GGTTCAATGT
	51				100
risA A.xylos.seq	NTTCGTTGCC	GAAGACGCCA	AAGAGATGGG	CAAACCTCTGG	CAACGCGAGC
risA B.avium.seq	ATTTCGTGGCC	GAAGATGCCA	AGGAAATGGG	CAAACCTGTGG	CAACGCGAAC
risA B.bron.seq	ATTTCGTGGCC	GAAGATGCCA	AGGAAATGGG	CAAACCTGTGG	CAACGCGAAC
risA B.hinz.seq	CTTCGTGCGC	GAGGATGCCA	AGGAAATGGG	CAAGCTCTGG	CAGCGCGAAC
risA B.holm.seq	CTTCGTTGCC	GAGGATGCCA	AGGAAATGGG	CAAGCTCTGG	CAGCGTGAGC
risA B.para.seq	ATTTCGTGGCC	GAAGATGCCA	AGGAAATGGG	CAAACCTGTGG	CAACGCGAAC
risA B.pert.seq	ATTTCGTGGCC	GAAGATGCCA	AGGAAATGGG	CAAACCTGTGG	CAACGCGAAC
risA B.petri.seq	CTTCGTGCGC	GAAGACGCCA	AGGAAATGGG	CAAGCTCTGG	CAGCGCGAGC
risA B.trem.seq	CTTCGTGCGC	GAGGATGCCA	AGGAAATGGG	CAAGCTCTGG	CAACGCGAGC
	101				150
risA A.xylos.seq	ACTTCGACCT	GCTCGTGCTG	GATCTGATGC	TGCCGGGCGA	GGATGGCCTG
risA B.avium.seq	ACTTTGACCT	GCTGGTTCTC	GACCTGATGC	TGCCGGGCGA	GGATGGCCTG
risA B.bron.seq	ACTTTGACCT	GCTGGTTCTC	GACCTGATGC	TGCCGGGCGA	GGATGGCCTG
risA B.hinz.seq	ACTTCGACCT	GCTCGTCCTC	GACCTGATGC	TGCCGGGCGA	GGATGGTTTG
risA B.holm.seq	ACTTTGACCT	GCTCGTCCTC	GATTTGATGC	TTCCGGGCGA	GGATGGTCTG
risA B.para.seq	ACTTTGACCT	GCTGGTTCTC	GACCTGATGC	TGCCGGGCGA	GGATGGCCTG
risA B.pert.seq	ACTTTGACCT	GCTGGTTCTC	GACCTGATGC	TGCCGGGCGA	GGATGGCCTG
risA B.petri.seq	ACTTCGACCT	GCTGGTGCTC	GACCTGATGC	TGCCGGGCGA	AGACGGACTG
risA B.trem.seq	ACTTTGATCT	CCTGGTGCTC	GACCTGATGC	TGCCGGGCGA	GGATGGTCTG
	151				200
risA A.xylos.seq	TCCATCTGTG	GCCGGCTGCG	CGGTGGCCAC	GACAACACCC	CAATCATCAT
risA B.avium.seq	TCGATCTGCC	GCCGCCTGCG	CGGCGGCCAC	GACAATACTC	CCATCATCAT
risA B.bron.seq	TCGATCTGCC	GCCGCCTGCG	CGGCGGCCAC	GACAATACTC	CCATCATCAT
risA B.hinz.seq	TCGATCTGCC	GCGCGCTGCG	GCGGCGCCAC	GACAATACGC	CCATCATCAT
risA B.holm.seq	TCGATCTGCC	GACGGCTGCG	GGGCGGCCAC	GACAATACAC	CCATCATCAT
risA B.para.seq	TCGATCTGCC	GCCGCCTGCG	CGGCGGCCAC	GACAATACTC	CCATCATCAT
risA B.pert.seq	TCGATCTGCC	GCCGCCTGCG	CGGCGGCCAC	GACAATACTC	CCATCATCAT
risA B.petri.seq	TCGATCTGCC	GCCGCCTGCG	GCGGCGCCAC	GACAACACCC	CCATCATCAT
risA B.trem.seq	TCGATCTGTG	GCCGCCTGCG	CGGCGGCCAC	GACAACACCC	CCATCATCAT
	201				250
risA A.xylos.seq	GCTGACCGCC	AAGGCCGGAAG	AAATCGACCG	CATCGTCGGC	CTGGAGATGG
risA B.avium.seq	GCTGACCGCC	AAGGCCGAGG	AAATCGACCG	GATCGTCGGC	CTGGAAATGG
risA B.bron.seq	GCTGACCGCC	AAGGCCGAGG	AAATCGACCG	GATCGTCGGC	CTGGAAATGG
risA B.hinz.seq	GCTGACCGCC	AAGGCCGAGG	AAATCGACCG	CATCGTCGGC	CTGGAGATGG
risA B.holm.seq	GCTGACCGCC	AAGGCCGGAAG	AGATCGACCG	TATCGTCGGC	CTTGAAATGG
risA B.para.seq	GCTGACCGCC	AAGGCCGAGG	AAATCGACCG	GATCGTCGGC	CTGGAAATGG
risA B.pert.seq	GCTGACCGCC	AAGGCCGAGG	AAATCGACCG	GATCGTCGGC	CTGGAAATGG
risA B.petri.seq	GCTCACGGCC	AAGGCCGGAAG	AAATCGACCG	CATCGTCGGC	CTCGAAATGG
risA B.trem.seq	GCTGACCGCC	AAGGCCGAGG	AAATCGACCG	CATCGTCGGC	CTTGAGATGG
	251				300
risA A.xylos.seq	GTGCGGACGA	CTACCTGTCC	AAGCCCTTCA	ACCCGCGCGA	ACTGCTGGCC
risA B.avium.seq	GAGCCGACGA	TTACCTGTCC	AAGCCCTTCA	ACCCGCGCGA	ACTGCTGGCC
risA B.bron.seq	GAGCCGACGA	TTACCTGTCC	AAGCCCTTCA	ACCCGCGCGA	ACTGCTGGCC
risA B.hinz.seq	GCGCCGACGA	TTACCTGTCC	AAGCCCTTCA	ATCCGCGCGA	GCTGCTGGCC
risA B.holm.seq	GCGCTGACGA	CTACTTGTCC	AAGCCCTTCA	ACCCGCGGAG	GCTGCTGGCC
risA B.para.seq	GAGCCGACGA	TTACCTGTCC	AAGCCCTTCA	ACCCGCGCGA	ACTGCTGGCC
risA B.pert.seq	GAGCCGACGA	TTACCTGTCC	AAGCCCTTCA	ACCCGCGCGA	ACTGCTGGCC
risA B.petri.seq	GCGCCGACGA	CTACCTGTCC	AAGCCCTTCA	ATCCGCGCGA	ACTGCTGGCT
risA B.trem.seq	GCGCCGATGA	TTATCTTTCC	AAGCCCTTCA	ACCCGCGCGA	ACTGCTGGCC
	301				350
risA A.xylos.seq	CGGATCAACG	CGATCCTGCG	CCGCCGCGGC	ACCGAGGAAC	ATCCCGGGGC
risA B.avium.seq	CGCATCAATG	CGATCCTGCG	CCGCCGCGGC	ACCGAAGAGC	ACCCGGGGCG
risA B.bron.seq	CGCATCAATG	CGATCCTGCG	CCGCCGCGGC	ACCGAAGAGC	ACCCGGGGCG
risA B.hinz.seq	CGCATCAATG	CGATCCTGCG	CCGCCGCGGC	ACCGAAGAGC	ATCCGGGGCG
risA B.holm.seq	CGCATCAATG	CGATCCTGCG	CCGCCGCGGC	ACCGAAGAGC	ATCCGGGGCG
risA B.para.seq	CGCATCAATG	CGATCCTGCG	CCGCCGCGGC	ACCGAAGAGC	ACCCGGGGCG
risA B.pert.seq	CGCATCAATG	CGATCCTGCG	CCGCCGCGGC	ACCGAAGAGC	ACCCGGGGCG
risA B.petri.seq	CGCATCAATG	CCATCCTGCG	CCGCCGCGGC	ACCGAAGAAC	ACCCGGGGCG
risA B.trem.seq	CGCATCAACG	CGATCCTGCG	TCGCCGCGGC	ACCGAAGAGC	ACCCGGGGCG


```

risA A.xylos.seq  CCCCAGCCAG  GAAAACGAAT  CCATCGCCTT  CGGCCCTAC  GTGCTGAACC
risA B.avium.seq  GCCCAGCCAG  GAAAACGAGT  CGATCGCCTT  CGGCCCGTAC  GTCCTGAACC
risA B.bron.seq   GCCCAGCCAG  GAAAACGAGT  CGATCGCCTT  CGGCCCGTAC  GTCTGAACC
risA B.hinz.seq   CCCCAGCCAG  GAAAACGAGT  CGATCGCCTT  CGGTCCCTAT  GTGCTGAACC
risA B.holm.seq   TCCCAGCCAG  GAGAACGAGT  CGATTGCTTT  CGGGCCCTAT  GTGCTCAACC
risA B.para.seq   GCCCAGCCAG  GAAAACGAGT  CGATCGCCTT  CGGCCCGTAC  GTCCTGAACC
risA B.pert.seq   GCCCAGCCAG  GAAAACGAGT  CGATCGCCTT  CGGCCCGTAC  GTCTGAACC
risA B.petri.seq  GCCCAGCCAG  GAAAACGAGT  CCATCGCTTT  CGGGCCCTAT  GTGCTCAACC
risA B.trem.seq   ACCCAGCCAG  GAAAACGAGT  CGATCGCCTT  CGGCCCTAT   GTGCTGAATC
401                                                    450

risA A.xylos.seq  TGTCGACCCG  CACGCTCAGC  CGCAACGGCG  AACAGGTGCC  CATCACGACC
risA B.avium.seq  TGTCACGCGC  CACCCTCACC  CGCAATGGCG  AGCAGGTGCC  GATCACGACC
risA B.bron.seq   TGTCACGCGC  CACCCTCACC  CGCAATGGCG  AGCAGGTGCC  GATCACGACC
risA B.hinz.seq   TCTCGACCCG  CACCCTGACG  CGCAACGGCG  AACAAAGTGC  CATCACGACC
risA B.holm.seq   TGTCGACCCG  CACCCTTACC  CGCAATGGCG  AGCAGGTGCC  CATCACACC
risA B.para.seq   TGTCACGCGC  CACCCTCACC  CGCAATGGCG  AGCAGGTGCC  GATCACGACC
risA B.pert.seq   TGTCACGCGC  CACCCTCACC  CGCAATGGCG  AGCAGGTGCC  GATCACGACC
risA B.petri.seq  TGTCACCCCG  CACGCTTACG  CGCA~~~~~  ~~~~~~  ~~~~~~
risA B.trem.seq   TCTCGACCCG  CACCCTGACG  CGCAACGGCG  AACAGGTCCC  CATCACGACC
451                                                    500

risA A.xylos.seq  GGCGAATTCT  CGGTGCTCAA  GGTGTTTGCG  CGCCACCCGA  AGATTCCGCT
risA B.avium.seq  GGCGAATTCT  CGGTCTTGAA  GGTTTTTGCC  CGCCATCCCA  AGATCCCCT
risA B.bron.seq   GGCGAATTCT  CGGTCTTGAA  GGTTTTTGCC  CGCCATCCCA  AGATCCCCT
risA B.hinz.seq   GGCGAGTTCT  CGGTCTTGAA  GGTCTTCGCG  CGCCACCCCA  AGATCCCCT
risA B.holm.seq   GGCGAGTTCT  CGGTCTTGAA  GGTCTTCGCG  CGCCACCCCA  AGATCCCCT
risA B.para.seq   GGCGAATTCT  CGGTCTTGAA  GGTTTTTGCC  CGCCATCCCA  AGATCCCCT
risA B.pert.seq   GGCGAATTCT  CGGTCTTGAA  GGTTTTTGCC  CGCCATCCCA  AGATCCCCT
risA B.petri.seq  ~~~~~~  ~~~~~~  ~~~~~~  ~~~~~~  ~~~~~~
risA B.trem.seq   GGCGAGTTCT  CGGTGCTCAA  GGTCTTCGCG  CGTCATCCCA  AGATCCCCT
501                                                    550

risA A.xylos.seq  GTCGCGCGAC  AAGCTCATGG  AACTGGCCCG  CGGCCGCGAA  TACGAAGCCT
risA B.avium.seq  GTCGCGCGAC  AAGCTGATGG  AACTGGCCCG  CGGACGCGAA  TACGAGGCGT
risA B.bron.seq   GTCGCGCGAC  AAGCTGATGG  AACTGGCCCG  CGGACGCGAA  TACGAGGCGT
risA B.hinz.seq   GTCGCGCGAC  AAGCTCATGG  AGCTGGCCCG  CGGCCGCGAA  TACGAGGCT
risA B.holm.seq   GTCGCGCGAC  AAGCTCATGG  AGCTGGCCCG  CGGCCGCGAG  TACGAGGCGT
risA B.para.seq   GTCGCGCGAC  AAGCTGATGG  AACTGGCCCG  CGGACGCGAA  TACGAGGCGT
risA B.pert.seq   GTCGCGCGAC  AAGCTGATGG  AACTGGCCCG  CGGACGCGAA  TACGAGGCGT
risA B.petri.seq  ~~~~~~  ~~~~~~  ~~~~~~  ~~~~~~  ~~~~~~
risA B.trem.seq   GTCGCGCGAC  AAATCATGG   AACTGGCCCG  CGGCCGCGAA  TACGAAGCCT
551                                                    574

risA A.xylos.seq  TCGACCGCAG  CCTGACGTG  CAGT
risA B.avium.seq  TCGACCGCAG  CCTGGATGTG  CAGA
risA B.bron.seq   TCGACCGCAG  CCTGGATGTG  CAGA
risA B.hinz.seq   TCGATCGAAG  CCTGGACGTG  CAGA
risA B.holm.seq   TCGACCGCAG  CCTGGACGTG  CAGA
risA B.para.seq   TCGACCGCAG  CCTGGATGTG  CAGA
risA B.pert.seq   TCGACCGCAG  CCTGGATGTG  CAGA
risA B.petri.seq  ~~~~~~  ~~~~~~  ~~~~~~
risA B.trem.seq   TCGACCGCAG  CCTGGACGTG  CAGA

```

Abbildung 41: Alignment der in 1.1.2 ermittelten DNA-Sequenzen des Regulatorproteins RisA der einzelnen *Bordetella*-Arten. Die *risA*-Sequenzen von *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium* und *B. petrii* beziehen sich auf die in den Datenbanken veröffentlichten Daten. Von der *risA*-Sequenz aus *B. petrii* wurde nur der zum Zeitpunkt des Sequenzvergleiches in der Datenbank publizierte Teilbereich in das Alignment mit aufgenommen. Die Genebank-Nummer für die *risA*-Sequenz aus *B. pertussis* lautet BX470248, aus *B. parapertussis* BX470249, aus *B. bronchiseptica* BX470250, aus *B. avium* AJ224800 und aus *B. petrii* AJ242553.

A. xylos. = *A. xylosoxidans*; *B. bron.* = *B. bronchiseptica*; *B. hinz.* = *B. hinzii*; *B. holm.* = *B. holmesii*; *B. para.* = *B. parapertussis*; *B. pert.* = *B. pertussis*; *B. petri.* = *B. petrii*; *B. trem.* = *B. trematum*.

	<i>B. pert.</i>	<i>B. para.</i>	<i>B. bron.</i>	<i>B. avium</i>	<i>B. holm.</i>	<i>B. hinz.</i>	<i>B. trem.</i>	<i>B. petri.</i>	<i>A. xylos.</i>
<i>B. pert.</i>	---	99,8%	99,8%	99,8%	89,7%	91,1%	90,6%	89,9%	88,3%
<i>B. para.</i>	99,8%	---	100%	100%	90,0%	91,3%	90,8%	89,9%	88,3%
<i>B. bron.</i>	99,8%	100%	---	100%	90,0%	91,3%	90,8%	89,9%	88,3%
<i>B. avium</i>	99,8%	100%	100%	---	89,9%	91,3%	90,8%	89,9%	88,3%
<i>B. holm.</i>	89,7%	90,0%	90,0%	89,9%	---	92,0%	89,0%	89,2%	86,6%
<i>B. hinz.</i>	91,1%	91,3%	91,3%	91,3%	92,0%	---	92,3%	90,1%	88,7%
<i>B. trem.</i>	90,6%	90,8%	90,8%	90,8%	89,0%	92,3%	---	90,1%	88,7%
<i>B. petri.</i>	89,9%	89,9%	89,9%	89,9%	89,2%	90,1%	90,1%	---	88,7%
<i>A. xylos.</i>	88,3%	88,3%	88,3%	88,3%	86,6%	88,7%	88,7%	88,7%	---

Tabelle 6: Prozent identischer Aminosäuren in der Aminosäuresequenzen der in 1.1.2 ermittelten Sequenzabschnitte des Regulatorproteins RisA.

Die RisA-Sequenzen aus *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium* und *B. petrii* beziehen sich auf die in den Datenbanken veröffentlichten Daten (siehe Abbildung 34).

A. xylos. = *A. xylosoxidans*; *B. bron.* = *B. bronchiseptica*; *B. hinz.* = *B. hinzii*; *B. holm.* = *B. holmesii*; *B. para.* = *B. parapertussis*; *B. pert.* = *B. pertussis*; *B. petri.* = *B. petrii*; *B. trem.* = *B. trematum*.

Abb. 42A

		1							50
BvgA	<i>B. avium</i>	bvgAreceiv.seq	ATTATTGACG	ATCATCCCCT	CATCCGCTTT	GCCCTAAAAG	CATTGATGGA		
BvgA	<i>B. hinz</i>	bvgAreceiv.seq	ATTATTGACG	ATCATCCCCT	CATCCGGTAT	GCCGTAAAGG	GCTTGATGGA		
BvgA	<i>B. holm</i>	bvgAreceiv.seq	ATTATTGATG	ATCATCCCCT	CATCCGGTAT	GCCGTAAAGG	GCTTGATGGA		
BvgA	<i>B. pert</i>	bvgAreceiv.seq	ATCATTGACG	ATCACCCCTGT	ACTGAGATTC	GCCGTCCGGG	TCCTGATGGA		
			51						100
BvgA	<i>B. avium</i>	bvgAreceiv.seq	GAAGGAAGGT	TTCGAGGTCG	TAGGCGAAAC	TGACAATGGT	CTGGACGGCA		
BvgA	<i>B. hinz</i>	bvgAreceiv.seq	GAAAGAGGGT	TTCGAGGTCG	TGGGCGAAAC	GGACAACGGC	TTGGACGGCA		
BvgA	<i>B. holm</i>	bvgAreceiv.seq	GAAAGAGGGT	TTCGAGGTCG	TGGGCGAAAC	GGACAACGGC	TTGGACGGCA		
BvgA	<i>B. pert</i>	bvgAreceiv.seq	AAAGGAAGGA	TTCGAAGTCA	TCGGCGAAAC	CGATAACGGC	ATTGACGGGC		
			101						150
BvgA	<i>B. avium</i>	bvgAreceiv.seq	TCAGCATGGC	GCGCGAGATG	CTGCCCAACC	TCGTATCCTT	TGACATCGGC		
BvgA	<i>B. hinz</i>	bvgAreceiv.seq	TCACCATGGC	GCGGGAGCTG	CTCCCAACC	CGGTGATTCT	GGACATCGCC		
BvgA	<i>B. holm</i>	bvgAreceiv.seq	TCACCATGGC	GCGGGAGCTG	CTCCCAACC	TGGTGATTCT	GGACATCGCC		
BvgA	<i>B. pert</i>	bvgAreceiv.seq	TCAAGATCGC	CCGCGAGAAA	ATTCCCAACC	TCGTCTACT	CGACATCGGC		
			151						200
BvgA	<i>B. avium</i>	bvgAreceiv.seq	ATCCCAAAC	TGGACGGCCT	AGAGGTGCTG	ACTCGTCTAC	AAGGCCTGCG		
BvgA	<i>B. hinz</i>	bvgAreceiv.seq	ATCCCGAAGC	TCGATGGCCT	GGAGGTCCTG	ACCCGCCTGC	AGGCGCTGGG		
BvgA	<i>B. holm</i>	bvgAreceiv.seq	ATCCCGAAGC	TCGATGGCCT	GGAGGTCCTG	ACCCGCCTGC	AGGCGCTGGG		
BvgA	<i>B. pert</i>	bvgAreceiv.seq	ATTCCCAAGC	TGGACGGGCT	GGAAGTCATC	GCCCGGCTGC	AATCGCTGGG		
			201						250
BvgA	<i>B. pert</i>	bvgAreceiv.seq	CCTACCCATG	CATGTATTGA	TACTGACCGG	TCAGCAACCC	GCCCTGTTTG		
BvgA	<i>B. hinz</i>	bvgAreceiv.seq	GCTGCCCATG	CACGTGCTCA	TCCTCACTGG	CCAACAGCCC	GCCCTCTTTG		
BvgA	<i>B. holm</i>	bvgAreceiv.seq	GCTGCCCATG	CACGTGCTCA	TCCTCACTGG	CCAACAGCCC	GCCCTCTTTG		
BvgA	<i>B. pert</i>	bvgAreceiv.seq	GTTGCCGCTA	CGCGTGCTGG	TGCTGACCGG	CCAGCCGCCT	TCGCTGTTCG		
			251						285
BvgA	<i>B. avium</i>	bvgAreceiv.seq	CACGCCGATG	CCTGAATGCC	GGTGCGCCG	GCTTT			
BvgA	<i>B. hinz</i>	bvgAreceiv.seq	CCAGGCGCTG	TCTTAACGCG	GGGCGAGCCG	GGTTT			
BvgA	<i>B. holm</i>	bvgAreceiv.seq	CCAGGCGCTG	TCTTAACGCG	GGGCGAGCCG	GCTTT			
BvgA	<i>B. pert</i>	bvgAreceiv.seq	CCCGCCGCTG	CCTGAACTCC	GGCGCCGAG	GCTTC			

Abb. 42B

		1							50
BvgA	<i>B. avium</i>	bvgAreceiv.pep	IIDDHPVIRF	ALKALMEKEG	FEVVGETDNG	LDGISMAREM	LPNLVILDIG		
BvgA	<i>B. pert</i>	bvgAreceiv.pep	IIDDHPVLRP	AVRVLMEKEG	FEVIGETDNG	IDGLKIAREK	IPNLVLDIG		
BvgA	<i>B. hinz</i>	bvgAreceiv.pep	IIDDHPVIRY	AVKGLMEKEG	FEVVGETDNG	LDGITMAREL	LPNPVILDIA		
BvgA	<i>B. holm</i>	bvgAreceiv.pep	IIDDHPVIRY	AVKGLMEKEG	FEVVGETDNG	LDGITMAREL	LPNLVILDIA		
			51						95
BvgA	<i>B. avium</i>	bvgAreceiv.pep	IPKLDGLEVL	TRLQGLRLPM	HVLILTQQP	ALFARRCLNA	GAAGF		
BvgA	<i>B. pert</i>	bvgAreceiv.pep	IPKLDGLEVI	ARLQSLGLPL	RVLVLTGQPP	SLFARRCLNS	GAAGF		
BvgA	<i>B. hinz</i>	bvgAreceiv.pep	IPKLDGLEVL	TRLQALGLPM	HVLILTQQP	ALFARRCLNA	GAAGF		
BvgA	<i>B. holm</i>	bvgAreceiv.pep	IPKLDGLEVL	TRLQALGLPM	HVLILTQQP	ALFARRCLNA	GAAGF		

Abb. 42C:

```

1
BvgA B. avium bvgAout.seq GGTGCGGCCG GCTTTGTCTC TAAACACGGC AACCTCCAGG AAGTGGTAGA
BvgA B. holm bvgAout.seq GGCGCCGCGG GCTTTGTCTC CAAGCACGGT AACCTGCAAG AAGTGGTCGA
BvgA B. pert bvgAout.seq GGCGCCGCGG GCTTCGTGTG CAAACACGAG AACCTGCACG AGGTCATCAA
BvgA B. trem bvgAout.seq GGTGCGGCCG GATTTGTATC CAAGCACGGC AATCTTCAGG AAGTGGTCGA
51
BvgA B. avium bvgAout.seq CGAAGCGAAG GCCGTGGTGG CGGGTATATC CTACTTCCCT AAAACCACGC
BvgA B. holm bvgAout.seq CGCCGCCAAG GCGGTCTGTG CGGGCTACAC CTATTTCCTG AAAACCACGC
BvgA B. pert bvgAout.seq TGCCGCCAAG GCGGTGATGG CCGGCTACAC CTACTTCCCC AGCACCACGC
BvgA B. trem bvgAout.seq TGCCGCCAAG GCCGTCTGTG CCGGCTACAC CTATTTCCTG AAAACCACCC
101
BvgA B. avium bvgAout.seq TCACCGAGAT CCGT...GGC GTCGAAAAGCC AGGACGACGC CATGATGATT
BvgA B. holm bvgAout.seq TTACGGATAT TCGC...GGA GTCGAAAACC AGGACGACGC GATGATGATC
BvgA B. pert bvgAout.seq TCAGCGAGAT GCGCATGGGC GACAACGCCA AGAGCGACAG TACGCTCATC
BvgA B. trem bvgAout.seq TCAGCGACAT CCGG...GGC ACCGAGCACC AGGACGATGC GATGCTGATC
151
BvgA B. avium bvgAout.seq TCGTCCTTAT CCAACCGTGA GTTGGCGGTC TTGCAGCTTC TGGCGCAAGG
BvgA B. holm bvgAout.seq TCCTCGCTGT CGAATCGCGA GCTGGCCGTG CTGCAGTTAT TGGCTCAAGG
BvgA B. pert bvgAout.seq AGCGTGTGT CCAACCGCGA ACTGACCGTC CTGCAACTGC TGGCGCAAGG
BvgA B. trem bvgAout.seq GCCTCGCTCT CCAACCGTGA GCTGGCGGTC CTGCAACTGC TTTCCAGGG
201
BvgA B. avium bvgAout.seq CCTCACCAAC AAAGATATCG CCGATAGCAT GTTTCTCAGC
BvgA B. holm bvgAout.seq CCTGACCAAT AAAGATATTG CCGACAGCAT GTTTCTGAGC
BvgA B. pert bvgAout.seq CATGTCCAAC AAGGACATCG CTGACAGCAT GTTCTCAGC
BvgA B. trem bvgAout.seq ACTGACCAAC AAGGACATTG CCGACAGCAT GTTCTGAGC
240

```

Abb. 42D:

```

1
BvgA B. avium bvgAout.pep GAAGFVSKHG NLQEVVDEAK AVVAGYTYFP KTTLTEIRGV ESQ.DDAMMI
BvgA B. holm bvgAout.pep GAAGFVCKHE NLHEVINAAK AVMAGYTYFP STTLSEMRMG DNAKSDSTLI
BvgA B. pert bvgAout.pep GAAGFVSKHG NLQEVVDAAK AVVAGYTYFP KTTLTDIRGV ENQ.DDAMMI
BvgA B. trem bvgAout.pep GAAGFVSKHG NLQEVVDAAK AVVAGYTYFP KTTLSDIRGT EHQ.DDAMLI
51
BvgA B. avium bvgAout.pep SSLSNRELAV LQLLAQGLTN KDIADSMFSL
BvgA B. holm bvgAout.pep SVLSNRELTV LQLLAQGMNS KDIADSMFSL
BvgA B. pert bvgAout.pep SSLSNRELAV LQLLAQGLTN KDIADSMFSL
BvgA B. trem bvgAout.pep ASLSNRELAV LQLLSQGLTN KDIADSMFSL
80

```

Abbildung 42: Alignment der in 1.1.2 ermittelten DNA- und Aminosäuresequenzen der Receiver- (*bvgA~receiv.seq* (Abb. 42A) bzw. *BvgA~receiv.pep* (Abb. 42B)) und der Output-Domäne (*bvgA~out.seq* (Abb. 42C) bzw. *BvgA~out.pep* (Abb. 42D)) von *BvgA* aus einzelnen *Bordetella*-Arten.

B. holm.= *B. holmesii*; *B. hinz.*= *B. hinzii*; *B. pert.*= *B. pertussis*; *B. trem.*= *B. trematum*. Die *bvgA* bzw. *BvgA* Sequenz von *B. pertussis* bezieht sich auf die in den Datenbanken veröffentlichten Daten. Die Genebank-Nummern für die *bvgA*- bzw. *BvgA*-Sequenz aus *B. pertussis* lauten BX470249 bzw. CAE41245.

Tabelle 7A :

	<i>B. pertussis</i>	<i>B. avium</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>B. hinzii</i>
<i>B. pertussis</i>	---	70,8%	71,5%	70,4%
	---	76,8%	76,8%	75,8%
<i>B. avium</i>	70,8%	---	79,0%	79,0%
	76,8%	---	91,6%	90,5%
<i>B. holmesii</i>	71,5%	79,0%	---	97,8%
	76,8%	91,6%	---	98,9%
<i>B. hinzii</i>	70,4%	79,0%	97,8%	---
	75,8%	90,5%	98,9%	---

Tabelle 7B:

	<i>B. pertussis</i>	<i>B. avium</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>B. trematum</i>
<i>B. pertussis</i>	---	70,9%	73,4%	73,4%
	---	72,2%	72,2%	72,2%
<i>B. avium</i>	70,9%	---	80,2%	77,6%
	72,2%	---	96,2%	89,9%
<i>B. holmesii</i>	73,4%	80,2%	---	80,6%
	72,2%	96,2%	---	92,4%
<i>B. trematum</i>	73,4%	77,6%	80,6%	---
	72,2%	89,9%	92,4%	---

Tabelle 7: Prozent identischer Nukleotide und Aminosäuren in der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der in 1.1.2 ermittelten Sequenzabschnitte der Receiver- (Tabelle 7A) bzw. Output-Domäne (Tabelle 7B) von BvgA. Die Identität zwischen den Nukleotidsequenzen ist in grau, die Identität zwischen den Aminosäuresequenzen ist in schwarz angegeben. Die *bvgA*- und BvgA-Sequenzen aus *B. pertussis* beziehen sich auf die in den Datenbanken veröffentlichten Daten (siehe Abbildung 3).

Abbildung 43: DNA-Sequenz des Genomabschnittes (GW.seq) aus *B. holmesii* G7702.

```

1  CTGCAGCTCC ATGCCCTGCC GGCCACCGCC CTCACAATCG AGGTCACCGA
51  AACCGGCCCG CTCTCGGTGC AAGCTTCCAC GCTCGAAACC CTGGTGCGGC
101 TGCGTCTGCT GGGGTGCACG GTCTCGATCG ATGACTTTGG CACCGGTTTT
151 TCCTCGATGG AGAGGTTGTG CAATCTGCCA TTCAATCAGC TCAAGATCGA
201 TGCTTCCTTT GTCAGCCGCC TGCCGGGCGA TGCCCGTAGC GAAAGCGTCA
251 TCGCCGCCAC GCTCTCTCTC GCCGAGCGCC TGGGCATCAA CGTGGTTGCC
301 GAGGGCATCG AAACCGCTGA TCGCCGCAAC GCCTTGCTCG ACATGCGGTG
351 CGCGCTGGGC CAAGGCTTCT GGTATGCGCG CCCCATGTCG GGGGACGAGT
401 ATGAGTCATG GTTGTTC AAT CCCATGTAGC CAATACCTGA TCGTATGACG
451 CCTACCGCCT AGGTACGGGC TTGCCGAGTC AGCTCGGTTA TCCCTGCACG
501 CGTTACGGCG TCTTATTGCA TCTTCCCGGA CGGGGCGTTC GATGTATTGC
551 ACGATCCCGG CGCCCCGCCG TAGCGCCAGT GGCCGCAGCA GATAAGACAA
601 AAAGCACAAG ATTGGTCTGA GATCCCGGCC CGGCCCTTGG GGCAGATACT
651 TAAACTAGCC TGATTTTTAT TAGGCTCACC GTAACGCACA TTCTCGCAAT
701 ATTCAGTAGC CAAACTGCGG GCTATGCTCT AACTTGTCAC CGAATTGGGA
751 GCTTTAGATG CTTACCTTTC AATGTGATCC CGGCTTCGGA AAAAAACCAC
801 CTCTGGCTGA CTACATCTTT TCAAACATAA TAACGATCAT TAAAAC TGAA
851 GATTTGTGAG GCAGCAGACG GCCATGCAAA AGCTACTAAT TATTGATGAT
901 CATCCCGTCA TCCGGTATGC CGTAAAGGGC TTGATGGAGA AAGAGGTTTT
951 CGAGGTCTGTG GCGGAAACGG ACAACGGCTT GGACGGCATC ACCATGGCGC
1001 GGGAGCTGCT CCCCAACCTG GTGATTCTGG ACATCGCCAT CCCGAAGCTC
1051 GATGGCCTGG AGGTCCTGAC CCGCCTGCAG GCGCTGGGGC TGCCCATGCA
1101 CGTGCTCATC CTCCTGGCC AACAGCCCGC CCTCTTTGCC AGGCGCTGTC
1151 TTAACGCGGG CGCCGCGGGC TTTGTCTCCA AGCACGGTAA CCTGCAAGAA

```

1201 GTGGTCGACG CCGCCAAGGC GGTCGTGGCG GGCTACACCT ATTTCCCGAA
1251 AACACGCTT ACGGATATTC GCGGAGTCGA AAACCAGGAC GACGCGATGA
1301 TGATCTCCTC GCTGTGCAAT CGCGAGCTGG CCGTGCTGCA GTTATTGGCT
1351 CAAGGCCTGA CCAATAAAGA TATTGCCGAC AGCATGTTTC TGAGCAATAA
1401 AGCCATCAGT ACTTACAAAA CCCGCCTGCT GCAGAAGCTT AATGCAACCA
1451 CACTGGTGGA GCTGATAGAC ATGGCCAAAC GAAATAATCT GGGGTGAGGT
1501 TTATGCCGCC AAGGGTGGTC TGGCGATGCG CGCGGTGGCT GCTGAGTCTG
1551 GCGGCCGCTC TCTTGTTCGC TGGCGGGCCT GTCGGCGCTC AGACGCTGCT
1601 CGACGGCTCC AATGCGGATG TACCAAACT GAACCTGGAT CTGGACGGCG
1651 AGGACTGGCA TTGGCTGGCA GACAAACGCG AGTTCAGACT CGGCATCTAC
1701 GCCCCTGACT ATGCGCCATT TCAGTTTACG CAACGCCCGC GTTTCGAGGG
1751 GCTCAACGCC GACTACCTCA AGCTCATCAG TCACAACCTG GGCTTGATCC
1801 CGGTGATTTCG CCTGTTTCCG GATCGAGACA GTGCGCTGCA CGCCTTGAAG
1851 GAAGGCGATA TCGACGCGGT CGATGATGTG GCTGGCGGCC CGCTGCACGG
1901 CCAGGACTTC GCCACTACCC GCCCTACCT GAGCAATCCT ACAGTGGCTG
1951 TGGCGCGGCG CGATCGAGGC GAGATCCCGG CCGATCTGGG AACATTGCGC
2001 GTGGCGGTCA ATCCGCGCTC CCAGCCCGCC GCCATACCCC AGGATGCGTC
2051 AGCCGCACGA TGGAGCAGCT ACCCGACGCC GTTGCTGGGC ATGAGTGCCG
2101 TGGCGTACGG GCAGGCCGAT GTCTATCTCG GCGACCCACT GGCCGTGGCC
2151 TATTACTTGG CGGCAGGCGT CTTTAGCGAC ATGCAGGTGC GACGCCGGGA
2201 TGACCTCGGC CAACGTGCCA ATGTCTACAC CGTGCAACGC GCCAATACCC
2251 GACTGCGTCA CATTCTTGAC CAAACCATTG CCGGCATCCC GGCTGTCTGG
2301 CGGCAGAACG CTATCTATCG ATGGGGCTTG CCCACCGGCG CCTTCATGCC
2351 GCCCCCGCCG CTTGCATTGA CGGAAAAGGA ACAGCGCTGG ATCCGGCGGC
2401 ATCCGGTGGT CCGCGTGCAG GCACTGAATC TTTTCCGCC CTTTTCGATG
2451 CATATTCAGG GCGACGCGCA GTTGTCCGGA CTCTCGATGG ATCTGTTGCA
2501 ACGGATTGGC CAACTGGCAG GATTGCATTT CCAGATCGAA GGGCCGACT
2551 CGTCGGCGGG GATGCAGCAA GCCTTGACAGA ACCATGAGGC AGACATGAGT
2601 GCGGGGCTGT TCTGGAGCCA AAACCGCGAA GATGTGCTGG ATTTACAGCG
2651 TCCCTATCTC AGCACGGCAT TTGTATTGGT TGGCCGGCAG GACAGCCCGG
2701 CCTCGTCTGC GGGCGCGGAT TTCGCGGGCC TGCATATTGC CAGTGTGCCC
2751 GGCAGCGCCG CGTCTGACGC GTTGATTCAA CACTACCCGC ATGCGGAGCT
2801 TGTGCCGGCC AGCAGCCCA ATGATGCGCT GCTAAAGGTG CTCGGTGGGC
2851 AGGCGGATGT TGCGGTGCAA ACCCAAATTG CCGCCAATT TTACCTCCGT
2901 AACTACTTTC GCGACGAGCT TCGCGTCACC GCCGCGCTGA ACACCGCTCC
2951 TGCGCGGCTG GCCTTCGCGT TTGCCCGCA TCAGGATGAG CTGCAAAGCA
3001 TCGTCGACAA AGCCTTGGCG GCGCTTCCGG CCGATGAGTC TATCTACCTC
3051 ATGAACCGCT GGGCGGGCGA ATCCGCATCC ACCATCAATA CCTGGTACGC
3101 CTATCGTCAG GAGATCTATC TGCTCGTGGC AGCCCGCGTG GTCACTGCCG

3151 CGATATTTCT CGCCTGGGTG GTCTATCTGC GCAGGCAGAT GCGCCAACGC
3201 CGCCAGGCAG AAAGAGCATT GAGCGACCAG TTGGCCTTCA TGC GCGTCTT
3251 GATCGATGGC ATCCCCAACC CGGTCTTTGT GCGTGATCGA CACGGCCGTA
3301 TGGTGATTTG CAATCGTAGT TATCTGGATA CCTTCCAGTT GCAGGCCGAG
3351 GACGTGGTGC GCCGGACCTT GCTAGAGTCG CCCATGCGCA CCGACAATCC
3401 TGCCCAGGCT GCACGCGTGC ATGAGCAATA CCTGCAGGCA ATGGAACAGG
3451 AGGCAGGCGG CCCAGTTTTT CAGGATCTGG AGCTGACGCT GCGTGGCGAA
3501 AAGCATTATC TCTATCACTG GCTGTGCCT TACGCCGACT CGGTCGGCCG
3551 CGTCAATGGG CTGATCGGCG GCTGGACCGA TCTGACGGAA CGTATGAGGC
3601 TGCTGCATGA TCTGCAAGAA GCCAAAGAAG AGGCCGACGC GGCCAACCGT
3651 GCCAAGACCA CATTCTGGC TACCATGAGC CATGAAATCC GCACTCCCAT
3701 GAACGCCATC ATAGGGATGT TGGAGTTGGT ACTACGTCGC CCGCCGAGC
3751 AGGCGTTGA CCGCCAGGCA CTGATGGTGG CTTATGATTC GGCCCGCTCG
3801 CTGCTCGATC TGATTGGCGA TATTCTGGAC ATTTCCAAGA TTGAGGCAGA
3851 CAAACTCGAG CTCACGCCGG TACCTACCGA TCTGCGCCGC TTGCTCGAGA
3901 GCGTGGTCAA TGTCTTCCAG GGGATGGCGC GGCAAAACGG GCTGAGCCTT
3951 CGGCTGGACA TCGGGCAGAA CCAGGTCCCT GCGGTCTCTA TCGATGCCTC
4001 TCGCCTCAAG CAGGTCGTGT CCAATCTCGT GAGCAATGCC TTGAAGTTCA
4051 CCGAGAAAGG TGGCGTGACG GTATCGATGC AGGTGAGGCC AGTTGAGCAA
4101 GGACTTGCCC GGATAGAAAT CGCCGTCGAC GACAGCGGCC CTGGCATCAG
4151 CGCCCGCGAC CGCAGGCGTC TGTTTGAGCC GTTTACCCAG GTCCACCAGG
4201 AAGCCGCGC CGACAAAGGC AGGCTCGCAG GCACTGGGCT AGGACTGGCT
4251 ATCAGCCGTC GCATCGTGCA GGCCATGGGC GGCAGCTTTG ATCTGAGCAG
4301 TATCCCCGGC AAAGGCACGC GCATCGATGT GCAGCTTTGC GCTCCGCTGT
4351 TGGCCGCGGA TGTGCTGCCA GCAGCGTCCC TGCCCGCGCA GATCTGCACC
4401 GATGCCAAGG TGGCCCGGCT GCGAGTGCTC GTCATTGACG ACCATGGGCC
4451 CAATCGCATG CTGCTGGCGC AACAAATGGC ATACATCGGT CATGATGTCC
4501 TGGACGCCGC AGATGGCAAG CAGGTCTGG CGCTTTGGCG CGAGCATGAG
4551 CCGGATGTGG CGCTCACCGA CTGCAATATG CCGGGGATGA GCGCTATGA
4601 GGTGGCTCGG GAGATCCGTC GCCTCGAGCA GGCACATGGC CGCGCGGCTA
4651 CGATCATCTA TGCCATCACG GCGTCGGCGC AAACCGAAGA ATTTGCCCGC
4701 TGCGAGGCTG CCGGCATGGA CGGCTGCCTG TTCAAACCCT TGGACATTGA
4751 TACGTTGCGC CAACGTCTGC ACCCCCTTGC CGTTCGGAAA GCCGAGCAAC
4801 GCCCCATGCC TTTCTCTCCC ACTACCTTCC GCCCTCAGGA GCTGCTTGAT
4851 CTGACCGGTG CCGACGCGGC CATGGCGCGA CACATTATCG AAGGACTGAT
4901 CAAGACCAAT CGCGAGGATA GCGCGGCGCT GCGCAAGCG GCCCCGATCG
4951 GAGACAATCC CGCCGTGGCA GATCTGGCCC ATCGTATTTT GGGCGGCGCC
5001 CGCGTAGTGG CGGCCGATCA GCGGTCGCT CAAGCTCACG CCTTGGAGGC
5051 GGCCGCCCGT CAAAGCAAGG GCGATATGCA AGCAGATGCC ACCGTGTTGA

5101 TTCAGACGCT CGCCAGCCTG GAAGCCGATA TGCAGGCCCTG GCTGGCCGCC
5151 CGCGACTGAC ACGAGTACCC CACCGCTGAC GCCAGGCCGT TTTTCCACCT
5201 GAAGGTGAAT ACGATGTTGC GACTCTGGCA ACGCTGGAAG GCGTCCCCTA
5251 CTGCCGGCCA TCAACTGGAT AGCCTGCTGG CCGCCGCAAG GCCCGACGCC
5301 GACCTGGTCG AGCGCAATCT TTGGGTCACT CGAGCTTGCG CTCTGGATCC
5351 GGCGCGCCCG AGCCGCGCCG GCCGGCGCCA GCGGGAGCCA CCCGCAACTG
5401 GCGCGACTGC GATATCTCCT CCATGTGCTA GACCGCCAAC CGGAGACGCG
5451 GGAGCGGTTT GCGCAGACGC TGC GTTCAGT GGTGCCGAC AACGATCCAC
5501 TTTGCTGTT CTGTGATACT GCGGTGGCAT CCCAGCCCG CTTCTGGGGC
5551 GAGATGGTCG AGCGCGTGCA GCGCGCTAT CTCCCGCTGC CGCCCAATCG
5601 CAGCGACATG TTTGCAATTT TCTCGCTGGT ATTTACGAGC GAAGATGATG
5651 CCGACTGGCT GCGCGCCATC GACGAAGACA CGCTGGAGCG CCTGCGCGAC
5701 CTGTTGCAGG TCCCGCACAG CCGCCGCGAT CCGGCGCTGG GCATGGACGC
5751 GGATCGCCTG CCCGGCTTCG AGCAAGCCCT GGTCAATAGC TCGTCAGCCA
5801 GGTTCGCGCC ACCGGTCTGA GCCACTCGAT CCGTTCACGC CTGCCAGGAG
5851 CCGTGACGGA GACGCCCTTT TTCAAGTTGA CCGAGGCGTG TGCGCAGCTT
5901 AGCAACCCGA CCATCTGGCG CATGCCTGAC GTCTTTGCGC AGTCGCTGGC
5951 TTACTTCAGG GCTCTTCTGG ATGAGTGTGC CCTGCAGGTC AACGGTGTGT
6001 CAGTGGAGGT GGTGTTTACA TGCGAGCGCA TGAATCCCG CTTGCGGCGC
6051 ATCGAGTTGT TGCTCGGGGT GTGGGTGGAT CCTACGCAGA AGCACAAGCA
6101 CTTGCACCTG ATGGCCGAGT TGATCCAGTC CACCCAGGCG CTACGCAGCG
6151 TCCGGCACCT GGCCGCCTCT TCGTTCGCCC ACCTTGCCCG ACGTGTGATG
6201 GAGCGCACGG AGCAAACCGG CGAACACTAC ATTGCGCGCG ACGGCCGCGA
6251 GTACCGTGAG ATGATCAAGG CGGCATTGGG CGGAGGACTG ATCACGGCGG
6301 CCACCGTCTA TATCAAGCTG GCCATCTACG GACTGCATGC CGGCCGCTTT
6351 ATGGAAGGAA TGCTGGCGTC ATTGAACTAC GCCAGCAGCT TCTTGGTCAT
6401 CCATTTTGCG CACTTCACGT TGGCGACCAA GCAGCCAGCG ATGACCGGGC
6451 CGGCCCTGGC TCACCGTCTG GATGACACCG GCACGGCGCA NNGCCGCCAG
6501 GCGTTTGTGC ACGATACCCT GCGGATGATC C