
Molekulare Charakterisierung des Filamentösen Hämagglutinins von *Bordetella holmesii*

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

vorgelegt von

Stefanie Link

aus Schweinfurt

Würzburg, 2006

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 von August 2002 bis Juni 2006 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

Bei Herrn Prof. Dr. Roy Gross möchte ich mich herzlich für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung und allzeit offenes Ohr bedanken.

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

Ein besonderes Dankeschön geht an Gabriele Gerlach, die mich mit ihrer Hilfsbereitschaft, guten Tipps und Ratschlägen in Sachen *B. holmesii* sehr unterstützt hat.

Aleksandra Horvat danke ich für ihr Interesse und die guten Gespräche während unserer gemeinsamen Schreibphase. Zusammen mit dir fiel der Abschied vom Lehrstuhl irgendwie leichter.

Bei Jenni Pohlert, Melanie Lechner und Claudia Schemm möchte ich mich für die interessanten Gespräche sowie die nette Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle Mitarbeiter, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen, besonders erwähnen möchte ich hier meine Zellkultur-Fachfrau Daniela Löffler, die Real-Time-Expertin Barbara Gareiss, die Primerextension-Spezialisten Doro Rogoll und Michael Pflock sowie die Fachfrau für Proteinaufreinigung Aleksandra Horvat.

Bei Dagmar Beier möchte ich mich dafür bedanken, dass ich sie bezüglich kniffliger Fragen und Probleme immer zu Rate ziehen konnte.

Danken möchte ich auch denjenigen, die mit ihrer Arbeit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, vor allem meinen beiden Diplomandinnen Genia Lücking und Karin Schmitt.

Ebenso danken möchte ich den „guten Seelen“ des Lehrstuhls, Ellen Appel, Jürgen Kreft und Ursel Rdest für ihre ständige Hilfsbereitschaft in allen Belangen.

Nicht zuletzt geht ein liebes Dankeschön an meine mehr oder weniger pünktliche „Mensa-Gruppe“ Sonja Mertins, Regina Ecke, Sascha Stoll, Stefanie Müller-Altrock, Victor Weidmann (ehemalige Mitglieder: Dani Löffler, Siwe/Silke Fregin). Es hat Spass gemacht, mit Euch täglich viertel nach 11 für kurze Zeit dem Laboralltag zu entfliehen.

Ein Dankeschön geht auch an meine Mitstreiter und Diskussionspartner in Sachen Graduiertenkolleg, Biju Joseph, Anto Jimenez Pearson und Norman Mauder.

Vielen Dank an alle Angestellte des Lehrstuhls für die gute Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ein besonders liebes Dankeschön gilt meinen Eltern für ihre grenzenlose Unterstützung und ihr Vertrauen, meiner „kleinen“ Schwester für ihr Interesse und offenes Ohr und meinem Freund Karsten dafür, dass er mir immer zur Seite stand.

Inhaltsverzeichnis

I	Zusammenfassung	1
II	Einleitung	5
1	Das Genus <i>Bordetella</i> und seine Bedeutung	5
1.1	Phylogenetische und physiologische Klassifizierung	5
1.2	Der Keuchhustenerreger <i>Bordetella pertussis</i>	6
1.3	Das <i>B. bronchiseptica</i> -Cluster	7
1.4	Die „neuen“ <i>Bordetella</i> -Arten	9
1.5	<i>B. holmesii</i>	10
1.6	Evolutionäre Tendenzen der Gattung <i>Bordetella</i>	11
2	Die Virulenzfaktoren	13
2.1	Das Filamentöse Hämagglutinin	13
2.2	Weitere Adhäsine	16
2.3	Toxine	17
2.4	Expression der Virulenzgene beim <i>B. bronchiseptica</i> -Cluster	18
2.5	Die Virulenzfaktoren der „neuen“ <i>Bordetella</i> -Arten	20
3	Das BvgAS-Zwei-Komponentensystem	20
3.1	Signaltransduktion über das BvgAS-Zwei-Komponentensystem	20
3.2	Transkriptionelle Genregulation durch das BvgAS-Zwei-Komponentensystem	22
3.3	Der <i>bvgAS</i> -Genlocus innerhalb der Gattung <i>Bordetella</i>	26
3.4	Das BvgAS-System aus <i>B. holmesii</i>	27
4	Zielsetzung der Arbeit	28
III	Material	29
1	Geräte	29
2	Bakterienstämme	30
3	Plasmide	31
4	Oligonukleotide	32
5	Zelllinien	34
6	Verbrauchsmaterial	35
6.1	Chemikalien	35
6.2	Enzyme	35
6.3	Kits	35
7	Wachstumsmedien und Antibiotika	35
7.1	Wachstumsmedien	35
7.2	Antibiotika	37
8	Molekulargewichtsmarker	37
8.1	Molekulargewichtsmarker für die Agarose-Gelelektrophorese	37
8.2	Molekulargewichtsmarker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37

IV	Methoden	38
1	Molekularbiologische und genetische Methoden	38
1.1	Isolierung von Nukleinsäuren	38
1.1.1	Isolierung von chromosomaler DNA	38
1.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab mittels Nucleobond-AX-Kit von Machery & Nagel	38
1.1.3	Isolierung von RNA	39
1.2	DNase-Behandlung isolierter RNA mittels Phenol-Extraktion	39
1.3	Quantifizierung von Nukleinsäuren	39
1.4	Reverse Transkription	40
1.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
1.6	Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese	41
1.7	Reinigung von DNA-Fragmenten	42
1.7.1	Reinigung von PCR-Produkten	42
1.7.2	Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel	42
1.8	Enzymatische Modifikation von DNA	42
1.8.1	Restriktionsverdau von DNA	42
1.8.2	Klenow-Behandlung von DNA	43
1.8.3	Ligation von DNA-Fragmenten	43
1.9	Transformation von DNA	44
1.9.1	Herstellung von CaCl ₂ -kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	44
1.9.2	Transformation	44
1.10	Konjugation und Allelaustausch	44
1.10.1	Allelaustausch	44
1.10.2	Durchführung der Konjugation	45
1.11	DNA-Sequenzierung	45
1.12	Southernblot	46
1.13	RNA-Slotblot	47
1.14	Genome Walk	48
1.15	Primerextension	49
1.15.1	5'-Markierung des Oligonukleotid-Primers	49
1.15.2	Bestimmung der spezifischen Aktivität	50
1.15.3	Sequenzierungsreaktion	50
1.15.4	Herstellung eines 6% igen Polyacrylamid-Harnstoffgels	51
1.15.5	Primerextension-Experiment	51
2	Proteinbiochemische Methoden	51
2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	51
2.2	Westernblot	52
2.3	Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen	53
2.3.1	Gelretardations-Experiment	53
2.3.1.1	Radioaktive Markierung der DNA-Sonde	53
2.3.1.2	Bindestudien mit gereinigtem Protein	54
2.3.1.3	Elektrophoretische Auftrennung im nativen Polyacrylamidgel	54
2.3.1.4	Kompetitions-Experiment	55
2.3.2	DNaseI-Footprint-Experiment	55
2.3.2.1	Präparation einer radioaktiv markierten DNA-Sonde	55
2.3.2.2	DNaseI-Footprint-Analyse	56

3	Zellkultur	58
3.1	Subkultivierung eukaryotischer Zellen	58
3.2	Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen	58
3.3	Bestimmung der Lebendzellzahl (LZZ)	59
3.4	Adhäsionsassay von <i>B. holmesii</i> an A549-Zellen	59
V	Ergebnisse	60
1	Identifizierung putativer Virulenzfaktoren in <i>B. holmesii</i>	60
1.1	Identifizierung eines <i>fhaB</i> -homologen Gens in <i>B. holmesii</i>	60
1.2	Versuche zur Identifizierung von homologen Genen zu <i>fhaC</i> , <i>fimA</i> , <i>fimD</i> , <i>prn</i> und <i>dnt</i> in <i>B. holmesii</i>	63
2	Vervollständigung der <i>fhaB</i>-Sequenz aus <i>B. holmesii</i> mittels „Genome Walk“ und Analyse benachbarter DNA-Bereiche	64
3	Charakterisierung von <i>fhaB</i> aus <i>B. holmesii</i>	66
3.1	Molekulare Analyse von <i>fhaB_{BH}</i>	66
3.1.1	Vergleich der <i>fhaB</i> -Nukleotid- und Aminosäuresequenzen aus <i>B. holmesii</i> , <i>B. pertussis</i> , <i>B. avium</i> und <i>B. petrii</i>	66
3.1.2	Vergleichende Analysen von Struktur- und Bindedomänen der FhaB-Sequenzen aus <i>B. holmesii</i> und <i>B. pertussis</i>	68
3.1.2.1	Identifizierung von Signalsequenzen bei FhaB _{BH}	68
3.1.2.2	Analyse putativer Bindedomänen und anderer Proteindomänen bei FhaB _{BH}	70
3.2	Untersuchungen zur Regulation des <i>fhaB</i>-Gens aus <i>B. holmesii</i>	72
3.2.1	Untersuchung des Einflusses von BvgAS _{BH} auf die <i>fhaB_{BH}</i> -Transkription	72
3.2.2	Untersuchung der <i>in vitro</i> -DNA-Bindeeigenschaften des Response Regulators BvgA _{BH} an die <i>fhaB_{BH}</i> -upstream-Region	73
3.2.2.1	Gelretardations-Experimente	73
3.2.2.2	DNaseI-Footprint-Experimente	75
3.2.3	Analyse der <i>fhaB_{BH}</i> -Expression durch Konstruktion einer <i>fhaB_{BH}</i> -Promotor-Reporterfusion	76
3.2.4	Kartierung von Transkriptionsstartpunkten innerhalb der <i>fhaB_{BH}</i> -upstream-Region	78
3.2.5	<i>In silico</i> -Analyse der <i>fhaB</i> -upstream-Region aus <i>B. holmesii</i>	79
3.2.6	Charakterisierung putativer BvgA _{BH} -Bindestellen innerhalb der <i>fhaB_{BH}</i> -upstream-Region	82
3.2.6.1	Bindestudien zur Charakterisierung möglicher BvgA _{BH} -Bindestellen	82
3.2.6.2	Charakterisierung der potentiellen BvgA _{BH} -Bindestellen mit Hilfe von verschiedenen <i>fhaB_{BH}</i> -Promotor-Reporterfusionen	83
3.3	Untersuchungen zur Regulation von <i>fhaB_{BH}</i> in <i>B. pertussis</i>	87
3.3.1	Analyse der <i>fhaB_{BH}</i> -Expression mit Hilfe der <i>fhaB_{BH}</i> -Promotor-Reporterfusion	87
3.3.2	Kartierung von <i>fhaB_{BH}</i> -Transkriptionsstartpunkten in <i>B. pertussis</i>	87
3.4	Funktionelle Analyse des Filamentösen Hämagglutinins aus <i>B. holmesii</i>	89
3.4.1	Konstruktion einer <i>fhaB</i> -Deletionsmutante von <i>B. holmesii</i> G7702	89
3.4.2	Vergleichende Charakterisierung von <i>B. holmesii</i> G7702, <i>B. holmesii</i> G7702 <i>fhaB</i> ⁻ und <i>B. holmesii</i> G7702 <i>bvgA::kan</i>	91

3.4.3	Untersuchungen zur Adhäsion von <i>B. holmesii</i> G7702, <i>B. holmesii</i> G7702 <i>fhaB</i> und <i>B. holmesii</i> G7702 <i>bvgA::kan</i> an A549-Zellen	92
VI	Diskussion	94
1	Identifizierung putativer Virulenzfaktoren in <i>B. holmesii</i>	94
2	Der <i>fhaB</i>-Locus in <i>B. holmesii</i>	95
3	Funktionelle Charakterisierung des Filamentösen Hämagglutinins aus <i>B. holmesii</i>	96
4	Molekulare Analyse des Filamentösen Hämagglutinins aus <i>B. holmesii</i> auf DNA- und Proteinebene	97
5	Die Regulation des Filamentösen Hämagglutinins aus <i>B. holmesii</i>	100
5.1	Analyse der <i>fhaB_{BH}</i> -Regulation durch Transkriptions- und Expressionsstudien	100
5.2	Charakterisierung putativer BvgA _{BH} -Bindestellen der <i>fhaB_{BH}</i> -upstream-Region	103
5.2.1	<i>In vitro</i> -Bindung von BvgA _{BH} an die <i>fhaB_{BH}</i> -upstream-Region	103
5.2.2	Charakterisierung der Bedeutung der einzelnen putativen BvgA _{BH} -Bindestellen	105
5.2.3	Darstellung eines Modells für die BvgA _{BH} -Bindung an die <i>fhaB_{BH}</i> -upstream-Region	106
5.2.4	Regulation von <i>fhaB_{BH}</i> in <i>B. pertussis</i>	107
5.2.5	Die Bedeutung der <i>fhaB_{BH}</i> -Promotorstruktur	109
VII	Literaturverzeichnis	112
VIII	Anhang	125
1	Abkürzungsverzeichnis	125
2	Lebenslauf	128
3	Publikationsliste	129
4	DNA- und Proteinsequenzen	130

I Zusammenfassung

Zur Gattung *Bordetella* zählen derzeit neun verschiedene Arten Gram-negativer Bakterien. Die „klassischen“ *Bordetella*-Arten *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* werden aufgrund ihrer engen Verwandtschaft auch als *B. bronchiseptica*-Cluster bezeichnet. Der strikt humanpathogene Keim *B. pertussis* ist der Erreger des Keuchhustens und stellt das wohl wichtigste Mitglied dieser Gattung dar. *B. parapertussis* kann sowohl Menschen als auch Schafe infizieren, während *B. bronchiseptica* für Atemwegserkrankungen bei verschiedenen Säugetieren verantwortlich gemacht wird. Die innerhalb der letzten Jahre identifizierten „neuen“ *Bordetella*-Arten konnten, ebenso wie die „klassischen“ Bordetellen, alle in Assoziation mit einem Wirtsorganismus nachgewiesen werden. Eine besondere Ausnahme stellt *B. petrii* dar, von dem sowohl ein Umweltisolat als auch ein klinisches Isolat existiert. Bei den „neuen“ Arten *B. avium*, *B. holmesii*, *B. hinzii*, *B. trematum*, *B. petrii* und *B. ansorpii* konnte zum Teil human- oder tierpathogenes Potential, zum Teil noch kein pathogenes Potential nachgewiesen werden. *B. holmesii* wurde 1995 erstmals von Weyant *et al.* beschrieben und gewann in den letzten Jahren als humanpathogener Keim, der Keuchhusten-ähnliche Erkrankungen verursacht, zunehmend an Bedeutung. Mit Ausnahme des BvgAS-Systems (Gerlach *et al.*, 2004) konnten in *B. holmesii* bislang keine für die „klassischen“ Arten bekannten Virulenzfaktoren nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde über PCR-Reaktionen mit aus konservierten Nukleotidsequenzen abgeleiteten Oligonukleotiden ein zum Filamentösen Hämagglutinin homologer Faktor in *B. holmesii* G7702 identifiziert. Weitere putative Virulenzgene konnten sowohl über PCR-Reaktionen als auch mittels Southernblot-Experimenten nicht nachgewiesen werden. Das *fhaB*-homologe Gen kommt dagegen bei den Stämmen *B. holmesii* G7702, *B. holmesii* ATCC51541, *B. holmesii* No1 und *B. holmesii* G8341 vor und ist somit innerhalb der Art verbreitet. Mittels der Methode des „Genome Walk“ wurde die *fhaB*-Sequenz aus *B. holmesii* vervollständigt und zudem ein Teil des stromaufwärts angrenzenden DNA-Bereichs identifiziert. Dieser als *orfMP* bezeichnete Leserahmen wird in die zum *fhaB* entgegengesetzte Richtung transkribiert und kodiert für ein putatives Membranprotein, welches auch in *B. bronchiseptica* und *B. parapertussis* vorkommt. Stromabwärts des *fhaB* ist in *B. holmesii* ein IS1001-ähnliches IS-Element lokalisiert (Karin Schmitt, persönliche Mitteilung). Der *fhaB*-Locus aus *B. holmesii* unterscheidet sich somit interessanterweise deutlich von dem des *B. bronchiseptica*-Clusters sowie dem der anderen „neuen“ *Bordetella*-Arten.

Sequenzalignments zeigten, dass das *fhaB*-Gen aus *B. holmesii* sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene die größte Ähnlichkeit zu dem *fhaB*-Homolog aus *B. avium* aufweist. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen aus früheren Sequenzvergleichen von Genen, wie z.B. *bvgAS* und *ompA* überein (Gerlach *et al.*, 2004) und bestärkt die Vermutung, dass *B. holmesii* phylogenetisch im Umfeld von *B. avium* anzusiedeln ist. Durch *in silico*-Analysen der FhaB_{BH}-Aminosäuresequenz wurden einige Sequenzmotive entdeckt, die auch für das FhaB-Protein aus *B. pertussis* sowie für entsprechende Proteine aus anderen Bakterienarten beschrieben werden. Hierzu zählt eine N-terminale Signalpeptidomäne, die im Allgemeinen für den Sec-abhängigen Transport von Proteinen durch die Cytoplasmamembran benötigt wird. Auffällig ist dabei der ungewöhnliche N-terminale Anhang des Signalpeptids, der zwar bei einigen bakteriellen Sekretionsproteinen konserviert ist, dessen Funktion aber noch unklar ist. Weiterhin konnte beim FhaB aus *B. holmesii* eine sogenannte TPS-Domäne identifiziert werden. Diese könnte, wie bei den „klassischen“ Bordetellen, mit einem FhaC-Partnerprotein interagieren, um den FHA-Transport durch die äußere Membran zu gewährleisten. Die Existenz eines *fhaC*-homologen Gens im Genom von *B. holmesii* ist deshalb nahe liegend.

Anhand von *in silico*-Analysen wurde zudem ein KGD-Motiv, nicht jedoch eine Heparinsulfat- und eine Kohlenhydrat-Bindedomäne im FhaB von *B. holmesii* identifiziert. Das KGD-Motiv könnte möglicherweise das RGD-Motiv im FHA der „klassischen“ *Bordetella*-Arten bei der Rezeptorerkennung ersetzen. Die Anwesenheit einer Heparinsulfat- und einer Kohlenhydrat-Bindedomäne kann jedoch aufgrund der hohen Variabilität der Konsensussequenzen dieser Motive nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

In Zellkultur-Experimenten konnte die Adhäsionsfähigkeit von *B. holmesii* G7702 an A549-Zellen nachgewiesen werden. Weiterhin haben diese Versuche gezeigt, dass das Filamentöse Hämagglutinin in *B. holmesii* eine Rolle als Adhäsionsfaktor spielt. Demnach zeigte der Stamm *B. holmesii* G7702 *fhaB*, der eine Deletion im *fhaB*-Gen trägt, eine signifikant niedrigere Adhäsionsrate als der wildtypische *B. holmesii*-Stamm. Weiterhin wurde für den Stamm *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan*, der aufgrund der Insertion einer Kanamycin-Kassette im *bvgA*-Gen kein funktionsfähiges BvgA-Protein produzieren kann, eine im Vergleich zu *B. holmesii* G7702 und *B. holmesii* G7702 *fhaB* signifikant niedrigere Adhäsionsrate beobachtet. Dies deutet zum einen auf eine BvgAS-Abhängigkeit der *fhaB_{BH}*-Expression hin, zum anderen kann aus dem Adhäsionsverhalten von *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan* geschlossen werden, dass neben FHA in *B. holmesii* weitere Adhäsionsfaktoren an der Wirtszell-adhäsion beteiligt sind, die vermutlich unter der Kontrolle des BvgAS-Systems stehen.

Laut den Ergebnissen aus den Regulationsstudien erfolgt die *fhaB*-Transkription in *B. holmesii* über zwei konstitutiv aktive Promotoren (P1 und P2) und einen *bvg*-abhängigen Promotor (P3). *In vitro* ist phosphoryliertes BvgA_{BH} in der Lage, spezifisch an die *fhaB*-upstream-Region aus *B. holmesii* zu binden. Innerhalb der *fhaB_{BH}*-upstream-Region wurden drei putative BvgA_{BH}-Bindestellen BS2-4 identifiziert, die Ähnlichkeiten zu „inverted-repeat“-Anordnungen der BvgA-Konsensussequenz 5'- T/A T T C C/T T A -3' aufweisen. Basierend auf den Ergebnissen der *in vitro*-Binde- und *in vivo*-Expressionsstudien zur Charakterisierung der einzelnen putativen BvgA_{BH}-Bindestellen wird ein Modell für die BvgA_{BH}-Bindung innerhalb des *fhaB*-Promotors in *B. holmesii* vorgeschlagen. Demnach wird zunächst die primäre BvgA_{BH}-Bindestelle BS2 mit der höchsten Affinität von BvgA_{BH}-P gebunden, wobei für BvgA_{BH}-P eine Dimerisierung angenommen wird. Anschließend bindet ein zweites BvgA_{BH}-P-Dimer an die als sekundäre Bindestelle bezeichnete BS3-Region, die sich stromabwärts von BS2 befindet. Eine möglicherweise darauf folgende unspezifische Anlagerung von zwei weiteren BvgA_{BH}-P-Dimeren an den 37 bp großen DNA-Abschnitt zwischen BS2 und BS3 ist, ebenso wie die Besetzung der niedrigaffinen Bindestelle BS4 durch ein weiteres BvgA_{BH}-P-Dimer, hauptsächlich auf kooperative Protein-Protein-Wechselwirkungen zurückzuführen. Das an BS4 gebundene BvgA_{BH}-P-Dimer befindet sich am weitesten stromabwärts und könnte zusammen mit der RNA-Polymerase die Initiation der Transkription gewährleisten. Ergebnisse aus den *in vitro*-Bindestudien sowie die unterschiedliche Zusammensetzung und Anordnung der putativen BvgA-Bindestellen der *fhaB*-Promotoren aus *B. holmesii* und *B. pertussis* deuten auf eine unterschiedliche Regulation dieser beiden Promotoren hin. So scheint der *fhaB*-Promotor aus *B. holmesii*, im Vergleich zum *fhaB*-Promotor aus *B. pertussis*, erst bei höheren Konzentrationen an phosphoryliertem BvgA gebunden und somit aktiviert zu werden. In *B. holmesii* wird vermutlich die konstitutive FHA-Synthese nach BvgAS-Stimulation durch die *bvg*-abhängige *fhaB_{BH}*-Expression unterstützt, um eine erfolgreiche Infektion des Wirtes zu gewährleisten.

Summary

The *Bordetella* genus which are Gram-negative bacteria include nine species. The “classical” *Bordetella* species *B. pertussis*, *B. parapertussis* and *B. bronchiseptica* are closely related and represent the so-called *B. bronchiseptica* cluster. The most important member of this genus is *Bordetella pertussis*, a strictly human pathogen and the agent of whooping cough. *B. parapertussis* can infect humans and sheep, whereas *B. bronchiseptica* causes respiratory disease in many animal species. During the last years several “new” *Bordetella* species have been identified and most of them have been isolated in association with a host organism. *B. petrii* is the first member of this genus, which has been found as environmental and clinical isolate. For some of the “new” *Bordetella* species, which include *B. avium*, *B. holmesii*, *B. hinzii*, *B. trematum*, *B. petrii* and *B. ansoipii*, human or animal pathogenic features have been identified and characterized. *B. holmesii* has been described for the first time in 1995 by Weyant *et al.* and over time it has emerged as an important pathogen, which can cause pertussis-like disease in humans. Except for the *bvgAS* locus no “classical” virulence factors have been detected in *B. holmesii* so far.

By PCR amplification using digonucleotides specific to conserved *fhaB* sequences of *B. pertussis* and *B. avium*, it was possible to identify a *fhaB*-homologous gene in *B. holmesii* G7702. Additional virulence factors could not be detected by PCR or southernblot experiments. The *fhaB*-homologous gene could be found in the *B. holmesii* strains *B. holmesii* G7702, *B. holmesii* ATCC51541, *B. holmesii* No1 and *B. holmesii* G8341. The entire *fhaB_{BH}* gene was sequenced by the genome walking approach. In addition, the upstream region was found to contain an open reading frame, *orfMP*, encoding an putative membrane protein, which is also present in *B. bronchiseptica* and *B. parapertussis*. An IS1001-like IS element is located downstream of *fhaB* in *B. holmesii* (Karin Schmitt, personal communication). Thus the *fhaB* locus of *B. holmesii* exhibits significant differences compared to that of the *B. bronchiseptica* cluster and the other “new” *Bordetella* species.

Sequence alignments indicated, that *fhaB* of *B. holmesii* is most similar to the homologue of *B. avium* on DNA as well as on protein level. This observation is in confirmation with earlier results of sequence comparison of genes like *bvgAS* and *ompA* (Gerlach *et al.*, 2004) and suggests a phylogenetic position of *B. holmesii* near *B. avium*. *In silico* analysis of the FhaB_{BH} amino acid sequence led to detection of sequence motifs which are also known to be present in FhaB of *B. pertussis* and appropriate proteins of several other bacteria. FhaB_{BH} contains an N-terminal signal peptide domain, which in general is necessary for the sec-dependent transport of proteins through the cytoplasmic membrane. The signal peptide includes an unusual N-terminal extension, which is conserved in several bacterial secretion proteins, but its function is still unknown. Furthermore, a so-called TPS domain could be identified inside the FhaB of *B. holmesii*. Like in the “classical” *Bordetella* species, this TPS domain could interact with its partner protein to allow the FHA transport across the outer membrane. Therefore the existence of an FhaC-homologous protein in the genome of *B. holmesii* could be assumed. Sequence analysis of FhaB_{BH} also revealed a KGD motif, but no heparin binding and no carbohydrate binding site could be identified. Possibly the KGD motif could replace the RGD motif of “classical” FHA in receptor recognition. The existence of an heparin and carbohydrate binding site in FhaB_{BH} can not be excluded completely, because the consensus sequences of that motifs are highly variable.

Cell culture experiments demonstrated that *B. holmesii* G7702 is able to adhere to A549 cells and that filamentous haemagglutinin plays a role as adhesion factor in *B. holmesii*. Thus the strain *B. holmesii* G7702 *fhaB*⁻, in which *fhaB_{BH}* is deleted, exhibited a significantly lower adhesion rate compared to the wildtype strain. Furthermore, for the strain *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan*, which cannot produce BvgA, a significant lower adhesion rate compared to *B. holmesii* G7702 and *B. holmesii* G7702 *fhaB* could be observed. This leads to the assumption that *fhaB* expression in *B. holmesii* depends on BvgAS_{BH}. The adhesion behaviour of *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan* also shows that in addition to FHA other adhesion factors, which are presumably regulated by the BvgAS_{BH} system, seem to be involved in host cell adhesion of *B. holmesii*.

The regulation studies indicated, that *fhaB* transcription in *B. holmesii* can occur from three different promoters, two of which are constitutive (P1 and P2) and one which is under the control of the BvgAS_{BH} system (P3). *In vitro*, the phosphorylated form of BvgA_{BH} is able to bind to the *fhaB* upstream region of *B. holmesii* specifically. Inside the *fhaB* upstream region of *B. holmesii*, three putative BvgA_{BH} binding sites could be identified. These regions, named BS2-4, exhibit similarities to “inverted repeat” structures of the BvgA consensus sequence 5'-T/A T T C C/T T A -3'. Based on the *in vitro* and *in vivo* results concerning the characterization of the putative BvgA_{BH} binding sites, a model for BvgA_{BH} binding inside the *fhaB_{BH}* upstream region was developed. According to that, BvgA_{BH}-P binds as a dimer first to the primary binding site BS2 with a high affinity. After that a second BvgA_{BH}-P dimer binds to BS3 inside the secondary binding region, which is located downstream of BS2. A possibly subsequent unspecific binding of two additional BvgA_{BH}-P dimers to the region between BS2 and BS3 and the occupation of BS4 results exclusively from cooperative protein-protein interactions. The BvgA_{BH}-P dimer, which binds to BS4, is located downstream and presumably interacts with the RNA polymerase in order to initiate *fhaB_{BH}* transcription. Results from *in vitro* binding studies as well as the divergent structure and localisation of BvgA binding sites inside the *fhaB* promoters of *B. holmesii* and *B. pertussis* suggest a differential regulation of these two promoters. For activation of *fhaB* promoter of *B. holmesii*, higher concentrations of phosphorylated response regulator seem to be necessary compared to that for *fhaB* promoter activation in *B. pertussis*. Presumably in *B. holmesii* the constitutive *fhaB_{BH}* expression is supported by the *bvg*-dependent *fhaB_{BH}* expression as a result of a BvgAS_{BH} stimulating signal in order to guarantee successful infection of the host.

II Einleitung

1 Das Genus *Bordetella* und seine Bedeutung

1.1 Phylogenetische und physiologische Klassifizierung

Die Gattung *Bordetella* wird phylogenetisch der β -Gruppe der Proteobakterien zugeordnet und gehört zur Familie der *Alcaligenaceae* (Vandamme *et al.*, 1996a). Durch vergleichende Sequenzanalysen der 16S rDNA konnte eine enge Verwandtschaft des Genus *Bordetella* mit den beiden Gattungen *Achromobacter* und *Alcaligenes* festgestellt werden (siehe Abb.1). Bei den *Bordetella*-Arten handelt es sich laut gegenwärtiger Genusdefinition um kleine Gram-negative Kokkobazillen mit einer Länge von 0,5-2 μm . Diese können einzeln oder paarweise, selten in kurzen Ketten, vorliegen. Bis heute sind neun Arten bekannt, die bis auf eine Ausnahme ausschließlich in Assoziation mit dem Menschen oder warmblütigen Vertebraten isoliert wurden. Die wohl wichtigste Spezies des Genus ist *Bordetella pertussis*, der Erreger des Keuchhustens. Jedoch auch andere Vertreter dieser Gattung gewinnen aufgrund ihrer pathogenen Eigenschaften zunehmend in der Human- und Veterinärmedizin an Bedeutung.

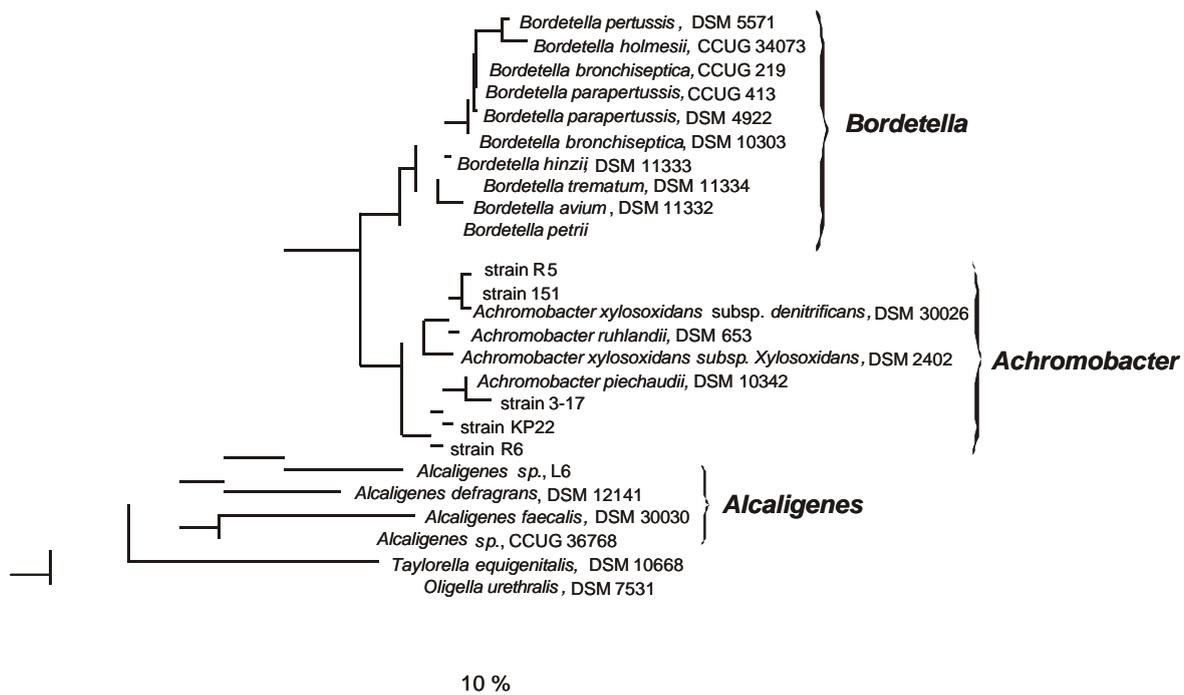


Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der Familie *Alcaligenaceae* basierend auf den 16S rDNA-Sequenzen (modifiziert nach Gerlach *et al.*, 2001). Der Balken entspricht 10 % geschätzte Sequenzdivergenz.

Die Vertreter des Genus *Bordetella* zeigen einen hohen GC-Gehalt (61,5-68 mol%) und besitzen bis auf *B. petrii* einen strikt aeroben Metabolismus. *B. petrii* kann auch anaerob Selenat oder Nitrat reduzieren, einen fermentativen Stoffwechsel findet man jedoch bei keiner der bisher klassifizierten *Bordetella*-Arten. Als Kohlenstoff- und Energiequelle können *Bordetella* spp. keine Saccharide nutzen, vorrangig werden Aminosäuren oxidiert (Weiss, 1992; von Wintzingerode *et al.*, 2001).

1.2 Der Keuchhustenerreger *Bordetella pertussis*

Die Geschichte des Keuchhustens ist, verglichen mit anderen hochinfektiösen Erkrankungen, wie z. B. Tetanus oder Diphtherie, erstaunlich kurz. *B. pertussis* wurde erstmals 1640 von dem französischen Arzt Guillaume de Baillou beschrieben. Dieser berichtete von einer 1578 in Paris aufgetretenen Epidemie und deren typischem Krankheitsbild (Cone, 1970). Erst 1904 konnte Bordet zusammen mit Gengou den bakteriellen Erreger dieser Krankheit, *Bordetella pertussis*, isolieren und unter Laborbedingungen kultivieren (Bordet und Gengou, 1906). Da *B. pertussis* zum Wachstum Blut benötigte, erhielt dieses Bakterium zunächst den Namen *Haemophilus pertussis*. Im Gegensatz zu *Haemophilus* ist *B. pertussis* jedoch nicht auf die Wachstumsfaktoren X (Haematin) und V (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid) angewiesen (Hornibrook, 1940) und wurde in den folgenden Jahren mehrmals umbenannt. Erst im Jahr 1952 wurde *B. pertussis* eine eigene Gattung zugeteilt, die nach dem belgischen Wissenschaftler Jules Bordet *Bordetella* genannt wurde (Lopez-Moreno, 1952; Pittman, 1984a).

Der durch Tröpfcheninfektion direkt von Mensch zu Mensch übertragene Keim infiziert die zilienträgenden Epithelzellen der oberen Atemwege. Durch die Bildung zahlreicher Toxine kommt es zur Schädigung des Respirationsepithels, den charakteristischen, krampfartigen Hustenanfällen sowie zu systemischen Schäden. *B. pertussis*-Infektionen sind ausschließlich auf den Menschen beschränkt, ein Reservoir für den Keim außerhalb des Menschen gibt es somit nicht. Laut der Weltgesundheitsorganisation WHO erkranken jährlich 20-40 Millionen Menschen an Keuchhusten, wobei bis zu 90 % der Krankheitsfälle in den Entwicklungsländern auftreten. Ungefähr 300.000 der betroffenen Patienten sterben pro Jahr an den Folgeerscheinungen dieser Infektion. Vor allem bei Säuglingen und Kleinkindern wird häufig ein akuter und lebensbedrohlicher Infektionsverlauf beobachtet.

Durch die Einführung von Reihenimpfungen in den frühen 50er Jahren konnten *B. pertussis*-Infektionen in den Industrieländern unter Kontrolle gebracht werden. Die damals entwickelten Totimpfstoffe enthielten durch Hitze oder Formaldehyd abgetötete *B. pertussis*-Isolate und wurden als Kombinationsimpfstoff mit inaktiviertem Diphtherie- und Tetanustoxin verabreicht. In den Entwicklungsländern ist Keuchhusten jedoch wegen des fehlenden Impfschutzes und der schlechten medizinischen Versorgung (z. B. Mangel an Antibiotika) heute noch eine häufige Todesursache bei Kleinkindern. In den Industrieländern führte der Erfolg dieser Totimpfstoffe zu einem starken Rückgang der *B. pertussis*-Infektionen, so dass die in seltenen Fällen auftretenden Nebenwirkungen des Vakzins wie Fieber und Appetitlosigkeit in den Vordergrund rückten. Ende der 70er Jahre musste somit ein Absinken der Impfquote und folglich ein rascher Anstieg der Keuchhustenfälle verzeichnet werden (Greco *et al.*, 1996). Erkenntnisse über die molekularen Vorgänge während des Infektionsverlaufs und der rasch zunehmende technologische Fortschritt halfen, neuartige, sogenannte azelluläre Impfstoffe gegen *B. pertussis*-Infektionen zu entwickeln. 1981 wurde in Japan der erste azelluläre Impfstoff eingesetzt, der nur noch aus einigen immunogenen Komponenten von *B. pertussis*, wie dem Pertussistoxin (PTX) und dem Filamentösen Hämagglutinin (FHA), zusammengesetzt war (Sato *et al.*, 1984a). Heutzutage werden anstelle von chemisch inaktivierten Toxinen hauptsächlich genetisch manipulierte Toxoide verwendet, die durch die Einführung ortsspezifischer Mutationen in den entsprechenden Virulenzgenen detoxifiziert werden (Pizza *et al.*, 1989; Rappuoli, 1999). Trotz der hohen Effizienz und guten Verträglichkeit dieser Vakzine wirft ihr Einsatz viele Fragen bezüglich der Schutzwirkungsdauer und möglicher Auswirkungen auf *B. pertussis* auf. So wurde in den vergangenen Jahren in einigen Ländern trotz hoher Immunisierungsrate eine deutliche Zunahme an *B. pertussis*-Infektionen vermerkt (de Melker *et al.*, 1997).

Untersuchungen an zirkulierenden *B. pertussis*-Stämmen ergaben einen hohen Grad an Sequenzpolymorphismen in einigen Virulenzgenen. Dadurch entstanden Antigenvarianten, gegen die immunisierte Menschen möglicherweise nicht geschützt waren (Bourseaux-Eude *et al.*, 1999; Bourseaux-Eude und Guiso, 2000). Durch die molekulare Charakterisierung von Virulenzfaktoren verschiedener *B. pertussis*-Stämme werden jedoch ständig neue Erkenntnisse gewonnen, die zur Impfstoffentwicklung genutzt werden. Neben neuartigen Kombinationsimpfstoffen werden auch Lebendimpfstoffe, bestehend aus attenuierten *B. pertussis*-Isolaten, vorgeschlagen (Mielcarek *et al.*, 1998).

1.3 Das *B. bronchiseptica*-Cluster

Die drei „klassischen“ *Bordetella*-Arten *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* wurden schon Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieben und zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, den respiratorischen Trakt von Menschen bzw. Säugetieren zu kolonisieren. Sequenzanalysen der 23S rDNA-Sequenzen (Müller und Hildebrandt, 1993), DNA/DNA-Hybridisierungen (Dobrogosz *et al.*, 1979), Multilocus-Enzym-Elektrophorese (van der Zee *et al.*, 1997) und die am Sanger Center ermittelten Genomsequenzen demonstrieren eine sehr enge verwandtschaftliche Beziehung zwischen diesen drei Arten. Heute werden sie als Subspezies einer Art betrachtet und im sogenannten *B. bronchiseptica*-Cluster zusammengefasst. Trotz dieser engen genetischen Verwandtschaft können diese drei Arten aufgrund einiger physiologischer Merkmale leicht voneinander unterschieden werden (siehe Tab. 1).

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

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

Die Mitglieder des *B. bronchiseptica*-Clusters unterscheiden sich jedoch am deutlichsten bezüglich ihrer Wirtsspezifität. *B. pertussis* ist der Erreger des Keuchhustens beim Menschen und gilt als obligat humanpathogen (siehe 1.2). Man teilt das typische Krankheitsbild einer Keuchhusteninfektion in drei Stadien ein (Preston, 1988). Nach einer Inkubationszeit von 5-21 Tagen entsteht zunächst ein akuter Katarrh der Atemwege, der von unspezifischen Erkältungssymptomen begleitet ist. In diesem sogenannten *Stadium catarrhale* (Dauer 7-14 Tage) ist die Diagnose noch sehr schwierig und die Ansteckungsgefahr am höchsten. Es folgt das 3-6-wöchige *Stadium convulsivum*, welches sich durch die typischen, krampfartigen Keuchhustenanfälle und Erbrechen auszeichnet.

Im anschließenden *Stadium decrementi* kommt es in einer wochen- bis monatelangen Rekonvaleszenzphase zum Abklingen der Symptome. Interessanterweise kann der Keim nur während des *Stadium catarrhale* und nicht mehr nach dem Ausbruch der Keuchhustenanfälle aus dem respiratorischen Trakt isoliert werden. Dies lässt auf eine wichtige Rolle von Toxinen bei der Symptomausprägung schließen (Cotter und Miller, 2000).

Neben dem beschriebenen Krankheitsbild des Keuchhustens kann bei Jugendlichen und Erwachsenen auch ein abgeschwächter Krankheitsverlauf beobachtet werden (Cherry, 1999b). Pertussis-Infektionen bei Jugendlichen und Erwachsenen sind vorwiegend auf eine abgeschwächte Immunität zurückzuführen, denn die Schutzwirkung der Erstimpfung ist auf maximal 9-10 Jahre begrenzt. Häufig wird bei Patienten mit mildem Krankheitsverlauf die Keuchhustenerkrankung nicht diagnostiziert und entsprechend behandelt, so dass diese Personen als bedeutende Übertragungsquelle von *B. pertussis* gelten (Schneider und Gross, 2001).

B. parapertussis verursacht eine mildere Form des Keuchhustens beim Menschen mit kürzerem Krankheitsverlauf (Heiniger *et al.*, 1994). Der Erreger konnte 1937 aufgrund physiologischer Merkmale von *B. pertussis* abgegrenzt und erstmals beschrieben werden (Bradford und Slavin, 1937; Elderling und Kendrick, 1938). Man geht davon aus, dass ein erheblicher Prozentsatz aller Keuchhustenfälle tatsächlich auf diesen Erreger anstelle von *B. pertussis* zurückzuführen ist (Mastrantonio *et al.*, 1998). Neben diesen Humaninfektionen wird *B. parapertussis* auch für die chronische Pneumonie in Schafen verantwortlich gemacht. Die Isolate aus dem Schaf zeigen jedoch deutliche genomische Unterschiede zu den Humanisolaten, weshalb man Schafe als Reservoir für humanpathogene *B. parapertussis*-Erreger ausschließen kann (Yuk *et al.*, 1998a). Die verschiedenen Isolate haben sich vermutlich unabhängig voneinander aus einem gemeinsamen Vorfahren entwickelt und stellen unterschiedliche Stämme mit spezifischer Wirtsadaptation dar (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. Der Keim wurde aus einer Vielzahl von Säugetieren, wie z. B. Hunden, Katzen, Schweinen, Affen und Kaninchen isoliert und ist dort für verschiedene respiratorische Erkrankungen verantwortlich (Goodnow, 1980). Auch bei Menschen, die in Kontakt mit infizierten Tieren stehen sowie bei immunsupprimierten oder älteren Personen wurde der Erreger entdeckt (Gueirard *et al.*, 1995; Woolfrey und Moody, 1991; Decker *et al.*, 1991). Dort verursacht *B. bronchiseptica* chronische, oftmals asymptomatisch verlaufende respiratorische Erkrankungen, die meist nur schwierig mit Antibiotika zu behandeln sind. Selten wurden auch akute Infektionen beobachtet (Gomez *et al.*, 1998; Woolfrey und Moody, 1991).

1.4 Die „neuen“ *Bordetella*-Arten

In den letzten 25 Jahren wurde eine Reihe neuer Arten klassifiziert, welche sich in das Genus *Bordetella* einordnen. Bei diesen handelt es sich um *B. avium*, *B. holmesii*, *B. hinzii*, *B. trematum*, *B. petrii* und *B. ansorpii*. Über Virulenzfaktoren und deren Regulation ist bei diesen Arten noch sehr wenig bekannt. Dennoch treten alle „neuen“ *Bordetella*-Arten assoziiert mit verschiedenen Erkrankungen in bestimmten Wirtsorganismen auf (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Eigenschaften der „neuen“ *Bordetella*-Arten

	<i>B. holmesii</i>	<i>B. avium</i>	<i>B. hinzii</i>	<i>B. trematum</i>	<i>B. petrii</i>	<i>B. ansorpii</i>
Wirt	Mensch	Vögel	Geflügel, Mensch	Mensch?	Umwelt, Mensch?	Mensch?
Erkrankung	resp. Erkrankungen, Sepsis	Koryza des Truthahns	asymptom. Erkrankungen, Sepsis im Menschen	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Isolationsort	resp. Trakt, Blut	resp. Trakt von Vögeln	resp. Trakt von Vögeln, Blut, Sputum	Wunden, Ohrinfektionen	Fluss-sediment, Kieferentzündung	Epidermalzyste

B. avium wurde 1984 als erste der „neuen“ *Bordetella*-Spezies beschrieben und mit Atemwegserkrankungen bei Vögeln in Verbindung gebracht (Hinz *et al.*, 1978; Kersters *et al.*, 1984). Die von diesem Erreger in Vögeln verursachte Bordetellose bzw. Koryza ist eine hochansteckende Infektion der oberen Atemwege (Skeeles und Arp, 1997). Das Krankheitsbild ähnelt den durch die „klassischen“ *Bordetella*-Arten verursachten Infektionen bei Säugern. Auch *B. avium* kolonisiert die zilienträgenden Epithelzellen der oberen Atemwege und verursacht Schädigungen und Entzündungen des Gewebes sowie Sekundärinfektionen durch andere Erreger. Die durch *B. avium* verursachten Bordetellosen und dadurch begünstigte Sekundärinfektionen führen in den USA jährlich zu einem Verlust von mehreren Millionen US-Dollar. Hinweise, dass *B. avium* auch den Menschen infizieren bzw. kolonisieren kann, gibt es bisher nicht. Einige der bekannten Virulenzfaktoren des *B. bronchiseptica*-Clusters konnten bereits auch in *B. avium* identifiziert werden (Gentry-Weeks *et al.*, 1988; Temple *et al.*, 1998; Spears *et al.*, 2003).

1995 wurde die nah mit *B. avium* verwandte Art *B. hinzii* entdeckt, die im Gegensatz zu *B. avium* vorwiegend als harmloser Kommensal im Respirationstrakt von Vögeln vorkommt (Vandamme *et al.*, 1995). Jedoch wurde dieses Bakterium vereinzelt auch aus immunsupprimierten und kranken Menschen isoliert. So konnte der Keim beispielsweise im Blut eines AIDS-Patienten und im Sputum eines an cystischer Fibrose erkrankten Patienten nachgewiesen werden. In diesen Fällen wurde *B. hinzii* für Sepsis und Bakteriämie verantwortlich gemacht, weshalb der Erreger als potentiell humanpathogen einzustufen ist (Kattar *et al.*, 2000; Cookson *et al.*, 1994; Funke *et al.*, 1996).

Der 1996 beschriebene Keim *B. trematum* wurde beim Menschen bislang nur aus Wundinfektionen bzw. entzündlichen Erkrankungen des Gehörganges isoliert. Unklar ist allerdings, ob es sich hierbei um Sekundärinfektionen handelt oder ob *B. trematum* ursächlich an diesen Erkrankungen beteiligt ist (Vandamme *et al.*, 1996b).

Mit der Isolierung von *B. petrii* aus dem Flusssediment der Saale wurde 2001 der erste Umweltkeim der Gattung *Bordetella* entdeckt (von Wintzingerode *et al.*, 2001). Diese Art unterscheidet sich deutlich von allen anderen *Bordetella*-Arten, da sie anaerob mittels Nitrat- oder Selenatreduktion wachsen kann. Bis vor kurzem hielt man *B. petrii* deshalb für die einzige *Bordetella*-Art, die nicht in enger Assoziation mit einem Wirtsorganismus vorkommt. 2005 wurde jedoch das erste klinische Isolat dieser Art beschrieben (Fry *et al.*, 2005). Die Isolation dieses Stammes erfolgte aus dem Kiefer eines Patienten mit Kieferknochenhautentzündung. Dennoch ist auch in diesem Fall unklar, ob *B. petrii* als Verursacher oder Folgeerscheinung dieser Erkrankung auftritt. Über die pathogene Relevanz dieses Organismus können demnach noch keine Aussagen getroffen werden.

Anfang des Jahres 2005 wurde ein weiterer Vertreter der Gattung *Bordetella* identifiziert und *B. ansoipii* genannt (Ko *et al.*, 2005). Das Bakterium wurde aus einer Epidermalzyste einer Patientin isoliert und konnte anhand der 16S rDNA-Sequenzen in die Gattung *Bordetella* eingeordnet werden. Dabei wurde festgestellt, dass die 16S rDNA-Sequenz aus *B. ansoipii* die größte Übereinstimmung zu jener aus *B. petrii* (98,3 %) aufweist. Dennoch unterscheidet sich dieses Isolat bezüglich verschiedener Eigenschaften von den anderen *Bordetella*-Arten. So konnten beispielsweise Unterschiede in der Zusammensetzung der zellulären Fettsäuren sowie bezüglich der Homologie zu bestimmten Genen festgestellt werden. Über ein mögliches pathogenes Potential dieses Bakteriums ist jedoch noch nichts bekannt.

1.5 *B. holmesii*

Seit kurzem wird mit *B. holmesii* ein weiterer Vertreter der Gattung *Bordetella* mit respiratorischen Erkrankungen beim Menschen in Verbindung gebracht. Der Keim wurde 1995 von Weyant *et al.* (1995) zum ersten mal als nicht-beweglicher, Gram-negativer Kokkobacillus beschrieben, dessen Koloniemorphologie der von *B. pertussis* stark ähnelt. Einige biochemische Merkmale unterscheiden *B. holmesii* jedoch deutlich von den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters, z. B. seine Cephalexinsensitivität und die fehlende β -Hämolyse. Durch die charakteristische, braune Pigmentierung und die fehlende Oxidase-Aktivität unterscheidet sich *B. holmesii* von *B. pertussis* und *B. bronchiseptica*, durch die fehlende Urease-Aktivität von *B. parapertussis*.

Zunächst konnte der Erreger hauptsächlich aus Blutkulturen immunsupprimierter Sepsispatienten isoliert werden (Lindquist *et al.*, 1995; Morris und Myers, 1998; Tang *et al.*, 1998; Shepard *et al.*, 2004). Man nahm deshalb bis in das Jahr 1998 an, dass dieses Bakterium nicht in der Lage ist, den respiratorischen Trakt des Menschen zu besiedeln. *B. holmesii* konnte dann jedoch aus dem Sputum sowie aus dem Nasen-Rachenraum immunkompetenter Personen isoliert werden, die an Keuchhusten-ähnlichen Symptomen litten (Tang *et al.*, 1998; Yhi *et al.*, 1999). Eine Coinfektion mit *B. pertussis* konnte dabei nicht nachgewiesen werden. Die Isolation von *B. holmesii* aus dem Rachenraum gelang vermutlich, weil ein Selektionsmedium mit dem Antibiotikum Methicillin anstelle von Cephalexin verwendet wurde. Es stellte sich heraus, dass Cephalexin, welches im Allgemeinen zum Nachweis von *Bordetella spp.* dient, das Wachstum von *B. holmesii* inhibiert. Dies könnte eine mögliche Ursache dafür sein, dass dieser Keim niemals zuvor im respiratorischen Trakt des Menschen identifiziert wurde (Mazengia *et al.*, 2000).

Tatsache ist, dass *B. holmesii* als humanpathogener Erreger zunehmend an Bedeutung gewinnt. In einem Fall wurde dieses Bakterium sogar für eine schwere Lungeninfektion verantwortlich gemacht (Russell *et al.*, 2001).

Aktuelle Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Symptome einer Pertussis-Infektion in den meisten Fällen durch *B. pertussis* und nicht durch *B. holmesii* verursacht werden. So konnte im Rahmen einer mehrjährigen Studie bei insgesamt etwa 11.000 Keuchhustenpatienten aus Holland und Finnland ausschließlich *B. pertussis* aus dem Nasen-Rachentrakt isoliert werden (Antila *et al.*, 2006).

Unklar ist auch die phylogenetische Position von *B. holmesii* innerhalb der Gattung *Bordetella*. Basierend auf dem Homologiegrad der 16S rRNA-Sequenzen weist *B. holmesii* eine enge Verwandtschaft zum *B. bronchiseptica*-Cluster, speziell zu *B. pertussis* auf (Weyant *et al.*, 1995). Allerdings konnte durch vergleichende Analysen anderer DNA- und Proteinsequenzen diese systematische Stellung der Art nicht bestätigt werden. So zeigen beispielsweise die OmpA- und BvgA-Sequenzen von *B. holmesii* eine deutlich größere Ähnlichkeit zu denen der „neuen“ *Bordetella*-Arten (Gerlach *et al.*, 2004). Auch der Vergleich der GyrB-Sequenzen konnte die enge verwandtschaftliche Beziehung zwischen *B. holmesii* und dem *B. bronchiseptica*-Cluster nicht belegen (von Wintzingerode *et al.*, 2002). Mit Ausnahme des BvgAS-Systems (Gerlach *et al.*, 2004) konnten bislang weder durch Southernblot- noch durch Westernblot-Experimente Homologe zu den Virulenzfaktoren der „klassischen“ *Bordetella*-Arten in *B. holmesii* identifiziert werden (Njamkepo *et al.*, 2000).

Durch vergleichende Genomhybridisierungs-Analysen konnte kürzlich gezeigt werden, dass *B. holmesii* eine hoch konservierte genomische Region von 66 kb enthält, die wahrscheinlich durch horizontalen Gentransfer aus *B. pertussis* in *B. holmesii* eingebracht und durch homologe Rekombination ins Chromosom integriert wurde (Diavatopoulos *et al.*, 2006). Dabei handelt es sich um eine „Eisen-Aufnahme-Insel“ (IUI), die für Biosynthese (*alcABCDE*), Export (*alcS*), Aufnahme (*fauA*) und Regulation (*alcR*) des Siderophors Alcaligin kodiert. Die Eisenaufnahme aus dem Wirtsorganismus ist die Voraussetzung für eine effiziente Kolonisierung des Wirtes und wird bei Bordetellen vorwiegend durch die Produktion des Siderophors Alcaligin sichergestellt (Register *et al.*, 2001). Somit ist anzunehmen, dass die Kolonisierungsfähigkeiten von *B. holmesii* durch die Alcaliginproduktion erheblich verbessert wurden (Diavatopoulos *et al.*, 2006). Es wird vermutet, dass *B. holmesii* seine 16S rRNA-Gene ebenfalls durch horizontalen Gentransfer aus *B. pertussis* erhalten hat. Der Erwerb von DNA aus *B. pertussis* spielte wahrscheinlich eine Schlüsselrolle für die Entstehung und Wirtsadaptation von *B. holmesii*.

1.6 Evolutionäre Tendenzen der Gattung *Bordetella*

Vergleichende Sequenzanalysen zeigten, dass die nächsten Verwandten der Gattung *Bordetella* die Vertreter der Gattungen *Achromobacter* und *Alcaligenes* sind (DeLey *et al.*, 1986; Yabuuchi *et al.*, 1998). Unter den *Achromobacter*-Arten findet man vor allem Umweltorganismen und einige wenige fakultativ pathogene Erreger, die als opportunistische Krankheitserreger nokosomiale Infektionen beim Menschen verursachen (Granowitz und Keenholz, 1998; Weitkamp *et al.*, 2000). Die enge verwandtschaftliche Beziehung dieser Umweltorganismen zu den *Bordetella*-Arten lässt vermuten, dass auch diese von einem apathogenen Umweltkeim abstammen. Ausgehend von diesem gemeinsamen Vorfahren, der im Boden bzw. Wasser gelebt hat, entwickelten sich die *Bordetella*-Arten vermutlich durch den Erwerb von Virulenzfaktoren zu fakultativ pathogenen Erregern bzw. obligaten Parasiten (Gerlach *et al.*, 2001). Diese Hypothese über die ursprüngliche Herkunft der Bordetellen wird durch die Entdeckung des Umweltisolats *B. petrii* bekräftigt. Zudem ist *B. bronchiseptica* in der Lage, für längere Zeit außerhalb eines Wirtes zu überleben, z. B. in Teichwasser oder Phosphatpuffer (von Wintzingerode *et al.*, 2001; Porter und Wardlaw, 1993).

Die Aktivierung von Virulenzfaktoren des *B. bronchiseptica*-Clusters durch einen Temperaturanstieg von 20 °C auf 37 °C spricht ebenfalls für den Übergang der Bakterien aus der Natur auf einen homoisothermen Wirt. Genomanalysen des Umweltisolats von *B. petrii* zeigten, dass dieses Bakterium einige Homologe zu den Virulenzgenen der „klassischen“ Bordetellen besitzt. Man geht deshalb davon aus, dass der Erwerb der Virulenzgene schon in einer frühen Phase der Evolution der Bordetellen stattgefunden hat (Gerlach *et al.*, 2004). Interessanterweise konnte man auch in einigen anderen Umweltbakterien, wie z. B. *Aeromonas spp.*, *Xanthomas campestris*, *Pseudomonas putida* und *Pseudomonas aeruginosa* ein der Adenylatzyklase ähnliches RTX-Toxin sowie Gene mit Homologien zum Filamentösen Hämagglutinin identifizieren (Kuhnert *et al.*, 1997; <http://www.pseudomonas.com>).

Bei vielen pathogenen Bakterien spielt der horizontale Erwerb von mobilen genetischen Elementen, wie Pathogenitätsinseln (PAIs) oder Bakteriophagen, eine große Rolle für die Virulenz und Wirtsadaptation der Erreger (Kaper und Hacker, 1999). Für das *B. bronchiseptica*-Cluster gibt es allerdings kaum Indizien für das Vorhandensein von PAIs, da die meisten Virulenzgene einzeln über das gesamte Chromosom verstreut zu sein scheinen und zudem ihr GC-Gehalt nicht signifikant von dem der restlichen Gene abweicht (Parkhill *et al.*, 2003). Eine Ausnahme stellt das *ptx/ptl*-Gencluster dar, welches für die Strukturgene und den Sekretionsapparat des Pertussistoxins kodiert und typische Merkmale einer PAI aufweist (Hausmann *et al.*, 1996). Ein zweites Virulenzgencluster codiert für die regulatorischen Gene *bvgAS*, die *fha*-Struktur- und Transportgene sowie einige Gene, die für die Biosynthese und den Export der Fimbrien verantwortlich sind (Willems *et al.*, 1994). Für dieses Gencluster gibt es jedoch keine Anzeichen von Instabilität. Innerhalb des *B. bronchiseptica*-Clusters scheint somit nicht der horizontale Erwerb von genetischem Material für die Anpassung an verschiedene Wirtsorganismen entscheidend gewesen zu sein. Wichtige virulenzrelevante Unterschiede spielen sich zwischen *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* und *B. parapertussis* vielmehr auf der Ebene der Transkription ab. Tatsächlich sind im *B. bronchiseptica*-Cluster die Gene einiger Virulenzfaktoren, wie z. B. *ptx* und *tcf*, in allen drei Arten vorhanden, sie werden aber nur art- bzw. stammspezifisch exprimiert (Gerlach *et al.*, 2001).

Die am Sanger Center ermittelten Genomsequenzen des *B. bronchiseptica*-Clusters zeigten, dass die Genome von *B. pertussis* (4,1 Mbp) und *B. parapertussis* (4,3 Mbp) deutlich kleiner sind als das von *B. bronchiseptica* (5,3 Mbp) und zudem eine große Anzahl an Pseudogenen enthalten (Parkhill *et al.*, 2003). Man geht deshalb davon aus, dass *B. pertussis* und *B. parapertussis* durch die Spezialisierung auf jeweils einen einzigen Wirt einen erheblichen Teil ihrer genetischen Information verloren haben. Diese Art von Genomreduktion wurde auch bei anderen obligat pathogenen sowie symbiontischen Bakterien festgestellt (Anderson und Kurland, 1998). 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 gezeigt werden, dass die genetische Variabilität bei *B. bronchiseptica*-Stämmen am größten ist und dass humane *B. parapertussis*-Isolate näher mit der tierpathogenen Art *B. bronchiseptica* verwandt sind als mit dem humanpathogenen *B. pertussis*. Man nimmt deshalb an, dass sich *B. parapertussis* und *B. pertussis* unabhängig voneinander und zu verschiedenen Zeitpunkten aus unterschiedlichen *B. bronchiseptica*-Stämmen entwickelt haben (Parkhill *et al.*, 2003). Ebenso konnte festgestellt werden, dass humane *B. parapertussis*-Isolate und Isolate aus dem Schaf deutliche Unterschiede in ihrer Genomstruktur aufweisen. Vermutlich haben auch sie sich unabhängig voneinander von einem gemeinsamen Vorfahren aus entwickelt. Demnach stellen Schafe kein Reservoir für humanpathogene *B. parapertussis*-Keime dar (van der Zee *et al.*, 1997).

Über die evolutionären Beziehungen der „neuen“ *Bordetella*-Arten konnten bislang keine eindeutigen Aussagen getroffen werden. Es ist zu hoffen, dass durch die nähere Charakterisierung dieser Spezies weitere Erkenntnisse über die Evolution der Virulenzeigenschaften und Wirtsadaptionenmechanismen der Gattung *Bordetella* gewonnen werden.

2 Die Virulenzfaktoren

Für eine erfolgreiche Infektion des Wirtes benötigen Bordetellen eine Vielzahl von Virulenzfaktoren. Diese wurden bislang vorwiegend bei den „klassischen“ *Bordetella*-Spezies charakterisiert und werden bis heute intensiv molekularbiologisch untersucht. Allgemein lassen sich die Virulenzfaktoren des *B. bronchiseptica*-Clusters in Adhäsionsfaktoren und Toxine unterteilen.

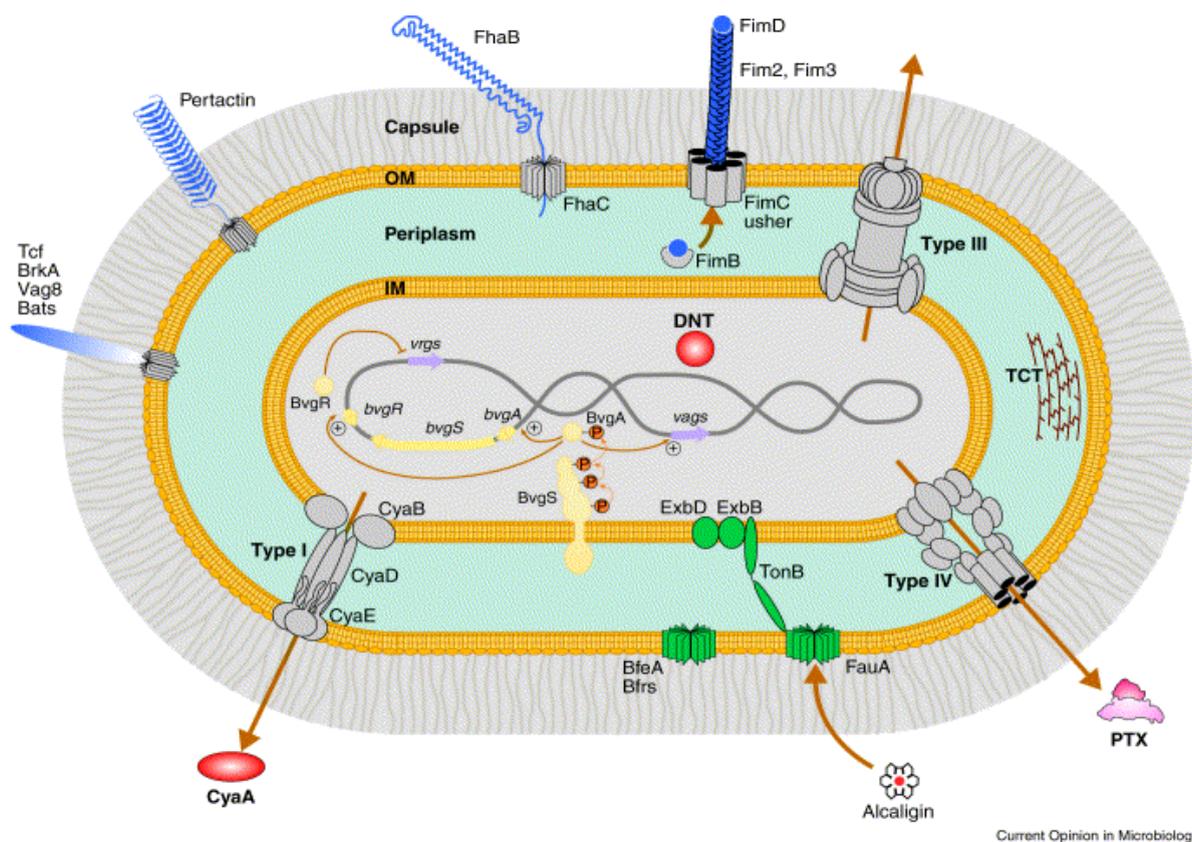


Abb. 2: Gezeigt sind virulenzassoziierte Faktoren von *B. pertussis* (Locht, Antoine und Jacob-Dubuisson, 2001)

2.1 Das Filamentöse Hämagglutinin

Nach Tröpfcheninfektion gelangen die Bordetellen in den oberen Atemtrakt des Wirtes und heften sich dort an die zilienträgenden Epithelzellen an. Die spezifische Adhäsion an das Zilienepithel ist also der erste Schritt im Infektionszyklus von *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica*. Das Filamentöse Hämagglutinin (FHA) gilt dabei als wichtigster Adhäsionsfaktor, seine Expression ist für eine erfolgreiche Kolonisierung des respiratorischen Trakts unbedingt erforderlich (Cotter *et al.*, 1998).

Das 220 kDa große, stark immunogene Protein wird zunächst als 367 kDa großes Vorläuferprotein (FhaB) gebildet und posttranslational prozessiert (Locht *et al.*, 1993). Hierfür passiert FhaB vermutlich über ein Sec-abhängiges Sekretionssystem die Cytoplasmamembran und gelangt in den periplasmatischen Raum, in dem die Prozessierung stattfindet (Lambert-Buisine *et al.*, 1998). Dabei wird neben einem N-terminalen Signalpeptid (71 AS) ein ca. 150 kDa großes C-terminales Fragment proteolytisch abgespalten. Die Abspaltung des C-Terminus, bei der vermutlich eine Serinprotease der Autotransporterfamilie SphB1 eine Rolle spielt (Coutte *et al.*, 2001; Mazar und Cotter, 2006), führt zur Entstehung des reifen 220 kDa großen FHA-Proteins. Dieser C-terminale Teil scheint für die Biogenese des FHA eine entscheidende Rolle zu spielen, denn frame-shift-Mutationen in diesem Bereich führten zur Abwesenheit von detektierbarem FHA im Kulturüberstand von *B. pertussis* (Locht *et al.*, 1993). Laut einem Modell von Renauld-Mongenie *et al.* (1996) könnte die C-terminale Domäne des FhaB nach der Translokation des Precursors durch die innere Membran als intramolekulares Chaperon fungieren, das sich an den C-Terminus des eigentlichen FHA-Proteins anlagert und somit die frühzeitige Faltung des Proteins im Periplasma verhindert. Nach der SphB1-Spaltung wird der C-Terminus von FhaB dann vermutlich im Periplasma abgebaut.

Die Translokation des FHA aus dem periplasmatischen Raum zur extrazellulären Seite erfolgt über ein sogenanntes TPS (two partner secretion)-System mit Hilfe des akzessorischen Proteins FhaC, welches eine Pore in der äußeren Membran bildet (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1999; 2000; 2001). Dabei finden zwischen FhaC und der N-terminalen Sekretionsdomäne von FhaB spezifische Interaktionen statt (Jacob Dubuisson *et al.*, 1997). Man nimmt an, dass FhaB in gestreckter Konformation die äußere Membran durchquert und erst auf der Bakterienoberfläche als gefaltetes und reifes FHA mit Haarnadel-Struktur vorliegt (Guedin *et al.*, 1998; Clantin *et al.*, 2004). Die Faltung des FHA auf der Bakterienoberfläche stellt wahrscheinlich die Energie bereit, die für die Translokation benötigt wird (Renauld-Mongenie, 1996; Guedin, 1998; Kajava, 2001).

Am N-terminalen Ende befinden sich mehrere Proteindomänen, die für die Anheftung an eukaryotische Wirtszellen verantwortlich sind (Arico *et al.*, 1993). Hierzu gehört eine Kohlenhydrat-Bindestelle, welche die Adhäsion der Bakterien an das Zilienepithel des oberen respiratorischen Trakts ermöglicht (Prasad *et al.*, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass bei Deletion der Kohlenhydrat-Bindestelle der entsprechende *B. pertussis*-Stamm nicht mehr in der Lage war, an Makrophagen und zilienträgende Epithelzellen zu binden (Prasad *et al.*, 1993). Eine Heparin-Bindeaktivität ist vermutlich für die Interaktion mit nicht-zilienträgenden Epithelzellen und der extrazellulären Matrix verantwortlich (Menozzi *et al.*, 1990; Sato *et al.*, 1981; Urisu *et al.*, 1986). So wurde festgestellt, dass die Anheftung von FHA an CHO-Zellen, die keine Glykosaminoglykane mehr produzieren können, stark vermindert ist (Hannah *et al.*, 1994). Über das kurze Sequenzmotiv Arg-Gly-Asp (RGD-Motiv) ist FHA zudem in der Lage, an den CR3-Oberflächenrezeptor von Makrophagen zu binden (Relman *et al.*, 1990). Die Bindung der Bordetellen über FHA an die CR3-Integrine verursacht die Internalisierung der Bakterien in die Makrophagen, ohne dass dabei ein „oxidativer burst“ ausgelöst wird. Somit können die Bordetellen innerhalb der Makrophagen überleben (Locht *et al.*, 1993). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass FHA die Zytokinexpression in Epithelzellen und Makrophagen und somit die Immunantwort des Wirtes beeinflusst (Abramson *et al.*, 2001; Ishibashi und Nishikawa, 2002). Dem Filamentösen Hämagglutinin wird darüber hinaus eine Funktion als „Brückenadhäsion“ zugesprochen, da es die Anlagerung von anderen Mikroorganismen an das Zilienepithel erleichtert und somit schwere Sekundärinfektionen ausgelöst werden können (Tuomanen, 1986).

Bislang wurde angenommen, dass FHA extrazellulär mit dem C-terminalen Ende in der äußeren Membran verankert ist und zum Teil sezerniert wird (Domenighini *et al.*, 1990). Neueste Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass der C-Terminus des FHA auf der Bakterienoberfläche exponiert ist (Mazar und Cotter, 2006). Überraschend ist auch, dass der C-Terminus von FHA für die Adhärenz von *B. bronchiseptica* an kultivierte L2-Epithelzellen unentbehrlich zu sein scheint. Mazar und Cotter haben daraufhin ein neues Modell für die Sekretion, Lokalisation und Freisetzung von FHA entwickelt. Demnach erkennt der N-Terminus von FhaB die N-terminale Domäne von FhaC im Periplasma und bleibt mit ihr assoziiert, während das restliche FHA durch die Pore transportiert wird. Auf der Bakterienoberfläche kommt es zur sukzessiven Faltung des Proteins in eine β -Helix, beginnend mit dem N-terminalen Ende. Die für den Transport benötigte Energie wird durch die Faltung des FHA und seine Neigung, eine starre Haarnadelstruktur anzunehmen, bereitgestellt. Die C-terminale Domäne von FhaB könnte mit dem C-Terminus von FHA interagieren und so gewährleisten, dass der spätere C-Terminus von FHA genug Zeit hat um seine Konformationen anzunehmen und sich letztendlich - nach SphB1-Spaltung an der Zelloberfläche - in seine endgültige Form zu falten. Die C-terminale Domäne von FhaB wird im Periplasma degradiert und FHA bleibt vermutlich durch Interaktionen seines N-Terminus mit dem FhaC auf der Zelloberfläche verankert. Der Mechanismus, welcher zur Freisetzung von FHA von der Bakterienoberfläche führt, ist noch weitgehend ungeklärt. Es wird spekuliert, dass aufgrund mangelnder Stabilität der Interaktion zwischen N-terminalem FHA und FhaC das Protein aus dem Kanal entweichen könnte (Mazar und Cotter, 2006).

Das für das Filamentöse Hämagglutinin kodierende Gen *fhaB* ist bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters zwischen dem *bvgAS*-Locus und dem *fim*-Gencluster lokalisiert. Das *bvgAS*-Operon wird in die zum *fhaB* entgegengesetzte Richtung transkribiert. Der *fim*-Locus und das sich daran anschließende *fhaC*-Gen kann zusammen mit *fhaB* als polycistronische RNA synthetisiert werden. Zusätzlich befindet sich vor dem *fim*-Gencluster ein eigener Transkriptionsstartpunkt für die Herstellung einer *fimABCD-fhaC*-spezifischen mRNA (Locht *et al.*, 1993).

In *B. avium* befindet sich stromaufwärts vom *fhaB* anstelle des *bvgAS*-Locus das Gen für einen ATP-bindenden ABC-Transporter. Stromabwärts konnten auch hier homologe Gene zum *fim*-Cluster und zum *fhaC* lokalisiert werden (Spears *et al.*, 2003). Vor kurzem wurde die Genomsequenz von *B. avium* 197N vollständig identifiziert und charakterisiert (Sebahia *et al.*, 2006). Dabei konnte festgestellt werden, dass *B. avium* die beiden FHA-ähnlichen Proteine FhaL und FhaS besitzt, welche auch im Genom von *B. bronchiseptica* vorkommen (Julio und Cotter, 2005). Zusätzlich enthält das *B. avium*-Genom sechs neue Gene (darunter zwei Pseudogene), die für FHA-ähnliche Proteine kodieren. Darunter befindet sich unter anderem *hagB*, das vermutlich zusammen mit *hagA* ein *fhaB/fhaC*-ähnliches TPS-System bildet (Sebahia *et al.*, 2006).

Im Rahmen der Annotation des *B. petrii*-Genoms konnte auch in dieser *Bordetella*-Art ein *fhaB*-homologes Gen identifiziert werden (<https://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/gendb>). Die genomische Organisation des *fhaB*-Locus unterscheidet sich jedoch von der der „klassischen“ *Bordetella*-Arten und von *B. avium*. Das *fhaC*-Gen befindet sich hier stromaufwärts vom *fhaB*. Stromabwärts von *fhaB* ist bei *B. petrii* nicht das *fim*-Gencluster, sondern der Leserahmen für ein konserviertes hypothetisches Protein mit Übereinstimmungen zu einem Homolog aus *Yersinia pseudotuberculosis* (60 % Identität, 77 % Ähnlichkeit) lokalisiert. In Abbildung 3 sind die *fhaB*-Loci der verschiedenen *Bordetella*-Arten schematisch dargestellt.

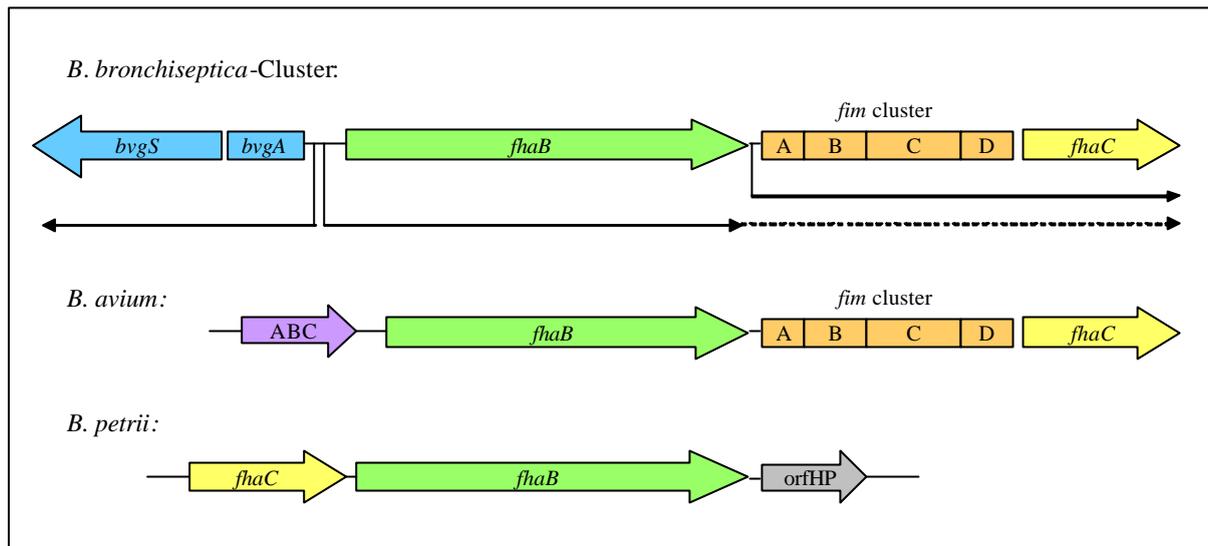


Abb. 3: Schematische Darstellung der *fhaB*-Loci aus dem *B. bronchiseptica*-Cluster, *B. avium* und *B. petrii* (modifiziert nach Lochter *et al.*, 1993; Spears *et al.*, 2003; siehe <https://www.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/-gendb> für *fhaB*-Locus aus *B. petrii*); ABC: ATP-bindendes ABC-Transporterprotein; HP: konserviertes hypothetisches Protein

Neue Erkenntnisse lassen vermuten, dass FHA eine Rolle für die Wirtsspezifität der *Bordetella*-Arten spielt. So war ein *B. bronchiseptica*-Stamm, der das FHA aus *B. pertussis* exprimiert - trotz hoher Ähnlichkeit der FHA-Aminosäuresequenzen beider Arten - nicht mehr in der Lage, den unteren Respirationstrakt in Ratten zu kolonisieren. Man vermutet, dass FHA aus *B. pertussis* spezifisch an einen Rezeptor bindet, der nur im Menschen vorkommt, während das Protein aus *B. bronchiseptica* - ein Bakterium mit breitem Wirtsspektrum - weniger spezifische Bindeeigenschaften aufweist (Inatsuka *et al.*, 2005).

Kürzlich wurde in *B. bronchiseptica* das Gen *fhaS* identifiziert, welches eine große Ähnlichkeit zum *fhaB*-Strukturgen aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *fhaS* unter der Kontrolle des BvgAS-Systems steht. Ebenso wird FhaS, wie FhaB, prozessiert und mit Hilfe von FhaC durch die äußere Membran transportiert. Dennoch ist FhaS nicht in der Lage, *in vitro* die Adhäsion von *B. bronchiseptica* an Epithelzellen zu vermitteln. Auch für die Kolonisierung des respiratorischen Trakts *in vivo* scheint dieses Protein nicht erforderlich zu sein. Die Funktion von FhaS ist demnach noch unklar. Es wird darüber spekuliert, ob das Protein möglicherweise zur Wirtsspezifität beitragen könnte (Julio und Cotter, 2005).

2.2 Weitere Adhäsine

Neben dem FHA sind einige weitere Adhäsionsfaktoren im *B. bronchiseptica*-Cluster bekannt, die in der äußeren Membran lokalisiert sind. Dabei handelt es sich vorwiegend um sogenannte Autotransporterproteine, die zum Passieren der äußeren Membran keine Hilfsproteine benötigen, sondern mittels ihrer carboxyterminalen Domäne durch sie hindurch gelangen. Alle diese Adhäsine enthalten mindestens ein RGD-Motiv, weshalb ihnen eine Rolle bei der erfolgreichen Kolonisierung des Atmungstrakts zugesprochen wird. Hierzu gehören z. B. das Pertaktin (PRN) (Leiniger *et al.*, 1991), der tracheale Kolonisierungsfaktor (TCF) (Finn und Stevens, 1995a) und der Serumresistenzfaktor BrkA (Fernandez und Weiss, 1994).

Vor kurzem konnte festgestellt werden, dass in *B. avium* ein Adhäsion-ähnliches Protein vorkommt, welches Übereinstimmungen mit Tia und Hek, zwei Adhäsinen aus *E. coli*, aufweist. Ein weiteres neu identifiziertes Adhäsion-ähnliches Protein aus *B. avium* stimmt zu 31 % mit Bap, einem an der Biofilmbildung beteiligten Protein aus *S. aureus*, und zu 24 % mit Intimin aus *E. coli* überein (Sebahia *et al.*, 2006).

Des Weiteren tragen bei den „klassischen“ *Bordetella*-Arten mehrere Serotyp-spezifische Fimbrien zur Besiedelung des Respirationstrakts bei (Mooi *et al.*, 1992). Dabei können Heparin und andere Zuckersulfate, die im Atmungstrakt von Säugern ubiquitär vorhanden sind, von Fim2, Fim3 und FimD gebunden werden (Geuijen *et al.*, 1996). Zudem ist bekannt, dass die Bindung von FimD an VLA-5-Rezeptoren von Monozyten zur Aktivierung der CR3-Rezeptoren führt, an welche wiederum FHA binden kann (Hazenbos *et al.*, 1995).

2.3 Toxine

Nach erfolgreicher Adhäsion an die Wirtszellen produzieren die Vertreter des *B. bronchiseptica*-Clusters einige Zellgifte, die die Zerstörung von Gewebe verursachen. Diese zellschädigende Wirkung dient sowohl der Schwächung des wirtseigenen Abwehrsystems als auch der Freisetzung von limitierenden Nährstoffen, wie z. B. Eisen.

Das Pertussistoxin (PTX) ist der bekannteste Virulenzfaktor des Keuchhustenerregers. Dieses Toxin wird ausschließlich von *B. pertussis* exprimiert und ist vermutlich für die charakteristischen Begleitscheinungen der Krankheit, wie erhöhte Insulinproduktion, Lymphozytose und Histaminsensibilisierung verantwortlich (Pittman, 1984b). Zusätzlich trägt PTX als Adhäsionsfaktor zur Anlagerung der Bakterien an Makrophagen und an das Zilienepithel bei (Tuomanen und Weiss, 1985; van't Wout *et al.*, 1992). Die Sekretion von PTX erfolgt über den Sec-Transportweg durch die innere Membran und anschließend über ein TypIV-Sekretionssystem durch die äußere Membran (Farizo *et al.*, 2000; Burns, 1999). PTX selbst besteht aus fünf Untereinheiten (S1-S5) und stellt ein typisches „AB-Toxin“ dar. Die B-Untereinheit, bestehend aus den Komponenten S2-S5, ermöglicht die Translokation der enzymatisch aktiven A-Untereinheit ins Innere der Wirtszelle (Tamura *et al.*, 1982a/b). Die toxische A bzw. S1-Untereinheit besitzt eine ADP-Ribosyltransferase-Aktivität und katalysiert unter NAD-Verbrauch die ADP-Ribosylierung von wirtseigenen G-Proteinen, die dadurch inaktiviert werden. Es kommt zu einer unkontrollierten Aktivierung der Adenylatzyklase und somit zur Überproduktion des Botenstoffes cAMP. Letztendlich werden wichtige Signaltransduktionskaskaden gestört, was zur Schädigung der Wirtszellen führt (Katada *et al.*, 1986; Loch und Antoine, 1995).

Die Adenylatzyklase (CYA) ist ein Toxin, das von allen Vertretern des *B. bronchiseptica*-Clusters gebildet wird. Dieses bifunktionale Toxin weist neben seiner Calmodulin-abhängigen Adenylatzyklase-Aktivität auch eine hämolytische Aktivität auf (Glaser *et al.*, 1988). Die Sekretion erfolgt über ein Sec-unabhängiges TypI-Sekretionssystem, welches aus akzessorischen Proteinen zusammengesetzt ist (Locht *et al.*, 2001). Es wurde gezeigt, dass CYA in der Lage ist, Apoptose in Makrophagen auszulösen und somit zur Schwächung der zellvermittelten Wirtsabwehr beizutragen (Gueirard *et al.*, 1998; Khelef *et al.*, 1993). Neuere Untersuchungen zeigen, dass CYA auf der Bakterienoberfläche mit FHA assoziiert ist und dass FHA erforderlich ist, um CYA in der äußeren Membran festzuhalten (Zaretzky *et al.*, 2002). Laut Perez Vidakovics *et al.* (2006) verstärkt CYA die adhäsiven Eigenschaften von FHA und beeinflusst - möglicherweise über Konformationsänderungen des FHA-Proteins - die Aktivität der Heparin-Bindedomäne.

Das tracheale Zytotoxin (TCT) ist ein kleines Disaccharid-Tetrapeptid und Bestandteil der Mureinschicht der bakteriellen Zellwand (Cookson *et al.*, 1989a/b). Mureinbruchstücke wie das TCT entstehen während des normalen Wachstums eines Bakteriums und werden von den meisten Bakterien wieder dem Zellmetabolismus zugeführt. Dies ist den Bordetellen jedoch aufgrund eines Gendefekts nicht möglich und so wird TCT während der exponentiellen Wachstumsphase der Bordetellen spontan in die Umgebung abgegeben (Rosenthal, 1987). Zusammen mit dem bakteriellen Lipopolysaccharid (LPS) wirkt TCT stimulierend auf die Interleukin-1-Produktion von Wirtszellen, wodurch es zu einer vermehrten Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) kommt (Heiss *et al.*, 1994; Flak *et al.*, 2000). Höhere Konzentrationen von NO wirken zytotoxisch auf die zilienträgenden Epithelzellen des Respirationstrakts. Man vermutet, dass die Schädigung und der Verlust des Zilienepithels Hauptursache der krampfartigen Hustenanfälle des Keuchhustens sind (Luker *et al.*, 1995).

Das dermonekrotische Toxin (DNT) wurde bislang nur im Cytosol der Bordetellen nachgewiesen, seine Bedeutung für die Pathogenese ist noch unklar. Die Injektion von DNT verursacht in Mäusen jedoch nekrotische Hautläsionen und verläuft bei höherer Dosis tödlich (Livey und Wardlaw, 1984). Zudem wurde gezeigt, dass DNT GTP-bindende Rho-Proteine modifizieren kann, was zu einer konstitutiven Aktivität der GTPasen führt. Dies stimuliert wiederum die Ausbildung von Aktin-Stressfasern, was letztlich eine morphologische Veränderung der Zellen mit sich bringt (Horiguchi *et al.*, 1997; Masuda *et al.*, 2000).

Neben den klassischen Adhäsinen und Toxinen verfügen einige *Bordetella*-Arten über weitere Faktoren, die entscheidend zur Virulenz beitragen können. Hierzu zählen unter anderem Eisenaufnahmesysteme, wie der TonB-Komplex (Pradel *et al.*, 2000) und ein TypIII-Sekretionssystem (Yuk *et al.*, 1998b). Durch dieses können verschiedene Effektorproteine direkt in die Wirtszelle injiziert werden und man vermutet, dass dadurch der eukaryotische Transkriptionsfaktor NF- κ B inaktiviert und somit die Immunantwort des Wirts moduliert wird (Yuk *et al.*, 2000).

2.4 Expression der Virulenzgene beim *B. bronchiseptica*-Cluster

Trotz des ähnlichen genetischen Repertoires bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters unterscheiden sich diese Spezies bezüglich ihrer Wirtsadaptation und der Art des von ihnen verursachten Krankheitsverlaufs. Die Hauptursache hierfür scheint in der unterschiedlichen Expression der einzelnen Virulenzfaktoren zu liegen.

Wie in Tabelle 3 zu erkennen ist, werden bestimmte Virulenzfaktoren nur art- bzw. stamm-spezifisch exprimiert, obwohl die entsprechenden Genloci bei allen drei Arten vorhanden sind. Hierzu zählt zum einen das Pertussistoxin, welches aufgrund von Punktmutationen im Promotorbereich des *ptx*-Gens nicht von *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* produziert wird, sondern ausschließlich bei *B. pertussis* vorkommt (Gross und Rappuoli, 1988; Parkhill *et al.*, 2003). Man vermutet, dass aufgrund der fehlenden *ptx*-Expression von *B. parapertussis* eine Infektion mit diesem Erreger sehr viel kürzer und milder verläuft als eine Pertussis-Infektion. Auch der tracheale Kolonisierungsfaktor (TCF) wurde bislang nur bei *B. pertussis*-Isolaten nachgewiesen (Finn *et al.*, 1995a). Im Gegensatz dazu wird die Urease nur von *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* synthetisiert, während das Gencluster in *B. pertussis* aufgrund von Mutationen vermutlich nicht abgelesen wird (McMillan *et al.*, 1998). Die bei allen drei Arten vorkommenden Flagellengene werden nur von *B. bronchiseptica* exprimiert und verleihen dieser Art Motilität (Akerley *et al.*, 1993).

Regulatorische Mutationen in Promotorbereichen von Virulenzgenclustern sind möglicherweise auch für stammspezifische Expressionsunterschiede einiger Faktoren verantwortlich. So wird zum Beispiel der Serumresistenzfaktor BrkA nur von einigen *B. bronchiseptica*-Stämmen exprimiert (Rambow *et al.*, 1998) und auch die Expression von LPS ist stamm-spezifisch und kann während einer Infektion variieren (Le Blay *et al.*, 1997; Gueirard *et al.*, 1998; Middendorf und Gross, 1999).

Tab 3: Verbreitung und Funktion wichtiger Virulenzfaktoren innerhalb des *B. bronchiseptica*-Clusters (modifiziert nach Gerlach *et al.*, 2001).

Virulenzfaktor	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	Funktion
PTX				AB-Toxin, Adhäsion
Expression ^a	+	-	-	
Gene ^b	+	+	+	
CYA				Hämolysin, Adenylat- zyklase
Expression ^a	+	+	+	
Gene ^b	+	+	+	
TCT	+	+	+	Toxin
DNT				Modifikation monomerer
Expression ^a	+	+	+	
Gene ^b	+	+	+	
GTPasen				
FHA				Adhäsion
Expression ^a	+	+	+	
Gene ^b	+	+	+	
PRN				Adhäsion
Expression ^a	+	+	+	
Gene ^b	+	+	+	
Fimbrien				Adhäsion, Kolonisierung
Expression ^a	+	+	+	
Gene ^b	+	+	+	
TCF				Kolonisierung
Expression ^a	+	-	-	
Gene ^b	+	+	+	
Urease-Aktivität				Spaltung von Harnstoff
Expression ^a	-	+	+	
Gene ^b	+	+	+	
TypIII-Sekretionssystem				persistierende Kolonisierung
Expression ^a	-	+	+	
Gene ^b	+	+	+	
BrkA				Serumresistenz, Adhäsion, Invasion?
Expression ^a	+		einige Stämme	
Gene ^b	+	+	+	
Flagellen				Motilität
Expression ^a	-	-	+	
Gene ^b	+/-	+/-	+	

^a: nach Westernblot, ^b: nach Southernblot bzw. Genomdaten

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

Die Virulenzeigenschaften der „neuen“ *Bordetella*-Spezies sind im Gegensatz zu denen der „klassischen“ Arten kaum untersucht. Obwohl die meisten der „neuen“ Arten human- bzw. tierpathogenes Potential aufweisen, konnten bislang nur wenige der aus dem *B. bronchiseptica*-Cluster bekannten Virulenzfaktoren nachgewiesen werden.

B. holmesii wurde - wie unter 1.5 beschrieben - aus Patienten mit Keuchhusten-ähnlichen Symptomen isoliert. Dennoch konnte über Southernblot- und Westernblot-Experimente in dieser Art bislang kein für das *B. bronchiseptica*-Cluster bekannter Virulenzfaktor nachgewiesen werden. Dies gilt ebenso für *B. trematum* und *B. hinzii*. Erst vor kurzem wurden in den Arten *B. holmesii*, *B. trematum* und *B. hinzii* homologe Gene zum *bvgA* und *bvgS* des *B. bronchiseptica*-Clusters identifiziert (Gerlach *et al.*, 2004).

Auch in *B. avium* verliefen DNA-Hybridisierungsversuche und Immunoblot-Analysen zur Identifikation von virulenzassoziierten Faktoren zunächst negativ. Seit längerem ist jedoch bekannt, dass *B. avium* eine dermonekrotische und hämagglutinierende Aktivität besitzt sowie ein tracheales Zytotoxin produziert (Gentry-Weeks *et al.*, 1988; Temple *et al.*, 1998). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass dieses Bakterium homologe Gene zu *bvgA*, *bvgS*, *fhaB*, *fhaC* und *fimC* besitzt. Die Inaktivierung dieser Gene führte zu einem Verlust der Virulenzeigenschaften im Tiermodell (Spears *et al.*, 2003). Die Identifizierung der Genomsequenz von *B. avium* 197N ermöglichte den Nachweis weiterer putativer Virulenzfaktoren in dieser Art (Sebahia *et al.*, 2006). So wurden neben *fhaL* und *fhaS* sechs neue Gene identifiziert, von denen vier für FHA-ähnliche Proteine kodieren, während die beiden anderen Pseudogene darstellen. Das FHA-Homolog *hagB* bildet vermutlich zusammen mit *hagA* ein TPS-System. Mutationen in entweder *hagA* oder *hagB* führten zum Verlust der hämagglutinierenden Fähigkeit von *B. avium*. Weiterhin konnten zwei Adhäsion-ähnliche Proteine identifiziert werden, die Adhäsionsproteinen aus *E. coli* und *S. aureus* ähneln. Ob und inwieweit diese neu identifizierten Gene an der Virulenz von *B. avium* beteiligt sind, ist jedoch noch unbekannt.

Die Analyse der Genomsequenz von *B. petrii* zeigte, dass auch dieses Umweltisolat Gene aufweist, die Homologien zu *fhaB*, *fhaC*, *bvgAS*, *fim* und *brk* besitzen (<https://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/gendb>).

3 Das BvgAS-Zwei-Komponentensystem

3.1 Signaltransduktion über das BvgAS-Zwei-Komponentensystem

Um in verschiedenen Habitaten erfolgreich überleben zu können, müssen Bakterien in der Lage sein, sich schnell an verändernde Umweltbedingungen anzupassen. Zwei-Komponentensysteme ermöglichen die Wahrnehmung äußerer Stimuli (z. B. Temperaturschwankungen, Änderungen von pH-Wert, Osmolarität und Nährstoffkonzentration) und sind für die globale Regulation der Genexpression verantwortlich (Gross *et al.*, 1989a; Stock *et al.*, 1990; Perraud *et al.*, 1999). Bei Eubakterien sind Zwei-Komponentensysteme weit verbreitet, jedoch kommen sie auch bei einigen Archaeobakterien und niederen Eukaryoten wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* und bei Pflanzen vor (Loomis *et al.*, 1998;).

Schon vor vielen Jahren wurden bei den „klassischen“ *Bordetella*-Arten zwei Phänomene entdeckt, die auf die Anwesenheit eines Zwei-Komponentensystems im Zusammenhang mit der Virulenzgenregulation hindeuteten. Bei der sogenannten Phasenvariation verlieren *B. pertussis*- und auch *B. bronchiseptica*-Isolate *in vitro* mit einer Frequenz von 10^{-3} bis 10^{-6} spontan ihre Virulenzeigenschaften (Leslie und Gardner, 1931; Weiss und Falkow, 1984). Als Ursache für diesen meist irreversiblen Vorgang werden verschiedene Mutationen im *bvgAS*-Locus der Bordetellen verantwortlich gemacht (Stibitz *et al.*, 1989; Monack *et al.*, 1989). Dagegen bezeichnet die sogenannte phänotypische Modulation einen Vorgang, bei dem es unter bestimmten Wachstumsbedingungen zu einem reversiblen Verlust der Virulenzgenexpression kommt (Lacey, 1960). Zu den modulierenden Bedingungen zählen die Anwesenheit von Sulfationen oder Nikotinsäure im Nährmedium sowie die Kultivierung der Bakterien bei Raumtemperatur anstelle von 37 °C (Melton und Weiss, 1989). Genetische Analysen zeigten, dass auch dieses Phänomen auf den *bvgAS*-Locus zurückzuführen ist (Miller *et al.*, 1992; Gross und Rappuoli, 1989b).

Das BvgAS-System stellt den Hauptregulator der Virulenzgenexpression in Bordetellen dar. Es wird den unorthodoxen Zwei-Komponentensystemen zugeordnet und zeichnet sich durch einen vierstufigen His-Asp-His-Asp-Phosphotransfer aus (Uhl und Miller, 1994; 1996a; Perraud *et al.*, 1999). In Abbildung 4 ist der Aufbau des BvgAS-Systems schematisch dargestellt.

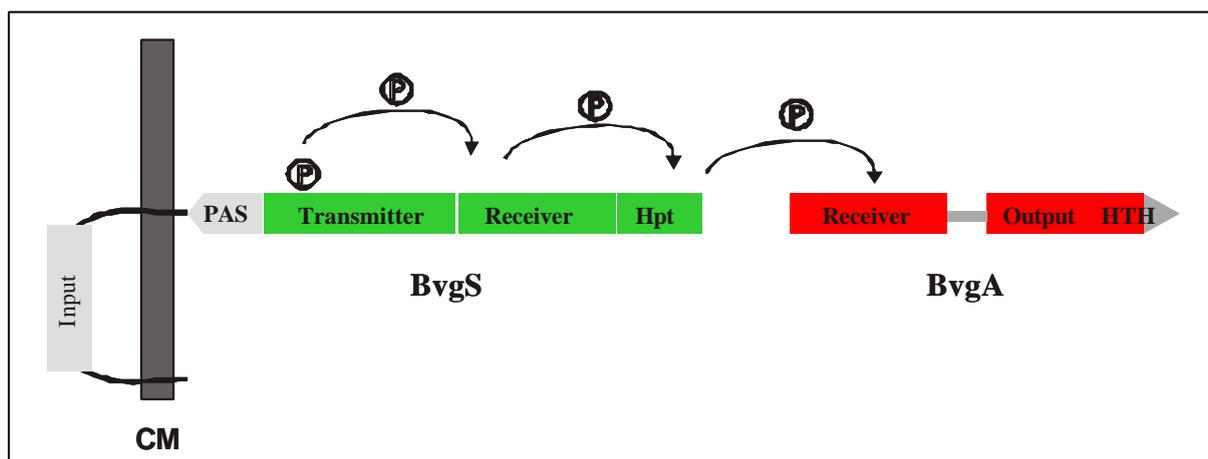


Abb. 4: Schematische Darstellung und Phosphorelay des BvgAS-Zwei-Komponentensystems

Die Histidinkinase BvgS ist über zwei Transmembrandomänen in der Cytoplasmamembran (CM) verankert. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen den mehrstufigen Transfer der Phosphatgruppe (P) auf den Response Regulator BvgA; PAS: PAS-Domäne, Hpt: Histidin beinhaltende Phosphotransfer-Domäne, HTH: Helix-turn-Helix-Motiv

BvgS ist eine 135 kDa große, membranständige, sensorische Histidinkinase, die aus einer periplasmatischen und vier cytoplasmatischen Domänen besteht und als Dimer vorliegt (Stibitz und Yang, 1991; Beier *et al.*, 1995). Die N-terminale periplasmatische Inputdomäne ist über einen Linker mit dem cytoplasmatischen Bereich verbunden. Dieser cytoplasmatische Teil besteht aus einer PAS-Domäne, dem Transmitter, dem Receiver und der C-terminalen Hpt-Domäne. PAS-Domänen sind ubiquitär verbreitete Signalmoleküle, die auf Reize wie Licht, Sauerstoff, kleine Liganden sowie den Redox- und Energiezustand der Zelle reagieren können (Taylor und Zhulin, 1999). Tatsächlich konnte vor kurzem gezeigt werden, dass BvgS in der Lage ist, *in vitro* den Oxidationszustand von Ubichinon wahrzunehmen und somit wahrscheinlich direkt mit der Atmungskette und damit dem Energiezustand der Zelle verknüpft ist (Bock und Gross, 2002).

Die Transmitter-Domäne des BvgS enthält eine ATP-Bindestelle und einen hochkonservierten Histidinrest (H⁷²⁹). An dieser Stelle kommt es *in vitro* unter nicht-modulierenden Bedingungen (Wachstum der Bakterien bei 37 °C in Abwesenheit von Magnesiumsulfat und Nikotinsäure) zu einer ATP-abhängigen Autophosphorylierung. Von dort aus wird die Phosphatgruppe zunächst auf den Aspartatrest D⁰²³ des BvgS-Receivers und anschließend auf den Histidinrest H¹⁷² der Hpt-Domäne übertragen (Uhl und Miller, 1994). Alternativ zum Phosphotransfer auf H¹⁷² kann die Receiver-Domäne des BvgS aufgrund ihrer Autophosphatase-Aktivität den Phosphorelay unterbrechen. Man schreibt der BvgS-Receiver-Domäne deshalb eine besondere Funktion bei der Feinregulierung des Systems zu (Uhl und Miller, 1996b). Die Hpt-Domäne ist letztlich für die spezifische Übertragung der Phosphatgruppe auf den Aspartatrest D⁵⁴ der BvgA-Receiver-Domäne zuständig (Uhl und Miller, 1996b; Perraud *et al.*, 1998).

BvgA ist ein 23 kDa großes, cytoplasmatisches Regulatorprotein, das zur FixJ-Familie der Response Regulatoren gehört (Pao und Saier Jr., 1995). Das Protein ist ein DNA-bindender Transkriptionsfaktor und besteht aus einer N-terminalen Receiver-Domäne und einer C-terminalen Output-Domäne mit Helix-turn-Helix-Motiv (Arico *et al.*, 1989). Unabhängig von seinem Phosphorylierungsgrad liegt BvgA als Dimer vor (Roy *et al.*, 1989; 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; Marques und Carbonetti, 1997). Äußere Signale, die *in vivo* durch dieses System wahrgenommen werden und somit zu einer gezielten Regulation der Virulenzgene führen, sind bislang noch nicht bekannt.

Man findet bei den BvgAS-Zwei-Komponentensystemen von *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* eine starke Konservierung sowohl bezüglich der Sequenzen als auch auf funktioneller Ebene. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass phasenvariante *B. bronchiseptica*-Stämme durch den *bvgAS*-Locus von *B. pertussis* komplementiert werden können, wodurch es wieder zur Expression ihrer Virulenzfaktoren kommt (Mc Gillivray *et al.*, 1989).

Neueste Ergebnisse belegen, dass auch *B. holmesii* ein BvgAS-System besitzt (Gerlach *et al.*, 2004; siehe 3.4), welches zwar eine umfangreiche Sequenzkonservierung zu dem aus *B. pertussis* aufweist, jedoch nicht in der Lage ist, die Funktion des BvgA-Proteins aus *B. pertussis in vitro* bzw. *in vivo* zu ersetzen. Im Gegensatz dazu konnte die Histidinkinase BvgS aus *B. holmesii* die Funktion des mutierten BvgS-Proteins im *B. pertussis*-Stamm 347 übernehmen, wie durch Komplementationsexperimente gezeigt wurde. Überraschenderweise stellte sich heraus, dass die Aktivität von BvgS aus *B. holmesii* nicht wie das Protein der „klassischen“ *Bordetella*-Arten vollständig durch Sulfationen moduliert werden kann. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die BvgS-Sensorproteine aus *B. holmesii* und *B. pertussis* in ihren sensorischen Bereichen einen relativ geringen Konservierungsgrad aufweisen (Gerlach *et al.*, 2004).

3.2 Transkriptionelle Genregulation durch das BvgAS-System

Das BvgAS-Zwei-Komponentensystem ist für die Aktivierung und Repression einer Reihe von Genen direkt und indirekt verantwortlich. Aufgrund dieser Kontrolle durch das BvgAS-System können die „klassischen“ *Bordetellen* mindestens drei verschiedene phänotypische Phasen ausprägen.

In der virulenten Bvg⁺-Phase kommt es zur Aktivierung der Expression der sogenannten *vag*-Gene (virulence activated genes). Hierzu zählen neben den Virulenzfaktoren PTX, CYA, FHA, PRN, FIM, TCF, BrkA und das TypIII-Sekretionssystem auch einige House-keeping-Faktoren, wie z. B. das Cytochrom d-629 und ein Porin (Ezzel *et al.*, 1981; Finn *et al.*, 1995b; Antoine *et al.*, 2000a/b). Auch das *bvgAS*-Operon selbst gehört zu den *vag*-Genen und unterliegt demnach einer positiven Autoregulation (Roy *et al.*, 1990; 1991; Scarlato *et al.*, 1990). Die Expression des putativen Repressors BvgR, welcher an der Repression der sogenannten *vrg*-Gene (virulence repressed genes) beteiligt ist, wird ebenfalls aktiviert (Beattie *et al.*, 1993; Merkel *et al.*, 1998a). Die Aktivierung dieser Gene wird unter nicht-modulierenden Bedingungen von der phosphorylierten Form des BvgA-Proteins (BvgA-P) vermittelt. BvgA-P ist in der Lage, spezifisch an die Promotorregionen der *vag*-Gene zu binden. Diese Promotorregionen enthalten als BvgA-Bindestelle die Konsensussequenz 5'-T/A T T C C/T T A -3' oder Varianten davon, welche entweder als „direct-repeat“- oder „inverted-repeat“-Strukturen mit unterschiedlichen Abständen zwischen den beiden Halbseiten angeordnet sind (Roy und Falkow, 1991; Karimova und Uhlmann, 1997; Marques und Carbonetti, 1997). Die Anwesenheit von mehreren BvgA-Bindestellen ist dabei ein gemeinsames Kennzeichen von allen *bvg*-abhängigen Promotoren. Hierzu zählt im Allgemeinen jeweils eine primäre und eine oder mehrere sekundäre BvgA-Bindestellen. Vermutlich kommt es während der DNA-Bindung zu einer Oligomerisierung und Akkumulation von mehreren BvgA-Dimeren (Boucher und Stibitz, 1995; Boucher *et al.*, 1997). Dabei wird zunächst die primäre Bindestelle mit hoher Affinität besetzt. Kooperative Interaktionen ermöglichen anschließend die Bindung weiterer BvgA-Dimere an die sekundären Bindestellen, die weniger affin und spezifisch sind (Boucher *et al.*, 2001a/b; Kinnear *et al.*, 1999). Das BvgA-P-Dimer, welches die sekundäre Bindestelle besetzt hat, kann dann mit der RNA-Polymerase interagieren, wodurch die Transkription der *vag*-Gene schließlich eingeleitet wird (Boucher *et al.*, 1997). Die *vag*-Gene lassen sich hinsichtlich ihrer Aktivierungskinetik in „frühe“ und „späte“ Gene einteilen. Die frühen Gene, wie *fhaB*, *bvgAS* und *bvgR*, werden bereits wenige Minuten nach einem Shift von modulierenden zu nicht-modulierenden Bedingungen transkribiert. Die Induktion der späten Gene, wie z. B. *ptx* und *cya*, benötigt dagegen mehrere Stunden (Gross und Rappuoli, 1989b, Scarlato *et al.*, 1991b).

Laut neueren Untersuchungen enthält die *fhaB*-Promotorregion aus *B. pertussis* insgesamt fünf BvgA-Bindestellen (siehe Abb. 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 befindet sich an Position -88,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt und besteht aus einem fast perfekten „inverted repeat“ (5'-TTTCTTA-3' auf dem kodierenden und 5'-TTTCCTA-3' auf dem nicht-kodierenden Strang). Zwischen den beiden Halbseiten sind keine zusätzlichen Nukleotide enthalten (Roy and Falkow, 1991). Durch Mutationsanalysen am *fhaB*-Promotor konnte gezeigt werden, dass die Nukleotide an den Positionen 3 (Thymidin), 4 (Cytosin) und 7 (Adenosin) für die Bindung des BvgA-P-Proteins besonders wichtig sind. Ein Austausch des Thymidins an Position 6 zu einem Adenosin verschlechtert ebenfalls das Bindevormögen von BvgA-P (Boucher *et al.*, 2001b). Interessanterweise sind lediglich die an die P-, S1- und S2-Bindestellen gebundenen BvgA-Dimere an der Aktivierung der *fhaB*-Transkription beteiligt. Die einzelnen Binderegionen sind dabei jeweils 21 bp voneinander entfernt, was zwei Umwindungen der DNA entspricht. Dies bedeutet, dass die BvgA-Dimere bei ihrer Bindung ausgehend von der primären Bindestelle bis zur -35-Region eine vollständige Seite der Doppelhelix besetzen (Boucher *et al.*, 2003).

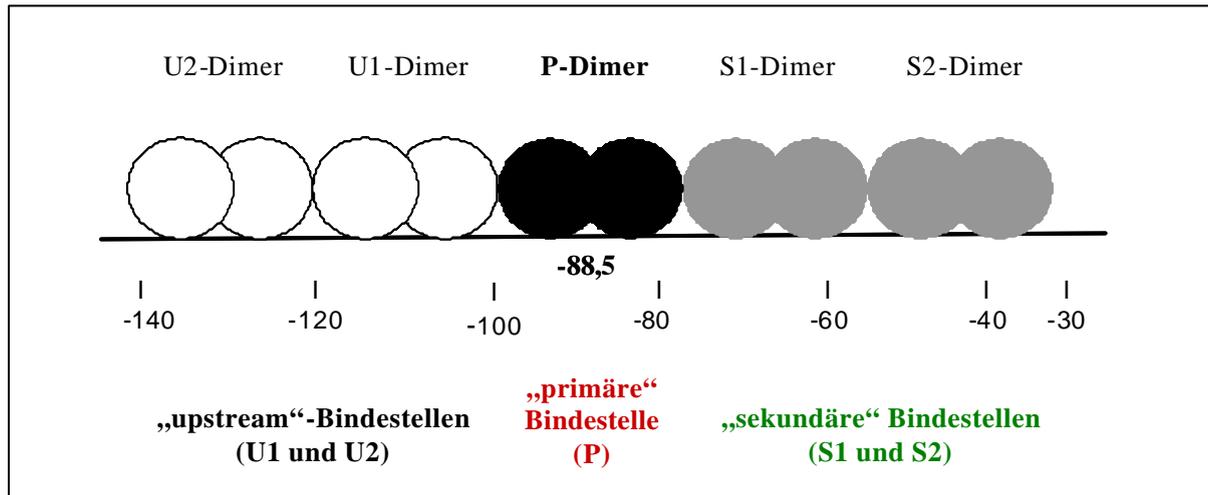


Abb. 5: Schematische Darstellung der multiplen BvgA-Bindestellen innerhalb der *fhaB*-Promotorregion aus *B. pertussis* (modifiziert nach Boucher *et al.*, 2003)

Angegeben sind die Positionen der „primären“, „sekundären“ sowie der „upstream“ BvgA-Bindestellen relativ zum *fhaB*-Transkriptionsstartpunkt. Die Bindestellen sind so 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.

Für die Aktivierung der „späten“ Gene scheint eine in etwa zehnfach höhere Konzentration an BvgA-P erforderlich zu sein (Steffen *et al.*, 1996; Zu *et al.*, 1996; Karimova *et al.*, 1996). Die differentielle Regulation der *vag*-Gene basiert auf der unterschiedlichen Architektur ihrer Promotorregionen (Boucher und Stibitz, 1995) und der damit verbundenen unterschiedlichen Affinität für BvgA (Scarlato *et al.*, 1991b). So stimmt zum Beispiel die primäre Bindestelle des *ptx*-Promotors nur an jeweils fünf der sieben Positionen einer Halbseite mit der Konsensussequenz überein. Zusätzlich sind die beiden Halbseiten dieser „inverted-repeat“-Struktur 10 bp voneinander getrennt und das Zentrum liegt bei Position -136,5, also viel weiter stromaufwärts als bei den Promotoren der „frühen“ Gene (Boucher und Stibitz, 1995). Aufgrund dieses relativ großen Sequenzbereichs zwischen der primären Bindestelle und dem *ptx*-Transkriptionsstartpunkt scheint für eine effektive Interaktion zwischen Response Regulator und RNA-Polymerase die Oligomerisierung von mehreren BvgA-Dimeren notwendig zu sein. Die hierfür benötigte hohe intrazelluläre Konzentration an BvgA-P liegt erst mehrere Stunden nach dem Shift vor (Marques und Carbonetti, 1997).

Eine weitere phänotypische Phase ist die avirulente Bvg⁻-Phase, in der es zu einer Expression der *vrg*-Gene kommt, während die *vag*-Gene nicht transkribiert werden. Unter modulierenden Bedingungen, d.h. Wachstum bei niedrigen Temperaturen bzw. in Anwesenheit von Sulfationen oder Nikotinsäure, kommt es nicht zur Autophosphorylierung der Histidinkinase BvgS und somit auch nicht zu dem unter 3.1 beschriebenen Phosphotransfer. Da nun das BvgR-Repressorprotein, welches in der Bvg⁺-Phase für die Repression der *vrg*-Gene verantwortlich ist, nicht mehr transkribiert wird und noch vorhandene *bvgR*-Transkripte aufgrund ihrer Instabilität schnell abgebaut werden, kommt es zu einer schnellen Induktion der *vrg*-Gene. Somit ist das BvgAS-System nur indirekt an der Kontrolle der *vrg*-Gene beteiligt. Diese sind im Gegensatz zu den *vag*-Genen kaum charakterisiert. In *B. pertussis* konnten mittels 2D-Gelelektrophorese und Transposonmutagenese bis zu 22 BvgAS-reprimierte Faktoren entdeckt werden, darunter zwei Oberflächenproteine VraA und VraB, deren Funktion bislang unklar ist (Stenson und Pepler, 1995; Knapp und Mekalanos, 1988).

Über die Funktion der *vrg*-Gene aus *B. bronchiseptica* ist dagegen sehr viel mehr bekannt. Hier gehören beispielsweise die Urease (McMillan *et al.*, 1996) und einige Enzyme der Alcaligin-Biosynthese (Giardina *et al.*, 1995) zu den Bvg⁻-spezifischen Faktoren. Auch die Beweglichkeit von *B. bronchiseptica* ist ein typisches Merkmal der Bvg⁻-Phase. Diese wird allerdings durch den Transkriptionsaktivator FrlAB, der die Expression des Mobilitätsregulon induziert, direkt reguliert (Akerley *et al.*, 1993). Zudem wurden Gene identifiziert, die an wichtigen Vorgängen des Energiestoffwechsels, z. B. dem Elektronentransport, dem Fettsäure-Metabolismus, dem Glyoxylatzyklus oder dem Abbau aromatischer Aminosäuren beteiligt sind (Cotter und Miller, 2000; Schneider *et al.*, 2002). Auch für die LPS-Variation (van den Akker *et al.*, 1998), die Synthese eines alternativen Adhäsins (Register und Ackermann, 1997) und die Expression einer saueren Phosphatase (Chhatwal, 1997) werden *vrg*-Gene verantwortlich gemacht.

Zur Ausprägung der dritten phänotypischen Phase, der Bvgⁱ-Phase, kommt es unter submodulierenden Bedingungen, wie z. B. für *B. bronchiseptica* in Anwesenheit von 0,4 bis 1,6 mM Nikotinsäure (Cotter und Miller, 2000). Die Bvgⁱ-Phase zeichnet sich durch eine mittlere Konzentration an phosphoryliertem BvgA aus. Aufgrund dessen kommt es zur Expression der frühen *vag*-Gene (*fhaB*, *bvgAS* und *bvgR*), zur Repression der *vrg*-Gene und zur Aktivierung einiger Bvgⁱ-spezifischer Faktoren (Cotter und Miller, 1997). Hierzu gehört das BipA-Protein (Bvg-intermediate phase protein A), dessen Funktion bislang unklar ist. Es weist jedoch vor allem am N-Terminus Ähnlichkeiten zum Intimin, einem Adhäsin aus enteropathogenen *E. coli* und zum Invasin aus *Yersinia spp.* auf (Stockbauer *et al.*, 2001). In der *bipA*-Promotorregion wurden insgesamt fünf BvgA-Bindestellen identifiziert, die sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts vom Transkriptionsstartpunkt lokalisiert sind und sich in ihrer Affinität zu BvgA stark unterscheiden. Es wird postuliert, dass in der Bvgⁱ-Phase die Transkription von *bipA* über die Bindung von BvgA-P an die hochaffinen Bindestellen im Promotorbereich aktiviert wird. Dagegen ist in der Bvg⁺-Phase die intrazelluläre Konzentration an BvgA-P so hoch, dass durch die zusätzliche Besetzung der niedrigaffinen Bindestellen im offenen Leserahmen von *bipA* dessen Transkription reprimiert wird (Deora *et al.*, 2001; 2002; Mishra und Deora, 2005; Cotter und DiRita, 2000).

Die Rolle der drei phänotypischen Phasen im Infektionszyklus der Bordetellen ist noch ungeklärt. Für eine erfolgreiche Kolonisierung des respiratorischen Trakts ist jedoch sowohl die Aktivierung der *vag*-Gene als auch die Repression der *vrg*-Gene essentiell (Akerley *et al.*, 1995; Merkel *et al.*, 1998b). Durch Versuche mit Mutanten, die in der Bvg⁺-Phase arretiert sind, konnte gezeigt werden, dass diese Phase notwendig und ausreichend für die Etablierung einer Infektion im Tiermodell ist. Somit erscheint die *in vivo*-Relevanz der Bvg⁻-Phase und der Bvgⁱ-Phase fraglich (Martinez de Tejada *et al.*, 1998; Cotter und Miller, 1994). Im Gegensatz zu *B. pertussis* und *B. parapertussis* kann *B. bronchiseptica* auch außerhalb eines Wirtsorganismus, z. B. in Phosphatpuffer oder in Teichwasser kurzzeitig überleben (Porter und Wardlaw, 1993). Dabei haben sich Phasenvarianten von *B. bronchiseptica* als resistenter gegen widrige Umweltbedingungen erwiesen. Man vermutet deshalb, dass die Bvg⁻-Phase bzw. die Expression der *vrg*-Gene für das Überleben im Umweltreservoir eine Rolle spielen (Cotter und Miller, 1997; Banemann *et al.*, 1998; Bock und Gross, 2002). Auch für die Persistenz von *B. bronchiseptica* im Phagosom von Makrophagen scheint die Bvg⁻-Phase von Bedeutung zu sein (Banemann und Gross, 1997). So könnte das BvgAS-System als Sensor dienen, der es den Bakterien ermöglicht, zwischen den verschiedenen Nischen innerhalb und außerhalb des Wirtes zu unterscheiden und entsprechend darauf zu reagieren. Die humanpathogenen Erreger *B. pertussis* und *B. parapertussis* sind möglicherweise aufgrund ihres größeren Virulenzpotentials nicht mehr darauf angewiesen, längere Zeit außerhalb eines Wirtes zu überleben.

Womöglich hat die Ausprägung der Bvg⁻-Phase bei diesen *Bordetella*-Arten an Bedeutung verloren (Bock und Gross, 2001). Tatsächlich konnte bei *B. pertussis* der Verlust und die Inaktivierung einiger *vrg*-Gene von *B. bronchiseptica* festgestellt werden (Schneider *et al.*, 2002). Die Bvg⁺-Phase wird jedoch von allen Vertretern des *B. bronchiseptica*-Clusters ausgeprägt. Diese feinregulierte Genexpression spielt vermutlich bei gewissen Wachstumsbedingungen, z. B. in einem späten Infektionsstadium oder bei der Übertragung auf einen anderen Wirt eine Rolle (Cotter und Miller, 2000; Stockbauer *et al.*, 2001). Vermutlich kann das BvgAS-System auch sehr geringe Temperaturunterschiede innerhalb des Wirtes, z. B. zwischen dem Nasen-Rachenraum und dem unteren Respirationstrakt wahrnehmen, um daraufhin die differentielle Genexpression einzuleiten (Cotter und DiRita, 2000).

3.3 Der *bvgAS*-Genlocus innerhalb der Gattung *Bordetella*

Die BvgAS-Systeme der Mitglieder des *B. bronchiseptica*-Clusters sind nicht nur auf Sequenzebene, sondern auch auf funktioneller Ebene stark konserviert (Martinez de Tejada *et al.*, 1996; McGillivray *et al.*, 1989). Auch die chromosomale Lokalisation der *bvgAS*-Genloci der „klassischen“ Arten ähnelt sich sehr (siehe Abb. 6). An das *bvgAS*-Operon grenzt stromaufwärts das *fhaB*-Gen, welches für das Filamentöse Hämagglutinin kodiert. Stromabwärts vom *bvgAS*-Operon befindet sich der Genlocus für das BvgR-Protein, den Repressor der *vrg*-Gene. Diese beiden den *bvgAS*-Locus flankierenden Gene werden in die zum *bvgAS*-Operon entgegengesetzte Richtung transkribiert.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch die „neuen“ *Bordetella*-Arten *B. avium*, *B. holmesii*, *B. hinzii* und *B. trematum* homologe Gene zu *bvgA* und *bvgS* des *B. bronchiseptica*-Clusters besitzen (Spears *et al.*, 2003; Gerlach *et al.*, 2004), wobei der Konservierungsgrad auf Proteinebene erheblich größer ist als auf DNA-Ebene. Innerhalb dieser neuen Arten stimmen jedoch die *bvgAS*-Nukleotidsequenzen sowie die genomische Anordnung der *bvgAS*-Genloci weitgehend überein. Stromaufwärts vom *bvgA* befindet sich hier ein Leserahmen *orfX*, der in dieselbe Richtung wie das *bvgAS*-Genpaar transkribiert wird. Die Aminosäuresequenz von OrfX weist Ähnlichkeiten zu verschiedenen putativen Response Regulatoren anderer Bakterienarten auf, darunter das Protein PA3947 aus *Pseudomonas aeruginosa* (43 % Identität) sowie VieA aus *Vibrio vulnificus* (31 % Identität). Bei OrfX handelt es sich folglich um ein potentiellies Regulatorprotein. Der DNA-Bereich stromabwärts vom *bvgS* ist bei den „neuen“ Arten noch weitgehend unbekannt. Bislang konnte kein homologes Gen zum *bvgR* der „klassischen“ Arten identifiziert werden (Gerlach *et al.*, 2004; Spears *et al.*, 2003). Die chromosomale Lokalisation der *bvgAS*-Loci der „neuen“ Arten unterscheidet sich also deutlich von der des *B. bronchiseptica*-Clusters, während sie bei *B. avium*, *B. holmesii*, *B. hinzii* und *B. trematum* konserviert ist.

Der Umweltkeim *B. petrii* stellt diesbezüglich jedoch eine Ausnahme dar. Im Rahmen der Sequenzierung und Annotation des *B. petrii*-Genoms konnte vor kurzem ein BvgAS-System in dieser Art identifiziert werden. Dieses unterscheidet sich in Aufbau und chromosomaler Lokalisation deutlich von dem der anderen *Bordetella*-Arten. Dieses BvgAS-System besteht aus zwei BvgS-Homologen, die entgegengesetzt zueinander orientiert sind und das Gen *bvgA* sowie eine zusätzliche *hpt*-Domäne flankieren. Dabei werden *bvgA* und *hpt* in die gleiche Richtung transkribiert wie das stromaufwärts gelegene *bvgS2*-Gen (<https://www.unibielefeld.de/groups/brf/software/gendb>). Verglichen mit dem Konservierungsgrad dieser Gene innerhalb der „klassischen“ und der „neuen“ *Bordetella*-Arten, zeigen die Aminosäuresequenzen des *B. petrii*-BvgAS-Systems insgesamt eine verhältnismäßig geringe Übereinstimmung (50 %-60 %; dagegen z. B. 83 % Ähnlichkeit zwischen *bvgA* aus *B. pertussis* und *B. holmesii*).

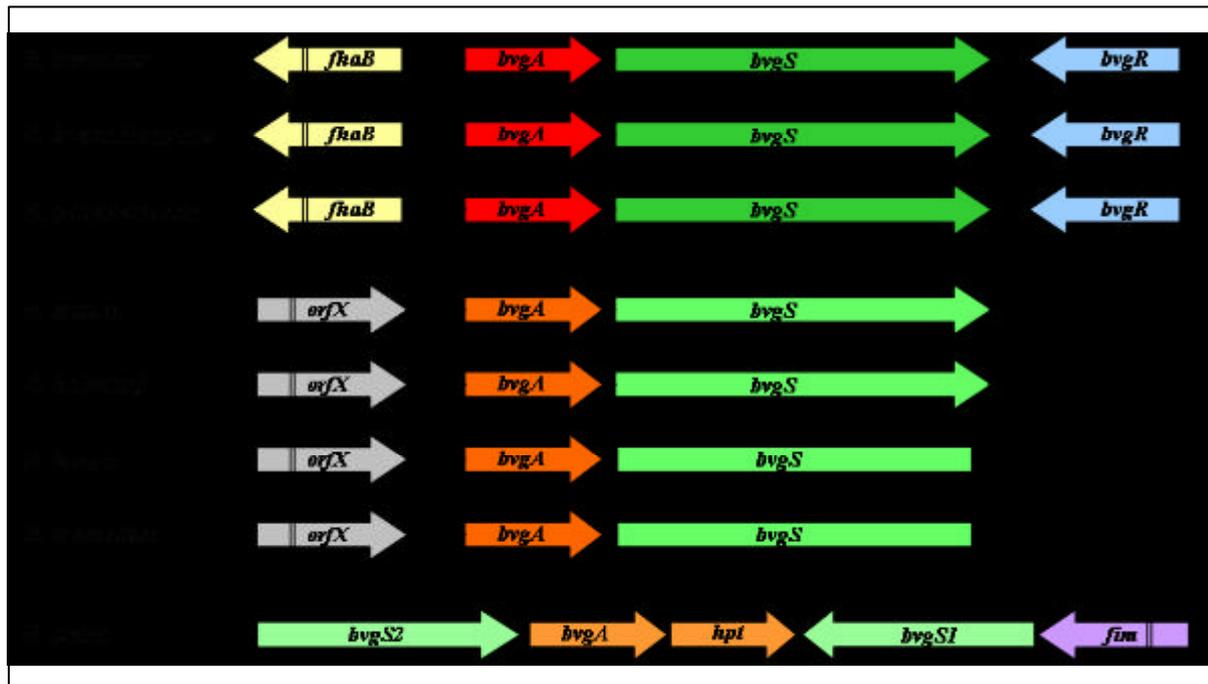


Abb. 6: Genomische Organisation der *bvgAS*-Genloci der verschiedenen *Bordetella*-Arten (modifiziert nach Gerlach *et al.*, 2004).

Die ubiquitäre Verbreitung und Konservierung des *bvgAS*-Locus innerhalb der Gattung *Bordetella* lässt vermuten, dass bereits ein Vorläufer der pathogenen Bordetellen dieses Zwei-Komponentensystem enthielt. Dort könnte das BvgAS-System ursprünglich an der Regulation von „Housekeeping“-Genen beteiligt gewesen sein, um Stoffwechselfunktionen an verschiedene Umweltbedingungen anzupassen. Möglicherweise wurden erworbene Virulenzgene erst nachträglich unter die Kontrolle des BvgAS-Systems gestellt, um Wirtsorganismen effektiv besiedeln zu können (von Wintzingerode *et al.*, 2002; Bock und Gross, 2002).

3.4 Das BvgAS-System aus *B. holmesii*

Vor kurzem konnte das BvgAS-System in *B. holmesii* identifiziert und charakterisiert werden (Gerlach *et al.*, 2004). Die genomische Anordnung dieses Locus wurde auch für die *bvgAS*-Loci der Arten *B. avium*, *B. hinzii* und *B. trematum* beschrieben und unterscheidet sich deutlich von der des *B. bronchiseptica*-Clusters (siehe Abb. 6). Zudem wurde gezeigt, dass das BvgA-Protein aus *B. holmesii* trotz der hohen Sequenzübereinstimmung mit dem Response Regulator aus *B. pertussis* (74,8 % Identität für Receiver-Domäne, 86,1 % für die Output-Domäne) nicht in der Lage ist, dieses Protein *in vivo* funktionell zu ersetzen. Die Vermutung, dass BvgA aus *B. holmesii* unfähig ist, an *bvg*-abhängige Promotoren aus *B. pertussis* zu binden, wurde mittels Gelretardations-Experimenten für den *fhaB*-Promotor und den *bvgA*-Promotor aus *B. pertussis* bestätigt.

Dagegen kann die Histidinkinase BvgS aus *B. holmesii* das BvgA-Protein aus *B. pertussis* phosphorylieren, was darauf hindeutet, dass die cytoplasmatischen Signaldomänen beider Proteine funktionell austauschbar sind. Vermutlich existieren jedoch Unterschiede in der Funktion der N-terminalen Inputdomänen beider BvgS-Proteine, denn die Zugabe von $MgSO_4$ ins Kulturmedium, die bei den „klassischen“ Bordetellen zur Inaktivierung von BvgS führt, beeinflusst die Aktivität der Histidinkinase aus *B. holmesii* kaum (Gerlach *et al.*, 2004).

Wie für das *B. bronchiseptica*-Cluster beschrieben, unterliegt auch das BvgAS-System aus *B. holmesii* einer positiven Autoregulation. Dies konnte durch Primerextension- und Western-blot-Experimente gezeigt werden. Über DNaseI-Footprint-Experimente wurde ein 125 bp großer, vor dem DNaseI-Verdau geschützter Bereich innerhalb des *bvgA*-Promotors aus *B. holmesii* identifiziert. *In silico*-Analysen zeigten, dass dieser DNA-Bereich vier aus je 14 bp bestehende Sequenzmotive enthält, von denen jeweils eine Halbseite weitgehend mit der für BvgA-Bindestellen beschriebenen Konsensussequenz (siehe 3.2) übereinstimmt. Die jeweilige zweite Halbseite weist dagegen keine Ähnlichkeit zu der Konsensussequenz auf. Es wird angenommen, dass die beiden Sequenzmotive, welche sich in der Nähe der RNA-Polymerase-Bindestelle befinden, primäre BvgA-Bindestellen darstellen, während es sich bei den beiden weiter stromaufwärts gelegenen Sequenzmotiven um sekundäre BvgA-Bindestellen handeln könnte (Gerlach *et al.*, 2004).

4 Zielsetzung der Arbeit

Im Gegensatz zu den Vertretern des *B. bronchiseptica*-Clusters sind die „neuen“ *Bordetella*-Arten bislang kaum charakterisiert. Über die Verbreitung und Bedeutung potentieller Virulenzfaktoren bei den „neuen“ *Bordetella*-Arten ist somit erst wenig bekannt.

B. holmesii gewinnt als humanpathogener Erreger zunehmend an Bedeutung, da dieses Bakterium in den letzten Jahren vermehrt für Keuchhusten-ähnliche Erkrankungen beim Menschen verantwortlich gemacht wurde (Yih *et al.*, 1999; Mazengia *et al.*, 2000). Die Identifizierung und Charakterisierung putativer Virulenzfaktoren dieses Organismus ist deshalb von besonderem Interesse. Vor kurzem konnte in *B. holmesii* das BvgAS-Zwei-Komponentensystem entdeckt und funktionell charakterisiert werden (Gerlach *et al.*, 2004). Für eine erfolgreiche Besiedelung des menschlichen Respirationstrakts sind jedoch weitere Virulenzfaktoren nötig. Adhäsine spielen für die Kolonisierung von Wirtsgewebe und Etablierung einer Infektion eine besonders wichtige Rolle. Das Filamentöse Hämagglutinin wird als der wichtigste Adhäsionsfaktor der „klassischen“ *Bordetella*-Arten angesehen, da dessen Expression für eine erfolgreiche Kolonisierung des respiratorischen Trakts unbedingt erforderlich ist (Cotter *et al.*, 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten putative Virulenzfaktoren des Krankheitserregers *B. holmesii* identifiziert und analysiert werden. Im Besonderen sollte untersucht werden, ob *B. holmesii* über einen zum Filamentösen Hämagglutinin homologen Virulenzfaktor verfügt. Dieser sollte sowohl auf molekularer Ebene als auch hinsichtlich seiner Regulation und Funktion charakterisiert werden.

III Material

1 Geräte

Autoklaven	Webeco
Blotkammer	Biotech Fischer
Brutschrank	Heraeus
Elektrophoresekammer	Institutswerkstatt; Biorad
Geigerzähler	Berthold; Herfurth
Geltrockner	Biorad; Hötzel; Uniequip
Heizblöcke	Eppendorf-Thermostat 5320; Liebisch 2099DA
Magnetrührer	Gerhardt; M32 von GLW
Mikrowelle	Siemens
Netzgeräte	Biorad; Consort
PCR-Gerät	T3 Thermocycler Biometra
Pipetten	Gilson; Eppendorf
pH-Meter	Hartenstein; WTW Weilheim
Photometer	Pharmacia Gene Quant II; Ultrospec 2100pro; Klett Summerson
Röntgenfilme	X-ray Retina
Röntgenfilmentwickler	Kodak X-Omat M35
Röntgenfilmkassette	Dr. Goos Suprema
Schüttelinkubator	Infors
Sequenzierer	CEQ 2000
Slotblot-Kammer	BioRad
Speed-Vac	Eppendorf Concentrator 5301
Sterilbänke	NuAireTM; GelAire
Szintillationszähler	Beckmann LS 1800
Taumler	Mini Rocker MR-1, lab 4 you
Ultraschallgerät	Sonifier B-12; Branson Sonic Power Company
UV-Crosslinker	Stratagene UV-Stratalinker 2400
UV-Leuchtkasten	Vilber Courmat
Vakuumpumpe	Neuberger
Videoprinter	Sony UP 860 CE
Vortexer	Heidolph Reax 2000; Mixomat Boskamp GmbH
Waagen	Sartorius; Mettler
Wasserbad-Inkubator	Infors
Zentrifugen:	
Kühlzentrifugen:	Heraeus Megafuge 1.0R; Eppendorf 5417R
Tischzentrifugen:	Sigma 1-14; Hettich Mikroliter Eppendorf 5417R
Ultrazentrifuge:	Beckman L8-55M

2 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung/Genotyp	Referenz
<i>B. pertussis</i> Tohama I <i>Dtox</i>	Wildtypderivat; <i>ptx</i> -Operon durch eine Kan ^R -Kassette ersetzt; Sm ^R , Kan ^R , NaI ^R	Pizza <i>et al.</i> , 1989
<i>B. pertussis</i> 359	TI-Derivat; <i>bvgA</i> ::Tn5; Sm ^R , NaI ^R , Kan ^R	Weiss and Falkow, 1984
<i>B. bronchiseptica</i> 7865	Wildtyp; Humanisolat; Sm ^R , NaI ^R	Arico and Rappuoli, 1987
<i>B. bronchiseptica</i> 7866	Phasenvariante von BB 7865 (241 bp Deletion in <i>bvgS</i>); Sm ^R , NaI ^R	Monack <i>et al.</i> , 1989
<i>B. avium</i> 1852	Wildtyp und Typstamm; wurde aus dem Truthahn isoliert; Sm ^R	Laboratorium Microbiologie, Rijks-universiteit Gent
<i>B. holmesii</i> <i>No1</i>	Blutisolat; stammt aus einem Patienten mit einer Sichelzellenanämie	Njamkepo <i>et al.</i> , 2000
<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. holmesii</i> ATCC51541	Referenzstamm; Blutisolat; stammt aus einem Patienten mit einer schwachen Leukozytose und Cardiomegalie; stellt nat. <i>bvgA</i> -Mutante dar durch A-Insertion im <i>bvgA</i> -Gen	Weyant <i>et al.</i> , 1995
<i>B. holmesii</i> G7702	Blutisolat; stammt aus einem Patienten mit Hodgkin Lymphom; Sm ^R	Weyant <i>et al.</i> , 1995
<i>B. holmesii</i> G7702 <i>bvgA_{BH}</i> :: <i>kan</i>	<i>B. holmesii</i> G7702, <i>bvgA_{BH}</i> -Leserahmen durch eine Kanamycin-Kassette zerstört; Sm ^R , Kan ^R	Gerlach <i>et al.</i> , 2004
<i>B. holmesii</i> G7702 <i>fhaB</i>	<i>B. holmesii</i> G7702, 4650 bp des <i>fhaB</i> -Leserahmen deletiert	diese Arbeit
<i>E. coli</i> DH5α	Wildtypisches Isolat (TypI); für effiziente Transformation; F, F 80/? <i>lacZ</i> M15, ? (<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK ⁺ , mK ⁺), <i>supE44</i> , ?, <i>tfi-1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA1</i>	Bethesda Research Laboratories (BRL)
<i>E. coli</i> SM10	<i>lacY</i> , <i>tonA</i> , <i>recA</i> , <i>Muc</i> ⁺ , <i>thi</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>supE</i> , RP4-2-Tc::Mu, Kan, λpir; zur Konjugation mit <i>Bordetella</i> geeignet	Simon <i>et al.</i> , 1983

3 Plasmide

Vektor/ Plasmid	Beschreibung	Referenz
pSK	Phagemid, ColE1-Replikation, pUC19-Derivat; Amp ^R	Stratagene
pSORTP1	pRTP1-Derivat; Klonierungsvektor; ermöglicht den Allelaustausch in <i>Bordetella</i> -Arten; Gen ^R , Amp ^R	Stibitz <i>et al.</i> , 1986
pKEN2	trägt ein <i>XbaI/HindIII</i> -DNA-Fragment mit dem promotorlosen <i>gfp-mut2</i> Gen	Cormack <i>et al.</i> , 1996
pMMB208	pMMBHE-Derivat; „broad range“ Klonierungsvektor; Cm ^R	Morales <i>et al.</i> , 1991
pSK-FP	pSK enthält ein 312 bp großes <i>BamHI/HindIII</i> -DNA-Fragment aus der <i>fhaB</i> -upstream-Region von <i>B. holmesii</i> G7702	diese Arbeit
pSK- <i>fhaB_{BH}1/2</i>	pSK enthält ein 351 bp großes <i>EcoRI/PstI</i> -DNA-Fragment und ein 342bp großes <i>PstI/BamHI</i> -DNA-Fragment aus dem <i>fhaB</i> -Gen von <i>B. holmesii</i> G7702	diese Arbeit
pSORTP1- <i>fhaB_{BH}1/2</i>	pSORTP1 enthält ein 351 bp großes <i>EcoRI/PstI</i> -DNA-Fragment und ein 342 bp großes <i>PstI/BamHI</i> -DNA-Fragment aus dem <i>fhaB</i> -Gen von <i>B. holmesii</i> G7702	diese Arbeit
pSK- <i>fhaP_{BH}-gfp</i>	pSK enthält ein <i>BamHI/HindIII</i> -DNA-Fragment mit einer Fusion zwischen dem promotorlosen <i>gfp</i> -Gen und 265 bp der <i>fhaB</i> -upstream-Region von <i>B. holmesii</i> G7702; Amp ^R	diese Arbeit
pMMB208- <i>fhaP_{BH}-gfp</i>	pMMB208 enthält ein <i>BamHI/HindIII</i> -DNA-Fragment mit einer Fusion zwischen dem promotorlosen <i>gfp</i> -Gen und 265 bp der <i>fhaB</i> -upstream-Region von <i>B. holmesii</i> G7702; Cm ^R	diese Arbeit
pMMB208- <i>fhaP-gfp1</i>	pMMB208 enthält ein <i>BamHI/HindIII</i> -DNA-Fragment mit einer Fusion zwischen dem promotorlosen <i>gfp</i> -Gen und 426 bp der <i>fhaB</i> -upstream-Region von <i>B. holmesii</i> G7702; Cm ^R	K. Schmitt, Diplomarbeit
pMMB208- <i>fhaP-gfp2</i>	pMMB208 enthält ein <i>BamHI/HindIII</i> -DNA-Fragment mit einer Fusion zwischen dem promotorlosen <i>gfp</i> -Gen und 212 bp der <i>fhaB</i> -upstream-Region von <i>B. holmesii</i> G7702; Cm ^R	K. Schmitt, Diplomarbeit
pMMB208- <i>fhaP-gfp3</i>	pMMB208 enthält ein <i>BamHI/HindIII</i> -DNA-Fragment mit einer Fusion zwischen dem promotorlosen <i>gfp</i> -Gen und 156 bp der <i>fhaB</i> -upstream-Region von <i>B. holmesii</i> G7702; Cm ^R	K. Schmitt, Diplomarbeit
pMMB208- <i>fhaP-gfp4</i>	pMMB208 enthält ein <i>BamHI/HindIII</i> -DNA-Fragment mit einer Fusion zwischen dem promotorlosen <i>gfp</i> -Gen und 134 bp der <i>fhaB</i> -upstream-Region von <i>B. holmesii</i> G7702; Cm ^R	K. Schmitt, Diplomarbeit

pMMB208- <i>fhaP-gfp5</i>	pMMB208 enthält ein <i>BamHI/HindIII</i> -DNA-Fragment mit einer Fusion zwischen dem promotorlosen <i>gfp</i> -Gen und 198 bp der <i>fhaB</i> -upstream-Region von <i>B. holmesii</i> G7702; Cm ^R	K. Schmitt, Diplomarbeit
pMMB208- <i>fhaP-gfp6</i>	pMMB208 enthält ein <i>BamHI/HindIII</i> -DNA-Fragment mit einer Fusion zwischen dem promotorlosen <i>gfp</i> -Gen und 99 bp der <i>fhaB</i> -upstream-Region von <i>B. holmesii</i> G7702; Cm ^R	K. Schmitt, Diplomarbeit

4 Oligonukleotide

Plasmid-spezifische Oligonukleotide:

Name	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Verwendung
T3	5'- AATTAACCCTCACTAAAGGG -3'	PCR-Screening; Sequenzierung
T7	5'- GTAATACGACTCACTATAGGGC -3'	PCR-Screening; Sequenzierung
pMMB208/1	5'- GTTGACAATTAATCATCGGCTCGTAT -3'	PCR-Screening; Sequenzierung
pMMB208/2	5'- CTGATTTAATCTGTATCAGGCTGAA -3'	PCR-Screening; Sequenzierung
pSORT/2	5'- ACCGGACATTTCGCGGAGACCTTCGT -3'	PCR-Screening; Sequenzierung

fhaB_{BH}-spezifische Oligonukleotide:

Name	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Verwendung
FOR4	5'- CCAAGCCCAAGCCCAAGCCCAAGGCC -3'	Identifikation von <i>fhaB_{BH}</i> ; spezifisch für <i>fhaB</i> aus <i>B. pertussis</i>
REV4	5'- ATAGAAGACCCGGTAGTTCT -3'	Identifikation von <i>fhaB_{BH}</i> ; spezifisch für <i>fhaB</i> aus <i>B. pertussis</i>
fhapert10	5'- CTCATCATCGCCAACCCCAACGG -3'	Identifikation von <i>fhaB_{BH}</i> ; spezifisch für <i>fhaB</i> aus <i>B. pertussis</i>
fhapert11	5'- AGCTGGCGCACGCCAGGCCTG -3'	Identifikation von <i>fhaB_{BH}</i> ; spezifisch für <i>fhaB</i> aus <i>B. pertussis</i>
fha5'1	5'- CAAACCATCGGTATTGACGCCACTGCT -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fha5'2	5'- ACCCTGGGTGACGCCAGCGAGACGA -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fha5'3	5'- GCGCGCTGCAGGCCCGGACAGGCCAA -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fha5'4	5'- CGCAAGAGAGCATAACGTAAGCGATATG -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fha5'5	5'- GCCCTTGCGGCGACCCGCCGTCTTGA -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor1	5'- GAGGCAGGCTCGGGCTATGCCATCGA -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor2	5'- GCACGGCAAGGCCATCACCTGATAT -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor3	5'- AGCATCATCCTGTCGCGTGACATCAAG -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor4	5'- GTTTCAAGGTCAGGGCAAGAAGCTGGGT -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor5	5'- CGCAACGAGGGCGTAGCGGTGCTGAT -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor6	5'- GGCGAGACAAGCACTTTCGGTACTA -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor7	5'- CAGCGCGCAACTTACGGTTCAGGAAG -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor8	5'- ACATCGACAACGCCGGCGAGGTCAAA -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor9	5'- CGACATAAACCAGCAGCAGCACAAG -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor10	5'- GCAAGAAAGCACGCGTCTACAACGAG -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor11	5'- GGTGGACTACTACCCTCTTGAGCAA -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor12	5'- TCACGCACACGGGTGGCACCATGCTC -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor13	5'- ATGGGCAGTGGCGACGCTCCGACCGTC -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor14	5'- CAAACAGCTGATGGACAACGGCAGTGAA -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor15	5'- CTTGCCAGGCGCACACAGACAGTT -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor16	5'- TTGCAGCAAGCGGCGGCAAGGTCAT -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor17	5'- GGCGGAGGGGATGTCACCGTGGCCAAT -3'	Genome Walk; Sequenzierung

fhafor18	5' - TCTGGTGGGCGCGAAGGTGTCGATTGA -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor19	5' - CGCGCCTCCGTGGGCCTGGATGCAA -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor20	5' - GAACGCCGATGCGGCTCGAGGCATGTT -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor21	5' - GGCAAGATCAACGCCAGCCAGCTCAA -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor22	5' - AAAATAGACAAAGATGGTGGCAAGGCT -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor23	5' - CCGTCAGAGCAGGCGACAGCCAGATT -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor24	5' - CGGGCGCGCAACTGCAGGGCAAGAC -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor25	5' - GCGACCGACGTCGGCAGCACCATTA -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhafor26	5' - GATCGTCGACAACAGTGGCGACGTGT -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhagw1	5' - ACATCCTTCATGAGGTTGATCTCGGAC -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhagw2	5' - TTCTGTGCGACCTTGACCTGCTCCTGG -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhagw3	5' - GCGAGCAACTGATGAAGCTCGACGGCAA -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhagw4	5' - AGCCTGCCAAGGGGCGGAGCAGAAGTT -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhagw5	5' - TAGGATCGACCTTTGGCGCAGGTTTGG -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhagw6	5' - GGTCCGCTACGGGAGGCGCCACCAATT -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhagw7	5' - ACCGCAGGCACCTCCGGCTCCGGATTC -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhagw8	5' - GGTCGACCCGCTGCGCGTATTGAAC -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhagw9	5' - GGGGTGCTGGTGACCGTTCGCGGTTTC -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhagw10	5' - TGAACCTGGGAGTCGTCGTGAGAGTC -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhagw11	5' - CGGTCTTGATTACCTTGGTCTTGACC -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhagw12	5' - ACTGACCAGATGGGCGCCGTGACAT -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhagw13	5' - GAGCGTCAGGCTCTTGCCTGCTTGTA -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhagw14	5' - CGCAGCCCTGAGCGACACATCACCTTT -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhagw15	5' - TTTGAACTGCGTACCGGCCAGAGTGA -3'	Genome Walk; Sequenzierung
fhaM/EcoRI	5' - ACGCCCTCGGGAATTCCCCTCCAT -3'	Konstruktion BH G7702 <i>fhaB</i> '
fhaM/PstI/1	5' - ACCCGCCGTCTGCAGTTCGGA TAC -3'	Konstruktion BH G7702 <i>fhaB</i> '
fhaM/PstI/2	5' - CAAACAGCTGCAGGACAACGGCAG -3'	Konstruktion BH G7702 <i>fhaB</i> '
fhaM/BamHI	5' - GGCGAGCATGGATCCGCGTTGGG -3'	Konstruktion BH G7702 <i>fhaB</i> '
fha/Chr.1	5' - GTTGCATGAGTCTCTCCTGAGGT -3'	Konstruktion BH G7702 <i>fhaB</i> '
fha/Chr.2	5' - TCGCGCTGGGCAAGCGTGTGAT -3'	Konstruktion BH G7702 <i>fhaB</i> '
fha1for	5' - ACGCCTCTCTATCGTTTGATC -3'	Konstruktion BH G7702 <i>fhaB</i> '
fha2rev	5' - CTGCGCGTGTCAATCGACACCTT -3'	Konstruktion BH G7702 <i>fhaB</i> '
FP1BamHI	5' - CCTCGGAGGATCCCCTCCATCGA -3'	Konstruktion pSK-FP
FP2HindIII	5' - TACTTTGCTGAAGCTTAAACGATAG -3'	Konstruktion pSK-FP
fhaBamHI/gfp1	5' - CCTCGGAGGATCCCCTCCATCGA -3'	Konstruktion pMMB208- <i>fhaP_{BH}-gfp</i> , pMMB208- <i>fhaP-gfp5</i> und Bandshift-Sonde
fhaXbaI1	5' - AACGATCTAGA TCCGCGCTGCCC -3'	Konstruktion pMMB208- <i>fhaP_{BH}-gfp</i> und Bandshift-Sonde
fhaXbaI2	5' - AAAAATCTAGAAGATGATGCAGA -3'	Konstruktion pMMB208- <i>fhaP-gfp5</i>
fhaBamHI/gfp2	5' - ACAACGAGAGGATCCGCAGCAA -3'	Konstruktion pMMB208- <i>fhaP-gfp1</i>
fhaBamHI/gfp3	5' - CAAAAGGGGATCCACGGGGCAA -3'	Konstruktion pMMB208- <i>fhaP-gfp2</i> und Bandshift-Sonde
fhaBamHI/gfp4	5' - AGGGTGCGAGGATCCTGACACA -3'	Konstruktion pMMB208- <i>fhaP-gfp3</i>
fhaBamHI/gfp5	5' - GAGGAGTGGATCCACATGTAAGT -3'	Konstruktion pMMB208- <i>fhaP-gfp4</i>
fhaBamHI/gfp6	5' - AAGTGTGGGATCCGTAGTGTCT -3'	Konstruktion pMMB208- <i>fhaP-gfp6</i> und Bandshift-Sonde
fhaB5NEU	5' - GACTATCCTGACACATTGAGGAG -3'	Konstruktion Bandshift-Sonde
fhaB6NEU	5' - CTACATGTAAGTAGGGCCCTGTG -3'	Konstruktion Bandshift-Sonde
Unspez.3	5' - CAAGATCGCCGCAACCGACTA -3'	Konstruktion Bandshift-Sonde
Unspez.4	5' - TCGGTCTTGATGGTCTGGGACA -3'	Konstruktion Bandshift-Sonde
fhaSlot1	5' - ATGGCACGTTGACCCTGCAAGCCA -3'	Konstruktion Slotblot-Sonde, RT-PCR
fhaSlot2	5' - CCTGATCCTGGGAGATGTTACCGT -3'	Konstruktion Slotblot-Sonde, RT-PCR

Verschiedene Oligonukleotide:

Name	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Verwendung
AP1	5'- GTAATACGACTCACTATAGGGC -3'	Adaptor-Primer für Genome Walking
AP2	5'- ACTATAGGGCACGCGTGGT -3'	Adaptor-Primer für Genome Walking
16Sup	5'- ACTACGCGAAAGCGTGGCTA -3'	Konstruktion Slotblot-Sonde aus 16S-rDNA von <i>B. holmesii</i>
16Sdown	5'- TCCTCCGCATATCTACGCAT -3'	Amplifikation Slotblot-Sonde aus 16S-rDNA von <i>B. holmesii</i>
gfp.PE	5'- CAAGAATTGGGACAACCTCCAGT -3'	Primerextension-Experimente
BvgStest1	5'- ACGGGCAGGCCGATGTCTATCTCGGC -3'	PCR zum Nachweis von <i>B. holmesii</i> DNA
BvgStest2	5'- GCAATCCTGCCAGTTGGCCAATCCGT -3'	PCR zum Nachweis von <i>B. holmesii</i> DNA
av.BvgS1	5'- TGGCGCCGCCCTGATGGGGCAGCATTT -3'	PCR zum Nachweis von <i>B. avium</i> -spezifischer DNA
av.BvgS2	5'- GCCGTCCTTGAGTGCGGATTCCATTTC -3'	PCR zum Nachweis von <i>B. avium</i> -spezifischer DNA
deg1for	5'- GTNGTNTTYAAYAAY -3'	PCR-Amplifikation
deg1rev	5'- NCCRTCDATNGCRTA -3'	PCR-Amplifikation
deg2for	5'- GAYAAAYTAYTTYGAY -3'	PCR-Amplifikation
deg2rev	5'- NCGNCCYTRTRCRTC -3'	PCR-Amplifikation
fhaC.1	5'- GCCGGGCGCGCGCGACCTCAA -3'	PCR-Amplifikation
fhaC.2	5'- CGGCATGGCCGAGAACACCATC -3'	PCR-Amplifikation
fhaC.3	5'- CAGTTCAGCGTGTATGGCGG -3'	PCR-Amplifikation
fhaC.4	5'- GGTTGTATCCGCGCACCGTGT -3'	PCR-Amplifikation
fhaC.5	5'- CGTGGACCTGGACTTCGGCG -3'	PCR-Amplifikation
fhaC.6	5'- TTGTAGATCGCCTGGTCGATATC -3'	PCR-Amplifikation
fhaC.av.S1	5'- AAGGCCATACCGTGTCTTGGAG -3'	Southern Blot
fhaC.av.S2	5'- CCTGCCCTGAATTATCGCGCCCC -3'	Southern Blot
fhaC.av.S3	5'- GGGAGATTTGCTGGGAATTAACGAT -3'	Southern Blot
fhaC.av.S4	5'- CGCTATAGTGCTTGTATTGACCGC -3'	Southern Blot
fimA.1	5'- GTGCGACTTCCGAAGATATCT -3'	PCR-Amplifikation
fimA.2	5'- TACATGACAGAGAATTGCACC -3'	PCR-Amplifikation
fimD.1	5'- TGGCTGTATCCCCAGAAAGGCGAAG -3'	PCR-Amplifikation
fimD.2	5'- TCAGTCATAGTTCAAGGTCACGG -3'	PCR-Amplifikation
prn.1	5'- TACCGGGTCCTGCCGGAGCCC -3'	PCR-Amplifikation
prn.2	5'- AGCCGTAGCGCACCGACG -3'	PCR-Amplifikation
prn.3	5'- ATGAACATGTCTCTGTCACGCATT -3'	PCR-Amplifikation
prn.4	5'- CCGGCTGGGCGGAAGGTCTTCCG -3'	PCR-Amplifikation
prn.5	5'- CCATGGCGCTGGGCGCGCTGGGC -3'	PCR-Amplifikation
prn.6	5'- CCCAACACAGACACCGCCGCGGGCG -3'	PCR-Amplifikation
dnt.1	5'- AGGCGCGCTACGAGATCTACTACCTAC -3'	PCR-Amplifikation
dnt.2	5'- TGTTGTGATTTTCGATTCCACGCGGAT -3'	PCR-Amplifikation
dnt.3	5'- ATGGCGCTTGTAAGGCTACGACGGC -3'	PCR-Amplifikation
dnt.4	5'- AGTCGAGCGGAACGCCGCTCGA -3'	PCR-Amplifikation
dnt.av.S1	5'- TACTCGATCAGGAAACGAGTGAGG -3'	Southern Blot
dnt.av.S2	5'- TCCCTAGGCAATA CTCTTGATTTCTA -3'	Southern Blot

5 Zelllinien

Die Adhäsionsassays wurden unter Verwendung der folgenden permanenten Zelllinie durchgeführt:

A549: humane Lungenkarzinomzellen (DSMZ no.: ACC 107; Giard *et al.*, 1973; Lieber *et al.*, 1976)

Diese Epithelzellen wachsen als Monolayer und haben eine Verdopplungszeit von etwa 30 h.

6 Verbrauchsmaterialien

6.1 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.

6.2 Enzyme

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

6.3 Kits

Nucleobond[®]AX Purification of Plasmids (Macherey&Nagel)

QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen)

QIAquick[®] Nucleotide Removal Kit (Qiagen)

ECL[™] direct nucleic acid labelling and detection Kit (Amersham)

ECL[™] western blotting labelling and detection Kit (Amersham)

RNeasy[®] Midi Kit (Qiagen)

SuperScript[™] II RT (Invitrogen)

Universal GenomeWalker[™] Kit (BD Biosciences Clontech)

T7 Sequencing Kit (usb)

7 Wachstumsmedien und Antibiotika

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

7.1 Wachstumsmedien

LB-Medium (Luria-Bertani):	Select-Peptone	10 g
	Yeast-Extrakt	5 g
	NaCl	10 g
		ad 1 l H ₂ O _{dest.}
LB-Agar:	LB-Medium	1 l
	+ Agar	15 g

Bordet-Gengou-Platten (BG-Platten):	Bordet-Gengou-Agar Basis	30 g
	Glycerin	8 ml
	<hr/>	
		ad 1 l H ₂ O _{dest.}

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

5 x Stainer Scholte Medium (5 x SS):	Natrium-Glutamat	53,5 g
	L-Prolin	1,2 g
	NaCl	12,5 g
	KH ₂ PO ₄	2,5 g
	KCl	1,0 g
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,5 g
	Tris	7,5 g
	<hr/>	
		ad 1 l H ₂ O _{dest.}

Mit HCl auf pH 7,6 einstellen

1 x Stainer Scholte Medium (1 x SS):	CaCl ₂ (10 mg/ml)	2 ml
	5 x SS	200 ml
	100 x SS-Supplement (s.u.)	10 ml
	50 x <i>B. avium</i> -Supplement (s.u.)	20 ml
	Casaminoacids (100 mg/ml)	10 ml
	Cyclodextrin (50 mg/ml)	10 ml
	<hr/>	
		ad 1 l H ₂ O _{dest.}

Casaminoacids wird in H₂O_{dest.}, Cyclodextrin in 62,5 mM NaOH gelöst und sterilfiltriert. 1 x SS ist bei 4-8 °C nur etwa 3 Monate haltbar.

100 x SS-Supplement:	L-Cystin	200 mg
	HCl	0,5 ml
	<hr/>	
		ad 4,5 ml H ₂ O _{dest.}
	FeSO ₄ x H ₂ O	50 mg
	Ascorbinsäure	100 mg
	Nikotinsäure	4 mg
	Glutathion	100 mg
	<hr/>	
		ad 45 ml H ₂ O _{dest.}

Beide Lösungen werden gemischt, sterilfiltriert und bei 4 °C aufbewahrt.

50 x <i>B. avium</i>-Supplement:	2-Ketoglutarat	5 g
	Pyruvat	5 g
	Pantothenat (10 mg/ml)	25 mg
	L-Phenylalanin (20 mg/ml)	50 mg
	<hr/>	
		ad 50 ml H ₂ O _{dest.}

7.2 Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika werden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ oder/und Ethanol gelöst und anschließend sterilfiltriert. Antibiotikallösungen werden bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Antibiotikum	Konz. der Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	100 $\mu\text{g/ml}$
Kanamycin	50 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	50 $\mu\text{g/ml}$
Streptomycin	100 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	100 $\mu\text{g/ml}$
Spectinomycin	100 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	100 $\mu\text{g/ml}$
Chloramphenicol	20 mg/ml in 50 % EtOH	20 $\mu\text{g/ml}$
Gentamycin	15 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	15 $\mu\text{g/ml}$

8 Molekulargewichtsmarker

8.1 Molekulargewichtsmarker für die Agarosegelelektrophorese

Verwendet wurde der DNA-Marker von MBI (Gene Ruler TM 1 kbp-Leiter) mit folgenden Fragmentlängen:

Bande	Fragmentlänge (bp)	Bande	Fragmentlänge (bp)	Bande	Fragmentlänge (bp)
1	10000	6	3500	11	1000
2	8000	7	3000	12	750
3	6000	8	2500	13	500
4	5000	9	2000	14	250
5	4000	10	1500		

8.2 Molekulargewichtsmarker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

BioRad Precision Protein Standard, prestained	Bande	Größe (kDa)
	1	250
	2	150
	3	100
	4	75
	5	50
	6	37
	7	25
	8	15
	9	10

IV Methoden

1 Molekularbiologische und genetische Methoden

1.1 Isolierung von Nukleinsäuren

1.1.1 Isolierung von chromosomaler DNA

Für die Isolierung chromosomaler DNA werden 50 ml einer Bakterien-Übernachtskultur in der logarithmischen Wachstumsphase für 15 min abzentrifugiert (6000 rpm, 4 °C) und in 10 ml Lösung I resuspendiert. Die Zellsuspension wird für mindestens 30 min bei -20 °C eingefroren. Anschließend gibt man 100 µl Lysozym-Lösung (100 mg/ml) zu der gefrorenen Bakterienlösung und inkubiert diese nach dem Auftauen (bei Raumtemperatur) noch etwa 45 min auf Eis. Dann fügt man 6 ml Lösung II und 2 ml Proteinase K (Endkonzentration 1 mg/ml) hinzu und inkubiert 60 min im 50 °C-Wasserbad. Danach wird 2 x mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert, wobei man durch vorsichtiges Schwenken eine Zerstörung der DNA durch Scherkräfte vermeidet. Die Phasentrennung erreicht man jeweils durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 4000 rpm. Die zähflüssige, wässrige Phase wird zur DNA-Fällung mit 0,1 Volumen 5 M NaCl und 2 Vol. eiskaltem 100 % EtOH versetzt. Die durch vorsichtiges Schütteln ausgefallene DNA wird mit einer Pipette entnommen, in 5 ml Lösung III mit 150 µl RNase (10 mg/ml) resuspendiert und ÜN bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird 1 x mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 1 x mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die DNA wird wie oben beschrieben gefällt und schließlich 15 min bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Nach Trocknung wird das DNA-Pellet in einem geeigneten Volumen H₂O_{dest.} aufgenommen und bei 4 °C aufbewahrt.

Lösung I: 50 mM EDTA
50 mM Tris-HCl (pH 8)

Lösung II: 400 mM EDTA
50 mM Tris-HCl (pH 8)
0,5 % SDS

Lösung III: 1 mM EDTA
50 mM Tris-HCl (pH 8)

1.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab mittels Nucleobond-AX-Kit von Macherey & Nagel

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt chromatographisch über eine Anionen-Austauschersäule, welche die Präparation von bis zu 100 µg DNA aus einer 10-100 ml Bakterienkultur ermöglicht. Alle verwendeten Lösungen sowie Säule und Filter werden im Kit gebrauchsfertig geliefert.

Für eine Plasmidisolierung werden 100 ml einer Übernachtskultur in zwei Greiner-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (15 min bei 6000 rpm und 4 °C). Die Bakterienpellets werden insgesamt in 4 ml S1-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Zur alkalischen Lyse werden 4 ml S2-Puffer zugegeben, die Suspension vorsichtig invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Man fügt 4 ml S3-Puffer hinzu und inkubiert die Lösung nach mehrmaligem Invertieren für ca. 5 min auf Eis. Anschließend wird die Suspension über einen Filter von Zelltrümmern und chromosomaler DNA befreit. Der klare plasmidhaltige Überstand wird dann auf eine zuvor mit 2 ml N2-Puffer äquilibrierte Säule gegeben. Die Säule wird 2 x mit je 5 ml N3-Puffer gewaschen, bevor durch Zugabe von 4 ml N5-Puffer die Plasmid-DNA eluiert wird.

Zur Fällung der Plasmid-DNA fügt man 0,7 Vol. Isopropanol zum Eluat und zentrifugiert 30 min bei 14000 rpm und 4 °C. Das DNA-Pellet wird mit 70 % EtOH gewaschen und anschließend in 100 µl sterilem H₂O_{dest.} aufgenommen. Die gelöste Plasmid-DNA wird bei -20 °C aufbewahrt.

1.1.3 Isolierung von RNA

B. holmesii-Stämme werden wegen ihres schlechten Wachstums in Flüssigmedien jeweils auf 3-4 BG-Blutagarplatten ausgestrichen und für 2-3 Tage bei 37 °C kultiviert. Danach werden die Bakterien geerntet, in 1 x PBS resuspendiert und für 10 min bei 6000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das gewonnene Pellet wird in 10 ml heißem (65 °C) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol resuspendiert und mit 6 ml AE-Puffer (65 °C) und 150 µl 25 % SDS (65 °C) versetzt. Anschließend wird die Suspension 20 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert und dann 10 min auf Eis gestellt. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 6000 rpm und 4 °C wird die wässrige Phase abgenommen und mit 670 µl 3M NaAc (pH 4,8) und 6 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol erneut extrahiert. Nach einmaliger Extraktion mit 6 ml reinem Chloroform wird die RNA der wässrigen Phase mit 2,5 Vol. 100 % EtOH über Nacht bei -20 °C gefällt. Am nächsten Tag wird die RNA durch 30-minütige Zentrifugation bei 10000 rpm und 4 °C pelletiert und einmal mit 70 % EtOH gewaschen. Nach dem Trocknen wird das RNA-Pellet in 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen und zur Entfernung von DNA-Resten mit DNaseI behandelt (siehe 1.2).

20 x PBS:	NaCl	160 g	1 x PBS:	20 x PBS	100 ml
	KCl	4 g		H ₂ O _{dest.}	900 ml
	Na ₂ HPO ₄	23 g			
	<u>KH₂PO₄</u>	<u>4 g</u>			
	ad 1 l H ₂ O _{dest.}		AE-Puffer (pH 5,5):	20 mM NaAc	
				1 mM EDTA	

1.2 DNase-Behandlung isolierter RNA mittels Phenol-Extraktion

Folgender Reaktionsansatz wird 60 min bei 25 °C inkubiert:

RNA	100 µl
DNaseI FPLC pure	10 µl
0,5 M MgCl ₂	6 µl
1M Tris-HCl (pH7,5)	20 µl
<u>RNase-Inhibitor</u>	<u>1 µl</u>
	ad 500 µl DEPC-H ₂ O

Anschließend wird der Ansatz zweimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Die obere wässrige Phase wird mit 1/10 Vol. LiCl (10 M) und 2 Vol. 100 % EtOH versetzt und die RNA bei -20 °C für mindestens 30 min gefällt. Nach 25-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C wird das RNA-Pellet einmal mit 70 % EtOH gewaschen und im Anschluss in 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

1.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die photometrische Messung der optischen Dichte ermöglicht somit die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA bzw. RNA. Für eine Konzentrationsbestimmung wird die DNA-Probe 1:50 mit H₂O_{dest.} verdünnt, RNA dagegen entsprechend mit DEPC-H₂O behandelt. Die Extinktion wird photometrisch bei 260 und 280 nm gemessen und die Konzentration anhand der folgenden Formeln berechnet.

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

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

Der Quotient $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ gibt dabei den Reinheitsgrad an und sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen.

1.4 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase in komplementäre ssDNA (cDNA) umgeschrieben. Dabei entspricht die Menge der synthetisierten cDNA-Moleküle der Anzahl der vorhandenen RNA-Moleküle. Zur cDNA-Synthese wird der „SuperScript™ II RT Kit“ von Invitrogen verwendet mit folgendem Reaktionsansatz:

Gesamt-RNA	2-4 μg
Genspezifische Primer (10 μM)	1 μl
dNTP's (10 mM)	1 μl
ad 12 μl DEPC-H ₂ O	

Der Ansatz wird 5 min bei 65 °C inkubiert, danach auf Eis gestellt und mit 4 μl 5 x First Strand-Buffer und 2 μl DTT (0,1 M) versetzt. Nach 2-minütiger Inkubation bei 42 °C wird 1 μl Reverse Transkriptase (200 U/ μl) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 50 min bei 42 °C inkubiert. Schließlich wird der Ansatz zur Inaktivierung des Enzyms für 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die entstandene cDNA kann mittels Standard-PCR amplifiziert werden (siehe 1.4).

1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion stellt ein automatisiertes Verfahren zur Vervielfältigung eines definierten DNA-Abschnitts dar. Die Spezifität der Amplifikationsreaktion beruht auf der Sequenz von zwei Oligonukleotid-Primern, die zu den Endbereichen der zu amplifizierenden DNA komplementär sind und gegenläufig an diese binden. Die automatische Wiederholung von DNA-Denaturierung (bei 94 °C), Primer-Hybridisierung (bei einer Temperatur, die von den verwendeten Primern abhängig ist) und Primer-Elongation (bei 72 °C) ermöglicht die exponentielle Vermehrung des DNA-Fragments.

Die Schmelztemperaturen der Oligonukleotide lassen sich anhand folgender Formel näherungsweise bestimmen:

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

Ein Standard-PCR-Ansatz enthält:

10 x PCR-Puffer	5,0 μl
dNTP's (20 mM)	0,5 μl
Primer I (100 μM)	0,5 μl
Primer II (100 μM)	0,5 μl
Taq-Polymerase (5 U/ μl)	0,1 μl
Template-DNA (10-500 ng/ μl)	2,0 μl
ad 50 μl H ₂ O _{dest.}	

Die PCR wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

	first step delay	3 min 94 °C
<u>30 Zyklen:</u>	Denaturierung	1 min 94 °C
	Annealing	40 s 50-65 °C
	Elongation	1min 72 °C (1 kb/min)
	last step delay	3 min 72 °C

Die Elongationszeiten können je nach Größe des zu erwartenden PCR-Produkts variiert werden. Im Allgemeinen synthetisiert die Taq-Polymerase 1 kb in einer Minute. Zur Überprüfung der PCR-Reaktion werden im Anschluss jeweils 10-20 µl davon auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 1.6). Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgt mit Hilfe der QIAquick-Säulen (siehe 1.7).

PCR mit der Pfu-DNA-Polymerase (Promega)

Die aus *Pyrococcus furiosus* DSM3638 isolierte Pfu-DNA-Polymerase katalysiert ebenfalls eine DNA-abhängige Polymerisation von Nukleotiden in 5'-3'-Richtung. Im Gegensatz zur Taq-Polymerase jedoch besitzt die Pfu-Polymerase zusätzlich eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität („proofreading activity“). Mögliche fehlgepaarte Basen werden somit wieder entfernt und das richtige Nukleotid eingefügt. Die Verwendung von „proofreading Polymerasen“ ermöglicht also eine genauere Amplifikation von DNA-Fragmenten. Beispielsweise kann so das Auftreten von unerwünschten Stopcodons im PCR-Produkt vermieden werden. Aufgrund dieser zusätzlichen Aktivität benötigen solche Polymerasen in den meisten Fällen verhältnismäßig lange Elongationszeiten für die Synthese eines PCR-Produktes.

Ein Pfu-PCR-Ansatz enthält:

10 x Pfu-Puffer	5,0 µl
dNTP's (20 mM)	0,5 µl
Primer I (10 µM)	1,0 µl
Primer II (10 µM)	1,0 µl
Pfu-Polymerase (3 U/µl)	0,2 µl
Template-DNA (10-100 ng/µl)	1,0 µl
	ad 50 µl H ₂ O _{dest.}

Die PCR wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

	first step delay	3 min 95 °C
<u>30 Zyklen:</u>	Denaturierung	1 min 95 °C
	Annealing	40 s 50-68 °C
	Elongation	2-6 min 72 °C (500 bp/min)
	last step delay	10 min 72 °C

1.6 Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente lassen sich aufgrund ihrer elektrischen Ladung mit Hilfe der Gelelektrophorese in Abhängigkeit von ihrer Größe auftrennen. Ein DNA-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-Fragmenten mit einer Länge von 400 bis 1000 bp. Um DNA-Moleküle sichtbar zu machen, wird dem Gel der Farbstoff Ethidiumbromid zugesetzt, welcher in Nukleinsäuren interkaliert. Unter einer UV-Lampe lassen sich so fluoreszierende DNA-Moleküle in Form von Banden detektieren.

Für die Herstellung eines 1%igen Agarosegels werden 150 ml TBE-Puffer mit 1,5 g Agarose aufgekocht, bis diese vollständig gelöst ist. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wird Ethidiumbromid (Endkonzentration 3 µg/µl) zugegeben, die Gellösung in einen Gelschlitten gegossen und ein Gelkamm eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wird der Schlitten in einer Gelkammer mit 1 x TBE-Laufpuffer bedeckt. Die DNA-Proben werden mit 1/10 Vol. Probenpuffer versetzt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wird ein Standard (1 kb Leiter) mit aufgetragen, dessen Bandenmuster und zugehörige Längen bekannt sind. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 150 V für etwa 40 min. Anschließend können die DNA-Banden unter einer UV-Lampe fotografiert werden.

10 x TBE-Puffer:	Tris-HCl	890 mM	10 x Probenpuffer:	Bromphenoblau	0,2 %
	Borsäure	890 mM		EDTA	0,2M
	EDTA	2 mM		Glycerin	50,0 %

1.7 Reinigung von DNA-Fragmenten

1.7.1 Reinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte mit einer Größe zwischen 100 bp und 10 kb können mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) aufgereinigt werden. Man gibt 5 Vol. PB-Puffer zum PCR-Ansatz und lädt alles auf eine QIAquick-Säule. Diese zentrifugiert man 1 min bei 14.000 rpm, verwirft den Durchfluss und wäscht die Säule mit 750 µl PE-Puffer. Der Durchfluss wird wiederum verworfen und ein anschließender Zentrifugationsschritt in leerem Zustand trocknet die Säule vollständig. Die Elution der DNA von der Säulenmatrix erfolgt mit 30-50 µl H₂O_{dest.} Das Eluat wird durch Zentrifugation aufgefangen und bei -20 °C gelagert.

1.7.2 Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Dieses Verfahren ermöglicht die Elution von DNA-Molekülen mit einer Größe von 70 bp-10 kb. Das entsprechende DNA-Fragment wird unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten, gewogen und mit 3 Vol. QG-Puffer versetzt. Man inkubiert den Ansatz solange bei 50 °C, bis das Gelstück vollständig aufgelöst ist (ca. 10 min) und gibt anschließend 1 Vol. Isopropanol hinzu. Nach kurzem Vortexen wird der Ansatz auf eine QIAquick-Säule geladen, diese 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zum Waschen werden 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben und diese für eine weitere Minute zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wird die Säule zum Trocknen der Säulenmatrix für 1 min in leerem Zustand zentrifugiert. Die Elution der DNA erfolgt durch Zugabe von 30-50 µl H₂O_{dest.} und 1-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm. Das Eluat wird in einem Eppendorf-Tube aufgefangen und bei -20 °C aufbewahrt.

1.8 Enzymatische Modifikation von DNA

1.8.1 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen sind Bestandteile von Restriktions-Modifikations-Systemen in Bakterien, die diese vor der Aufnahme artfremder DNA schützen. Die hier verwendeten Typ II-Restriktionsendonukleasen erkennen jeweils eine spezifische Nukleotidfolge im DNA-Doppelstrang und erzeugen dort eine definierte Schnittstelle. Je nach Enzym werden verschiedene Pufferbedingungen (1 x oder 2 x) und entsprechende Temperaturen (37 °C oder 30 °C) benötigt.

Bei optimalen Reaktionsbedingungen spaltet ein Unit Enzym 1 μg DNA in einer Stunde. Die eingesetzte Enzymmenge sollte 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da die Reaktion sonst durch zu hohe Glycerinkonzentrationen inhibiert werden könnte.

Standardansatz:

Plamid-DNA bzw. PCR-Fragment	1-2 μg
10 x Puffer	2/4 μl
Restriktionsenzym (10 U/ μl)	1 μl
<hr/>	
	ad 20 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

Der Verdau inkubiert 1 bis 2 h bei gewöhnlich 37 °C. Plasmid-DNA kann zur Kontrolle des Verdaus anschließend in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt werden.

1.8.2 Klenow-Behandlung von DNA

Das Klenow-Enzym ist das große Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli*. Es besitzt sowohl eine 5'-3'-Polymeraseaktivität als auch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Dies ist von Nutzen, wenn man beispielsweise in einen „sticky end“ geschnittenen Vektor ein Insert mit glatten Enden („blunt end“) einfügen möchte. 3'-überhängende Enden können abgebaut, 5'-überhängende Ende dagegen aufgefüllt werden.

Standardansatz:

Verdaute DNA	0,1- 4 μg
dNTP's (0,5 mM)	1 μl
10 x Filling-In Buffer	2 μl
Klenow	1-5 U
<hr/>	
	ad 20 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

Der Ansatz wird für 15 min bei 30 °C inkubiert und die Reaktion anschließend durch 10-minütiges Erhitzen auf 75 °C gestoppt. Die so behandelte DNA kann nach Aufreinigung (siehe 1.7.1) für eine „blunt end-Ligation“ (siehe 1.8.3) verwendet werden.

1.8.3 Ligation von DNA-Fragmenten

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. Meist werden Ligasen verwendet um ein spezielles DNA-Fragment, das sogenannte Insert, an einer bestimmten Stelle eines Klonierungsvektors einzufügen. Der Vektor und das zu klonierende DNA-Fragment werden in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:6 eingesetzt. Die Gesamt-DNA-Menge sollte zwischen 0,1 μg und 1,0 μg betragen.

Standardansatz:

geschnittener Vektor	0,05 μg
geschnittenes Insert	0,25 μg
10 x T4-DNA-Ligase-Puffer	2,0 μl
T4-DNA-Ligase (1 U/ μl)	1,0 μl
<hr/>	
	ad 20 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

Der Ligationsansatz wird üblicherweise über Nacht bei 16 °C inkubiert und kann am nächsten Tag direkt für eine Transformation in *E. coli* eingesetzt werden (siehe 1.9).

1.9 Transformation von DNA

1.9.1 Herstellung von CaCl₂-kompetenten *E. coli*-Zellen

100 ml LB-Medium werden mit 1 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und die Kultur bei 37°C inkubiert, bis sie eine optische Dichte (OD_{600nm}) von etwa 0,5 erreicht hat. Die Kultur wird für 15 min auf Eis gestellt und anschließend für 10 min zentrifugiert (6000 rpm, 4 °C). Das Bakterienpellet wird in 10 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (0,1 M) resuspendiert und dann 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren 10-minütigen Zentrifugation (4000 rpm, 4 °C) wird das Pellet in 5 ml eiskalter CaCl₂-Lösung mit 20 % Glycerin resuspendiert und in Aliquots von 250 µl bei -80 °C gelagert.

1.9.2 Transformation

Zu 100 µl CaCl₂-kompetenten Zellen werden 0,1-1 µg Plasmid-DNA bzw. 20 µl Ligationsansatz gegeben. Die Suspension wird für 30-60 min auf Eis inkubiert und anschließend erfolgt ein Hitzeschock für ca. 1 min bei 42 °C. Nach 2-minütiger Inkubation auf Eis werden 800 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Danach werden die Zellen pelletiert (3 min, 10.000 rpm), in 100 µl LB-Medium aufgenommen und auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

1.10 Konjugation und Allelaustausch

Die Übertragung von Plasmid-DNA in *Bordetella*-Stämme erfolgt mit hoher Effizienz durch Konjugation, d.h. ein Donorstamm überträgt genetisches Material durch direkten Zellkontakt auf den Rezipientenstamm. Der Donor-Stamm *E. coli* SM10 trägt eine chromosomale Integration des IncP-artigen Plasmids pRP4 mit verschiedenen Transferfunktionen.

1.10.1 Allelaustausch

Mit Hilfe eines speziell für die Gattung *Bordetella* entwickelten Klonierungsvektors (Stibitz *et al.*, 1986) kann man ortsspezifische Mutagenesen im *Bordetella*-Genom durchführen. 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 enthält ein Gen für eine Ampicillin-Resistenz, ein oriT-Element („origin for conjugative transfer“) und ein Gen für das ribosomale *E. coli* Protein S12. Dieses Protein wird in *Bordetellen* effektiv exprimiert und in die Ribosomen eingebaut. Somit werden streptomycinresistente Stämme in Gegenwart dieses Locus streptomycinsensitiv. Sowohl pRTP1 als auch pSORTP1 können in *Bordetella* nicht replizieren.

Im ersten Schritt werden auf ampicillin- bzw. gentamycinhaltigen BG-Blutplatten nur solche Bakterien selektiert, die den Vektor aufgrund eines Rekombinationsvorgangs ins Chromosom integriert haben. Durch Zugabe eines geeigneten Antibiotikums, gegen das der *Bordetella*-Stamm resistent ist, wird das Wachstum des *E.coli*-Donorstammes unterdrückt. Enthält der *Bordetella*-Rezipient das zur Streptomycinresistenz führende Gen S12, so erhält man - eventuell nach mehrmaligem Überstreichen des Stammes auf Platten ohne Antibiotikum - durch den zweiten Selektionsschritt auf Agarplatten mit Streptomycin all jene *Bordetellen*, die den Vektor pSORTP1 durch einen zweiten Rekombinationsvorgang innerhalb der klonierten Sequenz wieder verloren haben. Enthält das durch dieses „double crossover“ eingeführte Allel eine Deletion des ursprünglichen Gens, so sollte dies unter Verwendung von geeigneten Oligonukleotiden in einer PCR-Reaktion (siehe 1.5) überprüft werden.

1.10.2 Durchführung der Konjugation

Die jeweiligen *Bordetella*-Stämme werden 2-3 Tage, der entsprechende *E. coli*-Donorstamm einen Tag vor der Konjugation großflächig ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden auf einer BG-Blutagarplatte ohne Antibiotikum eine Impföse voll Bordetellen und etwa 1/5 der Menge *E. coli* auf einem etwa 4 cm großen Areal gut vermischt und zur Konjugation für 5 h bei 37 °C inkubiert. Danach wird das Bakteriengemisch geerntet, in 1 x PBS resuspendiert und eine Verdünnungsreihe bis 10^{-3} hergestellt. Jeweils 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-1} - 10^{-3} werden zur Züchtung der Konjuganden auf Selektionsplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Einzelkolonien können nach 3-6 Tagen isoliert und vermehrt oder aber zur Durchführung eines Allelaustausches zur weiteren Selektion eingesetzt werden. Die Aufnahme des Plasmids durch den Rezipienten wird mittels PCR (siehe 1.5) kontrolliert.

1.11 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung von PCR-Produkten bzw. Plasmiden wird der „CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit“ verwendet. Die Analyse der Sequenzen erfolgt durch den automatischen Sequenzierer CEQ 2000 (Beckmann Coulter), dessen Funktionsweise auf der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger basiert. Die zu sequenzierende DNA-Probe wird zunächst mittels Sequenzier-PCR amplifiziert. Hierfür wird Plasmid-DNA zuvor für 3 min bei 96 °C denaturiert. Anschließend werden folgende Reagenzien pro PCR-Ansatz gemischt:

Template-DNA	60-90 ng
Primer (0,05 µg/µl)	1,5 µl
Quick Start Mix (QSM)	4,5 µl
<hr/>	
	ad 20 µl H ₂ O _{dest.}

Die Sequenzier-PCR wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

<u>30 Zyklen:</u>	Denaturierung	20 s 96 °C
	Hybridisierung der Primer	20 s 50 °C
	Primer-Elongation	4 min 60 °C

Zur Fällung der DNA wird der PCR-Ansatz anschließend in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 5 µl Stoplösung sowie 60 µl reinem Ethanol versetzt. Nach gründlichem Mischen wird der Ansatz für 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet zweimal mit 200 µl 70 % EtOH gewaschen. Danach wird das Pellet in der SpeedVac für etwa 10 min getrocknet und in 40 µl SLS-Lösung aufgenommen. Dieser Ansatz kann nun bei 4 °C gelagert werden bis die automatische Sequenzanalyse erfolgt.

Stop-Lösung: 2 Vol 3 M NaOAc (pH 5,2)
2 Vol 100 mM EDTA
1 Vol 20 mg/ml Glykogen

QSM und SLS: Lösungen des DTCS Quick Start Kits

1.12 Southernblot

Unter einem Southernblot versteht man den Transfer von elektrophoretisch aufgetrennter DNA auf eine Nylon- oder Nitrocellulosemembran und deren anschließende Hybridisierung mit einer spezifischen DNA-Sonde. Mittels dieser Technik kann ein bakterielles Genom auf die Anwesenheit definierter DNA-Sequenzen geprüft werden.

Gelelektrophorese und Vorbereitung des Gels

Mit Hilfe eines geeigneten Restriktionsenzym (5 U/ μ g) werden etwa 5-10 μ g chromosomale DNA über Nacht bei 37 °C gespalten. Am nächsten Tag wird der Verdau in einem 1%igen TBE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 1.6) bis die Bromphenolblaufront des Auftragspuffers 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. Das Gel wird anschließend für 10 min in Depurinierungslösung geschwenkt, bis das Bromphenolblau nach gelb umschlägt. Nach kurzem Spülen mit $H_2O_{dest.}$ wird das Gel nun für 2 x 15 min in Denaturierungslösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wird das Gel wiederum kurz in $H_2O_{dest.}$ gespült und für weitere 30 min in Neutralisierungslösung geschwenkt.

Transfer der DNA auf eine Hybond N⁺-Nylonmembran

Für den Blot wird in eine mit 20 x SSC gefüllte Schale ein kleines Tischchen (z. B. ein Gelschlitten) gegeben, auf das man als Brücke ein Whatman-MM3-Papier legt. Dieses muss mit beiden Enden in die Flüssigkeit eintauchen. Das vorbehandelte Gel wird auf das Whatman-Papier gelegt und in angegebener Reihenfolge schließen sich folgende Schichten an, die alle auf die Größe des Gels zugeschnitten werden: die Nylonmembran (zuvor mit 20 x SSC befeuchten), 7-10 Schichten Whatman-Papier (die ersten drei mit 20 x SSC befeuchten), ein ca. 5 cm hoher Stapel Küchentücher und zum Beschweren des „Turms“ ein Gewicht von ca. 500 g. Der Transfer erfolgt über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag werden die Geltaschen markiert und die Membran wird kurz in 2 x SSC gewaschen. Zur Fixierung der DNA auf der Membran wird diese 2 min mit UV-Licht behandelt.

Markierung der Sonde

Die DNA-Sonde wird mit Hilfe des „ECL direct nucleic acid labelling and detection Kit“ (Amersham) wie folgt markiert: 200 ng DNA werden mit $H_2O_{dest.}$ auf ein Endvolumen von 20 μ l verdünnt und 5 min bei 100 °C inkubiert. Nach weiteren 5 min auf Eis wird die Probe kurz abzentrifugiert, mit 20 μ l DNA-Labelling-Reagenz versetzt und nach gründlichem Mischen 1 min bei RT inkubiert. Anschließend folgt die Zugabe von 20 μ l Glutaraldehyd und nach erneutem Mischen und kurzem 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 42 °C-warmem Hybridisierungspuffer überführt und für 15-60 min in einem 42 °C-Wasserbad unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Membran muss dabei vollständig mit Puffer bedeckt sein. Anschließend wird die markierte Sonde hinzupipettiert und der Blot über Nacht bei 42 °C unter leichtem Schütteln hybridisiert.

Waschen und Entwicklung der Membran

Am nächsten Tag wird die Membran für 2 x 20 min bei 42 °C in Primärwaschpuffer (vorgewärmt) gewaschen. Daran schließen sich zwei Waschgänge von jeweils 5 min in 2 x SSC bei Raumtemperatur an. Die Entwicklungsreagenzien I und II (ECL-Kit) werden dann in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und für 1 min auf die Membran gegeben. Diese wird anschließend in Frischhaltefolie gewickelt und die Signale durch Exposition eines Röntgenfilms detektiert.

20 x SSC (pH 7,0):	3,0 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
Hybridisierungspuffer:	0,5 M NaCl 5 % Blockreagenz (ECL) ad 100 ml Hybridisierungspuffer (ECL)

Der Hybridisierungspuffer wird nach Ansetzen 1 h bei RT und danach 1 h bei 42 °C gerührt und in Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

Primärwaschpuffer:	6 M Harnstoff 0,4 % SDS 0,5 x SSC
---------------------------	---

1.13 RNA-Slotblot

Unter einem RNA-Slotblot versteht man den Transfer von isolierter Gesamt-RNA auf eine Nylonmembran und deren anschließende Hybridisierung mit einer spezifischen DNA-Sonde. Mittels dieser Technik können definierte RNA-Transkripte nachgewiesen werden. Zudem kann die Transkriptionsstärke einer bestimmten RNA innerhalb verschiedener Stämme verglichen werden.

Transfer der RNA auf eine Hybond N⁺ Nylonmembran

Die Nylonmembran Hybond N⁺ wird zunächst auf 7,5 x 11 cm zugeschnitten, in DEPC-H₂O kurz befeuchtet und dann bis zu 1h in 20 x SSC inkubiert. In die mit 0,1 N NaOH und DEPC-H₂O gespülte Slotblot-Kammer werden nun zwei mit 20 x SSC befeuchtete dicke Whatman-Papiere eingelegt. Auf diese wiederum wird luftblasenfrei die Nylonmembran gelegt. Nach Aufsetzen des Deckels wird die Kammer fest verschlossen und an eine Vakuumpumpe angeschlossen. Die einzelnen Öffnungen der Kammer, die sogenannten Slots, werden je zweimal mit 500 µl 10 x SSC befüllt und durch vorsichtiges Anlegen von Vakuum wieder entleert, indem die Lösungen langsam durch die Nylonmembran gesogen werden. Nun werden je 20 µg isolierte RNA in 20 µl DEPC-H₂O verdünnt, mit 60 µl RNA-Denaturierungslösung versetzt und 5 min bei 65 °C inkubiert. Danach werden jeweils 80 µl 20 x SSC dazugegeben und die RNA-Proben nach kurzem Abzentrifugieren in die Slots geladen. Durch das Anlegen von Vakuum wird die RNA auf die Membran aufgetragen. Dann werden die Slots noch zweimal mit je 500 µl 10 x SSC gewaschen und die Vakuumpumpe zur Trocknung der Membran weitere 5 min angelassen. Nach Öffnen der Kammer wird die Membran zur Orientierung markiert und zur Fixierung der RNA im UV-Crosslinker bestrahlt. Die Markierung der spezifischen DNA-Sonde, die Vorhybridisierung und Hybridisierung der Membran, sowie die Waschvorgänge und Entwicklung der Membran wird wie unter 1.12 beschrieben durchgeführt.

20 x SSC (pH 7,0):	3,0 M NaCl 0,3 M Trinatriumcitrat
Denaturierungspuffer:	500 µl Formamid 160 µl Formaldehyd 100 µl 10 x MOPS-Puffer

10 x MOPS-Puffer: 0,20 M MOPS (3-(N-morpholino) propanesulphonic acid)
0,05 M NaAc
0,01 M EDTA

Hybridisierungspuffer: 0,5 M NaCl
5 % Blockreagenz (ECL)
ad 100 ml Hybridisierungspuffer (ECL)

Der Hybridisierungspuffer wird nach Ansetzen 1 h bei RT und danach 1 h bei 42 °C gerührt und in Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

Primärwaschpuffer: 6 M Harnstoff
0,4 % SDS
0,5 x SSC

1.14 Genome Walk

Mittels der Methode des „Genome Walk“ können unbekannte DNA-Sequenzen, die benachbart zu einer bekannten Sequenz liegen, identifiziert werden. Hierfür wurde der „Universal GenomeWalker™ Kit“ (Biosciences) verwendet.

Verdau der chromosomalen DNA

Zunächst werden etwa 3-5 µg chromosomale DNA in mehreren 100 µl-Ansätzen jeweils mit einem geeigneten Restriktionsenzym (5 U/µg) über Nacht bei 37 °C verdaut. Für das GC-reiche Genom von *B. holmesii* eignen sich vor allem die Enzyme *PstI*, *HindIII*, *BglI*, *DdeI*, *PvuI*, *SalI* und *SphI*. Zur Kontrolle werden am nächsten Tag jeweils 10 µl der Spaltansätze in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Reinigung der gespaltenen DNA

Zur Aufreinigung wird die verdaute DNA zunächst mit 90 µl Phenol und anschließend mit 90 µl Chloroform extrahiert. Die obere, wässrige Phase wird dann mit 2 Vol. reinem EtOH, 1/10 Vol. NaOAc (pH 4,5) und 20 µg Glykogen versetzt und die gefällte DNA durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm pelletiert. Das DNA-Pellet wird einmal mit 80%igem EtOH gewaschen (5 min, 14.000 rpm), getrocknet und in einem geeigneten Volumen H₂O_{dest.} (15-20 µl) aufgenommen. Wurde die DNA mit einem „sticky end“-Enzym gespalten, so muss nun eine Klenow-Behandlung der gereinigten DNA eingeschoben werden (siehe 1.8.2). Danach werden die DNA-Fragmente nochmals nach der beschriebenen Methode aufgereinigt.

Ligation der genomischen DNA mit dem „GenomeWalker Adaptor“

An die glatten Enden der DNA-Stücke wird nun der „GenomeWalker Adaptor“ im folgenden Reaktionsansatz über Nacht bei 16 °C ligiert:

gereinigte DNA	4,8 µl
Adaptor (25 µM)	1,9 µl
10 x Ligationspuffer	0,8 µl
T4-Ligase (1U/µl)	0,5 µl

Am nächsten Tag wird die Reaktion durch eine 5-minütige Inkubation bei 70 °C gestoppt. Zusätzlich wird das Volumen durch die Zugabe von 32 µl H₂O_{dest.} auf insgesamt 40 µl aufgestockt.

„Genome Walk“ mittels PCR

Bei diesem Schritt kommt es nun zur PCR-Amplifikation unbekannter DNA-Sequenzen durch die Kombination eines „Adapter-spezifischen“ (AP1 bzw. AP2) mit einem genspezifischen Oligonukleotid. Dabei muss das selbst gewählte Oligonukleotid am Ende der noch bekannten Gen- bzw. DNA-Sequenz binden, damit es durch die PCR-Reaktion in die gewünschte, unbekannte Sequenz hinein verlängert wird. Zudem werden in der Anleitung des „GenomeWalker Kits“ weitere Kriterien bezüglich des „Primer-Designs“ angegeben. So sollte der genspezifische Primer aus 26-30 Nukleotiden bestehen und einen GC-Gehalt von 40-60 % haben. Zusätzlich sollen die letzten sechs Positionen am 3'-Ende des Primer nicht mehr als drei G's oder C's enthalten.

Die PCR-Reaktionen werden mit Hilfe der Pfu-Polymerase wie unter 1.5 beschrieben durchgeführt. Als Template wird jeweils 1 µl der „Adapter-ligierten“ DNA eingesetzt. In der 1. PCR wird der Adapter-Primer AP1 mit einem genspezifischen Primer (GSP1) kombiniert. Um die Spezifität der PCR-Produkte zu erhöhen, wird auf die 1. PCR folgend eine 2. PCR durchgeführt, in welcher die 1:10-verdünnten Produkte aus der 1. PCR-Reaktion als Template dienen. Zudem wird hierfür ein zweiter genspezifischer Primer (GSP2) benötigt, der nun mit dem Adaptor-Primer AP2 kombiniert wird.

PCR-Bedingungen:

1. PCR:	<u>7 Zyklen:</u>	94 °C 40 s	2. PCR:	<u>5 Zyklen:</u>	94 °C 40 s
		72 °C 4 min			72 °C 4 min
	<u>32 Zyklen:</u>	94 °C 40 s		<u>25 Zyklen:</u>	94 °C 40 s
		67 °C 4 min			67 °C 4 min

Die PCR-Produkte werden jeweils im Agarosegel analysiert (siehe 1.6). Besonders deutliche Produkte (= klare, dicke Banden) werden aufgereinigt (siehe 1.7) und sequenziert (siehe 1.11).

1.15 Primerextension

Mit Hilfe der Primerextension-Analyse kann man sowohl den Transkriptionsstartpunkt eines Gens bestimmen als auch die Transkriptionsstärke eines Gens bei verschiedenen Bakterienstämmen miteinander vergleichen. Dabei wird ein am 5'-Ende radioaktiv markiertes Oligonukleotid an das entsprechende mRNA-Molekül hybridisiert und durch reverse Transkription (siehe 1.4) bis zum 5'-Ende des jeweiligen Transkripts verlängert. Durch Gelelektrophorese der entstandenen cDNA zusammen mit dem Sequenzierungsansatz eines Plasmids, in das die zu untersuchende Promotorregion und das 5'-Ende des interessierenden Gens kloniert wurde, kann der Transkriptionsstartpunkt des entsprechenden Gens exakt bestimmt werden. Die Sequenzierungsreaktion des Plasmids und die reverse Transkription der mRNA werden mit demselben Primer durchgeführt.

1.15.1 5'-Markierung des Oligonukleotid-Primers

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

Oligonukleotid-Primer (5 pmol/µl)	1 µl
(γ - ^{32}P) ATP (5000 Ci/mmol)	3 µl
10 x Kinase-Puffer (MBI)	1 µl
H ₂ O _{dest.}	4 µl
T4-Polynukleotid-Kinase (30 U/µl; MBI)	1 µl

Nach einer Inkubation des Ansatzes für 30 min bei 37 °C wird dieser zur Abtrennung des nicht-eingebauten ($\gamma^{32}\text{P}$) ATP mit Hilfe des „QIAquick Nucleotide Removal Kits“ von QIAGEN aufgereinigt. Hierfür wird die Markierungsreaktion mit 10 Vol. PN-Puffer versetzt und das Reaktionsgemisch auf eine QIAquick-spin-Säule aufgetragen. Zur Bindung des markierten Oligonukleotids an die Säulenmatrix wird 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säule wird anschließend zweimal mit je 500 μl PE-Puffer gewaschen und zum Trocknen der Matrix einmal in leerem Zustand für 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Durch Zugabe von 50 μl DEPC- H_2O und anschließender Zentrifugation (1 min, 14.000 rpm) wird das markierte Oligonukleotid schließlich in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eluiert.

1.15.2 Bestimmung der spezifischen Aktivität

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität des markierten Oligonukleotid-Primers werden 2 μl davon auf einen Glasfaserfilter (GF/C-Filter, Whatman) pipettiert und der Filter in ein Röhrchen mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Roth) gegeben. Die Aktivität der DNA wird in einem Szintillationszähler gemessen (cpm/ μl).

1.15.3 Sequenzierungsreaktion

Für die Sequenzierungsreaktion wurde der „T7 Sequencing Kit“ von USB verwendet. Zunächst erfolgt die Denaturierung des Plasmids, in welches der zu untersuchende Promotorbereich kloniert wurde, durch folgenden Reaktionsansatz:

Plasmid (1,5-2 μg)	32 μl
2 M NaOH	8 μl

Der Ansatz wird gemischt, kurz abzentrifugiert und anschließend für 10 min bei RT inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von:

3 M NaAc, pH 4,8	7 μl
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	4 μl
EtOH abs.	120 μl

Der Ansatz wird zur Fällung des denaturierten Plasmids über Nacht bei -20 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wird die Plasmid-DNA durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C pelletiert und anschließend mit 200 μl 70 % EtOH gewaschen (10 min, 14.000 rpm, 4 °C). Nach Trocknung des Pellets wird dieses in 10 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ resuspendiert und mit 2 μl des Oligonukleotid-Primers (5-10 pmol) und 2 μl Annealing-Puffer versetzt. Der Ansatz wird erst 5 min bei 65 °C und anschließend 10 min bei 37 °C inkubiert. Zum Annealing-Ansatz werden nun 3 μl Labelling-Mix A, 1,5 μl a^{33}P -dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$; 3000 Ci/mmol) und 2 μl T7 DNA-Polymerase (mit Enzyme Dilution Buffer 1:5 verdünnt) gegeben und das Reaktionsgemisch für 5 min bei RT inkubiert.

Aliquots von 4,5 μl werden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, die jeweils 2,5 μl eines Didesoxyribonucleosidtriphosphatpuffers (A-, C-, G- und T-Mix) enthalten. Man inkubiert 5 min bei 37 °C und beendet die Reaktion durch die Zugabe von 5 μl Stop-Puffer. Die Sequenzierungsansätze können nun bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt werden (bis zu 8 Tage).

1.15.4 Herstellung eines 6%igen Polyacrylamid-Harnstoffgels

Am Tag vor der Durchführung des Primerextension-Experiments wird das 6%ige Polyacrylamid-Harnstoffgel (20 cm x 40 cm x 0,3 mm) wie folgt hergestellt:

6%iges Polyacrylamid-Harnstoffgel:	Harnstoff	24 g
	H ₂ O _{dest.}	8 ml
	30%ige Polyacrylamidlösung	10 ml
	5 x TBE	10 ml
	10 % APS	200 µl
	TEMED	45 µl

Der Ansatz wird bei 50 °C solange gerührt, bis sich der Harnstoff vollständig aufgelöst hat. Anschließend werden 200 µl 10 % APS und 45 µl TEMED zugegeben und die gut gereinigten Gelplatten in waagrechttem Zustand mit der Flüssigkeit luftblasenfrei befüllt. Man setzt einen Kamm ein und lässt das Gel über Nacht bei RT auspolymerisieren. Am nächsten Tag wird das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt und diese mit 1 x TBE befüllt. Nach Ausspülen der Taschen erfolgt ein ca. 30-minütiger Vorlauf des Gels bei 1500 V. Anschließend wird das Gel beladen und die Elektrophorese bei 1500 V für etwa 2 h durchgeführt.

1.15.5 Primerextension-Experiment

20-30 µg RNA werden mit ca. 2.000.000 cpm des Oligonukleotid-Primers durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M NaAc (pH 4,8) und 2,5 Vol. 100 % EtOH präzipitiert. Nach einer Inkubation des Ansatzes über Nacht bei -20 °C wird die RNA durch Zentrifugation (15 min, 14.000 rpm, 4 °C) sedimentiert, mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 5 µl DEPC-H₂O gelöst. Anschließend werden 2 µl 5 x Reverse Transkriptase-Puffer (Roche) und 2 µl dNTP's (2 mM) zugegeben und der Ansatz für 2 min bei 100 °C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation folgt die Zugabe von 1 µl Reverse Transkriptase (30 U/µl; Roche) und eine 45-minütige Inkubation bei 45 °C. Zur Entfernung von RNA-Resten fügt man anschließend 1 µl RNase hinzu und inkubiert 10 min bei Raumtemperatur, bevor durch die Zugabe von 4 µl Stop-Lösung die Reaktion beendet wird.

Die cDNA-Proben werden zusammen mit den Sequenzierungsansätzen (siehe 1.15.3) für 2 min bei 75-80 °C denaturiert und auf ein 6%iges Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetragen (Reihenfolge: A, C, G, T, cDNA-Probe 1, 2, 3...). Die Elektrophorese erfolgt bei einer Spannung von 1500 Volt und ist beendet, wenn der Farbstoff Bromphenolblau aus dem Gel austritt. Das Gel wird auf ein Whatman-Papier aufgezogen, mit Klarsichtfolie bedeckt und für die Autoradiographie zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Röntgenfilmkassette eingeklebt. Die Expositionszeit bei -20 °C liegt je nach Intensität des Signals zwischen 1 und 3 Tagen.

2 Proteinbiochemische Methoden

2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer molekularen Masse in einem elektrischen Feld. Die Voraussetzung hierfür ist die denaturierende Behandlung der Proteine mit Natriumdodecylsulfat (SDS) und β-Mercaptoethanol. Das stark negativ geladene SDS bindet an die hydrophoben Regionen des Proteins und führt so zur Ausbildung eines SDS-Protein-Komplexes, dessen negative Ladung dem Molekulargewicht des Proteins etwa proportional ist. Durch das reduzierende β-Mercaptoethanol werden alle S-S-Bindungen innerhalb der Proteine gelöst, so dass diese unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung und Konformation ihrer Größe nach im Spannungsfeld aufgetrennt werden.

Zusammensetzung eines 12% - bzw. 8% -igen Polyacrylamidgels:

Reagenzien	12 % Trenngel (20 ml)	8 % Trenngel (20 ml)	Sammelgel (8 ml)
H ₂ O _{dest.}	6,6 ml	9,3 ml	5,5 ml
30%ige Acrylamidlösung	8,0 ml	5,3 ml	1,3 ml
1,0 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	-	1,0 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	5,0 ml	5,0 ml	-
10 % SDS	200 µl	200 µl	80 µl
10 % APS	200 µl	200 µl	80 µl
TEMED	8 µl	12 µl	8 µl

Nach Zugabe des Radikalbildners TEMED wird die Trenngellösung sofort zwischen zwei durch Spacer getrennte Glasplatten bis ca. 3 cm unterhalb des Glasplattenrandes gegossen und zur Ausbildung einer geraden Front mit H₂O_{dest.} überschichtet. Ist das Trenngel auspolymerisiert, kann das Sammelgel gegossen und ein Teflonkamm eingesetzt werden. Das fertige Gel wird in die mit 1 x Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingeklemmt. Die Proteinproben bzw. Ganzzelllysate werden mit 4 x Lämmli-puffer versetzt, 10 min bei 110 °C gekocht und in die Geltaschen pipettiert. Als Molekulargewichtsstandard werden zudem 10 µl des „Broad range“-Markers aufgetragen. Die Elektrophorese kann bei 200 Volt durchgeführt werden und ist beendet, sobald die Farbstofffront aus dem Gel gelaufen ist. Im Anschluss an die Elektrophorese können die aufgetrennten Proteine im Polyacrylamidgel durch Coomassie-Blau angefärbt werden. Hierzu wird das Gel 15-60 min in einer Färbelösung geschwenkt und anschließend in 10%iger Essigsäure solange entfärbt, bis sich die blau gefärbten Proteinbanden deutlich vom Hintergrund absetzen.

5 x Laufpuffer:	125 mM Tris-HCl 1,25 M Glycin 0,5 % SDS	4 x Lämmli-Puffer:	62,5 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 % Glycin 2 % SDS 5 % β-Mercaptoethanol
------------------------	---	---------------------------	--

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

2.2 Westernblot

Durch die Methode des Westernblots lassen sich einzelne Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper nachweisen und identifizieren.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Proteintransfer

Zunächst werden die Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe 2.1) und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Hierfür benötigt man eine Blotkammer, die aus zwei übereinander liegenden Graphitplatten besteht. Diese werden mit H₂O_{dest.} gespült, bevor auf die Anodenplatte drei mit Blotpuffer getränkte Whatmanpapiere gelegt werden. Auf diese werden wiederum zunächst die mit H₂O_{dest.} befeuchtete Nitrocellulosemembran und anschließend das Proteingel in gleicher Größe (nach Abtrennung des Sammelgels) aufgelegt. Luftblasen werden im Anschluß durch sanftes Rollen mit einem Glasstab entfernt. Es folgen drei in Blotpuffer getränkte Whatmanpapiere, auf die nun die Kathodenplatte aufgesetzt wird. Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran erfolgt mit 0,89 mA/cm² für etwa 1 h bei Raumtemperatur.

Blocken, Antikörperhybridisierung, Waschen und Entwicklung der Membran

Die Nitrocellulosemembran wird anschließend für 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C in TBST/Magermilch unter leichtem Schütteln inkubiert um unspezifische Bindestellen auf der Membran abzusättigen. Nun folgt eine einstündige Inkubation der Membran zusammen mit dem ersten Antikörper, der gegen das Zielprotein gerichtet ist und in TBST/Magermilch 1:1000 verdünnt wird. Anschließend wird die Membran dreimal mit TBST für je 10-15 min unter leichtem Schwenken gewaschen. Ein zweiter, mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper, der gegen die FC-Region des ersten Antikörpers gerichtet ist, wird mit TBST/Magermilch-Lösung hinzugegeben (1:10.000) und der Blot eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Man wäscht die Membran wieder dreimal mit TBST um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Detektion der spezifischen Proteine erfolgt mit Hilfe des „ECL western blotting labelling and detection Kit“ (Amersham). Hierfür werden etwa 6 ml eines 1:1-Gemisches der beiden Detektionsreagenzien I und II auf die Membran gegeben und diese 1 min bei RT inkubiert. Die Membran wird in Frischhaltefolie gewickelt und die Signale durch Exposition eines Röntgenfilms detektiert.

Blotpuffer:	Tris	5,8 g	10 x TBS (pH 7,6):	Tris	24,2 g
	Glycin	2,9 g		NaCl	80,0 g
	SDS	0,37 g		<hr/>	
	100 % EtOH	200 ml		1 l H ₂ O _{dest.}	
	<hr/>			ad 1 l H ₂ O _{dest.}	
1 x TBST:	10 x TBS	100 ml	TBST/Magermilch:	1 x TBST	
	Tween20	1 ml		5 % Magermilch	
	<hr/>			ad 1 l H ₂ O _{dest.}	

2.3 Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen

2.3.1 Gelretardations-Experiment

Mit Hilfe von Gelretardations-Experimenten können spezifische Protein-DNA-Interaktionen nachgewiesen werden. Dabei wird eine radioaktiv markierte DNA-Sonde, die ein mögliches Proteinbindemotiv enthält, mit einem gereinigten Protein inkubiert. Sich bildende Protein-DNA-Komplexe werden anschließend elektrophoretisch in einem nativen Polyacrylamidgel aufgrund ihrer geringeren Mobilität von der ungebundenen DNA-Sonde abgetrennt und autoradiographisch ausgewertet.

2.3.1.1 Radioaktive Markierung der DNA-Sonde

Ein Sequenzbereich, der eine oder mehrere mögliche Proteinbindestellen enthält, wird mittels PCR-Reaktion unter Verwendung der Pfu-Polymerase (siehe 1.5) amplifiziert und das PCR-Produkt wie unter 1.7 beschrieben aufgereinigt. Nun erfolgt die radioaktive Markierung der Sonde mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase, die die Übertragung des ³²P von (³²P)-ATP auf freie 5'-Hydroxylenden katalysiert. Ein Standardmarkierungsansatz, der für 30 min bei 37 °C inkubiert wird, setzt sich wie folgt zusammen:

DNA-Sonde	2,5 pmol
10 x Kinase-Puffer (MBI)	5,0 µl
³² P-ATP (5000 Ci/mmol)	3,0 µl
Polynukleotidkinase (30 U/µl)	2,0 µl
<hr/>	
ad 50 µl H ₂ O _{dest.}	

Zur Abtrennung des nicht eingebauten (^{32}P)-ATP wird der „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ von QIAGEN verwendet (siehe 1.15.1).

Die spezifische Aktivität der DNA-Sonde wird wie unter 1.15.2 beschrieben bestimmt. Die markierte Sonde wird anschließend in 1 x STE-Puffer so verdünnt, dass ein Volumen von 2 μl etwa 15.000 cpm entspricht. Bis zur Verwendung wird die DNA bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

1 x STE-Puffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5)
 100 mM NaCl
 10 mM EDTA (pH 8,0)

2.3.1.2 Bindestudien mit gereinigtem Protein

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:

Proteinverdünnung	2 μl
10 x Bindepuffer	2 μl
^{32}P -markierte Sonde	15000 cpm
ad 20 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	

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

<p>Verdünnungspuffer: 2 mM MgCl_2 50 mM KCl 0,1 % Igepal CA 630 10 mM DTT</p>	<p>10 x Bindepuffer: 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM KCl 50 mM EDTA 10 mM DTT 10 % Glycerin</p>
--	---

2.3.1.3 Elektrophoretische Auftrennung im nativen Polyacrylamidgel

4%iges natives Polyacrylamidgel:

5 x TBE	5,0 ml
30%ige Acrylamidlösung	16,7 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	78,3 ml
10 % APS	700 μl
TEMED	100 μl

Die Lösung wird luftblasenfrei zwischen zwei gut gereinigte Glasplatten gegossen, die durch Spacer getrennt sind (20 cm x 30 cm x 1,5 mm). Anschließend setzt man einen Kamm ein und lässt das Gel für etwa 2 h bei RT auspolymerisieren. Das Gel wird in die Elektrophoresekammer eingespannt und diese mit 0,25 x TBE als Laufpuffer gefüllt. Nach Entfernen der Luftblasen lässt man das Gel für ca. 30 min bei 150 V vorlaufen. Anschließend werden die Taschen gespült und die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt für ca. 2 h 30 min bei 150 V. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Glasplatten voneinander getrennt, das Gel mit einem trockenen Whatmanpapier abgezogen und mit Frischhaltefolie bedeckt. Das so behandelte Gel wird nun von oben und unten mit mehreren Lagen Whatmanpapier bedeckt und für 2 h bei $80\text{ }^\circ\text{C}$ unter Vakuum getrocknet. Für die Autoradiographie wird das getrocknete Gel zusammen mit einem Röntgenfilm in die Röntgenkassette gelegt. Die Expositionszeit bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ liegt je nach Intensität des Signals zwischen 1 und 3 Tagen.

2.3.1.4 Kompetitions-Experiment

Kompetitions-Experimente sind wichtig um festzustellen, mit welcher Affinität und Sequenzspezifität ein Protein an die radioaktiv markierte 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, so wird die markierte DNA-Sonde nur durch den spezifischen Kompetitor vom Protein verdrängt und die entsprechende Bande in ihrer Intensität abgeschwächt. Abhängig von der Konzentration des spezifischen Kompetitors, bei der diese Abschwächung beobachtet wird, 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.

2.3.2 DNaseI-Footprint-Experiment

In diesem Experiment kann die sequenzspezifische Bindung eines Proteins an ein radioaktiv markiertes Promotorfragment untersucht werden. DNA-Bereiche, an die ein Protein erfolgreich gebunden hat, sind vor einem DNaseI-Verdau geschützt. Das gebundene Protein verändert die Empfindlichkeit des Bindungsbereichs gegenüber der DNaseI und somit auch das charakteristische Bandenmuster dieses Bereichs, das beim DNaseI-Verdau entsteht. DNA-Bereiche, an die das Protein nicht bindet, sind ungeschützt und zeigen sowohl in Abwesenheit, als auch in Anwesenheit des Proteins das gleiche charakteristische Bandenmuster nach DNaseI-Verdau.

2.3.2.1 Präparation einer radioaktiv markierten DNA-Sonde

Zunächst werden ca. 50 µg des Plasmids, in das die zu untersuchende Promotorregion einkloniert wurde, in einem Volumen von 100 µl mit dem ersten Restriktionsenzym N^{I} bei 37 °C gespalten (siehe 1.8.1). Die hierbei entstehende Schnittstelle muss an demjenigen Fragmentende lokalisiert sein, an dem später die radioaktive Markierung eingeführt werden soll. Nach der Aufreinigung des Reaktionsansatzes erfolgt die Dephosphorylierung des Plasmids mit Hilfe der alkalischen Phosphatase CIAP (calf intestine alkaline phosphatase; Fermentas) in folgendem Reaktionsansatz:

Dephosphorylierung:

Linearisiertes Plasmid (Eluat)	80 µl
10 x CIAP-Puffer	10 µl
CIAP (1 U/µl)	4 µl
<hr/>	
	ad 100 µl H ₂ O _{dest.}

Der Ansatz wird für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend zweimal mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert. Anschließend erfolgt die Fällung der Plasmid-DNA mit 2,5 Vol. 100 % EtOH (-20 °C) und 0,1 Vol. 3 M NaAc (pH 5,5). Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C wird das Pellet einmal mit 70 % EtOH gewaschen (10 min, 14.000 rpm), anschließend getrocknet und in 15 µl H₂O_{dest.} aufgenommen. Nun erfolgt die radioaktive Markierung des 5'- bzw. 3'-Endes der späteren DNA-Sonde mittels der T4-Polynukleotidkinase:

Radioaktive Markierung:

Dephosphorylierte Vektor-DNA	6-7 µg
10 x Kinasepuffer A	1 µl
T4-Polynukleotidkinase (30 U/µl)	1 µl
γ - ³² P-(ATP) (5000 Ci/mmol)	3 µl
<hr/>	
	ad 10 µl H ₂ O _{dest.}

Der Markierungsansatz wird für 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor anschließend die markierte DNA-Sonde mit dem zweiten Restriktionsenzym aus dem Plasmid herausgespalten wird:

2. Restriktionsverdau:

Kinase-Ansatz	10 μ l
10 x Restriktionspuffer	5 μ l
Enzym 2	4 μ l
<hr/>	
	ad 50 μ l H ₂ O _{dest.}

Nach Fortsetzung der Inkubation bei 37 °C für etwa 2 h wird die Reaktion durch die Zugabe von 20 μ l Probenpuffer gestoppt. Die nicht eingebauten Nukleotide und die Vektor-DNA werden nun elektrophoretisch von dem radioaktiv markierten DNA-Fragment abgetrennt. Dies erfolgt in einem 4%igen Polyacrylamidgel (20 cm x 30 cm x 0,2 mm) in 2 h bei 300 V in 1 x TBE-Puffer (vgl. 2.3.1.3).

4%-Polyacrylamidgel:	H ₂ O _{dest.}	23,0 ml	Probenpuffer:	45 % Saccharose
	5 x TBE	3,0 ml		100 mM Na ₂ EDTA (pH 7,9)
	30%-Acrylamidlg.	4,0 ml		0,1 % Bromphenolblau
	10 % APS	210 μ l		
	TEMED	30 μ l		

Nach Beendigung der Elektrophorese werden die beiden Glasplatten voneinander getrennt, das an einer Platte anhaftende Gel mit Frischhaltefolie bedeckt und in eine Röntgenfilmkassette gelegt. Die Position der Banden von Vektor und Fragment auf dem Gel wird durch die 5-minütige Exposition eines seitlich markierten Röntgenfilmes ermittelt. Dieser Röntgenfilm wird nach der Entwicklung deckungsgleich unter die Glasplatte mit dem Gel gelegt und dieses im Bereich der gewünschten Bande großzügig ausgeschnitten. Die Sonden-DNA wird in einem 15 ml Greiner-Röhrchen mit 5 ml Elutionspuffer UN unter Schütteln bei 30 °C aus dem Gel eluiert. Am nächsten Tag wird der Überstand auf vier bis sechs 2 ml Eppendorf-Gefäße verteilt, 1 x mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert, die DNA mit Ethanol gefällt und gewaschen. Nach Trocknung des Pellets und Aufnahme in etwa 50 μ l H₂O_{dest.} wird die spezifische Aktivität der Sonde wie unter 1.15.2 beschrieben bestimmt und die Sonden-DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Elutionspuffer:	10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
	1 mM Na ₂ EDTA (pH 8,0)
	300 mM NaAc (pH 5,2)
	0,2 % SDS

2.3.2.2 DNaseI-Footprint-Analyse

Zunächst werden geeignete Verdünnungen des Proteins in Verdünnungspuffer in einem Probevolumen von 10 μ l angesetzt. Ist eine *in vitro*-Phosphorylierung des Proteins erwünscht, wird zu den einzelnen Verdünnungsstufen jeweils 1 μ l 500 mM Acetylphosphat gegeben und die Ansätze für 20 min bei 25 °C inkubiert. Zur Bindung des Proteins an die radioaktiv markierte Sonde werden ca. 150.000 cpm dieser DNA für 20 min bei 25 °C mit unterschiedlichen Mengen des Proteins inkubiert. Als Negativkontrolle dient ein Ansatz, der lediglich die Sonde, nicht jedoch das Protein enthält.

Zusammensetzung der Bindeansätze:

Protein	0,1-10 μ g
10 x Footprintpuffer	5,0 μ l
(³² P)-markierte Sonde	50.000 cpm
<hr/>	
	ad 50 μ l H ₂ O _{dest.}

Anschließend werden pro Ansatz 1-2 U DNaseI zugegeben und die Inkubation 1 min bei 25 °C fortgesetzt. Durch die Zugabe von 140 μ l Stoppuffer wird die Reaktion beendet. Die Ansätze werden nun einmal mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert und die DNA durch die Zugabe von 2 Vol. 100 % EtOH ausgefällt. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C wird die DNA gewaschen, im Vakuum getrocknet und schließlich in 5 μ l Formamid-Farbstoffpuffer gelöst.

Verdünnungspuffer:	2,0 mM MgCl ₂ 50 mM KCl 0,1 % Igepal CA 630 10 mM DTT	10 x Footprintpuffer:	100 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 20 mM MgCl ₂ 1,0 mM CaCl ₂ 10 mM DTT 10 % Glycerin
Stoppuffer:	192 mM NaOAc 32 mM Na ₂ EDTA 0,14 % SDS 64 µg/ml tRNA	Formamid-Farbstoffpuffer:	0,3 % Bromphenolblau 0,3 % Xylen Cyanol FF 10 mM Na ₂ EDTA (pH 7,5) 97,5 % deion. Formamid

Als Längenstandard für die Gelelektrophorese wird mit der verwendeten DNA-Sonde parallel eine modifizierte G+A-Sequenzierungsreaktion nach Maxam und Gilbert (Maxam und Gilbert, 1977) durchgeführt.

Sequenzierungsansatz:

(³² P)-markierte Sonde	100.000 cpm
Poly[dIdC] (1 µg/µl)	1 µl
50 % Ameisensäure	1 µl
<hr style="width: 100%; border: 0; border-top: 1px solid black; margin-bottom: 5px;"/> ad 10 µl TE-Puffer	

Nach einer Inkubation von 6 min bei 37 °C werden 150 µl 1 M Piperidin zum Reaktionsansatz gegeben und dieser für 30 min auf 90 °C erhitzt. Anschließend wird die Probe 5 min auf Eis inkubiert. Es werden jeweils 3 µl tRNA-Lösung (1 µg/µl) zugegeben. Durch Zugabe von 1,2 ml 1-Butanol, gründliches Mischen und eine 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C (14.000 rpm) wird die DNA der Sequenzierungsreaktion gefällt. Der Überstand wird abgenommen und zunächst auf Eis aufbewahrt. Durch Messung des Überstandes mit dem Geigerzähler wird überprüft, ob die DNA zuvor komplett gefällt und abzentrifugiert wurde. Zeigt jedoch der Überstand noch einen hohen Strahlungswert an, so muss erneut gefällt und abzentrifugiert werden. Zum DNA-Pellet werden weitere 1,2 ml 1-Butanol und 150 µl 1 % SDS gegeben und nach gründlichem Mischen der Komponenten wird erneut 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird wiederum dekantiert und zur Entfernung von SDS-Rückständen wird das Pellet noch einmal mit 0,5 ml 1-Butanol gewaschen (5-10 min, 14.000 rpm, 4 °C). Nach der Trocknung in der Speed Vac wird das Pellet schließlich in 5 µl Formamid-Farbstoffpuffer aufgenommen.

Die Sequenzierungsreaktion und die Footprint-Ansätze werden vor dem Auftragen auf ein 6%iges Polyacrylamid-Harnstoffgel (20 cm x 40 cm x 0,3 mm; siehe 1.15.5) für 2 min auf 80 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgt bei 1500 V und ist beendet, wenn der Farbstoff Bromphenolblau das Gelende erreicht hat. Nach vorsichtigem Öffnen der Glasplatten wird das Gel auf ein Whatmanpapier aufgezogen, mit Frischhaltefolie bedeckt und in einer Röntgenfilmkassette auf einen Röntgenfilm ÜN bei -20 °C exponiert.

1 Zellkultur

Eukaryotische Zellen werden in humider Atmosphäre in CO₂-Begasungsbrutschränken bei 37 °C und 5 % CO₂ in speziellen Kulturflaschen kultiviert. Die verwendeten Puffer und Medien werden vor Benutzung stets auf 37 °C vorgewärmt. Es ist darauf zu achten, dass zugegebene Lösungen niemals direkt auf den Zellrasen pipettiert werden. Die Adhäsionsassays mit den verschiedenen *B. holmesii*- und Referenzstämmen fanden in 24-Napfschalen statt.

Medium für A549-Zellen: RPMI 1640 + L-Glutamin (GIBCO)
+ 10 % FCS

20 x PBS: (autoklavieren)	NaCl	160 g	20 x Mg²⁺/Ca²⁺: (autoklavieren)	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2 g
	KCl	4 g		CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2 g
	Na ₂ HPO ₄	23 g		ad 1 l H ₂ O _{dest.}	
	KH ₂ PO ₄	4 g			
<hr/>					
1 l H ₂ O _{dest.}					
Trypsin-Lsg.:	Trypsin	0,5 %	1 x PBS/Mg²⁺/Ca²⁺: (sterilfiltrieren)	20 x PBS	25 ml
				20 x Mg ²⁺ /Ca ²⁺	25 ml
			ad 500 ml H ₂ O _{dest.}		

3.1 Subkultivierung eukaryotischer Zellen

A549-Zellen bilden nach 4-6 Tagen einen Monolayer und müssen auf neue Kulturflaschen gesplittet werden. Hierfür wird das alte Medium zunächst aus der Flasche abgesaugt und die am Boden der Kulturflasche anhaftenden Zellen einmal mit 5 ml 1 x PBS gewaschen. Nach Absaugen des 1 x PBS werden zum Ablösen der Zellen vom Untergrund 1,5 ml Trypsin-Lösung zugegeben und die Flasche für etwa 5 min bei 37 °C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Die Ablösung der Zellen wird makroskopisch und mikroskopisch kontrolliert und die Zellen anschließend in 10,5 ml RPMI-Medium gut resuspendiert. Von der Zellsuspension werden 2-4 ml (1:6/1:3) in eine neue Kulturflasche überführt, die zuvor mit 12 ml RPMI-Medium befüllt wurde. Zur Verteilung der Zellen in der neuen Kulturflasche wird diese vorsichtig geschwenkt und anschließend im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert.

3.2 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Einfrieren eukaryotischer Zellen

Nach vorsichtigem Abziehen des Kulturmediums werden die Zellen einmal mit 5 ml 1 x PBS gewaschen und anschließend durch Trypsinisieren abgelöst (siehe 3.1). Die abgelösten Zellen werden in 9 ml RPMI-Medium resuspendiert und auf Eis gestellt. Um eine Kristallbildung innerhalb und außerhalb des Cytoplasmas sowie eine partielle Dehydratation zu vermeiden, setzt man üblicherweise 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) zu. Nach Zugabe von 1,2 ml DMSO wird die Zellsuspension gut gemischt und auf zehn beschriftete Kryoröhrchen aufgeteilt (je 1 ml). Die Röhrchen werden in Papiertücher verpackt und ÜN bei -80 °C eingefroren. Am nächsten Tag erfolgt dann die Überführung der Zellen in den Stickstofftank. In flüssigem Stickstoff (-196 °C) können eukaryotische Zellen über Jahre ohne Verlust der Lebensfähigkeit aufbewahrt werden.

Auftauen eukaryotischer Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen werden bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und sofort in einer Flasche mit 20 ml vorgelegtem Kulturmedium ausgesät. Das zytotoxische DMSO, welches zum Einfrieren der Zellen verwendet wurde, wird dadurch so stark verdünnt, dass es zunächst keinen negativen Einfluss auf die Zellen hat. Am nächsten Tag sollte man jedoch das DMSO enthaltende Kulturmedium gegen frisches RPMI-Medium (10 ml) austauschen.

3.3 Bestimmung der Lebendzellzahl (LZZ)

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgt mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Hierfür werden die Zellen trypsinisiert (siehe 3.1) und gut resuspendiert. Etwa 10 µl der Zellsuspension werden in die Zählkammer gegeben und die lebenden Zellen unter dem Mikroskop gezählt. Dabei sollen drei Großquadrate mit je 16 Kleinquadraten ausgezählt und das arithmetische Mittel bestimmt werden. Um die Zellzahl in einem Milliliter zu erhalten multipliziert man den gemittelten Wert mit dem Kammerfaktor 5000.

$$\text{Lebendzellzahl/ml} = (\text{Mittelwert Großquadrate}) \times (5 \times 10^3)$$

3.4 Adhäsionsassay von *B. holmesii* an A549-Zellen

Für diesen Adhäsionsassay werden die zu testenden *B. holmesii*-Stämme sowie ein als Positivkontrolle und zwei als Negativkontrolle dienende Stämme in einer bestimmten MOI (multiplicity of infection; Verhältnis Bakterienzellen/ausgesäte Zellen) auf einen semikonfluenten A549-Zellrasen transferiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h werden die nicht-adhärenenten Bakterien abgewaschen und die Zellen lysiert. Nach Ausplattieren und Auszählen der Bakterien können Aussagen über das Adhärenzverhalten der einzelnen Stämme getroffen werden. Somit kann der Beitrag eines bestimmten Gens zur Adhäsion der Bakterien an Wirtszellen durch Vergleich von WT und entsprechender Mutante bestimmt werden.

Aussaat der Zellen

Die A549-Zellen werden wie unter 3.1 beschrieben trypsinisiert und eine Zellzahl von 3×10^5 Zellen/ml in RPMI-Medium eingestellt. Je 1 ml Zellsuspension wird pro Napf in einer 24-Napfschale ausgesät. Hierbei werden für jeden zu untersuchenden Bakterienstamm drei Nöpfe ausgesät, um etwaige Fehlerquellen herauszumitteln. Die Zellen werden 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit haben die Zellen sich verdoppelt und einen semikonfluenten Monolayer ausgebildet. Dies wird mit Hilfe des Mikroskops überprüft.

Herstellung des Infektionsmediums

B. holmesii-Stämme werden wegen ihres schlechten Wachstums in Flüssigmedien jeweils auf eine BG-Blutagarplatte ausgestrichen und für 2 Tage bei 37 °C kultiviert. Am Tag des Adhäsions-experiments werden die Bakterien geerntet, in 1 x PBS resuspendiert und über die Messung der optischen Dichte auf eine bestimmte Bakterienanzahl/ml eingestellt. Mit diesen Bakterienzahlen/ml wird das Infektionsmedium mit RPMI-Medium auf eine MOI von 50, dh. auf eine Bakterienzahl von 3×10^7 Bakterien/ml eingestellt. Dabei wird die entsprechende Konzentration auf ein Volumen an Infektionsmedium/Napf von 1 ml berechnet.

Adhäsion

Die Nöpfe werden zunächst einmal mit je 1 ml 1 x PBS/MgCa gewaschen. Anschließend wird jeder Napf mit 1 ml des entsprechenden Infektionsmediums befüllt und die Schale für 1 h bei 37 °C im Begasungsbrutschrank inkubiert. Während dieser Zeit haben die Bakterien die Möglichkeit, an die Zelloberfläche zu adhären. Danach werden die Zellen zweimal mit 1 x PBS/MgCa gewaschen, um nicht-adhärenente Bakterien zu entfernen. Die Nöpfe werden nun jeweils mit 1 ml eiskaltem H₂O_{dest.} befüllt und die Zellen je 5 s pro Napf mit Ultraschall behandelt. Die Bakterien-Zellsuspensionen werden in Eppendorfgefäße aufgenommen und in geeigneten Verdünnungsstufen (10^{-2} , 10^{-3}) ausplattiert. Zusätzlich werden geeignete Verdünnungsstufen des Infektionsmediums jedes Stammes vor Zelladhäsion ausplattiert (10^{-4} und 10^{-5} aus je zwei Verdünnungsreihen), um die Anzahl der pro Napf applizierten Bakterien zu überprüfen. Nach einer Inkubationszeit von etwa 4 Tagen bei 37 °C werden die Lebendzellzahlen (CFU = colony forming units) durch Auszählen der Platten bestimmt:

$$\text{CFU/ml} = \text{gezählte Kolonien} \times \text{Verdünnungsstufe} \times 10$$

V Ergebnisse

1 Identifizierung putativer Virulenzfaktoren in *B. holmesii*

1.1 Identifizierung eines *fhaB*-homologen Gens in *B. holmesii*

Bislang konnten über Southernblot- und Westernblot-Experimente in *B. holmesii* keine für das *B. bronchiseptica*-Cluster bekannten Virulenzfaktoren nachgewiesen werden. Mit Hilfe von degenerierten Oligonukleotiden, die aus der BvgA-Aminosäuresequenz von *B. pertussis* abgeleitet wurden, gelang vor kurzem die Identifizierung eines *bvgAS*-homologen Locus in *B. holmesii* (Gerlach *et al.*, 2004). Es wurde gezeigt, dass der *bvgAS*-Locus einiger „neuer“ *Bordetella*-Arten auf Proteinebene einen erheblich größeren Konservierungsgrad aufweist als auf DNA-Ebene.

Zur Identifizierung eines *fhaB*-homologen Gens in *B. holmesii* wurden deshalb zunächst die bekannten FhaB-Aminosäuresequenzen aus *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* und *B. avium* miteinander verglichen und bezüglich konservierter Regionen untersucht. Innerhalb des *B. bronchiseptica*-Clusters ist die Übereinstimmung zwischen den FhaB-Sequenzen sehr hoch (siehe 3.1.1). *B. avium* wurde als Vertreter der „neuen“ *Bordetella*-Arten in die Untersuchungen einbezogen. Aus konservierten Bereichen, die besonders am N- und am C-Terminus der FhaB-Proteine auftreten, wurden zwei Paare degenerierter Oligonukleotide abgeleitet und unter Verwendung des UPAC-Codes synthetisiert. In Abbildung 7 sind die ausgewählten konservierten Aminosäuresequenzen und ihre Positionen innerhalb des FhaB aus *B. pertussis* sowie die daraus abgeleiteten degenerierten Oligonukleotidpaare dargestellt. Es wurden PCR-Reaktionen mit Hilfe dieser degenerierten Primer und unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Variiert wurde vor allem die Annealing-Temperatur der Oligonukleotide (35-55 °C). Allerdings konnten sowohl von chromosomaler DNA aus *B. holmesii* als auch von chromosomaler DNA aus *B. pertussis* und *B. avium* keine PCR-Produkte erhalten werden.

Anschließend wurden Alignments der verschiedenen *fhaB*-Nukleotidsequenzen durchgeführt und Oligonukleotidpaare aus solchen DNA-Sequenzbereichen ausgewählt, die bei *fhaB* aus *B. pertussis* und *B. avium* weitgehend übereinstimmen. Das Primerpaar FOR4/REV4 wurde dabei aus konservierten Nukleotidbereichen am 3'-Ende des *fhaB*-Gens gewählt, während die Primerkombination fhapert10/11 spezifisch innerhalb der 5'-Region des *fhaB*-Gens beider *Bordetella*-Arten bindet. Für die PCR-Reaktionen wurde chromosomale DNA aus *B. holmesii* G7702 und *B. bronchiseptica* 7865 eingesetzt. Die Durchführung erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Nach einem „first delay“ von 3 min bei 94 °C wurden 30 Zyklen mit den Parametern 1 min Denaturierung bei 94 °C, 40 sec „Annealing“ der Primer bei 65 °C, 40 sec „Annealing“ der Primer bei 57 °C und 45 sec Elongation der Primer bei 72 °C durchgeführt, an die sich der „last delay“ mit 3 min bei 72 °C anschloss.

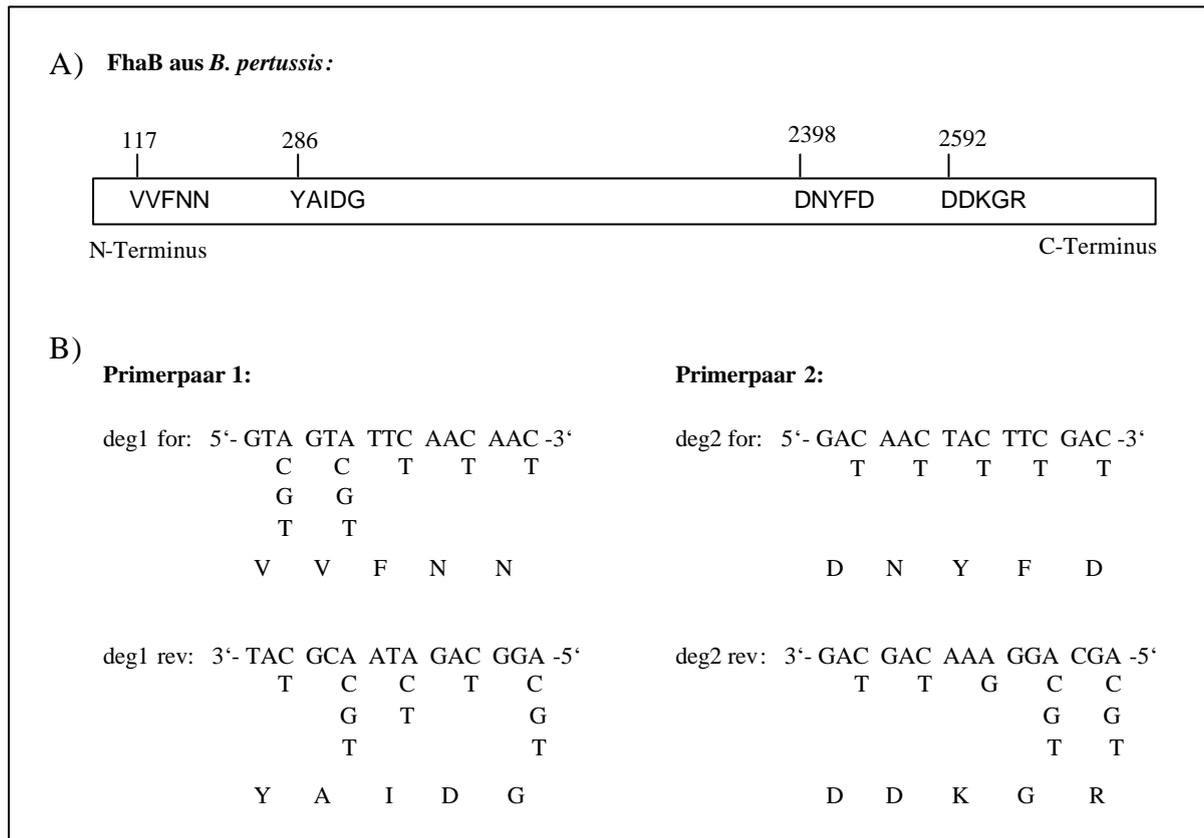


Abb. 7: A) Schematische Darstellung der FhaB-Sequenz aus *B. pertussis*

Die Aminosäuresequenzen, von denen sich die degenerierten Primer ableiten, sind angegeben. Die Zahlen kennzeichnen die jeweilige Position der jeweils ersten Aminosäure innerhalb des FhaB-Proteins.

B) Design der degenerierten Primer zur Amplifikation der *fhaB*-Sequenz

Die zu erwartenden PCR-Produkte haben im Falle des *B. bronchiseptica*-Clusters für das Primerpaar FOR4/REV4 eine Länge von 340 bp und für das Primerpaar fhapert10/11 eine Länge von 440 bp. Es konnten mit beiden Primerkombinationen PCR-Produkte der zu erwartenden Größen von chromosomaler DNA aus *B. holmesii* G7702 amplifiziert werden. Die als Positivkontrolle eingesetzte chromosomale DNA aus *B. bronchiseptica* 7865 lieferte ebenfalls mit beiden Primerpaaren die erwarteten PCR-Produkte.

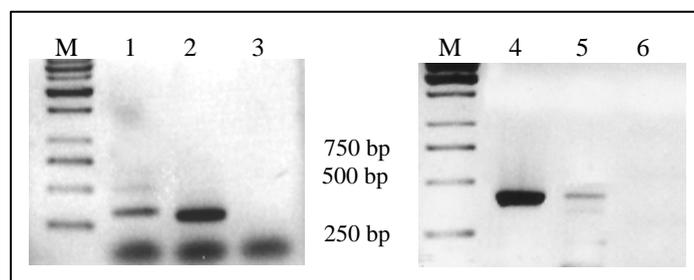


Abb. 8: PCR-Amplifikation zur Identifizierung eines *fhaB*-homologen Gens in *B. holmesii* G7702

M: Größenmarker; Verwendete Oligonukleotide: FOR4/REV4 (Spur 1-3), fhapert10/11 (Spur 4-6); In Spur 1 und 4 wurde chromosomale DNA aus *B. holmesii* G7702 als Template eingesetzt und mit den Primerpaaren FOR4/REV4 (Spur 1; Produkt 340 bp) und fhapert10/11 (Spur 4; Produkt 440 bp) amplifiziert. Spuren 2 und 5 stellen die Positivkontrollen unter Verwendung von *B. bronchiseptica* 7865-DNA dar. Spuren 3 und 6 bezeichnen die Negativkontrollen, die kein Template enthalten.

Die beiden PCR-Produkte wurden mit Hilfe der jeweiligen Primer FOR4 bzw. REV4 und fhapert10 bzw. 11 sequenziert und die DNA-Sequenzen durch BLAST-X-Analysen untersucht. Hierbei konnten Übereinstimmungen mit dem N- bzw. C-terminalen Ende der FhaB-Proteine aus *B. avium* und dem *B. bronchiseptica*-Cluster festgestellt werden. Die Aminosäuresequenz des 440 bp großen 5'-Bereichs des Gens zeigt dabei eine Identität von 58 % zum entsprechenden N-terminalen FhaB-Bereich aus *B. avium*, während die Übereinstimmung mit der entsprechenden FhaB-Sequenz aus *B. pertussis* nur 46 % beträgt. Die Aminosäuresequenz des 340 bp großen Bereichs am 3'-Ende des Gens stimmt dagegen mit beiden entsprechenden C-terminalen FhaB-Sequenzen aus *B. avium* und aus *B. pertussis* zu etwa 49 % überein. Auf Nukleotidebene konnten Übereinstimmungen der PCR-Produkte mit den entsprechenden *fhaB*-Sequenzen aus *B. avium* und *B. pertussis* von 63 % bis 71 % festgestellt werden, wobei diesbezüglich keine signifikant größere Übereinstimmung der Sequenzen aus *B. holmesii* zu jenen aus *B. avium* beobachtet wurde.

Die Anwesenheit des *fhaB*-homologen Gens im Genom von *B. holmesii* (*fhaB_{BH}*) konnte mittels Southernblot-Experimenten bestätigt werden (siehe Abb. 9). Hierfür wurde chromosomale DNA aus *B. holmesii* G7702 sowie aus *B. avium* 1852 mit Restriktionsenzymen verdaut, über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und durch UV-Licht fixiert. Als DNA-Sonde wurde das mit dem Primerpaar FOR4/REV4 amplifizierte PCR-Produkt aus *B. holmesii* G7702 eingesetzt. Erwartungsgemäß hybridisierte diese Sonde mit der jeweils entsprechend verdauten DNA aus *B. holmesii* G7702. Interessanterweise konnte kein Signal unter Verwendung von DNA aus *B. avium* 1852 detektiert werden. Die 63%ige Übereinstimmung der *fhaB*-Sonde aus *B. holmesii* mit dem entsprechenden DNA-Bereich aus *B. avium* scheint folglich für eine DNA-DNA-Hybridisierung nicht ausreichend zu sein.

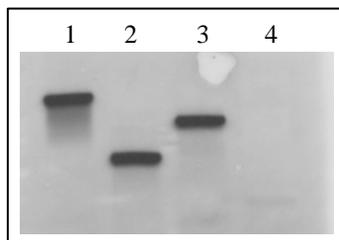


Abb. 9: Southernblot zum Nachweis eines *fhaB*-homologen Gens im Genom von *B. holmesii* G7702

Chromosomale DNA aus *B. holmesii* G7702 wurde mit *PstI* (Spur 1), *PvuI* (Spur 2) und *SphI* (Spur 3) verdaut; chromosomale DNA aus *B. avium* 1852 wurde mit *StuI* (Spur 4) verdaut. Die Proben wurden über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nylonmembran mit dem FOR4/REV4-PCR-Produkt aus *B. holmesii* G7702 hybridisiert.

Um die Verbreitung des *fhaB*-homologen Gens innerhalb der Art zu überprüfen, wurden verschiedene Isolate von *B. holmesii* mittels PCR auf die Anwesenheit des *fhaB*-Homologs untersucht. Hierfür wurden die zur Identifizierung von *fhaB_{BH}* eingesetzten Oligonukleotide fhapert10 und fhapert11 verwendet, die zur Amplifikation eines 440 bp großen PCR-Produktes von chromosomaler DNA aus *B. holmesii* G7702 führten (siehe Abb. 8). Es wurden Schnelllysate von den Stämmen *B. holmesii* ATCC51541, *B. holmesii* G8341 und *B. holmesii* Nol hergestellt und die PCR-Reaktion unter den bereits beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Als Positivkontrolle diente chromosomale DNA von *B. holmesii* G7702 und *B. avium* 1852.

Wie der Abbildung 10 zu entnehmen ist, konnte für alle *B. holmesii*-Stämme sowie für *B. avium* 1852 ein PCR-Produkt in der richtigen Größe von 440 bp erhalten werden. Somit scheinen alle untersuchten Isolate von *B. holmesii* ein *fhaB*-homologes Gen zu enthalten. Die Verbreitung des *fhaB*-Homologs innerhalb der Art *B. holmesii* konnte nachgewiesen werden.

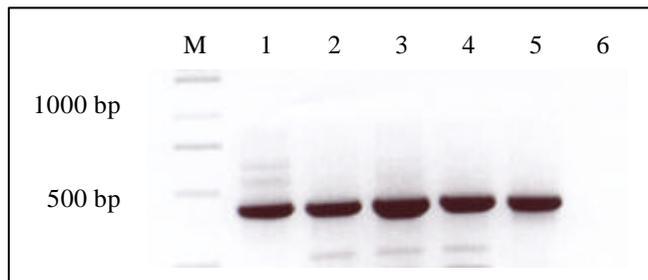


Abb. 10: PCR zur Untersuchung der Verbreitung des *fhaB*-Homologs bei verschiedenen *B. holmesii*-Isolaten

Die verwendeten Oligonukleotide fhapert10/11 führen zur Amplifikation eines 440 bp großen Produkts mit chromosomaler DNA von *B. holmesii* G7702 (Spur 1), Schnelllysate von *B. holmesii* ATCC51541 (Spur 2), Schnelllysate von *B. holmesii* G8341 (Spur 3), Schnelllysate von *B. holmesii* No1 (Spur 4) und chromosomaler DNA von *B. avium* 1852 (Spur 5); Spur 6: Negativkontrolle ohne Template; M: Größenmarker

1.2 Versuche zur Identifizierung von homologen Genen zu *fhaC*, *fimA*, *fimD*, *prn* und *dnt* in *B. holmesii*

Über PCR-Experimente mit aus konservierten Nukleotidsequenzen abgeleiteten Oligonukleotiden konnte ein *fhaB*-homologes Gen in *B. holmesii* nachgewiesen werden. Um weitere Homologe zu den Virulenzfaktoren des *B. bronchiseptica*-Clusters zu identifizieren, wurden die DNA-Sequenzen des *fhaC*-Gens, der Fimbriengene *fimA* und *fimD*, des Pertaktins (*prn*) und des dermonekrotischen Toxins (*dnt*) aus *B. pertussis* mit den entsprechenden DNA-Sequenzen aus *B. avium* verglichen und Oligonukleotide aus größtenteils übereinstimmenden Nukleotidbereichen abgeleitet. Diese wurden für PCR-Reaktionen unter Verwendung von chromosomaler DNA aus *B. holmesii* G7702 eingesetzt. In Tabelle 4 sind die jeweils verwendeten Primer aufgelistet. Es konnte jedoch trotz der Anwendung verschiedener PCR-Bedingungen mit keinem der Oligonukleotidpaare ein entsprechendes PCR-Produkt erhalten werden.

Tab. 4: Oligonukleotide für PCR- und Southernblot-Experimente, ausgewählt aus größtenteils übereinstimmenden Nukleotidbereichen der entsprechenden DNA-Sequenzen aus *B. pertussis* und *B. avium* zur Identifizierung von homologen Genen zu *fhaC*, *fimA*, *fimD*, *dnt* und *prn* in *B. holmesii*

Oligonukleotid	Verwendung	Oligonukleotid	Verwendung
fhaC.1	PCR	prn.1	PCR
fhaC.2	PCR	prn.2	PCR
fhaC.3	PCR	prn.3	PCR
fhaC.4	PCR	prn.4	PCR
fhaC.5	PCR	prn.5	PCR
fhaC.6	PCR	prn.6	PCR
fhaC.av.S1	Southern Blot	dnt.1	PCR
fhaC.av.S2	Southern Blot	dnt.2	PCR
fhaC.av.S3	Southern Blot	dnt.3	PCR
fhaC.av.S4	Southern Blot	dnt.4	PCR
fimA.1	PCR	dnt.av.S1	Southern Blot
fimA.2	PCR	dnt.av.S2	Southern Blot
fimD.1	PCR		
fimD.2	PCR		

Zusätzlich zu den PCR-Experimenten wurde versucht, einige Virulenzgen-Homologe mit Hilfe von Southernblot-Experimenten bei *B. holmesii* nachzuweisen. Die DNA-Sonden wurden hierfür jeweils aus chromosomaler DNA von *B. avium* 1852 amplifiziert, denn, wie unter 1.1 beschrieben, weist zumindest das *fhaB*-Gen aus *B. holmesii* bezüglich seiner Nukleotid- und Aminosäuresequenz die größte Ähnlichkeit zum Homolog aus *B. avium*. Für die Identifizierung eines *fhaC*- bzw. *dnt*-homologen Gens in *B. holmesii* G7702 wurde mit den Oligonukleotidpaaren *fhaC*.av.S1/2 bzw. *fhaC*.av.S3/4 und *dnt*.av.S1/2 eine 504 bp bzw. 350 bp und 480 bp große DNA-Sonde aus chromosomaler DNA von *B. avium* amplifiziert und diese jeweils für eine DNA-DNA-Hybridisierung mit verdauter und auf eine Nylonmembran geblotteter *B. holmesii*-DNA eingesetzt. Allerdings war bei keiner der Sonden eine Hybridisierung mit der DNA aus *B. holmesii* zu beobachten. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Homologie der DNA-Sequenzen von möglicherweise im *B. holmesii*-Genom vorhandenen *fhaC*- und *dnt*-Homologen für eine DNA-DNA-Hybridisierung nicht ausreicht.

2 Vervollständigung der *fhaB*-Sequenz aus *B. holmesii* mittels „Genome Walk“ und Analyse benachbarter DNA-Bereiche

Über PCR-Analysen mit Oligonukleotiden, die von konservierten Nukleotidsequenzen abgeleitet wurden, konnten zwei kleine Teilbereiche der Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Filamentösen Hämagglutinins aus *B. holmesii* (Fha_{BH}) ermittelt werden. Um diese Sequenz zu vervollständigen, wurden viele aufeinander folgende Zyklen des „Genome Walk“ mit chromosomaler DNA aus *B. holmesii* G7702 durchgeführt (siehe Methoden 1.14). Die durch die PCR-Reaktionen erhaltenen Produkte wurden sequenziert und die Sequenzen anhand von BLAST-Analysen untersucht. Handelte es sich bei der jeweiligen Sequenz um eine Fortsetzung des *fhaB*-Gens aus *B. holmesii*, so wurden daraus weitere genspezifische Oligonukleotide (siehe Material 4) für eine neue Runde des „Genome Walk“ ausgewählt.

Im Folgenden wird das zuerst durchgeführte „Genome Walk“-Experiment zur Identifizierung eines neuen *fhaB_{BH}*-Sequenzbereichs veranschaulicht. Die chromosomale DNA von *B. holmesii* G7702 wurde nach Verdau, Reinigung und „Adaptor-Ligation“ als Template für die 1. PCR-Reaktion eingesetzt. Der Primer AP1, welcher spezifisch im „Genome Walker Adaptor“ bindet, wurde in diesem Fall mit dem Oligonukleotid *fha5'1* kombiniert. Das Oligonukleotid *fha5'1* bindet am 5'-Ende der ersten *fhaB_{BH}*-Teilsequenz, die in Abschnitt 1.1 mit Hilfe der Primerkombination *fhapert10/11* identifiziert wurde, und soll durch die PCR-Reaktion in 5'-Richtung verlängert werden. In Abbildung 10A ist das Ergebnis der 1. PCR dargestellt. In diesem Fall konnte in drei Ansätzen ein Produkt der jeweils gleichen Größe (ca. 1500 bp) detektiert werden. Für die spezifische Hochamplifikation der Produkte aus der 1. PCR wurde eine 2. PCR-Reaktion durchgeführt. Hierfür wurde jeweils 1 µl einer 1:10-Verdünnung der 1. PCR-Produkte als Template eingesetzt. Als Oligonukleotide für die 2. PCR dienten der „Adaptor-spezifische“ Primer AP2 und der genspezifische Primer *fha5'2*. Beide PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung der im Methodenteil unter 1.14 beschriebenen Parameter durchgeführt. Das Ergebnis der 2. PCR ist in Abbildung 10B dargestellt. Überraschenderweise wurde hier keine spezifische Hochamplifikation der entsprechenden in Abbildung 10A sichtbaren 1. Produkte beobachtet. Stattdessen kam nur in einem Ansatz (Spur 3) ein PCR-Produkt zum Vorschein, welches bezüglich seiner Größe nicht dem Produkt aus der 1. PCR (Spur 3) entspricht. Dieses Produkt aus der 2. PCR stellt wahrscheinlich spezifisch hochamplifizierte DNA dar, die im Ansatz 3 (Spur 3) der 1. PCR noch nicht im Gel sichtbar war.

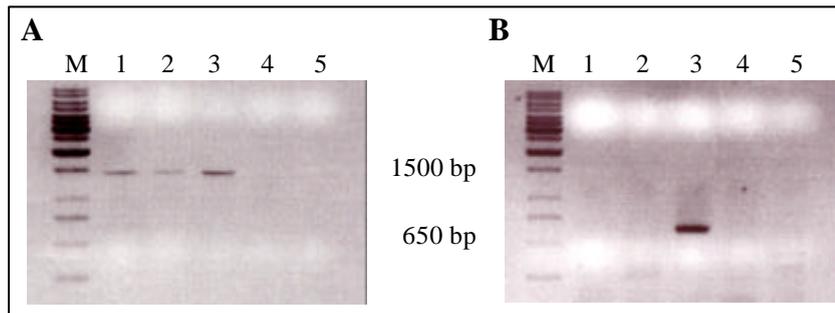


Abb. 10: „Genome Walk“-PCR 1(A) und 2 (B)

A: Chromosomale DNA aus *B. holmesii* G7702, verdaut (Spur 1: *EcoRV*; 2: *PvuII*; 3: *ScaI*; 4: *StuI*) und „Adaptor-ligiert“, wurde als Template für die 1. „Genome Walk“-PCR eingesetzt; hier verwendete Oligonukleotide: *fha5'1/AP1*. In Spur 1-3 erscheint ein etwa 1500 bp großes PCR-Produkt; Spur 5: Negativkontrolle

B: 1:10-Verdünnungen der 1. „Genome Walk“-PCR wurden als Template für die 2. PCR eingesetzt; hier verwendete Oligonukleotide: *fha5'2/AP2*. In Spur 3 erscheint ein etwa 650 bp großes PCR-Produkt; Spur 5: Negativkontrolle

Durch Sequenzierung und BLAST-Analysen konnte festgestellt werden, dass es sich bei dem in der 2. PCR amplifizierten DNA-Fragment tatsächlich um *fhaB_{BH}*-spezifische DNA, und zwar um den Anfang der kodierenden *fhaB_{BH}*-Gensequenz handelte, welche zudem das potentielle Startcodon der Translation (GTG) enthielt. Durch die Methode des „Genome Walk“ konnte das *fhaB*-Gen aus *B. holmesii* sukzessiv vervollständigt werden. Die komplette *fhaB_{BH}*-Sequenz und die entsprechende Aminosäuresequenz sind in Abbildung 40 im Anhang dargestellt.

Zudem konnte ein Teil der stromaufwärts von *fhaB_{BH}* liegenden DNA-Sequenz identifiziert werden. Dabei wurde festgestellt, dass die intergenische Region zwischen dem *fhaB_{BH}*-Startcodon und dem Beginn des stromaufwärts lokalisierten Leserahmens 346 bp umfasst. Die Aminosäuresequenz dieses Leserahmens weist Ähnlichkeiten zu einem konservierten Membranprotein aus *B. bronchiseptica* und *B. parapertussis* auf (56 % Identität) und wird im Weiteren als OrfMP bezeichnet. Mittels des „Genome Walk“ konnten 614 bp dieses 960 bp großen Orf's identifiziert werden. Die Transkription von *orfMP* bei *B. holmesii* erfolgt in die zum *fhaB_{BH}* entgegengesetzte Richtung.

Kürzlich konnte auch der am 3'-Ende des *fhaB_{BH}*-Gens angrenzende DNA-Bereich identifiziert werden (Karin Schmitt, Diplomarbeit). Interessanterweise handelt es sich hierbei um das TnpA-Gen für eine Transposase, die im IS-Element IS1001 vorkommt. Die intergenische Region zwischen *fhaB_{BH}* und IS1001 enthält nur 54 bp. Das Vorhandensein von IS1001 im Genom von *B. holmesii* konnte bereits vor einiger Zeit beobachtet werden (Templeton *et al.*, 2003; Gerlach, Doktorarbeit, 2004). Durch Southernblot-Experimente wurde gezeigt, dass die *B. holmesii*-Isolate *BH* G7702, *BH* G8341, *BH* ATCC51541 und *BH* No1 jeweils zwischen 8 und 10 Kopien von IS1001 enthalten (Karin Schmitt, persönliche Mitteilung).

Die genomische Organisation des *fhaB*-Locus aus *B. holmesii* unterscheidet sich also deutlich von der anderer *Bordetella*-Arten. Die Abbildung 11 zeigt eine schematische Darstellung der *fhaB*-Loci des *B. bronchiseptica*-Clusters, aus *B. avium*, *B. petrii* und *B. holmesii*.

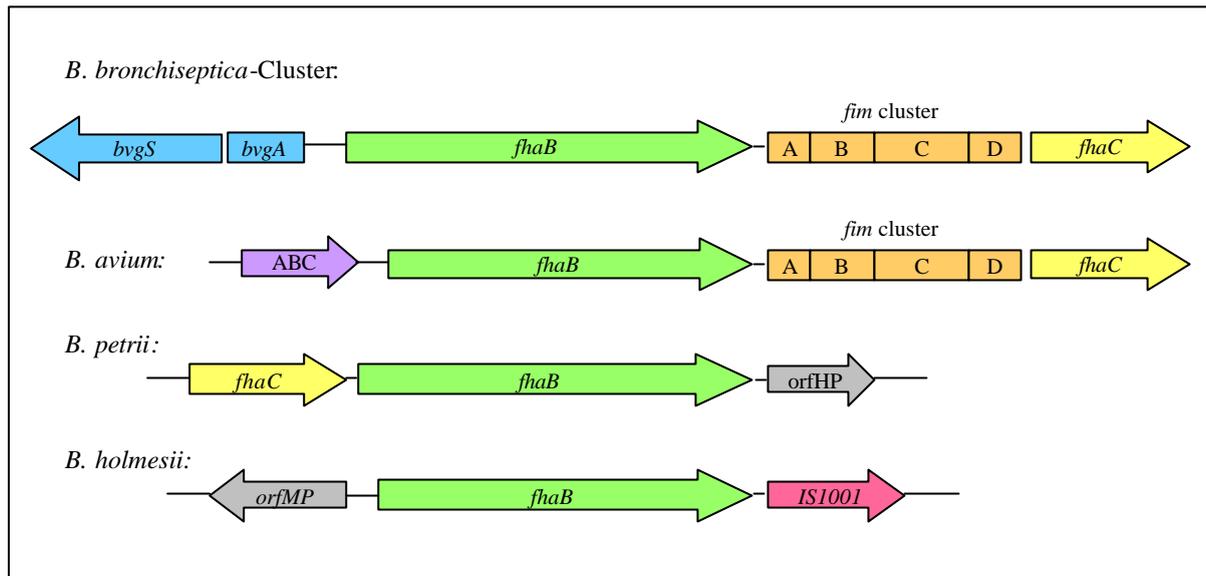


Abb. 11: Schematische Darstellung der *fhaB*-Loci aus dem *B. bronchiseptica*-Cluster, *B. avium*, *B. petrii* und *B. holmesii* (modifiziert nach Locht *et al.*, 1993; Spears *et al.*, 2003; siehe <https://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/gendb> für *fhaB*-Locus aus *B. petrii*). Gezeigt sind die stromaufwärts und stromabwärts an *fhaB* angrenzenden Bereiche. ABC: Leserahmen für ein ATP-bindendes ABC-Transporter-Protein; *orfMP*: Leserahmen für ein konserviertes Membranprotein; *orfHP*: Leserahmen für ein hypothetisches Protein

3 Charakterisierung von *fhaB* aus *B. holmesii*

Das Filamentöse Hämagglutinin (FHA) wird als der wichtigste Adhäsionsfaktor der „klassischen“ *Bordetella*-Arten angesehen, denn dieses Protein ist für eine erfolgreiche Kolonisierung des respiratorischen Trakts unbedingt erforderlich (Cotter *et al.*, 1998). Über PCR-Analysen konnte ein *fhaB*-homologes Gen in *B. holmesii* identifiziert werden. Mittels der Methode des „Genome Walk“ wurde die *fhaB_{BH}*-Sequenz vervollständigt. Um Aufschlüsse über die biologische Bedeutung von *fhaB* für *B. holmesii* zu erhalten, sollte das Gen durch die folgenden Experimente näher charakterisiert werden.

3.1 Molekulare Analyse von *fhaB_{BH}*

3.1.1 Vergleich der *fhaB*-Nukleotid- und Aminosäuresequenzen aus *B. holmesii*, *B. pertussis*, *B. avium* und *B. petrii*

Durch die Vervollständigung der *fhaB_{BH}*-Sequenz konnte die Größe des Gens festgestellt werden. Die kodierende Region von *fhaB* aus *B. holmesii* beinhaltet 8.793 bp. Im Gegensatz dazu enthalten die Mitglieder des *B. bronchiseptica*-Clusters weitaus längere *fhaB*-Sequenzen, wie z. B. 10.770 bp bei *B. pertussis*. Das Homolog aus *B. avium* umfasst dagegen nur 7911 bp. Im Rahmen der Genomannotation von *B. petrii* wurde auch in dieser *Bordetella*-Art ein *fhaB*-homologes Gen mit einer Größe von 9.120 bp gefunden. Die Größen der *fhaB*-Leserahmen der einzelnen *Bordetella*-Arten sind in Tabelle 5 aufgeführt. Zusätzlich wurden anhand der verschiedenen FhaB-Aminosäuresequenzen die jeweiligen Molekulargewichte der Proteine errechnet (www.expasy.org). Diese beziehen sich jeweils auf das nicht-prozessierte Vorläuferprotein FhaB.

Tab. 5: Größen der *fhaB*-Gene und Molekulargewicht (MG) der Vorläuferproteine von FHA bei verschiedenen *Bordetella*-Arten

	<i>B. holmesii</i>	<i>B. pertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. avium</i>	<i>B. petrii</i>
Größe des <i>fhaB</i> -Gens	8.793 bp	10.770 bp	10.902 bp	10.776 bp	7.911 bp	9.120 bp
MG des Vorläuferproteins von FHA (FhaB)	304 kDa	367 kDa	371 kDa	367 kDa	274 kDa	306 kDa

Um Übereinstimmungen der *fhaB*-Sequenzen aus *B. holmesii*, *B. pertussis*, *B. avium* und *B. petrii* auf Nukleotid- und Aminosäureebene festzustellen, wurden unterschiedliche Alignments dieser Sequenzen durchgeführt. Das Ausmaß der Übereinstimmung wurde jeweils mit dem BESTFIT- und GAP-Programm ermittelt (Altschul *et al.*, 1997). *B. pertussis* sollte dabei als Vertreter des *B. bronchiseptica*-Clusters dienen. Die *fhaB*-Sequenzen der Mitglieder des *B. bronchiseptica*-Clusters sind auf Nukleotidebene zu 95 % und auf Aminosäureebene zu etwa 93 % identisch. *B. avium* und *B. petrii* wurden als Vertreter der „neuen“ *Bordetella*-Arten in die Untersuchungen einbezogen. Die Analysen zeigten, dass die *fhaB*-Sequenz aus *B. holmesii* sowohl auf Nukleotid- als auch auf Proteinebene die größte Ähnlichkeit zum *fhaB* aus *B. avium* aufweist. Die Übereinstimmungen der einzelnen *fhaB*-Sequenzen auf Nukleotid- und Aminosäureebene sind in Tabelle 6 dargestellt.

Ein CLUSTAL-Alignment (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/w2h/w2hdkfz/>) der Aminosäuresequenzen von FhaB aus *B. holmesii*, *B. pertussis*, *B. avium* und *B. petrii* ist im Anhang unter Abbildung 39 aufgeführt. Dieses zeigt, dass Sequenzübereinstimmungen vorwiegend im N-terminalen Bereich, der einige wichtige Struktur- und Bindemotive enthält (siehe 3.1.2) und auch am C-Terminus der Proteine vorkommen.

Tab. 6: Prozent identischer Nukleotide und Aminosäuren in den Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des Filamentösen Hämagglutinins bei verschiedenen *Bordetella*-Arten

	<i>B. holmesii</i>	<i>B. pertussis</i>	<i>B. avium</i>	<i>B. petrii</i>
<i>B. holmesii</i>	---	45 %	58 %	41 %
	---	32 %	47 %	27 %
<i>B. pertussis</i>	45 %	---	45 %	44 %
	32 %	---	33 %	27 %
<i>B. avium</i>	58 %	45 %	---	41 %
	47 %	33 %	---	26 %
<i>B. petrii</i>	41 %	44 %	41 %	---
	27 %	27 %	26 %	---

Die Identität zwischen den Nukleotidsequenzen ist in grau, die Identität zwischen den Aminosäuresequenzen ist in schwarz angegeben.

3.1.2 Vergleichende Analysen von Struktur- und Bindedomänen der FhaB-Sequenzen aus *B. holmesii* und *B. pertussis*

Bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters ist der strukturelle Aufbau des FHA sowie die Beschaffenheit und Funktion der einzelnen Bindedomänen des Proteins sehr gut charakterisiert. Gerade die verschiedenen Bindeeigenschaften des FHA spielen für die Funktion des Proteins als Adhäsionsfaktor eine entscheidende Rolle. Um erste Hinweise auf die Bedeutung des FHA_{BH} als potentiellen Virulenzfaktor zu erhalten, sollte die FhaB-Aminosäuresequenz aus *B. holmesii* hinsichtlich bekannter Struktur- und Bindemotive analysiert und mit der Sequenz aus *B. pertussis* (FhaB_{BP}) verglichen werden. Zudem sollte festgestellt werden, inwieweit vorhandene Sequenzmotive konserviert geblieben sind.

3.1.2.1 Identifizierung von Signalsequenzen bei FhaB_{BH}

Wie unter 2.1 beschrieben, wird bei den „klassischen“ *Bordetella*-Arten das FHA-Vorläuferprotein (FhaB) über ein Sec-abhängiges Sekretionssystem durch die Cytoplasmamembran transportiert und anschließend im periplasmatischen Raum prozessiert (Lambert-Buisine *et al.*, 1998). Für den Sec-abhängigen Transport benötigt FhaB ein N-terminales Signalpeptid.

Durch die Analyse des N-terminalen Bereichs der FhaB_{BH}-Sequenz konnte festgestellt werden, dass das Protein aus *B. holmesii* eine zum FhaB aus *B. pertussis* ähnliche Signalpeptiddomäne besitzt. Diese besteht jeweils aus rund 70 Aminosäuren und gliedert sich typischerweise in eine positiv geladene Region und ein langes hydrophobes Segment auf. Interessanterweise stellen die jeweils ersten 25 Aminosäuren einen sogenannten N-terminalen Anhang dar, dessen Funktion allerdings noch unklar ist (Lambert-Buisine *et al.*, 1998). Laut Chevalier *et al.* (2004) könnte der N-terminale Anhang die Exportrate des Proteins beeinflussen, indem er durch die zeitliche Verzögerung der Translokation über die innere Membran an der Koordination des Proteintransports über zwei Membranen beteiligt ist. Die ungewöhnliche N-terminale Verlängerung des Signalpeptids wurde bereits bei einigen Sekretionsproteinen gefunden, wie z. B. bei HMW1 und HMW2, zwei Adhäsinen aus *Haemophilus influenzae* oder bei SepA, einer Autotransporter-Protease aus *Shigella flexneri* (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004). Sie besteht meist aus hydrophoben und aromatischen Aminosäuren und endet häufig mit der Konsensussequenz LIAVSELAR. Laut Spears *et al.*, (2003) enthält auch das FhaB-Protein aus *B. avium* ein erweitertes Signalpeptid, bestehend aus 72 Aminosäuren. Abbildung 12 zeigt die Zusammensetzung der N-terminalen Signalpeptide von HMW1 und SepA sowie von FhaB aus *B. pertussis*, *B. holmesii* und *B. avium*.

Beim Vergleich der Signalpeptide der FhaB-Proteine aus *B. pertussis* und *B. holmesii* konnten einige sehr ähnliche Bereiche mit zum Teil identischen Aminosäuren identifiziert werden. So sind beispielsweise im N-terminalen Anhang des FhaB beider Arten 15 von 25 AS identisch. Der positiv geladene Bereich des Signalpeptids kommt bei *B. holmesii*, genau wie bei *B. pertussis*, vorwiegend durch die Verwendung von Arginin (R) zustande. Daran schließt sich in beiden Fällen ein Segment aus hydrophoben Aminosäuren wie Leucin (L), Alanin (A) oder Valin (V) an. Eine weitaus größere Ähnlichkeit konnte jedoch zwischen den beiden FhaB-Signalpeptiden aus *B. holmesii* und *B. avium* festgestellt werden. Im N-terminalen Anhang dieser Signalpeptide sind hier 20 von 25 Aminosäuren identisch. Die sich anschließenden positiv geladenen Regionen beinhalten jeweils verhältnismäßig viele Arginin- und Lysin (L)-Reste. Laut Spears *et al.* (2003) wird das Signalpeptid aus *B. avium* nach der Aminosäure Serin an Position 72 abgespalten.

Bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters wird beim FhaB-Transport durch die innere Membran das Signalpeptid durch die TypI-Signalpeptidase abgespalten (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004). Im Allgemeinen erfolgt die Spaltung durch die Signalpeptidase häufig nach der Konsensussequenz „Ala-X-Ala“ (Carlos *et al.*, 2000). Für den Translokationsprozess an sich ist die Abspaltung des Signalpeptids jedoch nicht erforderlich (Mori und Ito, 2001). Bei *B. pertussis* erfolgt die Spaltung des Signalpeptids nach der Aminosäure Alanin an Position 71. Im FhaB-Protein aus *B. holmesii* befindet sich an Position 69-71 eine Ala-Gly-Ala-Sequenz, die als Konsensussequenz für eine Signalpeptid-Spaltung nach Ala-71 dienen könnte.

	N-terminaler Anhang	positiv geladene Region	hydrophobes Segment	C
HMW1	MN-KIYRLKFSKRLNALVA VELAR	GCDHSTKGGSEKPARMKVRHLALKP	LSAMLLSLGVT IPOS	VLA- SGL
SepA	MN-KIYYLK YCH I TKSLI AVSELAR	RVTCKSHRRLSRR	VILTSVAALSLSS AWP	ALS- ATV
FhaB.BP	MNTNLYRLVFS HVRGML VPVSE HCT	VGNTFCGRTRGOARSGARATS	LSVAPNALAWALMLACTGLPLV	THA- QGL
FhaB.BH	VNAS LYRLI FSKVLGMY VPVSEL KT	AGRRKGRRTAGGPPYRLRM	LSCALWLAFLGSGPAGAQTTPA	AGA-? ATT
FhaB.BA	VNAS LYRLV FSKILGMY VPIAE IKT	AGRKKSTRARRKLGVPVPRACR	LSSA I LLAFAIPDFAAAEVVAAN	NKS- AVI

Abb. 12: Darstellung der erweiterten Signalpeptide von verschiedenen Transportproteinen (modifiziert nach Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004)

Gezeigt ist die Zusammensetzung der N-terminalen Signalpeptide aus HMW1, einem Adhäsins aus *Haemophilus influenzae*, SepA, einer Autotransporter-Protease aus *Shigella flexneri* sowie die der FhaB-Proteine aus *B. pertussis* (FhaB.BP), *B. holmesii* (FhaB.BH) und *B. avium* (FhaB.BA). Konservierte Reste im N-terminalen Anhang sind fett gedruckt, positiv geladene Reste innerhalb der positiv geladenen Region sind unterstrichen. Der Pfeil kennzeichnet jeweils die Schnittstelle für die TypI-Signalpeptidase; für FhaB.BH wird eine mögliche Schnittstelle angegeben.

Das Filamentöse Hämagglutinin der „klassischen“ Bordetellen ist Teil eines TPS (two-partner secretion)-Systems, das aus dem sekretierten Protein TpsA (hier: FhaB) und dem Transporter-Protein TpsB (hier: FhaC) besteht. Ein besonderes Merkmal dieser „Zwei-Partner-Sekretionsysteme“ ist das Vorhandensein einer konservierten TPS-Domäne im TpsA-Protein (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004). Diese schließt sich an die N-terminale Signalpeptiddomäne an und umfasst etwa 250 Aminosäuren. Bei der Translokation von TpsA durch die äußere Membran spielt die TPS-Domäne eine entscheidende Rolle, da sie vermutlich mit einer Rezeptor-Region des Transporter-Proteins TpsB interagiert und somit den Proteintransport ermöglicht. Die TPS-Domäne enthält vor allem zwei hoch konservierte Bereiche, die im FhaB aus *B. pertussis* und vielen anderen bakteriellen Sekretionsproteinen, wie z. B. dem Cytolysin ShlA aus *Serratia marcescens* oder dem Adhäsins HecA aus *Erwinia chrysanthemi* vorkommen. Dazu gehören unter anderem die NPNL- und NPNGI-Domänen, deren ersten beiden Asparagin-Reste beispielsweise essentiell für die Sekretion von ShlA sind, während für die FHA-Sekretion in *B. pertussis* vor allem der erste Asparagin-Rest des NPNL-Motivs (Asn-66) unentbehrlich ist (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1997; Schönherr *et al.*, 1993). Neueste Ergebnisse belegen, dass außer Asn-66 auch noch Ser-32, Asn-49, Ser-86, Glu-93, Asn-118 und Met-225 für die FHA-Sekretion benötigt werden. Andere Reste, wie z. B. Asn-105 des NPNGI-Motivs, sind dagegen eher bei der Interaktion der TPS-Domäne mit dem FhaC-Protein von Bedeutung (Hodak *et al.*, 2006). Genannte Positionen beziehen sich auf die FHA-Aminosäuresequenz aus *B. pertussis*, die kein Signalpeptid mehr enthält. Durch Sequenzanalysen und -alignments konnte eine TPS-Domäne in der FhaB_{BH}-Sequenz identifiziert werden, die einige konservierte Bereiche enthält.

Zusätzlich zu den NPNL- und NPNGI-Motiven kommen auch alle von Hodak *et al.* (2006) identifizierten Reste, die für die FHA-Sekretion unentbehrlich sind, in der TPS-Domäne des *B. holmesii*-FhaB's vor. Somit kann FhaB aus *B. holmesii* die Eigenschaft als Sekretionsprotein zugesprochen werden. In Abbildung 13 ist ein Alignment der TPS-Domänen aus verschiedenen repräsentativen TpsA-Proteinen sowie aus den FhaB-Proteinen verschiedener *Bordetella*-Arten dargestellt.

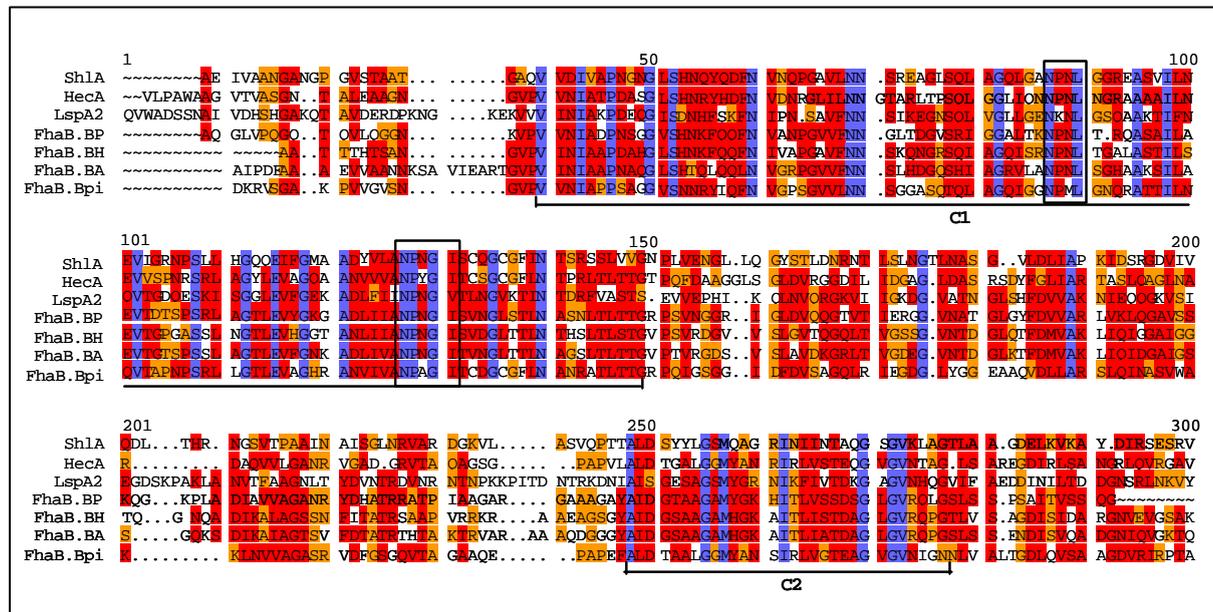


Abb. 13: Sequenzalignments der TPS-Domänen repräsentativer TpsA-Proteine sowie des FhaB-Proteins verschiedener *Bordetella*-Arten

ShlA: Cytolysin aus *Serratia marcescens*; HecA: Adhäsion aus *Erwinia chrysanthemi*, LspA2: Adhäsion aus *Haemophilus influenzae* (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004); C1 und C2 kennzeichnen die beiden hoch konservierten Bereiche innerhalb der TPS-Domänen. Die für die Sekretion wichtigen NPNL- und NPNGI-Motive sind durch einen Rahmen speziell hervorgehoben. BP: *B. pertussis*; BH: *B. holmesii*; BA: *B. avium*; Bpi: *B. petrii*

3.1.2.2 Analyse putativer Bindedomänen und anderer Proteindomänen bei FhaB_{BH}

Wie in der Einleitung unter 2.1 beschrieben, besitzt das FHA der „klassischen“ *Bordetella*-Arten mindestens drei unterschiedliche Bindeeigenschaften, die für die Anheftung der Bakterien an eukaryotische Wirtszellen verantwortlich sind (Arico *et al.*, 1993).

Die sogenannte Kohlenhydrat-Bindedomäne (CRD) ermöglicht die Adhäsion der Bordetellen an das Zilienepithel des oberen Respirationstrakts (Prasad *et al.*, 1993). Bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters erstreckt sich die Kohlenhydrat-Bindedomäne über die Aminosäure-Positionen 1141-1279. Anhand von BESTFIT-Analysen und CLUSTAL-Alignments der FhaB-Sequenzen aus *B. pertussis* und *B. holmesii* konnte im FhaB aus *B. holmesii* kein Bereich identifiziert werden, der Ähnlichkeiten mit der CRD aus FhaB_{BP} aufweist.

Über die Heparin-Bindedomäne (HBD; Positionen 442-862) können sich die „klassischen“ *Bordetella*-Arten an Epithelzellen ohne Zilien und an die extrazelluläre Matrix anlagern (Sato *et al.*, 1981; Hannah *et al.*, 1994). Die Heparin-Bindedomäne besteht aus einem sich mehrmals wiederholenden Sequenzmotiv von 19 Aminosäuren mit der Konsensussequenz

L X V X A/G G/X G/X A/X V/L X L/A X X L/A X S/A X G/X X (Colombi *et al.*, 2004).

Die Wiederholungssequenzen innerhalb der HBD von FhaB_{BP} entsprechen bis auf einige Ausnahmen dieser Konsensussequenz. Die FhaB-Sequenz aus *B. holmesii* wurde auf das angegebene Sequenzmotiv untersucht. Jedoch konnte kein Bereich identifiziert werden, der Wiederholungen dieses Sequenzmotivs oder Varianten davon enthält. Die Motivsuche über die PROSITE-Datenbank (<http://expasy.org/prosite>) lieferte ebenso keine Hinweise auf das Vorhandensein einer Heparin-Bindedomäne bzw. einer Kohlenhydrat-Bindedomäne im FhaB aus *B. holmesii*.

Die dritte Bindeeigenschaft des FHA der „klassischen“ *Bordetella*-Arten kommt durch das Sequenzmotiv Arg-Gly-Asp (RGD) zustande. Über dieses RGD-Motiv sind die Bakterien in der Lage, an CR3-Integrine zu binden, die sich beispielsweise auf Makrophagen befinden (Relman *et al.*, 1990). Das RGD-Motiv (Position 1097-1099) konnte in dieser Form nicht in der FhaB-Sequenz aus *B. holmesii* gefunden werden. Stattdessen kommen hier jedoch an Position 742-744 die Aminosäuren Lysin-Glycin-Asparaginsäure (KGD) vor. Lysin gehört wie Arginin zur Kategorie stark hydrophiler Aminosäuren mit basischen Seitenketten. Aus der Literatur ist bekannt, dass Proteine auch KGD-Motive anstelle von RGD-Motiven enthalten können und diese ebenfalls β 3-Integrine erkennen (Johansson, 1999; Mc Lane *et al.*, 1994; Nykvist *et al.*, 2001; Gorski *et al.*, 2003;).

An Position 2165 befindet sich im FhaB aus *B. pertussis* die Stelle, an der das FhaB-Protein prozessiert und somit zum reifen 220 kDa großen FHA-Protein umgewandelt wird. Über das Vorhandensein und die Position einer möglichen Schnittstelle im entsprechenden Bereich des FhaB-Proteins aus *B. holmesii* können keine Aussagen getroffen werden. Am C-terminalen Ende von FhaB_{BP} tauchen Prolin-reiche Wiederholungssequenzen auf, deren Bedeutung noch unbekannt ist. Im Allgemeinen wird Prolin-reichen Sequenzen eine Rolle bei der Verankerung von Proteinen in der Zellwand zugeschrieben (z. B. M-Protein aus *Streptococcus*, TonB aus *E. coli*; Domenighini *et al.*, 1990). Die in diesem Bereich bei FhaB_{BP} auftretende (Prolin-Lysin)₅-Sequenz kommt in der FhaB_{BH}-Sequenz nicht vor, allerdings enthält auch das Protein aus *B. holmesii* C-terminale Prolin-reiche Wiederholungssequenzen. In Abbildung 14 sind die FHA-Proteine aus *B. pertussis* und *B. holmesii* mit ihren Struktur- und Bindedomänen schematisch dargestellt.

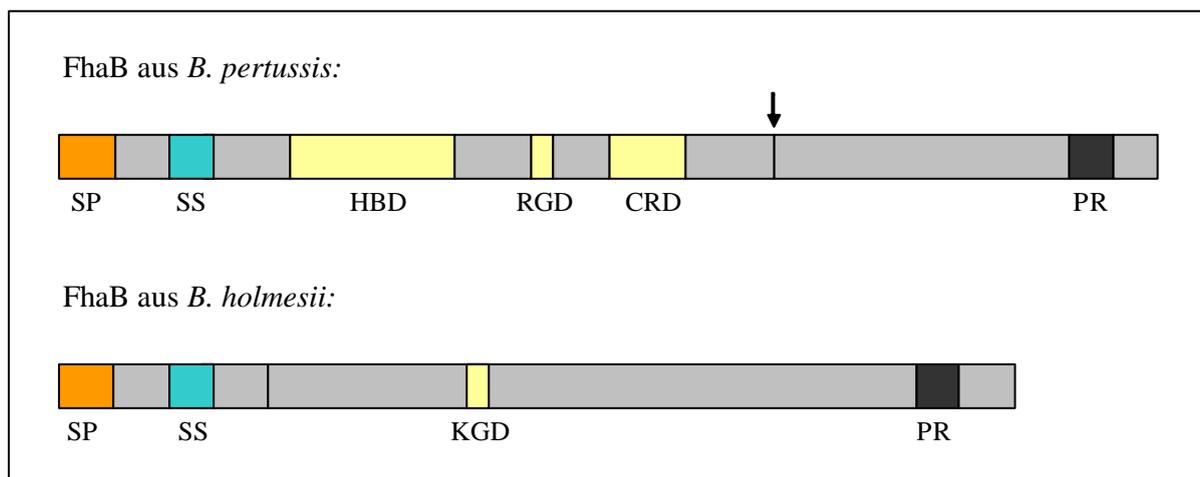


Abb. 14: Schematische Darstellung von FhaB aus *B. pertussis* und *B. holmesii* mit wichtigen Struktur- und Bindedomänen

Beide FhaB-Proteine enthalten ein Signalpeptid (SP) und die NPNL- und NPNGI-Signalsequenzen (SS). Die im FhaB aus *B. pertussis* enthaltene Heparin-Bindedomäne (HBD) und die Kohlenhydrat-Bindedomäne (CDR) konnten bei *B. holmesii* nicht identifiziert werden. Anstelle des RGD-Motivs enthält FhaB aus *B. holmesii* ein KGD-Motiv. Der Pfeil kennzeichnet bei FhaB aus *B. pertussis* die Stelle an der die C-terminale Prozessierung stattfindet. Am C-terminalen Ende treten bei FhaB aus *B. pertussis* und bei FhaB aus *B. holmesii* Prolin-reiche Repeats (PR) auf.

3.2 Untersuchungen zur Regulation des *fhaB*-Gens aus *B. holmesii*

Das Filamentöse Hämagglutinin gehört bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters zu den *vag*-Genen, deren Transkription unter nicht-modulierenden Bedingungen durch das BvgAS-System aktiviert wird. Durch die folgenden Experimente sollte untersucht werden, ob auch in *B. holmesii* das BvgAS-System (BvgAS_{BH}) für die *fhaB*-Expression eine Rolle spielt. Zudem sollte die Art und Weise einer möglichen *fhaB*_{BH}-Regulation durch BvgAS_{BH} näher charakterisiert werden.

3.2.1 Untersuchung des Einflusses von BvgAS_{BH} auf die *fhaB*_{BH}-Transkription

Durch die folgenden Versuche sollte festgestellt werden, ob in *B. holmesii* unter den üblichen Wachstumsbedingungen eine *fhaB*-Transkription stattfindet und ob eine mögliche *fhaB*-Transkription BvgAS_{BH}-abhängig ist.

Da *B. holmesii* schlecht in Flüssigkulturen wächst, wurden die beiden Stämme *B. holmesii* G7702 und *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan* grundsätzlich auf jeweils 4-5 BG-Blutplatten für 3 Tage bei 37 °C angezogen. Anschließend wurden die Bakterien geerntet, in 1 x PBS resuspendiert und 10 min bei 6000 rpm abzentrifugiert. Aus beiden Stämmen wurde jeweils die Gesamt-RNA isoliert und die restlichen Spuren von chromosomaler DNA durch mehrmaligen DNase-Verdau entfernt. Mittels Kontroll-PCR unter Verwendung der Oligonukleotide BvgStest1 und BvgStest2 wurde die Abwesenheit von DNA bei allen RNA-Proben sichergestellt. Die RNA wurde anschließend für Slotblot-Experimente eingesetzt. Diese ermöglichen die Identifizierung spezifischer RNA-Transkripte durch Hybridisierung mit einer entsprechenden markierten DNA-Sonde. Hierfür wurden je 20 µg der isolierten RNA der Stämme *B. holmesii* G7702, *B. holmesii* G8431, *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan*, der kein funktionsfähiges BvgA produziert und *B. avium* 1852 (Kontrolle) auf eine Nylonmembran aufgetragen und mit einer 430 bp großen *fhaB*_{BH}-Sonde hybridisiert. Die *fhaB*_{BH}-Sonde wurde durch PCR-Amplifikation mit Hilfe der Oligonukleotide *fhaSlot1* und *fhaSlot2* aus chromosomaler *B. holmesii* G7702-DNA erhalten. Die Transkriptionsstärke konnte anhand der detektierten Signale analysiert und verglichen werden. Im Anschluss wurde dieselbe Membran mit einer 16S-Sonde behandelt, um zu kontrollieren, ob vergleichbare RNA-Mengen eingesetzt wurden.

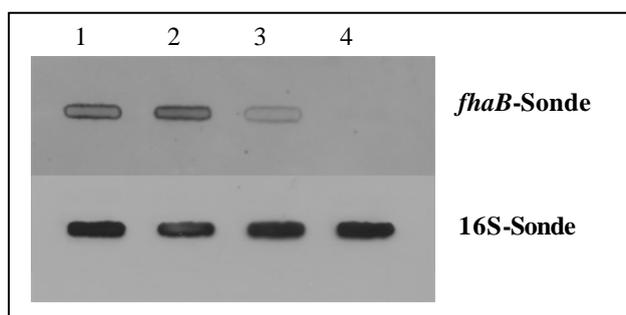


Abb. 15: Slotblot-Experiment zur Überprüfung der *fhaB*_{BH}-Transkription in *B. holmesii* G7702 und *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan*

Je 20 µg der RNA aus *B. holmesii* G7702 (Spur 1), *B. holmesii* G8431 (Spur 2), *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan* (Spur 3) und *B. avium* 1852 (Spur 4) wurden auf eine Nylonmembran aufgetragen und mit einer *fhaB*_{BH}-spezifischen Sonde bzw. einer 16S-Sonde hybridisiert.

Wie der Abbildung 15 zu entnehmen ist, konnten bei beiden wildtypischen *B. holmesii*-Isolaten starke Signale detektiert werden, während das Signal bei der BvgA-Mutante von *B. holmesii* deutlich schwächer ausfiel. Der Kontrollstamm *B. avium* 1852 zeigte - wie erwartet - kein Signal. Bei Hybridisierung der RNA-Proben mit der 16S-Sonde unterschieden sich die Signalstärken bei den einzelnen Stämmen nicht, so dass hiermit der Einsatz gleicher RNA-Mengen nachgewiesen werden konnte. Somit wurde gezeigt, dass *fhaB* in *B. holmesii* unter den üblichen Wachstumsbedingungen (bei 37 °C auf BG-Blutplatten) transkribiert wird. Das im Vergleich zu den beiden *B. holmesii*-Wildtypen schwache Hybridisierungssignal der BvgA-Mutante weist zudem auf eine niedrige Transkriptionsrate des *fhaB_{BH}*-Gens in Abwesenheit von BvgA_{BH} hin. Eine Aktivierung der *fhaB_{BH}*-Transkription durch das BvgA_{BH}-System kann somit angenommen werden.

3.2.2 Untersuchung der *in vitro*-DNA-Bindeeigenschaften des Response Regulators BvgA_{BH} an die *fhaB_{BH}*-upstream-Region

3.2.2.1 Gelretardations-Experimente

Die Slotblot-Ergebnisse (siehe 3.2.1) lassen eine Aktivierung der *fhaB_{BH}*-Transkription durch BvgA_{BH} vermuten. Das BvgA-Protein der „klassischen“ *Bordetella*-Arten ist ein DNA-Bindeprotein, das sich in seiner phosphorylierten Form über ein Helix-Turn-Helix-Motiv an *bvg*-abhängige Promotoren anlagert (Arico *et al.*, 1989; Boucher *et al.*, 1994; Marques und Carbonetti, 1997).

Durch folgende Gelretardations-Experimente sollte deshalb die Bindefähigkeit des BvgA_{BH}-Proteins an die *fhaB_{BH}*-upstream-Region sowie die Abhängigkeit einer möglichen Bindung vom Phosphorylierungsstatus des Proteins untersucht werden. Hierfür wurde zunächst mit Hilfe der Oligonukleotide *fhaBamHI/gfp1* und *fhaXbaI1* ein 277 bp großes DNA-Fragment von chromosomaler DNA aus *B. holmesii* G7702 amplifiziert, welches die *fhaB_{BH}*-upstream-Region enthält. Das gereinigte PCR-Produkt wurde anschließend radioaktiv markiert. Der von Gabriele Gerlach gereinigte Response Regulator BvgA_{BH} aus *B. holmesii* (His₆-BvgA_{BH}) wurde in geeigneten Verdünnungen eingesetzt. Ein Ansatz wurde vor Zugabe der Sonde jeweils mit 50 mM Acetylphosphat versetzt, während parallel dazu ein weiterer Ansatz ohne Acetylphosphat mit der Sonde inkubiert wurde. Die Ansätze wurden anschließend über ein natives Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und dieses schließlich autoradiografisch ausgewertet.

Wie auf Abbildung 16 zu erkennen ist, konnte für die nicht-phosphorylierte Form von BvgA_{BH} kein Protein-DNA-Komplex nachgewiesen werden. Die phosphorylierte Form des Response Regulators aus *B. holmesii* scheint jedoch in der Lage zu sein, an die *fhaB_{BH}*-upstream-Region zu binden, denn bei einer Konzentration von 650 ng an phosphoryliertem BvgA_{BH} (Spur 8) ist eine Protein-DNA-Komplexbildung deutlich zu erkennen.

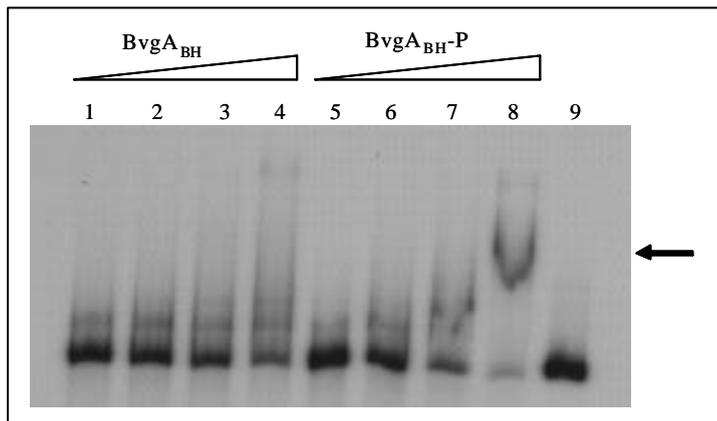


Abb. 16: Gelretardations-Experiment zur Überprüfung der DNA-Bindeeigenschaft des Response Regulators BvgA aus *B. holmesii* an die *fhaB_{BH}*-upstream-Region

15.000 cpm der Sonden-DNA (Spur 9) wurden jeweils mit 150, 350, 500 und 650 ng His₆-BvgA_{BH} in Abwesenheit von Acetylphosphat (Spuren 1-4) und in Anwesenheit von Acetylphosphat (Spuren 5-8) jeweils 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf ein 4%iges natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Dieses wurde nach der Elektrophorese autoradiographisch ausgewertet. Der Pfeil kennzeichnet den Protein-DNA-Komplex.

Durch Kompetitions-Experimente konnte gezeigt werden, dass die Bindung von BvgA_{BH} an den *fhaB_{BH}*-upstream-Bereich spezifisch erfolgt. Als spezifischer Kompetitor wurde das unmarkierte 277 bp große *fhaB_{BH}*-upstream-Fragment eingesetzt, welches mit den Oligonukleotiden *fhaBamHI/gfp1* und *fhaXbaI1* aus chromosomaler DNA von *B. holmesii* G7702 amplifiziert wurde. Mit Hilfe der Oligonukleotide Unspez.3 und Unspez.4 wurde aus dem 3'-Bereich des *fhaB_{BH}*-Gens ein 183 bp großes DNA-Fragment amplifiziert. Dieses stellte den unspezifischen Kompetitor dar. In den Bindeansätzen wurden je 700 ng phosphoryliertes BvgA_{BH} mit einem jeweils zunehmenden Überschuss an entweder spezifischer oder unspezifischer Kompetitor-DNA inkubiert. Wie auf Abbildung 17 zu erkennen ist, führt die Inkubation mit dem spezifischen Kompetitor in steigender Konzentration zu einer Abnahme der Bandenintensität. Bereits bei einer Konzentration von 20 x mehr unmarkierter Sonde (Spur 4) nimmt die Signalintensität der Protein-DNA-Bindung deutlich ab. Wurde 100 x mehr unmarkierte Sonde eingesetzt (Spur 6), so ist keine Komplexbildung zwischen BvgA_{BH} und markierter *fhaB_{BH}*-upstream-Sonde mehr erkennbar. Im Gegensatz dazu ist selbst bei 300-fachem Überschuss an unspezifischem Kompetitor (Spur 12) kaum eine Verdrängung von BvgA_{BH} aus dem Protein-DNA-Komplex zu beobachten.

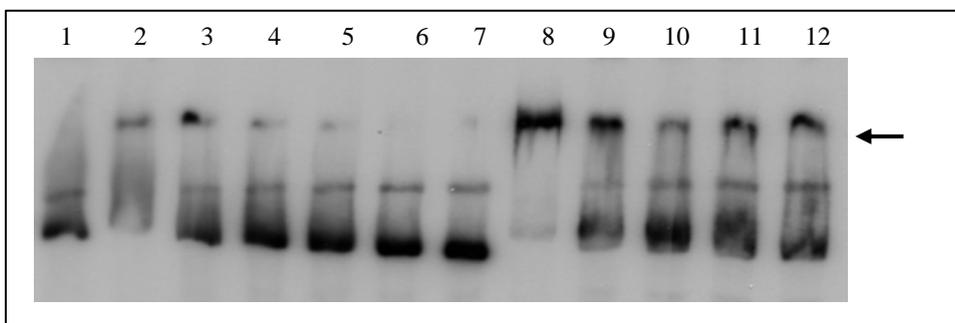


Abb. 17: Kompetitions-Experiment mit spezifischem und unspezifischem Kompetitor im Überschuss zur Überprüfung der Spezifität der BvgA_{BH}-Bindung an den *fhaB_{BH}*-upstream-Bereich

15.000 cpm der Sonden-DNA (Spur 1) wurden mit je 700 ng BvgA_{BH}-Protein in Anwesenheit von 0x, 5x, 20x, 50x, 100x und 200x mehr (Spur 2-7) spezifischem unmarkiertem Kompetitor und in Anwesenheit von 0x, 20x, 100x, 200x und 300x mehr (Spur 8-12) unspezifischem Kompetitor für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Elektrophorese der Ansätze in einem 4%igen nativen Polyacrylamidgel wurde dieses autoradiographisch ausgewertet. Der Pfeil kennzeichnet den Protein-DNA-Komplex.

3.2.2.2 DNaseI-Footprint-Experimente

Die Bindeeigenschaft des Response Regulators BvgA_{BH} an die *fhaB_{BH}*-upstream-Region sollte mittels der Methode des DNaseI-Footprints bestätigt werden. Zudem sollte durch diese Versuche der Bereich der BvgA_{BH}-Bindung innerhalb der *fhaB_{BH}*-upstream-Region lokalisiert werden.

Als Sonde für den DNaseI-Footprint wurde ein 312 bp großes DNA-Fragment gewählt, welches mit den beiden Oligonukleotiden FP1/*Bam*HI und FP2/*Hind*III von chromosomaler DNA aus *B. holmesii* G7702 amplifiziert wurde. Der amplifizierte DNA-Bereich erstreckt sich von +29 bis -283 bezüglich des *fhaB_{BH}*-Translationsstarts und enthält somit 283 bp der 346 bp umfassenden *fhaB_{BH}*-upstream-Region (siehe Abb. 18). Über die PCR-Reaktion wurde an das 5'-Ende des DNA-Fragments eine *Bam*HI-Schnittstelle und an das 3'-Ende eine *Hind*III-Schnittstelle angefügt. Das PCR-Fragment wurde nach einem Doppelverdau in das Plasmid pSK kloniert, wodurch das Plasmid pSK-FP entstand. Zur Sondenmarkierung wurde das Plasmid pSK-FP zunächst über einen *Bam*HI-Verdau linearisiert und anschließend dephosphoryliert. Nach radioaktiver Markierung des freien 5'-Endes des DNA-Fragments wurde dieses durch einen *Hind*III-Verdau von der Vektor-DNA freigesetzt.

Unterschiedliche Mengen des gereinigten, mit Acetylphosphat phosphorylierten Response-Regulators BvgA aus *B. holmesii* (BvgA_{BH}-P) wurden mit der radioaktiv markierten *fhaB_{BH}*-upstream-Sonde inkubiert. Anschließend wurde ein 1-minütiger DNaseI-Verdau der Proben durchgeführt und diese nach Phenol/Chloroform-Fällung auf ein 4%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Längenstandard für die Gelelektrophorese wurde eine G+A-Sequenzierungsreaktion nach Maxam und Gilbert (1977) mit aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel autoradiographisch ausgewertet.

Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, tritt ab der Zugabe von 2000 ng BvgA_{BH}-P (Spur 6) ein verändertes Bandenmuster auf. Ein etwa 200 bp großer DNA-Abschnitt, der in etwa den Bereich von -40 bis -243 relativ zum *fhaB_{BH}*-Translationsstart umfasst, scheint hier vor dem DNaseI-Verdau geschützt zu sein. Das veränderte Bandenmuster erscheint recht abrupt, denn bei der Zugabe von 1000 ng BvgA_{BH}-P (Spur 5) ist noch keine Musteränderung zu erkennen. Interessanterweise treten innerhalb dieser geschützten Region in regelmäßigen Abständen hypersensitive Banden auf. Auffällig ist auch, dass im Bereich von ca. -40 bis ca. -120 bezüglich des *fhaB_{BH}*-Translationsstartpunktes die Abstände zwischen den Banden kleiner werden, verglichen mit den Bandenabständen im Bereich -120 bis -243. Der vor dem DNase-Verdau geschützte Sequenzbereich innerhalb der *fhaB_{BH}*-upstream-Region wird schematisch in Abbildung 18 und detailliert in Abbildung 25 unter 3.2.5 dargestellt.

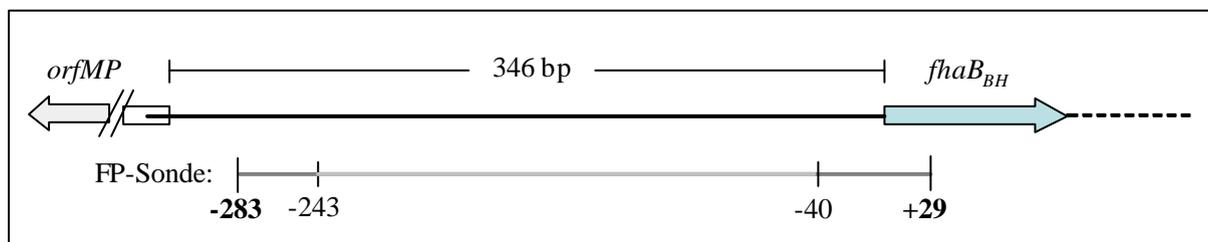


Abb. 18: Schematische Darstellung der für die DNaseI-Footprint-Experimente eingesetzte DNA-Sonde aus der *fhaB_{BH}*-upstream-Region

Die fettgedruckten Zahlen geben die Begrenzungen der Footprint-Sonde (FP-Sonde) bezüglich des *fhaB_{BH}*-Startcodons an. Der hellgraue Bereich innerhalb der FP-Sonde kennzeichnet den vor dem DNaseI-Verdau geschützten Bereich, die Zahlen geben die ungefähren Begrenzungen des geschützten Bereichs an.

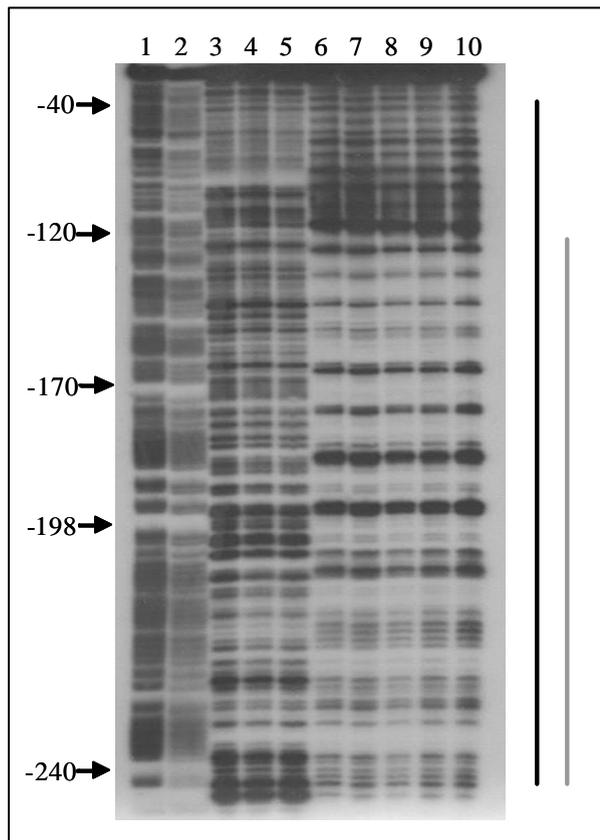


Abb. 19: DNaseI-Footprint von BvgA_{BH}-P die *fhaB_{BH}*-upstream-Region

Ein 312 bp großes *Bam*HI/*Hind*III-Fragment, das 283 bp der *fhaB_{BH}*-upstream-Region beinhaltet, wurde mit verschiedenen Mengen an phosphoryliertem BvgA_{BH}-P für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In den Proben der Spuren 3-10 wurden 0, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 6000 und 8000 ng BvgA_{BH}-P zugegeben. Die Zahlen auf der linken Seite geben die Nukleotidposition bezüglich des *fhaB_{BH}*-Translationsstartpunktes an. Der schwarze Balken auf der rechten Seite kennzeichnet den etwa 200 bp umfassenden geschützten DNA-Bereich innerhalb der *fhaB_{BH}*-upstream-Region. Der graue Balken zeigt den DNA-Bereich mit den verhältnismäßig großen Abständen zwischen den hypersensitiven Banden. In Spur 1 und 2 wurde jeweils eine G+A-Sequenzierungsreaktion nach Maxam und Gilbert (1977) aufgetragen.

3.2.3 Analyse der *fhaB_{BH}*-Expression durch Konstruktion einer *fhaB_{BH}*-Promotor-Reportergenfusion

Mittels Gelretardations- und DNaseI-Footprint-Experimenten konnte die Bindefähigkeit von BvgA_{BH} an den *fhaB*-upstream-Bereich aus *B. holmesii* nachgewiesen werden. Eine *fhaB_{BH}*-Promotor-Reportergenfusion eignet sich, um die *in vivo*-Relevanz der BvgA_{BH}-Bindung zu analysieren. Zudem sollte die BvgA_{BH}-abhängige Expression von *fhaB_{BH}* auf Proteinebene bestätigt werden. Da hierfür kein FHA_{BH}-spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, sollte das „green fluorescent protein“ (GFP) als Marker für die *fhaB_{BH}*-Expression dienen.

Das promotorlose *gfp*-Gen wurde über einen *Xba*I/*Hind*III-Verdau aus dem Plasmid pKEN isoliert. Ein 277 bp großes DNA-Fragment, das die *fhaB_{BH}*-Promotor-Region (*fhaP_{BH}*) enthält, wurde mit den Primern *fhaBam*HI/*gfp*1 und *fhaXba*I durch eine PCR von chromosomaler DNA aus *B. holmesii* G7702 amplifiziert. Über die Oligonukleotide wurde am 5'-Ende des PCR-Produkts eine *Bam*HI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *Xba*I-Schnittstelle eingefügt.

Nach einem Doppelverdau mit diesen beiden Enzymen wurde das DNA-Fragment (265 bp) zusammen mit dem *gfp*-Gen in den *Bam*HI/*Hind*III-geschnittenen Vektor pSK ligiert, wodurch das Plasmid pSK-*fhaP_{BH}-gfp* entstand. In pSK-*fhaP_{BH}-gfp* befindet sich die Reporterengenfusion in gleicher Orientierung wie der vektoreigene *lac*-Promotor, weshalb das Konstrukt in *E. coli* zu einer starken GFP-Expression führt (siehe Abb. 21 Spur 4). Über einen *Bam*HI/*Hind*III-Verdau wurde nun die Reporterengenfusion in den pMMB208-Vektor in inverser Orientierung zu dem vektoreigenen *tac*-Promotor umklontiert, wodurch das Plasmid pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp* entstand (siehe Abb. 20). Der *fhaB*-Promotor aus *Bordetella* kann von der RNA-Polymerase aus *E. coli* in Abwesenheit des *bvg*-Locus nicht aktiviert werden (Miller *et al.*, 1989), weshalb dieses Konstrukt in *E. coli* zu keiner GFP-Expression führt. Der entsprechende Stamm wurde als Negativkontrolle für die nachfolgenden Experimente eingesetzt (siehe Abb. 21 Spur 3). Der pMMB208-Vektor ist ein „broad-host-range“-Vektor, der im Gegensatz zu dem pSK-Vektor auch in *Bordetellen* replizieren kann. Mit Hilfe des Donorstammes *E. coli* SM10 wurde das Plasmid pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp* in die Stämme *B. holmesii* G7702 und *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* konjugiert.

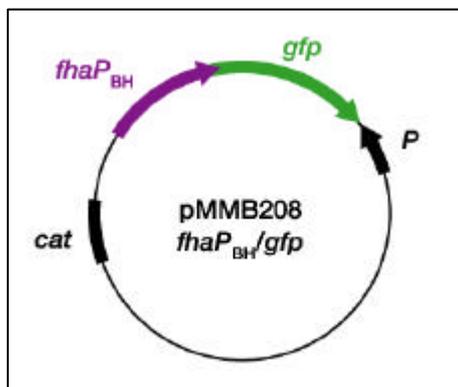


Abb. 20: Schematische Darstellung des Konstruktes pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp*

Gezeigt ist die Fusion des *fhaB_{BH}*-Promotors (*fhaP_{BH}*) mit dem Reportergen *gfp* innerhalb des pMMB208-Vektors. Der schwarze Pfeil gibt die Orientierung des vektoreigenen *tac*-Promotors an; *cat* bezeichnet das Chloramphenicol-Resistenzgen des Vektors

Um das Ausmaß der GFP-Expression bei den einzelnen Stämmen bestimmen zu können, wurden Westernblot-Experimente durchgeführt. Hierfür wurden die aus den Konjugationen hervorgegangenen Stämme zunächst auf BG-Blutplatten mit Streptomycin und Chloramphenicol (*cat*) ausgestrichen und 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien geerntet, in 1 x PBS resuspendiert und jeweils auf eine Zellzahl von $1,4 \times 10^8$ eingestellt. Die daraus hergestellten Proteinlysate wurden über ein 12%iges Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit einem polyklonalen GFP-Antikörper inkubiert.

Wie auf Abbildung 21 zu sehen ist, zeigt die *BvgA*-Mutante von *B. holmesii* eine im Gegensatz zum Wildtyp verminderte GFP-Expression. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass es im Wildtyp aufgrund der Bindung von *BvgA_{BH}* an den *fhaB_{BH}*-Promotor zu einer verstärkten Transkription und Expression des *fhaB_{BH}*-Gens kommt.

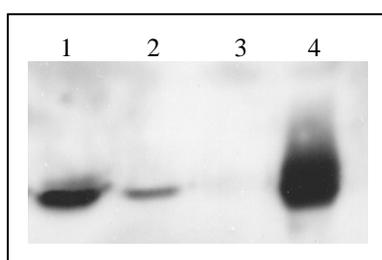


Abb. 21: Westernblot-Experiment zum Nachweis der GFP-Expression

SDS-PAGE-Proben der einzelnen *B. holmesii*-Lysate wurden auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit einem GFP-spezifischen Antiserum inkubiert. Die sichtbaren Banden entsprechen dem GFP-Protein. *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp*; Spur 1), *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* (pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp*; Spur 2), *E. coli* (pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp*; Spur 3), *E. coli* (pSK-*fhaP_{BH}-gfp*; Spur 4)

3.2.4 Kartierung von Transkriptionsstartpunkten innerhalb der *fhaB_{BH}*-Promotorregion

Die *fhaB*-Transkription erfolgt bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters von dem *bvg*-abhängigen Promotor *PfhaB*, dessen Transkriptionsstartpunkt 70 bp vor dem *fhaB*-Startcodon lokalisiert ist. Zusätzlich konnte in *B. pertussis in vitro* ein *bvg*-unabhängiger *fhaB*-Promotor identifiziert werden, dessen Startpunkt sich 130 bp vor dem *fhaB*-Startcodon befindet. Es ist jedoch bislang nicht bekannt, ob dieser Promotor *in vivo* existiert bzw. eine Rolle spielt (Boucher *et al.*, 1997).

Um Transkriptionsstartpunkte innerhalb der *fhaB_{BH}*-Promotorregion zu identifizieren, wurden Primerextension-Experimente durchgeführt. Hierfür wurde Gesamt-RNA aus den beiden unter 3.2.3 beschriebenen Stämmen *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp*) und *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* (pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp*) isoliert. Die Stämme wurden zunächst auf mehrere BG-Blutagarplatten mit Streptomycin und Chloramphenicol ausgestrichen und 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Das Bakterienmaterial wurde anschließend von den Platten geerntet, in 1 x PBS resuspendiert und abzentrifugiert. Als Oligonukleotid für die Primerextension-Experimente wurde *gfp*.PE eingesetzt, das an RNA des *gfp*-Gens hybridisieren kann. Für die Sequenzierreaktion wurde das Konstrukt pSK-*fhaP_{BH}-gfp* verwendet.

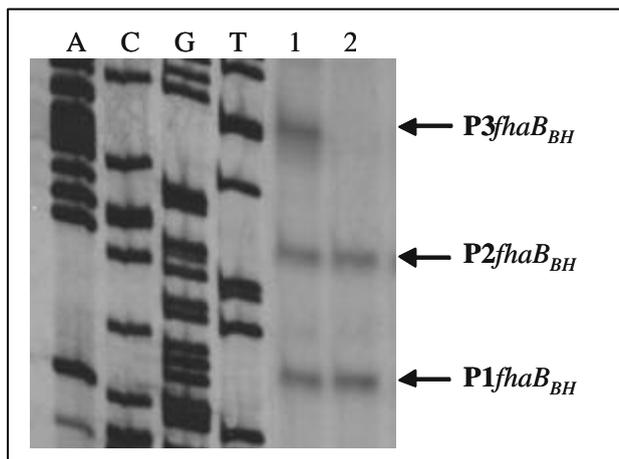


Abb. 22: Primerextension-Experiment zur Kartierung von Transkriptionsstartpunkten innerhalb der *fhaB_{BH}*-Promotorregion

Gesamt-RNA wurde von *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp*; Spur 1) und *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* (pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp*; Spur 2) isoliert und je 30 µg der RNA mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid *gfp*.PE hybridisiert. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die drei Transkriptionsstartpunkte P1, P2 und P3, die in der *fhaB_{BH}*-Promotorregion detektiert wurden. Für die Sequenzierungsreaktion wurde das Oligonukleotid *gfp*.PE und das Plasmid pSK-*fhaP_{BH}-gfp* benutzt. Die Positionen der Transkriptionsstartpunkte innerhalb der *fhaB_{BH}*-upstream-Sequenz sind in Abbildung 23 angegeben.

Wie der Abbildung 22 zu entnehmen ist, konnten für beide *B. holmesii*-Stämme zwei Transkriptionsstartpunkte, P1 und P2, identifiziert werden. Diese befinden sich 58 bzw. 71 Nukleotide vor dem *fhaB_{BH}*-Startcodon. Zusätzlich konnte beim wildtypischen Stamm von *B. holmesii* G7702 ein dritter Transkriptionsstartpunkt, P3, nachgewiesen werden. Dieser 88 bp vor dem *fhaB_{BH}*-Startcodon lokalisierte Promotor P3 konnte bei *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan*, also in Abwesenheit von *BvgA_{BH}*, nicht detektiert werden. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass es sich bei P1 und P2 um konstitutiv aktive Promotoren handelt, während P3 vermutlich *BvgA_{BH}*-abhängig aktiviert wird. In Abbildung 23 sind die Positionen der mittels Primerextension-Experimente identifizierten Transkriptionsstartpunkte innerhalb der *fhaB_{BH}*-Promotorregion dargestellt.

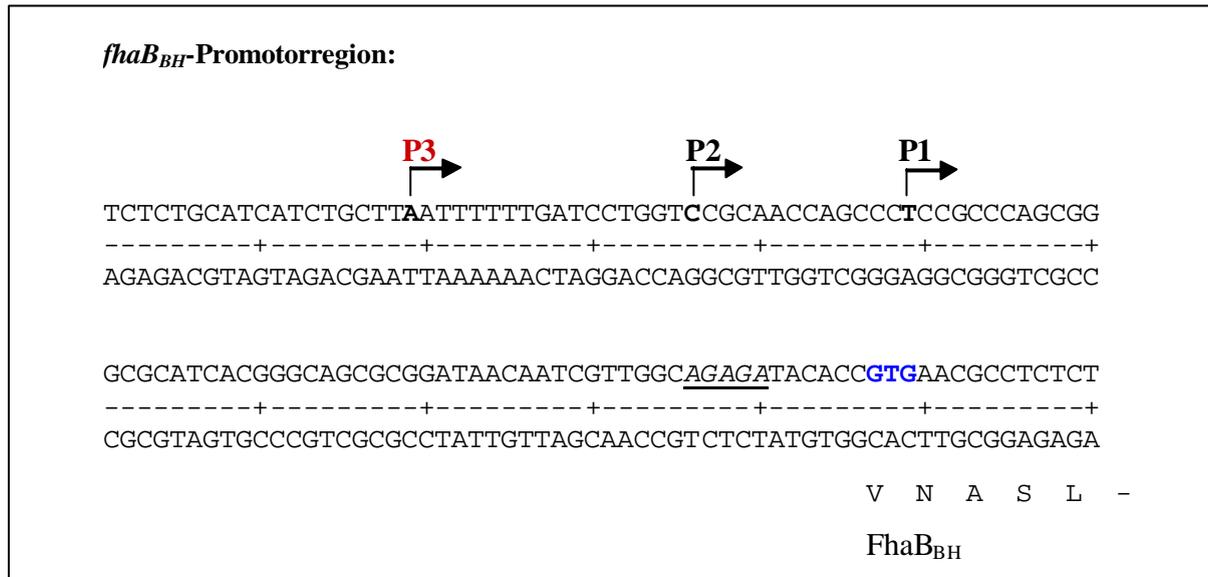


Abb. 23: Darstellung der Transkriptionsstartpunkte P1, P2 und P3 innerhalb der *fhaB_{BH}*-Promotorregion
 Die Transkriptionsstartpunkte des *fhaB_{BH}*-Gens wurden durch Primerextension-Experimente (siehe Abb. 22) ermittelt und befinden sich 58 (P1), 71 (P2) und 88 (P3) Basenpaare vor dem *fhaB_{BH}*-Startcodon (blau hervorgehoben und unterstrichen). P1 und P2 sind konstitutiv aktiv, während P3 vermutlich durch BvgA_{BH} aktiviert wird. Gezeigt ist zudem die potentielle Shine-Dalgarno-Sequenz, welche kursiv dargestellt ist.

3.2.5 *In silico*-Analyse der *fhaB_{BH}*-upstream-Region aus *B. holmesii*

Anhand von Gelretardations- und DNaseI-Footprint-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass der Response Regulator BvgA_{BH} in der Lage ist, an die Promotorregion des *fhaB*-Gens aus *B. holmesii* zu binden. Zudem konnte mittels Primerextension-Experimenten ein *bvg*-abhängiger Transkriptionsstart innerhalb der *fhaB_{BH}*-Promotorregion identifiziert werden. Bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters enthalten die *bvg*-abhängigen Promotoren der Virulenzgene bestimmte Sequenzmotive, die als BvgA-Bindestellen dienen. Die Konsensussequenz einer BvgA-Bindestelle lautet 5'- T/A T T C C/T T A -3'. Diese Sequenzen oder Varianten davon sind entweder als „direct-repeat“- oder „inverted-repeat“-Strukturen mit unterschiedlichen Abständen zwischen den beiden Halbseiten angeordnet (Roy und Falkow, 1991; Karimova und Uhlmann, 1997; Marques und Carbonetti, 1997).

Durch *in silico*-Analysen sollte die *fhaB_{BH}*-upstream-Region auf das Vorhandensein solcher Sequenzmotive untersucht werden. Hierbei konnten mehrere DNA-Bereiche identifiziert werden, die Übereinstimmungen mit der BvgA-Konsensussequenz aufweisen (siehe Abb. 24). Zum einen wurde ein Sequenzmotiv mit Ähnlichkeit zu einer „direct-repeat“-Struktur gefunden (BS1), wobei pro Halbseite fünf bzw. sechs Nukleotide mit der Konsensussequenz übereinstimmen. Zwischen den beiden Halbseiten befindet sich ein aus drei Nukleotiden bestehender Abstand. Zusätzlich wurden drei mögliche BvgA_{BH}-Bindestellen identifiziert (BS2-4), die jeweils Übereinstimmungen zur „inverted-repeat“-Struktur der BvgA-Konsensussequenz aufweisen. Die Halbseiten dieser Sequenzmotive enthalten jeweils zwischen drei und fünf Nukleotide, die mit der Konsensussequenz übereinstimmen. Vergleicht man die Positionen dieser möglichen BvgA_{BH}-Bindestellen mit den Positionen der BvgA-Bindestellen innerhalb der *fhaB*-Promotorregion aus *B. pertussis*, so lassen sich auch hier gewisse Übereinstimmungen feststellen. Innerhalb der *fhaB*-Promotor-Region aus *B. pertussis* erstrecken sich die beiden sekundären BvgA-Bindestellen über die Positionen -35 bis -80 relativ zum Transkriptionsstartpunkt (siehe Abb. 5).

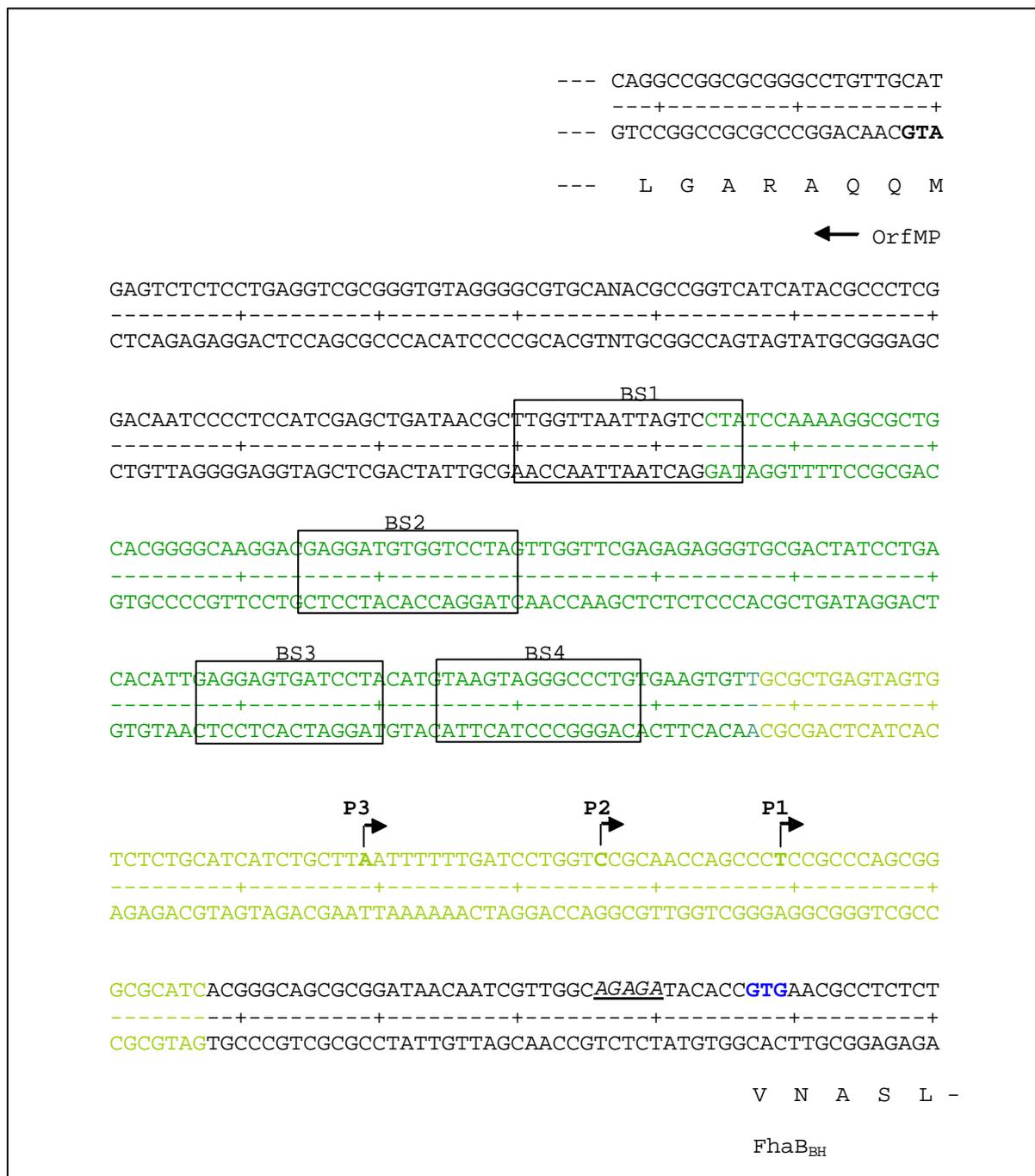


Abb. 25: Zusammenfassung der Ergebnisse über die *in silico*- und *in vitro*-Analysen der *fhaB_{BH}*-upstream-Region

Gezeigt ist die *fhaB_{BH}*-upstream-Region. Der *in vitro* durch die BvgA_{BH}-Bindung vor einem DNaseI-Verdau geschützte DNA-Bereich wird durch die dunkel- und hellgrün gefärbten Nukleotide dargestellt. Die hellgrün gefärbten Nukleotide stellen den DNA-Bereich dar, welcher im DNaseI-Footprint-Experiment ein gegenüber dem dunkelgrünen DNA-Bereich verändertes Bandenmuster aufweist (siehe 3.2.2.2). Die dunkelgrün markierte Region enthält drei (BS2-4) der durch *in silico*-Analysen identifizierten potentiellen BvgA_{BH}-Bindestellen (siehe 3.2.5), welche jeweils in einem Rechteck eingefasst sind. Zudem sind die Positionen der in 3.2.4 ermittelten Transkriptionsstartpunkte P1-P3 angegeben. OrfMP bezeichnet den Leserahmen für ein konserviertes Membranprotein (siehe 2). Dieses wird in entgegengesetzte Richtung zum *fhaB_{BH}* transkribiert. Die potentielle Shine-Dalgarno-Sequenz ist kursiv hervorgehoben und unterstrichen.

3.2.6 Charakterisierung putativer Bvg_{A_{BH}}-Bindestellen innerhalb der *fhaB_{BH}*-upstream-Region

Durch *in silico*-Analysen konnten innerhalb der *fhaB_{BH}*-upstream-Region vier potentielle Bvg_{A_{BH}}-Bindestellen identifiziert werden, die Übereinstimmungen zu der Konsensussequenz für BvgA-Bindung aufweisen (siehe 3.2.5). Bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters besitzen die BvgA-Bindestellen, die innerhalb der upstream-Region eines Virulenzgens liegen, unterschiedliche Funktionen. So enthält die *fhaB*-upstream-Region aus *B. pertussis* beispielsweise fünf BvgA-Bindestellen, von denen jedoch nur drei für die Aktivierung der *fhaB*-Transkription eine Rolle spielen. Diese drei BvgA-Bindestellen werden wiederum in eine primäre Bindestelle mit hoher Affinität für BvgA und zwei sekundäre Bindestellen mit niedrigerer BvgA-Affinität unterteilt (Boucher *et al.*, 2001a; Kinnear *et al.*, 1999). Durch die nachfolgenden Experimente sollte die Bedeutung der einzelnen potentiellen Bvg_{A_{BH}}-Bindemotive für die Aktivierung der *fhaB_{BH}*-Expression in *B. holmesii* untersucht werden.

3.2.6.1 Bindestudien zur Charakterisierung möglicher Bvg_{A_{BH}}-Bindestellen

Um die Bedeutung der einzelnen möglichen Bvg_{A_{BH}}-Bindestellen innerhalb der *fhaB_{BH}*-upstream-Region zu überprüfen, wurde zunächst die Bindeeffizienz von Bvg_{A_{BH}} an diese DNA-Bereiche mittels Gelretardations-Experimenten untersucht. Hierfür wurden verschiedene DNA-Sonden aus dem *fhaB_{BH}*-upstream-Bereich amplifiziert (siehe Abb. 26), radioaktiv markiert und anschließend jeweils mit ansteigenden Mengen des phosphorylierten His₆-Bvg_{A_{BH}}-Proteins inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend über ein natives Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und dieses schließlich autoradiografisch ausgewertet.

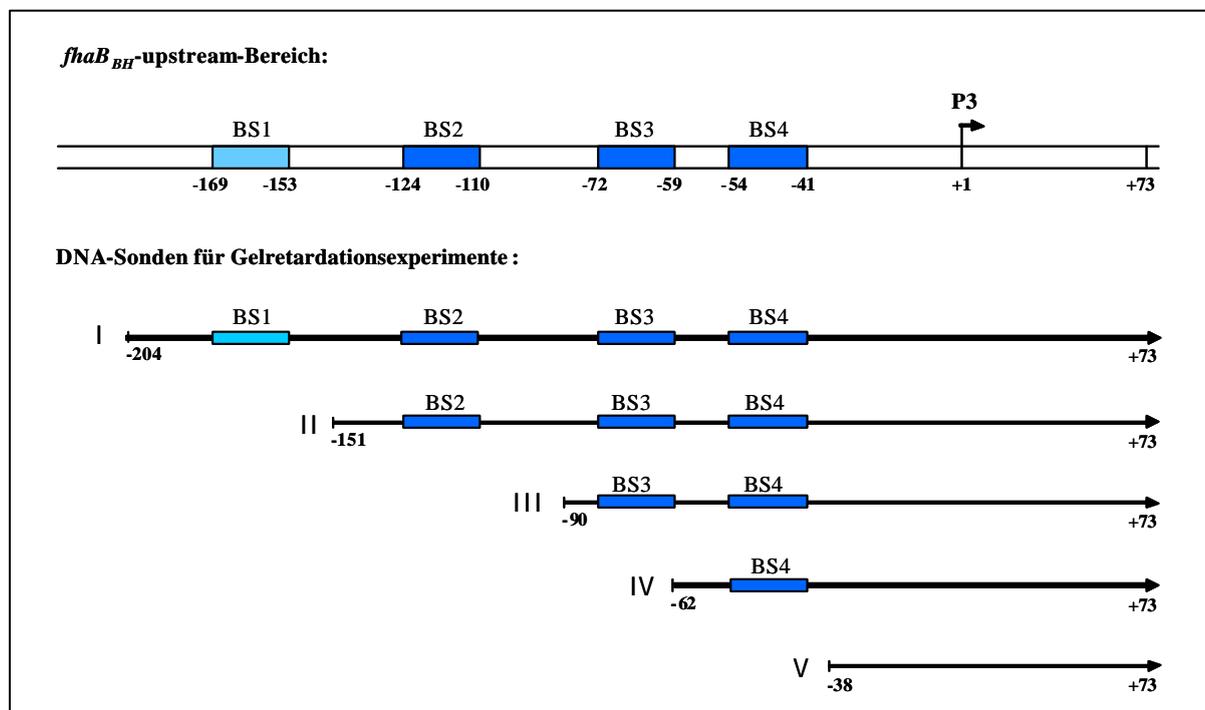


Abb. 26: Schematische Darstellung des *fhaB_{BH}*-upstream-Bereichs mit Positionen der möglichen Bvg_{A_{BH}}-Bindestellen und Präsentation der für die Gelretardations-Experimente verwendeten DNA-Sonden.

Die potentiellen Bvg_{A_{BH}}-Bindestellen werden als BS1-4 bezeichnet. Die römischen Zahlen I-V benennen die fünf unterschiedlichen DNA-Sonden, welche mittels PCR aus dem *fhaB_{BH}*-upstream-Bereich amplifiziert und für die Gelretardations-Experimente eingesetzt wurden. Die Zahlen am Anfang und am Ende der schematisch dargestellten DNA-Sonden geben jeweils die Größe des umfassten DNA-Bereichs an.

Die über eine PCR-Reaktion mit Hilfe der Oligonukleotide *fhaBamHI/gfp1* und *fhaXbaI1* hergestellte Sonde I enthält alle vier potentiellen Bvg_{A_{BH}}-Bindestellen und entspricht der in 3.2.2.1 eingesetzten DNA-Sonde. Wie auf Abbildung 27 zu sehen ist, konnte ein Protein-DNA-Komplex bei einer Konzentration von 500 ng Bvg_{A_{BH}}-P detektiert werden (Spur 5). Auch die mit den Primern *fhaBamHI/gfp3* und *fhaXbaI1* erzeugte Sonde II, der das erste potentielle Bindemotiv BS1 fehlt, führte zur Ausbildung des Protein-DNA-Komplexes bei einer Konzentration von 500 ng Bvg_{A_{BH}}-P (Spur 10). Dagegen konnte bei Verwendung von Sonde III (Amplifikation mit Oligonukleotiden *fhaB5NEU* und *fhaXbaI1*) ein Protein-DNA-Komplex erst ab einer Konzentration von 700 ng Bvg_{A_{BH}}-P nachgewiesen werden (Spur 14). Die Sonde III enthält nur die beiden „inverted-repeat“-ähnlichen Strukturen BS3 und BS4. Bei Verwendung von Sonde IV (PCR-Amplifikation über *fhaB6NEU* und *fhaXbaI1*) konnte ebenso wie bei Sonde V (PCR-Amplifikation über *fhaBamHI/gfp6* und *fhaXbaI1*) kein Protein-DNA-Komplex detektiert werden, obwohl bis zu 800 ng Bvg_{A_{BH}}-P eingesetzt wurden.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der phosphorylierte Response Regulator Bvg_{A_{BH}} mit der größten Effizienz an BS2 bindet, während BS3 bereits mit geringerer Effizienz von Bvg_{A_{BH}} gebunden wird, da hier eine größere Bvg_{A_{BH}}-P-Menge zur Komplexbildung benötigt wird. Für die Sonde IV, die nur BS4 enthält, konnte im Gel zwar ein Schmier, aber kein klarer Protein-DNA-Komplex detektiert werden. BS4 scheint somit nicht oder nur mit einer sehr geringen Effizienz von Bvg_{A_{BH}} gebunden zu werden. Auf eine mögliche Bvg_{A_{BH}}-Bindung von BS1 lieferten diese Versuche keinen Hinweis.

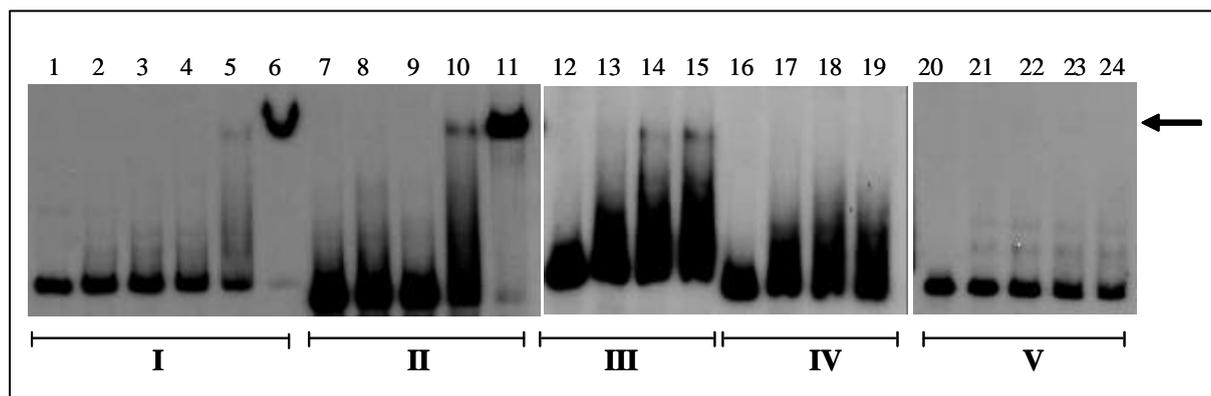


Abb. 27: Gelretardations-Experimente zur Untersuchung der Bindeeffizienz von Bvg_{A_{BH}} an die innerhalb der *fhaB_{BH}*-upstream-Region lokalisierten potentiellen Bvg_{A_{BH}}-Bindestellen BS1-4

15.000 cpm der DNA-Sonde I (Spur 1), III (Spur 12), IV (Spur 16) und V (Spur 20) wurden mit 150 ng (Spur 2 und 7), 300 ng (Spur 3 und 8), 400 ng (Spur 4 und 9), 500 ng (Spur 5, 10, 13, 17 und 21), 600 ng (Spur 22), 700 ng (Spur 6, 11, 14, 18 und 23) und 800 ng (Spur 15, 19 und 24) Bvg_{A_{BH}} inkubiert. Die Proben wurden in einem 4%igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und das Gel anschließend autoradiographisch ausgewertet. Der Pfeil kennzeichnet die entsprechenden Protein-DNA-Komplexe.

3.2.6.2 Charakterisierung der potentiellen Bvg_{A_{BH}}-Bindestellen mit Hilfe von verschiedenen *fhaB_{BH}*-Promotor-Reportergenfusionen

Die Bedeutung der potentiellen Bvg_{A_{BH}}-Bindestellen innerhalb der *fhaB_{BH}*-upstream-Region sollte mittels *fhaB_{BH}*-Transkriptions und Expressionsstudien untersucht werden. Durch die nachfolgenden Experimente, welche Karin Schmitt im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt hat, sollte geprüft werden, welche Auswirkungen die Abwesenheit einzelner potentieller Bvg_{A_{BH}}-Bindemotive auf die Transkription bzw. Expression von *fhaB_{BH}* hat.

Hierfür wurden mittels PCR verschieden große DNA-Bereiche aus der *fha*_{BH}-upstream-Region amplifiziert, die jeweils eine unterschiedliche Anzahl der möglichen Bvg_A_{BH}-Bindestellen enthalten und somit den unter Abbildung 26 dargestellten Sonden I-V entsprechen. Die PCR-Produkte wurden jeweils an den durch die entsprechenden Primer eingeführten *Bam*HI- und *Xba*I-Schnittstellen verdaut und, wie unter 3.2.3 beschrieben, zusammen mit dem *gfp*-Gen zunächst in pSK und letztendlich in pMMB208 kloniert, wodurch die Konstrukte pMMB208-*fha*P_{BH}-*gfp*1-6 entstanden. Die hierfür verwendeten Oligonukleotidpaare sowie die Größe der *fha*_{BH}-Promotorfragmente (*fha*P_{BH}1-6) und die jeweils enthaltenen potentiellen Bvg_A_{BH}-Bindestellen sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tab. 7: Charakterisierung der für die Reporterfusionen eingesetzten *fha*_{BH}-Promotorfragmente *fha*P1-6 (modifiziert nach K. Schmitt)

<i>fha</i> P _{BH} -Fragment	Primer forward	Primer reverse	Größe <i>fha</i> P (bp) nach <i>Bam</i> HI- <i>Xba</i> I-Verdau	potentielle Bvg _A _{BH} -Binde motive	Konstrukt
<i>fha</i> P1	fhaBamHI/gfp2	fhaXbaI	426	BS1, BS2, BS3, BS4	pMMB208 <i>fha</i> P- <i>gfp</i> 1
<i>fha</i> P2	fhaBamHI/gfp3	fhaXbaI	212	BS2, BS3, BS4	pMMB208 <i>fha</i> P- <i>gfp</i> 2
<i>fha</i> P3	fhaBamHI/gfp4	fhaXbaI	156	BS3, BS4	pMMB208 <i>fha</i> P- <i>gfp</i> 3
<i>fha</i> P4	fhaBamHI/gfp5	fhaXbaI	134	BS4	pMMB208 <i>fha</i> P- <i>gfp</i> 4
<i>fha</i> P5	fhaBamHI/gfp1	fhaXbaI2	198	BS1, BS2, BS3, BS4	pMMB208 <i>fha</i> P- <i>gfp</i> 5
<i>fha</i> P6	fhaBamHI/gfp6	fhaXbaI	99	---	pMMB208 <i>fha</i> P- <i>gfp</i> 6

Das Promotorfragment *fha*P5 wurde so gewählt, dass von den drei Transkriptionsstartpunkten P1, P2 und P3 nur der *bvg*-abhängige Promotor P3 enthalten sein sollte. Die Konstrukte pMMB208-*fha*P-*gfp*1-6 wurden durch Konjugation aus *E. coli* SM10 in *B. holmesii* G7702 eingebracht. Zusätzlich wurde pMMB208-*fha*P-*gfp*5 in *B. holmesii* G7702 *bvgA*::*kan* eingebracht, um die Auswirkungen der Bvg_A_{BH}-Abwesenheit speziell anhand des *bvg*-abhängigen Promotors P3 untersuchen zu können.

Anhand von Primerextension-Experimenten sollte die Auswirkung der Abwesenheit einzelner möglicher Bvg_A_{BH}-Bindestellen auf die *fha*_{BH}-Transkription untersucht werden. Wie in 3.2.4 gezeigt, sind drei verschiedene Promotoren P1-P3 für die Transkription von *fha*B in *B. holmesii* verantwortlich, wobei P3 *bvg*-abhängig aktiviert wird. Für die Primerextension-Analysen wurde Gesamt-RNA aus den Stämmen *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fha*P-*gfp*2), *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fha*P-*gfp*3), *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fha*P-*gfp*4), *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fha*P-*gfp*6) sowie aus den beiden unter 3.2.3 beschriebenen Stämmen *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fha*P_{BH}-*gfp*) und *B. holmesii* G7702 *bvgA*_{BH}::*kan* (pMMB208-*fha*P_{BH}-*gfp*) isoliert. Die beiden unter 3.2.3 beschriebenen Stämme wurden im Abschnitt 3.2.4 zur Identifizierung der Transkriptionsstartpunkte eingesetzt und sollten hier als Positivkontrollen dienen. Als Oligonukleotid wurde *gfp*.PE, für die Sequenzierreaktion das Konstrukt pSK-*fha*P_{BH}-*gfp* (siehe 3.2.3) verwendet.

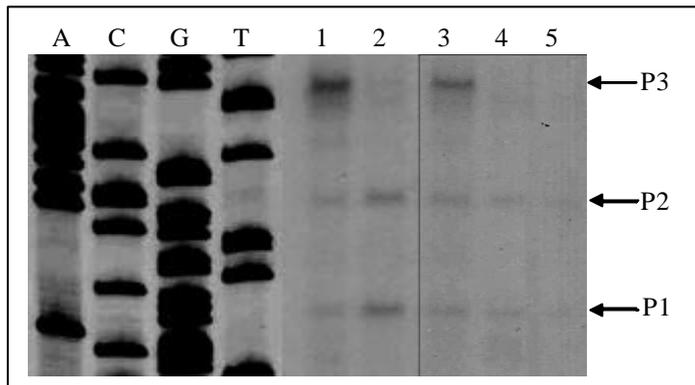


Abb. 28: Primerextension-Experiment zur Charakterisierung der *fhaB_{BH}*-upstream-Region (modifiziert nach K. Schmitt)

Gesamt-RNA wurde von *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP_{BH}*-*gfp*; Spur 1), *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* (pMMB208-*fhaP_{BH}*-*gfp*; Spur 2), *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP*-*gfp3*; Spur 3), *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP*-*gfp4*; Spur 4) und *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP*-*gfp6*; Spur 5) isoliert und je 30 µg der RNA mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid *gfp*.PE hybridisiert. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die drei Transkriptionsstartpunkte P1, P2 und P3. Für die Sequenzierungsreaktion wurde das Oligonukleotid *gfp*.PE und das Plasmid pSK-*fhaP_{BH}*-*gfp* benutzt. Die Positionen der Transkriptionsstartpunkte innerhalb der *fhaB_{BH}*-upstream-Region sind in Abbildung 23 angegeben.

Wie auf Abbildung 28 zu erkennen ist, konnte die Anwesenheit der drei Transkriptionsstartpunkte P1-3 in der *fhaB_{BH}*-upstream-Region beim Kontrollstamm *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP_{BH}*-*gfp*; Spur 1) und die Abwesenheit von P3 bei *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan* (pMMB208-*fhaP_{BH}*-*gfp*; Spur 2) bestätigt werden. Die Positionen der Transkriptionsstartpunkte innerhalb der *fhaB_{BH}*-upstream-Region sind in Abbildung 23 dargestellt. Weiterhin konnte für *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP*-*gfp3*; Spur 3) sowie für *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP*-*gfp2*; nicht gezeigt) ein deutliches Signal für alle drei Startpunkte erhalten werden. Das Promotorfragment *fhaP3* aus dem Konstrukt pMMB208-*fhaP*-*gfp3* enthält nur die potentiellen BvgA_{BH}-Bindestellen BS3 und BS4 und entspricht somit Sonde III in Abbildung 26. Das starke P3-Signal bei diesem Stamm zeigt, dass die Anwesenheit von BS3 und BS4 für eine BvgA_{BH}-Aktivierung der *fhaB_{BH}*-Transkription ausreichend ist. Im Gegensatz dazu wurden sowohl für *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP*-*gfp4*; Spur 4) als auch für *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP*-*gfp6*; Spur 5) ausschließlich die beiden P1- und P2-Signale detektiert. Die Anwesenheit von BS4 alleine ist also für eine Aktivierung der *fhaB_{BH}*-Transkription durch BvgA_{BH} nicht mehr ausreichend. Die Abwesenheit aller vier möglichen BvgA_{BH}-Bindestellen in pMMB208-*fhaP*-*gfp6* führte erwartungsgemäß zum Ausbleiben des P3-Signals.

Um die Auswirkung der Abwesenheit einzelner möglicher BvgA_{BH}-Bindestellen auf die *fhaB_{BH}*-Expression auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Westernblot-Experimente mit den *B. holmesii* G7702-Stämmen, die die Konstrukte pMMB208-*fhaP*-*gfp1-6* enthalten, durchgeführt. Zusätzlich sollte anhand der Stämme *B. holmesii* G7702 und *B. holmesii* G7702 *bvgA_{BH}::kan*, die beide das Konstrukt pMMB208-*fhaP*-*gfp5* mit allen vier möglichen BvgA_{BH}-Bindestellen enthalten, die BvgA_{BH}-Aktivierung der *fhaB_{BH}*-Expression bestätigt werden. Die Bakterien wurden jeweils auf eine Zellzahl von $1,4 \times 10^8$ eingestellt, die Proteinlysate über ein 12%iges Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit einem polyklonalen GFP-Antikörper inkubiert.

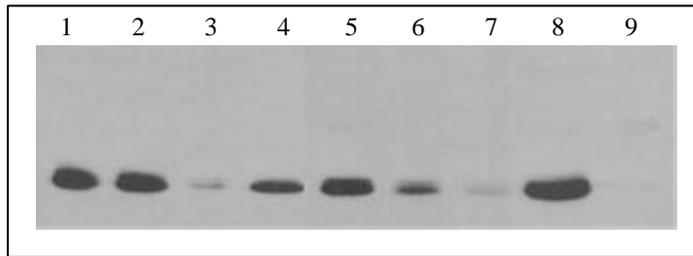


Abb. 29: Westernblot-Experiment zum Nachweis der GFP-Expression (modifiziert nach K. Schmitt)

SDS-PAGE-Proben der einzelnen *B. holmesii*-Lysate wurden auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit einem GFP-spezifischen Antiserum inkubiert. Die sichtbaren Banden entsprechen dem GFP-Protein. Spur 1: *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP-gfp1*); Spur 2: *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP-gfp5*); Spur 3: *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan* (pMMB208-*fhaP-gfp5*); Spur 4: *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP-gfp2*); Spur 5: *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP-gfp3*); Spur 6: *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP-gfp4*); Spur 7: *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP-gfp6*); Spur 8: *E. coli* (pSK-*fhaP_{BH}-gfp*; Positivkontrolle); Spur 9: *E. coli* (pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp*; Negativkontrolle)

Die Abbildung 29 zeigt, dass sowohl bei *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP-gfp1*; Spur 1) als auch bei *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP-gfp5*; Spur 2), die beide alle vier möglichen BvgA_{BH}-Bindemotive beinhalten, ein starkes GFP-Signal detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigt *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan* (pMMB208-*fhaP-gfp5*; Spur 3) eine sehr schwache GFP-Expression. Die BvgA_{BH}-Abhängigkeit der Fha_{BH}-Expression konnte somit bestätigt werden, allerdings zeigt das schwache GFP-Signal, dass in diesem Stamm eine BvgA_{BH}-unabhängige GFP-Expression stattfindet. Dies lässt darauf schließen, dass bei der Konstruktion von pMMB208-*fhaP-gfp5* die beiden konstitutiven Promotoren P1 und P2 nicht vollständig ausgegrenzt werden konnten.

Die einigermaßen starken GFP-Signale bei *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP-gfp2*; Spur 4) und *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP-gfp3*; Spur 5) deuten darauf hin, dass die Abwesenheit von BS1 bzw. von BS1 und BS2 keinen Einfluss auf die *bvg*-abhängige Aktivierung der Fha_{BH}-Expression hat. Die Anwesenheit von BS3 und BS4 scheint hierfür also ausreichend zu sein. Ist jedoch nur noch BS4 vorhanden, so kann offensichtlich keine effiziente BvgA_{BH}-Aktivierung der Fha_{BH}-Expression mehr stattfinden, wie durch das schwache GFP-Signal bei *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP-gfp4*; Spur 6) zu erkennen ist. Das Promotorfragment *fhaP6* enthält keine der vier möglichen BvgA_{BH}-Bindestellen. Der entsprechende Stamm *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP-gfp6*; Spur 7) zeigt eine kaum detektierbare GFP-Expression, die vermutlich auf die konstitutive Aktivierung von P1 und P2 zurückzuführen ist.

Sowohl durch die Primerextension- als auch durch die Westernblot-Experimente konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit der beiden potentiellen BvgA_{BH}-Bindestellen BS3 und BS4 für die BvgA_{BH}-abhängige Aktivierung der *fha_{BH}*-Expression erforderlich und ausreichend ist. Die alleinige Anwesenheit von BS4 führte zu keiner effizienten Aktivierung der *gfp*-Expression. Die unter 3.2.6.1 beschriebenen Gelretardations-Experimente bestätigen diese Ergebnisse insofern, als dass die alleinige Anwesenheit von BS4 (Sonde IV) nicht zur Ausbildung eines DNA-Protein-Komplexes führte, während bei Anwesenheit von BS3 und BS4 eine Bindung von BvgA_{BH} an die entsprechende Sonde (III) festgestellt wurde. Eine besondere Bedeutung der möglichen BvgA_{BH}-Bindestelle BS2, die laut Gelretardations-Experimente am effizientesten von BvgA_{BH} gebunden wird, konnte durch die hier beschriebenen Versuche nicht herausgestellt werden.

3.3 Untersuchungen zur Regulation von *fhaB_{BH}* in *B. pertussis*

Durch *in silico*-Analysen der *fhaB_{BH}*-upstream-Region konnten vier Sequenzmotive identifiziert werden, die Ähnlichkeiten zur BvgA-Konsensussequenz der „klassischen“ *Bordetella*-Arten aufweisen (siehe 3.2.5). Durch Binde- und Expressionsstudien (siehe 3.2.2 und 3.2.3) konnte gezeigt werden, dass BvgA_{BH} an die *fhaB_{BH}*-upstream-Region binden und die Expression von *fhaB_{BH}* aktivieren kann. Durch die folgenden Experimente sollte untersucht werden, ob auch das BvgAS-System aus *B. pertussis* (BvgAS_{BP}) in der Lage ist, die *fhaB_{BH}*-Expression zu aktivieren.

3.3.1 Analyse der *fhaB_{BH}*-Expression mittels der *fhaB_{BH}*-Promotor-Reporterfusion

Zur Untersuchung der *fhaB_{BH}*-Expression in *B. pertussis* wurde das in 3.2.3 beschriebene Plasmid pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp* verwendet, welches eine Fusion zwischen der *fhaB_{BH}*-Promotorregion und dem promotorlosen *gfp*-Gen besitzt. Mit Hilfe des Donorstammes *E. coli* SM10 wurde dieses Plasmid in den *B. pertussis*-Wildtyp-Stamm BP TI und in den phasenvarianten Stamm BP 359 konjugiert. Der Stamm BP 359 besitzt eine Transposoninsertion im *bvgA*-Gen und kann somit kein funktionsfähiges BvgA-Protein synthetisieren. Die aus der Konjugation hervorgegangenen Stämme BP TI (pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp*) und BP 359 (pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp*) wurden in Flüssigkulturen bis zu einer OD von 0,8 angezogen. Daraus hergestellte Proteinlysate wurden über ein 12%iges Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran gebロットet und mit einem polyklonalen GFP-Antikörper inkubiert. Auf Abbildung 30 ist zu sehen, dass es im Stamm BP TI (pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp*; Spur 3) zu einer starken GFP-Expression kommt, während bei Abwesenheit von BvgA_{BP} im Stamm BP 359 (pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp*; Spur 4) nur sehr wenig GFP-Protein detektiert werden konnte. Das Ergebnis zeigt, dass die *fhaB_{BH}*-Expression auch durch das BvgAS-System aus *B. pertussis* aktiviert werden kann. Interessanterweise scheint in *B. pertussis* nur eine sehr schwache *bvgBP*-unabhängige *fhaB_{BH}*-Expression stattzufinden, wie in Spur 4 des Westernblots zu erkennen ist.

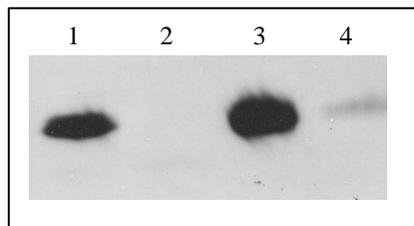


Abb. 30: Westernblot-Experiment zum Nachweis der GFP-Expression

SDS-PAGE-Proben der einzelnen *B. pertussis*-Lysate wurden auf eine Nitrocellulosemembran gebロットet und mit einem GFP-spezifischen Antiserum inkubiert. Die sichtbaren Banden entsprechen dem GFP-Protein. *E. coli* (pSK-*fhaP_{BH}-gfp*; Spur 1), *E. coli* (pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp*; Spur 2), *B. pertussis* BP TI (pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp*; Spur 3), *B. pertussis* BP 359 (pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp*; Spur 4)

3.3.2 Kartierung von *fhaB_{BH}*-Transkriptionsstartpunkten in *B. pertussis*

Anhand von *fhaB_{BH}*-Expressionsstudien in *B. pertussis* BP TI (pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp*) und BP 359 (pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp*) konnte eine BvgAS_{BP}-abhängige *fhaB_{BH}*-Expression bei diesen Stämmen nachgewiesen werden (siehe 3.3.1). Mittels Primerextension-Experimenten sollte untersucht werden, ob die für die *fhaB_{BH}*-Promotorregion in *B. holmesii* beschriebenen Transkriptionsstartpunkte (siehe 3.2.4) auch in *B. pertussis* auftreten. Hierfür wurde zunächst Gesamt-RNA aus den *B. pertussis*-Stämmen isoliert, bei denen über die Westernblot-Experimente eine starke (BP TI (pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp*)) bzw. sehr schwache (BP 359 (pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp*)) GFP-Expression nachgewiesen werden konnte. Als Oligonukleotid für die Primerextension-Experimente wurde *gfp*.PE eingesetzt und für die Sequenzierreaktion wurde pSK-*fhaP_{BH}-gfp* verwendet.

In Abbildung 31 ist zu erkennen, dass für den Stamm *BP* TI (pMMB208-*fhaP_{BH}*-*gfp*) zwei Transkriptionsstartpunkte innerhalb der *fhaB_{BH}*-Promotorregion detektiert werden konnten. Diese befinden sich an den gleichen Positionen wie die beiden Promotoren P1 und P3 (58 bp und 88 bp vor dem *fhaB_{BH}*-Startcodon), die auch für *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP_{BH}*-*gfp*) nachgewiesen wurden. Interessanterweise fehlt hier sowie auch in *BP* 359 (pMMB208-*fhaP_{BH}*-*gfp*) das Signal für den konstitutiv aktiven Promotor P2. Für den Stamm *BP* 359 (pMMB208-*fhaP_{BH}*-*gfp*) konnte nur das P1-Signal erhalten werden. Demnach findet die *fhaB_{BH}*-Transkription in *B. pertussis* sowohl in An- als auch in Abwesenheit von BvgA_{BP} über nur einen konstitutiven Promotor (P1) statt, während im *B. pertussis*-Wildtyp die *fhaB_{BH}*-Transkription zusätzlich durch BvgA_{BP} aktiviert wird (P3). Das durch die Westernblot-Experimente unter 3.3.1 erhaltene Ergebnis konnte dadurch bestätigt werden.

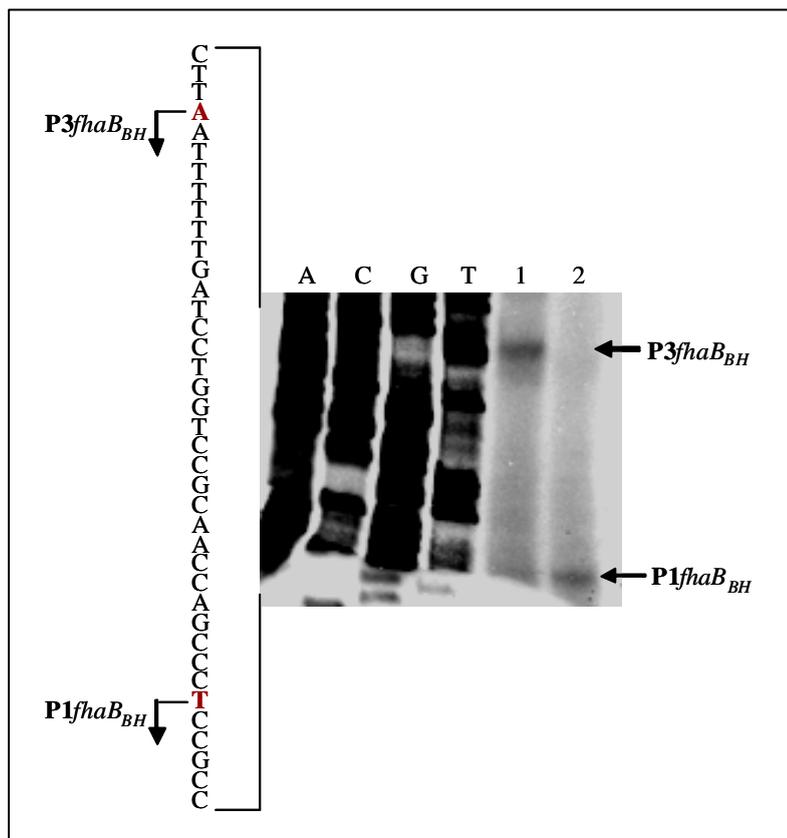


Abb. 31: Primerextension-Experiment zur Kartierung von Transkriptionsstartpunkten innerhalb der *fhaB_{BH}*-Promotorregion in *B. pertussis*

Gesamt-RNA wurde von *BP* TI (pMMB208-*fhaP_{BH}*-*gfp*; Spur 1) und *BP* 359 (pMMB208-*fhaP_{BH}*-*gfp*; Spur 2) isoliert und je 20 µg der RNA mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid *gfp*.PE hybridisiert. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die zwei Transkriptionsstartpunkte P1 und P3, die in der *fhaB_{BH}*-Promotorregion detektiert wurden. Für die Sequenzierungsreaktion wurde das Oligonukleotid *gfp*.PE und das Plasmid pSK-*fhaP_{BH}*-*gfp* benutzt. Ein Teil der *fhaB_{BH}*-Promotorsequenz ist links in der Abbildung dargestellt, wobei die Positionen der Transkriptionsstartpunkte P1 und P3 jeweils durch einen schwarzen Pfeil angegeben sind.

3.4 Funktionelle Analyse von FHA_{BH}

3.4.1 Konstruktion einer fha_{BH} -Deletionsmutante von *B. holmesii* G7702

Um die biologische Bedeutung der FHA-Expression für *B. holmesii* näher charakterisieren zu können, wurde eine fha_{BH} -Deletionsmutante des Stammes *B. holmesii* G7702 hergestellt. Hierbei sollten 4650 bp des fha_{BH} -Gens aus dem Chromosom deletiert werden. Zunächst wurde das Plasmid pSORTP1- $fha_{BH}1/2$ konstruiert. Hierfür wurden zwei fha_{BH} -Fragmente von chromosomaler DNA aus *B. holmesii* G7702 amplifiziert. Mit den Oligonukleotiden $fhaM/EcoRI$ und $fhaM/PstI1$ wurde ein 351 bp großes Fragment hergestellt (PCR-Produkt 1), während die Oligonukleotide $fhaM/PstI2$ und $fhaM/BamHI$ für die Amplifikation eines 342 bp großen Fragments (PCR-Produkt 2) eingesetzt wurden. PCR-Produkt 1 wurde anschließend mit den beiden Restriktionsenzymen *EcoRI* und *PstI*, PCR-Produkt 2 mit *PstI* und *BamHI* verdaut. Danach wurden beide DNA-Fragmente in den mit *EcoRI* und *BamHI* geschnittenen pSK-Vektor kloniert, wodurch das Plasmid pSK- $fha_{BH}1/2$ entstand. Das 693 bp große $fha_{BH}1/2$ -Fragment wurde über einen *EcoRI/BamHI*-Doppelverdau in den pSORTP1-Vektor umklontiert, wodurch das Plasmid pSORTP1- $fha_{BH}1/2$ entstand. Dieses Plasmid wurde dann mit Hilfe des Donorstammes *E. coli* SM10 in *B. holmesii* G7702 konjugiert. Die Rekombinationsereignisse sind in Abbildung 33 schematisch dargestellt.

Die Selektion der *B. holmesii*-Konjuganden erfolgte auf BG-Blutplatten mit Spectinomycin und Gentamycin. Sieben Klone wurden anschließend daraufhin überprüft, ob eine Integration des Plasmids in das Chromosom stattgefunden hatte. Hierfür wurde mit Hilfe der Oligonukleotide $fha/Chr.1$ und pSORT/2 eine PCR-Analyse durchgeführt. Für die Klone, bei denen ein „single-cross-over“ (sco) nach Möglichkeit 1 stattgefunden hat, war ein 860 bp großes PCR-Fragment zu erwarten. Bei Klonen, die das Plasmid nach Möglichkeit 2 integriert haben, sollte dagegen unter gleichen PCR-Bedingungen kein Produkt entstehen. Wie in Abbildung 32 zu sehen ist, zeigten drei Klone die für die Integration des Plasmids nach Möglichkeit 1 erwartete Bande von 860 bp, während bei den anderen vier Klonen kein PCR-Fragment nachgewiesen werden konnte.

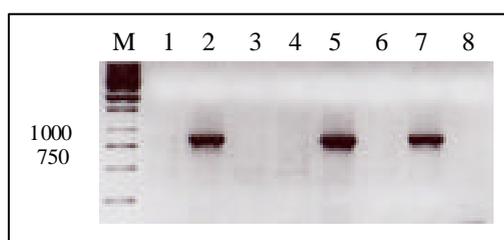


Abb. 32: PCR-Analyse der *B. holmesii*-Konjuganden mit den Oligonukleotiden $fha/Chr.1$ und pSORT/2 zur Überprüfung des „single-cross-over“-Ereignisses

Die PCR-Ansätze der Konjuganden 1-7 wurden in Spur 1-7 eines 1%igen Agarosegels aufgetragen. Bei Klon 2, 5 und 7 (entspricht Spur 2, 5 und 7) weist das PCR-Produkt von 860 bp auf eine Integration von pSORTP1- $fha_{BH}1/2$ nach Möglichkeit 1 hin. Spur 8 stellt die Negativkontrolle ohne Template dar.

Klon 2 (Spur 2 in Abb. 32) und Klon 3 (Spur 3), für den die Integration von pSORTP1- $fha_{BH}1/2$ nach Möglichkeit 2 nachgewiesen worden war (nicht gezeigt), wurden für das Ereignis des „double-cross-over“ (dco) weiterkultiviert. Hierfür wurden Klon 2 und 3 mehrmals auf frische BG-Blutplatten ohne Antibiotikum überstrichen und durch anschließende PCR-Reaktion auf das zweite Rekombinationsereignis getestet.

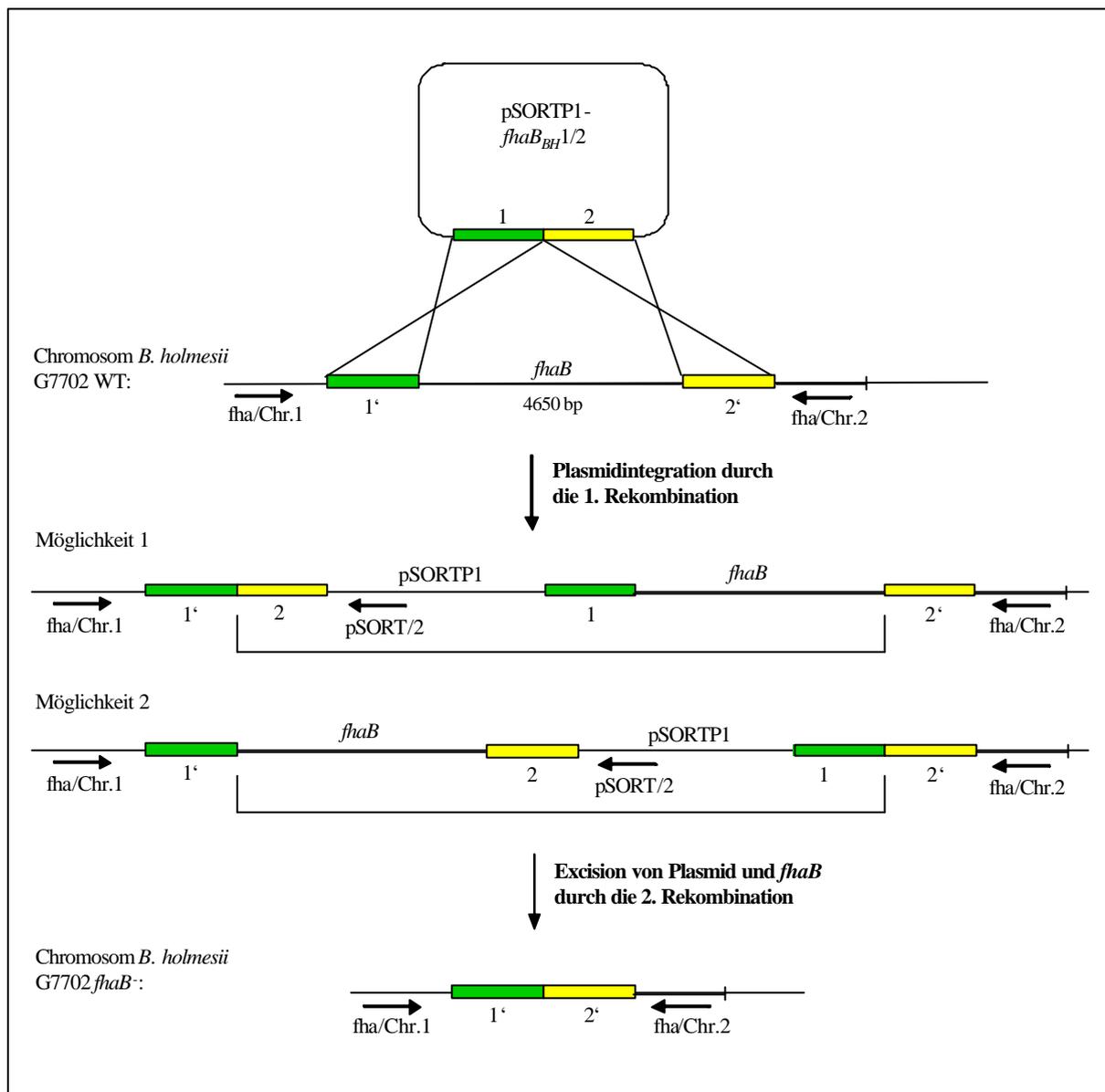


Abb. 33: Schematische Darstellung der Rekombinationsereignisse

Das Plasmid pSORTP1-*fhaB_{BH}*1/2 wurde in *B. holmesii* G7702 konjugiert und durch das 1. Rekombinationsereignis („single-cross-over“) ins Chromosom integriert. Da die Rekombination entweder über das 1. oder das 2. Homologiefragment stattfinden kann - die Rekombinationsorte sind durch überkreuzte Striche gekennzeichnet - gibt es zwei verschiedenen Möglichkeiten der Plasmidintegration. Durch das zweite Rekombinationsereignis („double-cross-over“) kommt es zum Verlust des Plasmids und der 4650 bp großen *fhaB_{BH}*-Sequenz. Die beschrifteten Pfeile stellen die zur Überprüfung der Rekombinationsereignisse verwendeten Oligonukleotide dar.

Für Klone, bei denen das Plasmid durch ein „double-cross-over“-Ereignis bereits wieder aus dem Chromosom eliminiert und somit auch die 4650 bp große *fhaB_{BH}*-Sequenz deletiert worden war, erwartete man unter Verwendung der Oligonukleotide *fha*/Chr.1 und *fha*/Chr.2 ein 840 bp großes PCR-Produkt. Zudem sollten solche Klone keine Gentamycin-Resistenz mehr aufweisen. Klone, bei denen noch kein zweites Rekombinationsereignis stattgefunden hatte, sollten dagegen kein PCR-Produkt zeigen. Solche Klone sind außerdem in der Lage weiterhin auf Gentamycin-haltigen BG-Platten zu wachsen.

Wie in Abbildung 34 zu erkennen ist, konnte bei zwei der sechs untersuchten Klone das nach einem „double-cross-over“ erwartete PCR-Produkt von 840 bp nachgewiesen werden. Diese PCR-Analyse wurde mit Einzelkolonien der entsprechenden „sco-Klone“ 2 und 3 durchgeführt, nachdem diese zum siebten Mal auf BG-Blutplatten überstrichen worden waren. Die Klone waren zudem Gentamycin-sensitiv. Der mutierte *fhaB_{BH}*-Locus der beiden positiven „dco-Klone“ 2 und 6 wurde zur Bestätigung der *fhaB_{BH}*-Deletion sequenziert. Klon 6, der im Folgenden als *B. holmesii* G7702 *fhaB* bezeichnet wird, wurde für weitere Experimente eingesetzt.

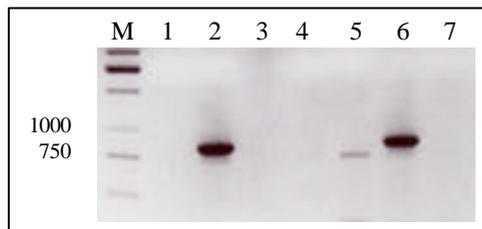


Abb. 34: PCR-Analyse der „sco-Klone“ nach mehrmaliger Subkultivierung zur Überprüfung des „double-cross-over“-Ereignisses

Die PCR-Ansätze der sco-Klone 1-6 wurden in Spur 1-6 eines 1%igen Agarosegels aufgetragen. Spur 2 und 6 (entspricht Klon 2 und 6) zeigen ein PCR-Produkt von 840 bp, welches erwartet wird, wenn die 2. Rekombination und somit der Verlust von Plasmid- und *fhaB_{BH}*-Sequenz aus dem Chromosom stattgefunden hat. Spur 7 stellt die Negativkontrolle unter Verwendung von chromosomaler DNA aus *B. holmesii* G7702 dar.

3.4.2 Vergleichende Charakterisierung von *B. holmesii* G7702, *B. holmesii* G7702 *fhaB* und *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan*

Um vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen *B. holmesii*-Stämmen durchführen zu können, ist es wichtig, Unterschiede in der Ausprägung phänotypischer Merkmale bei den einzelnen Stämmen zu kennen. Vor allem die Größe einer Bakterienzelle ist von Bedeutung, wenn es darum geht, die gleiche Anzahl von Bakterien verschiedener Stämme für vergleichende Analysen einzusetzen.

Aus diesem Grund wurden die drei Stämme *B. holmesii* G7702, *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan* und *B. holmesii* G7702 *fhaB* aus Glycerinkulturen auf entsprechende BG-Blutplatten ausgestrichen, für 48 h inkubiert, geerntet, in 1 x PBS resuspendiert und jeweils auf eine OD von 0,36 eingestellt. Einzelne Verdünnungsstufen (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}) aus zwei unterschiedlichen Verdünnungsreihen der jeweiligen Bakterien-PBS-Suspensionen wurden ausplattiert und die Einzelkolonien nach 4 Tagen analysiert und ausgezählt. Dabei fiel auf, dass die beiden Stämme *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan* und *B. holmesii* G7702 *fhaB* pro BG-Platte jeweils mehr Kolonien ausbildeten, als der wildtypische *B. holmesii* G7702-Stamm. Zudem waren die Kolonien der beiden Mutanten-Stämme deutlich kleiner als die des wildtypischen *B. holmesii*-Stammes. Aufgrund dieser Beobachtung wurde festgestellt, dass die beiden Stämme *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan* und *B. holmesii* G7702 *fhaB* kleinere Einzelzellen ausbilden als der Wildtyp. Dies konnte mittels mikroskopischer Analysen bestätigt werden. Die Bestimmung der Lebendzellzahlen zeigte, dass eine OD von 0,36 bei *B. holmesii* G7702 einer Bakterienzahl von 7×10^7 entspricht, während die Stämme *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan* und *B. holmesii* G7702 *fhaB* bei gleicher OD jeweils $4,8 \times 10^8$ Bakterienzellen enthalten. Diese Beobachtung wurde in allen Untersuchungen berücksichtigt.

3.4.3 Untersuchungen zur Adhäsion von *B. holmesii* G7702, *B. holmesii* G7702 *fhaB*⁻ und *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan* an A549-Zellen

Molekulare Analysen der *fhaB_{BH}*-Sequenz (siehe 3.1) sowie Untersuchungen zur Regulation des *fhaB_{BH}*-Gens (siehe 3.2) lieferten wichtige Ergebnisse zur Charakterisierung des *fhaB*-homologen Gens aus *B. holmesii*. Die bisherigen Versuche lassen jedoch keine Aussagen bezüglich der Funktion des FHA-Proteins in *B. holmesii* zu. Bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters stellt das FHA den wichtigsten Adhäsionsfaktor der Bakterien dar.

Durch Adhäsionsstudien unter Verwendung von menschlichen Lungenepithelzellen (A549) sollte zunächst das Adhäsionsverhalten des wildtypischen *B. holmesii*-Stammes G7702 untersucht werden, denn bislang sind keine Daten über das Verhalten von *B. holmesii* in Zellkultur-Experimenten bekannt. Durch den Vergleich des Wildtyps mit der *fhaB_{BH}*-Deletionsmutante von *B. holmesii* sollte die Bedeutung von FHA_{BH} als Adhäsion untersucht werden. Weiterhin sollte durch den Einsatz des Stammes *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan* geprüft werden, welche Auswirkungen die Abwesenheit von BvgA_{BH} auf das Adhärenzverhalten von *B. holmesii* hat. Als Positivkontrolle wurde der wildtypische *B. bronchiseptica*-Stamm 7865 eingesetzt, welcher bekanntermaßen an eukaryontische Epithelzellen adhärert (Savelkoul *et al.*, 1993; Schipper *et al.*, 1994; Cotter *et al.*, 1998). Als Negativkontrollen sollten sowohl der *B. bronchiseptica*-Stamm BB 7866, der eine Mutation im *bvgS*-Locus trägt, als auch *E. coli* K12 dienen.

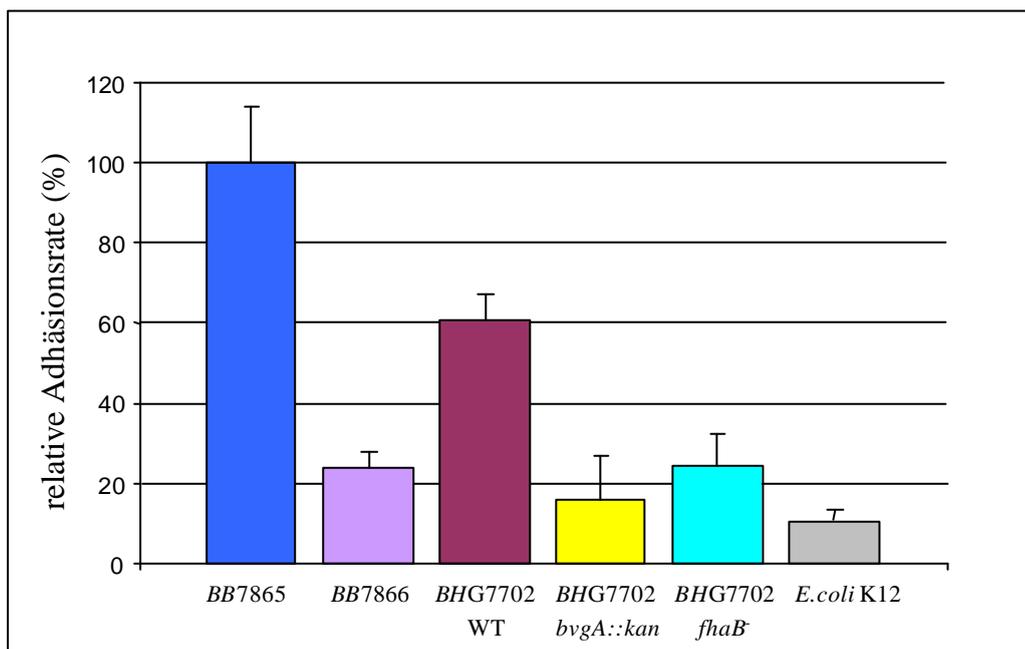


Abb. 35: Darstellung der relativen Adhäsionsraten an A549-Zellen bei den Stämmen *B. bronchiseptica* BB 7865 (Positivkontrolle), BB 7866 (Negativkontrolle), bei den *B. holmesii*-Stämmen BH G7702, BH G7702 *bvgA::kan* und BH G7702 *fhaB*⁻ sowie *E. coli* K12 (Negativkontrolle)

In Adhäsionsassays wurden semikonfluente A549-Zellen mit den entsprechenden Bakterienstämmen (MOI = 50) jeweils 1 h inkubiert und die Zellen danach zweimal gewaschen um nicht-adhärente Bakterien zu entfernen. Nach Lyse der Zellen durch Ultraschallbehandlung wurden Verdünnungen der Bakterien-Zellsuspensionen auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und nach etwa 4 Tagen die Lebendzellzahlen der Bakterien bestimmt. Insgesamt wurden vier voneinander unabhängige Adhäsionsexperimente unter jeweils gleichen Bedingungen durchgeführt.

In jedem dieser Adhäsionsexperimente wurde jeder Bakterien-Stamm in drei einzelnen Assays untersucht und die Werte gemittelt. Die relative Adhäsionsrate der einzelnen Stämme konnte innerhalb der vier Adhäsionsexperimente tendenziell reproduziert werden. Die Abbildung 35 zeigt daher das repräsentative Ergebnis eines Adhäsionsexperiments.

Die Adhäsionsrate des *B. bronchiseptica*-Stammes *BB* 7865 wurde auf 100 % gesetzt. Der wildtypische *B. holmesii*-Stamm *BH* G7702 zeigte mit 60,3 % eine signifikant niedrigere Adhäsionsrate als *B. bronchiseptica* 7865. Die beiden mutierten *B. holmesii*-Stämme wiesen stark verringerte Adhäsionsraten von 16,2 % (*BH* G7702 *bvgA::kan*) bzw. 24,2 % (*BH* G7702 *fhaB*) auf. Beide weichen signifikant von *BH* G7702 ab. Die Negativkontrollen *BB* 7866 und *E. coli* K12 zeigten Adhäsionsraten von 24 % bzw. 10,7 %. Eine Erklärung für die - wenn auch geringen - Adhäsionsraten der Negativkontroll-Stämme könnte sein, dass durch den Waschvorgang nach der Adhäsion nicht alle nicht-adhärenen Bakterien aus den Näpfen entfernt wurden.

Durch die Adhäsionsexperimente konnte erstmals gezeigt werden, dass *B. holmesii* *in vitro* an eukaryontische Zellen adhären kann. Das Ergebnis lässt weiterhin darauf schließen, dass FHA aus *B. holmesii* als Adhäsionsfaktor fungiert, denn seine Abwesenheit führt zu einer verminderten Adhäsionsfähigkeit der Bakterien. Fehlt das Regulatorprotein *BvgA_{BH}*, kommt es zu einer stark verminderten Adhäsion von *B. holmesii*, was auf die Existenz weiterer Adhäsionsfaktoren und deren Aktivierung durch das *BvgAS_{BH}*-System in *B. holmesii* G7702 hindeutet.

VI Diskussion

1 Identifizierung putativer Virulenzfaktoren in *B. holmesii*

B. holmesii wurde 1995 von Weyant *et al.* beschrieben und zählt zu den sogenannten „neuen“ *Bordetella*-Arten. Im Gegensatz zu den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters, *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica*, sind die „neuen“ *Bordetella*-Arten bislang kaum charakterisiert. *B. holmesii* wurde zunächst aus Blutkulturen von Sepsispatienten isoliert und gewann mit den Jahren zunehmend an Bedeutung als humanpathogener Keim, der den Respirationstrakt des Menschen besiedeln und Pertussis-ähnliche Erkrankungen hervorrufen kann (Lindquist *et al.*, 1995; Tang *et al.*, 1998; Yhi *et al.*, 1999). Um die Infektionsstrategie von *B. holmesii* zu erforschen und Maßnahmen zur Prävention bzw. Bekämpfung der Krankheit zu entwickeln, ist es wichtig, putative Virulenzfaktoren in *B. holmesii* zu identifizieren und zu charakterisieren. Bislang konnten über Southernblot- und Westernblot-Experimente in *B. holmesii* keine für das *B. bronchiseptica*-Cluster bekannten Virulenzfaktoren nachgewiesen werden (Njamkepo *et al.*, 2000). Mit Hilfe von degenerierten Oligonukleotiden, die aus der *BvgA*-Aminosäuresequenz von *B. pertussis* abgeleitet wurden, gelang vor kurzem die Identifizierung eines *bvgAS*-homologen Locus in *B. holmesii* (Gerlach *et al.*, 2004). Das *BvgAS*-Zweikomponenten-System ist bei den „klassischen“ *Bordetella*-Arten für die Regulation der Virulenzgenexpression verantwortlich. Das Vorkommen eines *BvgAS*-Systems in *B. holmesii* sowie die Fähigkeit des Bakteriums, Pertussis-ähnliche Erkrankungen im Menschen zu erzeugen, legt die Vermutung nahe, dass in dieser Art weitere für das *B. bronchiseptica*-Cluster bekannte Virulenzfaktoren vorkommen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein für das Filamentöse Hämagglutinin kodierender Faktor in *B. holmesii* identifiziert werden. Das Filamentöse Hämagglutinin ist der wichtigste Adhäsionsfaktor der „klassischen“ *Bordetella*-Arten und für die erfolgreiche Kolonisierung des respiratorischen Trakts des Wirtes unbedingt erforderlich (Cotter *et al.*, 1998). Der Nachweis eines *fhaB*-homologen Gens in *B. holmesii* gelang allerdings nicht über degenerierte Oligonukleotide, die aus konservierten *FhaB*-Aminosäuresequenzen von *B. pertussis* und *B. avium* abgeleitet wurden. Stattdessen führten Oligonukleotide, die aus konservierten Nukleotidbereichen der *fhaB*-Gene aus *B. pertussis* und *B. avium* ausgewählt wurden, zur PCR-Amplifikation eines Teilbereichs des *fhaB*-Homologs. Dies ist erstaunlich, denn laut Gerlach *et al.* zeigen die *bvgAS*-homologen Gene aus *B. holmesii* und *B. pertussis* auf Proteinebene eine größere Konservierung als auf DNA-Ebene, woraufhin diese Begebenheit auch für andere Virulenzgen-Homologe angenommen wurde. Möglicherweise waren die mittels des UPAC-Codes synthetisierten degenerierten Primerpaare zu unspezifisch, um an die entsprechenden Bereiche des *fhaB*-Gens aus *B. holmesii* zu binden. Für diese Hypothese spricht, dass die degenerierten Oligonukleotide zum Teil Basentriplets enthielten, die für die Aminosäuren Valin, Alanin, Glycin und Arginin kodieren, denn diese Codons können an ihrer dritten Position jeweils alle der vier möglichen Nukleotide enthalten.

PCR-Analysen mit Hilfe des Primerpaars *fhapert10/11*, das bei *B. holmesii* G7702 zur Identifizierung des *fhaB*-Homologs führte, zeigten, dass ein *fhaB*-homologes Gen auch bei den Isolaten *B. holmesii* G8341, *B. holmesii* ATCC51541 und *B. holmesii* No1 vorkommt und somit innerhalb der Art verbreitet ist. Das Vorkommen eines *FHA*-homologen Faktors scheint also durchaus für *B. holmesii* von Bedeutung zu sein und lässt auf eine wichtige Funktion des *FHA*-Homologs in dieser Art schließen.

Um Homologe für die Virulenzgene *fhaC*, *fimA*, *fimD*, *prn* und *dnt* in *B. holmesii* zu identifizieren, wurden Oligonukleotide aus konservierten DNA-Bereichen dieser Gene aus *B. pertussis* und *B. avium* für PCR-Analysen eingesetzt. Zusätzlich wurden zur Identifikation von *fhaC* und *dnt* Southernblot-Experimente mit aus den entsprechenden Genen von *B. avium* abgeleiteten DNA-Sonden durchgeführt. Die Sonden wurden deshalb von chromosomaler DNA aus *B. avium* amplifiziert, weil der zuerst identifizierte Teilbereich von *fhaB* aus *B. holmesii* die größte Übereinstimmung zum Homolog aus *B. avium* aufwies und deshalb angenommen wurde, dass auch weitere Virulenzfaktoren aus *B. holmesii* eine starke Homologie zu den entsprechenden *B. avium*-Genen aufweisen. Allerdings konnten keine weiteren Virulenzfaktoren in *B. holmesii* nachgewiesen werden. Die Ursache hierfür könnte eine mangelnde Übereinstimmung der DNA-Bereiche an den entsprechenden Stellen im Genom von *B. avium* und *B. holmesii* sein. Möglicherweise kommen jedoch einige der oben erwähnten Virulenzgene im Genom von *B. holmesii* nicht vor. Allerdings kann zumindest die Anwesenheit eines *fhaC*-homologen Gens vermutet werden, denn das FhaC-Protein bildet bei den „klassischen“ Bordetellen eine Pore in der äußeren Membran und wird somit für die Translokation von FHA an die Bakterienoberfläche benötigt. Die Bemühungen von Karin Schmitt, im Rahmen ihrer Diplomarbeit über PCR-Analysen ein *fhaC*-homologes Gen in *B. holmesii* zu identifizieren, scheiterten ebenfalls (persönliche Mitteilung). Die Frage über das Vorkommen weiterer Homologe zu den Virulenzfaktoren der „klassischen“ *Bordetella*-Arten in *B. holmesii* bleibt somit zunächst offen.

2 Der *fhaB*-Locus in *B. holmesii*

Über die Methode des „Genome Walk“ konnte die *fhaB*-Sequenz aus *B. holmesii* vervollständigt und ein Teil des stromaufwärts lokalisierten Leserahmens identifiziert werden. Dieser als OrfMP bezeichnete Leserahmen wird in die zum *fhaB_{BH}* entgegengesetzte Richtung transkribiert und weist eine 56%ige Identität zu einem konservierten Membranprotein aus *B. bronchiseptica* und *B. parapertussis* auf. Karin Schmitt gelang im Rahmen ihrer Diplomarbeit die Identifizierung des stromabwärts an *fhaB_{BH}* angrenzenden DNA-Bereichs. Überraschenderweise schließt sich in dieser Richtung nach einer intergenischen Region von nur 54 bp ein IS1001-ähnliches IS-Element an.

Damit unterscheidet sich der *fhaB*-Locus aus *B. holmesii* gänzlich von den entsprechenden Loci anderer *Bordetella*-Arten (siehe Abb. 11). Beim *B. bronchiseptica*-Cluster befindet sich stromaufwärts vom *fhaB* das *bvgAS*-Operon und stromabwärts sind Gene lokalisiert, die für die Fimbrien und FhaC kodieren. Diese können zusammen mit *fhaB* in eine polycistronische RNA transkribiert werden (Locht *et al.*, 1993). In *B. avium* ist stromaufwärts vom *fhaB* der Leserahmen für ein ATP-bindendes ABC-Transporterprotein lokalisiert, während sich stromabwärts ans *fhaB* auch hier die *fim/fhaC*-Gene anschließen (Spears *et al.*, 2003). In *B. petrii*, einem weiteren Vertreter der „neuen“ *Bordetella*-Arten und zudem einzigen Umweltisolat der Gattung, findet sich eine ganz neue Organisation des *fhaB*-Locus. Hier ist das *fhaC*-Gen unmittelbar vor dem *fhaB* gelegen und wird in die gleiche Richtung wie *fhaB* transkribiert, wie Sequenzierung und Annotation des *B. petrii*-Genoms kürzlich zeigten (<https://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/gendb>). Eine gemeinsame Transkription von *fhaB* und *fhaC* wäre auch hier denkbar, ist aber noch nicht erwiesen. Vom in 3'-Richtung angrenzenden DNA-Bereich wird in *B. petrii* ein hypothetisches Protein kodiert, das zu 60 % mit einem Homolog aus *Yersinia pseudotuberculosis* identisch ist. Die Anwesenheit eines *fhaB*-Homologs bei den human- und tierpathogenen *Bordetella*-Arten sowie im Umweltisolat *B. petrii* lässt vermuten, dass dieser Faktor in allen von diesen Organismen besetzten ökologischen Nischen von Bedeutung ist.

Obwohl sich die Struktur des *fhaB*-Locus der „klassischen“ Bordetellen von der der „neuen“ Arten unterscheidet, fällt dennoch auf, dass das *fhaC*-Gen immer in der Nähe von *fhaB* lokalisiert ist und vermutlich mit diesem zusammen transkribiert wird. Die Organisation ihrer Gene in einem Operon wird als typische Eigenschaft für die beiden Partner eines TPS-Systems beschrieben (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001). Beim Zwei-Partner-Sekretionsweg wird das Sekretionsprotein (TpsA) mit Hilfe seines Transportproteins (TpsB), das eine Pore in der äußeren Membran bildet, an die Bakterienoberfläche gebracht (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001, 2004). Für die Funktion von FHA als Adhäsionsfaktor ist sein Transport an die Bakterienoberfläche und somit die Anwesenheit von FhaC bzw. eines spezifischen Transporterproteins unbedingt erforderlich. Es kann somit angenommen werden, dass auch in *B. holmesii* ein *fhaC*-homologes Gen vorkommt, welches vermutlich in der Nähe des *fhaB*-Gens lokalisiert ist. Denkbar wäre, dass in *B. holmesii* ein mögliches *fhaB/fhaC*-Operon durch die Insertion des IS-Elements IS1001 unterbrochen worden ist.

3 Funktionelle Charakterisierung des Filamentösen Hämagglutinins aus *B. holmesii*

Die Funktion des FHA-Homologs in *B. holmesii* wurde anhand von Zellkultur-Experimenten untersucht. In Adhäsionsstudien konnte erstmals gezeigt werden, dass der wildtypische Stamm *B. holmesii* G7702 in der Lage ist, an eukaryontische Zellen zu adhären. Die Fähigkeit, Wirtsgewebe besiedeln zu können, ist eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Etablierung einer Infektion. Die Adhäsionsrate von *B. holmesii* G7702 an die hier verwendeten menschlichen Lungenepithelzellen (A549) fiel jedoch im Vergleich zu *B. bronchiseptica* 7865 signifikant niedriger aus (siehe Abb. 35). Dennoch zeigte der wildtypische *B. holmesii*-Stamm eine im Vergleich zu den beiden Mutanten *B. holmesii* G7702 *fhaB* und *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan* signifikant höhere Adhäsionsrate. Daraus lässt sich schließen, dass FHA in *B. holmesii* eine Rolle bei der Adhäsion an eukaryontische Wirtszellen spielt. Es scheinen jedoch weitere Adhäsionsfaktoren beteiligt zu sein, denn auch in Abwesenheit von FHA waren knapp 30 % von *B. holmesii* G7702 *fhaB* in der Lage, an die A549-Zellen zu adhären. Für eine *fhaB*-Mutante von *B. pertussis* konnte im Vergleich zum Wildtyp nur eine 3%ige Adhäsion an CHO-Zellen und eine 5,8%ige Adhäsion an respiratorische Epithelzellen mit Zilien aus dem Kaninchen gezeigt werden (Relman *et al.*, 1989). Die im Vergleich dazu relativ hohe Adhäsionsrate des Stammes *B. holmesii* G7702 *fhaB* spricht für eine Beteiligung weiterer Adhäsionsfaktoren an der Wirtszelladhäsion in *B. holmesii*. Die Beobachtung, dass in Abwesenheit des Bvg_{A_{BH}}-Proteins die Adhäsionsrate des entsprechenden Stammes niedriger ausfiel, als für *B. holmesii* G7702 *fhaB* gezeigt wurde, bekräftigt die Vermutung, dass in *B. holmesii* neben dem FHA weitere Faktoren bei der Adhärenz eine Rolle spielen. Scheinbar werden diese zusätzlichen Adhäsionsfaktoren, bei denen es sich um Homologe zu Pertaktin oder den Fimbrien handeln könnte, durch das Bvg_{A_{BH}}-System aktiviert.

Bei den Adhäsionsexperimenten fiel auf, dass auch der als Negativkontrolle dienende nicht-adhärenente *E. coli*-Stamm K12 in allen Experimenten eine geringe Adhäsionsrate an A549-Zellen zeigte. Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass nach der Inkubation der A549-Zellen mit den Bakterienstämmen jeweils nur zwei Waschgänge mit 1x PBS durchgeführt wurden, um nicht-adhärenente Bakterien zu entfernen. Möglicherweise reichte dies nicht aus, um wirklich alle nicht- oder nur lose anhaftenden Bakterien zu entfernen. Zusätzliche Waschgänge wurden jedoch nicht durchgeführt, um zu vermeiden, dass bereits Zell-adhärenente Bakterien gewegewaschen werden. Die gleiche Behandlung aller Adhäsionsansätze gewährleistet, dass dennoch vergleichende Aussagen über die Adhäsionsraten der einzelnen Stämme getroffen werden können.

Aufgrund der Ergebnisse der Adhäsionsstudien in Zellkultur-Experimenten kann dem Filamentösen Hämagglutinin aus *B. holmesii* eine Funktion als Adhäsion zugesprochen werden. Ähnlich wie bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters, könnte das FHA aus *B. holmesii* eine wichtige Rolle für die Pathogenität dieses Organismus spielen. Zur Erforschung der Bedeutung und Wirkungsweise dieses Proteins im Zuge einer *B. holmesii*-Infektion sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig. Derzeit wird die Virulenz der Stämme *B. holmesii* G7702, *B. holmesii* G7702 *fhaB* und *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan* im Mausmodell untersucht (C. Loch, Pasteur Institut, Lille). Die bald zu erwartenden Ergebnisse liefern sicher interessante Einblicke in die Bedeutung des Filamentösen Hämagglutinins für die Pathogenität von *B. holmesii* *in vivo*.

4 Molekulare Analyse des Filamentösen Hämagglutinins aus *B. holmesii* auf DNA- und Proteinebene

Das *fhaB*-Gen aus *B. holmesii* wurde bezüglich seiner Größe mit den entsprechenden Genen des *B. bronchiseptica*-Clusters sowie mit den *fhaB*-Homologen aus *B. avium* und *B. petrii* verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass *B. holmesii* mit 8.793 bp ein kleineres *fhaB*-Homolog besitzt als *B. petrii* (9.120 bp) und die Mitglieder des *B. bronchiseptica*-Clusters (10.770-10.902 bp). Im Gegensatz dazu enthält *B. avium* ein *fhaB*-Homolog mit 7.911 bp, welches demnach kleiner als *fhaB* aus *B. holmesii* ist. Die Bedeutung dieser Größenunterschiede ist allerdings ungewiss. Denkbar wäre, dass die verschiedenen Größen der *fhaB*-homologen Gene mit der Ausprägung unterschiedlicher Eigenschaften der FHA-Proteine zusammenhängen und somit auf die spezifische Funktion der einzelnen Proteine zurückzuführen sind.

Alignments der *fhaB*-Sequenzen aus *B. holmesii*, *B. pertussis*, *B. avium* und *B. petrii* zeigten, dass *fhaB* aus *B. holmesii* sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene die größte Ähnlichkeit mit dem Homolog aus *B. avium* aufweist. Während die FhaB-Aminosäuresequenzen aus *B. holmesii* und *B. avium* zu 47 % übereinstimmen, zeigten die BESTFIT- und GAP-Analysen nur eine 32% ige Identität der FhaB-Aminosäuren aus *B. holmesii* und *B. pertussis*. Mit dem *B. petrii*-FhaB stimmt das Homolog aus *B. holmesii* sogar nur zu 27 % überein. Eine hohe Übereinstimmung von Gen- bzw. Proteinsequenzen aus *B. holmesii* und *B. avium* konnte bereits für das Membranprotein OmpA sowie für das BvgAS-System beider Arten beobachtet werden (Gerlach *et al.*, 2004). Weiterhin wurde schon 1995 von Weyant *et al.* festgestellt, dass die Zusammensetzung der Membranlipide von *B. holmesii* im Wesentlichen mit dem CFA (cellular fatty acid)-Profil von *B. avium* übereinstimmt. *B. holmesii* scheint sich also phylogenetisch eher im Umfeld der „neuen“ Arten anzusiedeln. Allerdings sprechen die 16S DNA-Daten eher für eine verwandtschaftliche Beziehung von *B. holmesii* zu *B. pertussis*. Neueste Untersuchungen lassen jedoch vermuten, dass *B. holmesii* seine 16S rRNA-Gene durch horizontalen Gentransfer aus *B. pertussis* erhalten hat und der Erwerb von DNA aus *B. pertussis* generell wahrscheinlich eine wichtige Rolle für die Entstehung und Wirtsadaptation von *B. holmesii* spielte (Diavatopoulos *et al.*, 2006).

Die niedrige Übereinstimmung von FhaB aus *B. holmesii* zum Homolog aus *B. petrii* könnte dadurch erklärt werden, dass es sich bei *B. petrii* um einen Umweltkeim handelt, während *B. holmesii* Menschen infizieren kann. *B. petrii* konnte zwar kürzlich auch aus dem Menschen isoliert werden (Fry *et al.*, 2005), sein pathogenes Potential bleibt aber fragwürdig. Im Umweltisolat von *B. petrii* spielt das FHA-Protein möglicherweise eine Rolle bei der Anheftung der Bakterien an Umweltbestandteile.

Durch Sequenzanalysen konnten einige für das FhaB der „klassischen“ Arten typische Sequenzmotive im FhaB von *B. holmesii* gefunden werden. Ebenso wie FhaB aus *B. pertussis* und viele andere Sekretionsproteine, enthält das FhaB_{BH}-Protein ein N-terminales Signalpeptid. Dieses spielt bei Erkennung und Transport des Proteins durch das Sec-System eine entscheidende Rolle (Lambert-Buisine *et al.*, 1998). Das FhaB-Protein aus *B. holmesii* scheint also mit Hilfe des Sec-abhängigen Sekretionssystems durch die innere Membran transportiert zu werden. Das N-terminale Signalpeptid besteht sowohl bei *B. pertussis* als auch bei *B. holmesii* aus rund 70 Aminosäuren, die jeweils in einen ungewöhnlichen N-terminalen Anhang sowie eine positiv geladene Region und ein hydrophobes Segment gegliedert sind (siehe Abb. 12; Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004). 15 von 25 Aminosäuren des N-terminalen Anhangs sind bei den FhaB-Proteinen aus *B. pertussis* und *B. holmesii* identisch. Die positiv geladene Region kommt bei beiden Arten vorwiegend durch die Verwendung von Arginin zustande. Das jeweilige hydrophobe Segment enthält Aminosäuren wie Leucin, Alanin und Valin. Diese Art erweitertes Signalpeptid mit konserviertem N-terminalen Anhang kommt bei einigen TpsA-Proteinen vor, z. B. bei den beiden Adhäsinen HMW1 und HMW2 aus *Haemophilus influenzae* oder bei LspA1, einem Adhäsion aus *Haemophilus ducreyi*. Auch bei Autotransporter-Proteinen, wie z. B. SepA aus *Shigella flexneri*, taucht diese N-terminale Verlängerung des Signalpeptids auf (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004). Das Signalpeptid des FhaB-Proteins aus *B. avium* enthält ebenfalls einen N-terminalen Anhang (Spears *et al.*, 2003) und zeigt eine besonders hohe Übereinstimmung zum Signalpeptid des FhaB-Proteins aus *B. holmesii*. Über die Bedeutung dieser Ähnlichkeit kann noch keine Aussage getroffen werden, da über Entstehung, Transport und Funktion des FHA in *B. avium* noch sehr wenig bekannt ist. Man kann jedoch vermuten, dass die FhaB-Proteine aus *B. holmesii* und *B. avium*, ähnlich wie das Protein aus *B. pertussis*, Sec-abhängig über die Cytoplasmamembran transportiert werden. Die Funktion des N-terminalen Anhangs ist noch unbekannt. Es wird jedoch vermutet, dass dieser an der Steuerung der Geschwindigkeit der Proteintranslokation über die innere Membran beteiligt ist und somit die Exportrate des Proteins beeinflusst (Chevalier *et al.*, 2004). Dies wiederum könnte der zeitlichen Koordination des Transports großer Proteine über zwei Membranen dienen. Bei *B. pertussis* wird das Signalpeptid beim Transport durch die innere Membran abgespalten. Die Schnittstelle für die TypI-Signalpeptidase befindet sich nach der Aminosäure Alanin an Position 71 (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004). Im Signalpeptid des FhaB_{BH}-Proteins befindet sich an Position 71 auch ein Alanin. Diese Aminosäure ist zudem Bestandteil eines „Ala-X-Ala“-Motivs, welches häufig als Konsensussequenz für die Signalpeptidase dient (Carlos *et al.*, 2000). Es kann deshalb angenommen werden, dass auch im FhaB aus *B. holmesii* nach Ala-71 eine Spaltung durch die Signalpeptidase stattfindet.

Zusätzlich zur N-terminalen Signalpeptiddomäne konnte innerhalb der FhaB-Sequenz aus *B. holmesii* eine ca. 250 Aminosäuren umfassende Region identifiziert werden, die Homologien zur sogenannten TPS-Domäne aufweist. Die TPS-Domäne ist im N-terminalen Bereich von vielen TpsA-Proteinen lokalisiert und ermöglicht über die Interaktion mit dem dazugehörigen Transporterprotein die Proteintranslokation durch die äußere Membran (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004; Hodak *et al.*, 2006). Sequenzalignments der TPS-Domänen repräsentativer TpsA-Proteine sowie der FhaB-Proteine aus verschiedenen *Bordetella*-Arten zeigten, dass auch *B. holmesii* und die beiden anderen „neuen“ Arten *B. avium* und *B. petrii* innerhalb dieser Region stark konservierte Bereiche aufweisen (siehe Abb. 13). Neben dem ersten Asparagin-Rest des NPNL-Motivs (Asn-66) sind einige weitere konservierte Reste für die FHA-Sekretion unentbehrlich. So konnte gezeigt werden, dass für die FHA-Sekretion in *B. pertussis* die Aminosäuren Ser-32, Asn-49, Ser-86, Glu-93, Asn-118 und Met-225 essentiell sind (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1997; Hodak *et al.*, 2006).

Da all diese Aminosäuren auch in der TPS-Domäne des FhaB-Proteins aus *B. holmesii* vorhanden sind, liegt die Vermutung nahe, dass dieses Protein, ähnlich wie das FhaB der „klassischen“ Bordetellen, durch die äußere Membran transportiert wird. Es kann zudem angenommen werden, dass auch in *B. holmesii* ein am FhaB-Transport beteiligtes Protein existiert, welches mit der TPS-Domäne interagiert. Hierbei könnte es sich um ein FhaC-homologes Protein handeln.

Die *in silico*-Analyse der FhaB_{BH}-Sequenz führte weiterhin zur Entdeckung eines KGD-Motivs, welches aus den Aminosäuren Lysin-Glycin-Asparaginsäure besteht und sich an Position 742-744 befindet. Das sogenannte RGD-Motiv (Arginin-Glycin-Asparaginsäure, Position 1097-1099) ist bei den „klassischen“ *Bordetella*-Arten für die spezifische Erkennung von Rezeptoren, den CR3-Integrinen, zuständig. Durch diese Eigenschaft des FHA-Proteins können die Bakterien beispielsweise in Makrophagen aufgenommen werden (Locht *et al.*, 1993). Die Aminosäuren Arginin und Lysin sind in die gleiche Kategorie stark hydrophiler Aminosäuren mit basischen Seitenketten einzuordnen. Zudem ist aus der Literatur bekannt, dass KGD-Motive in Proteinen existieren und diese ebenfalls β 3-Integrine erkennen können (Johansson, 1999; Nykvist *et al.*, 2001; Gorski *et al.*, 2003; Mc Lane *et al.*, 1994). Das KGD-Motiv im von *B. holmesii* könnte also möglicherweise die Funktion des RGD-Motivs im FhaB der „klassischen“ Bordetellen übernehmen und eine Rolle bei der Rezeptorerkennung spielen.

Eine Heparin-Bindedomäne (HBD) konnte im FhaB von *B. holmesii* nicht identifiziert werden. Die HBD ist bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters an der Adhäsion der Bakterien an Epithelzellen ohne Zilien und an die extrazelluläre Matrix beteiligt (Hannah *et al.*, 1994; Menozzi *et al.*, 1990; Sato *et al.*, 1981; Urisu *et al.*, 1986). Sie setzt sich aus einem sich mehrmals wiederholenden Sequenzmotiv von 19 Aminosäuren zusammen, deren Konsensussequenz sehr variabel ist (siehe 3.1.2.2; Colombi *et al.*, 2004). Eine hohe Variabilität in der Konsensussequenz trifft auch für die Kohlenhydrat-Bindedomäne (CRD; Prasad *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1997) zu, welche ebenfalls nicht in der FhaB_{BH}-Sequenz identifiziert wurde. Eine Suche nach diesen beiden Motiven über die PROSITE-Datenbank (<http://expasy.org/prosite>) blieb ebenfalls erfolglos. Die starke Variabilität der Konsensussequenzen erschwert allerdings die Identifizierung von Bindedomänen durch *in silico*-Analysen. Die Existenz einer HBD sowie einer CRD im FHA von *B. holmesii* kann somit nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Es besteht aber die Möglichkeit, dass eine oder beide dieser Bindedomänen im FHA von *B. holmesii* fehlen und dieses Protein somit eine geringere Anzahl an Bindeaktivitäten aufweist als das FHA der klassischen *Bordetella*-Arten. Für diese Hypothese spricht, dass der wildtypische *B. holmesii*-Stamm in den Zellkultur-Experimenten jeweils eine im Vergleich zum *B. bronchiseptica*-Wildtyp signifikant schwächere Adhäsionsrate zeigte. Ebenso könnte die durch *B. holmesii* erzeugte schwache Form des Keuchhustens beim Menschen sowie das relativ seltene Auftreten der durch *B. holmesii* verursachten Erkrankung zumindest teilweise dadurch erklärt werden, dass *B. holmesii* durch das Fehlen wichtiger Bindedomänen im Hauptadhäsionsfaktor FHA den Wirtsorganismus weniger gut besiedeln kann und somit eine Infektion seltener erfolgreich etabliert wird. Der abgeschwächte Krankheitsverlauf könnte jedoch auch durch die Abwesenheit bestimmter Virulenzfaktoren in *B. holmesii* erklärt werden.

Denn es muss angenommen werden, dass FHA aus *B. holmesii* Bindedomänen enthält, durch die das Bakterium in der Lage ist, sich an eukaryontische Wirtszellen anzuheften, da eine signifikant höhere Adhäsionsrate des *B. holmesii*-Wildtyps im Vergleich zur *fhaB*-Mutante von *B. holmesii* an A549-Zellen gezeigt werden konnte. Denkbar wäre auch, dass im FHA aus *B. holmesii* Bindedomänen vorkommen, die im FHA der „klassischen“ *Bordetella*-Arten nicht enthalten sind bzw. bislang nicht beschrieben wurden.

Im FHA-Protein aus *B. avium* konnte das RGD-Motiv und eine Kohlenhydrat-Bindedomäne, aber keine Heparin-Bindedomäne identifiziert werden (Spears *et al.*, 2003). Eine mögliche Bedeutung oder Folge der HBD-Abwesenheit kann jedoch nicht abgeleitet werden, da über die Rolle und Wirkungsweise des FHA als Adhäsionsfaktor in *B. avium* noch zu wenig bekannt ist. Dennoch scheint das FHA-Protein aus *B. avium* – auch ohne Heparin-Bindedomäne – effektiv an der Pathogenität des Bakteriums beteiligt zu sein, da *B. avium*-Mutanten mit Insertionen im *fhaB*-Gen virulenzattenuiert sind (Spears *et al.*, 2003). Um Aufschlüsse über relevante Bindeaktivitäten des FhaB_{BH} zu erhalten, müsste eine biochemische Charakterisierung des Proteins durchgeführt werden.

5 Die Regulation des Filamentösen Hämagglutinins aus *B. holmesii*

Bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters erfolgt die *fhaB*-Transkription durch einen *bvg*-abhängigen Promotor, dessen Startpunkt sich 70 bp stromaufwärts des *fhaB*-Startcodons befindet. Die *fhaB*-upstream-Region in *B. pertussis* enthält fünf BvgA-Bindestellen, von denen jedoch nur die drei am weitesten stromabwärts gelegenen Bindestellen an der Aktivierung der *fhaB*-Transkription durch den Response Regulator beteiligt sind (Boucher *et al.*, 2003). Das BvgA-Protein bindet in phosphorylierter Form und als Dimer zunächst an die primäre Bindestelle, die aus einer hochaffinen „inverted-repeat“-Struktur besteht (5'- TTTCTTA-3' auf dem kodierenden und 5'- TTTCCTA -3' auf dem nicht-kodierenden Strang) und deren Zentrum sich an Position -88,5 relativ zum Transkriptionsstartpunkt befindet (siehe Abb. 38; Roy und Falkow, 1991). Durch kooperative Protein-Protein-Interaktionen kommt es zur Besetzung der sekundären Binderegion - diese erstreckt sich bis zur -35-Region des *fhaB*-Promotors - durch zwei weitere BvgA-Dimere (Boucher *et al.*, 2003). Dies ist wichtig, um das Regulatorprotein in die Nähe der Promotorelemente zu bringen, damit es mit der RNA-Polymerase interagieren kann (Boucher *et al.*, 1997). Die beiden sekundären BvgA-Bindestellen besitzen eine niedrige Affinität zu BvgA. Innerhalb der DNA-Sequenz dieser Region findet man kaum Bereiche, die Übereinstimmungen zur BvgA-Konsensussequenz 5'- T/A T T C C/T T A -3' aufweisen. Stattdessen scheint die Bindung der BvgA-Dimere an die sekundären Bindestellen durch kooperative Interaktionen mit der RNA-Polymerase stabilisiert zu werden (Boucher *et al.*, 1997; 2001). Laut Boucher *et al.* (1997) enthält die *fhaB*-Promotorregion von *B. pertussis* einen weiteren Transkriptionsstartpunkt, der sich 130 bp stromaufwärts des *fhaB*-Startcodons befindet (siehe Abb. 38). Dieser befindet sich innerhalb der sekundären BvgA-Binderegion und führt *in vitro* in Abwesenheit von BvgA bzw. in Anwesenheit von unphosphoryliertem BvgA zu einer konstitutiven *fhaB*-Transkription. Über die Existenz bzw. Bedeutung dieses *fhaB*-Promotors *in vivo* ist jedoch nichts bekannt. Es wird in Erwägung gezogen, dass es *in vivo* durch die Anwesenheit von phosphoryliertem BvgA zu einer Umpositionierung der RNA-Polymerase an den weiter stromabwärts lokalisierten *bvg*-abhängigen Promotor kommt (Boucher *et al.*, 1997).

5.1 Analyse der *fhaB_{BH}*-Regulation durch Transkriptions- und Expressionsstudien

Um Aufschlüsse über die Regulation der *fhaB*-Expression in *B. holmesii* zu erhalten, wurde die *fhaB_{BH}*-Expression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf dem Nachweis einer möglichen Regulation der *fhaB_{BH}*-Expression durch das BvgA_{BH}-System. Einen ersten Hinweis auf die Beteiligung des BvgA_{BH}-Proteins an der *fhaB_{BH}*-Transkription lieferten die Slotblot-Experimente (siehe Abb. 15). Hier konnte gezeigt werden, dass *fhaB_{BH}* unter den üblichen Wachstumsbedingungen (auf BG-Blutplatten bei 37 °C) transkribiert wird.

Ein weitaus schwächeres *fha*_{BH}-spezifisches Signal bei *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan* im Vergleich zu den beiden Wildtypen *B. holmesii* G7702 und *B. holmesii* G8341 deutete bereits auf eine BvgAS_{BH}-Abhängigkeit der *fha*_{BH}-Transkription hin. Gleich starke Signale der verwendeten Stämme bei einer zweiten Hybridisierung des Blots mit einer 16S-DNA-Sonde zeigten, dass von jedem Stamm die gleiche RNA-Menge auf den Blot aufgetragen wurde. Somit kann angenommen werden, dass das schwächere *fha*_{BH}-spezifische Signal bei der BvgA_{BH}-Mutante von *B. holmesii* auf eine geringere Transkriptionsrate des *fha*_{BH}-Gens in diesem Stamm zurückzuführen ist und somit die *fha*_{BH}-Transkription in *B. holmesii* zumindest teilweise durch das BvgA_{BH}-Protein aktiviert wird.

Interessanterweise konnte keine Hybridisierung der RNA aus *B. avium* mit der *fha*_{BH}-spezifischen DNA-Sonde festgestellt werden. Die Übereinstimmung des *fhaB*-Gens aus *B. holmesii* mit dem Homolog aus *B. avium* auf DNA-Ebene beträgt 58 % und ist damit höher als die Übereinstimmung der *fhaB*-Gene aus *B. holmesii* und den „klassischen“ *Bordetella*-Arten. Dennoch scheint die Homologie der beiden *fhaB*-Gene aus *B. holmesii* und *B. avium* weder für eine DNA-RNA-Hybridisierung noch für eine DNA-DNA-Hybridisierung (siehe Abb. 9) ausreichend zu sein. Dies erklärt wiederum, weshalb *fhaB* in *B. holmesii* nicht mittels Southernblot-Experimenten unter Verwendung *fhaB*-spezifischer DNA-Sonden aus anderen *Bordetella*-Arten identifiziert werden konnte (Niamkepo *et al.*, 2000).

Expressionsstudien mit *B. holmesii*-Stämmen, die eine Fusion des *fha*_{BH}-Promotors (*fhaP*_{BH}) mit dem *gfp*-Reportergen enthalten, bestätigen die BvgAS_{BH}-Abhängigkeit der *fha*_{BH}-Expression auf Proteinebene. So konnte über Westernblot-Experimente gezeigt werden, dass der Stamm *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP*_{BH}-*gfp*) eine deutlich größere Menge an GFP produziert, als *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan* (pMMB208-*fhaP*_{BH}-*gfp*). Die unterschiedlichen GFP-Mengen der beiden Stämme sind durchaus repräsentativ für eine starke (bei *B. holmesii* G7702) bzw. schwache (bei *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan*) Aktivierung des *fha*_{BH}-Promotors *in vivo*, da jeweils gleiche Zellzahlen der Bakterienstämme zur Herstellung der Proteinlysate verwendet und exakt gleiche Mengen der Proteinlysate auf das SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen wurden.

Über Primerextension-Experimente konnten für *B. holmesii* G7702 drei Transkriptionsstartpunkte innerhalb der *fha*_{BH}-upstream-Region identifiziert werden (siehe Abb. 22, 23). Der Startpunkt P1 befindet sich 58 bp, der Startpunkt P2 71 bp und der Startpunkt P3 88 bp vor dem *fha*_{BH}-Startcodon. Nur P1 und P2 wurden auch bei dem Stamm *B. holmesii* G7702 *bvgA::kan*, also in Abwesenheit von BvgA_{BH}, detektiert. Da für die RNA-Isolierung die beiden *B. holmesii*-Stämme mit der gleichen Zelldichte verwendet und für die Primerextension-Experimente jeweils gleiche RNA-Mengen eingesetzt wurden, kann eine vergleichende Aussage über die Transkripte getroffen werden. Die *fha*_{BH}-Transkription ausgehend von P3 findet demnach *bvg*-abhängig statt. Bei P1 und P2 scheint es sich dagegen um konstitutive und somit *bvg*-unabhängige Promotoren zu handeln, die sowohl in An- als auch in Abwesenheit von BvgA_{BH} gleich stark aktiviert werden. Die Möglichkeit, dass es sich bei dem P1-Transkript um ein *in vivo*-Abbauprodukt des P2-Transkripts handelt, kann aufgrund der Tatsache, dass dieser P1 aus *B. holmesii* in *B. pertussis* einen Transkriptionsstartpunkt darstellt (siehe Abb. 31 und Diskussion unter 5.2.4), als unwahrscheinlich betrachtet werden.

Die P1-, P2- und P3-upstream-Bereiche wurden hinsichtlich putativer -10- und -35-Regionen analysiert. Die Konsensussequenzen für die RNA-Polymerase-Erkennungselemente starker Promotoren aus *E. coli* lauten TATAAT (-10-Box) und TTGACA (-35-Region) (Hawley und McClure, 1983). Üblicherweise weichen die -10- und -35-Sequenzen *bvg*-abhängiger Promotoren aus *Bordetella* deutlich von diesen Konsensussequenzen ab.

Laut Goyard *et al.* (1995) tragen die beiden Cytosine an der jeweils ersten Position der -10- und -35-Region des *fhaB*-Promotors aus *B. pertussis* dazu bei, dass es sich hier um einen schwachen Promotor handelt, der für seine Aktivierung die Hilfe des Regulatorproteins BvgA benötigt. Der Austausch dieses Cytosins durch ein Thymin in entweder der -10- oder der -35-Region führte jeweils zu einem konstitutiv aktiven *fhaB*-Promotor. Durch die C-T-Substitution kann vermutlich die RNA-Polymerase alleine die *fhaB*-Transkription initiieren. Wahrscheinlich wird durch die Erhöhung des AT-Gehalts in diesem Bereich die zur Transkriptionsinitiation benötigte Trennung der DNA-Stränge erleichtert.

In Abbildung 36 werden mögliche -10- und -35-Bereiche für die Transkriptionsstartpunkte P1-3 der *fhaB_{BH}*-upstream-Region angegeben. Die Bestimmung dieser putativen -10- und -35-Sequenzen erfolgte unter Berücksichtigung der Konsensussequenzen aus *E. coli*. Zudem diente die Zusammensetzung der entsprechenden Regionen innerhalb des *fhaB*-Promotors aus *B. pertussis* als Vorlage für die *in silico*-Analysen. Für P1 wird eine putative -10-Box und zwei mögliche -35-Regionen angegeben, die zu 2 bzw. 3 bp mit der Konsensussequenz übereinstimmen. Für P2 werden zwei mögliche -10- und zwei mögliche -35-Bereiche angegeben. Die beiden möglichen -10-Boxen von P2 zeigen eine größere Übereinstimmung mit der Konsensussequenz als die putative -10-Box des P1-Promotors. Zudem werden beim P2-Promotor innerhalb der möglichen -10- und -35-Regionen die von der jeweiligen Konsensussequenz abweichenden Basen meist durch die entsprechend komplementären Basen ersetzt. Die -10-Box von P2 ist in jedem Fall besonders T-reich, was die Bildung eines offenen Transkriptionskomplexes erleichtern würde. Die Möglichkeit, dass zwischen der -10- und der -35-Region der für starke Promotoren optimale Abstand von 17 bp liegt (Hawley und McClure, 1983), besteht sowohl für P2 als auch für P1. Zusammenfassend deuten die für P1 und P2 getätigten *in silico*-Analysen darauf hin, dass es sich bei P2 um einen stärkeren Promotor handelt als bei P1. Die Primerextension-Experimente zeigen aber, dass die beiden konstitutiv aktiven *fhaB_{BH}*-Promotoren P1 und P2 etwa gleich stark aktiviert werden. Dies zeigt, dass für *E. coli* geltende Regeln bezüglich starker und schwacher Promotoren nicht ohne weiteres auf *B. holmesii* angewendet werden können.

Die als mögliche Promotorelemente angegebenen Sequenzen bei P3 stimmen zum Teil mit den -10- und -35-Regionen des *fhaB*-Promotors aus *B. pertussis* überein. An den Anfangspositionen könnte auch hier Guanin bzw. Cytosin anstelle von Thymin vorkommen, so dass auch dieser Promotor für seine Aktivierung die Hilfe eines Regulatorproteins benötigt. Die BvgA_{BH}-Abhängigkeit von P3 wurde durch die Primerextension-Experimente eindeutig nachgewiesen. Um eine Aussage treffen zu können, ob es sich bei den für P1, P2 und P3 angegebenen putativen -10- und -35-Regionen tatsächlich um Bindestellen für die RNA-Polymerase handelt, müssten DNaseI-Footprint-Experimente unter Verwendung der gereinigten *B. holmesii*-eigenen RNA-Polymerase, für P3 eventuell in Kombination mit dem BvgA_{BH}-Protein durchgeführt werden.



Abb. 36: Darstellung putativer -10- und -35-Regionen der *fhaB_{BH}*-Promotoren P1, P2 und P3 im Vergleich zum Konsensus-Promotor aus *E. coli* und zum *bvg*-abhängigen *fhaB*-Promotor aus *B. pertussis* (*PfhaB_{BP}*)
Mögliche -10- und -35-Elemente innerhalb der P1-, P2- und P3-Regionen sind jeweils eingerahmt. Für die -35-Region des *fhaB*-Promotors aus *B. pertussis* sind auch zwei verschiedene Bereiche möglich, die jeweils eingerahmt sind (Boucher *et al.*, 2001, 2003; Goyard *et al.*, 1995).

5.2 Charakterisierung putativer BvgA_{BH}-Bindestellen der *fhaB_{BH}*-upstream-Region

Durch *in silico*-Analysen konnten in der *fhaB_{BH}*-upstream-Region vier DNA-Bereiche identifiziert werden (siehe Abb. 38), die Übereinstimmungen zu der beschriebenen BvgA-Konsensussequenz 5'- T/A T T C C/T T A -3' aufweisen (Boucher *et al.*, 2001; Karimova *et al.*, 1996; Marques und Carbonetti, 1997; Roy und Falkow, 1991). Diese putativen BvgA_{BH}-Bindestellen zeigen Ähnlichkeiten zu „direct- bzw. „inverted-repeat“-Anordnungen der Konsensussequenz. Über die Positionen -169 bis -153 relativ zum *bvg*-abhängigen Transkriptionsstart P3 erstreckt sich das am weitesten stromaufwärts gelegene Sequenzmotiv BS1, das Ähnlichkeiten zu einer „direct-repeat“-Struktur zeigt. Die beiden Halbseiten von BS1 enthalten 5 bzw. 6 mit der Konsensussequenz übereinstimmende Nukleotide und sind durch 3 Nukleotide voneinander getrennt. Innerhalb der weiter stromabwärts lokalisierten „inverted-repeat“-ähnlichen Motive BS2 und BS3 stimmen jeweils 9 bp von 14 bp mit der Konsensussequenz für „inverted-repeat“-Strukturen überein. Die beiden Halbseiten von BS2 werden durch ein Basenpaar voneinander getrennt. Am weitesten stromabwärts befindet sich die putative BvgA_{BH}-Bindestelle BS4, in deren beiden „inverted-repeat“-ähnlichen Halbseiten jedoch insgesamt nur 8 bp mit der Konsensussequenz übereinstimmen. Berücksichtigt man neben der übereinstimmenden Anzahl der „Konsensus-Nukleotide“ zudem die Beobachtung, dass die Nukleotide Thymin an Position 3, Cytosin an Position 4 und Adenin an Position 7 für die BvgA-Bindung an den *fhaB*-Promotor besonders wichtig sind (Boucher *et al.*, 2001), so scheinen die beiden Sequenzmotive BS2 und BS3 am ehesten als BvgA_{BH}-Bindestellen geeignet zu sein.

5.2.1 *In vitro*-Bindung von BvgA_{BH} an die *fhaB_{BH}*-upstream-Region

Durch *in vitro*-Bindestudien konnte gezeigt werden, dass ein DNA-Fragment aus der *fhaB_{BH}*-upstream-Region, welches die beschriebenen Sequenzmotive BS1-4 enthält, spezifisch durch den phosphorylierten Response Regulator BvgA_{BH} gebunden wird. *In vitro*-DNaseI-Footprint-Experimente zeigten, dass innerhalb der *fhaB_{BH}*-upstream-Region ein DNA-Bereich von etwa -155 bis +48 relativ zum *bvg*-abhängigen Transkriptionsstart P3 vor dem DNaseI-Verdau geschützt bzw. von der BvgA_{BH}-P-Bindung betroffen ist (siehe Abb. 38).

Diese große Region enthält sowohl die putativen BvgA_{BH}-Bindestellen BS2-4 als auch die Transkriptionsstartpunkte P1-P3. Ob auch BS1 innerhalb der geschützten Region liegt, geht aus den Footprint-Experimenten nicht hervor. Durch diese Methode können jeweils nur etwa 200 bp große DNA-Regionen auf Proteinbindung untersucht werden. Der BS1-Bereich wurde durch diese Untersuchungen nicht erfasst. Man müsste weitere Footprint-Experimente unter Verwendung eines *fhaB_{BH}*-upstream-Bereichs, in dem das radioaktiv markierte Ende der Sonde weiter stromaufwärts vom BS1-Bereich lokalisiert ist, durchführen. Bei den DNaseI-Footprint-Experimenten fiel auf, dass das durch BvgA_{BH}-Bindung veränderte Bandenmuster sehr abrupt erschien. Der abrupte Beginn einer Protektion wurde allerdings auch während *in vitro*-DNaseI-Footprint-Analysen mit BvgA aus *B. pertussis* und der *ptx*-Promotorregion beschrieben (Zu *et al.*, 1996).

Geht man aufgrund der durch die Footprint-Analysen erhaltenen Ergebnisse davon aus, dass *in vivo* der gesamte Bereich von -155 bis +48 der *fhaB_{BH}*-upstream-Region durch die Bindung von BvgA_{BH} besetzt wird, so wären die putativen -10- und -35-Bereiche der Promotoren P1-P3 durch BvgA_{BH}-Bindung blockiert und es könnte keine Erkennung durch die RNA-Polymerase und somit keine Transkription des *fhaB_{BH}*-Gens stattfinden. Die Regulationsstudien zeigen aber, dass in *B. holmesii* sowohl eine *bvg*-abhängige als auch eine konstitutive *fhaB_{BH}*-Transkription stattfindet. Zudem fällt auf, dass sich im Footprint der DNA-Bereich von ca. -31 bis ca. +48, welcher die Promotoren P1-P3 enthält, bezüglich seines Bandenmusters vom stromaufwärts liegenden Bereich (etwa -155 bis -30), der die putativen BvgA_{BH}-Bindestellen BS2-4 enthält, unterscheidet. Im BS2-4-Bereich treten hypersensitive Banden in regelmäßigen Abständen von 10 bis 11 Nukleotiden auf. Hypersensitive Banden, die mit einer Periodizität von 10,5 Nukleotiden auftauchen, konnten auch bei Footprint-Experimenten mit BvgA aus *B. pertussis* und der *ptx*- und *fhaB*-Promotorregion sowie mit BvgA_{BH} und der *bvgAS_{BH}*-Promotorregion beobachtet werden (Boucher *et al.*, 1995, 1997; Gerlach *et al.*, 2004). Die erhöhte Sensitivität gegenüber der DNaseI-Behandlung ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die DNA innerhalb dieser Bereiche um den Proteinkomplex gewickelt ist (Boucher *et al.*, 1997). Im Bereich von etwa -20 bis +48 scheinen sich die Abstände zwischen den auftretenden hypersensitiven Banden auf 5-10 Nukleotide zu verringern. Allerdings sind die Banden der G+A-Sequenzierungsreaktion (Maxam und Gilbert, 1977) des DNaseI-Footprints im oberen Gelbereich schlecht auftrennbar, weshalb einzelne Banden auf dem Röntgenfilm schwer zu identifizieren sind. Es besteht deshalb die Möglichkeit, dass auch im Bereich -20 bis +48 die hypersensitiven Banden in Abständen von 10-11 Nukleotiden auftreten.

Die mögliche Musteränderung der hypersensitiven Banden im P1-P3-Bereich gegenüber dem BS2-4-Bereich der *fhaB_{BH}*-upstream-Region könnte bedeuten, dass im P1-P3-Bereich keine BvgA_{BH}-Bindung stattfindet. Stattdessen könnte das veränderte Bandenmuster in diesem Bereich eine Folge der BvgA_{BH}-Bindung an den stromaufwärts angrenzenden Bereich sein, der die putativen BvgA_{BH}-Bindestellen enthält. Möglicherweise verändert *in vitro* die BvgA_{BH}-Bindung an seine Zielsequenzen innerhalb des kurzen, linearen *fhaB_{BH}*-Promotorfragments die DNA-Struktur dahingehend, dass auch ohne BvgA_{BH}-Besetzung der P1-P3-Region mehrere kurze Sequenzbereiche vor dem DNaseI-Verdau geschützt werden, während andere Stellen besonders empfindlich gegenüber einem DNaseI-Verdau werden. Geht man davon aus, dass die hypersensitiven Banden über den gesamten DNA-Bereich von -155 bis +48 in regelmäßigen Abständen von 10 bis 11 Nukleotiden auftreten, so wäre folgende Erklärung denkbar. *In vitro* könnte durch den Überschuss an phosphoryliertem Response Regulator der ganze DNA-Bereich durch Protein-Protein-Interaktionen mit BvgA_{BH}-P-Molekülen besetzt werden, obwohl die gebundenen Sequenzen innerhalb der -10- und -35-Regionen von P1-P3 keine Affinität zu BvgA_{BH} haben.

In vivo könnte dies durch eine begrenzte Anzahl an BvgA_{BH}-P-Molekülen sowie die Anwesenheit der RNA-Polymerase verhindert werden, die anstelle des BvgA_{BH}-Proteins an ihre Promotorelemente bindet. Möglicherweise würde die Durchführung weiterer DNaseI-Footprint-Experimente in Kombination mit der RNA-Polymerase aus *B. holmesii* zur Aufklärung der Bindevorgänge im *fhaB_{BH}*-upstream-Bereich beitragen.

5.2.2 Charakterisierung der Bedeutung der einzelnen putativen BvgA_{BH}-Bindestellen

Anhand von *in vitro*-Bindestudien und *in vivo*-Expressionsanalysen wurden die einzelnen putativen BvgA_{BH}-Bindestellen näher charakterisiert. Die „direct-repeat“-ähnliche Bindestelle BS1, welche am weitesten stromaufwärts vom *bvg*-abhängigen Transkriptionsstartpunkt P3 lokalisiert ist (-153 bis -169), scheint für die BvgA_{BH}-Bindung nicht von Bedeutung zu sein. In den Gelretardations-Experimenten konnte durch die alleinige Abwesenheit von BS1 die Bindeeffizienz von BvgA_{BH} an die *fhaB_{BH}*-upstream-Region nicht beeinflusst werden (siehe Abb. 27). In den von Karin Schmitt durchgeführten Transkriptionsstudien unter Verwendung von *fhaB_{BH}*-Promotor-Reporterfusionen wurde bei BS1-Abwesenheit eine unverändert starke *fhaB_{BH}*-Transkription vom *bvg*-abhängigen Startpunkt P3 beobachtet (persönliche Mitteilung). Zudem konnte auf Proteinebene kein Einfluss der BS1-Deletion auf die GFP-Expression des entsprechenden *B. holmesii*-Stammes festgestellt werden (siehe Abb. 29). Im Allgemeinen spielen „direct-repeat“-Strukturen bei der BvgA-Bindung eher eine untergeordnete Rolle, während primäre BvgA-Bindestellen mit hoher Affinität meist als invertierte, direkt benachbarte Wiederholungssequenzen angeordnet sind (Karimova und Ullmann, 1997). Um eine Beteiligung von BS1 an der BvgA_{BH}-Bindung jedoch gänzlich auszuschließen, müsste gezeigt werden, dass ein DNA-Fragment, welches ausschließlich BS1 enthält, *in vitro* nicht von BvgA_{BH}-P gebunden wird.

Die am weitesten stromaufwärts gelegene „inverted-repeat“-Struktur BS2 erstreckt sich über die Nukleotide -110 bis -124 relativ zu P3. Die *in vitro*-Bindestudien lassen vermuten, dass BS2 mit einer relativ starken Effizienz von BvgA_{BH}-P gebunden wird. So wird bei Abwesenheit von BS2 im *fhaB_{BH}*-upstream-Bereich eine weitaus größere Menge an BvgA_{BH}-P zur Bildung eines deutlichen Protein-DNA-Komplexes benötigt als bei BS2-Anwesenheit (siehe Abb. 27). Dies würde bedeuten, dass die nach BS2-Deletion verbliebenen putativen BvgA_{BH}-Bindestellen BS3 und BS4 mit einer geringeren Effizienz von BvgA_{BH}-P gebunden werden als BS2. Allerdings scheint die Anwesenheit von BS3 und BS4 für die Aktivierung der *bvg*-abhängigen *fhaB_{BH}*-Transkription ausreichend zu sein, wie die Detektion eines relativ starken P3-Signals im Primerextension-Experiment zeigte. Im Vergleich zur *bvg*-abhängigen *fhaB_{BH}*-Transkription bei Anwesenheit aller vier putativen BvgA_{BH}-Bindestellen bzw. bei Anwesenheit von BS2, BS3 und BS4 zeigt der *B. holmesii*-Stamm mit der BS2-Deletion jedoch ein leicht abgeschwächtes P3-Signal (siehe Abb. 28). In den Westernblot-Experimenten konnte jeweils eine starke GFP-Expression bei alleiniger Anwesenheit von BS3 und BS4 detektiert werden (siehe Abb. 29). Obwohl nicht festgestellt werden kann, wie hoch dabei der GFP-Anteil aus der konstitutiven *fhaB_{BH}*-Expression ist, so zeigen die erhaltenen Daten dennoch, dass das BvgA_{BH}-Protein die *fhaB_{BH}*-Transkription unabhängig von BS2 aktivieren kann.

Fehlte zusätzlich zu BS1 und BS2 auch die „inverted-repeat“-ähnliche BS3-Sequenz (-59 bis -72), so hatte dies erhebliche Auswirkungen sowohl auf die BvgA_{BH}-DNA-Bindung *in vitro* als auch auf die *bvg*-abhängige *fhaB_{BH}*-Expression *in vivo*. In Gelretardations-Experimenten wurde selbst bei großen Mengen an BvgA_{BH}-P (800 ng) kein detektierbarer Komplex zwischen dem Protein und dem *fhaB_{BH}*-Promotorfragment, welches nur noch BS4 enthielt, gebildet (siehe Abb. 27).

Zudem konnte im Primerextension-Experiment bei alleiniger BS4-Anwesenheit kein *bvg*-abhängiges P3-Signal detektiert werden (siehe Abb. 28). Auf Proteinebene wurde eine deutliche Reduktion der GFP-Expression festgestellt (siehe Abb. 29). Die verbleibende GFP-Menge ist vermutlich auf die konstitutive *phaB_{BH}*-Promotoraktivierung zurückzuführen. Der BS4-Bereich alleine (-41 bis -54) reicht also für eine Aktivierung der *phaB_{BH}*-Transkription durch BvgA_{BH} nicht aus. Dennoch kann eine Beteiligung der BS4-Region an der *bvg*-abhängigen *phaB_{BH}*-Expression nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Vergleicht man das *in vitro*-Bindevverhalten von BvgA_{BH}-P an das BS4-enhaltende DNA-Fragment (Sonde IV) mit dem an DNA-Sonde V (siehe Abb. 26), die keine der vier möglichen BvgA_{BH}-Bindestellen enthält, so kann ein klarer Unterschied zwischen den beiden Ansätzen festgestellt werden. So konnte in den Proben, die die BS4-Sonde enthielten, zwar kein Protein-DNA-Komplex, aber dennoch ein Schmier detektiert werden, der für eine schwache Affinität dieser Region zu BvgA_{BH} spricht. Dagegen tritt die Sonde V, welche keine der vier putativen BvgA_{BH}-Bindestellen enthält, in den *in vitro*-Bindestudien jeweils ausschließlich frei und somit in Form einer klaren Bande auf (siehe Abb. 27). BS4 könnte demnach durchaus eine Rolle als niedrigaffine BvgA_{BH}-Bindestelle spielen.

Die Deletion aller putativen BvgA_{BH}-Bindestellen führte zu einer schwachen konstitutiven *phaB_{BH}*-Transkription von P1 und P2 und einer sehr schwachen GFP-Expression des entsprechenden *B. holmesii*-Stammes. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass durch die Entfernung aller putativen BvgA_{BH}-Bindestellen auch die Erkennungselemente des P2-Promotors beeinträchtigt wurden. Die putative -35-Region von P2 ist zwar noch im entsprechenden DNA-Fragment (*phaP6*) enthalten, aber möglicherweise ist hier die Erkennung durch die RNA-Polymerase erschwert, so dass keine effiziente konstitutive *phaB_{BH}*-Expression stattfinden kann.

5.2.3 Darstellung eines Modells für die BvgA_{BH}-Bindung an die *phaB_{BH}*-upstream-Region

Basierend auf den *in vitro*- und *in vivo*-Ergebnissen wird ein Modell für die BvgA_{BH}-Bindung des *phaB_{BH}*-Promotors vorgeschlagen (siehe Abb. 37). Wie für den *bvg*-abhängigen *phaB*-Promotor aus *B. pertussis* beschrieben, könnte sich auch in *B. holmesii* ein phosphoryliertes BvgA_{BH}-Dimer zunächst an eine primäre Bindestelle innerhalb der *phaB_{BH}*-upstream-Region anlagern. Die primäre BvgA_{BH}-Bindestelle mit der höchsten Affinität zu BvgA_{BH}-P könnte die „inverted-repeat“-ähnliche BS2-Struktur darstellen, da diese *in vitro* mit der größten Effizienz von BvgA_{BH}-P gebunden wird. Die Bindung von BvgA_{BH}-P als Dimer kann für den *phaB_{BH}*-Promotor angenommen werden. Die Beschaffenheit der putativen BvgA_{BH}-Bindestellen aus der *phaB_{BH}*-upstream-Region spricht für diese Art der BvgA-Bindung, denn es handelt sich jeweils um zwei Halbseiten mit Übereinstimmungen zur Konsensussequenz.

Auf die primäre BS2-Besetzung durch ein BvgA_{BH}-P-Dimer könnte die Bindung eines weiteren BvgA_{BH}-P-Dimers an BS3 erfolgen, denn BS3 wird *in vitro* mit der zweitgrößten Effizienz von BvgA_{BH}-P gebunden. BS3 kann deshalb als „sekundäre“ BvgA_{BH}-Bindestelle betrachtet werden. Die BvgA_{BH}-Bindung an BS3 kann jedoch vermutlich unabhängig von einem an BS2 gebundenen BvgA_{BH}-P-Dimer stattfinden, denn die Anwesenheit von BS2 war nicht erforderlich, um *in vitro* eine BvgA_{BH}-P-Bindung an BS3 zu beobachten bzw. *in vivo* die *bvg*-abhängige *phaB_{BH}*-Transkription zu aktivieren. Allerdings kann aufgrund der im Vergleich zu BS2 niedrigeren BvgA_{BH}-P-Affinität von BS3 vermutet werden, dass kooperative Protein-Protein-Interaktionen für die Stabilisierung des an BS3 gebundenen BvgA_{BH}-P-Dimers erforderlich sind. Der auffällig große Bereich von 37 bp zwischen BS2 und BS3 könnte dabei eine Rolle spielen.

Obwohl diese Region keine typischen mit der BvgA-Konsensussequenz übereinstimmenden Bereiche aufweist, wäre die Anlagerung von BvgA_{BH}-Dimeren in diesem Bereich denkbar. Es wäre vorstellbar, dass der 37 bp große DNA-Bereich zwischen BS2 und BS3 Platz für zwei weitere BvgA_{BH}-P-Dimere bietet. Die Bindung von BvgA-Dimeren an unspezifische DNA-Sequenzen wurde auch für die sekundäre Binderegion des *fhaB*-Promotors aus *B. pertussis* beschrieben, die etwa 45 bp enthält und von zwei BvgA-Dimeren gebunden wird (Boucher *et al.*, 2003). Für eine lückenlose BvgA_{BH}-P-Bindung des *fhaB*_{BH}-upstream-Bereichs zwischen BS2 und BS3 spricht auch das im DNaseI-Footprint-Experiment beobachtete regelmäßige Auftreten von hypersensitiven Banden in diesem Bereich.

Es wäre also denkbar, dass nach Besetzung von BS2 und BS3 eine unspezifische Anlagerung von zwei weiteren BvgA_{BH}-Dimeren an den DNA-Abschnitt zwischen BS2 und BS3 erfolgt, wobei die Bindung dieser BvgA_{BH}-Moleküle hauptsächlich auf kooperative Protein-Protein-Interaktionen zurückzuführen wäre. Die nun an BS2-, BS3- und den Zwischenbereich gebundenen BvgA_{BH}-P-Dimere könnten sich gegenseitig stabilisieren. Das Modell sieht weiterhin vor, dass BS4 von einem BvgA_{BH}-P-Dimer besetzt wird. Diese Bindung hängt vermutlich auch von Protein-Protein-Wechselwirkungen ab und erfordert wahrscheinlich die Anwesenheit des BS3-Dimers. Die DNA-Region, die BS3 und BS4 enthält, wird in diesem Modell als die „sekundäre“ Binderegion bezeichnet. Die BS4-Bindestelle überlappt mit der -35-Region des *bvg*-abhängigen Promotors P3. Wie auch für den *fhaB*-Promotor aus *B. pertussis* vermutet, könnte das am weitesten stromabwärts lokalisierte BvgA_{BH}-P-Dimer die Bindung der RNA-Polymerase begünstigen, wodurch die Transkriptionsinitiation ermöglicht wird.

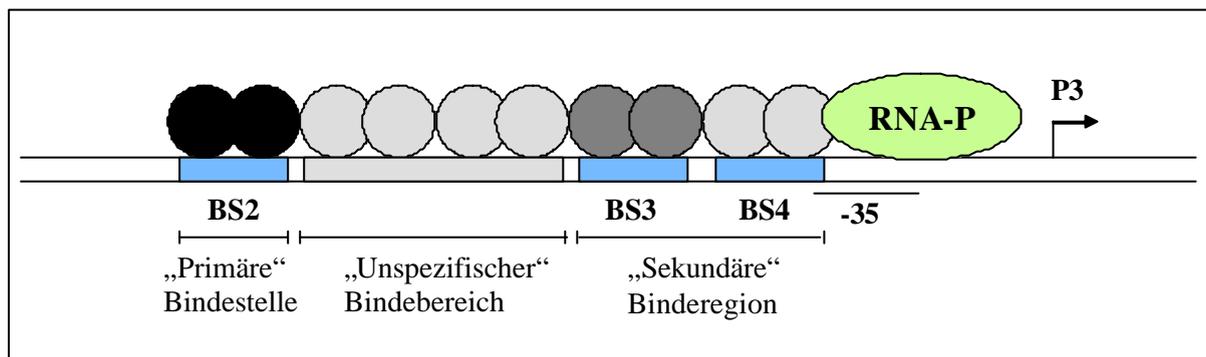


Abb. 37: Schematische Darstellung eines Modells zur BvgA_{BH}-Bindung im *fhaB*_{BH}-upstream-Bereich

Ein Kugelpaar stellt jeweils ein an die DNA gebundenes BvgA_{BH}-P-Dimer dar. Das BvgA_{BH}-P-Dimer, welches an die primäre BvgA_{BH}-Bindestelle BS2 bindet, ist schwarz eingefärbt. Das an BS3 innerhalb der sekundären Binderegion anheftende BvgA_{BH}-P-Dimer ist dunkelgrau gefärbt. In hellgrau sind die BvgA_{BH}-P-Dimere dargestellt, deren DNA-Bindung vermutlich hauptsächlich durch kooperative Protein-Protein-Interaktionen zustande kommt. P3 bezeichnet den *bvg*-abhängigen *fhaB*_{BH}-Promotor, dessen putative -35-Region mit BS4 überlappt. RNA-P steht für die RNA-Polymerase, die vermutlich mit dem an BS4 gebundenen BvgA_{BH}-P-Dimer interagiert, was zur Initiation der *bvg*-abhängigen *fhaB*_{BH}-Transkription führt.

5.2.4 Regulation von *fhaB*_{BH} in *B. pertussis*

Um zu erforschen, ob in *B. pertussis* eine Expression des *fhaB*_{BH}-Gens stattfinden kann und wie die Regulation einer möglichen *fhaB*_{BH}-Transkription in *B. pertussis* erfolgt, wurde wiederum die Reporterfusion *fhaP*_{BH}-*gfp* verwendet, die sowohl im wildtypischen *B. pertussis*-Stamm BP TI als auch in der BvgA-Mutante BP 359 *in trans* vorliegt. Interessanterweise konnten in BP TI (pMMB208-*fhaP*_{BH}-*gfp*) die beiden Transkriptionsstartpunkte P1 und P3 detektiert werden, die bezüglich ihrer Positionen den Promotoren P1 und P3 aus *B. holmesii* G7702 (pMMB208-*fhaP*_{BH}-*gfp*) entsprechen (siehe Abb. 31).

Bei Abwesenheit von BvgA, also im Stamm *BP* 359 (pMMB208-*fhaP_{BH}-gfp*), tritt dagegen ausschließlich der Transkriptionsstartpunkt P1 auf. Sowohl im Wildtyp als auch in der BvgA-Mutante von *B. pertussis* konnte der in *B. holmesii* auftretende konstitutiv aktive P2-Promotor nicht detektiert werden. Eine konstitutive, *bvg*-unabhängige *fhaB_{BH}*-Transkription findet also in *B. pertussis* ausschließlich über P1 statt. Die Westernblot-Experimente mit den beschriebenen *B. pertussis*-Stämmen bestätigten die Beobachtung einer starken, *bvg*-abhängigen *fhaB_{BH}*-Expression und einer im Vergleich zu *B. holmesii* relativ schwachen konstitutiven *fhaB_{BH}*-Expression anhand der jeweils detektierten GFP-Mengen.

Das Auftreten des *bvg*-abhängigen *fhaB_{BH}*-Promotors P3 im wildtypischen *B. pertussis*-Stamm und seine Abwesenheit in der BvgA-Mutante zeigt, dass eine *bvg*-abhängige *fhaB_{BH}*-Transkription auch in *B. pertussis* stattfindet und dort am gleichen Startpunkt (P3) initiiert wird, wie in *B. holmesii*. Das bedeutet, dass BvgA aus *B. pertussis* in der Lage sein muss, den *fhaB_{BH}*-upstream-Bereich zu binden und die *fhaB_{BH}*-Transkription zu aktivieren. Möglicherweise bindet der Response Regulator aus *B. pertussis* dabei an die in der *fhaB_{BH}*-upstream-Region identifizierten putativen BvgA_{BH}-Bindestellen BS2, BS3 und BS4. Da die identifizierten „inverted-repeat“-Strukturen BS2-4 zum Teil hohe Übereinstimmungen zu der beschriebenen Konsensussequenz aufweisen, ist eine Bindung derer durch BvgA_{BP} nahe liegend. Die Abweichungen innerhalb der *fhaB_{BH}*-upstream-Region bezüglich der Zusammensetzung und Anordnung der putativen BvgA_{BH}-Bindesstellen scheinen von dem Response Regulator aus *B. pertussis* toleriert zu werden. Erstaunlich ist jedoch die Tatsache, dass im umgekehrten Fall BvgA_{BH} aus *B. holmesii* nicht in der Lage ist, an den *fhaB*-Promotorbereich aus *B. pertussis* zu binden, wie durch *in vitro*-Bindestudien gezeigt wurde (Gerlach *et al.*, 2004). Neueste Untersuchungen zeigen, dass das unterschiedliche Bindeverhalten der beiden Proteine vermutlich auf Sequenzunterschiede innerhalb der Outputdomäne zurückzuführen ist (Aleksandra Horvat, persönliche Mitteilung). Zudem wäre denkbar, dass die spezifische Bindung von BvgA_{BH} an den *fhaB_{BH}*-Promotor auch von der Architektur dieses Promotors abhängt, wobei Symmetrie und Anordnung der BvgA_{BH}-Bindestellen eine Rolle spielen könnten.

Das Fehlen des P2-Signals in *B. pertussis* könnte durch mögliche Unterschiede in der RNA-Polymerase aus *B. pertussis* und *B. holmesii* erklärt werden. Demnach könnten die Promotoren P1 und P2 aus *B. holmesii* aufgrund der Zusammensetzung bzw. Anordnung ihrer Promotorelemente eine unterschiedliche Affinität zur RNA-Polymerase aus *B. pertussis* aufweisen. So könnte die RNA-Polymerase aus *B. pertussis* die -10- und -35-Region des P1-Promotors erkennen, während die entsprechenden Sequenzen des P2-Promotors aufgrund spezieller Abweichungen nicht gebunden werden. Möglicherweise ähneln die P1-Erkennungssequenzen eher den in *B. pertussis* natürlicherweise vorkommenden Promotorelementen. Diese Vermutung trifft zumindest für die mögliche -10-Region des P1-Promotors aus *B. holmesii* zu, die, wie die des *fhaB_{BP}*-Promotors, vorwiegend die Nukleotide C und A enthält, während die putative -10-Box des P2-Promotors sehr T-reich ist (siehe Abb. 36).

Aus der Beobachtung, dass P1 in *B. pertussis* als konstitutiv aktiver Promotor erkannt und aktiviert wird, kann zudem geschlossen werden, dass es sich bei P1 in *B. holmesii* ebenso um einen Promotor handelt und dass das P1-Transkript nicht durch einen *in vivo*-Abbau des P2-Transkripts entsteht.

5.2.5 Die Bedeutung der *fhaB_{BH}*-Promotorstruktur

Interessanterweise unterscheidet sich der *fhaB*-Promotor aus *B. holmesii* bezüglich der Symmetrie und Anordnung seiner putativen BvgA_{BH}-Bindestellen deutlich vom *bvgAS*-Promotor dieser *Bordetella*-Art (Gerlach *et al.*, 2004). Im *bvgAS_{BH}*-upstream-Bereich konnten vier „inverted-repeat“-ähnliche Strukturen identifiziert werden, von denen aber jeweils nur eine Halbseite Übereinstimmungen zur Konsensussequenz aufweist. Es wird vermutet, dass es sich bei den beiden am weitesten stromabwärts lokalisierten Bindestellen, die die höchste Ähnlichkeit zur Konsensussequenz aufweisen, um primäre BvgA_{BH}-Bindestellen handelt, während die beiden stromaufwärts gelegenen „inverted-repeat“-Strukturen die sekundären Bindestellen darstellen. Eine ähnliche Symmetrie und Anordnung der BvgA-Bindestellen wurde auch für den *bvg*-abhängigen und dennoch starken *bvgR*-Promotor aus *B. pertussis* beschrieben (Merkel *et al.*, 2003). Auch bei dem *bvgAS*-Promotor aus *B. holmesii* scheint es sich um einen im Vergleich zum *fhaB_{BH}*-Promotor stärkeren Promotor mit einer höheren Affinität zu BvgA_{BH} zu handeln, denn in den *in vitro*-Experimenten waren deutlich geringere Mengen an BvgA_{BH}-P für eine Bindung an die *bvgAS_{BH}*-upstream-Region notwendig. Möglicherweise enthält *B. holmesii*, wie auch die „klassischen“ *Bordetella*-Arten, mehrere unterschiedlich gestaltete Promotoren, die individuell durch BvgAS_{BH} reguliert werden.

Die Anordnung der putativen BvgA_{BH}-Bindestellen im *fhaB*-Promotor aus *B. holmesii* wurde vorwiegend mit der des *fhaB*-Promotors aus *B. pertussis* verglichen (siehe Abb. 38). Beim *fhaB*-Promotor aus *B. pertussis* ist das Zentrum der primären BvgA-Bindestelle an Position -88,5 lokalisiert. Zur Initiation der *bvg*-abhängigen *fhaB*-Transkription ist die Bindung von insgesamt drei BvgA-Dimeren nötig (Boucher *et al.*, 2003). Der *fhaB_{BP}*-Promotor wird also schon bei relativ geringen Mengen an phosphoryliertem BvgA aktiviert und zudem mit hoher Affinität von diesem gebunden (Boucher *et al.*, 1997; 2001; Cotter und Jones, 2003). Vermutlich aus diesen Gründen wird die *fhaB*-Transkription sehr schnell nach einem BvgAS-aktivierenden Signal initiiert (Kinnear *et al.*, 1999, 2001). Im Gegensatz dazu erfordern andere *bvg*-abhängige Promotoren, wie z. B. der *ptx*-Promotor, große Mengen an phosphoryliertem BvgA, um ihre ausgedehnten, niedrigaffinen Promotorbereiche mit BvgA-Dimeren besetzen zu können. Demnach werden solche Gene erst spät nach einer BvgAS-Induktion transkribiert (Boucher und Stibitz, 1995; Kinnear *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2005).

Das Zentrum der vermutlich primären BvgA_{BH}-Bindestelle BS2 im *fhaB_{BH}*-upstream-Bereich befindet sich an Position -117 und somit relativ weit stromaufwärts vom *bvg*-abhängigen *fhaB_{BH}*-Promotor P3 (siehe Abb. 38). Zudem wurden in den *in vitro*-Bindestudien bei *B. holmesii* weitaus größere Mengen an BvgA_{BH}-P benötigt, um eine Bindung an den *fhaB_{BH}*-upstream-Bereich zu erzielen, als das bei Verwendung von BvgA-P und dem *fhaB*-Promotor aus *B. pertussis* der Fall ist (siehe Abb. 16 und Gerlach *et al.*, 2004). Möglicherweise spielen hier unterschiedliche Phosphorylierungseigenschaften der beiden Response Regulatoren aus *B. holmesii* und *B. pertussis* eine Rolle. So könnte BvgA_{BP} *in vitro* effizienter phosphoryliert werden als BvgA_{BH}. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass die vermutlich primäre BvgA_{BH}-Bindestelle BS2 aus *B. holmesii* eine im Vergleich zur primären BvgA-Bindestelle des *B. pertussis*-*fhaB*-Promotors geringere BvgA-Affinität aufweist. So weichen in BS2 fünf von insgesamt vierzehn Nukleotiden von der Konsensussequenz ab. Zudem werden beide Halbseiten von BS2 durch ein Basenpaar voneinander getrennt, während die primäre BvgA-Bindestelle des *fhaB_{BP}*-Promotors eine perfekte „inverted-repeat“-Struktur mit direkt benachbarten Halbseiten darstellt.

Der große Abstand zwischen BS2 und dem *phaB_{BH}*-Promotor P3 lässt vermuten, dass an der Aktivierung der *phaB*-Expression in *B. holmesii* wahrscheinlich mehr als drei BvgA_{BH}-Dimere beteiligt sind. Der *bvg*-abhängige *phaB_{BH}*-Promotor wird vermutlich erst aktiviert, wenn eine ausreichende Menge an BvgA_{BH}-P zur Verfügung steht, damit die vielen, vergleichsweise niedrigaffinen BvgA_{BH}-Bindestellen besetzt werden können (siehe Modell unter 5.2.3). In *B. holmesii* könnte deshalb auch die konstitutive *phaB_{BH}*-Expression eine wichtige Rolle spielen. Bei den Mitgliedern des *B. bronchiseptica*-Clusters wird nach einem BvgAS-stimulierenden Signal der Adhäsionsfaktor FHA schnell produziert und kann seine wichtige Funktion, beispielsweise bei der Kolonisierung eines neuen Wirtes ausüben. In *B. holmesii* könnte diese erste wichtige Adhärenz an Wirtsgewebe durch die konstitutive *phaB_{BH}*-Expression gewährleistet werden. Vermutlich wird die konstitutive *phaB_{BH}*-Expression nach einem BvgAS_{BH}-stimulierenden Signal durch die *bvg*-abhängige *phaB_{BH}*-Expression unterstützt, was eine erfolgreiche Infektion des Wirtes gewährleisten könnte. Auch für *B. pertussis* ist nicht auszuschließen, dass eine konstitutive *phaB*-Expression eine Rolle spielt, denn über *in vitro*-Transkriptionsstudien konnte ein konstitutiv aktiver *phaB*-Promotor bei Abwesenheit von BvgA-P detektiert werden (siehe Abb. 38), dessen *in vivo*-Relevanz noch nicht geklärt ist (Boucher *et al.*, 1997).

Verglichen mit dem *phaB_{BH}*-Promotor scheint der *bvgAS*-Promotor aus *B. holmesii* durch geringere Mengen an BvgA_{BH}-P aktiviert zu werden (Gerlach *et al.*, 2004). Dies erscheint sinnvoll, wenn man in Erwägung zieht, dass in *B. holmesii* neben *bvgAS* und *phaB* wahrscheinlich weitere Virulenzfaktoren durch das BvgAS-System aktiviert werden und hierfür mehr oder weniger hohe Konzentrationen an phosphoryliertem BvgA_{BH} nötig sind.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit kann angenommen werden, dass die Virulenzgenexpression bei dem humanpathogenen Keim *B. holmesii*, ebenso wie bei *B. pertussis*, durch das BvgAS-System gesteuert wird. Dennoch scheint es Unterschiede in der Regulation einzelner Promotoren der beiden Arten zu geben. Diese könnten zum einen aus der unterschiedlichen Architektur dieser Promotoren resultieren, zum anderen könnten unterschiedliche Bindeeigenschaften der beiden Response Regulatoren eine Rolle spielen. Mögliche Unterschiede in den pathogenen Eigenschaften von *B. pertussis* und *B. holmesii* könnten dieser differentiellen Genregulation zu Grunde liegen. So verursacht *B. holmesii* bekanntermaßen eine mildere Form des Keuchhustens beim Menschen als *B. pertussis*. In Zukunft wird es von Interesse sein, mehr über die pathogenen Eigenschaften von *B. holmesii* zu erfahren. Hierfür müssten weitere Virulenzgene identifiziert und ihre Bedeutung anhand von Zellkultur-Experimenten sowie im Tiermodell untersucht werden. Möglicherweise können dadurch weitere Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Expression und Regulation von Virulenzgenen bei *B. holmesii* und *B. pertussis* aufgedeckt werden.

VII Literaturverzeichnis

Abramson T, Kedem H, Relman DA. (2001): Proinflammatory and Proapoptotic Activities Associated with *Bordetella pertussis* Filamentous Hemagglutinin. *Infect Immun.* Apr 2001, 2650-2658.

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, 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.

Andersson SG, Kurland CG. (1998): Reductive evolution of resident genomes. *Trends Microbiol.* 1998 Jul;6(7):263-8. Review.

Antila M, He Q, de Jong C, Aarts I, Verbakel H, Bruisten S, Keller S, Haanperä M, Mäkinen J, Eerola E, Viljanen MK, Merttola J, van der Zee A. (2006): *Bordetella holmesii* DNA is not detected in nasopharyngeal swabs from Finnish and Dutch patients with suspected pertussis. *J Med Microbiol.* 2006; 55:1043-1051.

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, 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.

Banemann A, Gross R. (1997): Phase variation affects long-term survival of *Bordetella bronchiseptica* in professional phagocytes. *Infect. Immun.* 65:3469-3473.

Banemann A, Deppisch H, Gross R. (1998): The lipopolysaccharide of *Bordetella bronchiseptica* acts as a professional shield against antimicrobial peptides. *Infect Immun.* 66:5607-5612.

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.

Bock A, Gross R. (2001): The BvgAS two-component system of *Bordetella* spp.: a versatile modulator of virulence gene expression. *Int. J. Med. Microbiol.* 291:119-130.

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.

Bordet J, Gengou O. (1906): Le microbe de la coqueluche. *Ann. Inst. Pasteur Paris* 1906, 20 :731-741

- Boucher PE, Menozzi FD, Locht 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.
- Bourseaux-Eude C, Thiberge S, Carletti G, Guiso N.** (1999): Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection: II. Sequence variation and protection induced by a tricomponent acellular vaccine. *Vaccine.* 17:2651-2660.
- Bourseaux-Eude C, Guiso N.** (2000): Polymorphism of repeated regions of pertactin in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun.* (2000) 68:4815-4817.
- Bradford WL, Slavin B.** (1937): An organism resembling *Hemophilus pertussis*, with special reference to color changes produced by its growth upon certain media. *Am J Public Health.* 27:1277-1282.
- Burns DA.** (1999): Biochemistry of type IV secretion. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:25-29.
- 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.** (1999b): Epidemiological, clinical, and laboratory aspects of pertussis in adults. *Clin Infect Dis.* 1999 Jun;28 Suppl 2:S112-7. Review.
- Chevalier N, Moser M, Koch HG, Schimz KL, Willery E, Locht C, Jacob-Dubuisson F, Müller M.** (2004): Membrane Targeting of a Bacterial Virulence Factor Harboring an Extended Signal Peptide. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2004;8:7-18.
- Clantin B, Hodak H, Willery E, Locht C, Jacob-Dubuisson F, Villeret V.** (2004): The crystal structure of filamentous haemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *PNAS.* 2004 Apr 20;101(16):6194-6199.
- Colombi D, Horton D, Oliveira ML, Sakauchi MA, Ho P.** (2004): Antibodies produced against a fragment of filamentous hemagglutinin (FHA) of *Bordetella pertussis* are able to inhibit hemagglutination induced by the whole adhesin. *FEMS Microbiology Letters.* 2004 Sep 25;240:41-47.
- Cone, T.E.Jr.** (1970): Whooping cough is first described as a disease sui generis by de Baillou in 1640. *Pediatrics* 1970 46:552
- 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 173:33-38.
- 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.
- Cotter PA, Jones AM.** (2003): Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. Trends in Microbiol. 2003 Aug; 11(8):367-373.
- Coutte L, Antoine R, Drobecq H, Loch C, Jacob-Dubuisson F.** (2001) : Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. EMBO J. Vol.20 No18:5040-5048.
- 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.
- DeLey JP, Seger K, Kersters K, Mannheim W, Lievens A.** (1986): Intra- and intergeneric similarities of the *Bordetella* ribosomal ribonucleic acid cistrons: proposal for a new family, Alcaligenaceae. Int J Syst Bacteriol. 36:405-414.
- De Melker HE, Conyn-van Spaendock MA, Rumke HC, van Wijngaarden JK, Mooi FR, Schellekens JF.** (1997): Pertussis in the Netherlands: an outbreak despite high levels of immunisation with whole cell vaccine. Emerging Infectious Diseases. 3:175-178.
- 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.
- Diavatopoulos DA, Cummings CA, van der Heide HGJ, van Gent M, Liew S, Relman DA, Mooi FR.** (2006): Characterization of a highly conserved island in the otherwise divergent *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis* genomes. J Bacteriol. 2006 Oct.
- 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, ppp86-93.
- 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.
- Eldering G, Kendrick P.** (1938): *Bacillus parapertussis*, a species resembling both *Bacillus pertussis* and *Bacillus bronchiseptica* but identical with neither. J Bacteriol. 35:561-572.

- 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
- Farizo KM, Huang T, Burns DA.** (2000): Importance of holotoxin assembly in Ptl-mediated secretion of pertussis toxin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 2000;68:4049-4054.
- Fernandez RC, Weiss AA.** (1994): Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun.* 1994 Nov;62(11):4727-38.
- 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.
- Fry NK, Duncan J, Malnick H, Warner M, Smith AJ, Jackson MS, Ayoub A.** (2005): *Bordetella petrii* Clinical Isolate. *Emerging Inf Dis*, Vol.11 No7, July 2005
- 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.
- 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.
- Gerlach G.** (2004): Funktionelle Charakterisierung des BvgAS-Zwei-Komponentensystems aus *B. holmesii*. Doktorarbeit, Universität Würzburg.
- Gerlach G, Janzen S, Beier D, Gross R.** (2004): Functional characterization of the BvgAS two-component system of *Bordetella holmesii*. *Microbiology.* 2004 Nov; 150(Pt 11): 3715-3729.
- Geuijen CAW, Willems RJL, Mooi FR.** (1996): The Major Fimbrial Subunit of *Bordetella pertussis* Binds to Sulfated Sugars. *Infect Immun.* 1996 July;Vol.64, No7:2657-2665.
- Giardina PC, Foster LA, Musser JM, Akerley BJ, Miller JF, Dyer DW.** (1995): bvg repression of alcaligin synthesis in *Bordetella bronchiseptica* is associated with phylogenetic lineage. *J Bacteriol.* 177:6058-6063.
- 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.
- Gomez L, Graziutti M, Sumoza D, Beran M, Rolston K.** (1998): Bacterial pneumonia due to *Bordetella bronchiseptica* in a patient with acute leukemia. *Clin Infect Dis.* 26:1002-1003.
- Goodnow RA.** (1980): Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol Rev.* 1980 Dec;44(4):722-38. Review.
- Gorski A, Dabrowska K, Switala-Jele K, Nowaczyk M, Weber-Dabrowska B, Boratynski J, Wietrzyk J, Opolski A.** (2003): New insights into the possible role of bacteriophages in host defense and disease. *Medical Immunology* 2003,2.
- Goyard S, Mireau H, Ullmann A.** (1995): Mutations which result in constitutive expression of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin gene. *Res. Microbiol.* 1995,146:363-370.
- 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.
- 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.
- Guedin S, Willery E, Loch C, Jacob-Dubuisson F.** (1998): Evidence that a globular conformation is not compatible with FhaC-mediated secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *Mol Microbiol.* 1998;29(3):763-774.
- 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.
- Hannah JH, Menozzi FD, Renaud G, Loch C, Brennan MJ.** (1994): Sulfated glycoconjugate Receptors for the *Bordetella pertussis* Adhesin Filamentous Haemagglutinin (FHA) and Mapping of the Heparin-Binding Domain on FHA. *Infect Immun.* 62: 5010-5019.
- 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.
- Hawley DK, McClure WR.** (1983): Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucl. Acid Res.* 11:2237-2255.
- Hazenbos WL, van den Berg BM, Geuijen CW, Mooi FR, van Furth R.** (1995): Binding of FimD on *Bordetella pertussis* to very late antigen-5 on monocytes activates complement receptor type 3 via protein tyrosine kinases. *J Immunol.* 155:3972-3978.
- 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.
- 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.
- Hinz KH, Glunder G, Luders H.** (1978): Acute respiratory disease in turkey poultts caused by *Bordetella bronchiseptica* like bacteria. *Vet Rec.* 1978 Sep 16; 103(12): 262-263.
- Hodak H, Clantin B, Willery E, Villeret V, Loch C, Jacob-Dubuisson F.** (2006): Secretion signal of the filamentous haemagglutinin, a model two-partner secretion substrate. *Mol. Microbiol.* (2006) 61(2):368-382.
- 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.
- Hornibrook JW.** (1940): Nicotinic acid as a growth factor for *Haemophilus pertussis*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 45:598-599.
- Inatsuka CS, Julio SM, Cotter PA.** (2005): *Bordetella* filamentous hemagglutinin plays a critical role in immunomodulation, suggesting a mechanism for host specificity. *PNAS*, Dec 2005, Vol.102 No 51: 18578-18583.

- Ishibashi, Nishikawa.** (2002): *Bordetella pertussis* infection of human respiratory epithelial cells up-regulates intercellular adhesion molecule-1 expression: role of filamentous hemagglutinin and pertussis toxin. *Microb Pathog.* 2002 Sep;33(3):115-125.
- Jacob-Dubuisson F, Buisine C, Willery E, Renault-Mongenie G, Loch C.** (1997): Lack of functional complementation between *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and *Proteus mirabilis* HpmA hemolysin secretion machineries. *J. Bacteriol.* (1997)179:775-783.
- Jacob-Dubuisson F, El-Hamel C, Saint N, Guedin S, Willery E, Molle G, Loch C.** (1999): Channel formation by FhaC, the outer membrane protein involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Biol Chem* 1999.274:37731-37735.
- Jacob-Dubuisson F, Kehoe B, Willery E, Reveneau N, Loch C, Relman DA.** (2000): Molecular characterization of *Bordetella bronchiseptica* filamentous hemagglutinin and its secretion machinery. *Micobiol.* 146:1211-1221.
- Jacob-Dubuisson F, Loch C, Antoine R.** (2001) : Two-partner secretion in Gram-negative bacteria : a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol. Microbiol.* (2001) 40(2):306-313.
- Jacob-Dubuisson F, Fernandez R, Coutte L.** (2004) : Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochimica et Biophysica Acta* 1694 (2004) 235-257.
- Johansson MW.** 1999. Cell adhesion molecules in invertebrate immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 23:303-315.
- Jones AM, Boucher PE, Williams CL, Stibitz S, Cotter P.** (2005): Role of BvgA phosphorylation and DNA binding affinity in control of Bvg-mediated phenotypic phase transition in *Bordetella pertussis*. *Mol. Microbiol.* 58(3):700-713.
- Julio SM, Cotter PA.** (2005): Characterization of the Filamentous Hemagglutinin-Like Protein FhaS in *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun.* Aug 2005, 4960-4971.
- Kajava AV, Cheng N, Cleaver R, Kessel M, Simon MN, Willery E, Jacob-Dubuisson F, Loch C, Steven A.** (2001): Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins. *Mol. Microbiol.* 2001; 42:279-292.
- Kaper JB, Hacker J.** (1999): Pathogenicity islands and other mobile virulence elements. ASM Press 1999.
- 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.
- 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.
- Kerstens K, Hinz KH, Hertle A, Segers P, Lievens A, Siegmann O, De Ley J.** (1984): *Bordetella avium* sp. nov., isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds. *Int J Syst Bactriol.* 34:56-70.
- Khelef N, Zychlinsky A, Guiso N.** (1993): *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun.* 1993 Oct;61(10):4064-71.
- 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.
- Kinnear SM, Marques RR, Carbonetti NH.** (2001): Differential regulation of Bvg-activated virulence factors plays a role in *Bordetella pertussis* pathogenicity. *Infect. Immun.* (2001)69:1983-1993.

- 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.
- Ko KS, Peck KR, Oh WS, Lee NY, Lee JH, Song JH.** (2005): New Species of *Bordetella*, *Bordetella ansorpii* sp. nov., Isolated from the Purulent Exudate of an Epidermal Cyst. *J of Clin Microbiol.* May 2005, 2516-2519.
- 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.
- Lambert-Buisine C, Willery E, Locht E, Jacob-Dubuisson F.** (1998): N-terminal characterization of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol Microbiol.* 28:1283-1293.
- 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.
- Lively I, Wardlaw AC.** (1984): Production and properties of *Bordetella pertussis* heat labile toxin. *J Med Microbiol.* 17:91-103.
- 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.
- Locht C, Antoine R.** (1995): A proposed mechanism of ADP-ribosylation by the pertussis toxin S1 subunit. *Biochimie* 1995;77:333-340.
- Locht C, Antoine R, Jacob-Dubuisson F.** (2001) : *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr Op in Microbiol.* 2001;4:82-89.
- Loomis WF, Kuspa A, Shaulsky G.** (1998): Two-component signal transduction systems in eukaryotic microorganism. *Curr Op in Microbiol.* 1:643-648.
- Lopez-Moreno M.** (1952): El genero *Bordetella*. *Microbiol. Esp.* 5:177-181.
- 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.
- 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.

- Masuda M, Betancourt L, Matsuzawa T, Kashimoto T, Takao T, Shimonishi , Horiguchi Y.** (2000): Activation of Rho through a cross-link with polyamines catalyzed by *Bordetella* dermonecrotic toxin. *EMBO J* 2000;19:521-530.
- Mazar J, Cotter PA.** (2006): Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol. Microbiol.* (2006).
- 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.
- McLane MA, Kowalska MA, Silver L, Shattil SJ, Niewiarowski S.** (1994): Interaction of disintegrins with the $\alpha_{IIb}\beta_3$ receptor on resting and activated human platelets. *Biochem. J.* (1994) 301:429-4356.
- 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, 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.
- 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.
- Mielcarek N, Riveau G, Remoue F, Antoine R, Capron A, Locht C.** (1998) : Homologous and heterologous protection after single intranasal administration of live attenuated recombinant *Bordetella pertussis*. *Nat Biotechnol.* 16: 454-457.
- 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.
- Miller JF, Johnson SA, Black WJ, Beattie DT, Mekalanos JJ, Falkow S.** (1992): Isolation and analysis of constitutive sensory transduction mutations in the *Bordetella pertussis bvgS* gene. *J. Bacteriol.* 174:970-979.
- Mishra M, Deora R.** (2005): Mode of Action of the *Bordetella* BvgA Protein: Transcriptional Activation and Repression of the *Bordetella bronchiseptica bipA* Promotor. *J of Bacteriol.* Sept.2005,6290-6299.
- 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.
- 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.
- Mori H, Ito K.** (2001): The Sec protein-translocation pathway. *TRENDS in Microbiology* Vol.9No10 Oct 2001

- 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
- 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.
- Nykvist P, Tasanen K, Viitasalo T, Kapyla J, Jokinen J, Bruckner-Tuderman L and Heino J.** (2001): The cell adhesion domain of type XVII collagen promotes integrin-mediated cell spreading by a novel mechanism. J. Biol. Chem. 276:38673-38679.
- 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, Rabbinowitsch 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.
- Perez Vidakovics MLA, Lamberti Y, van der Pol W, Yantorno O, Rodriguez ME.** (2006) : Adenylate cyclase influences filamentous haemagglutinin-mediated attachment of *Bordetella pertussis* to epithelial alveolar cells. FEMS Immunol Med Microbiol 48 (2006): 140-147.
- 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.
- Pittman M.** (1984a): In: Krieg NR, Holt JG (Eds.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1984, pp.388-394.
- Pittman M.** (1984b): The concept of pertussis as a toxin-mediated disease. Pediatr Infect Dis. 1984 Sep-Oct; 3(5):467-486.
- 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, 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.
- Pradel E, Guiso N, Menozzi FD, Loch C.** (2000): *Bordetella pertussis* TonB, a Bvg-independent virulence determinant. Infect Immun. 68:1919-1927.
- Prasad SM, Yin Y, Rodzinski E, Tuomanen EI, Masure HR.** (1993): Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *B. pertussis*. Infect Immun. 61:2780-2785.
- 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.
- Register KB, Ducey TF, Brockmeier SL, Dyer KW.** (2001): Reduced virulence of a *Bordetella bronchiseptica* siderophore mutant in neonatal swine. *Infect Immun.* 69:2137-2143.
- 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.
- Renauld-Mongenie G, Cornette J, Mielcarek N, Menozzi FD, Loch C.** (1996): Distinct roles of the N-terminal and the C-terminal precursor domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *J Bacteriol.* 1996 Feb; 178:1053-1060.
- 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.
- 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.
- Russel FM, Davis JM, Whipp MJ, Janssen PH, Ward PB, Vyas JR, Starr M, Sawy SM, Curtis N.** (2001): Severe *Bordetella holmesii* infection in a previously healthy adolescent confirmed by gene sequence analysis. *Clin Infect Dis.* 2001 Jul;33 (1):129-130.
- 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.
- Savelkoul PHM, Kremer B, Kusters JG, van der Zeijst AM, Gaastra W.** (1993): Invasion of HeLa cells by *Bordetella bronchiseptica*. *Microbial Pathogenesis.* 14: 161-168.
- 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, Rappuoli R.** (1991b): Differential response of the *bvg* virulence regulon of *Bordetella pertussis* to MgSO₄ modulation. *J Bacteriol.* 1991 Nov;173(22):7401-4.
- Schipper H, Krohne GF, Gross R.** (1994): Epithelial cell invasion and survival of *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun., July 1994, Vol.62, No.7, p. 3008-3011*
- Schneider B, Gross R.** (2001): *Bordetella pertussis*: Increasing problems with a well-known pathogen and its relatives. In: Mühlendorfer I, Schäfer KP (eds): *Emerging bacterial pathogens.* Contrib Microbiol. Basel, Karger, 2001; 8, pp.123-136.
- 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.

- Schönherr R, Tsolis R, Focareta T, Braun V.** (1993): Amino acid replacements in the *Serratia marcescens* haemolysin Sh1A define sites involved in activation and secretion. *Mol. Microbiol.* 9:1229-1237.
- Sebailia M, Preston A, Maskell DJ, Kuzmiak H, Connell TD, King ND, Orndorff PE, Miyamoto DM, Thomson NR, Harris D, Goble A, Lord A, Murphy L, Quail MA, Rutter S, Squares R, Squares S, Woodward J, Parkhill J, Temple LM.** (2006): Comparison of the Genome Sequence of the Poultry Pathogen *Bordetella avium* with Those of *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* and *B. parapertussis* Reveals Extensive Diversity in Surface Structures Associated with Host Interaction. *J of Bacteriol.* Aug 2006,6002-6015.
- 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.
- Simon R, Priefer U, Pühler A.** (1983): A broad host range mobilization system for *in vitro* genetic engineering: transport mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biol./Technology* (1983)1:37-45.
- Skeeles DW, Arp LH.** (1997): Diseases of poultry (Eds.: Clancik 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.
- 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, 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, 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.
- 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 Boligomer 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.
- 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.
- 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.** (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, 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'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.** (1984): Genetic analysis of phase change in *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 1984 Jan;43(1):263-9.
- Weiss AA.** (1992): The Genus *Bordetella*. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH. (eds), *The prokaryotes*. Springer, Berlin Heidelberg New York (1992):2530-2543.
- 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.
- 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.
- 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.
- Zaretzky FR, Gray MC, Hewlett EL.** (2002): Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of *Bordetella pertussis*: a role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction. *Mol. Microbiol.* 45:1589-1598.
- 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.

VIII 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
BvgA _{BH}	BvgA-Protein aus <i>B. holmesii</i>
BvgA _{BP}	BvgA-Protein aus <i>B. pertussis</i>
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
CYA	Adenylatzyklase
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser, Millipore
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNT	Dermonekrotisches Toxin
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylmenadion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease

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
FHA	Filamentöses Hämagglutinin
<i>fhaB_{BH}</i>	<i>fhaB</i> -Gen aus <i>B. holmesii</i>
G	Guanin
g	Gramm
GC-Gehalt	Guanin/Cytosin-Gehalt
GFP	green fluorescent protein
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
PRN	Pertaktin
PTX	Pertussistoxin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Ubichinon
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	“rounds per minute”
RT	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdedocylsulfat
sec	Sekunde(n)
SS	Steiner-Scholte
T	Thymin
t	zeit
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-Borat-Saline
TCA	Trichloressigsäure
TCT	Tracheales Zytotoxin
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

Persönliche Daten:

Name: Stefanie Link
Anschrift: Websweilerstr. 26
66450 Bexbach/Höchen
Telefon: 06826/8170060
Geburtsdatum: 22.03.1976, Werneck
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung

09/1982 – 07/1986 Dr. Ludwig-Pfeiffer-Grundschule, Schweinfurt
09/1986 – 07/1995 Olympia-Morata-Gymnasium, Schweinfurt
Abschluss: Abitur, Note: 2,2

Hochschulausbildung

10/1995 – 07/2002 Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Hauptstudium mit den Schwerpunkten: Mikrobiologie
Biochemie, Zell- und Entwicklungsbiologie

Thema der Diplomarbeit: „Konstruktion von Insertionsmutanten von *Listeria monocytogenes* EGDe und *Listeria ivanovii* ATCC19119 zur Untersuchung der Deletionshäufigkeit von LIPI-1 und LIPI-., und „Charakterisierung der Protein-Tyrosin-Phosphatase-Deletionsmutanten von *Listeria monocytogenes* bezüglich der Expression verschiedener Internalingene“

Abschluss: Diplom-Biologin Univ., Note: sehr gut

08/2002 – 07/2006 Promotion am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. Roy Gross

3 Publikationsliste

Link, S., Schmitt, K., Gross, R. 2007. The Filamentous Hemagglutinin (FhaB) of *Bordetella holmesii* is Regulated by the BvgAS Two-component system and Contributes to Adhesion to Human Lung Epithelial Cells. Infect. Immun., submitted.

Gross, R., Guzman, C.A., Martinez, R., Bartels, D., Becker, P., Buhrmeister, J., Coudhuri, J.V., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hermann, S., Koebnik, R., Larisch, C., Lechner, M., Link, S., Martins dos Santos, V., Mormann, S., Nakunst, D., Rückert, C., Schneiker, S., Schulze, K., Vorhölter, F., Yevsa, T., Blöcker, H., Göbel, U.B., and O. Kaiser. 2006. The genome sequence of *Bordetella petrii* reveals features of pathogenic and environmental bacteria, in preparation.

Posterpräsentationen

Link, S., Gross, R.

„Identification and characterization of the *fhaB* gene of *B. holmesii*.“

Evaluierung des Graduiertenkollegs, Würzburg, 3/2005

Summerschool in Umeå, Schweden, 6/2005

Link, S., Gross, R.

“Structural characterization and regulation of FHA in *B. holmesii*.“

Jahrestagung der VAAM, Jena, 3/2006

4 DNA- und Proteinsequenzen

	1				50
FHAB.B.PERTUSSIS	MNTNLYRLVF	SHVRGMLVPV	SEHCTVGNTF	CGRTRGQARS	GARATSLSVA
FHAB.B.HOLMESII	VNASLYRLIF	SKVLGMYVPV	SELKTAGRRK	GRRARTGAGG	PYRLRMLSCA
FHAB.B.AVIUM	VNASLYRLVF	SKILGMYVPI	AEIKTAGRKK	STRARRKLG	VPRACRLSSA
FHAB.B.PETRII	~~~~~	~~~~~	VALFISVRL	MSKFRSLTIW	LVLITQVWTP
	51				100
FHAB.B.PERTUSSIS	PNALAWALML	ACTGLELVTH	AQGLVPG.GQ	TQVLQGGNKV	PVVNIADPNS
FHAB.B.HOLMESIILW	LAFGLSGPAG	AOVTPAAGAA	TTTHTSANGV	PVINI AAPDA
FHAB.B.AVIUMLL	LAFALPDDFAA	AEVVAAN.NK	SAVTEARTGV	PVINI AAPNA
FHAB.B.PETRIIV	LAQTLAISVD	KRVSGAK...	PVVGVSNGV	PVVNI APPSA
	101				150
FHAB.B.PERTUSSIS	GGVSHNKFOO	FNVANP.GVV	FNNGLTDGVS	RIGGALTKNP	NLT.RQASAI
FHAB.B.HOLMESII	HGLSHNKFQQ	FNTVAP.GAV	FNNSKQNGRS	QIAGQISRNP	NLTGALASTI
FHAB.B.AVIUM	QGLSH TOLQO	LNVGRP.GVV	FNNSLHDGOS	HIAGRVLANP	NLSGHAAKSI
FHAB.B.PETRII	GGVSNNRYIQ	FNVG.PSGVV	LNNSGGASQT	QLAGQIGGNP	MLGNQRATTI
	151				200
FHAB.B.PERTUSSIS	LAEVTDTSPS	RLAGTLEVYV	KGADLIIANP	NGISVNGLST	LNASNLTLTT
FHAB.B.HOLMESII	LSEVTGPGAS	SLNGTLEVHG	GTANLIIANP	NGISVDGLTT	LNTHSLTLST
FHAB.B.AVIUM	LAEVTGTSPS	SLAGTLEVFG	NKADLIVANP	NGITVNGLTT	LNAGSITLTT
FHAB.B.PETRII	LNQVTAPNPS	RLLG TLEVAG	HRA NVIVANP	AGITCDGCGF	LNANRATLTT
	201				250
FHAB.B.PERTUSSIS	GRPSVNGGRI	GLDVQCGIVT	IERGGVNAIG	LGYFDVVARL	VKLGQVASSK
FHAB.B.HOLMESII	GVPSVRDGVV	SLGVTQGLT	VGSSGVNTDG	LQTFDMVAKL	IQIGGAI GGT
FHAB.B.AVIUM	GVPTVRGDSV	SLAVDKGRLT	VGDEGVNTDG	LKTFDMVAKL	IOIDGAI GSS
FHAB.B.PETRII	GRPQLGSGGI	DFDVSAGQLR	IEGDGLYGGE	AAQVDLLARS	LQINASVWAK
	251				300
FHAB.B.PERTUSSIS	QGKPLADIAV	VAGANRYDHA	TRRATPIAAG	AR.GAAAG.A	Y AIDGTAAGA
FHAB.B.HOLMESII	QGN.QADIKA	LAGS SNFITA	TRSAAPVRRK	R..AAEAGSG	Y AIDGSAAGA
FHAB.B.AVIUM	.GQ.KSDIKA	IAGTSVFDTA	TRTHAKTRV	ARAAQDGGG	Y AIDGSAAGA
FHAB.B.PETRIIKLN.V	VAGASRVDFG	S...GQVTAG	A..AQEPAPE	FALDTAALGG
	301				350
FHAB.B.PERTUSSIS	MYGKHITLVS	SDSGLGVRQL	GSLSSP.SAI	TVSSQGEIAL	GDATVQRGPL
FHAB.B.HOLMESII	MHGKAITLIS	TDAGLGVRQP	GTLVSA.GDI	SIDARGNVEV	GSAKA.R...
FHAB.B.AVIUM	MHGKAITLIA	TDAGLGVRQP	GSLSSE.NDI	SVQADGNIQV	GKTQG.K...
FHAB.B.PETRII	MYANSIRLVG	TEAGVGVNIG	NNLVALTGDL	QVSAAGDVRI	RPTATLQAG.
	351				400
FHAB.B.PERTUSSIS	SLKGAGVVSA	GKLASGGAV	NVAGGGAVKI	ASASSVGNLA	VQGGKVVQAT
FHAB.B.HOLMESIIDLA	LRAG.....
FHAB.B.AVIUMNIS	TVSG.....
FHAB.B.PETRIIAGLS	LHSGSN....
	401				450
FHAB.B.PERTUSSIS	LLNAGGTLIV	SGRQAVQLGA	ASSRQALSVN	AGGALKAD.K	LSATRVRVDV
FHAB.B.HOLMESIIADV KAGT	VQTAGKLTAS	AGRNLAVD.T	MVAGQGASIT
FHAB.B.AVIUMAAASVGT	AVARQNLTK	AQSGLSID.A	FNVKGDANLQ
FHAB.B.PETRIIVDVAAGG	RLQGVGVAIV	AGQDARLDGT	LSSAGDVSVQ
	451				500
FHAB.B.PERTUSSIS	GKOLAVALGS	ASSNALSVRA	GGALKAGKLS	ATGRLDVVDGK	QAVTLGVSAS
FHAB.B.HOLMESII	TDSGDITLG.PA	GKAES.AASE	LTGNVEL...TAR
FHAB.B.AVIUM	TASGVWLWG.PE	TGAVSDGKSS	TGGRLSV...AAS
FHAB.B.PETRII	AGRDIATAG.K	LGVDG.GAVL	QAGRHLD...LAA
	501				550
FHAB.B.PERTUSSIS	DGALSVSAGG	NLRANELVSS	AQLEVRGQRE	VALDDASSAR	GMTVVAAGAL
FHAB.B.HOLMESII	NGSII LSR..DIKA	DSFKVR....
FHAB.B.AVIUM	DGGVVVSR..YVDT	DSLELK....
FHAB.B.PETRII	AAQIETAR..AIDARA	GNRL LAG..

	551					600
FHAB.B.PERTUSSIS	AARNLQSKGA	IGVQGGEAVS	VANANSDAEL	RVRGRGQVDL	HDLSAARGAD	
FHAB.B.HOLMESII	.ARSWVFR..NAVV	EASGKS....	...GAPNSVD	
FHAB.B.AVIUM	.ASNLHIN..HALI	DVKGSD....	...KQP...AT	
FHAB.B.PETRII	DARSGDMA.LA.	.A....GGAL	EARGNASAA	G...NMFLHAGGD	
	601					650
FHAB.B.PERTUSSIS	ISGEGRVNIG	RARSDSDVKV	SAHGALSIDS	MTALGAI	GVO	AGGSVSAKDM
FHAB.B.HOLMESII	VEVSDRIVLV	GALH.....GVD	GAG.....NP	
FHAB.B.AVIUM	IDVSGSITMA	GTLS.....AVR	VDG.....ET	
FHAB.B.PETRII	VSVAGQLLAG	RDLSLSADG.AVD	LAG.....TA	
	651					700
FHAB.B.PERTUSSIS	RSRGAVTVSG	GGAVNLGDVQ	SDGQVRATSA	GAMTVRDVAA	AADLALQAGD	
FHAB.B.HOLMESII	ITNSVVKMVD	G.....RPVVHEASSGK	
FHAB.B.AVIUM	INNASITLEN	G.....VPVVRDGLTGQ	
FHAB.B.PETRII	VADRMIRVNA	G.....	ADIVLREDA	L AQ.....GS	
	701					750
FHAB.B.PERTUSSIS	AIQAGFLKSA	GAMTVNGRDA	VRLDGAHAGG	QLRVSSDGOA	ALGSLAAKGE	
FHAB.B.HOLMESII	ALPD.....ATVGS...	..VGVRAIKGN	
FHAB.B.AVIUM	ALPG.....AELSSD...	..AGIRAHQGD	
FHAB.B.PETRII	QTLA.....MTAARD...	..LHVAGTTGT	
	751					800
FHAB.B.PERTUSSIS	LTVSAARAAT	VAELKSLDNI	SVTGGERSVSV	QSVNSASRVA	ISAHGALDVG	
FHAB.B.HOLMESII	ILLKGS....	...SLDNQ...	...SS.....VI	TALDGDITLS	
FHAB.B.AVIUM	IQLKAG....	...SLHNN...	...GG.....ML	LSAHG...IEVK	
FHAB.B.PETRII	AETAASQG..	...GLLQL A..	AG.....RDLA	VAPGGIVTAS	
	801					850
FHAB.B.PERTUSSIS	KVSAKSGIGL	EGWGAVGADS	LGSDG.AISV	SGR.DAVRVD	QARSLADISL	
FHAB.B.HOLMESII	FTGNENQG.V	IOSKK.RLTV	TAK.DIKNTL	LFDSDINIEL	
FHAB.B.AVIUM	ATSLIENKG.I	LRTKN.QLAL	SGQ.NIDNAF	AVLSDQDVQL	
FHAB.B.PETRII	SPAIITAAAR.D	LRLDGIIVAL	AGDLDLQAGG	QLAVGEHGRA	
	851					900
FHAB.B.PERTUSSIS	GAEGGATLGA	VEAAGSIDVR	GGSTVAANSL	HANRDVRVSG	KDAVRVTAAT	
FHAB.B.HOLMESII	TASG.....K	IENTGETSS.LDK	INKRAVRNVL	
FHAB.B.AVIUM	LAAG.....K	FSNTGTV...LAD	KGA...L...L	
FHAB.B.PETRII	QASN....RL	VADAGAGLA.VDG	IVVAGDT.VA	
	901					950
FHAB.B.PERTUSSIS	SGGGLHVSSG	RQLDLGAVQA	RGALALDGGGA	GVALQSAKAS	GTLHVQGGEH	
FHAB.B.HOLMESII	LHAGEKLTNS	...GFLGA	SGKLTIEG..	NVAQDQAKTR	
FHAB.B.AVIUM	IGANASINNO	...CVLNA	GGRLTLGG..	LAADAGQEGS	
FHAB.B.PETRII	LRAGQSAEIN	...GLIAA	LGGAGTGG..	LTVASQDIS	VG.....	
	951					1000
FHAB.B.PERTUSSIS	LDLGTAAVVG	AVDVNGTGDV	RVAKLVSDAG	ADLQAGRSMT	LGTVDITGDL	
FHAB.B.HOLMESIIPDVINDA.	...QGRVDV	EELSIT....	
FHAB.B.AVIUMPDIVS...	...AGRILS	DGLTVS....	
FHAB.B.PETRII	RLARVQAAGA	AAMQAGQDLR	LDGAVTIAID.	
	1001					1050
FHAB.B.PERTUSSIS	QARAQQKLEL	GSVKSQGLQ	AAAGGALSLA	AAEVAGALEL	SGQGVIT.VDR	
FHAB.B.HOLMESII	GNR.FDN..KGSFVV	RSGGAT.ADV	
FHAB.B.AVIUM	GRQ.FDN..QKLTIV	RGGGVS.IKV	
FHAB.B.PETRII	GLT.LAT..ARDTWI	NGSAAITDGL	
	1051					1100
FHAB.B.PERTUSSIS	ASASRARIDS	TGSVIGIGALK	AGAVEAASPR	RARRALRODF	FIPGSVVRRA	
FHAB.B.HOLMESII	TQMF....T	TGSFEVSSQN	GLDVRAGDVY	...ADGKL	TVKGRAKLDA	
FHAB.B.AVIUM	EDALR....S	TGEVQVGVGS	EVQATANTIH	...LGKGF	VSLSQVSLSA	
FHAB.B.PETRII	AWTGR....R	LGMGEHGLAQ	AGQRLAAQAQ	DS.MTLAAGTL	VAGQALALGA	

	1101				1150
FHAB.B.PERTUSSIS	QGNVTVGRGD	PHQGVLAQGD	TIIMDAKGGTL	LLRNDALITEN	G.TVTISADS
FHAB.B.HOLMESII	RANAQFA...	ANAK	VQVN...TL	EVKAQDLINK	G.DVTSTGQV
FHAB.B.AVIUM	AGDTDID...	GKGR	VSVK...QL	SLSTHNLHNT	G.SVSTSGAG
FHAB.B.PETRII	VNDVQLDG...	TAAALQGD	VAVRSTVGDV	RLGAQAHVOA	GGELVAEAGR
	1151				1200
FHAB.B.PERTUSSIS	AVLEHSTIES	KISQSVLAAK	GDKGKPAVSV	KVAKKLFVNG	TLRAVNDNNE
FHAB.B.HOLMESII	NVQAQOSIV		NHGK		.LQGH
FHAB.B.AVIUM	NIQARGSVE		NOGK		.LQGVN
FHAB.B.PETRII	DLIAAGTLAS	GQD...MR	LRAGR		QLDGIAAAQG
	1201				1250
FHAB.B.PERTUSSIS	TMSGRQIDVV	DGRPQITDAV	TGEARKDESV	VSDAALVADG	GPIVVEAGEL
FHAB.B.HOLMESII			ITLAAQRDV		
FHAB.B.AVIUM			L TLEAQLD		
FHAB.B.PETRII			A L DAAAGDL		
	1251				1300
FHAB.B.PERTUSSIS	VSHAGGIGNG	R.NKENGASV	TVRTTGNLVN	KGYISAGKQG	VLEVGALTN
FHAB.B.HOLMESII		RNEGVAVLI	OARQALSVTT	TGSVING	CTLRG
FHAB.B.AVIUM		NKGSASV	RGTRSLDATV	KGYVNE	GRVES
FHAB.B.PETRII		SVAAAGRV	QADGALALAA	GGALSNA	CVAAAG
	1301				1350
FHAB.B.PERTUSSIS	EFLVGS DGTQ	RIEAORIENR	GTFCSQAPAG	TAGALVVKAA	EATVHDGVMA
FHAB.B.HOLMESII	RTVT	.LQDDEAAN	...ERGAMIV	ASQSGDFKVR	KSLRNEGTIS
FHAB.B.AVIUM	QALV	.VQAQNLRN	...QAEATII	GNKGATLKVA	EQLRNGGTIR
FHAB.B.PETRII	ATTA	.TLSAGTAF	...DNTGTV	LSGGDLAASA	GILRNSQOLA
	1351				1400
FHAB.B.PERTUSSIS	TKGEMQIAGK	GGGSPTVTAG	AKATTSANKL	SVDVASWDNA	GSLDIKKGGA
FHAB.B.HOLMESII	TK		...RT	DIQAHELHM	AGGSLSATSA
FHAB.B.AVIUM					S
FHAB.B.PETRII	AG			VDAD	G.RLQTGS
	1401				1450
FHAB.B.PERTUSSIS	QVTVAGRYAE	HGEVSIQGDY	TVSADALALA	AQVTQGGAA	NLTSRHDRF
FHAB.B.HOLMESII	KITVSQGLTN	SCETKVS GML	DGRAATLSNQ	AGAQLSA	
FHAB.B.AVIUM					
FHAB.B.PETRII	LALRAGRIVN	SCAVLASTEM	LLAADAVDNT	GGSLAATG	
	1451				1500
FHAB.B.PERTUSSIS	SNKIRLMGPL	QVNAGGPVSN	TGNLKVREGV	TVTAAS.FDN	E.TGAEVMAK
FHAB.B.HOLMESII	...AQA	KLNVQGDLSN	AGDIKT.QQL	TLAAKG.LHN	Q.PGALLQAD
FHAB.B.AVIUM		N	...ASL	TVSAGS.LDN	L.LGAKLQAD
FHAB.B.PETRII	...A	ATIEARTLNN	QAGILAAGDI	SIQALDQVHN	SGDCTIAAR
	1501				1550
FHAB.B.PERTUSSIS	SATLTTSGAA	RNAGKMVQKE	AATIVAASVS	NPGTFTAGKD	ITVTSRGGFD
FHAB.B.HOLMESII	SAOLTVOEDI	DNAGEVKAKK	.LTLGARKLH	N	
FHAB.B.AVIUM	TATLDVRDQM	RNAGEVLVKQ	QLSVKAAELD	N	
FHAB.B.PETRII	SLNLDTAE LL	NTSGLVSSQG	SADIDAASLR	N	
	1551				1600
FHAB.B.PERTUSSIS	NEGKMSNKD	IVIKTEQFSN	GRVLDAKHDL	TVTASCOADN	RGSLKAGHDF
FHAB.B.HOLMESII	...KAT		G	...KIQADN	AT
FHAB.B.AVIUM	...VES		G	...SISASD	AG
FHAB.B.PETRII	...AD		G	...RLAED	RLA
	1601				1650
FHAB.B.PERTUSSIS	TVQAQRIDNS	GTMAAGHDAT	LKAPHLRNTG	QVVAGHDIHI	INSAKLENTG
FHAB.B.HOLMESII					LRVOSLDNAG
FHAB.B.AVIUM					LNASALNNTG
FHAB.B.PETRII					LQAQEDG V G
	1651				1700
FHAB.B.PERTUSSIS	RVDARNDIAL	DVA.DFTNTG	SLYAEHDATL	TLAGTQRDL	VVDODHILPV
FHAB.B.HOLMESII	VAQASHDMST	MTT.DYANAG	QLRAGHDLTL	NYNN.IAGL	TIDAKRQSPL
FHAB.B.AVIUM	KIAAVNDIVS	NVG.DYRNTG	HISAGANASF	XVTN.TDGL	DIDPERRAAV
FHAB.B.PETRII	TVHAGGDLAV	SVAGSLTQDG	TLVAGRDL SL	AVGDRLDNQG	QVSAGRDLIV

	1701		1750
FHAB.B.PERTUSSIS	AEGTLRVKAK	SLTTEIETGN	PG.SLTAIEVQ
FHAB.B.HOLMESII	ANGTLTLOAK	YLTVRTGIEN	PGNVVLTAST
FHAB.B.AVIUM	ANGALTYEAR	SLRVRDAIQN	PGNIIVLKATQ
FHAB.B.PETRII	AAANLDNAAG	AQLLLAGRVNT	LHVAQALNNA
	1751		1800
FHAB.B.PERTUSSIS	AHG.NVANEAA	NALL...WAA	GELTVKAQNI
FHAB.B.HOLMESII	AKG.GITNSP	GSLI...WAG	KDVTASGHTI
FHAB.B.AVIUM	AQG.DIINEA	GALM...WAG	QNISSLGRNI
FHAB.B.PETRII	IYGDIAIOA	NTLLNDAGAS	GAAVIAARRD
	1801		1850
FHAB.B.PERTUSSIS	VALLNKLGRV	RAGEDMHLDA	PRIENTA...
FHAB.B.HOLMESII	QKLRNEAGRI	EAGGKLSIDT	PNLENLS...
FHAB.B.AVIUM	NRVRNRVGRV	DAGKNLVIDA	PRTENLS...
FHAB.B.PETRII	.DLR.VGGAL	DAGGRAAGQA	DSLNVASATI
	1851		1900
FHAB.B.PERTUSSIS	RWSGIY...	VNYWLRAGNG	KKAGTLAAPW
FHAB.B.HOLMESII	ODQGFWS...	TGRWVRT...	.KIHSFSVST
FHAB.B.AVIUM	KNLGHWR...	VGRWVRT...	.KIDDFSVRR
FHAB.B.PETRII	ASELVQVSTT	PKVYRPEGS	TDMYDAATTW
	1901		1950
FHAB.B.PERTUSSIS	NAGARKDEHR	HLLNEGVIOA	GHHGHIG..G
FHAB.B.HOLMESII	NQQQHKGKKA	RVYNEGATVA	GAQLRVD..G
FHAB.B.AVIUM	NQHEQKGGGS	QIYNEGIVLA	GKVLKAD..G
FHAB.B.PETRII	.QERRMLKPS	SKYPERAQYGP	PFDYALNKRK
	1951		2000
FHAB.B.PERTUSSIS	PLPV..SLTA	LDNRAGLSPA	TWNFQSTIYEL
FHAB.B.HOLMESII	NTGG.FSTRV	EEVALPSSGGH	DGRFTSLYDM
FHAB.B.AVIUM	NVGGHYVTSV	VDSLALANVD	ERAFPSLYDL
FHAB.B.PETRII	GPGG.DAGYD	WCGMQPAEYF	YSPSARIWSV
	2001		2050
FHAB.B.PERTUSSIS	TEWSVNTLKN	LDLGYQAKPA	PTAPMPKAP
FHAB.B.HOLMESII	SPT.....	..YNLFPV	LAGADLSKAP
FHAB.B.AVIUM	HP.....	..ADVATV	LMSADMTHAP
FHAB.B.PETRII	SAG.....	..YKAQAA	YQQAALAVYEK
	2051		2100
FHAB.B.PERTUSSIS	YKKLQGEYEK	AKMAVQAVEA	YGEATTRVHD
FHAB.B.HOLMESII	QLGQRYGKAL
FHAB.B.AVIUM	GGMDAETKEV
FHAB.B.PETRIIQAP..
	2101		2150
FHAB.B.PERTUSSIS	DGIIQEFAAD	LRTVYAKQAD	QATIDAETDK
FHAB.B.HOLMESII	VAQRYKSQID
FHAB.B.AVIUM	AVRLQAIQPG
FHAB.B.PETRII
	2151		2200
FHAB.B.PERTUSSIS	RVTLAKALSA	ALGADWRA..L	GHSOLMQRWK
FHAB.B.HOLMESIIKMLAA	ALGADWRG..L	TAVQREERWR
FHAB.B.AVIUMKMLNH	VMGSDWRA..L	DATORHVRWT
FHAB.B.PETRII	.YAKLNQRIS	AFNADPDARM	VKNITTYRVN
	2201		2250
FHAB.B.PERTUSSIS	LAAG..AGLT	LS.....N	GAIHNGENAA
FHAB.B.HOLMESII	LAGK..AGVT	HT.....G	GTMLVGGNST
FHAB.B.AVIUM	MAGR..KGVE	IT.....G	GKIMLGGNAT
FHAB.B.PETRII	GGDASLAGAV	INDKSQIAAG	GTLAVDGPAT
	2251		2300
FHAB.B.PERTUSSIS	GSFDALRDVG	LEKRLDIDD	LAAVLVNPHI
FHAB.B.HOLMESII	AAASLQ....
FHAB.B.AVIUM	SEAQLT....
FHAB.B.PETRII	RRVVLKG...

	2301				2350
FHAB.B.PERTUSSIS	ARQARQAPET	DGMVDARGLG	SADALASLAS	LDAAQGLEVS	GRRN..AQVA
FHAB.B.HOLMESII	IG	KVOVEIIAGT	LDATFKLDE.PQLE
FHAB.B.AVIUM	IG	KADVAVTGT	LDAVFASSDG	M.....SYVG
FHAB.B.PETRIIER	EYEPAQPYTG	AVSVTPVELA	VAGAGGNQTV	APQGSAPAGS
	2351				2400
FHAB.B.PERTUSSIS	DAGLAGE SAV	AAPAVGAADV	GVEPVTGDQV	DQPVVAVGLE	QPVAIVRVVAP
FHAB.B.HOLMESII	DIDLDFE...DPVLDELL	ANRFVFRPVS	PTIISTAAIKA
FHAB.B.AVIUM	KDDLISQ...DPVLQELL	GNRFVFRGRAP	DKLAAQASEA
FHAB.B.PETRII	DIGTALFP..VEI	GSLPLPGDGE	.VRTVTSFAQ	LPDSQLFVVD
	2401				2450
FHAB.B.PERTUSSIS	PA.VALPRPL	FETRIKFIIDQ	SKFYGSRYFF	...EQIG...YK
FHAB.B.HOLMESII	PGKQTLPRPY	FETRLNYIDQ	SQFYGSRYFF	...QKLG...YQ
FHAB.B.AVIUM	SG.DALPKPY	YETRLAYIDQ	GQFYGSRYFF	...OOVG...YQ
FHAB.B.PETRII	RE..ADAPYL	VATDPOFTGQ	RPFVSSDYLL	DLLRQAGALT	GIPDGAPFLT
	2451				2500
FHAB.B.PERTUSSIS	PDRAARVAGD	NYFDITLVRE	QVRALGGYE	SRLPVRGVAL	VAKLMDSAGT
FHAB.B.HOLMESII	PQGARVSGD	NYFDTOWILR	ERARLLGAAG	ARMGSGDAPT	VKQLMDNGSE
FHAB.B.AVIUM	PHQGVRLGD	NYFDTQMIQR	ERARLLAGAE	GRDILQGASL	VKAMMDNAAA
FHAB.B.PETRII	PSGQPRRLGD	GFYEQKLVSD	QILATTGQRF	LENYADAGAQ	YQALLQAGAD
	2501				2550
FHAB.B.PERTUSSIS	VGKALGLKVG	VAPTAQOLKO	ADRDFVWYVD	TVIDGQKVLVLA	PRLYLTEATR
FHAB.B.HOLMESII	QASRLGLQVG	QALSADQVAK	LDKDIVWYVW	TRINGTQVLM	PRVYLARASR
FHAB.B.AVIUM	QAGALGLKVG	EALTEKQISG	LENDIVWYVW	ANIEGKPMVM	PRVYLAKQSK
FHAB.B.PETRII	FAAQHGVLQ	VALTDAQQRQ	LTSDLVWLVA	QTVTLPGDGT	EQVLVE.QVY
	2551				2600
FHAB.B.PERTUSSIS	CGITDQYAGG	GALIASGGDV	TVNTDGHVDS	SVNG.....
FHAB.B.HOLMESII	QAADDVRKQG	GAVVASAGDI	NVDTGCGDVT	VANGALVGAK	VSIDTRSAVA
FHAB.B.AVIUM	KAAEDSRKRG	GAVIASAGAI	NAKTNGADVA	VYN.....
FHAB.B.PETRII	LLVRDGLRG	DGTLMAGRDV	SLNADG.DVA	NSG.....
	2601				2650
FHAB.B.PERTUSSIS
FHAB.B.HOLMESII	KQEAAQRDAM	LARLGQELGT	PLNSAIDTLA	QAHQTQLQQA	AGKVMALAGA
FHAB.B.AVIUM
FHAB.B.PETRII
	2651				2700
FHAB.B.PERTUSSIS
FHAB.B.HOLMESII	ALAKAPDGKV	TLDVSKLDDT	QLARLQSSAQ	DFYWNSQLNA	TDLLELGRAS
FHAB.B.AVIUMA.....VF..MGDAG
FHAB.B.PETRII
	2701				2750
FHAB.B.PERTUSSIS	..LIQGRSVKV	DAG.....
FHAB.B.HOLMESII	VGLDASGTSV	AAGGLNADAA	RGMLAERAGA	WRQKHDKGQA	LTHKQLLDVL
FHAB.B.AVIUM	VHVDARGAGA	DSG.....
FHAB.B.PETRII	.TIGARGATV	ITA.....
	2751				2800
FHAB.B.PERTUSSISK...GKVVV
FHAB.B.HOLMESII	QRVSEASTGK	LAVTKPTAAA	VTKAAQRLAE	SEMRKGSYA	IKAAIGQANF
FHAB.B.AVIUMNIAF
FHAB.B.PETRIIENIV
	2801				2850
FHAB.B.PERTUSSIS	ADSKGAGGGI	EADDEV..DV	SGRDIGIEGG	KLR...GKDV	RLKAD..TVKV
FHAB.B.HOLMESII	SSTGGVRAGI	SGOESV..TV	RAGESQIAGA	QLO...GKTV	DLOTEGRLRT
FHAB.B.AVIUM	TSTGGVLGGA	FSKENV..DL	HGQNIIRISGG	AIN...AKRV	TLDAKDKLEI
FHAB.B.PETRII	NQAGGRIQAA	SVDLNARQDL	ANIAALIKGD	TVVLAAGNDI	ALTSTTTSFK
	2851				2900
FHAB.B.PERTUSSIS	ATSMRYDDKG	RLAARGD GAL	DAOGGQ.LHI	EAKRLETAGA	TLKG..G.KVK
FHAB.B.HOLMESII	IVGMYDEKKG	HLLARDD.QS	QIQGSDSVKI	AATDYASEGG	IVASAG.EVA
FHAB.B.AVIUM	IVGMYHDDKG	RLVRDLR.AD	QVNGQSVNLS	SAKAITTEGA	TIASQG.SVS
FHAB.B.PETRII	HGATSGVNLG	GLSQIDAGSL	DMAAGRDLRL	AAADLSIEGD	ARLQAGRDID

	2901		2950
FHAB.B.PERTUSSIS	LDVDDVKLGG VYEAGSSYEN KS..STPLGS LFAILSSTTE TNQSAHANHY		
FHAB.B.HOLMESII	LKTSTIKLGT VKEVGSYAS HV..THALGE ALAALSOTIK TEOSASATDV		
FHAB.B.AVIUM	LKADNVHLGD VKEVGSYRHS TV..HNGLGE FFSFLSQTNT IEKSAQANSA		
FHAB.B.PETRII	LGTVKQSHSE AYVYKRNDS KVRTASEIGT TIAAGDVAL VAGQDIKARA		
	2951		3000
FHAB.B.PERTUSSIS	GTRTEAGTLE G.KMQNLEIE GGSVDAHTD LSVARBARFK AAA.DFAHAE		
FHAB.B.HOLMESII	GSTITAKKLI VDNSGDVSVT GGTIDANKSE IDIGNLQLK AGE.NHYVGY		
FHAB.B.AVIUM	GTDISTKALK INTTGDLTVT GGNVQATNSD IDVGGNLKLE AGK.NDSYHD		
FHAB.B.PETRII	ADVTAAGQLA AAAGRVAIS AGQASGYARD EHYKTSGFMS SSSSTHTVKS		
	3001		3050
FHAB.B.PERTUSSIS	HEKDVRO..L SLG..AKVGA GGYE..AGFS LGSESGLEAH AGRG..MTAG		
FHAB.B.HOLMESII	SREDRRE..L ALG..AAVGA GGYE..AAAS LGSETGSAH AGRG..KTAG		
FHAB.B.AVIUM	FKEDKRO..I LVG..MDVGA GGYE..ASAG FDTEDGLQTY AGRAGPNSGG		
FHAB.B.PETRII	TDWTAAGGST LTGDTAVVMA GRDVNVAGSN LAAQNDLVVS ADRDVNIVAG		
	3051		3100
FHAB.B.PERTUSSIS	AEVKVGYRAS HEQSS...E TEKSYRN..AN LNFVGGVSEA GNVLDIGGAD		
FHAB.B.HOLMESII	ARLTAGFSAS SEEST...I QAKTHRN..AQ FNVGEGKVVV RGTADLGGAD		
FHAB.B.AVIUM	ATFNLAGASIS SEKET...R QAETVSN..GV FNVGNGLIKV GSMADIGGAD		
FHAB.B.PETRII	KNITDDYQYE KIKKSGFGAL GGI SYKYEQ TDSLQKRVF HTASTVGSVE		
	3101		3150
FHAB.B.PERTUSSIS	INRNR.YGG..AAKGNAGTE EA..LRMRK KVESTKYVSE QTSQSSGWSV		
FHAB.B.HOLMESII	INRDL.AKS..QAAVGAAG..LSIEAG NIASTKAVDD IHTQTSYTRY		
FHAB.B.AVIUM	INNHR.AGDD QSQQODGG..LSLTAN EIKTKYVVK EKRYSKVGPF		
FHAB.B.PETRII	GDALLNAGNT LTVAGSNVLA RQGDVTLIGR NIDITSVTDT TWQREFHEIK		
	3151		3200
FHAB.B.PERTUSSIS	EVASTASARSSLLTAAT RLGDVVAQNV EDG.REIRGE LMAAQVAAEA		
FHAB.B.HOLMESII	TLGAEANAGSSVATTAT RFGDMIAQTV DDPKPKIDPA LAAAMAATET		
FHAB.B.AVIUM	SVGYQAYAKSSLLTSS RFGDMIAQTV DDPKPKVDPA LAAAMAATEA		
FHAB.B.PETRII	QTGLTVAAT PLVSAVQTAQ RMGEAAGKTD NAVMQLAGA TIALAANAY		
	3201		3250
FHAB.B.PERTUSSIS	TQLVTAATAA VALSAGISAD FDSHSRSTS QNTQYLG... ..G.NLSIEA		
FHAB.B.HOLMESII	TOLLGDTGS LTGTAKAGAE WGHOTSTETR ESTOTFG... ..G.NISLAA		
FHAB.B.AVIUM	TQLLFDITVS AGEHVGADVF WQRQSSTHTK ENTQRIG... ..G.NVSFNA		
FHAB.B.PETRII	DAVMKDPASA GGVSIKISLG TSKTSSITER KSSSTANGSTV AAGRDLAIVA		
	3251		3300
FHAB.B.PERTUSSIS	TEGD...AT LVGAKFGGSD QVSLKAAKSV NLMAAESTFE SYSESHNFHA		
FHAB.B.HOLMESII	NKGD...IT LAGTQFKGGD RVTLDKAGDV SLRAAQSRIV SHGGDHLTL		
FHAB.B.AVIUM	TKGD...ID LVGTQFSGGN KVELDARGDV SLRAAKSTTT SSGEDHRVGL		
FHAB.B.PETRII	QGGQASGIT VTGSGLSAGN NAVLQAEGLI LLAQAKNSAS QKTD...SK		
	3301		3350
FHAB.B.PERTUSSIS	SADANLGANA VOGAVLGLT AGMGTSHQIT NETG..KTYA GTSVDAAN.V		
FHAB.B.HOLMESII	SASINGGVNA ALGAAGAGVS ATLGSHTVS TENS..TRYQ NANIAAGE.V		
FHAB.B.AVIUM	DVGRSYCVNA PLRSAGAGIW ATLSGTHLVS HENS..TTYE NATLGAQN.I		
FHAB.B.PETRII	SSGASIGVGI SLGANAGIT AEAGVVSASRG KASGKDTTWT PTTIAAGNTL		
	3351		3400
FHAB.B.PERTUSSIS	SIDAGKDLNL SGRVRGKH.. VVLDVEGDIN ATSKODERNY NSSGGCWDAS		
FHAB.B.HOLMESII	SIRTAGDLAL SGARITVQDK AKIDVGGNTR ITSVDIQR KQEGGTWTAG		
FHAB.B.AVIUM	DIKAGKNLGL IGATVKADHS ANVVGGDIT IKSLONDIK EANGGNWAVG		
FHAB.B.PETRII	ALQSGGDTSL VGAAGKAAQ.. IVAVGGDILL VQSLQDSSRY DSKQTSVGF		
	3401		3450
FHAB.B.PERTUSSIS	AGVAIQNRTL VAPVGSAGFN FNTHEDNSRL TNDGAGVVA SDG.LTGHVK		
FHAB.B.HOLMESII	AVAGVNTKTI GSASVTVGLT GEEHHDNAKV VRE.QAGIQA GKS.LTLTSG		
FHAB.B.AVIUM	AVISVNSNTL VASASLGGG AEHHDNARV VTQ.QAGITA GGP.LTLKTKG		
FHAB.B.PETRII	ASACVTGCVG GSVSANAG.. AGKMHSEYDS VTQ.QAGLWA GDGFTQVKVG		
	3451		3500
FHAB.B.PERTUSSIS	GDANLTGATI ADL...SGK GNLKVDGAVN AQLNKDYRDK D.....		
FHAB.B.HOLMESII	GNDLVTAHL VS...AD GRVNAGGKIN ASQLKDKIDK D.....		
FHAB.B.AVIUM	GSLGMTGSHL VSS...TKE GHVGGGGIN ATKLHDKIDK D.....		
FHAB.B.PETRII	ENTTLVGGVI ASSQQAFAEA LNSLSTGLV VRDIENRADY SASQIALGGG		

Abb. 40: DNA- und Proteinsequenz des *fhaB*-Gens aus *B. holmesii*

```

GTGAACGCCTCTCTCTATCGTTTGATCTTCAGCAAAGTACTGGGGATGTATGTCCCGGTA
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
CACTTGCGGAGAGAGATAGCAAAGTCTGTTTCATGACCCCTACATACAGGGCCAT

V N A S L Y R L I F S K V L G M Y V P V -

TCCGAACTCAAGACGGCGGGTCGCCGCAAGGGCCGGCGAGCGGCACCGGGCAGGCGGG
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
AGGCTTGAGTTCTGCCGCCAGCGGCGTTCGCGCCGCTCGCGCGTGGCCCCGTCCGCC

S E L K T A G R R K G R R A R T G A G G -

CCATATCGCTTACGTATGCTCTCTTGGCGCTCTGGCTGGCCTTTGGCCTGTCCGGGCC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GGTATAGCGAATGCATACGAGAGAACGCGGAGACCGACCGGAAACCGGACAGGCCCGGA

P Y R L R M L S C A L W L A F G L S G P -

GCAGGCGCGCAGGTCACGCCGCTGCCGGCGCCGACACACATACGTCCGCCAAT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CGTCCGCGCGTCCAGTGCGGGCGACGCGCCGCGGCGGTGTGTGTGTATGCAGGCGGTTA

A G A Q V T P A A G A A T T T H T S A N -

GGCGTGCCAGTGATTAACATCGCTGCACCCGATGCCACGGCCTGTGCGACAACAAATTC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CCGCACGGTCACTAATTGTAGCGACGTGGGCTACGGGTGCCGGACAGCGTGTGTTTAAAG

G V P V I N I A A P D A H G L S H N K F -

CAGCAGTTCAACATCGTGGCGCCGGGCGGGTGTTCACAACAGCAAGCAGAACGGTTCGA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
GTCGTCAAGTTGTAGCACCGCGGCCGCGCCACAAGTGTGTGTCGTTGCTTGCAGCT

Q Q F N I V A P G A V F N N S K Q N G R -

TCGCAGATCGCCGGACAGATCAGCCGCAATCCCAACCTGACCGGCGCGCTGGCCTCAACC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
AGCGTCTAGCGCCTGTCTAGTCCGGCTTAGGGTTGGACTGGCCGCGGACCGGAGTTGG

S Q I A G Q I S R N P N L T G A L A S T -

ATTCTGTCCGAAGTGACCGGTCCCGGCGCCAGCAGCCTCAACGGAACGCTGGAAGTCCAC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
TAAGACAGGCTTCACTGGCCAGGGCCGCGGTCGTCGGAGTTGCCTTGGACCTTCAAGTG

I L S E V T G P G A S S L N G T L E V H -

GGCGGAACCGCAACCTCATCATCGCCAATCCCAATGGCATCAGCGTCGATGGCCTTACC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
CCGCCTTGGCGGTTGGAGTAGTAGCGGTTAGGGTTACCGTAGTCGCAGCTACCGGAATGG

G G T A N L I I A N P N G I S V D G L T -

ACCCTCAACACGCACAGCCTGACGCTGTGCGACGGGCGTCCGAGCGTGCAGACGGCGTC
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
TGGGAGTTGTGCGTGTGCGACTGCGACAGCTGCCCGCACGGCTCGCACGCTCTGCCGCAG

T L N T H S L T L S T G V P S V R D G V -

GTCTCGCTGGGCGTCACCCAGGGTCAGCTCACCGTGGGCAGCAGTGGCGTCAATACCGAT
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
CAGAGCGACCCGCGAGTGGGTCAGTGGCAGCCGTCGTCACCGCAGTTATGGCTA

V S L G V T Q G Q L T V G S S G V N T D -

```

GGTTTGCAGACCTTCGACATGGTGGCCAAGCTCATCCAGATCGGCGGGGCCATTGGCGGC
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
CCAAACGTCTGGAAGCTGTACCACCGGTTTCGAGTAGGTCTAGCCGCCCGGTAACCGCCG
G L Q T F D M V A K L I Q I G G A I G G -
ACGCAAGGCAACCAGGCCGATATCAAGGCGCTAGCGGGCAGCAGCAACTTCATCACCGCT
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
TGCGTTCCGTTGGTCCGGCTATAGTTCCGCGATCGCCCGTCGTCGTTGAAGTAGTGGCGA
T Q G N Q A D I K A L A G S S N F I T A -
ACAAGGTCCGAGCGCCGGTGGCGGCAAGCGCCGCCGAGGCAGGCTCGGGCTATGCC
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
TGTTCCAGGCGTCGCGGCCACGCCCGGTTTCGCGCGGCGGCTCCGTCCGAGCCCGATACGG
T R S A A P V R R K R A A E A G S G Y A -
ATCGACGGCAGCGCCGGGGCGCCATGCACGGCAAGGCCATCACCTGATATCCACCGAT
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
TAGCTGCCGTGCGCGGCCCGCGGTACGTGCCGTTCCGGTAGTGGGACTATAGGTGGCTA
I D G S A A G A M H G K A I T L I S T D -
GCGGGCTGGGGGTACGCCAGCCGGGCACGCTCGTATCTGCCGAGACATCAGTATCGAC
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
CGCCCGACCCCATGCGGTGCGCCCGTGGGAGCATAGACGGCCTCTGTAGTCATAGCTG
A G L G V R Q P G T L V S A G D I S I D -
GCCCCGCGCAACGTTCGAGGTGCGCAGTGCCAAAGCCAGGGATCTGGCCTTGCGTGCCGGC
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
CGGGCGCGGTTGCAGCTCCAGCCGTCACGGTTTCGGTCCCTAGACCGGAACGCACGGCCG
A R G N V E V G S A K A R D L A L R A G -
GCGGACGTCAAGGCCGGCACCGTTCAAACCGCTGGCAAACCTACCGCCAGCGCTGGCCGC
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
CGCCTGCAGTTCGCGCCGTGGCAAGTTTGGGACCGTTTGGAGTGGCGGTCGCGACCGGCG
A D V K A G T V Q T A G K L T A S A G R -
AACCTGGCGGTCGATACGATGGTGGCAGGCCAGGGCGCCAGCATCACTACGGACTCCGGC
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
TTGGACCGCCAGCTATGCTACCACCGTCCGGTCCCGCGGTCGTAGTGTGCTGAGGCCG
N L A V D T M V A G Q G A S I T T D S G -
GACATCACGCTGGGACCGGCCGCAAGGCCGAAAGCGCCGCTCCGAGCTCACCGGCAAT
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
CTGTAGTGCACCCCTGGCCGGCCGTTCCGGCTTTTCGCGCGGAGGCTCGAGTGGCCGTTA
D I T L G P A G K A E S A A S E L T G N -
GTCGAACTCACCGCGCGCAACGGCAGCATCATCCTGTGCGGTGACATCAAGGCCGATAGT
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
CAGCTTGAGTGGCGCGGTTGCCGTCGTAGTAGACAGCGCACTGTAGTTCCGGCTATCA
V E L T A R N G S I I L S R D I K A D S -
TTCAAGGTCAGGGCAAGAAGCTGGGTATTCGCAATGCCGTGGTTCGAGGCCAGCGGCAAG
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
AAGTTCAGTCCCGTTCTTCGACCCATAAGGCGTTACGGCACCAGCTCCGGTCGCCGTT
F K V R A R S W V F R N A V V E A S G K -

AGCGGCGGCCCAACAGCGTAGATGTGGAGGTCAGCGATCGCATCGTGCTGGTCGGCGCC
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
TCGCCGCGGGGTTGTCGCATCTACACCTCCAGTCGCTAGCGTAGCACGACCAGCCGCGG

S G A P N S V D V E V S D R I V L V G A -
1381 CTGCATGGTGTGACGGCGCAGGCAATCCCATCACCAATTCGGTGGTCAAGATGGTGGAC
-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
GACGTACCACAACCTGCCGCGTCCGTTAGGGTAGTGGTTAAGCCACCAGTTCTACCACCTG

L H G V D G A G N P I T N S V V K M V D -
1441 GGACGTCCCCTGGTGCACGAAGCGTCTCCGGCAAAGCTCTCCAGATGCGACCGTGGGC
-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
CCTGCAGGGCACCACGTCTTCGCAGGAGCCGTTTCGAGAGGGTCTACGCTGGCACCCG

G R P V V H E A S S G K A L P D A T V G -
1501 TCCAGCGTCGGTGTGCGTGCCCTCAAGGGCAATATCCTGTTAAAGGGTAGTTTCGCTCGAC
-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
AGGTCGCAGCCACACGCACGGGAGTTCCCGTTATAGGACAATTTCCCATCAAGCGAGCTG

S S V G V R A L K G N I L L K G S S L D -
1561 AATCAAAGCAGCGTCATCACCGCACTTGACGGCGATACCACGCTGAGCTTCACCGGCAAT
-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
TTAGTTTCGTCGCAGTAGTGGCGTGAACCTGCCGCTATGGTGGACTCGAAGTGGCCGTTA

N Q S S V I T A L D G D T T L S F T G N -
1621 ATCGAGAACCAGGGCGTGATTTCAGAGCAAGAAGCGGCTCACGGTTACAGCAAAGGACATA
-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
TAGCTCTGGTCCCGCACTAAGTCTCGTTCTTCGCCGAGTGCCAATGTCGTTTCCTGTAT

I E N Q G V I Q S K K R L T V T A K D I -
1681 AAAAATACGCTGCTGTTTCGATTCCGATACCAATATCGAACTCACCGCTAGCGGAAAAATT
-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
TTTTTATGCGACGACAAGCTAAGGCTATGGTTATAGCTTGAGTGGCGATCGCCTTTTTTAA

K N T L L F D S D T N I E L T A S G K I -
1741 GAGAACACTGGCGAGATCTCATCGCTGGACAAGATAAAACAAACGCGCCGTGCGCAATGTA
-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
CTCTTGTGACCGCTCTAGAGTAGCGACCTGTTCTATTTGTTTGGCGGACGCGTTACAT

E N T G E I S S L D K I N K R A V R N V -
1801 CTTCTGCATGCGGGTGAAAACTGACCAACAGCGGGTTTCTGGGGGCATCCGGAAAACTG
-----+-----+-----+-----+-----+ 1860
GAAGACGTACGCCCCTTTTACTGGTTGTGCCCCAAAGACCCCGTAGGCCTTTTGAC

L L H A G E K L T N S G F L G A S G K L -
1861 ACCATCGAGGGTAATGTCGCCCAAGATGGTGCAAAAACGCGTCCAGATGTGATCAATGAT
-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
TGGTAGCTCCCATTACAGCGGGTCTACCACGTTTTTGGCGAGGTCTACACTAGTTACTA

T I E G N V A Q D G A K T R P D V I N D -
1921 GCTCAGGGGCGAGTCGACGTAGAGGAACTGTCTTAACCGGAAACCGTTTTGACAACAAA
-----+-----+-----+-----+-----+ 1980
CGAGTCCCCGCTCAGCTGCATCTCCTTGACAGGAATTGGCCTTTGGCAAAACTGTTGTTT

A Q G R V D V E E L S L T G N R F D N K -
1981 GGCAGTTTGTGTGCGAGGAAGCGGAGCGACCGCCGACGTGACACAGATGTTCCGCACG
-----+-----+-----+-----+-----+ 2040
CCGTCAAAAACAACAGCTCCTTCGCCCTCGCTGGCGGCTGCACTGTGTCTACAAGGCGTGC

G S F V V R G S G A T A D V T Q M F R T -

ACAGGAAGCTTCGAAGTGTCTCCAGAAATGGGTTAGACGTACGAGCCGGCGACGTGTAT
2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100
TGTCCTTCGAAGCTTCACAGGAGGGTCTTACCCAATCTGCATGCTCGGCCGCTGCACATA

T G S F E V S S Q N G L D V R A G D V Y -
GCAGACGGAAAGCTTACGGTGAAGGGCCGGGCTAAGCTGGATGCTCGCGCCAATGCAGCAG
2101 -----+-----+-----+-----+-----+ 2160
CGTCTGCCTTTCGAATGCCACTTCCCGGCCGATTTCGACCTACGAGCGCGGTTACGCGTC

A D G K L T V K G R A K L D A R A N A Q -
TTCGCGGCTAACGCCAAGGTTTACGGTAAACACGCTCGAGGTTAAGGCGCAAGATCTCATC
2161 -----+-----+-----+-----+-----+ 2220
AAGCGCCGATTGCGGTTCCAAGTCCATTTGTGCGAGCTCCAATTCGCGTTCTAGAGTAG

F A A N A K V Q V N T L E V K A Q D L I -
AATAAGGGTGACGTACCTCTACCGCCAGGTAAACGTTTACGGCACAGCAGAGCATCGTC
2221 -----+-----+-----+-----+-----+ 2280
TTATTCCCACTGCAGTGGAGATGGCCGGTCCATTTGCAAGTCCGTGTCGCTCGTAGCAG

N K G D V T S T G Q V N V Q A Q Q S I V -
AATCACGGCAAACCTCCAGGGACACGAAATCACGCTTGCCGCACAGAGAGATGTGCGCAAC
2281 -----+-----+-----+-----+-----+ 2340
TTAGTGCCGTTTGGAGTCCCTGTGCTTTAGTGCGAACGGCGTGTCTCTACACGCGTTG

N H G K L Q G H E I T L A A Q R D V R N -
GAGGGCGTAGCGGTGCTGATCCAGGGCAGACAAGCACTTTCGGTGACTACCACTGGAAGC
2341 -----+-----+-----+-----+-----+ 2400
CTCCCGCATCGCCACGACTAGGTCCGCTCTGTTGCGTAAAGCCACTGATGGTGACCTTCG

E G V A V L I Q A R Q A L S V T T T G S -
GTGACGAATGGCGGCACACTGCGAGGTAGAACGGTGACACTACAGACCGACGAGGCTGCT
2401 -----+-----+-----+-----+-----+ 2460
CACTGCTTACCGCCGTGTGACGCTCCATCTTGCCACTGTGATGTCTGGCTGCTCCGACGA

V T N G G T L R G R T V T L Q T D E A A -
AATGAGCGAGGTGCGATGATTGTGCGGTGCGAGTCAGGCGACTTCAAGGTGAGGAAAAGC
2461 -----+-----+-----+-----+-----+ 2520
TTACTCGCTCCACGCTACTAACAGCGCAGCGTCAGTCCGCTGAAGTTCCACTCCTTTTCG

N E R G A M I V A S Q S G D F K V R K S -
CTTCGCAATGAGGGGACGATCAGTACCAAGCGAACGGATATCCAGGCGGCAGAGCTTCAC
2521 -----+-----+-----+-----+-----+ 2580
GAAGCGTACTCCCTGCTAGTCATGGTTCGCTTGCCTATAGGTCCGCCGCTCTCGAAGTG

L R N E G T I S T K R T D I Q A A E L H -
AACATGGCGGGTGGCAGTCTGTGACCCACGTCGGCCAAGATTACGGTCTCGCAGGGCCTG
2581 -----+-----+-----+-----+-----+ 2640
TTGTACCGCCCACCGTCAGACAGTCGGTGCAGCCGGTCTAATGCCAGAGCGTCCCGGAC

N M A G G S L S A T S A K I T V S Q G L -
ACTAACAGCGGAGAGATCAAGGTCAGCGCATGCTCGACGGCCGTGCGGCCACGTTGAGC
2641 -----+-----+-----+-----+-----+ 2700
TGATTGTCGCCTCTCTAGTTCCAGTCGCGGTACGAGCTGCCGGCACGCGGTTGCAACTCG

T N S G E I K V S G M L D G R A A T L S -
AACCAGCCGGTGCACAGCTGAGCGCCGCGCAAGCCAAGCTCAACGTCCAAGGCGATCTG
2701 -----+-----+-----+-----+-----+ 2760
TTGGTCCGGCCACGTGTCGACTCGCGGCGGTTTCGGTTCGAGTTGCAGGTTCCGCTAGAC

N Q A G A Q L S A A Q A K L N V Q G D L -

TCTAACGCGGGGACATCAAGACCCAGCAACTCACACTCGCGGCGAAAGGCTTGCACAAT
2761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820
AGATTGCGCCCCCTGTAGTTCTGGGTCTGTTGAGTGTGAGCGCCGCTTCCGAACGTGTTA

S N A G D I K T Q Q L T L A A K G L H N -
2821 CAGCCAGGCGCCTTGCTTCAGGCGGACAGCGCAACTTACGGTTCAGGAAGACATCGAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2880
GTCGGTCCGCGGAACGAAGTCCGCCTGTGCGCGTTGAATGCCAAGTCTTCTGTAGCTG

Q P G A L L Q A D S A Q L T V Q E D I D -
2881 AACGCCGCGGAGGTCAAAGCAAAAAAAGTACGCTTGGCGCCGAAAAGTGCATAACAAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2940
TTGCGCGCCTCCAGTTTCGTTTTTTTACTGCGAACCAGCGGGCTTTTGACGTATTGTTC

N A G E V K A K K L T L G A R K L H N K -
2941 GCAACGGGCAAGATCCAGGCTGACAACGCCACCCTCAGGGTGCAATCGCTGGATAACGCG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3000
CGTTGCCGTTCTAGTCCGACTGTTGCGGTGGGAGTCCACGTTAGCGACCTATTGCGC

A T G K I Q A D N A T L R V Q S L D N A -
3001 GGCGTGGCGCAGGCCAGCCAGCACATGTCCATAATGACGACGGACTATGCCAATGCCGGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3060
CCGCACCAGTCCGGTCCGGTGGTGTACAGGTATTACTGCTGCCTGATACGGTTACGGCCA

G V A Q A S H D M S I M T T D Y A N A G -
3061 CAACTGAGGGCAGGGCAGATCTGACCTTGAAC TACAACAACATTGCTGGCCTGACGATA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3120
GTTGACTCCCGTCCCGTCTAGACTGGAAC TTAGTGTGTGTAACGACCCGACTGCTAT

Q L R A G H D L T L N Y N N I A G L T I -
3121 GACGCCAAGCGTCAGTCCCCCTCGCCAATGGCACGTTGACCCTGCAAGCCAAGTATCTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3180
CTGCGGTTGCGAGTCAGGGGGAGCGGTTACCGTGCAACTGGGACGTTCCGGTTCATAGAC

D A K R Q S P L A N G T L T L Q A K Y L -
3181 ACGGTACGTACCGGCATCGAGAACCCAGGCAACGTCGCTCTTGACGGCCAGCACGGGTGGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3240
TGCCATGCATGGCCGTAGCTCTTGGGTCCGTTG CAGCAGAACTGCCGGTCTGCCCCACCG

T V R T G I E N P G N V V L T A S T G G -
3241 ATCACC AACTACAGCCAGATCGCCACGCCC GCGCGTTGACGTTGACGGCCAAAGGCGGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3300
TAGTGGTTGATGTCCGTTAGCGGTGCGGGCC GCGCAACTGCAACTGCCGGTTTCCGCCG

I T N Y S Q I A T P G A L T L T A K G G -
3301 ATCACC AATAGCCCTGGCTCGCTGATCTGGG CGGGCAAGGACGTCACTGCCTCGGGCCAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3360
TAGTGGTTATCGGGACCGAGCGACTAGACC CCGCCGTTCTCTGCAGTGACGGAGCCCGGTG

I T N S P G S L I W A G K D V T A S G H -
3361 ACCATCGACAATCAGCGGATGCCTGGCTGAT GTCGCAAAACGGCAAGGTCACTCTTGCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3420
TGGTAGCTGTTAGTCGCGCTACGGACCGACT ACAGCGTTTTGCGGTTCCAGTGAGAACGG

T I D N Q R D A W L M S Q N G K V T L A -
3421 GCCTCGCAAAGCTGCGCAATGAGGCGGGCC GATCGAGGCTGGCGGCAAGCTGTCCATC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3480
CGGAGCGTTTTTCGACGCGTTACTCCGCC CCGCATAGCTCCGACCGCCGTTCCGACAGGTAG

A S Q K L R N E A G R I E A G G K L S I -

GATACCCCAAACCTCGAGAACCTCTCCGAACTGCAAGGCGATGTCCGCGTACAGCGCTCC
3481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3540
CTATGGGGTTTGGAGCTCTTGGAGAGGCTTGACGTTCCGCTACAGGCGCATGTGCGGAGG
D T P N L E N L S E L Q G D V R V Q R S -
3541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3600
CAGAAAGAAACGGTGAACATCTCCAGGATCAGGGGTTCTGGAGCACCGGGCGTTGGGTG
GTCTTTCTTTGCCACTTGTAGAGGGTCTTAGTCCCAAGACCTCGTGGCCCGCAACCCAC
Q K E T V N I S Q D Q G F W S T G R W V -
CGAACCCAAAATCCACAGTTTTTTCGGTGGTACGCCCCGTCAGTACCCTGAAGGTCAAGCAA
3601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3660
GCTTGGTTTTAGGTGTCAAAAAGCCACTCATGCGGGCAGTCATGGGACTTCCAGTTTCGTT
R T K I H S F S V S T P V S T L K V K Q -
GGGGGCATACGGGCGGTGGCGATATCGACATAAACAGCAGCAGCACAAAGGCAAGAAA
3661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3720
CCCCCGTATGCCCGGCCACCGCTATAGCTGTATTTGGTCGTCGTCGTTTCCGTTCTTT
G G I R A G G D I D I N Q Q Q H K G K K -
GCACGCGTCTACAACGAGGGCGCCATCGTGGCCGGCGCGCAGCTGCGGGTCGATGGCAAC
3721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3780
CGTGCAGATGTTGCTCCCGGGTAGCACCGGCCGCGCTCGACGCCAGCTACCGTTG
A R V Y N E G A I V A G A Q L R V D G N -
GTCGAAAACCGTTCCAAGGGGAAGTCGCTCAGTGTGTCATGGACTATTTGCGCCAGAACAG
3781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3840
CAGCTTTTGGCAAGGTTCCCTTCCAGCGAGTACAGTACCTGATAAACGCGGTCTTGTGC
V E N R S K G K S L S V M D Y L R Q N T -
GGCGGCTTTTCAACCCGCGTGAAGAGGTGGCACTTCCTTCGGGTGGGCACGATGGCCGC
3841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3900
CCGCCGAAAAGTTGGGCGCAGCTTCTCCACCGTGAAGGAAGCCCACCCGTGCTACCGGCC
G G F S T R V E E V A L P S G G H D G R -
TTCACGTCCCTCTACGACATGCTGGATTTTCATGCTCAACAACAGCGCTCATCGCGTCTCG
3901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3960
AAGTGCAGGGAGATGCTGTACGACCTAAAGTACGAGTTGTTGTCGCGAGTAGCGCAGAGC
F T S L Y D M L D F M L N N S A H R V S -
CTAGGCGGCTTTTATTCCTACTCGCTACCTACAACCTGTTTCCGGTGTGCGCCGGGGCC
3961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4020
GATCCGCCGAAAATAAGGATGAGCGGATGGATGTTGGACAAAGGCCACGACCCGCCCCGG
L G G F Y S Y S P T Y N L F P V L A G A -
GACCTGAGCAAAGCCCCGAGCTGCAGAAGATGCTGGCCGCTGCGCTGGGTGCGGACTGG
4021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4080
CTGGACTCGTTTTGGGGGCTCGACGTCCTTACGACCGGCGACGCGACCCACGCTGACC
D L S K A P E L Q K M L A A A L G A D W -
CGCGGCTTACCGCAGTGCAGCGTGAAGAGCGTTGGCGAGAGTTCAAAAATGGCCGGCGC
4081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4140
GCGCCGGAATGGCGTCACGTCGCACTTCTCGCAACCGCTCTCAAGTTTTTACCGGCCGCG
R G L T A V Q R E E R W R E F K N G R R -
GGTGGCACGGTGGACTACTACCCTCTTGAGCAAACGGTTTTGGCTGGAAAAGCCGGCGTC
4141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4200
CCACCGTGCCACCTGATGATGGGAGAAGTTCGTTGCCAAAACCGACCTTTTCGGCCGCG
G G T V D Y Y P L E Q T V L A G K A G V -

ACGCACACGGGTGGCACCATGCTCGTCGGTGGCAACAGCACGCAAACGCCGAGCGGCC
4201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4260
TGCGTGTGCCACCCTGGTACGAGCAGCCACCCTTGTCTGCGTGGTGGTGGCGGCGTCCCGG

T H T G G T M L V G G N S T Q N A A A A -
4261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4320
AGCTTGCAGGCCACCAGCGCCAGCAGGCACAGATCGGTAAAGTTCAGGTGCCATACTG
TCGAACGTCCGGGTGGTTCGCGGTCTCCGTGTCTAGCCATTTCAAGTCCACGGGTATGAC

S L Q A H Q R Q Q A Q I G K V Q V P I L -
4321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4380
GCAGGGACGCTGGATGCAACCTTCAAGCTCGACGAGCCGCAACTCGAGGACATCGATCTT
CGTCCCTGCGACCTACGTGGAAGTTCGAGCTGCTCGGCGTTGAGCTCCTGTAGCTAGAA

A G T L D A T F K L D E P Q L E D I D L -
4381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4440
GATTTTCCGGATCCGGTCTCGATGAGTTGCTGGCAAACCGCTTTCGTGTTCGGCCGGTG
CTAAAAGGCCTAGGCCACGAGCTACTCAACGACCGTTTGGCGAAGCACAAGCCGGCCAC

D F P D P V L D E L L A N R F V F R P V -
4441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4500
TCGCCGACGATCAGTACTGCAGCCATCAAGCGCCCGCAAGCAGACCTTGCCACGCCCC
AGCGGCTGCTAGTCATGACGTCGGTAGTTCCGCGGGCCGTTTCGTCTGGAACGGTGCGGGG

S P T I S T A A I K A P G K Q T L P R P -
4501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4560
TATTTGAGACGCGGCTCAACTACATCGATCAGTCGCAATTTCTACGGCTCAGGCTATTTTC
ATAAAGCTCTGCGCCGAGTTGATGTAGCTAGTCAGCGTTAAGATGCCGAGTCCGATAAAG

Y F E T R L N Y I D Q S Q F Y G S G Y F -
4561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4620
TTCCAGAAACTGGGCTATCAACCGCAGCAGGGTGCAGCGGTTAGCGGGGACAACCTATTTTC
AAGGTCTTTGACCCGATAGTTGGCGTCTCCACGCGCCAATCGCCGCTGTTGATAAAG

F Q K L G Y Q P Q Q G A R V S G D N Y F -
4621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4680
GATACGCAATGGATATTGCGTGAGCGTGCCCGCCTGCTGGGTGCTGCAGGGGCGCGGATG
CTATGCGTTACCTATAACGCACTCGCACGGGCGGACCCACGACGTCCCGCGCCTAC

D T Q W I L R E R A R L L G A A G A R M -
4681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4740
GGCAGTGGCGACGCTCCGACCGTCAAACAGCTGATGGACAACGGCAGTGAACAGGCCTCT
CCGTACCGCTGCGAGGCTGGCAGTTTGTGCGACTACCTGTTGCCGTCCTTGTCCGGAGA

G S G D A P T V K Q L M D N G S E Q A S -
4741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4800
CGTCTTGCTTGCAGGTTCGCCAGGCGTTGAGCGCTGACCAGGTGGCCAAACTGGACAAG
GCAGAACCGAACGTCCAGCCGGTCCGCAACTCGCGACTGGTCCACCGTTTGACCTGTTC

R L G L Q V G Q A L S A D Q V A K L D K -
4801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4860
GATACGGTCTGGTATGTCTGGACGCGGATAAACGGCACGCAGGTCTTGATGCCGCGCGTC
CTATGCCAGACCATAACAGACCTGCGCCTATTTGCCGTGCGTCCAGAACTACGGCGCGCAG

D T V W Y V W T R I N G T Q V L M P R V -
4861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4920
TACCTGGCCCGCGCCTCCAGGCAGGCCCGGACGACGTCGCAAGCAAGGGGGGGCCGTC
ATGGACCGGGCGCGGAGGTCCGTCCGGCGGCTGCTGCACGCGTTCGTTCCCGCCCGGCAG

Y L A R A S R Q A A D D V R K Q G G A V -

GTGGCATCGGCGGGCGATATCAATGTCGACACGGGCGGAGGGGATGTCACCGTGGCCAAT
4921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4980
CACCGTAGCCCGCCGCTATAGTTACAGCTGTGCCCGCCTCCCCTACAGTGGCACCGGTTA

V A S A G D I N V D T G G G D V T V A N -
GGGGCTCTGGTGGGCGCGAAGGTGTGATTGACACGCGCAGCGCCGTGGCCAAGCAGGAG
4981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5040
CCCCGAGACCACCCGCGCTTCCACAGCTAACTGTGCGCGTCGCGGCACCGGTTTCGTCCTC

G A L V G A K V S I D T R S A V A K Q E -
GCCGCCAACGCGACGCCATGCTCGCCCGGTTGGGGCAGGAGCTCGGCACGCCCTGAAC
5041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5100
CGGCGGTTGCGCTGCGGTACGAGCGGGCCAACCCCGTCTCGAGCCGTGCGGGGACTTG

A A Q R D A M L A R L G Q E L G T P L N -
AGCGCCATCGACACGCTTGCCAGGCGCACAGACACAGTTGCGCAAGCGGCGGGCAAG
5101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5160
TCGCGGTAGCTGTGCGAACGGGTCCGCGTGGTCTGTGTCAACGTCGTTCCGCCCGCCGTT

S A I D T L A Q A H Q T Q L Q Q A A G K -
GTCATGGCGTTGGCGGGAGCGGCGTTGGCCAAAGCGCCAGACGGCAAGTTCACCTTGAC
5161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5220
CAGTACCGCAACCGCCCTCGCCGCAACCGGTTTCGCGGTCTGCGGTTCCAGTGAACCTG

V M A L A G A A L A K A P D G K V T L D -
GTCTCCAAGCTCGATAACCGCAGTTGGCGCGTCTGCAGTCTCTGCCAGGACTTCTAC
5221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5280
CAGAGGTTGAGCTATGGTGCCTCAACCGCGCAGACGTCAGGAGACGGGTCCTGAAGATG

V S K L D T T Q L A R L Q S S A Q D F Y -
TGGAACAGCCAGCTCAACGCCACCGACCTGCTGGAGCTGGGCGCGCCTCCGTGGGCCTG
5281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5340
ACCTTGTGCGGTCGAGTTGCGGTGGCTGGACGACCTCGACCCGGCGGAGGCACCCGGAC

W N S Q L N A T D L L E L G R A S V G L -
GATGCAAGCGGCACCAGCGTTCGCGGCCGGCGCCTGAACGCCGATGCGGCTCGAGGCATG
5341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5400
CTACGTTCCCGTGGTTCGAGCGCCGGCCCGGACTTGGCGCTACGCCGAGCTCCGTAC

D A S G T S V A A G G L N A D A A R G M -
TTGGCGGAGCGTGCCGGGGCCTGGCGGCAGAAGCACGATAAAGGTCAGGCGCTGACACAT
5401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5460
AACCGCCTCGCACGGCCCCGGACCGCCGCTTTCGTGCTATTTCCAGTCCGCGACTGTGTA

L A E R A G A W R Q K H D K G Q A L T H -
AAGCAGTTGCTGGATGTGCTGCAGCGCTCTCCGAGGCGTCGACAGGCAAACCTGGCTGTG
5461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5520
TTCGTCAACGACCTACACGACGTCGCGCAGAGGCTCCGAGCTGTCCGTTTGACCGACAC

K Q L L D V L Q R V S E A S T G K L A V -
ACCAAACCTACGGCTGCGCCGTTACCAAAGCGGCGCAGCGGCTGGCCGAAAGCGAAATG
5521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5580
TGTTTTGGATGCCGACGCCGCAATGGTTTCGCCGCTCGCCGACCGGCTTTCGCTTTAC

T K P T A A A V T K A A Q R L A E S E M -
CGCGCCAAGGGCAGCTATGCCATCAAGGCCGCCATCGGGCAGGCCAACTTCAGCAGCACG
5581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5640
GCGCGGTTCCCGTCGATACGGTAGTTCCGGCGGTAGCCCGTCCGGTTGAAGTCGTCTGTC

R A K G S Y A I K A A I G Q A N F S S T -

GGCGGTGTCCGGGCCGGGATCTCCGGCCAAGAGAGTGTGACCGTCAGAGCAGGCGACAGC
5641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5700
CCGCCACAGGCCCGGCCCTAGAGGCCGGTTCTCTCACACTGGCAGTCTCGTCCGCTGTGC

G G V R A G I S G Q E S V T V R A G D S -
5701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5760
CAGATTGCGGGCGCGCAACTGCAGGGCAAGACGGTTCGACCTCCAGACCGAGGGCAGGCTG
GTCTAACGCCCGCGCTTGACGTCCCCTTCTGCCAGCTGGAGGTCTGGTCCCCTCCGAC

Q I A G A Q L Q G K T V D L Q T E G R L -
5761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5820
CGCACCATTGTCCGGATGCGGTACGACGAGAAGGGGCACTTGCTCGCTCGCGATGATCAA
GCGTGGTAACAGCCCTACGCCATGCTGCTTCCCCGTGAACGAGCGAGCGCTACTAGTT

R T I V G M R Y D E K G H L L A R D D Q -
5821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5880
TCTCAGATCCAGGGCAGCGATTCCGGTCAAGATCGCCGCAACCGACTACGCGAGCGAAGGC
AGAGTCTAGGTCCCGTCGCTAAGCCAGTTCTAGCGGCGTTGGCTGATGCGCTCGCTTCCG

S Q I Q G S D S V K I A A T D Y A S E G -
5881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5940
GGCATCGTGGCCTCGGCCGGCGAGGTTCGCGCTCAAGACGTCCACGATCAAACCTCGGTACG
CCGTAGCACCGGAGCCGGCCGCTCCAGCGCGAGTTCTGCAGGTGCTAGTTTGAGCCATGC

G I V A S A G E V A L K T S T I K L G T -
5941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6000
GTCAAAGAGGTGGGGTCGCACTATGCCTCCCACGTCACTCACGCGTGGGCGAGGCGCTT
CAGTTTCTCACCCCCAGCGTGATACGGAGGGTGCAGTGAGTGCGCGACCCGCTCCGCGAA

V K E V G S H Y A S H V T H A L G E A L -
6001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6060
GCCGCGCTGTCCAGACCATCAAGACCGAGCAGTCTGCCAGCGGACCGACGTCGGCAGC
CGGCGCGACAGGGTCTGGTAGTTCTGGCTCGTCAGACGGTTCGCGCTGGCTGCAGCCGTCG

A A L S Q T I K T E Q S A S A T D V G S -
6061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6120
ACCATTACCGCCAAAAAAGTATCGTCGACAACAGTGGCGACGTGTCCGGTACTGGGGGC
TGGAATGGCGGTTTTTTGACTAGCAGCTGTTGTACCCTGCACAGCCACTGACCCCCG

T I T A K K L I V D N S G D V S V T G G -
6121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6180
ACGATCGACCGGAACAAGAGCGAAATCGATATCGGCGGCAATCTTCAGCTCAAGGCGGGT
TGCTAGCTGCGCTTGTCTCGCTTTAGCTATAGCCGCCGTTAGAAGTCGAGTTCCGCCCA

T I D A N K S E I D I G G N L Q L K A G -
6181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6240
GAAAACCACTACTACGGTTACAGCCGGAAGACCGTCGCGAGTTGGCCCTTGGCGCGGCA
CTTTTGGTGATGATGCCAATGTCCGGCGCTTCTGGCAGCGCTCAACCGGGAACCGCGCCGT

E N H Y Y G Y S R E D R R E L A L G A A -
6241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6300
GTGGGGCAGGCGGCTACGAGGCCCGCCCTCGCTGGGTAGCGAAACCGGCGGCTCGGCC
CACCCCCGTCCGCCGATGCTCCGGCGGCGGAGCGACCCATCGCTTTGGCCGCGGAGCCGG

V G A G G Y E A A A S L G S E T G G S A -
6301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6360
CACGCCGACGCGGCAAAACAGCGGGCGCCGGCTGACGGCGGGTTTCTCGGGCTCCTCT
GTGCGGCTGCGCCGTTTGTGCCCCGCGGGCCGACTGCCGCCAAAGAGCCGAGGAGA

H A G R G K T A G A R L T A G F S A S S -

GAAGAAAGCACCATACAGGCCAAGACCCACCGTAATGCACAGTTCAACGTGGGCGAGGGC
6361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6420
CTTCTTTTCGTGGTATGTCCGGTTCTGGGTGGCATTACGTGTCAAGTTGCACCCGCTCCCG
E E S T I Q A K T H R N A Q F N V G E G -
AAGGTAACCGTGCCTGGCAGCGCTGATCTGGGCGGCGGACATCAACCGGATCTGGCC
6421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6480
TTCCATTTGCACGCACCGTGCCGACTAGACCCGCGCGCTGTAGTTGGCGCTAGACCGG
K V N V R G T A D L G G A D I N R D L A -
AAGTCTCAGGCAGCGTTGGTGCCGAGGGCTGAGCATCGAGGCCGCAACATTGCCAGC
6481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6540
TTCAGAGTCCGTGCGCAACCACGGCGTCCCGACTCGTAGCTCCGGCCGTTGTAACGGTGC
K S Q A A V G A A G L S I E A G N I A S -
ACCAAAGCGGTGGACGACATCCACACGCAAACCTTCGTACACCCGCTATACGTTGGGTGCC
6541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6600
TGTTTTCGCCACCTGCTGTAGGTGTGCGTTTGAAGCATGTGGGCGATATGCAACCCACGC
T K A V D D I H T Q T S Y T R Y T L G A -
GAGGCCAATGCCGGATCTTCAGTGGCGACGACGCGACCCGCTTCGGAGACATGATCGCG
6601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6660
CTCCGGTTACGGCCTAGAAGTCACCGCTGCTGCCGCTGGGCGAAGCCTCTGTACTAGCGC
E A N A G S S V A T T A T R F G D M I A -
CAGACGGTGGACGACCCCAAGCGCAAGATCGACCCGGCGCTGGCCGCGCCATGGCGGCA
6661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6720
GTCTGCCACCTGCTGGGGTTCGCGTTCTAGCTGGGCGCGACCCGCGCCGTTACCGCCGT
Q T V D D P K R K I D P A L A A A M A A -
ACAGAGACCACGCAATTGTTGTTGGGCGACACCGGCTCACTGACCCGTACCGCTAAGGCC
6721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6780
TGTCTCTGGTGCCTTAACAACAACCCGCTGTGGCCGAGTGACTGGCCATGGCGATTCCGG
T E T T Q L L L G D T G S L T G T A K A -
GGCGCTGAGTGGGGTACCAAACCAGCACCGAAACCCGGGAGAGCACACAGACCTTCGGT
6781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6840
CCGCGACTCACCCAGTGGTTTGGTCTGGCTTTGGGCCCTCTCGTGTGTCTGGAAGCCA
G A E W G H Q T S T E T R E S T Q T F G -
GGCAATATCTCGTTGGCGGCCAACAAGGCGACATCACTCTGGCCGGTACGCAGTTCAAA
6841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6900
CCGTTATAGAGCAACCGCCGTTGTTTCCGCTGTAGTGAGACCGCCATGCGTCAAGTTT
G N I S L A A N K G D I T L A G T Q F K -
GGCGCGATCGCGTCACGCTCGATGCCAAAGGTGATGTGTGCTCAGGGCTGCGCAGTCC
6901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6960
CCGCCGCTAGCGCAGTGCAGCTACGGTTTCCACTACACAGCGAGTCCCAGCGCTCAGG
G G D R V T L D A K G D V S L R A A Q S -
CGTACGGTCACTCATGGCAAGATCATGGTTTACGCTTTCGGCGTCGATCAACGGCGGC
6961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7020
GCATGCCAGTCACTACCGCTTCTAGTACCAAACGCGAAAGCCGAGCTAGTTGCCGCCG
R T V S H G E D H G L T L S A S I N G G -
GTCAACGCCGCTCGGGGCGGCGGAGCCGGCGTGTCCGCTACCTTGTGGGTTTCGCAC
7021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7080
CAGTTGCGGCGGAGCCCGCCGCTCGGCCGACAGGGCATGGAACAGCCCAAGCGTG
V N A A L G A A G A G V S A T L S G S H -

ACCGTCAGTACGGAAAACAGCACCCGTTACCAGAATGCCAACATAGCGGCGGGCGAGGTC
7081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7140
TGGCAGTCATGCCTTTTGTGCGTGGGCAATGGTCTTACGGTTGTATCGCCGCCCGCTCCAG

T V S T E N S T R Y Q N A N I A A G E V -
AGTATTCGAACCGCGGGCGACCTCGCGCTGT CAGGCGCACGGATAACCGTGCAGGATAAA
7141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7200
TCATAAGCTTGGCGCCCGCTGGAGCGCGACAGTCCGCGTGCCTATTGGCACGTCTATTT

S I R T A G D L A L S G A R I T V Q D K -
GCCAAGATTGATGTGCGCGGCAACACGCGCATCACCAGCGTGCAGGACGACATTCAACGC
7201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7260
CGGTTCTAACTACAGCCCGCTTGTGCGGTAGTGGTGCACGTCTCTGTGTAAGTTGCG

A K I D V G G N T R I T S V Q D D I Q R -
AAGCAGGAGGGCGGCACTTGGACGGCCGGGGCGGTGGCAGGGTCAACACCAAGACCATC
7261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7320
TTCGTCTCCCGCCGTGAACCTGCCGGCCCGCCACCCTCCCGAGTTGTGGTTCTGGTAG

K Q E G G T W T A G A V A G V N T K T I -
GGTTCGGCTCGGTACGGTAGGCCGTGACCGGTGAGGAGCATCACGACAATGCCAAGGTC
7321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7380
CCAAGCCGGAGCCAGTGCATCCGGACTGGCCACTCCTCGTAGTGTGTACGGTTCCAG

G S A S V T V G L T G E E H H D N A K V -
GTTTCGAGAACAGCCGGCATAACAAGCAGGCAAGAGCCTGACGCTCACTTCGGGGGGCAAC
7381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7440
CAAGCTCTTGTCCGGCCGTATGTTCTGTCGGTCTCGGACTGCGAGTGAAGCCCCCGTTG

V R E Q A G I Q A G K S L T L T S G G N -
CTGGATGTCACGGGCGCCCATCTGGTCAGTGCGGATGGCCCGGTCAACGCCGGTGGCAAG
7441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7500
GACCTACAGTGCCCGGGTAGACCAGTACGCCTACCGCGCAGTTGCGGCCACCGTTC

L D V T G A H L V S A D G R V N A G G K -
ATCAACGCCAGCCAGCTCAAGGACAAAATAGACAAAGATGGTGGCAAGGCTGGTGGATCG
7501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7560
TAGTTGCGGTCGGTTCGAGTTCTGTTTTATCTGTTTCTACCACCGTTCCGACCACCTAGC

I N A S Q L K D K I D K D G G K A G G S -
GGTGCCATCAACCCGACGACCCGGCTTACCTATGGTGACCATCGAGTATGGGCGCGATGCA
7561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7620
CCACGGTAGTTGGGCTGCTGGCCGAATGGATAACCACTGGTAGCTCATACCCGCGCTACGT

G A I N P T T G L P M V T I E Y G R D A -
CGAGACCATGTGGAGGCGACCAACAACGCTACGATTGCTGTGGGCAAGGCGTCCCATGTC
7621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7680
GCTCTGGTACACCTCCGCTGGTTGTTGCGATGCTAACGACACCCGTTCCGACGGGTACAG

R D H V E A T N N A T I A V G K A S H V -
GCGGCGGCCAGGGTATTGCGGGGCATCTCAATACCGACGTGCGGCAGCAGCGCTTGTGTC
7681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7740
CGCCGCCGGTCCCATAACGCCCCGTAGAGTTATGGCTGCAGCCCGTCTGTCGCGCAACAG

A A A Q G I A G H L N T D V G Q Q R V V -
ACGCGGGAAGAGTACTACCCGGCGGGGAGTCCGCGCTGTCTGTGCGACTGAAGCCGGCG
7741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7800
TGCGCCCTTCTCATGATGCGGCCGCCCTCAGGCGCGACAGACAGCGTGACTTCGGCCGC

T R E E Y Y A G G E S A L S V A L K P A -

GTAGAAAACTGCGTGACAAGCTGAACAAGCAGGACGTGGTTCGAACATGCTCCGCCAGTG
7801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7860
CATCTTTTTGACGCACTGTTGACTTGTTCGTCCTGCACCAGCTTGTACGAGGCGGTCCAC
V E K L R D K L N K Q D V V E H A P P V -
GTGAAAACCAAAGTCGTCAATACCCAAACGGCGACCATCACGCCGCCGCGTGACGTCCAC
7861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7920
CACTTTTGGTTTCAGCAGTTATGGGTTTGCCGCTGGTAGTGCGGCGGCGCACTGCAGGTG
V K T K V V N T Q T A T I T P P R D V H -
CACGCCAAGGTGGTTCGACCCTGGTTCATCTGCTCCGGTGGTCAAGACCAAGGTTCATCAAG
7921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 7980
GTGCGGTTCCACCAGCTGGGACCAGTAGGACGAGGCCACCAGTTCTGGTTCCAGTAGTTC
H A K V V D P G H P A P V V K T K V I K -
ACGGAGACCCGCGACGGTTAGCTCGACCCCAAGGTTTCAGTACGCGCAGCGGGTTCGACCCC
7981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8040
TGCCCTCTGGCGCTGCCAATCGAGCTGGGGTTCCAAGTCATGCGCGTCGCCAGCTGGGG
T E T A T V S S T P K V Q Y A Q R V D P -
GGACATCCCGCCCCGATGGTCAAGGCCAAGGTCATCAAGACCGAAACCGCGACGGTCCAC
8041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8100
CCTGTAGGGCGGGCTACCAGTTCCGGTTCCAGTAGTTCTGGCTTTGGCGCTGCCAGTGG
G H P A P M V K A K V I K T E T A T V T -
ACGACCCCAAGGTTCAATACGCGCAGCGGGTTCGACCCCGGACATCCGGCGCCGGTGGTTC
8101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8160
TGCTGGGGGTTCCAAGTTATGCGCGTCGCCAGCTGGGGCCTGTAGGCCCGGGCCACCAG
T T P K V Q Y A Q R V D P G H P A P V V -
AAGACCAAGGTTCGTCAAGACCGAAACCGCGACGGTTACCACGACCCCAAGGTTTCAGTAT
8161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8220
TTCTGGTTCCAGCAGTTCTGGCTTTGGCCTGCCAATGGTGTGGGGTTCCAAGTCATA
K T K V V K T E T A T V T T T P K V Q Y -
GCGCAACGGGTCGACCCCGGACATCCGGCGCCGGTGGTCAAGACCAAGGTAATCAAGACC
8221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8280
CGCGTTGCCAGCTGGGGCCTGTAGGCCCGGCCACCAGTTCTGGTTCCATTAGTTCTGG
A Q R V D P G H P A P V V K T K V I K T -
GAAAAGGCGACTCTCACGACGACTCCCAAGGTTTCAGCATGCCAAAGTGGTGAATCCGGAG
8281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8340
CTTTTCCGCTGAGAGTGTCTGAGGGTTCCAAGTCGTACGGTTTCACCACTTAGGCCTC
E K A T L T T T P K V Q H A K V V N P E -
CCGGAGGTGCCTGCGGTGTCCACCCCGGTGTGCGCAGCCCGGAAATTGGTGGCGCCTCCC
8341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8400
GGCCTCCACGGACGCCACAGGTGGGGCCACAGCGTCGGCGGCTTTAACCACCGCGGAGGG
P E V P A V S T P V S Q P P K L V A P P -
GTAGCGGACCAGGTTGATGCCGGTCCCAAACCTGCGCCAAAGGTCGATCCTAAGCCCAAG
8401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8460
CATCGCCTGGTCCAACCTACGGCCAGGGTTTGGACGCGGTTTCCAGCTAGGATTCGGGTTT
V A D Q V D A G P K P A P K V D P K P K -
GCCAAAGCGGCGGCGCCGACCAAATATCAAGCCTCAACCGCAAGGCGGCGGTTATGCC
8461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8520
CGGTTTTCGCCCGCCCGGGCTGGTTTATAGTTTCGGAGTTGGCGTTCCGCCCGGCATACGG
A K A A A A R P N I K P Q P Q G G R Y A -

```
GTCCAGGAGCAGGTCAAGGTCGCACAGAAGCAGGTGTCCGAGATCAACCTCATGAAGGAT
8521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8580
CAGGTCCTCGTCCAGTTCAGCGTGTCTTCGTCCACAGGCTCTAGTTGGAGTACTTCCTA

V Q E Q V K V A Q K Q V S E I N L M K D -
GTAGGAGGCAAGCTTGCCAAACCCGTACGCTGACGTTTACCGACCCAATGGACCTGAA
8581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8640
CATCCTCCGTTTCAACGGTTTGGGCAGTGC GACTGCAAATGGCCTGGGTACCTGGACTT

V G G K L A K P V T L T F T G P N G P E -
ACCGTCACCATCACGCGCGCGAGCAACTGATGAAGCTCGACGGCAAGCTCTTGACGAGC
8641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8700
TGGCAGTGGTAGTGC GCCGCGCTCGTTGACTACTTCGAGCTGCCGTTGAGAACTGC TCG

T V T I T R R E Q L M K L D G K L L T S -
AAGCCTGCCCAAGGGGCGGAGCAGAAGTTCCTTCTCAAGTTCGAGGACGTCGGCGGCAAG
8701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 8760
TTCGGACGGGTTCCCCGCTCGTCTTCAAGGAAGAGTTCAGCTCCTGCAGCCGCCGTTTC

K P A Q G A E Q K F L L K V E D V G G K -
AACTACCGTATCTCCTATAGGACAGCGAAGTAG
8761 -----+-----+-----+-----+-----+ 8793
TTGATGGCATAGAGGATATCCTGTTCGCTTCATC

N Y R I S Y R T A K * -
```