
BAYERISCHE JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG
FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
LEHRSTUHL FÜR MIKROBIOLOGIE

Charakterisierung des Umweltkeims
Bordetella petrii.

**Untersuchungen zur genomischen Variabilität und zum
Bvg Regulon**



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

vorgelegt von
Melanie Lechner
aus Villingen-Schwenningen

Würzburg, 2008

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter: Prof. Dr. Roy Gross

2. Gutachter: Prof. Dr. Roland Benz

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Ich versichere, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt und verfasst wurde.

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

Neben dem akademischen Grad "Diplom-Biologin Univ." habe ich keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg,

Der experimentelle Teil der Arbeit wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg von April 2004 bis September 2007 durchgeführt.

Wir müssen unbedingt Raum für Zweifel lassen, sonst gibt es keinen Fortschritt, kein Dazulernen. Man kann nichts Neues herausfinden, wenn man nicht vorher eine Frage stellt. Und um zu fragen, bedarf es des Zweifelns.“

(Richard P. Feynman)

Danksagung

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

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Roy Gross bedanken, der mir dieses spannende Thema überlassen hat und mir mit guten Ratschlägen zur Seite stand.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Roland Benz für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und Herrn Prof. Dr. Werner Göbel für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Dem SFB 479 danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an Jenni Pohlert, meine Mitstreiterin bei der Erforschung von *B. petrii*, die mir mit den Jahren eine wertvolle Freundin wurde.

Dank auch an die Mitarbeiter der AG Gross und AG Beier für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die fachliche Unterstützung. Besonders bedanken möchte ich mich bei Steffi Müller für ihre Freundschaft und weil das Leben schließlich kein Ponyhof ist, bei Karin Schmitt und Susanne Bauer, die die *B. petrii*-Experimente fortführen und mich während der Schreibphase auf dem neuesten Stand der Forschung gehalten haben und natürlich bei meinen jetzigen und ehemaligen Laborkolleginnen Kristina Keidel und Aleks Horvat, mit denen die Arbeit im Labor immer Spaß gemacht hat.

Allen Mitgliedern des Lehrstuhls möchte ich für die freundliche Aufnahme und die Unterstützung bei meiner Arbeit danken. Besonders erwähnen möchte ich hier Dani Löffler, die Zellkultur-Fachfrau, Sonja Mertins, die mich in die Geheimnisse der Realtime-PCR eingewiesen hat sowie Andrea Spory, Barbara Gareiß und Jennifer Schär für die Unterstützung bei meinen „heißgeliebten“ 2D-Gel-Experimenten. Nicht zu vergessen unsere beiden Spülfrauen Frau Steinbrecher und Frau Stapf, ohne die das Arbeiten am Lehrstuhl ungleich schwerer gewesen wäre.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinen Lieben bedanken. Bei meinen Großeltern für ihr stetes Interesse an meinem Leben und bei meinem „großen“ kleinen Bruder Flo für die musikalische Weiterbildung. Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meine Eltern für ihre unermüdliche Unterstützung, weil ich mich immer auf sie verlassen konnte und sie geduldig allen meinen *B. petrii*-Geschichten gelauscht haben. Meinem Freund Stefan danke ich von Herzen, weil er immer für mich da war und mit ihm alles irgendwie leichter erschien. Euch möchte ich diese Arbeit widmen.

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2	EINLEITUNG	5
2.1	DIE GATTUNG <i>BORDETELLA</i>	5
2.2	DAS <i>B. BRONCHISEPTICA</i> -CLUSTER	6
2.2.1	<i>Klinische Relevanz des B. bronchiseptica-Clusters</i>	7
2.2.2	<i>Virulenzfaktoren des B. bronchiseptica-Clusters</i>	10
2.2.2.1	Adhäsine	10
2.2.2.2	Toxine.....	12
2.2.2.3	Weitere Faktoren	14
2.3	DIE „NEUEN“ <i>BORDETELLA</i> -ARTEN	15
2.3.1	<i>B. petrii</i>	17
2.3.2	<i>Virulenzfaktoren der „neuen“ Bordetella-Arten</i>	19
2.4	DAS BvgAS-ZWEIKOMPONENTENSYSTEM	21
2.4.1	<i>Phasenvariation und phänotypische Modulation</i>	21
2.4.2	<i>Signaltransduktion und Struktur des BvgAS-Systems</i>	22
2.4.3	<i>Transkriptionelle Genregulation über das BvgAS-System</i>	23
2.4.4	<i>Der bvgAS-Lokus innerhalb der Gattung Bordetella</i>	27
2.5	MECHANISMEN DER BAKTERIENEVOLUTION.....	28
2.5.1	<i>Genomische Inseln - Integrative und konjugative Elemente</i>	31
2.5.1.1	Das <i>clc</i> -Element von <i>Pseudomonas</i> sp. Stamm B13.....	33
2.5.2	<i>Evolutionäre Tendenzen in der Gattung Bordetella</i>	34
2.6	ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	37
3	MATERIAL	39
3.1	GERÄTE	39
3.2	BAKTERIENSTÄMME	39
3.3	ZELLINIEN	40
3.4	VEKTOREN UND REKOMBINANTE PLASMIDE	40
3.5	OLIGONUKLEOTIDE.....	41
3.5.1	<i>Plasmidspezifische Oligonukleotide</i>	41
3.5.2	<i>Klonierungs- und Screening- Oligonukleotide</i>	41
3.5.3	<i>Oligonukleotide zur Sequenzierung von 16S rDNA</i>	43
3.5.4	<i>Oligonukleotide zur Herstellung von Southern Blot Sonden zur Untersuchung der genomischen Inseln</i>	43
3.5.5	<i>Oligonukleotide für Realtime-PCR</i>	44
3.5.6	<i>Sonstige Oligonukleotide</i>	44
3.6	VERBRAUCHSMATERIALIEN	46
3.6.1	<i>Chemikalien</i>	46
3.6.2	<i>Enzyme</i>	46
3.6.3	<i>Molekularbiologische Kits</i>	46

3.7	WACHSTUMSMEDIEN UND ZUSÄTZE	46
3.7.1	Wachstumsmedien	46
3.7.2	Antibiotika	48
3.8	MOLEKULARGEWICHTSMARKER	48
4	METHODEN	49
4.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	49
4.1.1	<i>Isolierung, Amplifikation und Aufreinigung von DNA</i>	49
4.1.1.1	Isolierung von chromosomaler DNA	49
4.1.1.2	Plasmidpräparation mit dem Nucleobond® AX100 Midi-Kit	49
4.1.1.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	49
4.1.1.4	Herstellung eines Zelllysats zum Mutanten-Screening mittels PCR.....	50
4.1.1.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50
4.1.1.6	Reinigung von PCR-Produkten mit dem QIAquick® PCR Purification Kit	51
4.1.1.7	Elution und Reinigung von PCR-Produkten aus Agarosegelen	51
4.1.2	<i>Auftrennung von DNA</i>	51
4.1.2.1	Agarosegelelektrophorese	51
4.1.2.2	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	52
4.1.2.2.1	Isolierung von chromosomaler DNA in LMP-Agarose.....	53
4.1.2.2.2	Restriktionsverdau eingebetteter DNA.....	54
4.1.2.2.3	Herstellung und Beladung eines PFC-Agarosegels	54
4.1.2.2.4	Gellauf im CHEF-DR II System	54
4.1.3	<i>Klonierung von DNA</i>	55
4.1.3.1	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	55
4.1.3.2	Filling-in Reaktion	55
4.1.3.3	PNK-Behandlung von PCR-Fragmenten	55
4.1.3.4	Dephosphorylierung	56
4.1.3.5	Ligation	56
4.1.4	<i>Transformation von Bakterien</i>	56
4.1.4.1	Herstellung von CaCl ₂ -kompetenten <i>E. coli</i> DH5α Zellen	56
4.1.4.2	Herstellung von elektrokompetenten <i>E. coli</i> DH5α und <i>B. petrii</i> DSM 12804 Zellen	57
4.1.4.3	Hitzeschock-Transformation	57
4.1.4.4	Elektroporation.....	57
4.1.5	<i>Mutagenese durch homologe Rekombination</i>	57
4.1.6	<i>Konjugation</i>	58
4.1.7	<i>Sequenzierung</i>	58
4.1.8	<i>Southern Blot</i>	59
4.1.8.1	Gelelektrophorese und Vorbereitung des Gels.....	59
4.1.8.2	Transfer der DNA auf eine Hybond N ⁺ -Nylonmembran	59
4.1.8.3	Markierung der Sonde	60
4.1.8.4	Prähybridisierung und Hybridisierung	60

4.1.8.5	Waschen und Entwickeln der Membran.....	60
4.1.9	<i>Arbeiten mit RNA</i>	61
4.1.9.1	Isolierung von RNA	61
4.1.9.2	Aufreinigung mit dem RNeasy® Mini Kit.....	61
4.1.9.3	DNase-Behandlung mit dem DNA-free™ DNase Kit	61
4.1.9.4	Konzentrationsbestimmung von RNA	62
4.1.10	<i>cDNA Synthese</i>	62
4.1.11	<i>Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)</i>	62
4.2	BIOCHEMISCHE METHODEN.....	63
4.2.1	<i>Isolierung von Gesamtzellprotein gramnegativer Bakterien für die 2D-Gelelektrophorese</i>	63
4.2.2	<i>Proteinbestimmung nach Bradford</i>	64
4.2.3	<i>Auftrennung und Analyse von Proteinen</i>	64
4.2.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	64
4.2.3.2	Zweidimensionale Proteingelelektrophorese.....	65
4.2.3.2.1	Isoelektrische Fokussierung	65
4.2.3.2.2	SDS-PAGE – Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension	67
4.2.3.3	Proteinfärbung mit Silbernitrat.....	69
4.2.3.4	Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie	69
4.2.3.5	Auswertung der 2D-Gele mit der Delta 2D Software von DECODON	70
4.2.3.6	Analyse ausgewählter Spots mittels MALDI-TOF-MS	71
4.3	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	71
4.3.1	<i>Isolierung von Reinkulturen</i>	71
4.3.2	<i>Wachstumskurven</i>	72
4.3.3	<i>Langzeitwachstumsversuch</i>	72
4.3.4	<i>Antibiotikatest</i>	72
4.3.5	<i>Anlegen von Glycerinkulturen</i>	72
4.4	ZELLKULTUR	73
4.4.1	<i>Auftauen und Einfrieren von Makrophagen</i>	73
4.4.2	<i>Subkultivierung von Makrophagen</i>	73
4.4.3	<i>Bestimmung der Lebendzellzahl</i>	73
4.4.4	<i>Invasionsassay von B. petrii und B. bronchiseptica mit P388D1 makrophagenähnlichen Zellen</i>	74
4.4.5	<i>Infektionsassay von B. petrii und B. bronchiseptica mit P388D1 makrophagenähnlichen Zellen</i>	74
4.4.6	<i>Giemsafärbung und Mikroskopie zur Bestätigung der Invasionsdaten</i>	75
5	ERGEBNISSE	76
5.1	CHARAKTERISIERUNG DES UMWELTKEIMS <i>B. PETRII</i> DSM 12804	76
5.2	AUFNAHME UND ÜBERLEBENSFÄHIGKEIT VON <i>B. PETRII</i> DSM 12804 IN P388D1 MAKROPHAGENÄHNLICHEN ZELLEN	77

5.2.1	<i>Untersuchung zur Gentamycin- und Polymyxin B-Sensitivität von B. petrii DSM 12804 und B. bronchiseptica 7866</i>	77
5.2.2	<i>Vergleich der Aufnahme von B. petrii DSM 12804 und B. bronchiseptica 7866 in P388D1 makrophagenähnliche Zellen</i>	78
5.2.3	<i>Giemsa-Färbung und Mikroskopie von P388D1 makrophagenähnlichen Zellen nach Infektion mit B. bronchiseptica 7866 und B. petrii DSM 12804</i>	79
5.2.4	<i>Infektion von P388D1 makrophagenähnlichen Zellen zur Untersuchung der Überlebensfähigkeit von B. petrii DSM 12804 in eukaryotischen Zellen</i>	80
5.3	UNTERSUCHUNGEN ZUM BVG REGULON VON <i>B. PETRII</i> DSM 12804.....	81
5.3.1	<i>Das BvgAS-System von B. petrii DSM 12804</i>	82
5.3.2	<i>Herstellung von BvgA-/BvgAS-Deletionsmutanten in B. petrii DSM 12804</i>	88
5.3.2.1	<i>Klonierung in den Vektor pBluescript II KS (pKS)</i>	89
5.3.2.2	<i>Transformation in elektrokompente B. petrii DSM 12804 Zellen und Kontrolle der erhaltenen Mutanten</i>	90
5.3.3	<i>Wachstumsversuche mit den B. petrii DSM 12804 Deletionsmutanten</i>	93
5.3.4	<i>Vergl. Proteomanalyse mit B. petrii DSM 12804 und der ΔbvgA-Mutante</i>	93
5.3.5	<i>Untersuchung der Regulation ausgewählter Gene auf Transkriptionsebene mittels quantitativer Realtime-PCR</i>	97
5.3.6	<i>Zusammenfassung der Proteom- und Realtime-PCR-Daten</i>	99
5.4	BESCHREIBUNG VON <i>B. PETRII</i> VARIANTEN, DIE WÄHREND EINES LANGZEIT- WACHSTUMSVERSUCHS IN MAINWASSER ISOLIERT WURDEN.....	100
5.4.1	<i>Langzeitwachstumsversuch</i>	100
5.4.2	<i>Isolierung und Beschreibung der Varianten: g, k, f</i>	102
5.5	GENOMISCHE VARIABILITÄT VON <i>B. PETRII</i> DSM 12804	107
5.5.1	<i>Untersuchung der B. petrii Varianten g, k und f auf das Vorhandensein von genomischen Inseln mittels Southern Blot Analysen</i>	108
5.5.2	<i>Tabellarische Übersicht über die ICEs von B. petrii DSM 12804</i>	109
5.5.3	<i>Detektion von ringförmigen Intermediaten nach Excision der GIs</i>	111
5.5.4	<i>Sequenzvergleiche der Int-B13 Integrasen der genomischen Inseln GI1, GI2, GI3 und GI6 mit der Pseudomonas sp. Strain B13 Integrase des clc-Elements</i>	114
5.5.5	<i>Beschreibung der Integrationsstelle von GI3 in B. petrii DSM 12804</i>	117
5.5.6	<i>Untersuchungen zur Stabilität der genomischen Insel GI3</i>	118
5.5.6.1	<i>Herstellung der Insertionsmutante</i>	118
5.5.6.2	<i>Wachstumsversuche zum Stabilitätstest</i>	120
5.5.7	<i>Versuche zur Übertragbarkeit der GIs von B. petrii GI3::tet^R</i>	122
5.5.7.1	<i>Konjugationsexperiment mit B. bronchiseptica PS2 und B. petrii GI3::tetR</i>	122
5.5.7.2	<i>Bestimmung des Integrationsortes von GI3::tetR in B. bronchiseptica PS2</i>	123
5.6	VERGLEICHENDE ANALYSEN VON VERSCHIEDENEN <i>B. PETRII</i> ISOLATEN.....	124
5.6.1	<i>Pulsfeldgelelektrophorese mit den B. petrii Isolaten GDH030510, N122, N123, N134 und R521</i>	125
5.6.2	<i>Phylogenet. Analyse anhand der 16S rDNA verschiedener B. petrii Isolate</i>	126

5.6.2.1	Amplifikation und Sequenzierung der 16S rDNA von N122, N123, N134 und R521.....	126
5.6.2.2	Erstellen eines Stammbaums mit MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0.....	126
6	DISKUSSION	128
6.1	CHARAKTERISIERUNG DES UMWELTKEIMS <i>B. PETRII</i> DSM 12804	128
6.1.1	<i>Pathogene Eigenschaften von B. petrii DSM 12804: Untersuchung auf mit B. bronchiseptica vergleichbare intrazelluläre Stadien</i>	<i>128</i>
6.1.2	<i>Identifizierung von B. petrii Varianten während eines Langzeitwachstums-versuchs in Mainwasser</i>	<i>130</i>
6.2	DAS <i>B. PETRII</i> BVGAS ZWEIKOMPONENTENSYSTEM.....	131
6.2.1	<i>In silico-Charakterisierung des BvgAS-Systems aus B. petrii.....</i>	<i>131</i>
6.2.2	<i>Funktionelle Charakterisierung des BvgAS-Systems aus B.petrii DSM 12804 ...</i>	<i>134</i>
6.3	GENOMISCHE VARIABILITÄT VON <i>B. PETRII</i> DSM 12804	137
6.3.1	<i>Die genomischen Inseln GI1, GI2, GI3 und GI6 von B. petrii DSM 12804 und ihre Ähnlichkeit zum clc-Element von Pseudomonas sp. Strain B13.....</i>	<i>139</i>
6.3.2	<i>Stabilität und Übertragbarkeit von GI3</i>	<i>144</i>
6.4	PHYLOGENETISCHE ANALYSE VERSCHIEDENER <i>B. PETRII</i> ISOLATE	146
7	VERZEICHNISSE	148
7.1	LITERATURVERZEICHNIS.....	148
7.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	169
8	ANHANG	172
8.1	LEBENS LAUF	172
8.2	PUBLIKATIONEN	173
8.3	SOUTHERN BLOTS ZUR UNTERSUCHUNG DER GENOMISCHEN INSELN GI1-GI3 UND GI6 ...	174
8.4	DER <i>BVGS/BVGA</i> -LOKUS.....	175
8.5	TABELLEN ZUR SPOTAUSWAHL MIT DELTA2D (DECODON)	180
8.6	MANN-WHITNEY U-TEST DER REALTIME-PCR DATEN.....	187

1 Zusammenfassung

Bordetellen sind gramnegative Kokkobazillen, welche phylogenetisch in die Gruppe der β -Proteobakterien eingeordnet sind und zur Familie der *Alcaligenaceae* gehören. Die Gattung *Bordetella* umfasst nach heutigem Wissenstand neun Arten. Die nahe verwandten Spezies *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* und *B. pertussis* bilden das sogenannte *B. bronchiseptica*-Cluster, wobei *B. pertussis* als der Erreger des Keuchhustens beim Menschen wohl den bedeutendsten Vertreter der Gattung darstellt. Auch *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* verursachen respiratorische Erkrankungen beim Menschen, bzw. in verschiedenen Säugetieren. *B. bronchiseptica* besitzt hierbei das breiteste Wirtsspektrum und kann zudem für einen längeren Zeitraum in der Umwelt überleben. Die „neuen“ *Bordetella* Arten *B. avium*, *B. holmesii*, *B. hinzii*, *B. trematum* und *B. ansorpii* wurden alle mensch- bzw. tierassoziiert isoliert und besitzen ein unterschiedliches pathogenes Potential, welches z.T. erst noch genauer aufgeklärt werden muss. Die 2001 beschriebene Art *B. petrii* stellt den ersten Umweltkeim der Gattung *Bordetella* dar, welcher aus einer anaeroben, dechlorinierenden Anreicherungskultur aus Flusssediment isoliert wurde (von Wintzingerode *et al.*, 2001). Phylogenetisch wird *B. petrii* an die Basis der Gattung *Bordetella* eingeordnet und ist in evolutionärer Hinsicht deshalb interessant, weil er sowohl für orthologe Gene bestimmter Virulenzfaktoren der pathogenen Bordetellen kodiert als auch typische Eigenschaften von Umweltkeimen aufweist und somit eine Art Bindeglied darstellt.

Ein solcher putativer Virulenzfaktor ist beispielsweise das BvgAS-System, welches in den pathogenen Bordetellen den Hauptregulator der Virulenzgenexpression darstellt. Da *B. petrii* ein orthologes BvgAS-System besitzt, wurde dessen Struktur im Rahmen dieser Arbeit mittels *in silico* Analysen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Konservierung nur auf Aminosäureebene deutlich zu erkennen ist und der Response Regulator BvgA von *B. petrii* die stärkste Konservierung aufweist. Des Weiteren besitzt *B. petrii* Gene für zwei Histidinkinasen, BvgS1 und BvgS2, sowie ein separates Gen, welches für eine Hpt-Domäne kodiert. Abweichend von den „klassischen“ Bordetellen ist auch die Domänenstruktur der *B. petrii* Histidinkinasen. Zusätzlich zur separaten Hpt-Domäne fehlt den *B. petrii*-Kinasen eine periplasmatische Sensordomäne und nur für BvgS1 kann eindeutig eine PAS-Domäne vorhergesagt werden, so dass sich vermutlich die Signalwahrnehmung von der der pathogenen Bordetellen unterscheidet. Möglicherweise hat das System in den pathogenen Bordetellen zusätzliche Funktionen übernommen und seine Struktur durch Integration weiterer Domänen komplexiert. Es bliebe zu untersuchen, ob beide *B. petrii*-Histidinkinasen funktionell sind, was möglicherweise Rückschlüsse auf die Evolution des BvgAS-Systems zulassen könnte.

Weitere putative Virulenzfaktoren von *B. petrii* gehören in die Gruppe der Adhäsionsfaktoren. Diese Faktoren spielen bei den „klassischen“ Bordetellen im Infektionszyklus eine wichtige Rolle für die Anheftung z.B. an die Epithelzellen des Respirationstraktes. Um ein mögliches pathogenes Potential von *B. petrii* abschätzen zu können, wurden vergleichende Zellkulturstudien mit *B. bronchiseptica* durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass *B. petrii* um den Faktor 7,5 weniger in Makrophagen aufgenommen wird. Abschließende Aussagen über das intrazelluläre Überleben von *B. petrii* konnten hier allerdings noch nicht getroffen werden. Da kürzlich auch klinische *B. petrii* Isolate beschrieben wurden (Fry *et al.*, 2005; Stark *et al.*, 2007), wäre es sicherlich

interessant, deren Interaktionen mit eukaryotischen Zellen zu untersuchen. Da *B. petrii* für putative Adhäsionsfaktoren kodiert, könnte man zunächst das Adhäsionsverhalten an unterschiedliche Zelltypen untersuchen.

Hinweise auf die Funktionalität des BvgAS-Systems in *B. petrii* wurden durch Proteomstudien mit einer BvgA-Mutante erhalten, wobei für die Auswertung die Problematik der Variabilität von *B. petrii* berücksichtigt werden musste. Die Schlussfolgerungen sind daher vorerst nur hypothetisch, unterstützen aber Ergebnisse von Mikroarray Analysen der „klassischen“ Bordetellen (Cummings *et al.*, 2006) und deuten darauf hin, dass das BvgAS-System in *B. petrii* möglicherweise eine Funktion in der Respirationskontrolle hat und auf wechselnde Sauerstoffbedingungen reagiert, wie sie z.B. in Biofilmen auftreten können. Es wäre daher sinnvoll, weitere Untersuchungen zur Funktionalität des BvgAS-Systems auch unter anaeroben Bedingungen durchzuführen.

Dass *B. petrii* ein hochvariabler Umweltkeim ist, der sich an verschiedene Lebensbedingungen anpassen kann, konnte bereits zu Beginn der Doktorarbeit im Rahmen eines Langzeitwachstumsversuchs gezeigt werden, bei dem drei phänotypisch unterscheidbare Varianten isoliert wurden. Diese Variabilität konnte später auch durch Mikroarray Analysen bestätigt werden (persönliche Mitteilung, Karin Schmitt) und wird durch die unterschiedliche Excision von genomischen Inseln hervorgerufen. Im Rahmen der Genomsequenzierung wurden acht genomische Inseln beschrieben (Gross *et al.*, 2008), die in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Struktur und ihrem Excisionsverhalten untersucht wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die genomischen Inseln, mit Ausnahme der Insel GI0, in verschiedenen Kombinationen als ringförmige Intermediate aus dem *B. petrii*-Genom ausgeschnitten werden können. Vier der genomischen Inseln (GI1-GI3 und GI6) weisen strukturelle Ähnlichkeiten zu einer Familie syntenischer genomischer Inseln auf, zu denen auch das *clc*-Element von *Pseudomonas sp.* Strain B13 zählt. Sie haben gemeinsam, dass sie in tRNA^{Gly}-Gene integrieren, ein ähnliches Integrase-Gen besitzen und aus einem konservierten Bereich für Konjugation und Transfer sowie aus einem variablen Bereich bestehen, der verschiedene metabolische Fähigkeiten vermittelt. Ferner konnte gezeigt werden, dass der Integrationsbereich der Inseln GI1-GI3 dieselbe Struktur aufweist wie sie für den Integrationsbereich des *clc*-Elements in *Ralstonia sp.* Strain S11 beschrieben wurde. Die größte Ähnlichkeit zum *clc*-Element weist die Insel GI3 von *B. petrii* auf. Diese beiden Inseln haben annähernd die gleiche Größe und besitzen Gene zum Abbau von 3-Chlorobenzoat (3-CBA). Sie unterscheiden sich hauptsächlich in zwei Genclustern voneinander, welche im variablen Bereich liegen und unterschiedliche metabolische Fähigkeiten vermitteln. Die Untersuchung der Stabilität von GI3 ergab, dass nach 125-150 Generationen nur noch 1,5 % der Bakterien die Insel GI3 enthielten. Hier wäre es sicherlich interessant zu untersuchen, ob durch 3-CBA als Substrat ein stabilisierender Effekt auftritt. Des Weiteren konnte die Übertragung der Insel GI3 von *B. petrii* auf *B. bronchiseptica* PS2 gezeigt und der Integrationsbereich bestimmt werden. Dies bestätigt die Bedeutung des horizontalen Gentransfers für die Bakterienevolution, da so in einem Schritt neue Stoffwechselwege vermittelt werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch ein Stammbaum der Gattung *Bordetella* erstellt, in welchen eine Reihe kürzlich neu beschriebener *B. petrii*-Isolate mit aufgenommen wurden. Zur besseren Abgrenzung der einzelnen Isolate voneinander sollten zwar zusätzlich zur 16S rDNA weitere Gene herangezogen werden, dennoch wird deutlich, dass durch das Hinzufügen

von *B. petrii* Isolaten aus unterschiedlichen Habitaten ein zu den pathogenen Bordetellen abgegrenztes Cluster gebildet wird.

Summary

Bordetellae are gram negative coccobacilli phylogenetically grouped within the beta-subclass of Proteobacteria and belonging to the family of the *Alcaligenaceae*. To date, the genus *Bordetella* comprises nine species. The closely related organisms *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* and *B. pertussis* constitute the so called *B. bronchiseptica*-cluster in which *B. pertussis*, as the agent of whooping cough in humans, is the most important member. *B. parapertussis* and *B. bronchiseptica* also cause respiratory diseases in humans and in various mammal species, respectively. Here *B. bronchiseptica* displays the broadest host range and in addition is able to survive in the environment for a certain period of time. The “new” *Bordetella* species *B. avium*, *B. holmesii*, *B. hinzii*, *B. trematum* and *B. ansorpii* have all been isolated in association with humans or animals and show different pathogenic potentials, which partly have to be further elucidated. The species *B. petrii*, described in 2001, represents the first environmental isolate of the genus *Bordetella* and was derived from an anaerobic, dechlorinating bioreactor culture enriched by river sediment (von Wintzingerode *et al.*, 2001). Phylogenetically *B. petrii* is placed at the root of the genus *Bordetella*. Since it possesses several orthologous genes to virulence factors of the pathogenic *Bordetella* species but also shows typical features of environmental bacteria, *B. petrii* might represent some sort of evolutionary missing link.

A putative virulence factor in *B. petrii* is, for example, the BvgAS-system, which appears to be the master regulator for virulence gene expression in the pathogenic *Bordetellae*. In this work the structure of this BvgAS ortholog was to be investigated via *in silico* analyses. We could show that there is a clear conservation on amino acid level and that it is the response regulator BvgA that displays the strongest conservation. Furthermore, *B. petrii* possesses two histidine kinase genes, *bvgS1* and *bvgS2*, as well as a separate gene, coding for an Hpt-domain. The domain structure of the *B. petrii* histidine kinases also differs from that of the classical *Bordetellae*. In addition to the separated Hpt-domain they also miss a periplasmatic sensing domain and a distinct PAS-domain can only be predicted for BvgS1. This indicates that the sensing mechanism in *B. petrii* is probably different. It could be possible that the system has gained additional functions in the pathogenic *Bordetellae* and that the structure became more complex via integration of further domains. Regarding the evolution of the *B. petrii* BvgAS-system it might be interesting to determine if both of the histidine kinases are functional.

Further putative virulence factors of *B. petrii* are adhesion factors. These play an important role in the infectious cycle of the classical *Bordetellae* to adhere e.g. to the epithelial cells of the respiratory tract. To assess a possible pathogenic potential of *B. petrii*, comparative cell culture studies with *B. bronchiseptica* were performed. They showed that the uptake of *B. petrii* into macrophages is 7,5 times less than the uptake of *B. bronchiseptica*. However, a final statement about the intracellular survival of *B. petrii* could not be made. But since there have been clinical isolates of *B. petrii* described recently (Fry *et al.*, 2005; Stark *et al.*, 2007), it might be of some interest to investigate their interactions with eukaryotic cells. As *B. petrii*

codes for putative adhesion factors, one should examine the adhesion behaviour to different cell types at first.

In order to characterize the BvgAS-system in *B. petrii*, proteome studies with a BvgA-mutant were performed. Since the problem of *B. petrii* variability had to be taken into account for the data evaluation, the conclusions are only preliminary yet. Nevertheless, they support results derived from microarray analyses with the “classical” *Bordetella* species (Cummings *et al.*, 2006) and indicate that the BvgAS-system in *B. petrii* might play a role in respiratory control and may react to changing oxygen availabilities occurring e.g. during growth in biofilms. For continuing studies it would therefore be appropriate to also probe anaerobic conditions.

Since three phenotypically distinguishable variants could be isolated during a long-term growth experiment at the beginning of this work, *B. petrii* even then revealed to be a highly variable bacterium capable of adapting to different living conditions. This initially observed variability was later confirmed via microarray analyses (personal information, Karin Schmitt) and is caused by differential excision of genomic islands. The genome sequencing project determined eight genomic islands (Gross *et al.*, 2008) which were investigated in this work regarding their structure and excision behaviour. We showed that all genomic islands, except island GI0, were able to excise from the *B. petrii* genome in different combinations and to form circular intermediates. Four of the genomic islands (GI1-GI3 and GI6) show structural similarity to a family of syntenic genomic islands also comprising the *clc*-element of *Pseudomonas sp.* strain B13. They have in common to integrate into tRNA^{Gly} genes and to contain similar integrase genes. Furthermore, they are made up of a conserved part responsible for conjugation and transfer and a variable part mediating metabolic properties. We demonstrated that the integration site of the islands GI1-GI3 displays the same structure than is described for the integration site of *clc* in *Ralstonia sp.* strain 11. Besides, the island GI3 exhibits the highest similarity to the *clc*-element. Both islands are approximately of the same size and contain genes for 3-chlorobenzoate (3-CBA) degradation. The main difference is made up by two gene clusters in the variable part mediating different metabolic properties. Investigation of the GI3 stability revealed a loss of GI3 in 98,5 % of the bacteria after 125-150 generations. In this context it would be interesting to see if 3-CBA given as a substrate could cause a stabilizing effect of the island. We further demonstrated the transfer of GI3 from *B. petrii* to *B. bronchiseptica* PS2 and also identified the integration site. This confirms the importance of horizontal gene transfer for bacterial evolution since new metabolic pathways are passed on in one single step.

In this work also a new phylogenetic tree of the genus *Bordetella* had to be created by integrating the recently described new *B. petrii* isolates. Although, in addition to the 16S rDNA, one should use more genes to further differentiate the isolates, it was obvious that the *B. petrii* isolates derived from different habitats form an independent cluster.

2 Einleitung

2.1 Die Gattung *Bordetella*

Der wohl bekannteste Vertreter der Gattung *Bordetella* ist *Bordetella pertussis*, der Erreger des Keuchhustens und der Hauptgrund für Kindersterblichkeit vor der Einführung entsprechender Impfungen (Diavatopoulos *et al.*, 2005). Das Krankheitsbild ist durch schweren, krampfartigen Husten und den Auswurf von zähem Schleim gekennzeichnet. Den anstrengenden Hustenanfällen folgt häufig ein Brechreiz, der den Patienten zusätzlich schwächt. Das charakteristische Keuchen wird durch das schwere Atemholen nach den oft minutenlangen Hustenkrämpfen verursacht (Mattoo & Cherry, 2005).

Trotz der auffälligen Symptomatik wird das Auftreten von Keuchhusten in Europa erstmals in Schriften des 15. Jahrhunderts erwähnt (Lapin, 1943). Das erste epidemieartige Auftreten des Keuchhustens um 1578 in Paris wurde von dem französischen Arzt Guillaume de Baillou beschrieben (Cone, 1970). Ein Jahrhundert später bezeichnete der englische Mediziner Thomas Sydenham den Husten als Pertussis. Als eigenständiges Krankheitsbild wurde der Keuchhusten erst im Rahmen von großen Epidemien im 18. Jahrhundert definiert. 1906 beschrieben die belgischen Wissenschaftler Jules Bordet und Octave Gengou dann die Isolierung des bakteriellen Erregers und dessen Kultivierung unter Laborbedingungen (Bordet & Gengou, 1906). Die Zuteilung einer eigenen Gattung, die zu Ehren von Jules Bordet *Bordetella* genannt wurde, fand allerdings erst im Jahr 1952 statt (Lopez-Moreno, 1952).

Weitere Vertreter der Gattung *Bordetella*, die Anfang des 20. Jahrhunderts isoliert wurden, sind *B. bronchiseptica* und *B. parapertussis*, welche respiratorische Erkrankungen in verschiedenen Säugetierarten bzw. eine abgeschwächte Form des Keuchhustens im Menschen verursachen können.

Nach heutigem Wissensstand gehören insgesamt neun Arten zur Gattung *Bordetella*: die bereits beschriebenen „klassischen“, human- bzw. säugetierpathogenen Arten *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* und *B. parapertussis*, welche auch als *B. bronchiseptica*-Cluster bezeichnet werden (2.2), sowie die in den letzten Jahren beschriebenen „neuen“ Arten *B. avium*, *B. holmesii*, *B. hinzii*, *B. trematum*, *B. petrii* und *B. ansorpii*. Die Vertreter der „neuen“ Arten weisen z.T. tierpathogenes oder humanpathogenes Potential auf bzw. stellen mit *B. petrii* den ersten Umweltkeim der Gattung vor und werden unter 2.3 näher beschrieben.

Phylogenetisch werden die Bordetellen in die Gruppe der β -Proteobakterien eingeordnet und zur Familie der *Alcaligenaceae* gezählt (Vandamme *et al.*, 1996). Die enge Verwandtschaft zu den Gattungen *Alcaligenes* und *Achromobacter* zeigt sich in der vergleichenden Analyse der 16S rDNA und ist in Abbildung 2-1 dargestellt. Die Vertreter dieser Gattungen sind hauptsächlich Umweltkeime, es finden sich aber auch fakultative Pathogene wie *Achromobacter xylosoxidans*, welcher eine zunehmende Rolle bei nosokomialen Infektionen spielt und zum Beispiel auch Infektionen im Respirationstrakt von Patienten mit Zystischer Fibrose verursacht (Aisenberg *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2002; Tsay *et al.*, 2005)

Laut Genusdefinition handelt es sich bei den *Bordetella*-Arten um kleine, gramnegative und katalasepositive Kokkobazillen von 0,5 bis 2 μm Länge, die einzeln, paarweise oder selten in

kurzen Ketten vorliegen. Bordetellen weisen einen nicht fermentativen, asaccharolytischen Stoffwechsel auf und sind bis auf *B. pertussis* strikt aerob. Als Kohlenstoff- und Energiequelle werden vorrangig Aminosäuren oxidiert und unter aeroben Bedingungen wird Citrat assimiliert (Armstrong & Gross, 2007; von Wintzingerode *et al.*, 2001; Weiss, 1992). Ein weiteres Charakteristikum für die Gattung *Bordetella* ist der hohe GC-Gehalt (61,5-68 mol%) des Genoms (Gerlach *et al.*, 2001; Parkhill *et al.*, 2003).

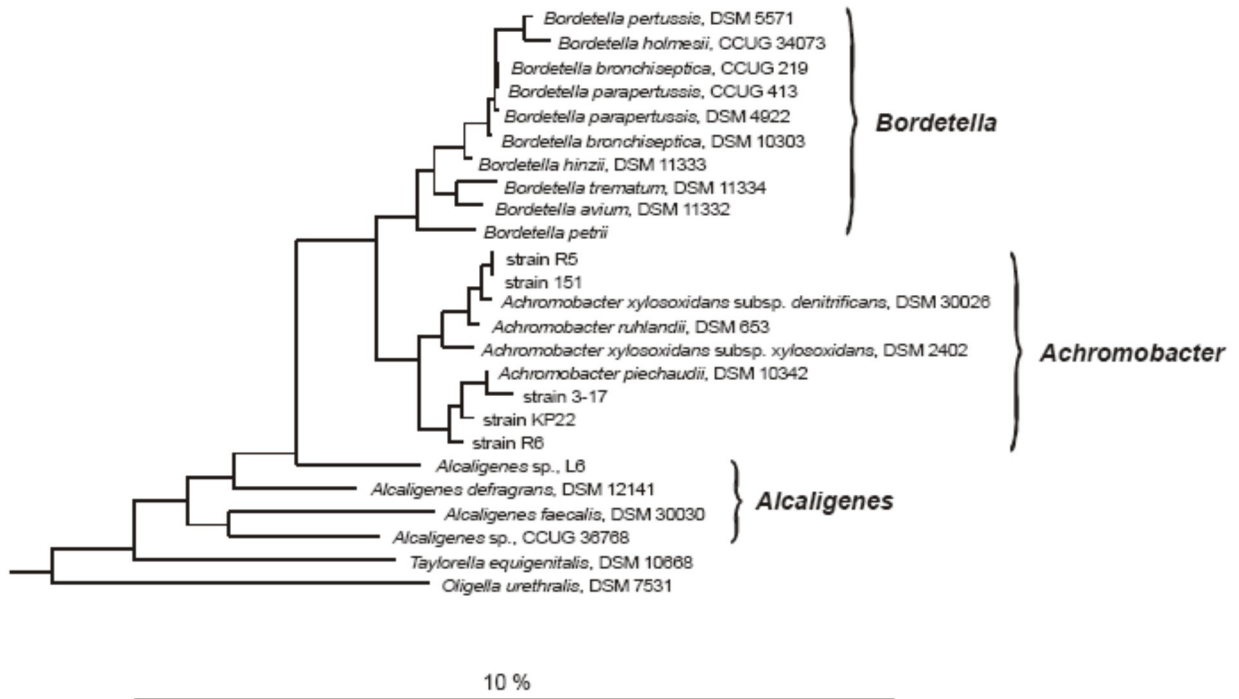


Abbildung 2-1 Stammbaum der Familie *Alcaligenaceae*, basierend auf 16S rDNA-Sequenzen verschiedener Typstämme. Der Balken entspricht 10 % geschätzter Sequenzdivergenz. (Gerlach *et al.*, 2001).

2.2 Das *B. bronchiseptica*-Cluster

Die bereits Anfang des 20. Jahrhunderts beschriebenen *Bordetella*-Arten *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* verursachen respiratorische Erkrankungen im Menschen bzw. in verschiedenen Säugetieren, wobei sie die zilientragenden Zellen der oberen Atemwege besiedeln und durch das Absondern von Toxinen das Gewebe schädigen (Fuchs & Gross, 2001; Mattoo & Cherry, 2005). Eine Reihe von vergleichenden Analysen, wie zum Beispiel DNA-Hybridisierungsstudien, Multilokusenzymelektrophorese (MEE), Untersuchungen zum Polymorphismus von IS-Elementen (van der Zee *et al.*, 1997), 23S rDNA-Sequenzanalysen (Müller & Hildebrandt, 1993) und der Vergleich der am Sanger Center ermittelten Genomsequenzen (Preston *et al.*, 2004) zeigen die sehr enge Verwandtschaft dieser drei Arten auf. Man geht mittlerweile davon aus, dass *B. pertussis* und Isolate von *B. parapertussis* aus dem Menschen Klone von *B. bronchiseptica* darstellen, die sich erst seit relativ kurzer Zeit an den menschlichen Wirt angepasst haben, und dass sich humane und ovine Isolate von *B. parapertussis* zu unterschiedlichen Zeiten unabhängig aus *B. bronchiseptica* entwickelt haben (van der Zee *et al.*, 1997). MEE Studien verschiedener Isolate von *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* weisen ferner auf eine

geringe genetische Divergenz innerhalb der drei Gruppen hin, was zum einen die klonale Herkunft, zum andern die evolutionär nicht weit zurückliegende Abspaltung von einem gemeinsamen Vorfahren unterstreicht (Musser *et al.*, 1986). *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* werden daher eher als Subspezies einer Art mit unterschiedlichen Anpassungen betrachtet und sind unter dem Begriff *B. bronchiseptica*-Cluster zusammengefasst (Gerlach *et al.*, 2001). Trotz der engen genetischen Verwandtschaft können sie aufgrund einiger physiologischer Merkmale leicht voneinander unterschieden werden (siehe Tabelle 2-1).

	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>
Wirt	Mensch	Mensch, Schaf	Säugetiere, selten Mensch
Erkrankung	Keuchhusten	milde Form des Keuchhustens	respiratorische Erkrankungen
Isolationsort	Respirationstrakt	Respirationstrakt	Respirationstrakt
<u>Physiologische Merkmale:</u>			
Wachstum auf Blutagar („chocolate agar“)	-	+	+
Wachstum auf McConkey-Agar	-	+/-	+
Oxidaseaktivität	+	-	+
Ureaseaktivität	-	+	+
Beweglichkeit	-	-	+
Braune Pigmentierung	-	+	-
β-Hämolyse	+	+	+
Nitratreduktion	-	-	+
Citrat Assimilation	+	+	+

Tabelle 2-1 Merkmale zur Unterscheidung der *Bordetella*-Arten *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* (modifiziert nach (Gerlach *et al.*, 2001; Ko *et al.*, 2005; Weyant *et al.*, 1995)).

2.2.1 Klinische Relevanz des *B. bronchiseptica*-Clusters

Infektionen mit *B. pertussis* sind ausschließlich auf den Menschen beschränkt, wobei besonders Kleinkinder (< 5 Jahre) und Säuglinge in hohem Maße gefährdet sind. Bei ihnen kann häufig ein akuter und lebensbedrohlicher Infektionsverlauf beobachtet werden (Crowcroft *et al.*, 2002; Mattoo & Cherry, 2005). Die Kinder weisen dabei relativ geringe respiratorische Symptome auf, dafür kommt es oft zu Atemstillständen und die Krankheit kann zu Organversagen führen (Forsyth, 2007).

Der typische Krankheitsverlauf bei älteren Kindern und Erwachsenen lässt sich in drei Stadien einteilen. Der Keim wird durch Tröpfcheninfektion übertragen und besitzt eine Inkubationszeit von fünf bis zu 21 Tagen. Durch die Kolonisierung der oberen Atemwege entsteht ein akuter Katarrh, der durch unspezifische Erkältungssymptome wie Schnupfen, Husten und leichtes Fieber gekennzeichnet ist. Während diesem sogenannten *Stadium catarrhale* ist die Ansteckungsgefahr am höchsten und der Husten verschlimmert sich zusehends. Die Krankheit geht dann in das 3 - 6 Wochen andauernde *Stadium convulsium*

über, welches sich durch die typischen krampfartigen Hustenanfälle und Erbrechen auszeichnet. Die immer wiederkehrenden Hustenanfälle werden durch die zunehmende Schädigung des Respirationsepithels durch die zahlreichen von *B. pertussis* gebildeten Toxine verursacht. Diesem Stadium folgt die Rekonvaleszenzphase, das *Stadium decrementi*, in welcher die Symptome abklingen und das mehrere Wochen bis Monate dauern kann (Fuchs & Gross, 2001; Mattoo & Cherry, 2005).

Bei Erwachsenen, besonders wenn sie als Kind immunisiert wurden, ist ein solcher Krankheitsverlauf jedoch selten. Eine *B. pertussis* Infektion kann sich dann in Erkältungssymptomen und leichtem bis starkem Husten äußern und wird aufgrund der abgeschwächten Symptomatik oft nicht richtig diagnostiziert. Dennoch treten *B. pertussis* Infektionen in Erwachsenen regelmäßig auf und man geht davon aus, dass 12 % - 32 % der Erwachsenen mit Hustenerkrankungen, die länger als zwei Wochen andauern, mit *B. pertussis* infiziert sind (Cherry, 2005). Solche unerkannten Infektionen stellen eine wichtige Übertragungsquelle dar, was wiederum ein Risiko für Neugeborene darstellt.

Seit den in den 40er Jahren eingeführten Reihenimpfungen mit dem Kombinationsimpfstoff DTPw (inaktiviertes Diphtherie- und Tetanustoxin, Ganzzell-Pertussis) und dem damit verbundenen Rückgang der Keuchhustenfälle, wurde in den USA das geringste Auftreten von Keuchhusten in den 80er Jahren erreicht (Halperin, 2007). Da der Ganzzellimpfstoff, der mit Hitze oder Formaldehyd abgetötete *B. pertussis*-Isolate enthielt, häufige Nebenwirkungen wie Fieber, Appetitlosigkeit und Enzephalitis verursachte, verlor er nach der ersten erfolgreichen Bekämpfung des Keuchhustens an Akzeptanz in der Bevölkerung. In Staaten ohne Impfpflicht, wie Schweden und Deutschland, wurden die Impfprogramme zeitweise sogar ganz gestoppt (Crowcroft *et al.*, 2002). Dies führte zu einem Absinken der Impfrate in den 70er Jahren und damit verbunden zu einem Anstieg der Keuchhustenfälle (Greco *et al.*, 1996). In den 90er Jahren wurden zunehmend azelluläre Impfstoffe (DTPa) eingesetzt, wobei die gentechnische Gewinnung eines inaktivierten Pertussistoxins (PT) die chemischen Detoxifikationsmethoden ablöste (Pizza *et al.*, 1989). Um nicht nur die toxische Wirkung von PT und die damit verursachte Symptomatik, sondern bereits die Adhäsion und Kolonisierung zu verhindern, werden heute Impfstoffe verwendet, die zusätzlich aufgereinigte immunogene Komponenten wie das filamentöse Hämagglutinin (FHA), Pertaktin (PRN) und Fimbrien (FIM) in unterschiedlicher Kombination enthalten (Poolman & Hallander, 2007). Diese azellulären Impfstoffe sind sehr wirksam und verursachen weniger Nebenwirkungen (Greco *et al.*, 1996).

Laut der Weltgesundheitsorganisation WHO erkranken jährlich 20 - 50 Millionen Menschen an Keuchhusten, wobei 90 % der Fälle in den Entwicklungsländern auftreten (Crowcroft *et al.*, 2003; WHO, 2005). Doch auch in Ländern mit hoher Immunisierungsrate ist in den letzten 20 - 30 Jahren eine stetige Zunahme an Keuchhustenfällen zu verzeichnen gewesen (de Melker *et al.*, 1997; Guris *et al.*, 1999). Zudem scheinen immer mehr Fälle bei älteren Kindern und Jugendlichen aufzutreten (Halperin, 2007; Skowronski *et al.*, 2002). Eine solche veränderte Epidemiologie kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen kann ein Rückgang des Impfschutzes mit der Zeit eine Rolle spielen, zum andern können Polymorphismen in den Bestandteilen des Impfstoffes zu einer verringerten Wirksamkeit des Vakzins führen (Halperin, 2007; Poolman & Hallander, 2007; Yih *et al.*, 2000). Um einer solchen Entwicklung entgegenzuwirken, werden neue Impfprogramme erarbeitet, die zum Beispiel die

regelmäßige Impfung von Erwachsenen vorschlagen (Cherry, 2005; Forsyth *et al.*, 2007). Man sollte dabei aber auch berücksichtigen, dass die Zahl der beschriebenen Keuchhustenfälle durch die besseren Diagnoseverfahren zusätzlich erhöht wird und nicht ausschließlich auf eine veränderte Epidemiologie zurückzuführen ist (Halperin, 2007; Poolman & Hallander, 2007; Yih *et al.*, 2000).

Ein weiterer humanpathogener Vertreter des *B. bronchiseptica*-Clusters ist *B. parapertussis*. Der Erreger wurde 1937 erstmals beschrieben und konnte aufgrund physiologischer Merkmale von *B. pertussis* abgegrenzt werden (Bradford & Slavin, 1937; Eldering & Kendrick, 1938). Der Krankheitsverlauf einer *B. parapertussis* Infektion ist dem des Keuchhustens ähnlich. Es treten ebenfalls schwerer Husten, Hustenkrämpfe und Erbrechen auf, jedoch dauern sie weniger lange bzw. treten in weniger Prozent der Fälle auf, so dass man von einer milderer Form des Keuchhustens sprechen kann. Fieber sowie Lymphocytose, welche von *B. pertussis* hervorgerufen werden, kommen nicht vor (Heininger *et al.*, 1994; Mastrantonio *et al.*, 1998). Durch die Ähnlichkeit der Symptome und die unterschiedlichen Ausprägungen der Krankheit werden *B. pertussis* und *B. parapertussis* Infektionen oft nicht differenziert, so dass die tatsächliche Häufigkeit des jeweiligen Erregers nicht ganz klar ist. In Kindern scheinen beide Erreger gleichermaßen aufzutreten, wobei in Jugendlichen und Erwachsenen häufiger *B. pertussis* Infektionen vorkommen (He *et al.*, 1998). Obwohl die beiden Stämme einen hohen Verwandtschaftsgrad aufweisen, scheinen Pertussis-Impfstoffe nur geringen Schutz gegenüber *B. parapertussis* zu vermitteln, was darauf hinweist, dass die Koexistenz im Menschen vermutlich durch Vermeidung von Kreuzimmunität erreicht wird (Bjornstad & Harvill, 2005; Willems *et al.*, 1993).

1994 wurde *B. parapertussis* aus Schafen mit chronisch nicht progressiver Pneumonie isoliert (Porter *et al.*, 1994). Da dieser Stamm sich auf genomischer Ebene deutlich von den Humanisolaten unterscheidet geht man davon aus, dass es sich um unterschiedliche Klone mit spezifischer Wirtsadaptation handelt, die sich zu unterschiedlichen Zeiten aus einem *B. bronchiseptica*-ähnlichen Vorfahren entwickelt haben (van der Zee *et al.*, 1997; Yuk *et al.*, 1998).

B. bronchiseptica wurde bereits 1912 bei der Untersuchung der Hundestaupe und ähnlicher Krankheiten bei anderen Tieren beschrieben und zunächst als *Bacillus bronchisepticus* bezeichnet (Ferry, 1912). Im Gegensatz zur engen Wirtsspezifität von *B. pertussis* und *B. parapertussis* kann *B. bronchiseptica* respiratorische Erkrankungen in einer Vielzahl von Säugetieren wie z.B. Mäusen, Kaninchen, Katzen, Pferden, Hunden und Schweinen verursachen (Goodnow, 1980). Die am besten beschriebenen Krankheiten sind dabei der Zwingerhusten des Hundes (McCandlish *et al.*, 1978) und die atrophische Rhinitis beim Schwein, welche zu Deformierungen der Schnauze führen kann (De Jong, 1992). Obwohl *B. bronchiseptica* hauptsächlich mit Erkrankungen von Tieren assoziiert ist, treten auch *B. bronchiseptica*-Infektionen in immunsupprimierten oder älteren Menschen oder bei solchen, die in häufigen Kontakt mit infizierten Tieren gekommen sind, auf (Gueirard *et al.*, 1995; Woolfrey & Moody, 1991). Diese Infektionen verlaufen meist chronisch, oft asymptomatisch und sind schwierig mit Antibiotika zu behandeln. In seltenen Fällen wurden auch akute Infektionen beobachtet (Gomez *et al.*, 1998; Woolfrey & Moody, 1991). Zusätzlich zu dem breiten Wirtsspektrum konnte gezeigt werden, dass *B. bronchiseptica* in tracheobronchialen Spülungen verschiedener Säugetiere und auch in PBS (phosphate buffered

saline) wachsen kann (Porter & Wardlaw, 1994). Sogar in Teichwasserproben konnten verschiedene *B. bronchiseptica* Stämme über einen längeren Zeitraum hinweg überleben und damit einem beträchtlichen, durch Nährstoffmangel verursachten Stress, widerstehen (Porter & Wardlaw, 1993). Dies deutet darauf hin, dass *B. bronchiseptica* auch außerhalb des Respirationstraktes überleben kann und damit potentielle Umweltreservoirs für eine Infektion vorhanden sind.

2.2.2 Virulenzfaktoren des *B. bronchiseptica*-Clusters

Für eine erfolgreiche Infektion des Wirtes benötigen Bordetellen verschiedene Virulenzfaktoren. Diese lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Die Adhäsionsfaktoren, die im ersten Schritt des Infektionszyklus zur Anheftung an die Epithelzellen des Respirationstraktes notwendig sind und die Toxine, welche eine wichtige Rolle bei der Kolonisierung des Atmungstraktes spielen. Diese Virulenzfaktoren wurden bislang vorwiegend für die „klassischen“ *Bordetella*-Arten beschrieben und werden im Hinblick auf Impfstoff- und Antibiotikaentwicklung intensiv molekularbiologisch untersucht. Eine Übersicht über die Virulenzfaktoren in *B. pertussis* ist in Abbildung 2-2 gegeben.

2.2.2.1 Adhäsine

Das am besten charakterisierte Adhäsine ist das hochimmunogene, haarnadelförmige **Filamentöse Hämagglutinin (FHA)** (Cotter & Miller, 2000), welches Bestandteil der meisten azellulären Pertussis-Vakzine ist (Cherry & Heiniger, 2004). Das Gen *phaB*, welches für FHA kodiert, ist zwischen dem *bvgAS*-Lokus und dem *fim*-Gencluster lokalisiert. *phaB* ist eines der am stärksten durch das Zweikomponentensystem BvgAS aktivierte Gen. Sein Promotor besitzt eine hochaffine BvgA-Bindestelle, sowie zwei weniger affine, kooperative BvgA-Bindestellen (Boucher *et al.*, 2003; Roy & Falkow, 1991). Außerdem können der *fim*-Lokus und das sich anschließende *phaC*- sowie das *phaB*-Gen auch als polycistronische mRNA synthetisiert werden (Locht *et al.*, 1993).

FHA wird als 367 kDa großes Vorläuferprotein (FhaB) gebildet, welches über einen Sec-abhängigen Transportweg durch die Cytoplasmamembran geschleust wird. Dem Transport schließt sich die Prozessierung im Periplasma an, wobei das N-terminale Signalpeptid (71 AS) und ein 150 kDa großes C-terminales Fragment, das als intramolekulares Chaperon dient, abgespalten werden (Lambert-Buisine *et al.*, 1998; Renauld-Mongenie *et al.*, 1996). Das prozessierte Protein hat eine Größe von 220 kDa (Locht *et al.*, 1993). Die Translokation von FHA durch die äußere Membran erfolgt mit Hilfe des akzessorischen Proteins FhaC, welches eine FHA-spezifische Pore bildet. FHA und FhaC stellen damit ein TPS (two-partner secretion)-System dar (Jacob-Dubuisson *et al.*, 1999; Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001). Auf der Zelloberfläche bleibt FHA vermutlich durch Interaktion seines N-Terminus mit FhaC verankert (Mazar & Cotter, 2006).

Im Gegensatz zu vielen anderen Adhäsinen besitzt FHA mindestens drei unterschiedliche Bindemotive für die Anheftung an eukaryotische Wirtszellen. Das Arg-Gly-Asp (RGD)-Motiv vermittelt die Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren von Makrophagen und Monocyten (Relman *et al.*, 1990). Des Weiteren verfügt FHA über eine Kohlenhydratbindestelle (CRD), welche die Adhäsion der Bakterien an das Zilienepithel des

Respirationstraktes ermöglicht (Prasad *et al.*, 1993). Eine Heparin-Bindeaktivität ist vermutlich für die Interaktion mit nicht-zilientragenden Epithelzellen und der extrazellulären Matrix verantwortlich (Menozzi *et al.*, 1990). Da *Bordetella*-Subspezies unterschiedlich an Zellen verschiedener Wirte binden, geht man davon aus, dass die Wirtsspezifität z.T. auch von der Interaktion der bakteriellen Adhäsine mit ihren Wirtsrezeptoren abhängt (Inatsuka *et al.*, 2005; Tuomanen *et al.*, 1983). Dem FHA wird zudem eine Funktion als Brückenadhäsion zugesprochen, da es die Anlagerung von anderen Mikroorganismen erleichtert und somit schwere Sekundärinfektionen ausgelöst werden können (Tuomanen, 1986).

Zwei weitere Gene, welche für FHA-ähnliche Proteine kodieren, *phaS* und *phaL*, wurden kürzlich in *B. pertussis* identifiziert und orthologe Gene dazu finden sich auch in *B. bronchiseptica* und *B. parapertussis* (Parkhill *et al.*, 2003).

Einen weiteren wichtigen Adhäsionsfaktor der Bordetellen stellen die **Fimbrien** (FIM) dar. Dabei handelt es sich um lange filamentöse Zellanhänge, die eine Reihe von Bindeeigenschaften vermitteln. *B. pertussis* produziert zwei unterschiedliche Fimbrientypen, Serotyp 2 und Serotyp 3. Die entsprechenden Hauptstrukturproteine werden von den Genen *fim2* bzw. *fim3* kodiert. Zusätzlich zu den Hauptstrukturproteinen besitzen die Fimbrien das Adhäsion FimD (Locht *et al.*, 1992; Willems *et al.*, 1992). Zwei weitere Gene, die für Hauptstrukturproteine kodieren sind *fimA* und *fimX*, wobei *fimA*, welches als einziges der vier Hauptstrukturgene direkt stromaufwärts vom *fim*-Operon liegt, wahrscheinlich das ursprüngliche Hauptstrukturgen darstellt und die anderen daraus durch Genduplikation entstanden sind. *fimA* und *fimX* werden nicht, oder nur in geringem Maße exprimiert. Im *fim*-Operon sind zudem die Gene *fimB* und *fimC*, welche für ein Chaperonprotein bzw. ein Usherprotein kodieren, sowie *fimD* lokalisiert (Locht *et al.*, 1992; Willems *et al.*, 1992). Die akzessorischen Proteine FimB und FimC sind beide für die Fimbrienbiogenese notwendig. Das *fimABCD*-Cluster ist zudem im selben Operon wie das *phaC*-Gen lokalisiert und wird mit diesem gemeinsam als polycistronische mRNA transkribiert, was auf enge Koordination der Biogenese der beiden Adhäsionsfaktoren FIM und FHA hinweist (Willems *et al.*, 1994). Wie die FHA-Expression, wird auch die Fimbrienexpression vom BvgAS-System reguliert (Smith *et al.*, 2001; Willems *et al.*, 1990).

Über die Hauptstrukturproteine können Heparin und andere Zuckersulfate, die im Atmungstrakt von Säugern ubiquitär vorhanden sind, gebunden werden (Geuijen *et al.*, 1996). Zudem kann FimD an das VLA-5-Integrin von Makrophagen binden, was wiederum die Bildung des spezifischen Makrophagenrezeptors (CR3) für die FHA Adhäsion stimuliert (Hazenbos *et al.*, 1995).

Weitere Bordetellenfaktoren, die eine mögliche Rolle bei der Anheftung spielen könnten, gehören zur Gruppe der Autotransporter. Diese Proteine werden, wie auch FHA, als Vorläuferproteine gebildet, benötigen für ihren Transport aber keine zusätzlichen akzessorischen Proteine. Eine N-terminale Signalsequenz vermittelt einen Sec-abhängigen Transport durch die Cytoplasmamembran und wird im Periplasma abgespalten. Die C-terminale Sequenz bildet dann eine Pore in der äußeren Membran durch die der N-Terminus auf die Zelloberfläche gelangt, wo er entweder assoziiert bleibt oder proteolytisch abgetrennt wird (Henderson & Nataro, 2001).

Das erste als Autotransporter beschriebene Protein in Bordetellen ist das 60 kDa große **Pertactin** (PRN), welches oberflächenassoziiert vorliegt und ein RGD-Motiv zur Bindung an

Makrophagenrezeptoren aufweist (Leininger *et al.*, 1991). Für die Immunantwort scheint PRN besonders wichtig zu sein, da PRN-spezifische Antikörper einen hohen Impfschutz vermitteln (Cherry *et al.*, 1998; Storsaeter *et al.*, 1998).

Weitere oberflächenassoziierte Autotransporterproteine sind der **Serumresistenzfaktor** BrkA (Fernandez & Weiss, 1994) und **Vag8** (Finn & Amsbaugh, 1998). Auch dem **trachealen Kolonisierungsfaktor** (TCF) (Finn & Stevens, 1995), der nur von *B. pertussis* exprimiert wird und nicht oberflächenassoziiert vorliegt, wird eine Rolle bei der erfolgreichen Kolonisierung des Atmungstraktes zugesprochen. Alle diese Faktoren enthalten mindestens ein RGD-Motiv und werden durch das BvgAS-System aktiviert.

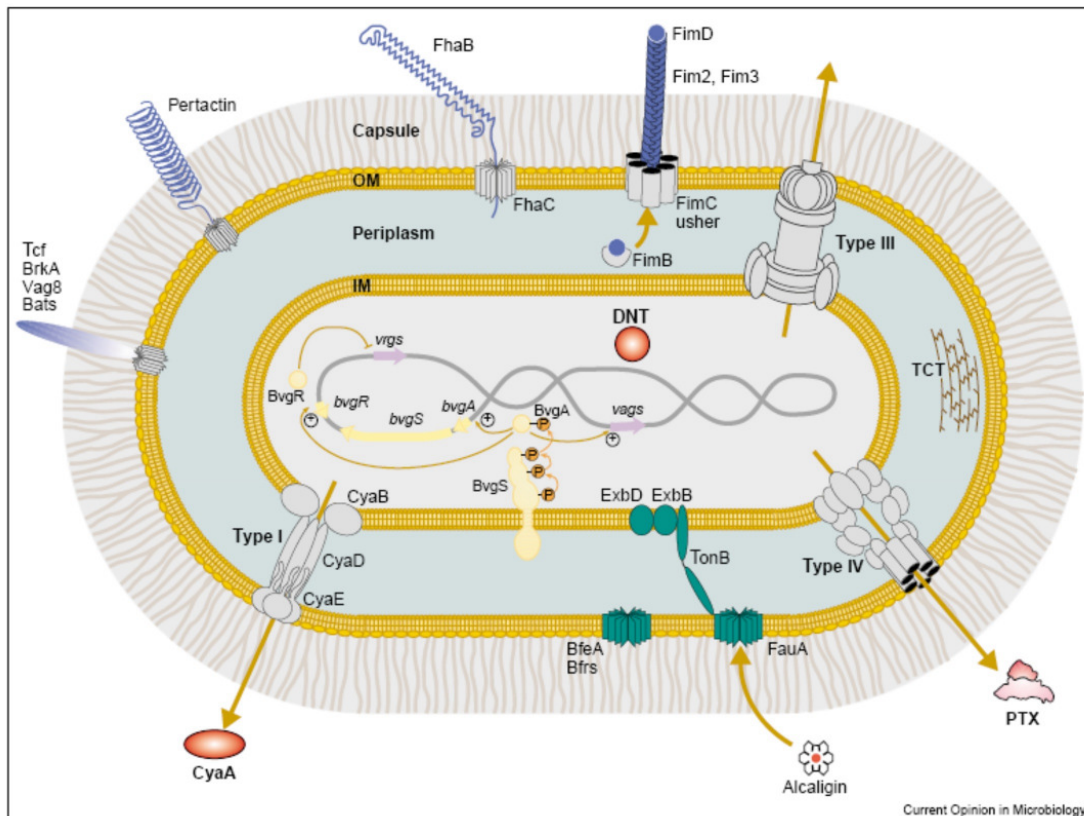


Abbildung 2-2 Übersicht und Lokalisation der Virulenzfaktoren von *B. pertussis* (Locht *et al.*, 2001)

2.2.2.2 Toxine

Nach erfolgreicher Adhäsion an die Wirtszellen produzieren die Vertreter des *B. bronchiseptica*-Clusters eine Reihe von Zellgiften, welche die Zerstörung des Gewebes verursachen. Ihre Funktion liegt sowohl in der Schwächung des Abwehrsystems des Wirtes als auch in der Freisetzung von limitierenden Nährstoffen, wie z.B. Eisen.

Der bekannteste Virulenzfaktor des Keuchhustenerregers ist das **Pertussistoxin** (PTX). Dieses Toxin wird nur von *B. pertussis* exprimiert, obwohl entsprechende PTX-Operone auch in *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* vorkommen, wo sie aber aufgrund von Mutationen im Promotorbereich nicht exprimiert werden (Arico & Rappuoli, 1987). Vermutlich ist dieses Toxin für die charakteristischen Begleiterscheinungen der Krankheit, wie erhöhte Insulinproduktion, Lymphozytose und Histaminsensibilisierung verantwortlich (Pittman,

1984). PTX gehört zur Gruppe der AB-Toxine. Der enzymatisch aktive Promotor A des Toxins besteht aus der S1 Untereinheit, die für die Bindung an die Zelloberfläche zuständige B Untereinheit setzt sich aus den Komponenten S2, S3, S4 und S5 im Verhältnis 1:1:2:1 zusammen (Tamura *et al.*, 1982). Die Gene, welche für die PTX Untereinheiten kodieren, sind im *ptx/ptl*-Gencluster zusammengefasst, wobei die *ptl*-Gene für den Transport von PTX durch die äußere Membran, d.h. für ein Typ-IV-Sekretionssystem kodieren (Locht & Keith, 1986; Weiss *et al.*, 1993). Die Untereinheiten von PTX werden einzeln translatiert und Sec-abhängig ins Periplasma geschleust, wo sie sich dann zum Holoenzym zusammenfügen, welches anschließend sekretiert wird (Farizo *et al.*, 2000; Loch & Keith, 1986). Die B Untereinheit vermittelt durch Bindung an die Zelloberfläche die Translokation des Promotors A in die Wirtszelle, wo dieser seine ADP-Ribosyltransferaseaktivität entfaltet (Tamura *et al.*, 1982). Unter NAD-Verbrauch wird dabei die ADP-Ribosylierung von wirtseigenen G-Proteinen katalysiert. Durch die damit verbundene Inaktivierung der G-Proteine kommt es zu einer unkontrollierten Aktivierung der Adenylatcyclase und damit zur Überproduktion des Botenstoffs cAMP, wodurch wiederum wichtige Stoffwechselkaskaden gestört werden (Katada *et al.*, 1986; Loch & Antoine, 1995). PTX trägt zusätzlich als Adhäsionsfaktor zur Anlagerung der Bakterien an Makrophagen und an das Zilienepithel bei (Tuomanen & Weiss, 1985; van't Wout *et al.*, 1992). Als eines der wichtigsten Antigene ist es Bestandteil aller azellulären *Pertussis*-Impfstoffe (Pizza *et al.*, 1989; Poolman & Hallander, 2007).

Ein weiteres wichtiges Toxin ist das bifunktionale **Adenylatzyklase Toxin (CYA)**, welches von allen Vertretern des *B. bronchiseptica*-Clusters gebildet wird. Dieses Protein weist neben seiner Calmodulin-abhängigen Adenylatzyklaseaktivität auch eine hämolytische Aktivität auf. Hämolyse wird durch den C-terminalen Teil des Proteins vermittelt, wohingegen im N-terminalen Teil des Proteins die katalytische und die Calmodulin-Bindedomäne lokalisiert sind (Glaser *et al.*, 1988). Durch Anheftung einer Fettsäure wird CYA nach seiner Synthese chemisch modifiziert und über ein Typ-I-Sekretionssystem, welches aus akzessorischen Proteinen zusammengesetzt ist, sekretiert (Hackett *et al.*, 1994). Mittels der Fettsäure und hydrophober Segmente kann sich CYA in die Membran der Wirtszelle einlagern. Die Bindung von Kalziumionen führt zur Aufnahme der enzymatischen Domäne in die Zelle, welche dort durch Calmodulin aktiviert wird. Durch die Adenylatzyklaseaktivität werden wiederum große Mengen an cAMP gebildet (siehe PTX) (Ladant & Ullmann, 1999). Es wurde gezeigt, dass CYA sowohl die Apoptose in Makrophagen auslösen kann als auch die Phagozytose von *B. pertussis* durch Neutrophile inhibiert und damit wahrscheinlich zur Schwächung der zellvermittelten Immunabwehr des Wirtes beiträgt (Gueirard *et al.*, 1998; Khelef *et al.*, 1992; Weingart & Weiss, 2000).

Ein drittes Proteintoxin, das **Dermonekrotische Toxin (DNT)**, ist einer der ersten Virulenzfaktoren, der für *B. pertussis* beschrieben wurde (Bordet & Gengou, 1909). Im Gegensatz zu den anderen Toxinen wird es nicht sekretiert, sondern wurde bislang nur im Cytosol der Bordetellen nachgewiesen (Cowell *et al.*, 1979). Strukturell ist es ein typisches AB-Toxin mit einer N-terminalen Bindedomäne und einer C-terminalen enzymatischen Domäne, welches hitzeinstabil ist und bereits bei 56°C inaktiv wird (Mattoo & Cherry, 2005; Zhang & Sekura, 1991). Seine Bedeutung für die Pathogenese ist noch unklar, die Injektion von DNT in Mäuse verursacht jedoch Hautläsionen und verläuft bei höherer Dosis tödlich (Livey & Wardlaw, 1984). *In vitro* Studien mit gereinigtem DNT haben gezeigt, dass das

Toxin Deaminierungen bzw. Polyaminierungen am Gln63 der kleinen GTPase Rho bewirkt (Masuda *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 1999). Die GTPase wird dadurch konstitutiv aktiviert, was wiederum die Signaltransduktion stört und zu extremen Veränderungen in der Morphologie und Differenzierung der Wirtszelle führt. Transposon-Mutanten von *B. pertussis*, die kein DNT bilden, sind im Mausmodell aber nicht weniger virulent als der Wildtypstamm (Weiss & Goodwin, 1989).

Das **Tracheale Cytotoxin** (TCT) ist ein Disaccharid-Tetrapeptid, das von allen gramnegativen Bakterien durch Ab- und Umbau der Zellwand während des Wachstums gebildet wird, mit dem Unterschied, dass es bei Bordetellen nicht wiederverwertet, sondern aufgrund eines Gendefekts in die Umgebung abgegeben wird (Cookson *et al.*, 1989a; Cookson *et al.*, 1989b). TCT wird daher konstitutiv gebildet und nicht, wie die oben beschriebenen Proteintoxine, durch das BvgAS-System kontrolliert. Synergistisch mit dem bakteriellen Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert TCT die Interleukin (IL)-1 α Produktion. TCT und IL-1 α wiederum bewirken zusammen eine vermehrte Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) in zilienträgenden Zellen des Atmungstraktes (Flak & Goldman, 1999; Heiss *et al.*, 1993a; Heiss *et al.*, 1993b). Diese erhöhten Konzentrationen von NO führen zur Zerstörung der Epithelzellen. Dies ist auch der Grund für die krampfartigen Hustenanfälle, da der Schleim nicht mehr durch das Zilienepithel entfernt werden kann (Luker *et al.*, 1995).

2.2.2.3 Weitere Faktoren

Neben den klassischen Adhäsinen und Toxinen verfügen einige *Bordetella*-Arten über weitere Faktoren, die zur Virulenz beitragen können. Dazu können zum Beispiel **Typ-III-Sekretionssysteme** (TTSS) gehören, die es gramnegativen Pathogenen ermöglichen, Effektorproteine direkt ins Zytoplasma der Wirtszelle zu transferieren. Dies geschieht mit Hilfe eines Proteinkomplexes, der die beiden bakteriellen Membranen durchspannt und eine Verbindung mit der Membran der Zielzelle aufbaut (Cheng & Schneewind, 2000). In Bordetellen werden die beschriebenen Typ-III-Sekretionssysteme, wie die meisten Virulenzfaktoren, durch das BvgAS-System aktiviert (Cummings *et al.*, 2006). In *B. pertussis* scheint allerdings eine posttranskriptionelle Hemmung stattzufinden, so dass bisher nur das *B. bronchiseptica* Typ-III-Sekretionssystem als funktional charakterisiert ist (Mattoo *et al.*, 2004). Solche Veränderungen der Transkription in *B. pertussis* sind vermutlich auf Laborstämme beschränkt, da in klinischen Stämmen, welche noch nicht lange im Labor kultiviert wurden, die Sekretion eines TTSS-Effektors nachgewiesen werden konnte (Fennelly *et al.*, 2008). Die genaue Funktion der Effektorproteine ist noch nicht bekannt, aber sie scheinen dazu beizutragen, der induzierten Immunantwort des Wirtes zu entgehen. So können z.B. Typ-III-Deletionsmutanten von *B. bronchiseptica* den Atmungstrakt von Mäusen nicht mehr langfristig kolonisieren (Yuk *et al.*, 2000). Es wurde auch gezeigt, dass die Typ-III-Sekretion in *B. bronchiseptica* den Transkriptionsfaktor NF- κ B aggregiert und inaktiviert und entweder durch die veränderte Genexpression oder direkt Apoptose in Makrophagen auslösen kann (Yuk *et al.*, 2000).

Eine wichtige Rolle für die Virulenz spielen auch **Eisenaufnahmesysteme**, die es pathogenen Bakterien erlauben, sich unter den eisenarmen Bedingungen im Wirt zu etablieren. Bordetellen besitzen ein TonB-abhängiges Eisenaufnahmesystem (Pradel *et al.*, 2000) und verschiedene Membranrezeptoren, wie z.B. den Alcaliginrezeptor FauA (Brickman &

Armstrong, 1999), der die Aufnahme von eisenhaltigem Alcaligin ermöglicht. Dieser Siderophor wird von den Bordetellen selbst gebildet (Pradel *et al.*, 1998), aber das Vorhandensein des Enterobactinrezeptors BfeA (Beall & Sanden, 1995) ermöglicht ihnen auch die Aufnahme von Siderophoren anderer Bakterien. Ein weiterer Membranrezeptor (BhuR) ermöglicht die Aufnahme von Hämoglobin bzw. Hämin (Mocny *et al.*, 2007; Vanderpool & Armstrong, 2001).

Kapseln können in pathogenen Bakterien eine wichtige Rolle spielen, um der Wirtsabwehr zu entgehen (Moxon & Kroll, 1990). Interessanterweise besitzt nur *B. bronchiseptica* einen intakten Genlokus, der für die Biosynthese kapsulärer Polysaccharide kodiert, nicht aber *B. pertussis* und *B. parapertussis*. Dies deutet darauf hin, dass eine putative Kapsel in diesem Fall zum Überleben von *B. bronchiseptica* in der Umwelt beitragen könnte (Preston *et al.*, 2004). Vergleichbar hierzu ist die **Flagellen**expression in *B. bronchiseptica*. Diese wird negativ durch das BvgAS-Zweikomponentensystem reguliert, so dass das Bakterium nur unter modulierenden Bedingungen oder z.B. in der Umwelt motil ist (Parkhill *et al.*, 2003).

2.3 Die „neuen“ *Bordetella*-Arten

Unter den „neuen“ *Bordetella*-Arten versteht man die seit 1980 klassifizierten Spezies *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. trematum*, *B. petrii* und *B. ansorpii*. Über Virulenzfaktoren und deren Regulation ist bei diesen Arten noch wenig bekannt, obwohl sie z.T. human- oder tierpathogenes Potential besitzen. So treten sie mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert in verschiedenen Wirtsorganismen auf. Aus dem Respirationstrakt des Menschen konnte bisher nur *B. holmesii* isoliert werden (Tang *et al.*, 1998). *B. petrii* ist der einzige Stamm dieser Gattung, für den bisher Umweltisolate beschrieben wurden (von Wintzingerode *et al.*, 2001). Physiologische Merkmale der „neuen“ *Bordetella*-Arten sind in Tabelle 2-2 zusammengefasst.

B. avium wurde als erste der „neuen“ *Bordetella*-Arten im Jahr 1984 beschrieben, aber zuvor schon als *B. bronchiseptica*-ähnlicher Keim mit respiratorischen Erkrankungen in Vögeln in Verbindung gebracht (Hinz *et al.*, 1978; Kersters *et al.*, 1984). Der Erreger infiziert viele Wildvögel und domestizierte Vogelarten (Raffel *et al.*, 2002), und kommerziell gezüchtete Truthähne sind besonders anfällig (Skeeles & Arp, 1997). Die durch *B. avium* verursachte Bordetellosis und die dadurch begünstigten Sekundärinfektionen durch andere Erreger führen jährlich zu großen Verlusten in der Geflügelindustrie. Das Krankheitsbild einer *B. avium* Bordetellosis oder Koryza ähnelt den durch die „klassischen“ *Bordetella*-Arten verursachten Infektionen bei Säugetieren, dabei kommt es zu Husten und okulonasalem Ausfluss (Skeeles & Arp, 1997). Bei der Infektion bindet *B. avium* bevorzugt an die zilienträgenden Epithelzellen des oberen respiratorischen Traktes, die dadurch zerstört werden (Arp & Cheville, 1984). Es wurden verschiedene Virulenzfaktoren, die man bereits aus dem *B. bronchiseptica*-Cluster kennt, auch für *B. avium* beschrieben. Dazu gehören FHA, Fimbrien, DNT und TCT sowie ein zu BvgAS orthologes Zweikomponentensystem (Gentry-Weeks *et al.*, 1988; Spears *et al.*, 2003). Weitere Faktoren, die mit der *B. avium* Virulenz assoziiert sind, unterscheiden sich signifikant von denen anderer medizinisch relevanter Bordetellen, was als eine Anpassung an Vögel als spezifische Wirte, welche sich von

Säugetieren stark unterscheiden, gesehen werden kann (Sebaihia *et al.*, 2006; Weiss, 1992). Ähnlich wie *B. bronchiseptica* kann auch *B. avium* für längere Zeit in Wasser überleben, was für seine Verbreitung in der Umwelt wichtig erscheint, da unter den wildlebenden Vogelarten besonders solche betroffen sind, die an Gewässern leben, wie z.B. Enten, Gänse und Reiher (Raffel *et al.*, 2002; Skeeles & Arp, 1997).

	<i>B. avium</i>	<i>B. hinzii</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>B. trematum</i>	<i>B. petrii</i>	<i>B. ansorpii</i>
Wirt/Lebensraum	Vögel	Geflügel, Mensch	Mensch	Mensch?	Umwelt, Mensch?, Pflanzen?	Mensch?
Erkrankung	Koryza des Truthahns	sepsisartig, asymptomat.	resp. Erkrankung- en, Sepsis	n.n.	n.n.	n.n.
Isolationsort	resp. Trakt von Vögeln	resp. Trakt von Vögeln, Blut, Sputum	resp. Trakt, Blut	Wunden, Ohrinfektionen	Fluss- sediment, Boden, Tiefseeschwamm, Entzündungen	epiderm. Zyste, Blut
<u>Physiologische Merkmale:</u>						
Wachstum auf Blutagar („chocolate agar“)	+	+	+	+	+	+
Wachstum auf McConkey-Agar	+	+	+	+	+	+
Oxidaseaktivität	+	+	-	-	+	-
Ureaseaktivität	-	+	-	-	-	-
Beweglichkeit	+	+	-	+	-/+	+
Nitratreduktion	-	-	-	+	+	-

Tabelle 2-2 Merkmale der „neuen“ *Bordetella*-Arten (modifiziert nach (Gerlach *et al.*, 2001; Ko *et al.*, 2005)). n.n : nicht nachgewiesen

Eine mit *B. avium* nahe verwandte Spezies wurde 1995 beschrieben und als *B. hinzii* bezeichnet. Das Bakterium wurde als harmloser Kommensal aus dem Respirationstrakt von Vögeln isoliert (Vandamme *et al.*, 1995). Vereinzelt Isolate aus geschwächten oder immunsupprimierten Menschen weisen auf ein opportunistisches Pathogen hin. Der Keim wurde beispielsweise im Sputum eines an Zystischer Fibrose erkrankten Patienten nachgewiesen (Funke *et al.*, 1996), sowie aus Blut eines AIDS-Patienten isoliert, wo er für Bakteriämie verantwortlich gemacht wurde (Cookson *et al.*, 1994). Des Weiteren wurde der Keim im Zuge einer tödlich verlaufenden Sepsis isoliert (Kattar *et al.*, 2000) und aus dem

Blut eines Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (Fry *et al.*, 2007). *B. hinzii* kann damit als potentiell humanpathogen eingestuft werden.

Ebenfalls 1995 wurde *B. holmesii* als humanpathogener Vertreter der Gattung *Bordetella* beschrieben (Weyant *et al.*, 1995), der zunächst meist aus dem Blut von immunsupprimierten Sepsispatienten isoliert wurde (Lindquist *et al.*, 1995; Morris & Myers, 1998; Shepard *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 1998). Später wurde *B. holmesii* dann auch dem Sputum und dem Nasen-Rachenraum von immunkompetenten Personen isoliert, die an *Pertussis*-ähnlichen Symptomen litten (Tang *et al.*, 1998; Yih *et al.*, 1999). In einem Fall wurde das Bakterium auch für eine schwere Lungeninfektion verantwortlich gemacht (Russell *et al.*, 2001). Die späte Isolierung von *B. holmesii* aus dem Rachenraum könnte damit zusammenhängen, dass zuvor das Antibiotikum Cephalexin im Selektionsmedium für Bordetellen standardmäßig verwendet wurde, welches aber das Wachstum von *B. holmesii* inhibiert. Erst die Verwendung von Methicillin im Selektionsmedium machte es möglich, *B. holmesii* zu identifizieren (Mazengia *et al.*, 2000). Die Entwicklung von *B. holmesii* zum humanpathogenen Keim hat in der nahen Vergangenheit stattgefunden und es gibt Hinweise darauf, dass der Erwerb von DNA aus *B. pertussis* über horizontalen Gentransfer dabei eine Rolle spielte (Diavatopoulos *et al.*, 2006). Die genaue phylogenetische Zuordnung von *B. holmesii* innerhalb der Gattung *Bordetella* ist noch unklar. Anhand von 16S rDNA-Vergleichen wird *B. holmesii* als nahe verwandt zu *B. pertussis* eingeordnet, der Vergleich von Haushaltsgenen hingegen zeigt ihn als näheren Verwandten von *B. hinzii* und *B. avium* (Diavatopoulos *et al.*, 2006).

Das 1996 beschriebene Bakterium *B. trematum* wurde beim Menschen bislang nur aus Wundinfektionen bzw. entzündlichen Erkrankungen des Gehörgangs isoliert, nicht aber aus dem Respirationstrakt. Über das pathogene Potential des Bakteriums ist nichts weiter bekannt, da es unklar ist, ob es sich bei den gefundenen Isolaten um Sekundärinfektionen handelt oder ob *B. trematum* ursächlich an den Erkrankungen beteiligt ist (Vandamme *et al.*, 1996).

Ein weiterer Vertreter der Gattung *Bordetella*, für den der Name *B. ansorpii* vorgeschlagen wurde, ist 2005 identifiziert worden. Das Bakterium wurde aus der eitrigen Flüssigkeit einer epidermalen Zyste isoliert und konnte über 16S rDNA-Vergleiche der Gattung *Bordetella* zugeordnet werden. Eine phylogenetische Analyse, basierend auf den 16S rDNA-Sequenzen der bekannten *Bordetella*-Arten, zeigte die größte Übereinstimmung mit *B. petrii* (98,3 %). Das Isolat kann aufgrund verschiedener physiologischer Eigenschaften sowie der Zusammensetzung der zellulären Fettsäuren aber deutlich von den anderen *Bordetella*-Arten abgegrenzt werden (Ko *et al.*, 2005). Zwar wurde kürzlich ein zweites humanes *B. ansorpii*-Isolat aus einem Patienten mit Knochenmarkleukämie beschrieben, über ein mögliches pathogenes Potential dieses Bakteriums ist bisher jedoch nichts bekannt (Fry *et al.*, 2007).

2.3.1 *B. petrii*

B. petrii DSM 12804 wurde aus einer anaeroben, dechlorinierenden Anreicherungskultur aus Flusssediment isoliert und 2001 als erstes Umweltisolat der Gattung *Bordetella* beschrieben (von Wintzingerode *et al.*, 2001). Entsprechend der Genusdefinition weist *B. petrii* die

Fähigkeit zur Citrat-Assimilation auf, ist Katalase positiv und wächst bei 37°C unter aeroben und mikroaeroben Bedingungen sowie bei 30°C unter aeroben Bedingungen (siehe auch 2.1). Von den anderen *Bordetellen* unterscheidet sich *B. petrii* jedoch deutlich durch seine Fähigkeit zu anaerobem Wachstum, wobei Nitrat reduziert bzw. Selenat zu elementarem Selen reduziert und präzipitiert wird.

Anhand vergleichender 16S rDNA-Sequenzanalysen wurde die enge Verwandtschaft des Keims zu den Gattungen *Bordetella* sowie *Achromobacter* und *Alcaligenes*, die ebenfalls Umweltisolate beinhalten, aufgezeigt. Dabei bildet *B. petrii* einen eigenständigen Zweig zu dem die anderen *Bordetella*-Arten die nächsten Nachbarn darstellen (von Wintzingerode *et al.*, 2001). Die Genomnotation bestätigt diese Einordnung an der Basis der Gattung *Bordetella*, denn *B. petrii* weist sowohl Eigenschaften von Umweltkeimen auf, kodiert aber auch für Faktoren, die Ähnlichkeiten zu den Virulenzfaktoren der pathogenen *Bordetellen* haben (siehe 2.3.2), und stellt somit eine Art Bindeglied dar (Gross *et al.*, 2008).

Mit etwa 5,29 Mbp besitzt *B. petrii* ein ähnlich großes Genom wie *B. bronchiseptica* (~ 5,34 Mbp), das zudem durch eine große Zahl an mobilen genetischen Elementen gekennzeichnet ist. So besitzt *B. petrii* z.B. acht genomische Inseln, die sich deutlich durch ihren niedrigen GC-Gehalt auszeichnen, sowie 105 IS-Elemente, die eine Rolle für Umstrukturierungen und Deletionen im Genom spielen (Gross *et al.*, 2008; Siguier *et al.*, 2006). *In silico* Analysen weisen zudem auf vielseitige metabolische Fähigkeiten hin, wie z.B. den Abbau von aromatischen Verbindungen wie Chlorbenzoat, Phenol oder Phthalat (Gross *et al.*, 2008).

In den letzten Jahren wurden zunehmend weitere *B. petrii*-Isolate aus den unterschiedlichsten Habitaten beschrieben. Eine phylogenetische Analyse anhand der 16S rDNA-Sequenzen der neu beschriebenen *B. petrii*-Isolate wurde in dieser Arbeit durchgeführt und deutet auf ein mögliches *B. petrii*-Cluster hin (siehe Kapitel 5.6.2).

B. petrii Stämme wurden wiederholt aus Umweltproben isoliert, z.B. aus mikrobiellen Konsortien, welche aromatische Verbindungen wie Naphthalin oder 1,2,4-Trichlorbenzol abbauen können (Bianchi *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007). Bakterien, die das Potential zum Abbau sogenannter Xenobiotika aufweisen, könnten in Zukunft eine wichtige Rolle bei der biologischen Sanierung verschmutzter Böden oder Gewässer spielen (Huang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Weiss & Cozzarelli, 2008).

Interessanterweise wurden auch klinische Isolate von *B. petrii* beschrieben. So wurde das Bakterium z.B. aus einer Biopsieprobe eines Patienten mit mandibularer Osteomyelitis, einer Knochenhautentzündung im Kiefer (Fry *et al.*, 2005), sowie aus dem eitrigen Sekret einer chronischen Mastoiditis, einer Knochenentzündung im Mittelohr, isoliert (Stark *et al.*, 2007). Die beiden klinischen Isolate sind hinsichtlich ihrer 16S rDNA-Sequenz sowie der *risA*- und *ompA*-Sequenzen zu 100 % identisch. Das zweite Isolat unterscheidet sich aber dadurch, dass es nicht unter anaeroben Bedingungen wächst und dass es beweglich ist. (Stark *et al.*, 2007). Die jeweiligen Infektionsquellen und die Rolle von *B. petrii* bei der Infektion sind aber noch unklar.

Vier weitere Isolate wurden bei der Untersuchung von Tiefseeschwämmen unterschiedlicher Regionen gewonnen (Sfanos *et al.*, 2005). Es ist zwar nicht bekannt welche Rolle die Bakterien dort spielen, doch sie sind über einen längeren Zeitraum im Schwamm persistent (persönliche Mitteilung Ute Hentschel).

Im Zusammenhang einer Analyse der wurzelassoziierten Bakterien des Wüstengrases *Lasiurus syndicus* wurde, neben einer Vielzahl grampositiver und -negativer Bakterien, *B. petrii* zum ersten Mal in Verbindung mit Pflanzen beschrieben (Chowdhury *et al.*, 2007).

2.3.2 Virulenzfaktoren der „neuen“ *Bordetella*-Arten

Virulenzfaktor	Funktion	Expression in den einzelnen Bakterienstämmen								
		<i>B.p.</i>	<i>B.b.</i>	<i>B.pp.</i>	<i>B.a.</i>	<i>B.h.</i>	<i>B.hi.</i>	<i>B.tr.</i>	<i>B.pet.</i>	<i>B.an.</i>
BvgAS	Zwei-komponenten-system	+	+	+	+	+	+	(+)	+	?
FHA	Adhäsion	+	+	+	+	+	?	?	(+)	?
Fimbrien	Adhäsion, Kolonisierung	+	+	+	(+)	?	?	?	+*	?
PRN	Adhäsion, Kolonisierung	+	+	+	-	?		?	-	?
BrkA/Brk B	Serumresistenz, Adhäsion	+/+*	-/+*	-/+*	-/(+)	?	?	?	-/(+)	?
TCF	Kolonisierung, Adhäsion	+	-	-	-	?	?	?	-	?
PTX	G-Protein Inaktivierung, Steigerung des cAMP-Spiegels	+	-	-	-	?	?	?	-	?
CYA	Hämolyse, Steigerung des cAMP-Spiegels	+	+	+	-	?	?	?	-	?
DNT	Aktivierung kleiner GTPasen	+	+	+	+*	?	?	?	-	?
TCT	Toxin	+*	+*	+*	+*	?	?	?	+*	?
Typ-III-Sekretions-system	Langfristige Kolonisierung	-	+	-	-	?	?	?	-	?

- B.p.* *B. pertussis*
B.b. *B. bronchiseptica*
B.pp. *B. parapertussis*
B.a. *B. avium*
B.h. *B. holmesii*
B.hi. *B. hinzii*
B.tr. *B. trematum*
B.pet. *B. petrii*
B.an. *B. ansorpii*
+ wird exprimiert
(+) Gene vorhanden, Nachweis der Expression oder der BvgAS-Regulation steht noch aus
- Gene nicht vorhanden oder *in vitro* nicht exprimiert
? nicht bekannt, ob Gene vorhanden sind
* nicht BvgAS-reguliert

Tabelle 2-3 Virulenzfaktoren der „klassischen“ und „neuen“ *Bordetella*-Arten (modifiziert nach Cummings *et al.*, 2006; Horvat, 2007; Sebahia *et al.*, 2006))

Die Virulenzeigenschaften der „neuen“ *Bordetella*-Arten sind im Gegensatz zu den Arten des *B. bronchiseptica*-Clusters nur wenig untersucht. Die meisten Vertreter der „neuen“

Bordetella-Arten sind potentiell tier- oder humanpathogen, aber nur wenige der aus dem *B. bronchiseptica*-Cluster bekannten Virulenzfaktoren konnten bisher nachgewiesen werden (Tabelle 2-3).

Die ersten virulenzassoziierten Faktoren, die für *B. avium* beschrieben wurden, waren die Toxine DNT und TCT (Gentry-Weeks *et al.*, 1988). Außerdem wurde schon früh eine Kapselbildung beobachtet (Kerstens *et al.*, 1984). Des Weiteren wurde gezeigt, dass dieses Bakterium orthologe Gene zu *bvgA*, *bvgS*, *fhaB*, *fhaC* und *fimC* besitzt und die Inaktivierung dieser Gene zu einem Verlust der Virulenzeigenschaften im Tiermodell führt (Spears *et al.*, 2003). Die Genomannotation trug schließlich einen wesentlichen Teil zur Identifizierung von weiteren Virulenzfaktor-kodierenden Genen bei. Es wurden zusätzlich *fhaL* und *fhaS* orthologe Gene identifiziert sowie sechs neue Gene, welche für FHA-ähnliche Proteine kodieren. Ferner konnte gezeigt werden, dass *fhaB* und *fhaC* genauso wie in *B. bronchiseptica* angeordnet sind mit *fhaC* als fünftem Gen im *fimABCD*-Operon (Sebahia *et al.*, 2006). In *B. avium* wurden zwei Fimbrienloci beschrieben, welche jeweils für das Chaperon-Usher-Biosynthesesystem, das Adhäsion FimD und ein bzw. zwei Strukturproteine kodieren. Insgesamt besitzt *B. avium* 11 Gene, die für Hauptstrukturproteine kodieren, aber nur *fimA* ist ortholog zu dem im *B. bronchiseptica*-Cluster identifizierten Gen der Fimbrienuntereinheit FimA. Allerdings ist noch nicht ganz klar welche der Fimbriengene unter welchen Bedingungen exprimiert werden (Sebahia *et al.*, 2006). *B. avium* besitzt außerdem 7 intakte Gene, die für Autotransporter kodieren und ein komplettes und intaktes Set an Motilitäts- und Chemotaxis-Genen. Die Flagellenbildung wird bei 40°C, der Körpertemperatur von Truthähnen, komplett abgeschaltet, weshalb für die Motilität eine Rolle bei der Verbreitung in der Umwelt vermutet wird (Temple *et al.*, 1998). Die *bvgAS* Gene sind im Gegensatz zum *B. bronchiseptica*-Cluster nicht mit dem *fhaB-fimABCD-fhaC*-Cluster assoziiert und ein Gen für den Repressor BvgR ist nicht vorhanden (Sebahia *et al.*, 2006).

Im Rahmen der Annotation des *B. petrii*-Genoms konnten auch in dieser *Bordetella*-Art Gene identifiziert werden, welche für FhaB- und FhaC-ähnliche Proteine kodieren (Gross *et al.*, 2008). Die genomische Organisation des Operons unterscheidet sich aber von der des *B. bronchiseptica*-Clusters und *B. avium*, da *fhaC* sich direkt stromaufwärts von *fhaB* befindet und nicht mit dem *fim*-Gencluster assoziiert ist. Insgesamt wurden drei Fimbrien-Gencluster in *B. petrii* identifiziert, welche jeweils für eine Hauptstrukturuntereinheit, das Chaperon-Usher-Biosynthesesystem und ein Adhäsion kodieren (Gross *et al.*, 2008). Die Expression und Regulation der jeweiligen Gencluster ist noch nicht vollständig untersucht und wird anderweitig diskutiert (Pohlert, In Vorbereitung). Des Weiteren wurde ein Gencluster identifiziert, welches für die Biosynthese kapsulärer Polysaccharide kodiert, sowie drei weitere Gencluster, die ebenfalls mit der Biosynthese von Polysacchariden in Verbindung gebracht werden. *B. petrii* besitzt zwar vier Autotransportergene, aber Gene, welche für die Toxine der „klassischen“ *Bordetella*-Arten kodieren, fehlen. Kleine Mengen an TCT werden jedoch freigesetzt (Gross *et al.*, 2008). *B. petrii* besitzt zwar ein komplettes Gencluster für die Flagellenbiosynthese, dieses wird aber durch eine IS-Element-Insertion inaktiviert, was erklärt, weshalb *B. petrii* als unbeweglich beschrieben wurde (Gross *et al.*, 2008; von Wintzingerode *et al.*, 2001). Interessanterweise wurde kürzlich ein klinisches Isolat von *B. petrii* nachgewiesen, welches im Gegensatz zu dem untersuchten Umweltisolat motil ist (s.o.) (Stark *et al.*, 2007).

Ein Äquivalent zum virulenzregulatorischen BvgAS-System der anderen *Bordetella*-Arten existiert ebenfalls, wobei dessen Struktur komplexer erscheint und in dieser Arbeit unter 5.3 näher erläutert wird.

Für *B. holmesii*, *B. trematum* und *B. hinzii* konnten bisher die Gene *bvgA* und *bvgS* des virulenzregulatorischen Zweikomponentensystems der Bordetellen identifiziert werden (Gerlach *et al.*, 2004), und für *B. holmesii* konnte zudem ein Gen für einen dem FhaB verwandten Faktor nachgewiesen werden (Link *et al.*, 2007).

2.4 Das BvgAS-Zweikomponentensystem

Zweikomponentensysteme (ZKS) sind weitverbreitete Signaltransduktionssysteme in Eubakterien, Archaeen und einigen Eukaryoten, die es ihnen erlauben, vielfältige Veränderungen in ihrem Lebensraum wahrzunehmen und auf diese entsprechend zu reagieren (Stock *et al.*, 2000). Das BvgAS (*Bordetella* virulence gene)-ZKS der Bordetellen kontrolliert die Expression von über 250 Genen, darunter auch die unter 2.2.2 beschriebenen Virulenzfaktoren mit Ausnahme des TCT (Cummings *et al.*, 2006).

2.4.1 Phasenvariation und phänotypische Modulation

Bereits 1931 beobachteten Leslie und Gardner, dass die Expression der Virulenzeigenschaften von *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* nicht stabil ist (Leslie & Gardner, 1931). Die Bildung von avirulenten Phänotypen kann durch zwei unterschiedliche Mechanismen erklärt werden, die beide mit dem BvgAS-System zusammenhängen.

Bei der sogenannten Phasenvariation verlieren die Bakterien *in vitro* mit einer je nach Stamm variierenden Frequenz von 10^{-3} bis 10^{-6} spontan ihre Fähigkeit zur Expression der Virulenzfaktoren wodurch ein avirulenter Phänotyp entsteht (Weiss & Falkow, 1984). Als Ursache für die Phasenvariation werden verschiedenartige Mutationen innerhalb des *bvgAS*-Lokus verantwortlich gemacht. Bei *B. bronchiseptica*-Isolaten konnten kleine Deletionen in der Größenordnung von 50-500 bp in der Nukleotidsequenz für die Histidinkinase *BvgS* beobachtet werden (Monack *et al.*, 1989). Des Weiteren wurden *B. pertussis* Phasenvarianten beschrieben, welche durch eine Verschiebung des Leserahmens von *bvgS* entstanden sind (Stibitz *et al.*, 1989). Die molekularen Mechanismen dieser Leserahmen-Verschiebung sind Erweiterungen und Reduktionen in einem homopolymeren Bereich in *bvgS* (Gogol *et al.*, 2007). Das Vorhandensein einer Reihe solcher homopolymeren Bereiche im *B. pertussis* Genom deutet darauf hin, dass die Phasenvariation eine größere Rolle bei der Bildung von phänotypischen Varianten spielt als bisher angenommen (Gogol *et al.*, 2007). Durch die entstehenden Subpopulationen könnten sich Selektionsvorteile gegenüber der Immunantwort des Wirtes ergeben (van der Woude, 2006).

Zusätzlich zur Phasenvariation kennt man die phänotypische Modulation, bei der es unter bestimmten Wachstumsbedingungen zu einem reversiblen Verlust der Virulenzgenexpression kommt (Lacey, 1960). Zu den modulierenden Bedingungen *in vitro* zählen die Anwesenheit von Sulfationen oder Nikotinsäure im Medium sowie die Kultivierung der Bakterien bei niedrigen Temperaturen (25°C) (Melton & Weiss, 1989; Prugnola *et al.*, 1995). Kürzlich

wurde gezeigt, dass möglicherweise auch die Osmolarität des Mediums eine Rolle für die Modulation spielt (Stenson & Pepler, 2007). Dabei kann man mindestens drei verschiedene Expressionsprofile unterscheiden, die durch die differenzielle Expression von vier unterschiedlichen, Bvg-abhängig regulierten Genklassen gekennzeichnet sind (Cotter & Jones, 2003) und unter Abschnitt 2.4.3 näher erläutert werden.

2.4.2 Signaltransduktion und Struktur des BvgAS-Systems

Das klassische ZKS besteht aus zwei Untereinheiten: einer in der Zellmembran lokalisierten Histidinkinase und einem cytoplasmatischen Response Regulator Protein. Die Histidinkinase besteht aus einer externen Sensordomäne und einer cytoplasmatischen Kinasedomäne an der als Antwort auf Umweltsignale die Übertragung des γ -Phosphorylrestes von ATP auf einen konservierten Histidinrest stattfindet. Diese Autophosphorylierung ist eine bimolekulare Reaktion zwischen zwei Homodimeren der Histidinkinase. Die anschließende Übertragung der Phosphatgruppe auf einen konservierten Aspartatrest der regulatorischen Domäne des Response Regulators führt zu Konformationsänderungen, welche die DNA-Bindung ermöglichen. Die Entfernung der Phosphatgruppe vom Phospho-Asp-Rest erfolgt über Hydrolyse, welche durch die Autophosphataseaktivität des Receivers des Response Regulators oder der Kinase vermittelt wird (Stock *et al.*, 2000).

Das BvgAS-ZKS der Bordetellen wird den unorthodoxen Zweikomponentensystemen zugeordnet. Im Gegensatz zu den klassischen ZKS ist dieses System strukturell komplexer aufgebaut und zeichnet sich durch einen vierstufigen His-Asp-His-Asp-Phosphotransfer aus (Perraud *et al.*, 1999; Uhl & Miller, 1994; Uhl & Miller, 1996a). In Abbildung 2-3 ist der schematische Aufbau des BvgAS-Systems dargestellt.

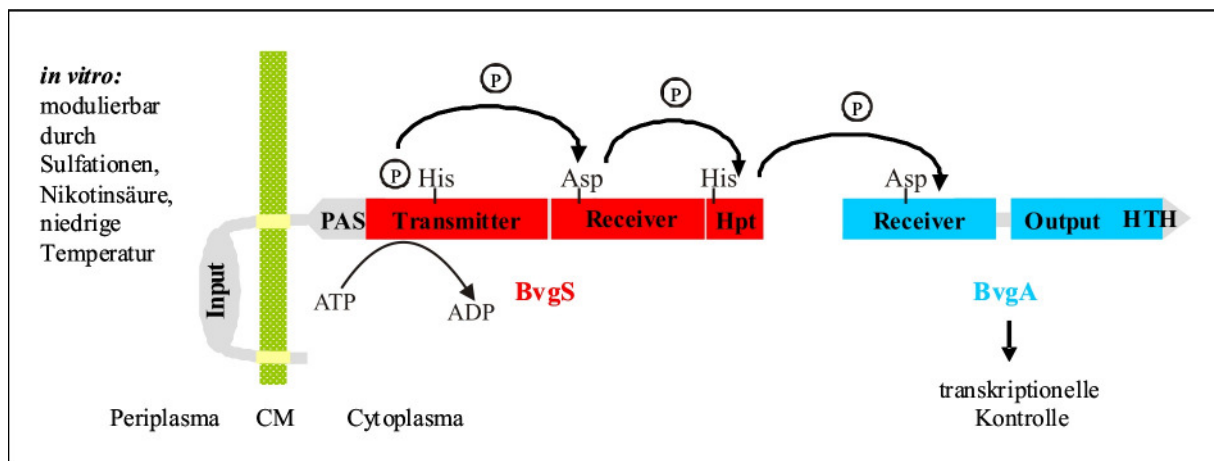


Abbildung 2-3 Schematische Darstellung und Phosphorelay des BvgAS-Zweikomponentensystems. Die Histidinkinase BvgS ist über zwei Transmembrandomänen in der Cytoplasmamembran (CM) verankert. Die Pfeile kennzeichnen den mehrstufigen Transfer der Phosphatgruppe (P) auf den Response Regulator BvgA; PAS: PAS-Domäne, Hpt: Histidin-beinhaltende Phosphotransferdomäne, HTH: Helix-turn-Helix Motiv.

Die Histidinkinase BvgS ist ein 135 kDa großes, membranständiges Protein, welches aus mehreren Domänen aufgebaut ist und als Dimer vorliegt. Der N-terminale, periplasmatische Bereich, welcher von zwei transmembranen Segmenten flankiert wird, ist über einen Linker mit dem cytoplasmatischen Bereich verbunden. Dieser besteht aus einer PAS-, einer

Transmitter-, einer Receiver- und der C-terminalen Histidin-beinhaltenden Phosphotransfer-Domäne (Hpt) (Beier *et al.*, 1996; Stibitz & Yang, 1991). PAS-Domänen sind ubiquitär verbreitete cytosolische Signaldomänen, die auf Reize wie Licht, Sauerstoff, kleine Liganden (FAD) sowie den Redox- und Energiezustand der Zelle reagieren können (Taylor & Zhulin, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass BvgS von *B. pertussis* 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 & Gross, 2002).

In vitro kommt es unter nicht-modulierenden Bedingungen zu einer ATP-abhängigen Autophosphorylierung der beiden BvgS-Homodimere am konservierten Histidinrest (H⁷²⁹). Anschließend wird die Phosphatgruppe auf den Aspartatrest D¹⁰²³ des BvgS-Receivers übertragen (Uhl & Miller, 1994). Der Phosphatrest kann nun entweder weiter auf den Histidinrest H¹¹⁷² der Hpt-Domäne übertragen werden, oder aufgrund der Autophosphatase-aktivität der Receiver-Domäne durch Hydrolyse als Orthophosphat freigesetzt werden. Diese Funktion spielt wahrscheinlich bei der Feinregulierung des Systems eine Rolle (Uhl & Miller, 1996a). Die C-terminale Hpt-Domäne ist für die spezifische Übertragung der Phosphatgruppe auf den Aspartatrest D⁵⁴ der BvgA-Receiver-Domäne zuständig (Perraud *et al.*, 1998; Uhl & Miller, 1996b).

Das 23 kDa große BvgA-Protein ist ein typischer Response Regulator mit einer N-terminalen Receiver-Domäne und einer C-terminalen DNA-Bindedomäne mit Helix-turn-Helix (HTH)-Motiv (Arico *et al.*, 1989). Das cytoplasmatische Regulatorprotein BvgA gehört zur FixJ/NarL-Familie der Response Regulatoren und wirkt als DNA-bindender Transkriptionsfaktor (Pao & Saier, 1995). Unabhängig von seinem Phosphorylierungszustand liegt BvgA als Dimer vor (Perraud *et al.*, 2000). Die phosphorylierte Form des Response Regulators bindet mit erhöhter Affinität an spezifische DNA-Zielsequenzen in BvgAS-abhängigen Promotoren (Boucher *et al.*, 1994; Steffen *et al.*, 1996).

Obwohl das BvgAS-System *in vitro* auf Temperaturänderungen, Sulfationen und Nikotinsäure reagiert, ist wenig über die Signale, welche dieses System *in vivo* wahrnimmt, bekannt.

Die Transkriptionskontrolle hängt mit der intrazellulären Konzentration an BvgA-P zusammen. Cotter und Jones haben ein Modell vorgeschlagen, welches eine Feinregulation des BvgA-P-Gehalts als Antwort auf bestimmte Umweltbedingungen erklären könnte (Cotter & Jones, 2003). Dafür ist die Domänenstruktur der Histidinkinase wichtig, deren Receiver-Domäne sowohl als Phosphotransferase als auch als Phosphatase aktiv sein kann (Uhl & Miller, 1996a). Wenn nun der Phosphotransfer von BvgA-P auf die Hpt-Domäne reversibel ist, würde der BvgS-Receiver durch die Dephosphorylierung von Hpt auch als BvgA-P-Phosphatase wirken. Da die Histidinkinase als Dimer vorliegt, können auf diese Weise verschiedene Aktivierungsstadien erreicht werden, je nachdem ob einer, beide oder keiner der Monomere aktiviert wird.

2.4.3 Transkriptionelle Genregulation über das BvgAS-System

Das BvgAS-ZKS ist direkt und indirekt für die Aktivierung und Repression einer Reihe von Genen verantwortlich, wie z.B. der Virulenzgene. Expressionsanalysen haben kürzlich die große Komplexität des BvgAS-Regulons aufgezeigt, da in Untersuchungen mit *B. bronchiseptica* und *B. pertussis* insgesamt 288 Bvg-aktivierte und 250 Bvg-reprimierte

Gene identifiziert werden konnten. Zusätzlich wurden für *B. bronchiseptica* noch 262 Gene identifiziert, welche in einem intermediären Stadium BvgAS-abhängig exprimiert werden (Cummings *et al.*, 2006). Das BvgAS-System funktioniert demnach als regulatorisches Kontinuum in dem mindestens drei phänotypische Phasen ausgeprägt sind: die virulente Bvg⁺-Phase, die intermediäre Bvgⁱ-Phase und die avirulente Bvg⁻-Phase (Cotter & Jones, 2003; Cotter & Miller, 1997)

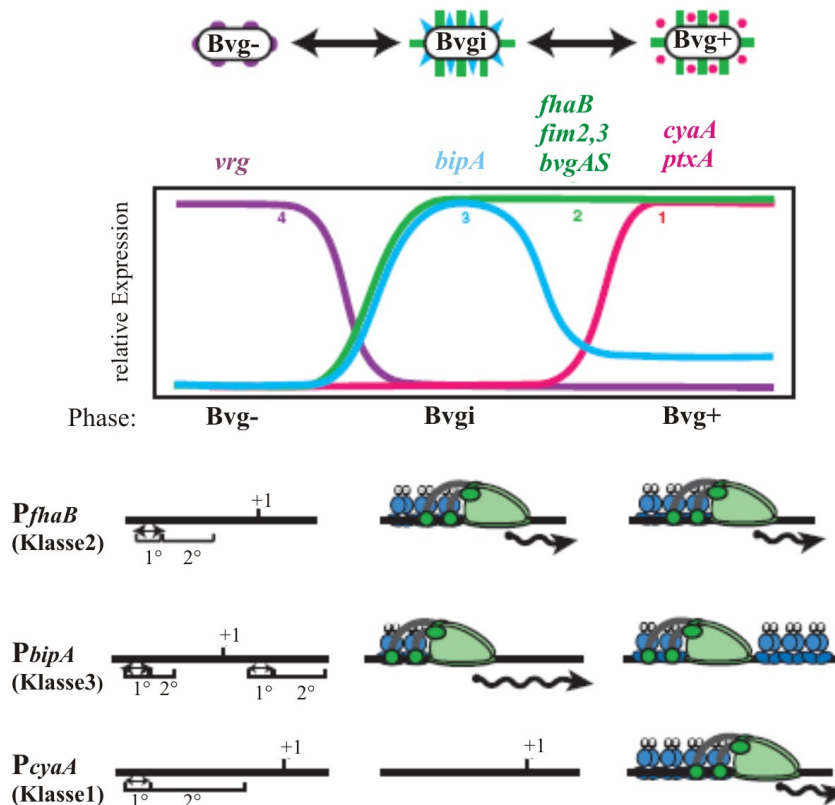


Abbildung 2-4 Schematische Darstellung der Bvg⁺-, Bvgⁱ- und Bvg⁻-Phase. Im Diagramm sind hypothetische Kurven zur relativen Expression der frühen und späten *vag*-Gene (Klassen 2 und 1), der intermediär exprimierten Gene (Klasse 3) sowie der *vrg*-Gene (Klasse 4) in den einzelnen Phasen aufgezeigt. Darunter sind Schemata repräsentativer Promotoren der Klasse 1, 2 und 3 Gene dargestellt. Die relativen Positionen von primären (1°) und sekundären (2°) BvgA-Bindestellen sind angegeben. Hochaffine Bindestellen am *fhaB*- und *bipA*-Promotor sind mit dicken Pfeilen, niedrigaffine Bindestellen am *bipA*- und am *cyaA*-Promotor sind mit dünnen Pfeilen markiert. Die Bindung von BvgA-P (blau) und RNA-Polymerase (grün) an die entsprechenden Bindestellen in der Bvg⁺- und Bvgⁱ-Phase ist zu sehen (verändert nach (Jones *et al.*, 2005)).

In der **Bvg⁺-Phase** werden die sogenannten *vag*-Gene (**v**irulence **a**ctivated **g**enes) exprimiert. Dazu gehören die Virulenzfaktoren FHA, PRN, FIM BrkA, CYA, ein TypIII-Sekretionssystem, sowie in *B. pertussis* zusätzlich die Toxine PTX und TCF. Auch das *bvgAS*-Operon gehört zu den *vag*-Genen und wird somit autoreguliert (Roy & Falkow, 1991; Roy *et al.*, 1990; Scarlato *et al.*, 1990). Die Expression von *bvgR*, welches für ein Repressorprotein kodiert, wird ebenfalls aktiviert (Merkel *et al.*, 2003). Weitere Bvg-aktivierte Gene kodieren für Zelloberflächenproteine, weitere Autotransporter, einige Proteine, die eine Rolle in der Eisenaufnahme spielen, sowie für die putativen Adhäsine FhaS und FhaL. Auch wenn in *B. bronchiseptica* und *B. pertussis* die Bvg-aktivierten Gene in relativ ähnliche funktionelle Kategorien eingeteilt werden können, scheint in

B. bronchiseptica der Einfluss auf Stoffwechselfvorgänge stärker zu sein. So kommt es in der Bvg⁺-Phase zur Expression von Glutamin- und Ammonium-Transportern und Enzymen des Laktat- und Fettsäure-Stoffwechsels. Auch eine Regulation von Genen des respiratorischen Elektronentransports wurde beobachtet (Cummings *et al.*, 2006). Die Aktivierung der Gene wird unter nicht-modulierenden Bedingungen von der phosphorylierten Form des BvgA-Proteins (BvgA-P) vermittelt (Steffen *et al.*, 1996). BvgA-P bindet an spezifische DNA-Motive in den Promotorregionen der *vag*-Gene, deren Konsensussequenz [TTTC(C/G)TA] lautet. Dieses Heptamer kann zudem variieren und ist entweder als „direct repeat“ (DR) oder „inverted repeat“ (IR) mit unterschiedlichen Abständen zwischen den beiden Halbseiten angeordnet (Karimova & Ullmann, 1997; Marques & Carbonetti, 1997; Roy & Falkow, 1991), wodurch vermutlich die unterschiedliche Affinität verschiedener Bindestellen entsteht (Cummings *et al.*, 2006). Die meisten Bvg-abhängigen Promotoren besitzen mehrere BvgA-Bindestellen, wobei zwischen primären und sekundären Bindestellen unterschieden wird.

Der *fhaB*-Promotor besitzt beispielsweise drei BvgA-Bindestellen, welche für die Aktivierung der Transkription notwendig sind, wobei die primäre Bindestelle hochaffin ist (Boucher *et al.*, 2003; Boucher *et al.*, 2001b). Kooperativ Bindung von BvgA-P an die unmittelbar stromabwärts liegenden sekundären Bindestellen führt zur Interaktion mit der RNA-Polymerase und zur Aktivierung der Transkription (Boucher *et al.*, 1997; Boucher *et al.*, 2001a). Aufgrund der hohen Affinität zu BvgA-P wird der Promotor schon bei einer relativ geringen Konzentration an aktivem Regulatorprotein aktiviert. Die *vag*-Gene lassen sich hinsichtlich ihrer Aktivierungskinetik in „frühe“ und „späte“ Gene einteilen (Scarlatto *et al.*, 1991). Späte Gene wie z.B. *cyaA*, besitzen keine hochaffinen BvgA-Bindestellen in ihren Promotoren, sondern mehrere Heptamere, die tendenziell von der Konsensussequenz abweichen und in variablen Abständen, bei *cyaA* bis Position -139, stromaufwärts verteilt sind (Karimova *et al.*, 1996; Zu *et al.*, 1996). Daher ist eine etwa zehnfach höhere Konzentration an BvgA-P zur Aktivierung des Promotors erforderlich, da viel mehr BvgA-P Dimere kooperativ an die DNA binden müssen als bei der Aktivierung von Promotoren mit hochaffinen BvgA-Bindestellen (siehe auch Abbildung 2-4) (Zu *et al.*, 1996). Die frühen Gene wie *fhaB*, *bvgAS* und *bvgR*, werden bereits wenige Minuten nach einem Shift von modulierenden zu nicht-modulierenden Bedingungen transkribiert, was mit ihrer Funktion in der frühen Phase der Infektion zusammen hängen könnte. Die Induktion der späten Gene wie *ptx* und *cya* benötigt dagegen mehrere Stunden, da sie in der Infektion erst später eine Rolle spielen (Scarlatto *et al.*, 1991; Veal-Carr & Stibitz, 2005).

Zur Ausprägung der intermediären Phase, der **Bvgⁱ-Phase**, kommt es unter submodulierenden Bedingungen, z.B. durch die Zugabe von 0,4 bis zu 20 mM Nikotinsäure (Cotter & Miller, 2000; Cummings *et al.*, 2006). Diese Phase zeichnet sich bei zunehmender Nikotinsäurekonzentration durch eine abnehmende BvgA-P-Konzentration aus (Jones *et al.*, 2005). *vrg* (virulence repressed genes)-Genprodukte sind in dieser Phase abwesend (Stockbauer *et al.*, 2001). Für *B. bronchiseptica* wurden zwei unterscheidbare regulatorische Klassen unter submodulierenden Bedingungen beschrieben. Im Bereich von 0,4 – 0,6 mM Nikotinsäure werden bereits die frühen *vag*-Gene exprimiert, und hier liegt ein Maximum für die Expression von 69 weiteren Genen, darunter Gene für die Biosynthese von Cytochrom *bd* und Cytochrom *cbb₃* sowie für eine periplasmatische Nitratreduktase, welche vermutlich unter mikroaerophilen Bedingungen eine Rolle spielen (Cummings *et al.*, 2006; Siddiqui *et al.*, 1993; Tseng *et al.*, 1996). 193 weitere Gene zeigten ein Expressionsmaximum im Bereich von

0,8 - 1,2 mM Nikotinsäure. Als Bezeichnung werden Bvgⁱ-a bzw. Bvgⁱ-b vorgeschlagen. Eine maximale Expression des intermediären Markergens *bipA* liegt bei etwa 0,6 – 0,8 mM Nikotinsäure (Cotter & Miller, 1997; Cummings *et al.*, 2006). In *B. pertussis* ist die Zahl der intermediären Gene deutlich geringer als in *B. bronchiseptica*, aber das BipA-Protein (Bvg-intermediate phase protein A) wird ebenfalls gebildet. Dessen Funktion ist bislang noch unklar, es weist jedoch Ähnlichkeiten zu Intimin aus enteropathogenen *E. coli* und zu Invasin aus *Yersinia* spp. auf (Stockbauer *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass diese Phase womöglich eine Rolle bei der Transmission via Aerosolbildung und der Etablierung neuer Infektionen spielt (Cotter & Jones, 2003; Vergara-Irigaray *et al.*, 2005). Die intermediäre Phase bei *B. bronchiseptica* ist deutlich komplexer, so dass hier womöglich die Kolonisierung eines breiteren Spektrums an Wirtsnischen erleichtert wird, z.B. im Nasen-Rachenraum wo Temperaturschwankungen auftreten oder im Schleim des Epithels im Atmungstrakt wo mikroaerophile Bedingungen herrschen können (Beier & Gross, 2006; Cummings *et al.*, 2006; Vergara-Irigaray *et al.*, 2005). In der *bipA*-Promotorregion sind zwei stromaufwärts gelegene BvgA-Bindestellen lokalisiert, an die Bvg-A-P mit hoher Affinität bindet und die Transkription ähnlich wie in Klasse 2 Promotoren aktiviert. Stromabwärts vom Transkriptionsstartpunkt befinden sich drei niedrigaffine BvgA-Bindestellen. Bei hohen intrazellulären BvgA-P-Konzentrationen in der Bvg⁺-Phase verursacht die Bindung an diese Stellen eine Reprimierung der *bipA* Transkription (Deora, 2002; Deora *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2005).

Eine weitere phänotypische Phase ist die **Bvg⁻-Phase**, in der die *vrg*-Gene exprimiert werden. Diese sind fast ausschließlich in *B. bronchiseptica* zu finden, darunter Gene für die Chemotaxis und die Flagellen-Biosynthese (Akerley *et al.*, 1995; Cummings *et al.*, 2006). Zudem wird eine Reihe von Stoffwechsel-Genen aktiviert, wie z.B. Gene für Tricarboxylat- und aromatische Aminosäuretransporter, welche für eine Aktivierung des Citrat-Zyklus sprechen, oder für Arginase, welche den Harnstoffzyklus beschleunigt (Cummings *et al.*, 2006). Ferner wurde eine erhöhte Ureaseexpression beschrieben (McMillan *et al.*, 1996), sowie die Expression von Genen des Fettsäure-Metabolismus und des Glyoxalatzyklus (Schneider *et al.*, 2002). Da *B. bronchiseptica* auch außerhalb eines Wirtes in Wasser für längere Zeit überleben kann (Porter & Wardlaw, 1993) und die Bvg⁻-Phase *in vitro*, neben Nikotinsäure und Sulfationen, auch durch niedrige Temperaturen induziert werden kann, geht man davon aus, dass die Bvg⁻-Phase von *B. bronchiseptica* eine Rolle für das Überleben in der Umwelt und unter Nährstoffmangel spielt (Bock & Gross, 2001; Cotter & Miller, 1994). Das BvgAS-ZKS könnte sich demnach aus einem Sensor entwickelt haben, der es einem fakultativ pathogenen Vorfahren der Bordetellen ermöglichte, zwischen dem Aufenthalt in der Umwelt und im Wirt zu unterscheiden (Gerlach *et al.*, 2001). *B. pertussis* und *B. parapertussis* sind aufgrund ihres größeren Virulenzpotentials womöglich nicht mehr darauf angewiesen, längere Zeit außerhalb eines Wirtes zu überleben, so dass der Selektionsdruck zur Aufrechterhaltung der Bvg⁻-Phase gering ist und sie in diesen Arten vermutlich ein evolutives Überbleibsel darstellt (Cotter & Miller, 2000; Stockbauer *et al.*, 2001). Über die Mechanismen der Reprimierung der *vrg*-Gene ist relativ wenig bekannt. Stromabwärts vom *bvgAS*-Operon wurde der *bvgR*-Lokus beschrieben, welcher für ein Repressor Protein kodiert. Dieses wird BvgA-aktiviert und reprimiert vermutlich manche *vrg*-Gene in der Bvg⁺-Phase durch Bindung an entsprechende Konsensussequenzen (Merkel *et al.*, 1998). Durch den schnellen Abbau des *bvgR* Transkripts ist eine schnelle Aktivierung der

vrg-Gene unter modulierenden Bedingungen gewährleistet (Merkel *et al.*, 2003). Die negative Regulation der *vrg*-Gene scheint aber komplexer zu sein und beinhaltet wahrscheinlich mehrere regulatorische Mechanismen. Die Motilität wird z.B. indirekt durch die BvgA vermittelte Reprimierung des *frlAB*-Operons, welches für den Masterregulator der Flagellenexpression kodiert, reguliert (Akerley *et al.*, 1995).

2.4.4 Der *bvgAS*-Lokus innerhalb der Gattung *Bordetella*

Das BvgAS-ZKS ist bei *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* ist sowohl auf Sequenzebene als auch auf funktioneller Ebene stark konserviert. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass phasenvariante *B. bronchiseptica* Stämme durch den *bvgAS*-Lokus von *B. pertussis* komplementiert werden können, was wieder zur Expression der Virulenzfaktoren führte (Martinez de Tejada *et al.*, 1996; McGillivray *et al.*, 1989). Auf Aminosäureebene sind die BvgA-Proteine des *B. bronchiseptica*-Clusters identisch. Die BvgS-Proteine von *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* sind zu 99 % identisch und BvgS von *B. pertussis* weist zu diesen beiden eine Sequenzhomologie von 95 % auf (Heininger *et al.*, 2002). Die periplasmatischen Domänen von BvgS, welche für einen Teil der Signalwahrnehmung verantwortlich gemacht werden, zeigen dabei die größte Sequenzvariabilität (Arico *et al.*, 1991). Die Gene des *bvgAS*-Lokus sind in einem Operon angeordnet, an das sich stromaufwärts das *fhaB*-Gen anschließt (Arico *et al.*, 1989). Stromabwärts befindet sich der *bvgR*-Leserahmen, welcher für den Repressor der *vrg*-Gene kodiert. Die beiden den *bvgAS*-Lokus flankierenden Gene werden in die zum *bvgAS*-Operon entgegengesetzte Richtung transkribiert (Merkel *et al.*, 2003; Roy & Falkow, 1991).

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 (Gerlach *et al.*, 2004; Spears *et al.*, 2003). Die Gene haben auf DNA-Ebene zwar eine geringere Ähnlichkeit zu denen des *B. bronchiseptica*-Clusters, betrachtet man aber Größe, Aminosäuresequenz und genetische Organisation, stellen sie eindeutig Orthologe zum BvgAS-System dar. *B. avium* weist z.B. in den Aminosäuresequenzen 50 - 60 % Ähnlichkeit für BvgS und 80 - 90 % Ähnlichkeit für BvgA im Vergleich zu *B. pertussis* auf (Spears *et al.*, 2003). Ferner konnte gezeigt werden, dass die Histidinkinasen von *B. pertussis* und *B. holmesii* trotz der Sequenzunterschiede funktional austauschbar sind, nicht aber die Response Regulatoren (Gerlach *et al.*, 2004).

Innerhalb dieser neuen Arten stimmt die genomische Anordnung der *bvgAS*-Genloci weitgehend überein. Stromaufwärts von *bvgA* befindet sich hier der Leserahmen *orfX*, der in dieselbe Richtung wie das *bvgAS*-Operon 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 daher vermutlich um ein potentiellies Regulatorprotein (Gerlach *et al.*, 2004; Spears *et al.*, 2003). Der DNA-Bereich stromabwärts vom *bvgS* ist bei den „neuen“ Arten noch weitgehend unbekannt und bislang konnte kein homologes Gen zum *bvgR* der „klassischen“ Arten identifiziert werden.

Die genomische Organisation des *bvgAS*-Lokus von *B. petrii* unterscheidet sich deutlich von der der anderen *Bordetella*-Arten und wird in Abschnitt 5.3 näher beschrieben.

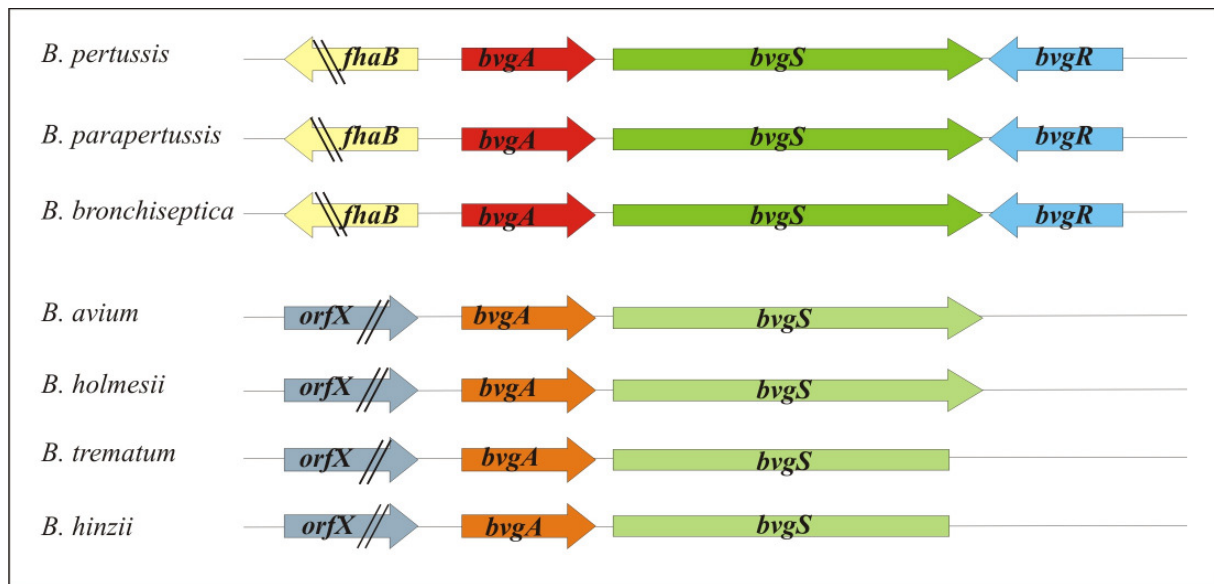


Abbildung 2-5 Genomische Organisation der *bvgAS*-Genloci der verschiedenen *Bordetella*-Arten (modifiziert nach (Gerlach *et al.*, 2004; Link, 2006)). Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

2.5 Mechanismen der Bakterienevolution

Bakterien haben sich vor ungefähr 3,8 Milliarden Jahren auf unserem Planeten entwickelt und seither eine beeindruckende Diversität erreicht. Dies zeigt sich z.B. in ihrer unterschiedlichen Anpassung an vielseitige und extreme Lebensbedingungen, hervorgerufen durch die chemische Zusammensetzung des umgebenden Mediums, die Temperatur sowie durch die pH- und Druckverhältnisse (Arber, 2000). Zudem interagieren Bakterien mit einer Vielzahl von Organismen wie Bakteriophagen, anderen Bakterien, Amöben, Insekten, Pilzen, Anneliden, Nematoden, Pflanzen und Säugetieren. Einige Bakterienarten haben sich in ihrer Interaktion spezialisiert und sich zu Symbionten und Pathogenen entwickelt, welche sich an ein Leben in enger Gemeinschaft mit ihrem Wirt angepasst haben (Pallen & Wren, 2007). Die genetische Variation ist eine Grundvoraussetzung für die Evolution, um die Anpassungsfähigkeit einer Population an veränderte Umweltbedingungen zu gewährleisten. Solche Variationen können durch drei unterschiedliche Strategien hervorgerufen werden: durch lokale Veränderungen der DNA-Sequenz, durch Umstrukturierung ganzer Segmente in der Genom-DNA sowie durch den Erwerb von Fremd-DNA mittels horizontalem Gentransfer (HGT) (Arber, 2000).

Unter **lokalen Veränderungen der DNA-Sequenz** versteht man z.B. Punktmutationen, die durch Fehler bei der Replikation oder durch das Einwirken von mutagenen Substanzen wie UV-Licht oder Sauerstoffradikalen entstehen können. Solche Mutationen können stumm bleiben, zu Modifikationen oder veränderter Regulation eines bestehenden Gens führen oder auch eine Verschiebung des Leserasters und damit meist eine Inaktivierung des Gens hervorrufen (Steinmann-Keller, 2000). Da solche Mutationen immer wieder zufällig stattfinden und sich mit fortschreitender Zeit akkumulieren werden lokale Sequenz-Veränderungen z.B. der 16S rDNA häufig zum Abschätzen der evolutiven Distanz

herangezogen (Nethe-Jaenchen, 2000). Auch wenn Punktmutationen über einen evolutiv langen Zeitraum gesehen zur Diversifikation von Mikroorganismen beitragen, kann die Anpassungsfähigkeit an neue Lebensräume nicht allein durch die Anhäufung von solchen Punktmutationen erklärt werden (Ochman *et al.*, 2000).

Durch **Umstrukturierung ganzer Segmente** können z.B. Inversionen, Deletionen oder Duplikationen entstehen, wobei letztere durch fortschreitende Evolution zur Bildung von paralogen Genen oder Genclustern führen können. In *Mycobacterium tuberculosis* wird beispielsweise die Entstehung einer wichtigen Proteinfamilie, der Glycin-reichen Proteine, auf multiple Duplikationsereignisse zurückgeführt (Cole *et al.*, 1998). Häufig erfolgen Umstrukturierungen durch Rekombinationsereignisse an ähnlichen DNA-Sequenzen. Auf diese Weise können z.B. verschiedene funktionale Domänen von Genen neu kombiniert werden, was wahrscheinlich ein Grund dafür ist, dass Gene mit ansonsten unterschiedlicher Funktion oft ähnliche Sequenzmotive oder funktionale Domänen aufweisen (Arber, 2000). Eine wichtige Rolle bei der Umgestaltung von bakteriellen Genomen spielen die durch horizontalen Gentransfer erworbenen IS (insertion sequence)-Elemente, welche die einfachsten transponierbaren genetischen Elemente darstellen. Sie bestehen aus einem Transposase-Gen sowie zwei begrenzenden „inverted repeats“ (IRs) und werden in verschiedene Familien eingeteilt. Sie kommen in unterschiedlicher Anzahl und Kombination, manchmal in hundertfacher Kopie, in vielen bakteriellen Genomen vor (Siguier *et al.*, 2006). Durch IS-Elemente wird die homologe Rekombination innerhalb des Genoms erleichtert, wobei häufig große chromosomale Bereiche umgestellt werden oder verloren gehen können. Durch den Einbau in intakte Gene oder Operonstrukturen können Pseudogene entstehen oder ganze Stoffwechsel- oder Biosynthesewege blockiert werden (Preston *et al.*, 2004; Siguier *et al.*, 2006).

Der **horizontale Gentransfer** spielt eine tragende Rolle in der Bakterienevolution. Er ermöglicht es Mikroorganismen, sich DNA-Sequenzen, welche für neue Fähigkeiten wie Antibiotikaresistenzen, Virulenzfaktoren oder metabolische Fähigkeiten kodieren, anzueignen und somit evolutive Sprünge in relativ kurzer Zeit zu vollführen (Groisman & Ochman, 1996; Ochman *et al.*, 2000). Der Erwerb von Fremd-DNA kann hierbei auf verschiedene Weise erfolgen. Natürlich kompetente Bakterien wie *Helicobacter pylori* (Hofreuter *et al.*, 2001) oder *Neisseria gonorrhoeae* (Koomey, 1998) können z.B. nackte DNA aus ihrer Umgebung mittels bestimmter Strukturen, wie Typ-IV-Sekretionssystemen bzw. Typ IV-Pili, aufnehmen. Auch Bakteriophagen spielen eine Rolle im HGT, da sie z.B. zufällige DNA Fragmente der Donor-Zelle, welche in Phagenpartikel eingebaut wurden, in ein anderes Bakterium schleusen können oder nach Bildung eines Prophagen DNA-Bereiche der Integrationsstelle mit ausschneiden und so weiterverbreiten (Steinmann-Keller, 2000). Klassische Virulenzfaktoren wie Diphtheria-Toxin und Cholera-Toxin werden beispielsweise durch Bakteriophagen vermittelt, welche sich ins Bakterienchromosom integrieren können (Freeman, 1951; Waldor & Mekalanos, 1996). Eine weitere Möglichkeit für horizontalen Gentransfer stellt die Konjugation dar. Hierbei wird DNA über eine Cytoplasmabrücke von einer Donorzelle auf eine Empfängerzelle übertragen, wobei genetisches Material auf diese Weise nicht nur zwischen Bakterien ausgetauscht werden kann, sondern auch zwischen Bakterien und Pflanzen (Stachel & Zambryski, 1986) oder Bakterien und Hefen (Heinemann & Sprague, 1989). Zu den übertragbaren Strukturen zählen sowohl Plasmide als auch die im nächsten

Abschnitt besprochenen integrativen und konjugativen Elemente (ICEs) (Burrus *et al.*, 2002; Ochman *et al.*, 2000). Unter Selektionsdruck kann aufgenommene DNA als Episom persistieren oder sie kann via Rekombination oder Transposase- bzw. Integrase-vermittelt ins bakterielle Chromosom integrieren.

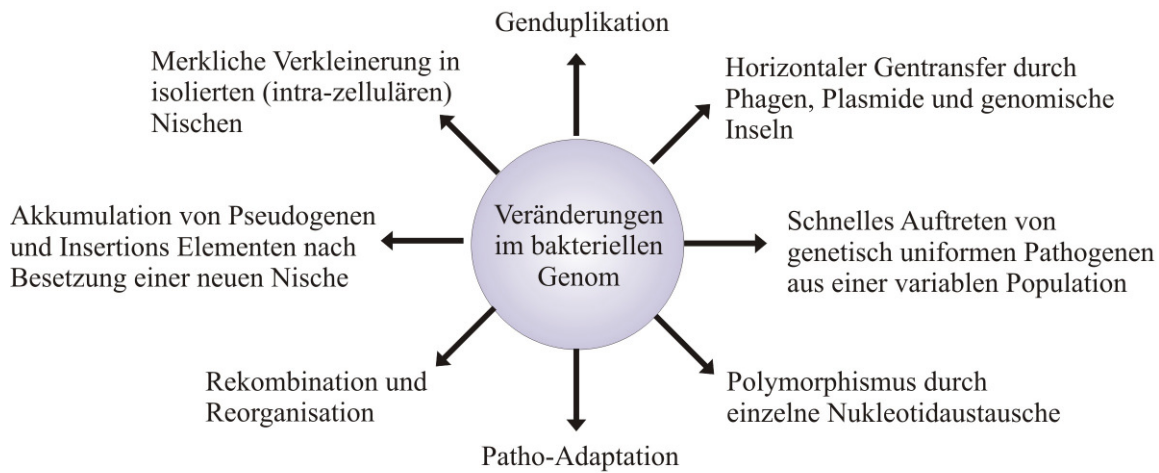


Abbildung 2-6 Dynamik des bakteriellen Genoms. Die Abbildung zeigt Strategien für die genetische Variabilität auf, die in einem Bakterium stattfinden können, sowie verschiedene Veränderungen, die diese mit sich bringen kann, wie z.B. die Entstehung von Pathogenitäts-Mechanismen. (verändert nach (Pallen & Wren, 2007)).

Die Häufigkeit genetischer Variation wird durch bestimmte Modulatoren beeinflusst. Dazu gehören DNA-Reparatursysteme, welche das Auftreten von Punktmutationen auf eine für den Organismus tolerierbare Häufigkeit reduzieren, oder Restriktions-Modifikations-Systeme, welche ubiquitär in Bakterien vorkommen und welche Fremd-DNA erkennen und über eine Restriktionsendonuklease-Funktion spalten können (Arber, 2000). Obwohl Bakterien ihren DNA-Gehalt durch HGT und Duplikationen verändern, führt dies nicht zu einer immer größeren Anhäufung von genetischem Material. Im Gegenteil, bakterielle Genome bleiben eher klein und beinhalten wenige nicht-funktionale Sequenzen (Mira *et al.*, 2001). Ist die Selektion auf bestimmte Genfunktionen schwach, so werden diese Gene leichter wieder eliminiert bzw. sind anfälliger für Mutationen. Auf diese Weise können durch größere Deletionen ein oder mehrere Gene eliminiert werden, oder es entstehen Pseudogene, die nach und nach weiteren Deletions- oder Mutationsereignissen ausgesetzt sind (Mira *et al.*, 2001; Ochman & Moran, 2001).

Der Trend zu einer durch Genverlust hervorgerufenen Verkleinerung des Genoms zeigt sich bei einer Reihe von Pathogenen wie *Mycobacterium leprae* (Cole *et al.*, 2001) oder *Yersinia pestis* (Parkhill *et al.*, 2001), bei denen durch die Anpassung an eine wirtsassoziierte Nische viele Gene einem geringeren Selektionsdruck ausgesetzt waren und somit eliminiert wurden. Eine solche Nische bedeutet auch, dass Replikation in kleinen Populationen stattfindet und die Möglichkeit zur Rekombination zwischen Varianten relativ gering ist, weshalb sich Mutationen schneller festsetzen, als in weniger spezialisierten Organismen (Andersson & Kurland, 1998). Bei der Evolution von Pathogenen wird der Verlust von Genen im Rahmen der Pathoadaptation z.T. auch gezielt selektioniert, weil dies z.B. Vorteile bei der Vermeidung der Immunantwort des Wirtes mit sich bringen kann, wie beispielsweise der Verlust der Flagellen bei *B. pertussis* oder *Y. pestis* (Pallen & Wren, 2007).

Besonders extreme Formen des Genverlustes kann man bei intrazellulären Bakterien wie *Rickettsia prowazekii* (Andersson *et al.*, 1998), dem Blattlaussymbionten *Buchnera aphidicola* (Shigenobu *et al.*, 2000) oder den Mitochondrien (Andersson & Kurland, 1998) beobachten. Spezialisierte Symbionten oder Pathogene mit kleinem Genom haben meist reduzierte Möglichkeiten zum Ausgleich eines solchen Genverlustes mittels HGT. Sie kommen entweder aufgrund ihrer Wirtsspezifität nicht in Kontakt mit anderen Mikroorganismen oder haben die Gene, die für die Fähigkeit zur Aufnahme von Fremd-DNA kodieren, bereits verloren, so dass sich der Trend der Genomreduktion fortsetzt. Nur eine Abhängigkeit des Wirtes, wie sie bei Endosymbionten oder den Zellorganellen zu finden ist, begrenzt hier die völlige Reduktion des bakteriellen Genoms (Andersson & Kurland, 1998; Ochman & Moran, 2001)

2.5.1 Genomische Inseln - Integrative und konjugative Elemente

Unter integrativen und konjugativen Elementen (ICEs) versteht man eine Reihe mobiler DNA-Elemente, welche als konjugative Transposons, integrative Plasmide oder genomische Inseln bezeichnet werden. Alle ICEs weisen folgende Merkmale auf: Sie werden über ortsspezifische Rekombination als ringförmige Struktur aus dem Genom ausgeschnitten, sie sind selbstübertragbar mittels Konjugation und sie integrieren in einer oder wenigen Stellen im Wirtsgenom, wobei die Spezifität und die Mechanismen von Integration und Konjugation nicht weiter definiert sind (Burrus *et al.*, 2002)

Die Bezeichnung genomische Insel (GI) wird für bestimmte instabile und z.T. übertragbare chromosomale Regionen in der Größenordnung von 10 - 502 kb verwendet (Gaillard *et al.*, 2006; Hacker & Carniel, 2001). Diese Elemente sind dadurch gekennzeichnet, dass sie oft in oder in der Nähe von tRNA-Genen ins Chromosom integrieren, wobei am anderen Ende der Insel eine kurze Wiederholungs-Sequenz (DR) entsteht. Sie tragen Gene für den Transfer und die Integration ins Genom, meist in Form von Integrasen oder Transposasen und zusätzlich Gencluster, welche spezifische Funktionen vermitteln (Hacker & Carniel, 2001; Hacker & Kaper, 2002; van der Meer & Sentchilo, 2003). Im Gegensatz zur spezifischen Integration von GIs sind konjugative Transposons nicht an tRNAs gebunden und können an multiplen Stellen im Genom integrieren (Burrus *et al.*, 2002).

Gute Erkennungsmerkmale der horizontalen Herkunft genomischer Inseln sind ihr vom restlichen Genom abweichender G/C-Gehalt und eine andere Codon-Nutzung. Werden allerdings Inseln mit einer ähnlichen Sequenzstruktur übertragen können GIs z.B. über das Vorhandensein von Mobilitätsgenen, Integrasen, Transposasen oder Phagen Genen oder ein tRNA-Screening identifiziert werden. Zudem können über Genomvergleiche verwandter Spezies ungewöhnliche, stammspezifische Regionen detektiert werden (Gal-Mor & Finlay, 2006).

Man geht davon aus, dass sich GIs aus integrativen Plasmiden oder Bakteriophagen ableiten (Dobrindt *et al.*, 2004) (Abbildung 2-7). Hinweise auf die GI-Evolution gibt das Vorhandensein von phagen- oder plasmidähnlichen Genen, wie z.B. Integrasen (Hacker & Carniel, 2001). Des Weiteren kann die Integration in tRNA-Gene für verschiedene lysogene Phagen und manche Plasmide, wie z.B. das Resistenzplasmid von *Haemophilus influenzae*, beobachtet werden (Cheetham & Katz, 1995; Dimopoulou *et al.*, 2002). Manche Phagen können zudem genomische Inseln vermitteln, wie z.B. die Pathogenitätsinsel VPI-1 von

Vibrio cholerae durch den Vibriophagen VPI ϕ (Karaolis *et al.*, 1999). Eine weitere Evolution der GI findet durch die Aufnahme und den Verlust von Genen oder ganzen Funktionseinheiten, durch Rekombinationsereignisse und Umstrukturierungen statt, weshalb sie oft eine mosaikartige Struktur aufweisen (Dobrindt *et al.*, 2004).

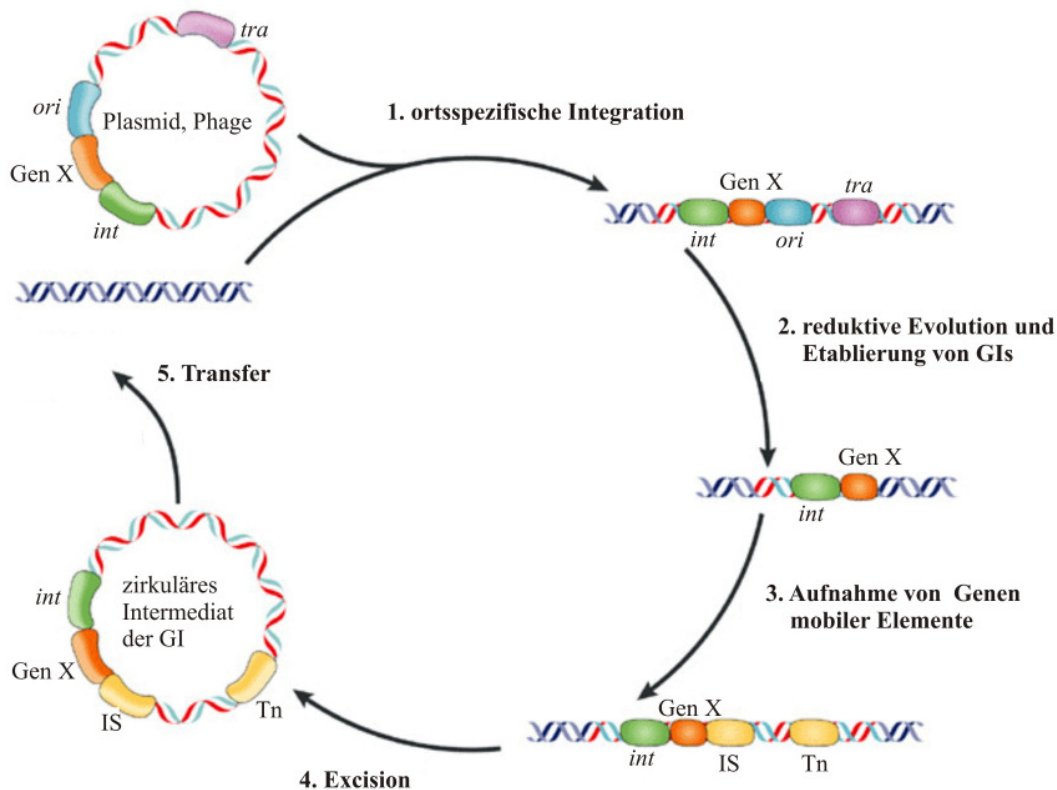


Abbildung 2-7 Mögliche Entstehung von genomischen Inseln (GIs). Mobile genetische Elemente können über ortsspezifische Rekombination ins Chromosom integrieren (1.). Gene für die autonome Replikation (*ori*) und den Plasmid- bzw. Phagentransfer (*tra*) können verloren gehen (2.) und dafür weitere DNA-Elemente aufgenommen werden, z.B. über Transposon (Tn)- oder Insertionssequenz (IS)-Integration (3.). Eine Integrase vermittelt die Excision (4.) und erneute Integration ins Chromosom eines anderen Bakteriums (5.). *int*: Integrase-Gen (verändert nach (Dobrindt *et al.*, 2004)).

Genomische Inseln tragen meist ganze Operonstrukturen, welche als funktionale Einheit neue Fitnesseigenschaften vermitteln (Gal-Mor & Finlay, 2006; Hacker & Carniel, 2001). Eine Entwicklung solcher Gencluster wird durch die Theorie des „selfish operon“ (Lawrence & Roth, 1996) erklärt. Demnach haben Gene, deren Produkte zu einer bestimmten Funktion beitragen und die zudem gebündelt vorliegen, einen Selektionsvorteil den HGT und damit die Verbreitung in der Population betreffend. Auf diese Weise wird die Übertragung vieler Gene in einem einzigen Schritt durch GIs gefördert (Gal-Mor & Finlay, 2006).

Eine solche Übertragung kann ein Bakterium in einem Schritt mit ganz neuen Fähigkeiten ausstatten, wie das Beispiel des „Locus of enterocyte effacement“ (LEE) aus enteropathogenen *E. coli* Stämmen (EPEC) zeigt. Der LEE vermittelt Gene für ein Typ-III-Sekretionssystem, ein Adhäsion und Effektorproteine wodurch Läsionen des Darmepithels verursacht werden. Die Übertragung von LEE auf Laborstämme von *E. coli* K12 erzeugt in einem einzigen Schritt einen virulenten Phänotyp aus einem ansonsten apathogenen Keim (McDaniel & Kaper, 1997).

Man differenziert ökologische, metabolische oder saprophytische Inseln, wenn die Mikroorganismen dadurch besser in der Umwelt oder als Saprophyten in einem Wirt überleben können, symbiontische Inseln, wenn dadurch eine verbesserte Interaktion mit dem Wirt vermittelt wird und Pathogenitätsinseln, wenn Virulenzfaktoren zur Schädigung des Wirtes übertragen werden (Hacker & Carniel, 2001).

Oft weisen genomische Inseln auch duale Funktionen auf. Im harmlosen Darmbakterium *E. coli* beispielsweise sind bestimmte Serotypen von Fimbrien, welche in genomischen Inseln kodiert sind, an der Besiedelung des Darms beteiligt. Aufgrund ihrer Fimbrien-Ausstattung können diese Bakterien aber Harnwegsinfektionen auslösen, d.h. eine eigentlich saprophytische Insel kann unter anderen Bedingungen als Pathogenitätsinsel wirken (Hacker & Carniel, 2001). Manche GIs sind sowohl unter pathogenen als auch apathogenen Keimen weitverbreitet, wie z.B. das „high pathogenicity island“ (HPI), welches zuerst für *Yersinia* spp. beschrieben wurde und für ein Eisenaufnahmesystem kodiert. Außerhalb eines Wirtes fungiert es daher als ökologische Insel, innerhalb als Pathogenitätsinsel (Bach *et al.*, 2000; Dobrindt *et al.*, 2004). GIs können auch verbesserte metabolische Fähigkeiten vermitteln, wie z.B. die symbiontische Insel der Rhizobien, welche Gene für die Stickstofffixierung trägt (Sullivan & Ronson, 1998) oder das *clc*-Element von *Pseudomonas* sp. Stamm B13, welches als ökologische/metabolische Insel die Verwertung von chloroaromatischen Verbindungen ermöglicht (Ravatn *et al.*, 1998a; Ravatn *et al.*, 1998b).

2.5.1.1 Das *clc*-Element von *Pseudomonas* sp. Stamm B13

Pseudomonas sp. Stamm B13 wurde als erster Stamm der Gattung *Pseudomonas* beschrieben, welcher 3-Chlorobenzoat (3CBA) als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen kann (Dorn *et al.*, 1974). Vermittelt wird diese Fähigkeit durch die *clcRABDE* Gene, welche für die Enzyme zur 3- und 4-Chlorocatechol Degradation des *ortho* „cleavage pathway“ kodieren (Frantz & Chakrabarty, 1987). Diese Gene liegen als Cluster auf dem ~105 kb großen *clc*-Element. Dieses Element weist charakteristische Eigenschaften von genomischen Inseln auf und ist an zwei Stellen im *Pseudomonas* sp. Stamm B13 Genom integriert. Es ist selbstübertragbar zwischen anderen β - und γ -Proteobakterien und integriert RecA unabhängig und gerichtet in Glycin-tRNA-Gene (Ravatn *et al.*, 1998a; Ravatn *et al.*, 1998b; Ravatn *et al.*, 1998c).

Bei der Übertragung auf *Pseudomonas putida* F1 konnte gezeigt werden, dass es an der ersten Integrationsstelle (INT1) unter selektiven Bedingungen, wie Wachstum auf Chlorobenzenen, zu Tandemintegrationen kommen kann. Diese sind unter nicht-selektiven Bedingungen instabil und werden deletiert, was darauf hinweist, dass eine höhere Kopienzahl der *clc*-Gene nur für den Abbau von Chlorobenzenen von Vorteil ist (Ravatn *et al.*, 1998a).

Die Integration des *clc*-Elements erfolgt in das 18 bp lange 3'-Ende der tRNA^{Gly}, welche als attB (att – attachment site) bezeichnet wird. Auf der rechten Seite wird dabei das tRNA^{Gly}-Gen durch den Einbau wieder vervollständigt, auf der linken Seite verbleibt eine 18 bp lange Wiederholungssequenz (DR) des 3'-Endes des tRNA^{Gly}-Gens. Bei der Excision aus dem Genom bildet das *clc*-Element ein ringförmiges Intermediat, bei dem die 18 bp lange Erkennungssequenz als attP bezeichnet wird (Ravatn *et al.*, 1998b).

Verantwortlich für die Integration und vermutlich auch die Excision ist eine 74 kDa große ortsspezifische Rekombinase der Bakteriophagen P4 Integrase Subfamilie, welche als Int-B13 bezeichnet wird und deren Gen proximal zum rechten Ende des *clc*-Elements lokalisiert ist

(Ravatn *et al.*, 1998b). Sie weist die für die ortsspezifischen Rekombinasen der Integrase-Familie konservierten Aminosäurereste (His-365, Arg-368, Tyr-401 und Arg-261 (Ravatn *et al.*, 1998b) auf, welche vermutlich eine Rolle bei der DNA-Bindung während der Rekombination spielen (Abremski & Hoess, 1992; Argos *et al.*, 1986; Pargellis *et al.*, 1988). Dem hochkonservierten N-terminalen Bereich der Int-B13 Integrase steht der etwa 220 Aminosäuren lange, wenig konservierte C-terminale Teil gegenüber, der in anderen phagenähnlichen Integrasen fehlt. Dieser Bereich zeigt Homologie zu einer putativen Transposase von *Pseudomonas* sp. Strain B4 (emb/CAB93963) (Larbig *et al.*, 2002).

Die Expression von *int-B13* wird von zwei Promotoren kontrolliert. Der starke konstitutive Promotor P_{circ} liegt am linken Ende der GI und vermittelt die *int-B13* Transkription nur in der zirkulären Form. Der zweite Promotor P_{int} liegt stromaufwärts von *int-B13* und vermittelt die Transkription in der integrierten Form (Sentchilo *et al.*, 2003b). Wachstum in der stationären Phase und Wachstum auf Chlorobenzoat führen zur Induktion von P_{int} und somit zu einer vermehrten Bildung des zirkulären Intermediats (Sentchilo *et al.*, 2003a).

Die Sequenzierung des *clc*-Elements zeigte, dass es sich in zwei unterscheidbare Regionen gliedern lässt. Ein etwa 50 kb großer Bereich beinhaltet das Integrase-Gen und die Gene, welche für die metabolischen Fähigkeiten kodieren. Die zweite Hälfte des *clc*-Elements scheint konserviert zu sein und spielt vermutlich eine Rolle für Konjugation und Transfer (Gaillard *et al.*, 2006).

2.5.2 Evolutionäre Tendenzen in der Gattung *Bordetella*

Aufgrund ihrer engen Verwandtschaft wird die Gattung *Bordetella* mit den Gattungen *Alcaligenes* und *Achromobacter* zur Familie der *Alcaligenaceae* gerechnet (Gerlach *et al.*, 2001). Den Gattungen *Alcaligenes* und *Achromobacter* gehören hauptsächlich Umweltorganismen an, die ein großes Potential für den Abbau von aromatischen Verbindungen aufweisen (Jiang *et al.*, 2007; Essam *et al.*, 2006; Rehfuss & Urban, 2005). Es finden sich aber auch fakultative Pathogene wie *Achromobacter xylosoxidans*, welcher eine Rolle bei nosokomialen Infektionen spielt und Infektionen im Respirationstrakt von Patienten mit Zystischer Fibrose verursachen kann (Aisenberg *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2002; Tsay *et al.*, 2005). Genomanalysen der sequenzierten *Bordetella*-Arten zeigen, dass sich zwei evolutionäre Tendenzen innerhalb der Gattung abzeichnen.

Die wirtsspezifischen Pathogene *B. pertussis* und *B. parapertussis* weisen eine zunehmende Genom-Reduktion auf, welche durch die Bildung von Pseudogenen und eine Expansion der IS-Elemente gekennzeichnet ist (Parkhill *et al.*, 2003). Das kürzlich beschriebene Umweltisolat *B. petrii* hingegen weist deutliche Kennzeichen von HGT auf. Sein Genom beinhaltet viele genomische Inseln und IS-Elemente sowie 2 intakte Prophagen und weist eine Reihe von Genen auf, die vielfältige metabolische Fähigkeiten vermitteln (Gross *et al.*, 2008). Zudem ist *B. petrii* der einzige Vertreter der Gattung, der, wie viele der nahe verwandten *Achromobacter*-Arten, fakultativ anaerob wachsen kann (von Wintzingerode *et al.*, 2001). Die Vermutung liegt daher nahe, dass der gemeinsame Vorfahre der Bordetellen ein Umweltbakterium war, welches sich durch den Erwerb von Virulenzfaktoren und eine zunehmende Spezifizierung zu den heute bekannten Krankheitserregern entwickelt hat. *B. petrii* weist einige putative Virulenzfaktoren der pathogenen *Bordetella*-Arten auf, wie z.B. verschiedene Adhäsine und das BvgAS-System, und verschiedene Isolate können potentiell

mit Wirtsorganismen interagieren (siehe 2.3.1) (Gross *et al.*, 2008). Somit stellt *B. petrii* eine Art Bindeglied zwischen einem apathogenen Vorfahren und den pathogenen Bordetellen dar. Dass sowohl *B. bronchiseptica*, welcher zudem ein breites Wirtsspektrum aufweist, als auch *B. avium* für längere Zeit außerhalb eines Wirtsorganismus in Teichwasser überleben können, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Gattung *Bordetella* sich aus einem fakultativ anaeroben Umweltbakterium entwickelt haben könnte (Porter & Wardlaw, 1993; Raffel *et al.*, 2002). Auch die BvgAS-vermittelte Aktivierung bestimmter Virulenzfaktoren durch einen Temperaturanstieg von 25°C auf 37°C könnte auf einen Übergang der Bakterien aus der Natur auf einen homoiothermen Wirt hindeuten (Scarlato *et al.*, 1993).

Merkmal	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>
Genomgröße (bp)	4.086.186	4.773.551	5.338.400
Anzahl der Gene	3.816	4.404	5.007
Anzahl der Pseudogene	358	220	18
(% der Kodierungs- kompetenz)	(9,4 %)	(5,0 %)	(0,4 %)
G+C Gehalt (%)	67,72	68,10	68,07
IS-Elemente (Kopienzahl)	IS481 (238) IS1002 (6) IS1663 (17)	IS1001 (22) IS1002 (90)	keine

Tabelle 2-4 Merkmale des *Bordetella*-Genoms. Die sequenzierten Stämme sind: *B. pertussis* Tohama I, *B. parapertussis* 12822 und *B. bronchiseptica* RB50. (verändert nach Preston *et al.* 2004).

Im *B. bronchiseptica*-Cluster selbst, scheint der Erwerb von „neuem“ genetischem Material eher eine untergeordnete Rolle bei der zunehmenden Pathogenität für den menschlichen Wirt gespielt zu haben. Für zwei Bereiche könnte allerdings ein laterales Gentransferereignis angenommen werden, da hier Virulenzgencluster auftreten. Im ersten Gencluster liegen Gene, welche für das BvgAS-Zweikomponentensystem, das FHA und die Biosynthese sowie den Export von Fimbrien kodieren (Willems *et al.*, 1994). Im zweiten Gencluster, welches zudem Merkmale einer PAI zeigt, liegen die *ptx/ptl*-Gene, welche für die Strukturproteine und den Sekretionsapparat des Pertussis-Toxins kodieren (Antoine *et al.*, 2000). Des weiteren finden sich z.T. intakte oder partielle Prophagen (Cummings *et al.*, 2004; Middendorf & Gross, 1999; Parkhill *et al.*, 2003) und auch das Vorhandensein von IS-Elementen deutet auf vereinzelt HGT hin (Preston *et al.*, 2004; van der Zee *et al.*, 1996). Die meisten Virulenzgene sind jedoch über das ganze Chromosom verteilt und ihr GC-Gehalt weicht nicht signifikant von dem des restlichen Genoms ab (Gerlach *et al.*, 2001).

Die Wirtsspezifität scheint durch differentielle Genexpression und eine zunehmende Genomreduktion erreicht zu werden. Dieser Trend zum Verlust von Genen zeigt sich besonders gut beim Vergleich der am Sanger Centre ermittelten Genomsequenzen von *B. bronchiseptica* RB50, *B. parapertussis* 12822 und *B. pertussis* Tohama I (Tabelle 2-4) (Parkhill *et al.*, 2003). Bei solchen Analysen darf man jedoch nicht außer acht lassen, dass es sich jeweils nur um einen repräsentativen Stamm der jeweiligen Art handelt (Preston *et al.*, 2004).

Aufgrund von Genomsequenzierung (Parkhill *et al.*, 2003; Preston *et al.*, 2004), vergleichender Genomhybridisierung mit Microarrays, dem Vergleich der IS-Element-

Verteilung und MLST (multilocus sequence typing) (Cummings *et al.*, 2004; Diavatopoulos *et al.*, 2005) ist das *B. bronchiseptica*-Cluster auch phylogenetisch recht gut untersucht. Um die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb des *B. bronchiseptica*-Clusters zu beschreiben, schlugen Diavatopoulos *et al.* eine Einteilung in vier Gruppen vor (Diavatopoulos *et al.*, 2005). Gruppe I beinhaltet dabei die Mehrheit der *B. bronchiseptica* Isolate u. a. den sequenzierten Stamm RB50 (Parkhill *et al.*, 2003). Diese *B. bronchiseptica* Isolate stammen zudem hauptsächlich aus Tieren. Gruppe II und Gruppe III beinhalten alle *B. pertussis* bzw. alle humanen *B. parapertussis* Isolate. In Gruppe IV finden sich die meisten humanen *B. bronchiseptica* Isolate. Da diese Gruppe eine engere Verwandtschaft zu *B. pertussis* als zur Gruppe I aufweist, scheint ein *B. bronchiseptica* Vorfahre sich schon früh von der Gruppe I abgespalten und eine vornehmlich menschassoziierte Linie gebildet zu haben, aus der heraus sich dann später wahrscheinlich *B. pertussis* entwickelt hat. Die humanen *B. parapertussis* Isolate haben sich vermutlich von der Gruppe I ausgehend entwickelt und sich unabhängig von *B. pertussis* an den menschlichen Wirt angepasst, was sich auch dadurch zeigt, dass sie entfernter mit diesem verwandt sind, als mit *B. bronchiseptica* (Diavatopoulos *et al.*, 2005; Parkhill *et al.*, 2003; van der Zee *et al.*, 1997). Die ovinen Isolate von *B. parapertussis* haben sich wiederum unabhängig von den humanen *B. parapertussis* Stämmen entwickelt und werden der Gruppe I zugeordnet (Diavatopoulos *et al.*, 2005).

Die Untersuchung der IS-Element-Verteilung unterstützt eine solche Einteilung, da das IS1001 in allen untersuchten *B. parapertussis* Isolaten und in *B. bronchiseptica* Isolaten der Gruppe I vorkommt und das IS1663 in *B. pertussis* und den *B. bronchiseptica* Isolaten der Gruppe IV nachgewiesen wurde, wie es bei einem vertikalen Transfer zu erwarten wäre (Cummings *et al.*, 2004; Diavatopoulos *et al.*, 2005). Das Auftreten von IS1002 sowohl in *B. pertussis* als auch in humanen *B. parapertussis* Isolaten ist hingegen eher als Ergebnis eines lateralen Gentransfers von *B. pertussis* auf *B. parapertussis* während einer Koinfektion zu betrachten (van der Zee *et al.*, 1996). Das IS481 kommt bis auf wenige Ausnahmen nur in *B. pertussis* vor und ist dort, durch seine extreme Vermehrung, der Hauptgrund für Pseudogen-Entstehung und Genverlust (Diavatopoulos *et al.*, 2005; Parkhill *et al.*, 2003; van der Zee *et al.*, 1997).

Betrachtet man die genetische Diversität innerhalb der einzelnen Arten, zeigen humane *B. parapertussis* Isolate eine geringere Variabilität als ovine Isolate, so dass man davon ausgehen kann, dass ovine *B. parapertussis* Stämme entwicklungsgeschichtlich älter sind. Auch *B. pertussis* Isolate weisen eine größere intraspezifische Variabilität als humane *B. parapertussis* Isolate auf, so dass man auch hier davon ausgehen kann, dass die Anpassung von *B. pertussis* an den Menschen wahrscheinlich früher stattgefunden hat (van der Zee *et al.*, 1997).

Die Abspaltung von *B. pertussis* von der menschassoziierten *B. bronchiseptica* Linie wird aufgrund von paarweisen Substitutionsraten von Allelen auf 0,3 - 2,7 Millionen Jahre geschätzt, so dass eine Anpassung an den Menschen schon relativ früh begonnen haben muss (Diavatopoulos *et al.*, 2005). Dass eine schriftliche Erwähnung der Keuchhustensymptome erst im 15. Jahrhundert stattfand, könnte damit zusammenhängen, dass sich eine erhöhte Virulenz, z.B. durch eine differentielle Toxinproduktion, erst in jüngerer Zeit entwickelt hat (Parkhill *et al.*, 2003). Interessant ist in dieser Hinsicht auch die Expression von PTX, die nur in *B. pertussis* stattfindet, obwohl die entsprechenden Gene auch in *B. bronchiseptica* und *B. parapertussis* vorhanden sind. Man hatte zunächst angenommen, dass in diesen beiden

Stämmen die Expression aufgrund von Mutationen im Promotorbereich unterbunden wurde (Arico & Rappuoli, 1987). Es ist aber wahrscheinlicher, dass sie den ursprünglicheren Promotorbereich besitzen, welcher in *B. pertussis* durch Punktmutationen weiter mutiert ist, so dass wieder eine Expression stattfinden konnte (Preston *et al.*, 2004).

Die Anpassung von *B. pertussis* an den Menschen ist zudem durch eine erhöhte Transmissionsrate gekennzeichnet, weist dafür aber eine kürzere Infektionsperiode auf. Dies hat den evolutiven Vorteil sich schneller in einer Population auszubreiten, über längere Zeiträume hinweg aber den Nachteil einer erhöhten Extinktionsrate. Solche akuten Stämme können daher besser in einer dichten Bevölkerung überleben, was zu der Theorie führte, dass die Entwicklung von *B. pertussis* mit der zunehmenden Urbanisierung des Menschen einherging und der Keim in Konkurrenz zu dem weniger spezialisierten Pathogen *B. bronchiseptica* trat, da ein Überleben in der Umwelt und eine geringe Schädigung des Wirtes kein Selektionsvorteil mehr waren (Bjornstad & Harvill, 2005; Lipsitch & Moxon, 1997).

Die unabhängige Entstehung der Wirtsspezifität bei *B. parapertussis* und dessen Koexistenz mit *B. pertussis* ist eine interessante Entwicklung, da sie vermutlich durch die Vermeidung von Kreuzimmunität ermöglicht wurde (Bjornstad & Harvill, 2005). Dies könnte z.B. die differentielle PTX-Expression oder die unterschiedliche Expression des O-Antigens erklären, welches von *B. pertussis* nicht gebildet wird (Middendorf & Gross, 1999). Beide Faktoren können von Vorteil sein, was die Vermeidung einer frühen Tilgung durch Neutrophile (Carbonetti *et al.*, 2003) bzw. den Schutz vor antimikrobiellen Peptiden (Banemann *et al.*, 1998) betrifft, aber beide Faktoren können auch eine antigenvermittelte Immunantwort des Wirtes auslösen.

In den letzten Jahren lässt sich zudem eine Anpassung von *B. pertussis* an eine durch Impfung hochimmunisierte Bevölkerung beobachten. Diese wird zum einen durch eine antigenische Divergenz von Virulenzfaktoren wie PTX, PRN (Cassiday *et al.*, 2000) und FIM (Tsang *et al.*, 2004) zwischen Vakzin-Stämmen und zirkulierenden Stämmen, zum anderen durch einen weitergehenden Genverlust bewirkt (Heikkinen *et al.*, 2007).

Ein weiterer interessanter Aspekt in der *Bordetella*-Evolution ist der vor kurzem aufgetretene humanpathogene Keim *B. holmesii* (Weyant *et al.*, 1995), der Anzeichen von HGT in Form eines DNA-Bereichs aufweist, welcher für die Biosynthese, den Export und die Aufnahme des Siderophors Alkaligin kodiert sowie mehrere IS481-Elemente trägt, so dass die Vermutung nahe liegt, dass eine laterale Übertragung des DNA-Bereichs von *B. pertussis* auf *B. holmesii* stattgefunden hat (Diavatopoulos *et al.*, 2006). Auch für die große Ähnlichkeit der 16S rRNA-Gene, welche eine engere Verwandtschaft zu *B. pertussis* vermuten lässt als die Untersuchung verschiedener Haushaltsgene aufzeigt, wird ein Gentransferereignis postuliert (Diavatopoulos *et al.*, 2006).

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Annotation des *B. petrii* Genoms ergab Hinweise auf das Vorhandensein einer Reihe von putativen genomischen Inseln, welche auf laterale Gentransferereignisse schließen lassen. Des Weiteren konnten einige putative Virulenzfaktoren, wie z.B. orthologe Gene zum virulenzregulatorischen BvgAS-ZKS der pathogenen *Bordetella*-Arten, detektiert werden.

Hinsichtlich evolutionärer Vorgänge im Bakteriengenom, für die der horizontale Gentransfer eine wichtige Rolle spielt, sollten die putativen genomischen Inseln von *B. petrii* näher untersucht werden. Die Isolation von *B. petrii* Varianten gab bereits Hinweise auf die genomische Variabilität dieses Bakteriums, weshalb es ein Ziel dieser Arbeit war, auf molekularer Ebene die Grenzen der genomischen Inseln, ihre Stabilität und ihre mögliche Übertragbarkeit auf pathogene Vertreter der Gattung *Bordetella* zu untersuchen.

Da *B. petrii* sich als Umweltkeim wesentlich von den human- und tierpathogenen Erregern seiner Gattung unterscheidet, stellte sich die Frage, welche Rolle putative Virulenzfaktoren bzw. ein orthologes System zum virulenzregulatorischen BvgAS-ZKS der pathogenen *Bordetella*-Arten in einem Umweltkeim spielen. Mittels *in silico* Analysen und Proteomstudien sollten daher die Struktur und Funktion des BvgAS-Systems in *B. petrii* untersucht werden, was weitere Einblicke in die evolutionären Tendenzen innerhalb der Gattung ermöglichen könnte.

Da der Keim sowohl in Assoziation mit anderen Organismen, wie z.B. dem Menschen, Schwämmen und Pflanzenwurzeln als auch frei in der Umwelt in Flusssediment vorgefunden wurde, sollte eine phylogenetische Analyse dieser Isolate erstellt werden, um zu untersuchen, wie sie sich in den Stammbaum der Gattung *Bordetella* eingliedern lassen.

3 Material

3.1 Geräte

2D-Gelelektrophorese	Ettan™ IPG-Phor, Amersham
	Hofer DALT Vertical System, Pharmacia
Autoklaven	Webeco
Brutschränke	Heraeus
Elektrophoresekammern	Institutswerkstatt; Biorad
Elektroporationsgerät	Mikropulser, Biorad
Fastprep	FP120, Thermo Savant
Flüssigkeitskühler	Model 100 Mini Chiller, Biorad; MultiTempIII, Pharmacia
Heizblöcke	Eppendorf-Thermostat 5320; Liebisch 2099DA
Magnetrührer	Assistent TMA 2070
Mikroskop	Leica DMR HC
Netzgeräte	Model 1000/500, Biorad; Consort E452
PCR-Gerät	T3 Thermocycler, Biometra
Peristaltikpumpe	Variable Speed Pump, Biorad
Pipetten	Gilson; Eppendorf
pH-Meter	WTW Weilheim
Photometer	Gene Quant II, Pharmacia; Ultrospec 2100pro, Pharmacia
	Klett Summerson
Pulsfeldgelelektrophorese	CHEF-DR II System (Drive Module, Electrophoresis Cell), Biorad
	Pulsewave 760 Switcher, Biorad
Realtime-PCR	DNA Engine Opticon™ System, MJ Research
Röntgenfilmentwickler	M35 X-Omat Prozessor, Kodak
Scanner	Epson Perfection 4990Photo
Schüttelinkubator	Infors; Clim-O-Shake, B. Braun Melsungen
Speed-Vac	Concentrator 5301, Eppendorf
Sterilbänke	NuAire™; GelAire; LaminAir, Heraeus
Taumlern	Heidolph
Ultraschallgerät	Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company
UV-Crosslinker	UV-Stratalinker 2400, Stratagene
UV-Leuchtkasten	Vilber Courmat
Vakuumpumpe	Neuberger
Videoprinter	Sony UP 860 CE
Vortexer	Reax 2000, Heidolph
Waagen	Kern EW; Kern ABS
Wasserbad-Inkubator	Infors
Zentrifugen:	
Kühlzentrifugen	Heraeus Megafuge 1.0R; Eppendorf 5417R; J2-21, Beckman;
	J25I-Avanti, Beckman Coulter
Tischzentrifugen	Biofuge 15, Heraeus; 4515C, Eppendorf

3.2 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung/Genotyp	Referenz/ Herkunft
<i>E. coli</i> DH5 α	Wildtypisches Isolat (Typ1); für effiziente Transformation; F-, Φ 80 / <i>dlacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK-, mK+), <i>supE44</i> , λ -, <i>tfi-1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA1</i> ;	Bethesda Research Laboratories (BRL)

<i>B. bronchiseptica</i> 7865	Wildtyp; Humanisolat; Sm ^r , Nal ^r	(Arico & Rappuoli, 1987)
<i>B. bronchiseptica</i> 7866	Phasenvariante von BB 7865 (241 bp Deletion in <i>bvgS</i>); Sm ^r , Nal ^r	(Monack <i>et al.</i> , 1989)
<i>B. bronch.</i> 7865 PS2	Wildtypderivat, nicht kartierte <i>TnphoA</i> Insertion auf dem Chromosom, Kan ^r , Sm ^r	(Banemann <i>et al.</i> , 1998)
<i>B. bronch.</i> 7865 PS2 GI3::tet ^R	<i>B. bronchiseptica</i> 7865 PS2 mit einer Integration der genomischen Insel GI3::tet ^R aus <i>B. petrii</i> GI3::tet ^R in tRNA45, Kan ^r , Sm ^r , Tet ^r	diese Arbeit
<i>B. petrii</i> DSM 12804	Wildtyp; Umweltisolat aus Flusssediment	(von Wintzingerode <i>et al.</i> , 2001)
<i>B. petrii</i> var g	<i>B. petrii</i> DSM 12804 Variante aus einem Langzeitwachstumsversuch in Mainwasser; große Kolonieform	diese Arbeit
<i>B. petrii</i> var k	<i>B. petrii</i> DSM 12804 Variante aus einem Langzeitwachstumsversuch in Mainwasser; kleine Kolonieform	diese Arbeit
<i>B. petrii</i> var f	<i>B. petrii</i> DSM 12804 Variante aus einem Langzeitwachstumsversuch in Mainwasser; Kolonien fließen ineinander	diese Arbeit
<i>B. petrii</i> GDH030510	Klinisches Isolat; stammt aus einem Patienten mit mandibularer Osteomyelitis	(Fry <i>et al.</i> , 2005)
<i>B. petrii</i> N122	Schwammisolat	(Sfanos <i>et al.</i> , 2005)
<i>B. petrii</i> N123	Schwammisolat	(Sfanos <i>et al.</i> , 2005)
<i>B. petrii</i> N134	Schwammisolat	(Sfanos <i>et al.</i> , 2005)
<i>B. petrii</i> R521	Schwammisolat	(Sfanos <i>et al.</i> , 2005)
<i>B. petrii</i> Δ <i>bvgA</i> ::tet ^R	<i>B. petrii</i> DSM 12804; 506 bp des <i>bvgA</i> Leserahmens deletiert; Tet ^r	diese Arbeit
<i>B. petrii</i> Δ <i>bvgAS</i> ::tet ^R	<i>B. petrii</i> DSM 12804; 5042 bp des <i>bvgAS</i> Lokus deletiert; Tet ^r	diese Arbeit
<i>B. petrii</i> GI3::tet ^R	<i>B. petrii</i> DSM 12804; Insertion einer Tetracyclin-Resistenzkassette an Position 1572678 im <i>B. petrii</i> Genom; Markierung von GI3	diese Arbeit

3.3 Zelllinien

Die Invasionsassays wurden unter Verwendung der folgenden permanenten Zelllinie durchgeführt: **P388D1 : mouse monocytes-macrophages**, DSMZ no.: ACC 288, Referenz: (Dawe & Potter, 1957). Aus einer DBA/2 Maus mit Methylcholanthren induziertem lymphoiden Neoplasma (P388) gewonnen. 1975 aufgrund ihrer Morphologie und Funktion als makrophagenähnlich charakterisiert (Koren *et al.*, 1975). Diese Makrophagen wachsen als Monolayer und haben eine Verdopplungszeit von etwa 24 h nachdem sie sich gesetzt haben.

3.4 Vektoren und rekombinante Plasmide

Vektor/ Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBluescript II KS (pKS)	Phagemid, CoIE1-Replikation, pUC19-Derivat; Amp ^r	Stratagene
pBR322	pMB1-Derivat, <i>rep</i> , <i>rop</i> , <i>Tn3-bla</i> , pSC101- <i>tet</i>	(Bolivar <i>et al.</i> , 1977)
pKS::tet	pKS enthält die ohne Schnittstellen amplifizierte und über „blunt-end“ Ligation klonierte 1391 bp große Tet ^R -Kassette aus pBR322 mit dem P ₂ Promotor.	diese Arbeit
pKS::tet _(Sma)	pKS enthält die über <i>Sma</i> I klonierte 1391 bp große Tet ^R -Kassette aus pBR322 mit dem P ₂ Promotor.	diese Arbeit
pKS::A1 tet _(Sma) A2	pKS enthält ein 479 bp großes <i>Sma</i> I/ <i>Eco</i> RI DNA-	diese Arbeit

	Fragment aus <i>bvgS1</i> und ein 521 bp großes <i>XbaI/SpeI</i> DNA-Fragment aus <i>hpt</i> , sowie die über <i>SmaI</i> klonierte 1391 bp große Tet ^R -Kassette aus pBR322 mit dem P ₂ Promotor.	
pKS::AS1 tet AS2	pKS::tet enthält ein 571 bp großes <i>EcoRI/PstI</i> DNA-Fragment aus der flankierenden Region von <i>bvgS2</i> und ein 635 bp großes <i>XbaI/SpeI</i> DNA-Fragment aus der flankierenden Region von <i>bvgS1</i>	diese Arbeit
pKS::I1 tet _(Sma) I2	pKS::tet _(Sma) enthält ein ein 417 bp großes <i>NotI/BcuI</i> DNA-Fragment und ein 400 bp großes <i>XhoI/EcoRI</i> DNA-Fragment aus GI3 von <i>B. petrii</i> DSM 12804.	diese Arbeit
pKS::bvgA	pKS enthält ein 1531 bp großes <i>XbaI/EcoRI</i> Fragment, welches <i>bvgA</i> mit flankierenden Regionen beinhaltet.	diese Arbeit
pKS::16S (N122)	pKS enthält 1475 bp des über „blunt-end“ Ligation klonierten 16S rRNA Gens aus dem Schwammisolat N122.	diese Arbeit
pKS::16S (N123)	pKS enthält 1475 bp des über „blunt-end“ Ligation klonierten 16S rRNA Gens aus dem Schwammisolat N123.	diese Arbeit
pKS::16S (N134)	pKS enthält 1486 bp des über „blunt-end“ Ligation klonierten 16S rRNA Gens aus dem Schwammisolat N134.	diese Arbeit
pKS::16S (R521)	pKS enthält 1496 bp des über „blunt-end“ Ligation klonierten 16S rRNA Gens aus dem Schwammisolat R521.	diese Arbeit

3.5 Oligonukleotide

3.5.1 Plasmidspezifische Oligonukleotide

Name	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Verwendung
T7	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'	pKS-Primer; PCR-Screening; Sequenzierung
T3	5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA-3'	pKS-Primer; PCR-Screening; Sequenzierung

3.5.2 Klonierungs- und Screening- Oligonukleotide

Name	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Verwendung
tet-Start- <i>SmaI</i>	5'-GGC <u>GCC CGG GAT</u> TCT CAT GTT TGA CAG CTT-3'	Amplifikation der Tet-Resistenzkassette aus pBR322; Southern Sonde
tet-End- <i>SmaI</i>	5'-GTC <u>GCC CGG GAT</u> ATG TTC TGC CAA GGG TT-3'	Amplifikation der Tet-Resistenzkassette aus pBR322; Southern Sonde
tet-Start	5'-ATT CTC ATG TTT GAC AGC TT-3'	Amplifikation der Tet-Resistenzkassette aus pBR322; Southern Sonde
tet-End	5'- ATA TGT TCT GCC AAG GGT T-3'	Amplifikation der Tet-Resistenzkassette aus pBR322; Southern Sonde
BvgAS- <i>PstI</i> -S2	5'-GGC <u>GCT GCA GGC</u> AAA TGA CAC TGA TGA CGC CC-3'	Konstruktion <i>B. petrii</i> Δ <i>bvgAS</i>

AS1- <i>EcoRI</i>	5'-GAC <u>GGA ATT CGA</u> GGC CAT AAC TGC CTG CG-3'	Konstruktion <i>B. petrii</i> Δ <i>bvgAS</i>
AS2- <i>XbaI</i> (<i>AatII</i>)	5'-GGC <u>ATC TAG A</u> (GA CGT C)TA CCG GGC TAT ACT GTC GTC G-3'	Konstruktion <i>B. petrii</i> Δ <i>bvgAS</i>
AS2- <i>SpeI</i>	5'-GTC <u>CAC TAG TCC</u> GCC AGC TGA TCG TCC GT-3'	Konstruktion <i>B. petrii</i> Δ <i>bvgAS</i>
BvgA1- <i>EcoRI</i> *	5'- GGC <u>GGA ATT CAA</u> CTC AGA CAT CGA TAG CGG C-3'	Konstruktion <i>B. petrii</i> Δ <i>bvgA</i>
BvgA1- <i>SmaI</i> **	5'-GAT <u>TCC CGG GCG</u> ACG ATG AGT ACG CTG GT-3'	Konstruktion <i>B. petrii</i> Δ <i>bvgA</i>
BvgA2- <i>XbaI</i> (<i>AatII</i>)	5'-GCA <u>TTC TAG A</u> (GA CGT C)GT CCA CCA AGG CGC CAA GCT GC-3'	Konstruktion <i>B. petrii</i> Δ <i>bvgA</i>
BvgA2- <i>SpeI</i> *	5'-GGG <u>CAC TAG TAA</u> CCG TCA GCA CTT ACA AA-3'	Konstruktion <i>B. petrii</i> Δ <i>bvgA</i>
tet1-fw	5'-CCA GGC AGG TAG ATG ACG AC-3'	PCR-Screening; Sequenzierung
tet2-rev	5'-AGT AGC GAA GCG AGC AGG AC-3'	PCR-Screening; Sequenzierung
BvgAS-Kontr(fw)	5'-GAT TGA AAT GAC AAA CGA AGG-3'	PCR-Screening; Sequenzierung
BvgAS-Kontr(rev)	5'-GAC AAA GCT CAA GGT CGA-3'	PCR-Screening; Sequenzierung
635-Kontroll-fw	5'-CGG GCA CAT TTA CGA TTA-3'	PCR-Screening; Sequenzierung
571-Kontroll-rev	5'-GTT ACC GAA TCC CGC GC-3'	PCR-Screening; Sequenzierung
AS2 Kontroll fw	5'-TAC GCA CTC AAC TAC GCC CG-3'	Chromosomaler Primer; PCR-Screening; Sequenzierung
AS1 Kontroll rev	5'-ATA CTT CCA ACG GCA CGG CGA-3'	Chromosomaler Primer; PCR-Screening; Sequenzierung
A2 Kontroll fw	5'-CGG AAG TCG CGC AAG TCA GA-3'	Chromosomaler Primer; PCR-Screening; Sequenzierung
A1 Kontroll rev	5'-CGC TTC CGC CAC CGT CAA C-3'	Chromosomaler Primer; PCR-Screening; Sequenzierung
AS-Screen-fw	5'-TCG CCG TGC CGT TGG AAG-3'	Amplifikation einer Southern Sonde zum Mutanten-Screen
AS-Screen-rev	5'- AGA GTA AAT AAT CAT GGA ACA G-3'	Amplifikation einer Southern Sonde zum Mutanten-Screen
A-Screen-fw	5'-CCT GGG TAA ACG CCT GGA A-3'	Amplifikation einer Southern Sonde zum Mutanten-Screen
A-Screen-rev	5'-TCC GAA CGC GAC ACC CTG-3'	Amplifikation einer Southern Sonde zum Mutanten-Screen
BvgA-rev	5'-CCA TCC TTC GTT GCG GCT-3'	Amplifikation einer Southern Sonde zum Mutanten-Screen
BvgA-fw	5'-ACG GTT TTG TTG CTG ATG AA-3'	Amplifikation einer Southern Sonde zum Mutanten-Screen
pKS-fw	5'-GAG AGG CGG TTT GCG TAT T-3'	Amplifikation einer Southern Sonde zum Mutanten-Screen
pKS-rev	5'-TAT CTA CAC GAC GGG GAG T-3'	Amplifikation einer Southern Sonde zum Mutanten-Screen
Ins1- <i>NorI</i>	5'-GAC <u>GGC GGC CGC</u> ATC TGG CAA AGC-3'	Konstruktion <i>B. petrii</i> GI3::tet ^R
Ins1- <i>BcuI</i>	5'-ATA <u>CTA GTC</u> ATC GCG TGA TCC TCG CGA A-3'	Konstruktion <i>B. petrii</i> GI3::tet ^R
Ins2- <i>EcoRI</i>	5'-ATG <u>AAT TCA</u> ATA CGC CCG AGA CCC GCG-3'	Konstruktion <i>B. petrii</i> GI3::tet ^R
Ins2- <i>XhoI</i>	5'-CAT <u>CTC GAG</u> AAA ACG GTG AAG GCC AGC-3'	Konstruktion <i>B. petrii</i> GI3::tet ^R
chrom I-Mut fw	5'-CGA CCG CGG CTA CGA GGG C-3'	Chromosomaler Primer; PCR-

		Screening; Sequenzierung
chrom I-Mut REV	5'-GCA GGG CGC CGG GGA ACA G-3'	Chromosomaler Primer; PCR-Screening; Sequenzierung

3.5.3 Oligonukleotide zur Sequenzierung von 16S rDNA

Name	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Verwendung
16S A1	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	Amplifikation; Sequenzierung
16S B1	5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	Amplifikation; Sequenzierung
16S B1(neu)	5'-AAA GGA GGT GAT CCA GCC G-3'	Amplifikation; Sequenzierung
16S ALBO	5'-CCG AAC CGC CTG CGC AC-3'	Sequenzierung
16S Seq Anf	5'-GAA GTA CCA AGA ATG TCA AAC-3'	Sequenzierung
16S Seq End	5'-CAC GCT CAC AAC CGA TCC CT-3'	Sequenzierung
16S Seq1	5'-GTA GGG TGC AAG CGT TAA TCG-5'	Sequenzierung
16S Seq2	5'-TTC GGT CCT TGG TAG CGC AG-3'	Sequenzierung
16S Seq out End	5'-CTG CGT GAA GTC GGA ATC G-3'	Sequenzierung
16S Seq out Anf	5'-GCC GCT CCA ATA GTG CGA-3'	Sequenzierung
16S Seq 209	5'-GAT TAG CTA GTT GGT GGG GT-3'	Sequenzierung

3.5.4 Oligonukleotide zur Herstellung von Southern Blot Sonden zur Untersuchung der genomischen Inseln

Name	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Verwendung
trna9 up2	5'-CAG CGT CCT GCC TTG GGT C-3'	Southern Sonde in GI1
trna9 up1	5'-GCA TCC TCC AAC AGC GCC T-3'	Southern Sonde in GI1
trna9 down1	5'-CGA ATC TGG GCG TAC AAA AAT G-3'	Southern Sonde außerhalb GI1
trna9 down2	5'-CCA ACG GAT GTG CC AAA ACG-3'	Southern Sonde außerhalb GI1
trna10 up1	5'-CTA CCC GTT CCA GCC GAG C-3'	Southern Sonde außerhalb GI1
trna10 up2	5'-CGC TTC TTG GGG GCT CTC A-3'	Southern Sonde außerhalb GI1
trna10 down1	5'-CGA TGT TGC CGC CCT ATG G-3'	Southern Sonde in GI1
trna10 down2	5'-CGC TTC TTG GGG GCT CTC A-3'	Southern Sonde in GI1
Int up1	5'-GCA TCA TTC TTG TTC TCG TG-3'	Southern Sonde in GI3
Int up2	5'-TTG GAG CGG GAA ACG AGA C-3'	Southern Sonde in GI3
Int down1	5'-TGT CAG CGA AAG CAG TGT CA-3'	Southern Sonde in GI2
Int down 2	5'-CGC AAC CAG CTA CGA CAT C-3'	Southern Sonde in GI2
trna11 up2	5'-TAT GTG GGC TGT TGT CTT CA-3'	Southern Sonde außerhalb GI3
trna11 up1	5'-CAG CCA GAT CGT CCC GCA-3'	Southern Sonde außerhalb GI3
trna11 down1	5'-TAC AGA CGA GAC ACC CCA G-3'	Southern Sonde in GI3
trna11 down2	5'-CGC TGT GAT CTA ACG ACG CT-3'	Southern Sonde in GI3
B VI up1	5'-CCG TGT GAG CGA ACC CTA TC-3'	Southern Sonde in GI6
B VI up2	5'-CGC TGT GGC TGG GTG AGA T-3'	Southern Sonde in GI6
B VI down1	5'-GTC AGC CGG GGC GGC AGC A-3'	Southern Sonde außerhalb GI6
B VI down2	5'-GCG ATA TCG GGC ACC ACC AC-3'	Southern Sonde außerhalb GI6
trna44 up1	5'-GCT TTG CTG GCC ATC GTG CG-3'	Southern Sonde außerhalb GI6
trna44 up2	5'-GCT TGC CCG TCT TGA TGT GG-3'	Southern Sonde außerhalb GI6
trna44 down1	5'-ACC GTA TTG TTG CTG GAG GAG-3'	Southern Sonde in GI6
trna44 down2	5'-AGC AGC AGC AGA CGT AGA CC-3'	Southern Sonde in GI6
GI3-Anf fw	5'-GAC ATC ATC CGC TCC CTG GC-3'	Southern Sonde in GI2
GI3-Anf Rev	5'-ACT TAC CGT CTT CCT GCT CGT-3'	Southern Sonde in GI2
GI3-End fw	5'-TGC CCT ACG GAT CGC CAT AAC-3'	Southern Sonde in GI2
GI3-End Rev	5'-CCT TGC GAT AGC GAA AAC GGT A-3'	Southern Sonde in GI2
GI1-End fw	5'-GAT GGT GTT GTC GTT GCT GAA G-3'	Southern Sonde in GI1

GI1-End Rev	5'-GAA GCC CCA AAC AGA ATG AAA TG-3'	Southern Sonde in GI1
nach GI1 fw	5'-GTA TCG GGT AAG CAG AGG GT-3'	Southern Sonde in GI1
nach GI1 Rev	5'-ACC CAC TGT TCA ATA GCA TAA G-3'	Southern Sonde in GI1
GI2-End fw	5'-AGG CGG CGG TCA TCC ACT T-3'	Southern Sonde außerhalb GI2
GI2-End Rev	5'-CAA CAA GGG AAT GCG GGT AAT-3'	Southern Sonde außerhalb GI2
Int-B13 fw	5'-CGA GAA GCG CAA GGC GTT CAC-3'	Southern Sonde, Nachweis der Int-B13 Integrase
Int-B13 REV	5'-ATC GGC CCA GTC CTG CAT CAT-3'	Southern Sonde, Nachweis der Int-B13 Integrase

3.5.5 Oligonukleotide für Realtime-PCR

Name	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Verwendung
rrna-JP-fw	5'- ATG CGG AGG AAC ACC GAT GGC GA-3'	Amplifikation des Realtime-Standards
rrna-JP-Rev	5'-ACC GAA GTC CCC AAC AGC TAG TT-3'	Amplifikation des Realtime-Standards
rrna-f	5'-CAG TGA AAT GCG TAG AGA TGC-3'	Amplifikation der 16S rRNA
rrna-R	5'-TCG TTT AGG GCG TGG ACT AC-3'	Amplifikation der 16S rRNA
3465-f	5'- TGC CAT CGA ATT CCT GCT GTG-3'	Amplifikation von b_petrii_3465
3465-R	5'-TGC ATT GGG CGG GGT CGA AA-3'	Amplifikation von b_petrii_3465
2282-f	5'-ACC GTG GAC ATC GGC AAC CT-3'	Amplifikation von b_petrii_2282
2282-R	5'-AGC GAC AGG GCA TAC CAC TG-3'	Amplifikation von b_petrii_2282
4085-f	5'-GCC ACG CCA ATC ACA GCC T-3'	Amplifikation von b_petrii_4085
4085-R	5'-CTT GGT AAA GGC ATC GCG AAA-3'	Amplifikation von b_petrii_4085
0464-f	5'-CGG GCA TCA GCT ACG ACC AG-3'	Amplifikation von b_petrii_0464
0464-R	5'-GAA GGA GTA GCC GAC GCC GA-3'	Amplifikation von b_petrii_0464
4236-f	5'-GCT GAT ATC GAT GCG TTG TT-3'	Amplifikation von b_petrii_4236
4236-R	5'-GTC CCC GAA CCA GCA AAG AA-3'	Amplifikation von b_petrii_4236
2667-f	5'-CGT CCG GCG GCG TGT TCA A-3'	Amplifikation von b_petrii_2667
2667-R	5'-GCT GCC CCA CTT GGC GTT GA-3'	Amplifikation von b_petrii_2667
0087-f	5'-TTC TGA TGC TCG ACG GCC TG-3'	Amplifikation von b_petrii_0087
0087-R	5'-GAT GGC TTC TTT TAC GGT GGC-3'	Amplifikation von b_petrii_0087
4722-f	5'-CTA CCA GCG CCA CTA TTT CA-3'	Amplifikation von b_petrii_4722
4722-R	5'-CGC CAC CCA GTT GCA CAA TG-3'	Amplifikation von b_petrii_4722
2539-f	5'-TCG TAT GCG TGT CGG TCA AT-3'	Amplifikation von b_petrii_2539
2539-R	5'-CTT GTC GAC CAG CAT GCC CA-3'	Amplifikation von b_petrii_2539
2123-f2	5'-CAT TAC CAA CCT GAA GAA CAC G-3'	Amplifikation von b_petrii_2123
2123-R2	5'-CAT CGG TGC CGA GCG AAA TTT-3'	Amplifikation von b_petrii_2123

3.5.6 Sonstige Oligonukleotide

Name	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Verwendung
BBbvgS fw	5'-CGC CTG AGT GTT CCC TAC G-3'	Nachweis von <i>B.b.</i> spez. DNA
BBbvgS Rev	5'-GAA GTA GCG GTT GAC GTA GTA-3'	Nachweis von <i>B.b.</i> spez. DNA
trna45-fw	5'-CCG TCT CCA ATC CCA AGG C-3'	<i>B.b.</i> tRNA Oligos; Nachweis der Integration von GI3 in <i>B.b.</i> tRNA45; Amplifikation und Sequenzierung
trna45-Rev	5'-CTG GAA CAA GAA GGC CCG C-3'	<i>B.b.</i> tRNA Oligos; Nachweis der Integration von GI3 in <i>B.b.</i> tRNA45; Amplifikation und Sequenzierung
trna44-fw	5'-GCG ATA GGC AAA GCG GCA TT-3'	<i>B.b.</i> tRNA Oligos

trna44-Rev	5'-CGC TGG AGA TGC TGG ACG AT-3'	<i>B.b.</i> tRNA Oligos
trna08-fw	5'-CCG CCA TTG TCG AGA AAC TG-3'	<i>B.b.</i> tRNA Oligos
trna08-Rev	5'-AGC GGC GTT CTA TGC GTG G-3'	<i>B.b.</i> tRNA Oligos
trna02-fw	5'-GCG TGC TGC TTA CCC TCG G-3'	<i>B.b.</i> tRNA Oligos
trna02-Rev	5'-CAG TTC GCC CTT GTC GCC T-3'	<i>B.b.</i> tRNA Oligos
18bp Kon fw	5'-GGG CAG CAA GGT TCC GGT AGG TC-3'	Amplifikation und Sequenzierung der Integrationsstelle von GI1-3 in <i>B. petrii</i>
18bp Kon REV	5'-GAA TCC GGC ATG TAA GAA GGG GCG-3'	Amplifikation und Sequenzierung der Integrationsstelle von GI1-3 in <i>B. petrii</i>
Extern rev	5'-TTG AGC GAG GTC AAA TCC TGG GTG G-3'	Nested Primer zur Amplifikation der Integrationsstelle von GI1-3
Extern fw	5'-GCG GAC TCC GGG GAG GATT CT GAT-3'	Nested Primer zur Amplifizierung der Integrationsstelle von GI1-3
GI6 out (Rev)	5'-GAT AGG GTT CGC TCA CAC GGC-3'	Ringbildungs-PCRs
GI6 out (fw)	5'-CTC CTC CAG CAA CAA TAC GG-3'	Ringbildungs-PCRs
GI1 out (fw)	5'-TAC GGA CCT TCT CGG CGG-3'	Ringbildungs-PCRs
GI1 out (Rev)	5'-GAC CCA AGG CAA GAC GCT G-3'	Ringbildungs-PCRs
GI1 out (fw)*	5'-ATT ACC CGC ATT CCC TTG TTG-3'	Ringbildungs-PCRs
GI2 out (fw)	5'-CTC TGC CGT CCC TCC TTG-3'	Ringbildungs-PCRs
GI2 out (Rev)	5'-TAC GAC AGT TGA CCA CAG TTG-3'	Ringbildungs-PCRs
GI3 out (fw)	5'-TCA GCC CCA GCA ACT ATC C-3'	Ringbildungs-PCRs
tRNA10 (Rev)	5'-TCA AGA CCA TCG TAT AGC GG-3'	Ringbildungs-PCRs
Nested GI1 Rev	5'-ATG AAG ACC CAA ATC GAC TG-3'	Ringbildungs-PCRs
Nested GI1 fw	5'-AGG TGC AGG TAG GGG TTG T-3'	Ringbildungs-PCRs
Nested GI1 fw*	5'-CAC GCC ACG ACA ATC ATC AG-3'	Ringbildungs-PCRs
Nested GI3 fw	5'-TCG TCA TGG TTC CCG CTC AG-3'	Ringbildungs-PCRs
Nested GI2 fw	5'-TTT CGT AGA CAG GGC GTT TTC-3'	Ringbildungs-PCRs
GI2 out fw Neu	5'-TCG TTG ACC TCG CTC CTC CA-3'	Ringbildungs-PCRs
GI2out fw (long)	5'-TGA CAC TGC TTT CGC TGA CAC-3'	Ringbildungs-PCRs
trna10REV 2	5'-TGC CTA CTC TAT ACT CGC CGC CC-3'	Ringbildungs-PCRs
trna10 REV (long)	5'-CGG TGT AAT TTC GTG CTG CAG-3'	Ringbildungs-PCRs
GI3 out fw(neu)	5'-GTA TTC CTG TGC CTA GAT TGG-3'	Ringbildungs-PCRs
GI3 out REV2	5'-AGG TCT AGG AAA ACT GGG CGA ATC-3'	Ringbildungs-PCRs
GI3 out fw (long)	5'-GTT CGT TGC AAT AGC CGC CC-3'	Ringbildungs-PCRs
GI4 cycle Rev	5'-ATG AAC ACC CGG CGA CCC-3'	Ringbildungs-PCRs
GI4 cycle fw	5'-GAG CTA ACC TAC TGT CCC AT-3'	Ringbildungs-PCRs
GI4 Nested fw	5'-GAT GCC GCC AAG AGC CGC CT-3'	Ringbildungs-PCRs
GI4 Nested Rev	5'-GAT GAC GCC CTG ATA GCC TTC-3'	Ringbildungs-PCRs
GI5 Anf Rev	5'-GTT TTG GGA TGT TTT GAA GCG TG-3'	Ringbildungs-PCRs
GI5 End fw	5'-CGG TCG AAG AAG CCA GCA GT-3'	Ringbildungs-PCRs
GI5 Nested Rev	5'-CCC GTC GTT CAG CAT GTA TTC TT-3'	Ringbildungs-PCRs
GI5 Nested fw	5'-ATC CAG CAA CGG GCG AAG TAT T-3'	Ringbildungs-PCRs
GI7 Anf Rev	5'-TTG AGA CGA CTA TGA ACC CAG-3'	Ringbildungs-PCRs
GI7End fw	5'-CGC CCA TTG CCA CGA CCG-3'	Ringbildungs-PCRs
GI7 Nested fw	5'-GTG ATC CGT CGT CTT TCC AAC A-3'	Ringbildungs-PCRs
GI7 Nested Rev	5'-GGT CTT GGT GCC TTG ATG TTT G-3'	Ringbildungs-PCRs
GI7End fw(neu)	5'-CAA GCC CCA CGT AGC GAT TA-3'	Ringbildungs-PCRs

Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden mit H₂O_{dest.} auf 50 µM eingestellt.

3.6 Verbrauchsmaterialien

3.6.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck, Roth, Bioproducts, Roche, Serva, Aldrich, Fulka, Oxoid, Riedel de Haan und Sigma bezogen. Nährstoffe und Agar wurden von Difco und Gibco geliefert.

3.6.2 Enzyme

DNA-Ligasen, Polymerasen, Restriktionsendonukleasen und DNA-modifizierende Enzyme wurden mit den dazugehörigen Puffern von den Firmen Amersham Biosciences, Q-Biogene, New England Biolabs, Promega, Stratagene, Roche, Genaxxon und MBI Fermentas geliefert.

3.6.3 Molekularbiologische Kits

Nucleobond® AX100 Purification of Plasmids (Macherey&Nagel)
 QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen)
 ECL™ direct nucleic acid labelling and detection Kit (Amersham)
 RNeasy® Mini Kit (Qiagen)
 SuperScript™ II RT (Invitrogen)
 DNA-free™ DNase Kit (Ambion)
 qPCR Core Kit for SYBR® Green I (Eurogentec)

3.7 Wachstumsmedien und Zusätze

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

3.7.1 Wachstumsmedien

<u>LB-Medium</u> (lysogeny broth): (pH 7,0)	Select-Peptide	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	<hr/>	
	ad 1 l H ₂ O _{dest.}	

<u>LB-Platten:</u>	LB-Medium	1 l
	+ Agar	15 g

<u>Bordet-Gengou-Platten</u> (BG-Platten): (pH 7,6)	Bordet-Gengou-Agar Basis	30 g
	Glycerin	10 g
	<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.

<u>5 x Stainer Scholte Medium</u> (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 6 H ₂ O	0,5 g

Material

Tris	7,5 g
<hr/>	
ad 1 l H ₂ O _{dest.}	

Mit HCl auf pH 7,6 einstellen

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

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

<u>100 x SS-Supplement:</u>	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.

<u>SS-Platten:</u>	1 x SS Medium	500 ml
	+ Agar	7,5 g

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen des SS-Agars auf etwa 45 - 50°C werden folgende Bestandteile steril zugegeben:

CaCl ₂ (10 mg/ml)	1 ml
Casaminoacids (100 mg/ml)	5 ml
Cyclodextrin (50 mg/ml)	5 ml
100 x SS-Supplement	5 ml
defibriertes Pferdeblut	25 ml

<u>Charcoal-Agar:</u>	Charcoal-Agar	62,5 g
<hr/>		
		ad 1 l H ₂ O _{dest.}

Zunächst das Wasser vorlegen und dann die abgewogene Menge Charcoal-Agar unter Rühren einrieseln lassen, damit sich keine Klumpen bilden.

<u>SOC-Medium:</u> (pH 7,0)	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	2,5 g
	NaCl	0,25 g
	1 M KCl	1,25 ml
	1 M MgCl ₂	5 ml
	40 % Glukose	5 ml
<hr/>		
		ad 500 ml H ₂ O _{dest.}

Zellkultur-Medium: RPMI 1640 + L-Glutamin (GIBCO, Invitrogen Cell Culture)
+ 50 ml hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum

<u>20 x PBS:</u> (pH 7,2)	NaCl	160 g
	KCl	4 g
	Na ₂ HPO ₄	23 g
	KH ₂ PO ₄	4 g
	<hr/>	
	ad 1 l H ₂ O _{dest.}	

Für 1 x PBS 1:20 verdünnen und autoklavieren. Für 1 x PBS + Ca²⁺ + Mg²⁺ zusätzlich 20 x Ca²⁺/ Mg²⁺- Lösung in einer 1:20-Verdünnung nach dem Autoklavieren steril zum 1 x PBS zugeben.

<u>20 x Ca²⁺/ Mg²⁺- Lösung:</u>	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,5 g
	CaCl ₂	0,5 g
	<hr/>	
	ad 250 ml H ₂ O _{dest.}	

3.7.2 Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika werden in H₂O_{dest.} oder/und Ethanol gelöst und anschließend sterilfiltriert. Antibiotikallösungen werden bei -20°C gelagert. Für Zellkulturen werden speziell ausgezeichnete Antibiotika verwendet und die entsprechenden Lösungen im Kühlschrank aufbewahrt.

Antibiotikum	Konz. der Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O _{dest.}	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O _{dest.}	50 µg/ml
Tetracyclin	12,5 mg/ml in H ₂ O _{dest.}	12,5 µg/ml
Chloramphenicol	100 mg/ml in 50 % EtOH	100 µg/ml
Streptomycin	100 mg/ml in H ₂ O _{dest.}	100 µg/ml
Polymyxin B	50 mg/ml in H ₂ O _{dest.}	100 µg/ml
Gentamycin	50 mg/ml (gebrauchsfertige Lösung)	100 µg/ml

3.8 Molekulargewichtsmarker

Gene Ruler™ 1 kb DNA Leiter, MBI

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

Lambda Ladder PFG Marker, New England Biolabs

Fragmentlängen: 1018,5 kb - 970 kb - 921,5 kb - 873 kb - 824,5 kb - 776 kb
727,5 kb - 679 kb - 630,5 kb - 582 kb - 533,5 kb - 485 kb
436,5 kb - 388 kb - 339,5 kb - 291 kb - 242,5 kb - 194 kb
145,5, kb - 97 kb - 48,5 kb

Broad Range Protein Marker, Biorad

Fragmentlängen: 200 kDa - 116,25 kDa - 97,4 kDa - 66,2 kDa - 45 kDa - 31 kDa
21,5 kDa - 14,4 kDa - 6,5 kDa

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Isolierung, Amplifikation und Aufreinigung von DNA

4.1.1.1 Isolierung von chromosomaler DNA

Die hier beschriebene Methode stellt eine schnelle Art der DNA-Präparation dar, wenn die nachfolgenden Arbeiten keinen allzu hohen Reinheitsgrad der DNA erfordern.

1,5 ml einer Übernachtskultur werden für 2 min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert (max. rpm, RT) und das Pellet in 480 µl Lyse-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µl Lysozym (50 mg/ml in Lysepuffer) wird die Probe für 15 min auf Eis inkubiert. Dann werden 10 µl 10 % SDS und 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben und der Ansatz bei 55°C im Heizblock inkubiert, bis die Lösung klar ist. Dieser Schritt kann einige Stunden dauern oder auch über Nacht erfolgen. Ist die Lösung nach 1 h immer noch sehr trüb, können zusätzliches SDS und Proteinase K zugegeben werden. Zur Präzipitation der DNA werden 500 µl Isopropanol zugesetzt und die DNA als weißliches Gespinnst ausgeschüttelt. Die DNA wird nun mit einer gelben Pipettenspitze entnommen und nacheinander in 96 % und 70 % EtOH gewaschen. Nach Lufttrocknen wird die DNA in 200 - 500 µl TE-Puffer (pH 7,4) gelöst und mit 1 µl RNase (10 mg/ml) versetzt.

Lyse-Puffer: 100 mM Tris pH 8.0
 5 mM EDTA
 200 mM NaCl

TE-Puffer: 10 mM Tris
 1 mM EDTA
 pH 7,4

Von Lysozym, Proteinase K und RNase werden jeweils Stocklösungen hergestellt; diese werden aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

4.1.1.2 Plasmidpräparation mit dem Nucleobond® AX100 Midi-Kit

Mit dem Kit von Macherey & Nagel erfolgt die Isolierung der Plasmid-DNA chromatographisch über eine Anionen-Austauschersäule, welche die Präparation von bis zu 100 µg DNA aus 10 - 100 ml Bakterienkultur ermöglicht.

Alle verwendeten Lösungen sowie Säulen und Filter werden im Kit gebrauchsfertig geliefert. Für die Isolierung eines „high copy“ Plasmids werden 100 ml einer Übernachtskultur in zwei 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (15 min bei 6000 rpm und 4°C). Die Bakterienpellets werden jeweils 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 RT 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 nun auf eine zuvor mit 2,5 ml N2-Puffer äquilibrierte Säule gegeben. Die Säule wird 2 x mit je 5 ml N3-Puffer gewaschen, bevor durch Zugabe von 3 ml N5-Puffer die Plasmid-DNA eluiert wird. Zur Präzipitation der Plasmid-DNA fügt man 0,7 Vol. Isopropanol zum Eluat und zentrifugiert 30 min bei 14.000 rpm und 4°C. Um die Ausbeute zu erhöhen, kann nach Zugabe des Isopropanols noch ein Inkubationsschritt auf Eis erfolgen. Das DNA-Pellet wird mit 2 ml 70 % EtOH gewaschen und nach dem Trocknen in 3 x 20 µl sterilem H₂O_{dest.} aufgenommen. Konzentration und Reinheit werden wie unter 4.1.1.3 beschrieben bestimmt. Die gelöste Plasmid-DNA wird bei -20°C aufbewahrt.

4.1.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dadurch wird eine photometrische Bestimmung ihrer Konzentration und Reinheit möglich.

Die DNA-Probe wird 1:50 mit H₂O_{dest.} verdünnt und ihre Extinktion bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm photometrisch bestimmt. Die Konzentration wird anhand folgender Formel berechnet:

DNA-Konzentration (µg/ml): OD₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x 50

Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ gibt dabei den Reinheitsgrad der Probe an und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

4.1.1.4 Herstellung eines Zellysats zum Mutanten-Screening mittels PCR

Dieses Verfahren ermöglicht eine schnelle Analyse der erhaltenen Klone eines Transformationsansatzes. Dabei werden die Bakterien nach dem Zellaufschluß durch Erhitzen direkt in der PCR-Reaktion eingesetzt. In 50 µl H₂O_{dest.} gibt man Bakterien, die man durch Antippen der gewünschten Kolonie mit einer gelben Pipettenspitze gewonnen hat. Diese Suspension wird für 10 min bei 110°C aufgeköcht, kurz abzentrifugiert und bis zur Verwendung auf Eis gestellt. Für einen 50 µl PCR-Ansatz werden 2 µl Lysat eingesetzt.

4.1.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1988)

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 95°C), Primer-Hybridisierung (bei einer Annealingtemperatur, die von den verwendeten Primern abhängig ist) und Primer-Elongation (bei 72°C) ermöglicht die exponentielle Vermehrung des DNA-Fragments. Die Funktionalität der Oligonukleotid-Primer hängt von der Art und Menge ihrer Sekundärstrukturen sowie von ihrem GC-Gehalt ab, der zwischen 40 – 60 % liegen sollte. Durch Anhängen von Schnittstellen an die spezifische Primersequenz lässt sich die zu amplifizierende Region modifizieren.

Die Schmelztemperaturen für Oligonukleotide, die kürzer als 25 bp sind, lassen sich anhand folgender Formel näherungsweise bestimmen:

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

Die optimale Annealingtemperatur liegt etwa 2 - 5°C darunter.

Standard-PCR-Ansatz mit Taq-Polymerase (Molzym):

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

Die PCR wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. Initiale Denaturierung	3 min 95 °C
2. Denaturierung	1 min 95 °C
3. Annealing	30 s - 1 min 50-70°C
4. Elongation	1 kb/min 72 °C
5. Abschlusselongation	4 min 72 °C

Die Schritte 2 - 4 werden 30 mal wiederholt. Die Elongationszeiten können je nach Größe des zu erwartenden PCR-Produkts variiert werden. Im Allgemeinen synthetisiert die Taq-Polymerase 1 kb in einer Minute.

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 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. Dies spielt eine Rolle, wenn das PCR-Produkt sequenziert werden soll, außerdem 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 (ca. 500 bp/min). Im Gegensatz zur Taq-DNA-Polymerase synthetisiert die Pfu-DNA-Polymerase PCR-Produkte mit glatten Enden, die direkt für eine „blunt-end“ Ligation eingesetzt werden können.

Zur Überprüfung der PCR Reaktion werden im Anschluss jeweils 5 - 10 µl davon auf ein Agarosegel aufgetragen (4.1.2.1). Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgt mit Hilfe der QIAquick-Säulen (4.1.1.6 und 4.1.1.7).

4.1.1.6 Reinigung von PCR-Produkten mit dem QIAquick® PCR Purification Kit

Dieses Kit der Firma Qiagen eignet sich zur Aufreinigung bzw. Umpufferung von DNA-Molekülen mit einer Größe zwischen 100 bp und 10 kb. 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 trocknet die Säule vollständig. Die Elution der DNA von der Säulenmatrix erfolgt mit 30 - 50 µl H₂O_{dest.}. Das Eluat wird bei -20°C gelagert.

4.1.1.7 Elution und Reinigung von PCR-Produkten aus Agarosegelen

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 (Qiagen) 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 erneut für 1 min zentrifugiert. Die Elution der DNA erfolgt mit 30 - 50 µl H₂O_{dest.}. Das Eluat wird bei -20°C aufbewahrt.

4.1.2 Auftrennung von DNA

Aufgrund ihrer negativen Ladung lassen sich linearisierte DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld auftrennen und wandern dabei zur Anode. Als Trägersubstanzen werden Polyacrylamid- oder Agarosegele verwendet, die nach Auspolymerisierung ein mehr oder weniger engmaschiges Netz bilden, abhängig von der jeweiligen Konzentration der Trägersubstanz. Polyacrylamidgele haben kleinere Poren als Agarosegele und eignen sich daher besser für hochauflösende Trennverfahren z.B. im niedermolekularen Bereich (< 500 bp). Da Agarosegele einfach und schnell herzustellen sind, eignen sie sich besonders gut für die standardmäßige Auftrennung von doppelsträngiger DNA, wie z.B. von PCR-Produkten oder für Southern Blot Analysen.

Um DNA-Moleküle sichtbar zu machen, wird dem Gel der Farbstoff Ethidiumbromid (1 µg/ml) zugesetzt, welcher zwischen die Basen der Nukleinsäuren interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert.

4.1.2.1 Agarosegelelektrophorese

Kleine DNA-Moleküle wandern im elektrischen Feld mit einer Geschwindigkeit, die proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts ist. Bei einem 1 %igen Agarosegel erreicht man die optimale Trennung von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 400 bis 1000 bp. Für kleinere Fragmente kann man den Agarosegehalt bis auf 2 % erhöhen.

Für ein 1 %iges Agarosegel wird 1 g Agarose in 100 ml 1 x TBE- Puffer aufgekocht bis sie vollständig gelöst ist. Ist die Agarose auf ca. 50°C abgekühlt, wird Ethidiumbromid (1 µg/ml) zugesetzt und die Lösung in einen vorbereiteten Gelschlitten gegossen, wo das Gel auspolymerisieren kann.

In der Elektrophoresekammer wird das Gel mit Laufpuffer (1 x TBE) überschichtet, die mit 2,5 x HSE versetzten Proben sowie ein Größenstandard (1 kb DNA Leiter) aufgetragen und die DNA bei 150 V aufgetrennt. Die Auswertung erfolgt unter UV-Licht.

10 x TBE-Puffer: 890 mM Tris-HCl
 890 mM Borsäure
 2 mM EDTA

2,5 x HSE-Puffer: 4 M Harnstoff
 50 mM EDTA
 50 % Saccharose
 0,1 % Bromphenolblau

4.1.2.2 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Bei der konventionellen Gelelektrophorese bleiben sämtliche DNA-Moleküle, die über 30 kb groß sind, zusammen und wandern dabei ungewöhnlich schnell. Um große Moleküle von 20 kb – 2000 kb aufzutrennen, wird das Prinzip der Pulsfeldgelelektrophorese angewandt. Hierbei wird ein pulsierendes elektrisches Feld erzeugt, indem die Feldrichtung in bestimmten Abständen gewechselt wird. Kommt ein Vorwärtsimpuls, linearisiert sich das DNA-Molekül und kann im Gel wandern, bricht das Feld kurzzeitig zusammen, beginnt das Molekül sich in eine globuläre Form zusammenzuziehen. Wählt man eine geeignete Pulsfrequenz, können sich die Moleküle eines bestimmten Größenbereichs in Resonanz mit den Pulsen falten und entfalten und kommen dann im Gel deutlich voran. Im Gegensatz dazu werden sehr viel größere Moleküle nicht nennenswert voran kommen, da sie mehr Zeit brauchen, sich im umgepolten Feld neu zu orientieren. Kleinere Moleküle hingegen haben genügend Zeit sich zu falten und zu entfalten, so dass sie schnell zur anderen Seite des Gels wandern können.

Das CHEF-DR II System von Biorad liefert durch die spezielle Geometrie der Elektrode ein sehr gleichförmiges Feld, was in sehr geraden Spuren resultiert.

Zur Apparatur gehört eine Elektrophoresekammer mit hexagonal angeordneten Elektroden, ein Drive Module, ein Pulsgenerator (Pulsewave® 760 Switcher), sowie eine Peristaltikpumpe und ein Flüssigkeitskühler (Model 1000 Mini Chiller). Zusätzlich wird noch eine Stromquelle benötigt, die sowohl an den Pulsgenerator als auch an das Drive Modul angeschlossen wird. (siehe Abbildung 4-1)

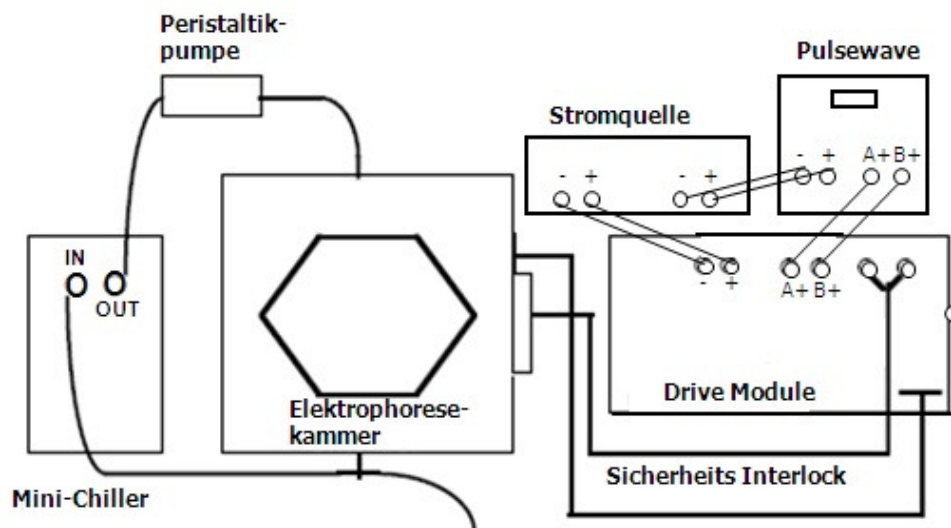


Abbildung 4-1 Schematischer Aufbau der PFGE Apparatur

4.1.2.2.1 Isolierung von chromosomaler DNA in LMP (Low Melting Point)-Agarose

Bei den üblichen DNA-Präparationsmethoden können doppelsträngige Moleküle erheblich geschert oder gebrochen werden. Man erhält dabei meist Moleküle einer Länge von maximal 200 kb. Will man ganze Chromosomen oder sehr große genomische Fragmente untersuchen, sollten solche zufälligen Brüche möglichst vermieden werden, weshalb PFGE-Proben *in situ* präpariert werden. Die Agarose schützt zum einen die langen DNA-Moleküle, zum andern ist sie permeabel für Puffer und Enzyme zur gezielten Manipulation der DNA.

20 ml einer logarithmisch gewachsenen Bakterienkultur werden mit 100 µg/ml Chloramphenicol (10 mg/ml) versetzt und ca. 30 min weiter inkubiert. Dieser Schritt ist optional und soll die laufende chromosomale Replikation synchronisieren und weitere Replikationsrunden inhibieren.

10 ml der Kultur werden für 15 min bei 4°C und 6000 rpm abzentrifugiert, das Pellet in 10 ml 20 mM NaCl-Puffer gewaschen und dann in 2 ml NaCl-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wird nun auf ca. $4,5 \times 10^9$ Zellen/ml eingestellt. 1 ml der Suspension wird in einem 2 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und dieses kurz im 50°C Wasserbad vorgewärmt. Nun wird 1 ml 50°C warme 2 %ige LMP-Agarose in H₂O_{dest.} zugegeben und die Suspension in abgedichtete Aluminium-Schienen pipettiert. Nach 20 minütiger Inkubation im Kühlschrank wird die bakterienhaltige Agarose in ca. 1-2 mm breite Streifen geschnitten und diese in 20 ml frischem Lysozym-Puffer aufgenommen. Die Proben werden für 2 h bei 37°C leicht geschwenkt, dann wird der Puffer abgesaugt und durch 20 ml Waschpuffer ersetzt. Nach 15 min bei RT wird der Waschpuffer abgesaugt und 20 ml frischer Proteinase K-Puffer zugegeben. Die Proteinase K-Behandlung erfolgt über Nacht bei 50°C im Wasserbad. Nach Entfernen des Proteinase K-Puffers wird nochmals in 20 ml Waschpuffer für 1 h bei RT inkubiert und dann noch 3 - 5 mal für 1-2 h in TE-Puffer gewaschen.

Die Proben sind im Kühlschrank für mehrere Monate haltbar. Ein Restriktionsverdau kann nun angeschlossen werden.

<u>NaCl-Puffer:</u>	20 mM NaCl pH 7,2		
<u>Lysozym-Puffer:</u>	10 mM Tris-HCl 50 mM NaCl 0,2 % Na-Deoxycholat 0,5 % Laurylsarcosyl pH 7,2 1 mg/ml Lysozym frisch dazu	<u>Lysozym-Stock:</u>	50 mg/ml in H ₂ O _{dest.} aliquotieren, -20°C
<u>Proteinase K-Puffer:</u>	100 mM EDTA 0,2 % Na-Deoxycholat 1 % Laurylsarcosyl pH 8,0 1 mg/ml Proteinase K frisch dazu	<u>Proteinase K-Stock:</u>	20 mg/ml in H ₂ O _{dest.} aliquotieren, -20°C
<u>TE-Puffer:</u>	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,0		
<u>Waschpuffer:</u>	20 mM Tris-HCl 50 mM EDTA pH 7,2		
<u>Chloramphenicol:</u>	10 mg/ml in EtOH		

4.1.2.2 Restriktionsverdau eingebetteter DNA

Durch Diffusion der Restriktionsendonuklease in die Agarose kann man DNA gezielt manipulieren. Aufgrund der begrenzten Diffusionsraten im Agaroseblöckchen muß die DNA über längere Zeit mit hohen Konzentrationen von Restriktionsendonukleasen inkubiert werden. Hierfür werden 1 - 2 Gelstückchen mit einer blauen Einwegimpföse aus dem TE-Puffer gefischt und in 200 µl 1 x Restriktionspuffer überführt. Die Gelstückchen werden bei 48°C für 1 h im Puffer äquilibriert, dann werden 10 - 20 U des entsprechenden Restriktionsenzym zugesetzt (z.B. *XbaI*, *SpeI*) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Vor der Beladung des Gels erfolgt eine erneute Äquilibration der Gelstückchen in Laufpuffer für ca. 30 min bei RT.

4.1.2.3 Herstellung und Beladung eines PFC (Pulsefield Certified)-Agarosegels

Als Pulsfeldgele verwendet man im allgemeinen Agarosegele mit sehr großen Poren. Für ein 1 %iges Gel wird 1 mg PFC-Agarose in 100 ml 0,5 % TBE aufgekocht und gelöst. Der Schlitten wird auf einem tariierbaren Gießtisch aufgebaut und der Tisch mit einer Libelle austariert. Ist die Agarose auf ca. 50°C abgekühlt, kann das Gel gegossen werden und muss nun etwa 1 h auspolymerisieren.

4.1.2.4 Gellauf im CHEF-DR II System

Als Laufpuffer wird 0,5 % TBE-Puffer verwendet, dem 250 µl 1 M Thioharnstoff zugesetzt werden. Für einen Lauf werden ca. 2,5 l Puffer benötigt, wovon 100 ml für das Gel abgenommen werden und 10 - 20 ml für die Proben. Mit etwa 400 ml wird die Elektrophoresekammer gespült, bevor der restliche Puffer zur Äquilibration eingefüllt wird. Da Pulsfeldgele bei niedrigen Temperaturen laufen müssen um eine gute Auftrennung zu erzielen, sollte der Puffer rechtzeitig auf 12°C herunter gekühlt werden.

Bei der Beladung des Gels werden die Agaroseblöckchen luftblasenfrei in die Geltaschen gesetzt, die Taschen mit LMP-Agarose aufgefüllt und diese 10 min fest werden gelassen. Zusätzlich wird ein Größenstandard mit aufgetragen, der ebenfalls in Agarose eingebettet ist (Lambda Ladder 3.8). Nun wird das Gel für 30 min in der Elektrophoresekammer im Laufpuffer äquilibriert.

Um Fragmente im unteren und mittleren Größenbereich aufzutrennen, wird ein zweistufiges Programm gefahren:

Initial A-time	1 s
Final A-time	40 s
Ratio	1
Runtime	14 h
Mode	10

Initial A-time	50 s
Final A-time	90 s
Ratio	1
Runtime	10 h
Mode	11

Die Auftrennung kann über die Laufzeit, die Pulszeiten und die angelegte Spannung optimiert werden. (Dazu siehe auch: Pulswave® 760 Switcher, Instruction Manual 3.0). Ein Gellauf erfolgt mit einer Feldstärke von maximal 6 V/cm. Je geringer die Feldstärke gewählt wird, desto länger dauert der Lauf. Bei Läufen, die länger als 30 h dauern, sollte der Laufpuffer zwischendurch gewechselt werden.

Feldstärke	6 V/cm	5 V/cm	4 V/cm	3 V/cm	2 V/cm
Volt	200 V	167 V	133 V	100 V	67 V

Tabelle 4-1 Umrechnung von Feldstärke zur anzulegenden Spannung.

Nach dem Lauf wird die Elektrophoresekammer mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gespült und die Elektroden trocken getupft. Das Gel wird zur Dokumentation für ca. 30 min in einem Ethidiumbromidbad ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$ in $1 \times \text{TBE}$) gefärbt und unter UV-Licht fotografiert.

4.1.3 Klonierung von DNA

4.1.3.1 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind prokaryotische Enzyme, die Teile des Restriktions-Modifikationssystems von Bakterien darstellen. Mit ihrer Hilfe wird die DNA an spezifischen Erkennungssequenzen, oft Palindromen, durch Lösen von je einer Phosphodiesterbindung in jedem Strang gespalten. Auf diese Weise kann Fremd-DNA abgebaut werden, wohingegen die eigene DNA an diesen Erkennungsmotiven durch Modifikationen geschützt ist.

Bei optimalen Reaktionsbedingungen spaltet ein Unit Enzym $1 \mu\text{g}$ 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. Der Restriktionspuffer und die optimalen Inkubationsbedingungen werden wie vom Enzymhersteller empfohlen gewählt. Ein Standard-Restriktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Plasmid-DNA bzw. PCR-Fragment	1 - 2 μg
10 x Puffer	5 μl
Restriktionsenzym (10 U/ μl)	1 μl
ad 50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	

Der Ansatz wird bei der empfohlenen Temperatur für mehrere Stunden oder über Nacht inkubiert. Der Restriktionserfolg von Plasmid-DNA kann über ein Agarosegel kontrolliert werden. Eine nachfolgende Hitzebehandlung oder Aufreinigung der DNA (4.1.1.6) stoppt den Restriktionsverdau.

4.1.3.2 Filling-in Reaktion

Sollen die 5'-kohäsiven Enden eines DNA-Fragments nach der Amplifikation mit der Taq-Polymerase oder nach einem Restriktionsverdau aufgefüllt werden, wird eine Filling-in Reaktion mit dem Klenow-Fragment (Fermentas) der DNA-Polymerase I nach folgendem Standardansatz durchgeführt:

DNA-Fragment	50 μl
dNTPs (0,5 mM)	1 μl
10 x Reaktionspuffer	6 μl
Klenow-Fragment (10 U/ μl)	1 μl
ad 50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	

Der Ansatz wird für 15 min bei 30°C inkubiert und dann bei 75°C für 10 min abgestoppt oder direkt mit dem QIAquick® PCR Purification Kit von Qiagen aufgereinigt (4.1.1.6).

4.1.3.3 PNK-Behandlung von PCR-Fragmenten

Die Polynukleotid-Kinase überträgt das γ -Phosphat von ATP auf die 5'-OH-Gruppe von einzel- bzw. doppelsträngiger DNA und RNA. So können beispielsweise PCR-Produkte phosphoryliert werden, um leichter über „blunt-end“ Ligation in einen dephosphorylierten Vektor kloniert zu werden. Ein Standardansatz setzt sich wie folgt zusammen:

DNA-Fragment	48 μl
rATP (100 mM)	1 μl
10 x PNK PufferA	6 μl

T4 PNK (Fermentas) (10 U/ μ l)	1 μ l
ad 60 μ l H ₂ O _{dest.}	

Der Ansatz wird für 30 min bei 37°C inkubiert und dann bei 65°C für 20 min abgestoppt oder direkt mit dem QIAquick® PCR Purification Kit von Qiagen aufgereinigt (4.1.1.6) und in 2 x 25 μ l H₂O_{dest.} eluiert.

4.1.3.4 Dephosphorylierung

Nach dem Restriktionsverdau von Plasmid-DNA, die für eine Ligation eingesetzt werden soll, kann eine Phosphatase-Behandlung sinnvoll sein, um das Auftreten von Religanden zu reduzieren. Die CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) ist in den vom selben Hersteller vertriebenen Restriktionspuffern aktiv und kann direkt zum entsprechenden Restriktionsansatz zugegeben werden. In der Regel wird 1 μ l CIAP zu einem 50 μ l Restriktionsansatz pipettiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Für die nachfolgende Ligation wird der Ansatz mit dem QIAquick® PCR Purification Kit aufgereinigt (4.1.1.6)

4.1.3.5 Ligation

Die T4-Ligase verknüpft unter ATP-Verbrauch freie 3'-Hydroxylenden mit 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA. Im Gegensatz zur *E. coli*-Ligase kann sie nicht nur kohäsive (sticky), sondern auch glatte (blunt) Enden verbinden. Ein typischer Ligationsansatz (Reaktionsvolumen 10 μ l) enthält bei einer „sticky-end“ Ligation ein Vektor:Insert-Verhältnis von 1:3, bei einer „blunt-end“ Ligation ein Verhältnis von 1:10. Der Ligationsansatz wird über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubiert und kann dann zur Transformation verwendet werden.

Ein Standard-Ligationsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Dephosphorylierter Vektor	1-2 μ l
Insert	3-6 μ l
10 x T4-DNA-Ligasepuffer	1 μ l
T4-DNA-Ligase (1 U/ μ l)	2 μ l
ad 10 μ l H ₂ O _{dest.}	

Folgende Ansätze dienen als Ligationskontrollen:

- Linearisierter Vektor wird in Abwesenheit von T4-Ligase inkubiert. Hierdurch wird die Vollständigkeit der Restriktionsspaltung kontrolliert.
- Linearisierter, dephosphorylierter Vektor wird in Anwesenheit der T4-Ligase inkubiert und zeigt den Dephosphorylierungsgrad

Die Hitzeinaktivierung der Ligase erfolgt für 10 min bei 65°C.

4.1.4 Transformation von Bakterien

Unter Transformation versteht man die Aufnahme freier, gelöster DNA durch eine kompetente Empfängerzelle. Man unterscheidet natürlich kompetente Bakterien von solchen, die erst durch eine bestimmte Behandlung kompetent gemacht werden müssen.

4.1.4.1 Herstellung von CaCl₂-kompetenten *E. coli* DH5 α Zellen

5 ml LB-Medium werden mit einer Übernachtskultur 1:100 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 wachsen gelassen (ca. 3 h). Dann wird die Kultur für 10 min bei 4°C und 5000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 5 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (0,1 M) resuspendiert. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis erfolgt ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min, 4°C, 4000 rpm). Das Pellet wird in 0,5 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (0,1 M) resuspendiert und 1-18 h auf Eis inkubiert. Die höchste Kompetenz ist nach etwa 12 h erreicht.

Will man Zellen auf Vorrat herstellen, werden 50 ml Kultur angeimpft und vor dem ersten Zentrifugationsschritt für 15 min auf Eis gestellt. Nach dem Zentrifugieren wird das Pellet in 10 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (0,1 M)

aufgenommen. Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt wird das Pellet in 5 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung mit 20 % Glycerin resuspendiert, die Zellen aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Die Kompetenz ist bei diesen Zellen etwas geringer als bei den frisch hergestellten.

4.1.4.2 Herstellung von elektrokompetenten *E. coli* DH5a und *B. petrii* DSM 12804 Zellen

2 x 500 ml LB werden mit je 10 ml Übernachtskultur angeimpft und für etwa 3 h bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 wachsen gelassen. Die Kulturen werden für 30 min auf Eis gestellt und dann für 15 min bei 4500 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Pellets in je 500 ml eiskaltem H₂O_{dest.} resuspendiert. Nach 30 minütiger Zentrifugation (4500 rpm, 4°C) den Überstand sehr vorsichtig verwerfen, da die Pellets sehr lose sind. Diese mit je 250 ml eiskaltem H₂O_{dest.} resuspendieren und nochmals für 30 min zentrifugieren (4500 rpm, 4°C). Wiederum den Überstand sehr vorsichtig verwerfen und beide Pellets nun in insgesamt 20 ml eiskaltem 10 % Glycerin aufnehmen. Nach 10 min bei 4°C und 6000 rpm das Pellet in 3 ml eiskaltem 10 % Glycerin resuspendieren, die Zellen aliquotieren und bei -80°C einfrieren, bzw. sofort verwenden.

4.1.4.3 Hitzeschock-Transformation

100 µl kompetente Zellen werden mit 5 - 10 µl Ligationsansatz gemischt und ca. 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgt bei 42°C für 90 s. Nach 5 min auf Eis werden 900 µl LB zugegeben und die Zellen zur phänotypischen Expression 1 h bei 37°C inkubiert. Nun werden je 100 µl auf geeignete Selektionsplatten ausplattiert, die restlichen Zellen pelletiert, in 100 µl LB resuspendiert und ebenfalls auf geeignete Selektionsplatten ausplattiert.

4.1.4.4 Elektroporation

Bei der Elektroporation wird mit Hilfe des Micropulsers (Biorad) ein elektrisches Feld angelegt (25 µF; 2,25 kV; 200 Ω; 4-5 ms). Innerhalb solch eines Feldes verhält sich die Zellmembran wie ein Kondensator, der bis zu einer bestimmten Spannung aufgeladen werden kann. Wird diese kritische Spannung überschritten, so reißt die Zellmembran reversibel auf und DNA kann in die Zelle gelangen.

45 - 80 µl kompetente Zellen werden in einer gekühlten Elektroporationsküvette vorgelegt und mit 1 - 3 µl des Ligationsansatzes gemischt. Die Küvette wird kurz trocken gerieben und mögliche Luftblasen durch Klopfen entfernt, dann wird sie zügig in der Elektroporationsapparatur auf ihre Position zwischen die beiden Elektroden gebracht und das elektrische Feld wird angelegt. Nach dem elektrischen Puls werden die Bakterien schnell in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und ca. 1 - 2 h zur phänotypischen Expression bei 37°C inkubiert, wobei *E. coli* kürzer und *B. petrii* länger inkubiert werden. Danach werden die Zellen wie für die Hitzeschock-Transformation beschrieben ausplattiert.

4.1.5 Mutagenese durch homologe Rekombination

Die homologe Rekombination zwischen einem rekombinanten Plasmid und dem bakteriellen Chromosom ist eine gängige Methode, um Deletions- oder Insertionsmutanten herzustellen. Eine Voraussetzung dabei ist, dass der verwendete Vektor im Bakterium nicht repliziert. Wurden zuvor in den Vektor zum Genom der zu mutierenden Bakterien homologe Bereiche inseriert, so kann zufällig, über homologe Rekombination, eine Integration des rekombinanten Plasmids (Vektor plus Insert) ins bakterielle Chromosom erfolgen. Durch einen wiederum zufälligen 2. Rekombinationsschritt kann der Vektoranteil wieder aus dem Chromosom entfernt werden und nur das Insert, z.B. eine Resistenzkassette, bleibt im Chromosom zurück. Die homologen Bereiche sollten mindestens 100 bp groß sein. Je größer diese Bereiche sind, umso wahrscheinlicher tritt das Ereignis der homologen Rekombination auf. Größe und Lage der ausgewählten homologen Bereiche hängt von der Größe des jeweiligen Gens und der Position funktionaler Bereiche des Genprodukts (N- oder C-terminal) ab. Liegt kein geeigneter Selektionsmarker auf dem Plasmid kann der Doppelcrossover mittels geeigneter PCR (4.1.1.5) und Southern Blot Analysen (4.1.8) detektiert und bestätigt werden.

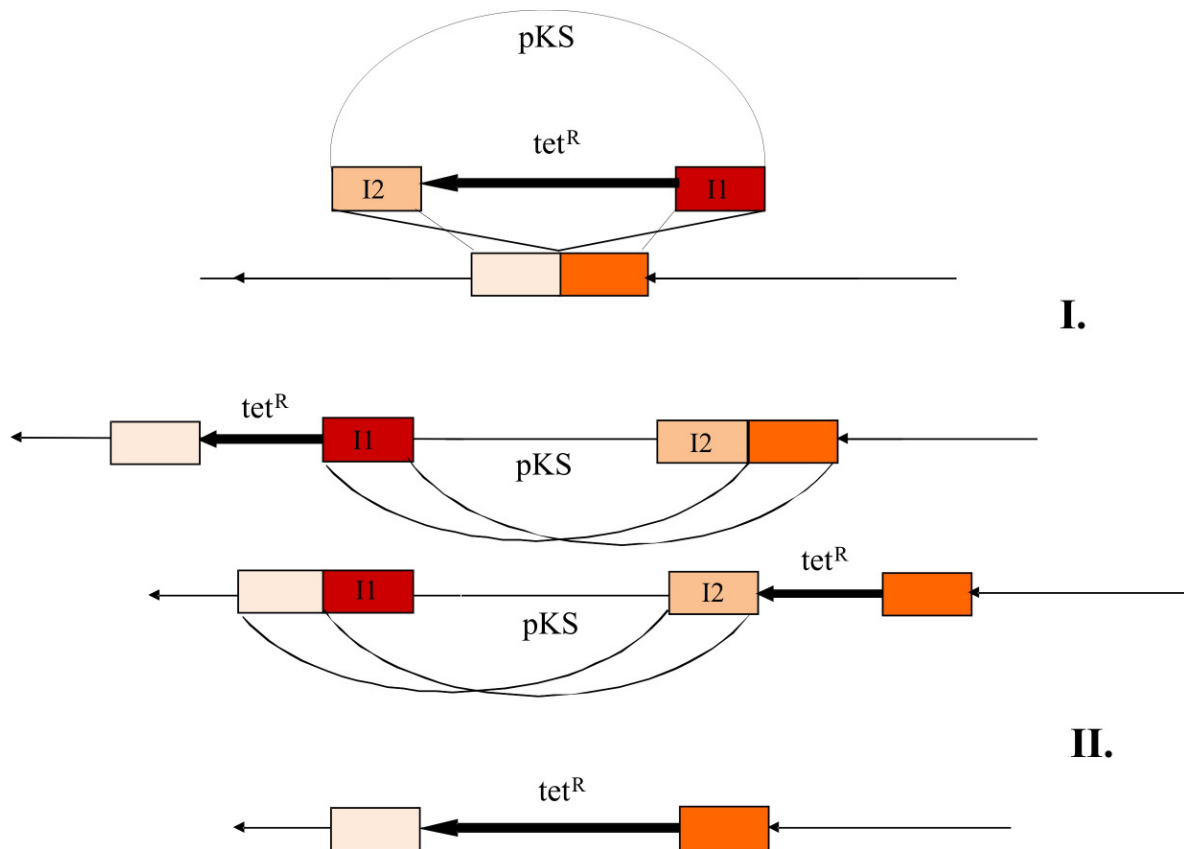


Abbildung 4-2 Konstruktion einer Tetracyclin-Insertionsmutante durch zwei zufällige Rekombinationsereignisse (I. und II.)

4.1.6 Konjugation

Unter Konjugation versteht man die Übertragung von extrachromosomaler DNA von einem Donorstamm auf einen Rezipientenstamm durch direkten Zellkontakt und Ausbildung von Plasmabrücken. Bei der übertragenen DNA kann es sich um Plasmide handeln oder andere integrative und konjugative Elemente wie genomische Inseln.

Zur Übertragung einer genomischen Insel von *B. petrii* GI3::tet^R auf *B. bronchiseptica* PS2 werden die Stämme über Nacht bei 37°C in LB_{tet12,5} bzw. SS_{kan50} angezogen, dann 1:50 verdünnt und bis zur OD₆₀₀ von 0,6 wachsen gelassen. Die Kulturen werden nun 1:1 gemischt (1 ml), kurz abzentrifugiert und das Pellet in 500 µl 1 x PBS resuspendiert. Nun werden 100 µl der Bakteriensuspension auf einen sterilen 0,45 µm Filter, der auf eine BG-Blutagarplatte gelegt wurde, aufpipettiert und die Platte für 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird der Filter in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl 1x PBS abgewaschen. Davon wird nun eine serielle Verdünnung bis 10⁻³ hergestellt, und jeweils 100 µl der Verdünnungsstufen 10⁰-10⁻³ werden zur Züchtung der Konjuganten auf BG_{tet12,5/kan50}-Blutagarplatten ausplattiert. Die Übertragung der genomischen Insel wird über Southern Blot (4.1.8), PCR (4.1.1.5) und Sequenzierung der PCR-Produkte (4.1.7) kontrolliert.

4.1.7 Sequenzierung

Extended Hot Shot Sequenzierungen (bis 900 bp) werden von der Firma SEQLAB (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) durchgeführt. Die notwendige Menge DNA wird mit 20 pmol Primer zu einem Gesamtvolumen von 7 µl eingestellt und so verschickt. Für verschiedene DNA-Templates gelten folgende Mengen:

Plasmid	600-700 ng
PCR-Produkt ~ 1000 bp	250 ng
PCR-Produkt ~ 500 bp	125 ng

PCR-Produkt ~ 200 bp 50 ng

Der Oligonukleotid-Primer sollte ein 18 - 25mer mit einer Schmelztemperatur von 52°C - 60°C sein.

4.1.8 Southern Blot

Unter einem Southern Blot 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 hin überprüft werden.

4.1.8.1 Gelelektrophorese und Vorbereitung des Gels

In einem 40 µl Ansatz werden 3 µg chromosomale DNA über Nacht mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (5 U/µg) bei 37°C gespalten. Eine geeignete Restriktionsendonuklease sollte die DNA in 1000 - 5000 bp große Fragmente schneiden. Für Southern Blots mit *B. petrii*-DNA eignet sich die Restriktionsendonuklease *PvuI* (10 U/µl). Die Proben werden nun auf einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (4.1.2.1), bis die Bromphenolblaufront des HSE-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 maximal 12 min in Depurinierungslösung geschwenkt, hierbei kommt es zu einem Farbumschlag des Bromphenolblaus nach gelb. Nach Abspülen mit H₂O_{dest.} wird das Gel nun für 2 x 15 min in Denaturierungslösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wird das Gel wiederum kurz mit H₂O_{dest.} gespült und für 30 min in Neutralisierungslösung geschwenkt.

4.1.8.2 Transfer der DNA auf eine Hybond N⁺-Nylonmembran (Amersham)

Für den Blot wird ein kleines Tischchen (z.B. ein Gelschlitten) in eine mit 20 x SSC gefüllte Schale gegeben, auf das man als Brücke ein Whatman-MM3-Papier legt.

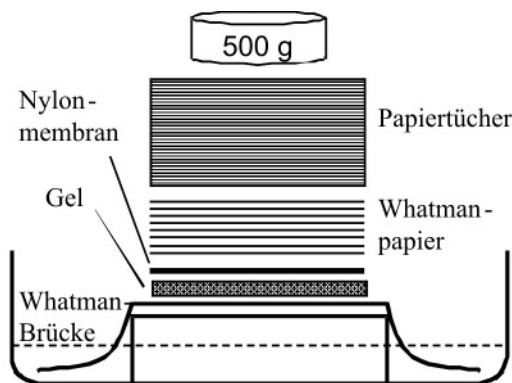


Abbildung 4-3 Schematischer Aufbau zum Transfer der DNA auf die Nylonmembran

Dieses muss mit beiden Enden in die Flüssigkeit eintauchen. Das vorbehandelte Gel wird auf das Whatmanpapier 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 Whatmanpapier (die ersten drei mit 20 x SSC befeuchten), ein ca. 5 cm hoher Stapel Zellstofftücher und zum Beschweren des „Turms“ ein Gewicht von ca. 500 g. Der Transfer erfolgt über Nacht bei RT. Am nächsten Tag werden auf der Membran die Geltaschen markiert und die Membran kurz in 2 x SSC gewaschen. Eine UV-Fixierung der DNA auf der Membran erfolgt für 2 min mit dem UV-Crosslinker.

4.1.8.3 Markierung der Sonde

Die DNA-Sonde wird mit Hilfe des „ECL™ direct nucleic acid labelling and detection Kit“ (Amersham) wie folgt markiert: 300 ng DNA werden mit H₂O_{dest.} auf ein Endvolumen von 30 µl verdünnt und 5 min bei 110°C inkubiert. Nach weiteren 5 min auf Eis wird die Probe kurz abzentrifugiert, mit 30 µl DNA-Labelling-Reagenz versetzt und nach gründlichem Mischen 1 min bei RT inkubiert. Nun werden 30 µl Glutaraldehyd zugegeben und nach erneutem Mischen und kurzem Abzentrifugieren wird der Ansatz für 10 min bei 37°C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten.

4.1.8.4 Prähybridisierung und Hybridisierung

Zur Prähybridisierung wird die Membran in eine dicht verschließbare Plastikbox mit 42°C-warmem Hybridisierungspuffer (0,25 ml/cm²) überführt und für 1 h in einem 42°C-Wasserbad unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Membran muss dabei vollständig mit Puffer bedeckt sein. Anschließend wird die markierte Sonde hinzupipettiert und der Blot über Nacht bei 42°C unter Schwenken hybridisiert.

4.1.8.5 Waschen und Entwickeln der Membran

Am nächsten Tag wird die Membran für 2 x 20 min bei 42°C in einem Überschuß an vorgewärmtem Primärwaschpuffer gewaschen. Daran schließen sich zwei Waschgänge von jeweils 5 min in 2 x SSC bei RT an. Die Entwicklungsreagenzien I und II (ECL-Kit) werden dann in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und die Membran für 1 min darin geschwenkt. Nun wird die Membran luftblasenfrei in Frischhaltefolie eingeschlagen und die Signale durch Exposition eines Röntgenfilms detektiert.

Da das ECL-Signal innerhalb weniger Stunden abklingt, kann der Blot für mehrere Wochen im Kühlschrank aufbewahrt und mit weiteren Sonden behandelt werden.

<u>20 x SSC</u>	3 M NaCl 0,3 M Trinatriumcitrat pH 7,0
<u>Depurinierungslösung</u>	0,25 N HCl
<u>Denaturierungslösung</u>	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
<u>Neutralisierungslösung</u>	0,5 M Tris-HCl 1,5 M NaCl
<u>Primärwaschpuffer</u>	6 M Harnstoff 4 % SDS
<u>Hybridisierungspuffer</u>	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.

4.1.9 Arbeiten mit RNA

Beim Arbeiten mit RNA ist es wichtig, eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden. Diese befinden sich überall auf der Haut des Menschen, im Speichel und auf den abgesonderten Sekreten der Schleimhäute und sind äußerst stabil. Alle verwendeten Gerätschaften sollten daher vor Gebrauch mit 1 N NaOH-Lösung und EtOH gereinigt und nur mit Handschuhen angefasst werden. Wässrige Lösungen werden in DEPC-H₂O_{dest.} angesetzt, das mit dem RNase-Inhibitor Diethylpyrocarbonat behandelt wurde. DEPC wird im Verhältnis 1/1000 zugegeben, die Lösung gut geschüttelt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wird das Wasser zweimal autoklaviert, damit das DEPC zerfällt.

4.1.9.1 Isolierung von RNA

50 ml LB Medium werden mit einer Übernachtskultur 1:100 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37°C inkubiert. Je 25 ml werden für 15 min bei 4°C und 6000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Eines der beiden Pellets wird als Reserve bei -80°C eingeforen, das andere wird mit 10 ml 65°C warmem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) -Gemisch resuspendiert, mit 6 ml 65°C warmem AE-Puffer und 125 µl 25 % SDS-Lösung versetzt und 30 min unter mehrmaligem Vortexen bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wird das Gemisch für 10 min auf Eis inkubiert und dann 20 min bei 4°C und 6000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 670 µl 3 M NaAc und 6 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und ausgeschüttelt. Nach einem 5 minütigen Zentrifugationsschritt (4°C, 6000 rpm) wird die wässrige Phase erneut abgenommen und mit 2 ml reinem Chloroform ausgeschüttelt. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (5 min, 4°C, 6000 rpm) wird die wässrige Phase mit 2,5 Volumen 100 % EtOH gemischt und zur Fällung der Nukleinsäuren über Nacht bei -20°C inkubiert. Am folgenden Tag werden die Nukleinsäuren auf 10 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt, für 30 min bei 4°C und 10.000 rpm pelletiert und das Pellet mit 2 ml 70 % EtOH gewaschen. Nach 10 min bei 4°C und 10.000 rpm wird das Pellet bei RT getrocknet, dann in 100 µl DEPC-H₂O_{dest.} aufgenommen und die entsprechenden Proben wieder vereint. Zur Kontrolle können 3 µl der Präparation auf ein Agarosegel aufgetragen werden, das mit 1 x TBE in DEPC-H₂O_{dest.} hergestellt wird. Es empfiehlt sich frischen Laufpuffer zu verwenden, damit die RNA während des Laufes nicht zu schnell degradiert.

AE-Puffer 20 mM NaAc
 1 mM EDTA
 pH 5,5

4.1.9.2 Aufreinigung mit dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen)

Über eine RNeasy Spin Säule lassen sich maximal 100 µg RNA aufreinigen. Zu 100 µl Probe werden 350 µl RLT-Puffer mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol zugegeben und gut gemischt. Anschließend werden 250 µl EtOH zugefügt und die Probe auf eine RNeasy Spin Säule aufgetragen. Nach 1 min bei 10.000 rpm wird die Säule 2 x mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und dann für 2 min zentrifugiert (10.000 rpm). Ein weiterer Zentrifugationsschritt für 1 min dient dem vollständigen Entfernen des Waschpuffers und dem Trocknen des Säulchens. Die Elution erfolgt in 2 x 40 µl RNase-freiem Wasser.

4.1.9.3 DNase-Behandlung mit dem DNA-free™ DNase Kit (Ambion)

Da durch die Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Präparation die gesamten Nukleinsäuren extrahiert worden sind, ist es notwendig, die DNA mittels DNase-Behandlung zu entfernen. Zu 76 µl RNA werden 9 µl 10 x Puffer und 5 µl DNase zugegeben und der Ansatz für 45 min bei 37°C im Heizblock inkubiert. Nach kurzem Abzentrifugieren werden 0,1 Vol. DNase Inactivation Reagent zugegeben und der Ansatz 2 min bei RT inkubiert. Nun wird 1 min bei max. rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es muss nun noch eine Test-PCR angeschlossen werden, um zu überprüfen, ob der DNase-Verdau vollständig war. Hierzu eignen sich z.B. 16S rDNA Primer. Wird hier noch ein PCR-Produkt erhalten, muss die DNase-Behandlung so oft wiederholt werden, bis die RNA DNA-frei ist.

4.1.9.4 Konzentrationsbestimmung von RNA

Zur Konzentrationsbestimmung von RNA geht man wie unter 1.1.3 für DNA beschrieben vor, nur dass für die Verdünnung DEPC-H₂O_{dest.} verwendet wird. Die Konzentration wird anhand folgender Formel berechnet:

DNA-Konzentration (µg/ml): OD₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x 40

4.1.10 cDNA Synthese

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. Wird ein spezifischer Primer für die Reaktion eingesetzt, kann man so eine bestimmte cDNA synthetisieren, werden hingegen sogenannte Random Primer, die hauptsächlich aus Hexameren bestehen, eingesetzt, kann repräsentativ das gesamte Transkriptom in cDNA übersetzt werden. Diese cDNA kann nun wiederum zur Analyse von Transkriptmengen z.B. in der quantitativen Real-Time-PCR eingesetzt werden.

Es werden 5 µg RNA und 3 µl Random Primer (3 µg/µl) mit DEPC-H₂O_{dest.} auf ein Volumen von 18 µl gebracht und 5 min bei 70°C inkubiert, um die Sekundärstrukturen in der RNA zu lösen. Danach wird der Ansatz 5 - 10 min auf Eis gestellt, bevor 22 µl Mastermix hinzugefügt werden. Der Mastermix setzt sich wie folgt zusammen:

5 x First Strand Buffer (Invitrogen)	8 µl
ATP (20 mM)	1 µl
TTP (20 mM)	1 µl
GTP (20 mM)	1 µl
CTP (20 mM)	1 µl
DTT (Invitrogen)	0,4 µl
RNase out (Invitrogen)	1 µl
SuperScript™ II Reverse Transkriptase (Invitrogen)	1 µl
DEPC-H ₂ O _{dest.}	7,6 µl
	<hr/>
	22 µl

Der Ansatz wird nun für 2 h bei 42°C inkubiert. Bei dieser Temperatur ist die Reverse Transkriptase aktiv. Zum Abstoppen der Reaktion erfolgt eine Inkubation bei 70°C für 15 min. Nach kurzem Zentrifugieren werden für den Abbau der eingesetzten RNA 2 µl RNase (Roche) zugefügt und der Ansatz bei 37°C für 45 min inkubiert. Die Reinigung der so erhaltenen cDNA erfolgt mit dem PCR Purification Kit von Qiagen (4.1.1.6).

Zur Konzentrationsbestimmung von cDNA wird wie bereits beschrieben vorgegangen (4.1.1.3). Die Konzentration errechnet sich anhand folgender Formel:

DNA-Konzentration (µg/ml): OD₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x 33

4.1.11 Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)

Die modernste Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren stellt die quantitative Realtime-PCR dar. Im Prinzip handelt es sich hierbei um eine konventionelle PCR, bei der die Amplifikation des PCR-Produkts Zyklus für Zyklus durch Verwendung eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes verfolgt wird. Allerdings werden keine absoluten Mengen an PCR-Produkt gemessen, sondern stattdessen nutzt man für die Quantifizierung die Kinetik der PCR-Reaktion aus. In den frühen PCR-Runden findet die Vermehrung der DNA-Fragmente noch exponentiell statt, verlangsamt sich dann aufgrund störender Einflüsse zu einem linearen Wachstum und kommt dann zum Stillstand. Die Stärke des Fluoreszenzsignals wird für jeden Ansatz nach jeder Runde gemessen und in einem Diagramm gegen die Zykluszahl dargestellt. Als Schwellenwert wird die Zykluszahl gesetzt, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund abhebt (C_T-Wert). Die Vermehrung ist hier noch exponentiell. Durch die parallele Amplifikation bekannter Templatmengen wird eine Standardkurve erstellt,

durch die die im Reaktionsansatz vorhandene Templatemenge quantifiziert werden kann. Das Mitführen eines internen Standards ermöglicht ferner den Vergleich verschiedener Ansätze, wie z.B. unterschiedliche Wachstumsbedingungen oder Vergleiche zwischen Wildtyp und Mutanten.

Zur Kontrolle der Spezifität der PCR-Produkte wird im Anschluss an die PCR-Reaktion eine Schmelzkurve erstellt.

Die Oligonukleotide für eine qRT-PCR sollten so gewählt werden, dass ein 130 bp bis max. 150 bp großes Produkt aus dem mittleren Bereich des zu untersuchenden Gens entsteht, da die entsprechende RNA an den Enden bereits degradiert sein kann.

Ein Standardreaktionsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

ABsolute™ QPCR SYBR® Green Mix	25 µl
Forward Primer (200 nM)	0,2 µl
Reverse Primer (200 nM)	0,2 µl
Template (cDNA)	2 µl
ad 50 µl H ₂ O _{dest.}	

Standardbedingungen:

40 Zyklen:	Denaturierung	15 min, 95°C
	Primer-Annealing	15 sec, 95°C
	Elongation	1 min, 60°C

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der Analysesoftware OpticonMONITOR™ Version 1.4.

4.2 Biochemische Methoden

4.2.1 Isolierung von Gesamtzellprotein gramnegativer Bakterien für die 2D-Gelelektrophorese

25 ml LB Medium werden mit frischer *B. petrii*-Übernachtskultur im Verhältnis 1:50 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Die nachfolgenden Schritte werden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt, um einen Abbau der Proteine zu verlangsamen. Nach einem 10 minütigen Zentrifugationsschritt bei 4°C und 6000 rpm wird das Pellet in 1 ml Tris-Puffer mit Protease-Inhibitor (complete, Mini, EDTA-free; Roche; 1 Tablette/10 ml Puffer) resuspendiert und der gesamte Ansatz in ein Schredder-Tube überführt. Bis zur Weiterverarbeitung können die Proben nun bei -80°C eingefroren werden. Zum Zellaufschluss werden die Proben für 6 x 30 s auf Stufe 6,5 in der Fastprep geschreddert und dazwischen immer wieder einige min auf Eis abgekühlt. Es erfolgt die Zugabe von 5 µl DNase/RNase-Mix (Benzoase/RNase-it, 1:1) und eine Inkubation von 10 min bei RT. Die Zelltrümmer werden für 10 min bei 4°C und 14.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand (ca. 1 ml) in ein Reaktionsgefäß überführt, in das 420 mg Harnstoff (~ 7 M) und 152 mg Thioharnstoff (~ 2 M) vorgelegt wurden. Die Proben werden nun 30 min bei RT inkubiert und mehrmals kräftig gevortext, bis sich der Harnstoff gelöst hat. Die Fällung der Proteine erfolgt durch Zugabe von 20 % TCA und einer Inkubation auf Eis für 1 - 2 h. Anschließend werden die Proteine 20 min bei 4°C und 14.000 rpm pelletiert und die Pellets 3 x mit 200 µl eiskaltem Aceton gewaschen (dazwischen je 10 min abzentrifugieren). Nachdem die Proben etwa 5 min bei 30°C im Heizblock getrocknet wurden, werden die Proteine in 100 µl Harnstoffpuffer und 10 µl CHAPS (400 mg/ml) gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

<u>Harnstoffpuffer</u>	7 M Harnstoff
	2 M Thioharnstoff
	70 mM DTT

<u>Tris-Puffer</u>	10 mM Tris
	5 mM MgCl ₂
	pH 7,2

4.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird der Bradford-Assay der Firma BioRad verwendet. Dieses Messverfahren beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 mit Proteinen in saurer Lösung Komplexe bildet, deren Absorptionsmaximum bei 595 nm liegt.

Vol. des 0,1 mg/ml BSA Stock [μ l]	Vol. H ₂ O [μ l]	Menge an BSA im Ansatz [μ g]
0	800	0
12,5	787,5	1,25
25	775	2,5
50	750	5
100	700	10

Tabelle 4-2 Pipettierschema für die Eichgerade

Zur Aufstellung einer Eichgeraden werden verschiedene Mengen BSA (1-10 μ g) mit Wasser auf ein Endvolumen von 800 μ l gebracht und mit 200 μ l Farbstofflösung versetzt. Proteinproben werden 1:10 verdünnt und davon 2 μ l und 5 μ l eingesetzt. Sowohl für die Eichgerade als auch für die Proteinproben werden jeweils 3 Ansätze pipettiert. Nach gründlichem Mischen aller Proben und einer Inkubationszeit von ca. 20 min werden deren Absorptionswerte mit Hilfe eines Photometers bei 595 nm Wellenlänge gemessen. Die Proteinkonzentration kann dann anhand der mit BSA erstellten Eichgeraden ermittelt werden.

Zur Kontrolle der Proteinbestimmung für die 2D-Gel Proteinproben, werden jeweils 7,5 μ g Protein auf ein 12 % Polyacrylamidgel aufgetragen (4.2.3.1).

4.2.3 Auftrennung und Analyse von Proteinen

4.2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer molekularen Masse in einem elektrischen Feld wird die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet. Grundlage 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 zur Ausbildung eines negativ geladenen SDS-Protein-Komplexes mit konstantem Ladungs/Masse-Verhältnis. β -Mercaptoethanol löst als reduzierende Substanz alle S-S-Bindungen im Protein. Bei der Elektrophorese ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes und den relativen Wanderungstrecken des SDS-Polypeptid-Komplexes. Auf diese Weise können Proteine unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung und Konformation ihrer Größe nach im Spannungsfeld aufgetrennt werden. Markerproteine ermöglichen die Ermittlung der Molekulargewichte unbekannter Proteine.

Nach Zugabe des Radikalbildners TEMED wird die Trenngellösung sofort zwischen zwei durch Spacer getrennte und abgedichtete Glasplatten bis ca. 3 cm unterhalb des Glasplattenrandes gegossen und zur Ausbildung einer geraden Front mit 7 % Isopropanol überschichtet. Ist das Trenngel auspolymerisiert, wird die Oberfläche gut abgespült und das Sammelgel gegossen. Um die Auftragstaschen zu erhalten wird ein Teflonkamm luftblasenfrei eingesetzt. Das fertige Gel wird in die mit 1 x SDS-Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Proteinproben werden mit 2 x Laemmli-Puffer versetzt, 5 min bei 95°C aufgeköcht, kurz abzentrifugiert und in die mit Puffer gespülten Geltaschen pipettiert. Als Molekulargewichtsstandard werden zudem 10 μ l Broad Range Marker (3.8) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 220 Volt und wird beendet, nachdem die Farbstofffront aus dem Gel gelaufen ist.

	12 % Trenngel (20 ml)	Sammelgel (8 ml)
H ₂ O _{dest}	6,6 ml	4,5 ml
30 % Acrylamidlösung	8,0 ml	1,34 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	5,0 ml	-
0,5 M Tris (pH 6,8)	-	2,0 ml
10 % SDS	200 µl	80 µl
10 % APS	200 µl	80 µl
TEMED	8 µl	8 µl

Tabelle 4-3 Zusammensetzung eines 12 % Polyacrylamidgels

Im Anschluss an die Elektrophorese werden die aufgetrennten Proteine im Polyacrylamidgel durch Coomassie-Blau angefärbt. Das Gel wird hierzu 15 - 60 min in einer Färbelösung geschwenkt und anschließend in 10 % Essigsäure so lange entfärbt, bis sich die blau gefärbten Proteinbanden deutlich vom Hintergrund absetzen.

<u>10 x SDS-Laufpuffer</u>	250 mM Tris 2 M Glycin 1 % SDS
<u>2 x Laemmli-Puffer</u>	31,25 mM Tris-HCl (pH 8,0) 5 % Glycin 1 % SDS 2,5 % β-Mercaptoethanol
<u>Coomassie-Färbelösung</u>	45 % Ethanol 10 % Eisessig 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R250

4.2.3.2 Zweidimensionale Proteingelektrophorese

Die zweidimensionale (2D-) Gelelektrophorese, die erstmals von O'Farrell und Klose 1975 beschrieben wurde, ist eine Kombination aus zwei unabhängigen Elektrophoreseschritten, die der Auftrennung von komplexen Proteingemischen dient (Klose & Kobalz, 1995; Klose & Spielmann, 1975; O'Farrell, 1975).

Durch die isoelektrische Fokussierung (IEF) erfolgt zunächst eine Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt. Die sich anschließende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese gewährleistet eine Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension nach ihrem relativen Molekulargewicht. Nach Visualisierung der Proteine im Gel entspricht jeder Spot auf dem 2D-Gel einem einzelnen Protein aus der Gesamtproteinprobe. Auf diese Weise können über 10.000 Proteine pro Gel getrennt werden.

4.2.3.2.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF) – Auftrennung von Proteinen in der ersten Dimension

Bei der IEF werden Proteine, die amphotere Moleküle darstellen, im elektrischen Feld anhand ihres isoelektrischen Punktes (pI) voneinander getrennt. Ein Protein wandert hierbei in einem pH-Gradientengel bis zu dem spezifischen pH-Wert, an dem seine Nettoladung, die durch die positiven und negativen Ladungen der Aminosäureseitenketten bestimmt wird, gleich Null ist. Liegt der umgebende pH-Wert eines Proteins unter dem pI-Wert, so ist es positiv geladen und wandert im elektrischen Feld in Richtung Kathode. Liegt der pH-Wert über dem pI-Wert, ist es negativ geladen und wandert in Richtung Anode, bis es seinen pI-Wert erreicht. Bei den in dieser Arbeit verwendeten pH-Gradientengelen handelt es sich um sogenannte immobilisierte pH-Gradienten (IPG)-Strips, die von GE Healthcare bezogen wurden. Die zur Herstellung der pH-Gradienten verwendeten Immobiline bestehen aus definierten sauren bzw. basischen Gruppen, die jeweils mit Acrylamidmonomeren verknüpft sind. Der pH-Gradient wird durch kontinuierliche Mischung zweier unterschiedlicher Immobilin-Lösungen erreicht, die mit dem Acrylamid kopolymerisieren. Auf diese Weise ist das individuelle Mischen eines Gradienten möglich, der an die Gelmatrix gebunden ist und daher sehr stabil und gut reproduzierbar ist. Die

Immobiline™ DryStrip Gele von GE Healthcare sind in unterschiedlichen Längen und mit unterschiedlichen pH-Gradienten erhältlich.

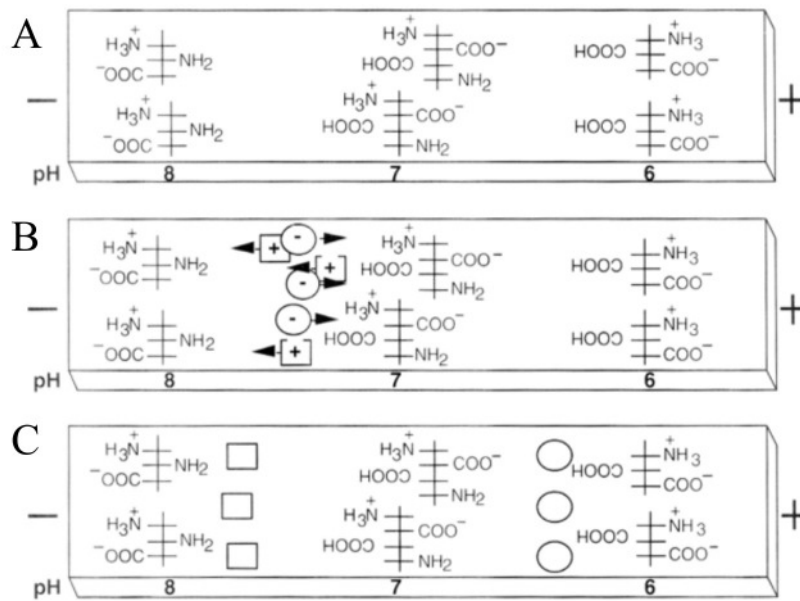


Abbildung 4-4 Schema der isoelektrischen Fokussierung (Verändert nach (Rehm, 2002)) **A:** Immobilin-Gradient im IPG-Strip. **B:** Auftragen der Probe. **C:** Probe fokussieren.

4.2.3.2.1.1 Rehydrierung der IPG-Strips

Da das Gel auf den immobilisierten Strips getrocknet ist, muss es vor der IEF rehydriert werden. Die Rehydrierung erfolgt im Reswelling-Tray (Amersham). Pro Strip werden 340 μl Rehydrierungslösung, bestehend aus Rehydrierungspuffer, 0,5 % IPG-Puffer des entsprechenden pH-Bereichs, 18 mM DTT und dem aufzutrennenden Protein, benötigt. Für Gele, die einer Silberfärbung unterzogen werden, werden 75 μg Gesamtzellprotein verwendet. Diese Färbemethode ist so sensitiv, dass bereits 1 ng Protein sichtbar gemacht werden kann. Werden die Proteine allerdings anschließend mit kolloidalem Coomassie gefärbt, um die differentiell exprimierten Proteine massenspektrometrisch analysieren zu können, sollte man etwa die 100fache Menge an Gesamtzellprotein einsetzen, da diese Färbemethode deutlich weniger sensitiv im Vergleich zur Silbernitratfärbung ist. Geeignete Mengen liegen zwischen 500 und 1000 μg Proteinprobe.

Die Rehydrierungslösung wird in eine Mulde des Reswelling-Trays pipettiert und der Strip vorsichtig mit der Gelseite nach unten auf die Rehydrierungslösung gelegt, so dass sich die Rehydrierungslösung möglichst gleichmäßig und luftblasenfrei unter dem Strip verteilt. Der IPG-Strip wird noch mit 2 ml Mineralöl überschichtet, um ein Austrocknen des Gels zu verhindern. Die Rehydrierung erfolgt für 10 - 20 h bei 20°C .

<u>Rehydrierungspuffer</u>	7 M Harnstoff
	2 M Thioharnstoff
	4 % CHAPS
	1 SpSP Bromphenolblau

4.2.3.2.1.2 IEF im Ettan™ IPGphor (Amersham)

Für die IEF im Ettan™ IPGphor wird die sogenannte Manifold benötigt. Dabei handelt es sich um eine Keramikplatte, auf der bis zu 12 IPG-Strips in einzelnen Channels parallel gefahren werden können. Sie wird auf der IPGphor platziert und mit einer Libelle austariert. Anschließend werden 108 ml Mineralöl gleichmäßig in die 12 Channels verteilt. Die rehydrierten IPG-Strips werden nun mit der Gelseite nach oben in den Channels platziert, so dass der saure Bereich des IPG-Stips über der Anode und der basische Bereich über der Kathode liegt.

Etwa 2,5 cm lange und 0,5 cm breite Whatmanpapier-Streifen werden mit 150 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ befeuchtet und jeweils an den Enden der IPG-Strips positioniert, so dass sie etwa 0,5 cm auf den Gelenken liegen. Dann werden die Elektroden auf den Whatmanpapieren positioniert.

Der Deckel der Apparatur wird geschlossen und die IEF unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt, wobei die ersten 3 Schritte verlängert werden können:

4 h	300 V	Step and Hold
6 h	1000 V	Gradient
2 h	8000 V	Gradient
	8000 V	Step and Hold

Bei einer Auftrennung von 75 μg Protein erfolgt die IEF der Proteine bis etwa 60.000 Vhs erreicht sind. Hat man allerdings sehr große Mengen an Protein aufgetragen (z.B. für Coomassie-Gele) sollte man die Elektrophorese bis mindestens 100.000 Vhs oder länger durchführen. Während der Elektrophorese werden etwa alle 20.000 bis 30.000 Vhs die Whatmanpapier-Streifen ausgewechselt. Diese dienen der Aufnahme von Salzen und Puffer-Ionen sowie von Proteinen, deren pI außerhalb des pH-Bereiches der verwendeten IPG-Strips liegt. Des weiteren wird hierdurch das System mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ versorgt, welches das Gel während langer Elektrophoresen vor Austrocknung schützt. Nach Beendigung der IEF werden die IPG-Strips aus der Manifold genommen, nach dem Abtropfen von überschüssigem Mineralöl mit der Gelseite nach unten in Alufolie eingewickelt und anschließend auf Trockeneis eingefroren. Die IPG-Strips können so bis zu 3 Monate bei -20°C gelagert werden.

4.2.3.2.2 SDS-PAGE – Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht (MW) voneinander getrennt (siehe 4.2.3.1). Als reduzierende Thiolverbindung wird hier statt Mercaptoethanol Dithiothreitol verwendet (DTT), um die Disulfidbrücken der Proteine zu lösen.

4.2.3.2.2.1 Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele im großen Maßstab

Das Gießen der SDS-Polyacrylamidgele erfolgt im DALT Gel Caster des Hoefer DALT-Systems von Pharmacia. Der Caster wird mit der Rückseite nach unten in eine Plastikwanne gelegt, die Frontplatte abgeschraubt und die zwei Dreieckschwämme in die dafür vorgesehene Öffnung eingesetzt. Der Aufbau der Platten wird nach folgendem Schema durchgeführt: Zunächst wird ein Separator-Sheet im Caster platziert, dann folgen immer abwechselnd eine Gekassette und ein Separator-Sheet, wobei die flexiblen Silikon-Gelenke der Gekassetten immer abwechselnd nach links bzw. nach rechts ausgerichtet werden. Bei dem gesamten Aufbau ist darauf zu achten, dass alle Teile (Separator-Sheets bzw. Gekassetten) immer an der den Schwämmen abgewandten Seite des Casters angelegt und in Richtung des Caster-Bodens geschoben werden. Der restliche Freiraum im Caster, der nicht von Gekassetten eingenommen wird, wird mit entsprechend dicken Plexiglasblöcken oder zusätzlich mit Separator-Sheets aufgefüllt, bis der Stapel eine Ebene mit der Caster-Kante bildet. Zwischen den Caster und die Frontplatte wird die mit Silikon eingefettete Gummidichtung in die dafür vorgesehene Rille gelegt. Nun wird die Frontplatte aufgesetzt und vorsichtig zugeschraubt. Nach dem Aufstellen des Casters wird noch ein Plastikröhrchen mit Trichter auf den Gummiring der Balance-Kammer aufgesteckt.

12 %	1	2	4	8	10	14	18	20
30 % PAA	30 ml	60 ml	120 ml	240 ml	300 ml	420 ml	540 ml	600ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	24,7 ml	49,4 ml	98,8 ml	197,6 ml	247 ml	345,8 ml	444,6 ml	494 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	18,75 ml	37,5 ml	75 ml	150 ml	187,5 ml	262,5 ml	337,5 ml	375 ml
10 % SDS	750 μl	1,5 ml	3 ml	6 ml	7,5 ml	10,5 ml	13,5 ml	15 ml
10 % APS	750 μl	1,5 ml	3 ml	6 ml	7,5 ml	10,5 ml	13,5 ml	15 ml
TEMED	7,5 μl	15 μl	30 μl	60 μl	75 μl	105 μl	135 μl	150 μl

Tabelle 4-4 Pipettierschema für 12 % Polyacrylamidgele

Die SDS-Polyacrylamidlösung wird bis auf das APS und den Radikalbildner TEMED zusammenpipettiert und die Displacing-Solution vorbereitet.

150 ml Displacing-Solution werden in die Balance-Kammer gefüllt. Die SDS-Polyacrylamidlösung wird mit APS und TEMED versetzt, auf einem Rührer gut gemischt und langsam, luftblasenfrei in den Trichter gefüllt. Anschließend wird das Plastikröhrchen entfernt, so dass die Displacing-Solution nachlaufen und die unterhalb der Gelkassetten befindliche SDS-Polyacrylamidlösung von unten in die Gelkassetten drücken kann (evtl. kann zusätzliche Displacing-Solution in die Balance-Kammer nachgefüllt werden). Die obere Gelfront sollte anschließend etwa 1 cm unterhalb der Glaskante der Gelkassetten sein. Nun wird das Gel sofort mit 2 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ überschichtet. Der Caster wird mit Klarsichtfolie abgedeckt und die Gele etwa 2 h zum Auspolymerisieren stehen gelassen.

Nach 2 h wird die Frontplatte vorsichtig abgeschraubt, so dass die Displacing-Solution ablaufen kann. Die einzelnen Gelkassetten sowie die Oberfläche der Gele werden mit warmem Wasser abgewaschen, um Gelreste zu entfernen, und anschließend mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ nachgespült. Die Gelkassetten werden in Klarsichtfolie eingeschlagen und können für einige Tage bei 4°C in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gelagert aufbewahrt werden.

<u>Displacing-Solution</u>	50 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
	100 ml Glycerin
	2 mg Bromphenolblau
	50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

4.2.3.2.2 Herstellung des Molekulargewichtsstandards für die 2. Dimension

1,5 μl Broad Range Protein Marker (Biorad) (3.8) werden mit 28,5 μl Laemmli-Puffer gemischt und 3 min bei 100°C gekocht. Dann werden 230 μl heiße 0,5 % M-Agarose in 1 x SDS-Laufpuffer zugegeben. Das Gemisch wird sofort mit Hilfe eines Spritzenaufsatzes luftblasenfrei in ein Glasröhrchen aufgezogen. Nach dem Erstarren der Agarose wird der Marker vorsichtig mit Hilfe einer mit Wasser gefüllten Spritze auf eine Glasplatte herausgedrückt und mit einem sauberen Skalpell in 0,5 cm große Stücke geschnitten. Die Marker-Stückchen werden einzeln in einem Reaktionsgefäß bei -20°C gelagert.

4.2.3.2.3 Vorbereitung der IEF-Gele und Start der 2. Dimension

Die IPG-Strips werden 5 min bei RT aufgetaut, anschließend in jeweils 10 ml Äquilibrationslösung, die mit 100 mg DTT versetzt wurde, überführt und 15 min auf dem Schüttler äquilibriert. Das DTT reduziert vorhandene Disulfidbrücken in den Proteinen. Anschließend werden die Strips in jeweils 10 ml Äquilibrationslösung, die mit 250 mg Iodacetamid (IAA) versetzt wurde, überführt und nochmals für 15 min auf dem Schüttler äquilibriert. Das IAA alkyliert die zuvor durch DTT reduzierten Schwefelgruppen in den Proteinen, um ihre Reoxidation während der Elektrophorese zu verhindern.

Die SDS-Gele werden mit dem Silikonrücken nach links in einem Ständer aufgestellt und mit 1 x SDS-Laufpuffer überschichtet. Überschüssige Äquilibrationslösung auf dem IPG-Strip wird kurz auf einem mit 1 x SDS-Laufpuffer getränkten Whatmanpapier abgestreift. Der Strip wird mit der Gelseite nach vorn in den Zwischenraum der Gelkassette gebracht und absinken gelassen. Nun wird der Strip mit einem Spatel fixiert, der Laufpuffer vom Gel abgegossen und ein Marker-Stückchen neben dem Strip positioniert. Um den IPG-Strip zu fixieren und den Kontakt zwischen IPG-Strip und Geloberfläche zu gewährleisten, wird dieser mit 0,5 % M-Agarose in 1 x SDS-Laufpuffer überschichtet. Der Strip sollte nun mittig und luftblasenfrei auf der Geloberfläche liegen.

Die Gelkassetten werden anschließend mit den flexiblen Silikon-Gelenken nach oben in den mit etwa 20 l 1 x SDS-Laufpuffer gefüllten Elektrophorese-Tank des Hoefer DALT-Systems geladen. Die Menge des Laufpuffers richtet sich nach der Anzahl der Gele und sollte mindestens bis zu den oberen Spacern der Gelkassetten, jedoch nicht über die Silikonrücken hinaus reichen.

Die Elektrophorese erfolgt bei 90 V und 15°C für etwa 18 - 20 h über Nacht bis die Bromphenolblaufront das untere Ende der Gele erreicht.

<u>Äquibrierungslösung</u>	50 mM 1,5 M Tris-HCl (ph 8,8)
	6 M Harnstoff
	30 % Glycerin
	2 % SDS
	1 Spsp Bromphenolblau
	40 ml Aliquots bei -20°C lagern

4.2.3.3 Proteinfärbung mit Silbernitrat

Bei der Silberfärbung bildet das Ag^+ -Ion Komplexe mit den Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Alkalisches Formaldehyd reduziert das Ag^+ der Komplexe zu Ag.

Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Glasplatten der Gelkassetten aufgehebelt, die Gele zurecht geschnitten und die Strips entfernt. Dann werden die Gele für mindestens eine Stunde oder über Nacht unter leichtem Schwenken fixiert. Für die anschließende Färbung werden Oxidierer, Silbernitratlösung und Entwickler immer frisch angesetzt, wobei jeweils 125 ml pro Gel benötigt werden. Nach dem Fixieren werden die Gele für 2 x 30 min mit 30 % Ethanol gewaschen und anschließend genau 1 min unter starkem Schwenken oxidiert. Nach einem weiteren Waschschrift (3 x 1 min mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$) werden die Gele für 1 h mit der Silbernitratlösung gefärbt. Es erfolgt ein erneuter Waschschrift (2 x 1 min mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$), bevor die Entwicklerlösung zugegeben wird. Die Gele werden solange in der Entwicklerlösung geschwenkt, bis die Proteine gut sichtbar sind (ca. 3 - 5 min). Durch die EDTA-Lösung wird der Entwicklungsvorgang abgestoppt. Nach mindestens 15 minütiger Inkubation können die Gele eingescannt und in Plastiktüten eingeschweißt werden.

Um die Proteinexpressionsmuster miteinander vergleichen zu können, ist es wichtig alle Gele gleich lang zu entwickeln.

<u>Fixierer</u> (300 ml/Gel)	12 % Essigsäure 50 % EtOH 38 % $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$
<u>EtOH</u> (300 ml/Gel)	30 %
<u>Oxidierer</u> (125 ml/Gel)	125 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ 83 ml 37 % Formaldehyd 62,5 μl Na-Thiosulfat
<u>Silbernitratlösung</u> (125 ml/Gel)	125 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ 83 ml 37 % Formaldehyd 0,25 g AgNO_3
<u>Entwickler</u> (125 ml/Gel)	125 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ 62,5 ml 37 % Formaldehyd 2,25 μl Na-Thiosulfat 7,5 g Na_2CO_3
<u>EDTA</u> (250 ml/Gel)	40 mM

4.2.3.4 Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie

Die SDS-Polyacrylamidgele werden vor der Färbung 2 h mit ca. 250 ml 12 % TCA fixiert. Anschließend werden sie 2 - 3 Tage mit 200 ml kolloidalem Coomassie (Gebrauchslösung) unter leichtem Schwenken gefärbt. Für die Prozedur sollte man nur extra dafür vorgesehene Behälter verwenden und die Gele nur vorsichtig am Rand mit sauberen Handschuhen anfassen, da Kontaminationen die anschließende MALDI-TOF (4.2.3.6) stören könnten.

Die Gele werden mindestens 7 h mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ entfärbt, wobei das $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ mehrmals gewechselt wird. Die gefärbten Gele werden eingescannt und können bis zu drei Tage in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ aufbewahrt werden.

Stocklösung A 1%ige Coomassie Blau (G250)-Lösung in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

Stocklösung B (für 2 Gele) 32 ml Stocklösung A
32 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
6,4 ml H_3PO_4
auf 320 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ auffüllen

Gebrauchslösung (für 2 Gele) 320 ml Stocklösung B
80 ml MeOH

4.2.3.5 Auswertung der 2D-Gele mit der Delta 2D Software von DECODON Version 3.5

Mit Hilfe dieser Software ist es möglich verschiedene Gele, die miteinander verglichen werden sollen, so zu überlagern, dass die entsprechenden Spots einander zugeordnet werden. Um z.B. den Wildtyp mit einer Mutante zu vergleichen, werden jeweils drei unabhängig präparierte Proteinproben benötigt, die wiederum gleichzeitig in einem Gellauf aufgetrennt werden. Diese 6 Gele können nach dem Einscannen in den Gelpool importiert werden. Der Gelpool enthält alle Gele, die man dann für verschiedene Projekte heranziehen kann.

Um ein neues Projekt zu starten, werden die Gele, die miteinander verglichen werden sollen, geladen und in entsprechende Gruppen eingeteilt z.B.: alle Wildtypgele in Gruppe 1, alle Mutantengele in Gruppe 2 und so fort. Nun wird eine Warpstrategie festgelegt, die angibt, welche Gelpaare direkt und welche impliziert gewarpt werden sollen, damit keine Warschleifen entstehen. Damit das Warpen so genau wie möglich wird, ist es notwendig, manuell sogenannte Matchvektoren zu setzen, die entsprechende Spots einander zuordnen.

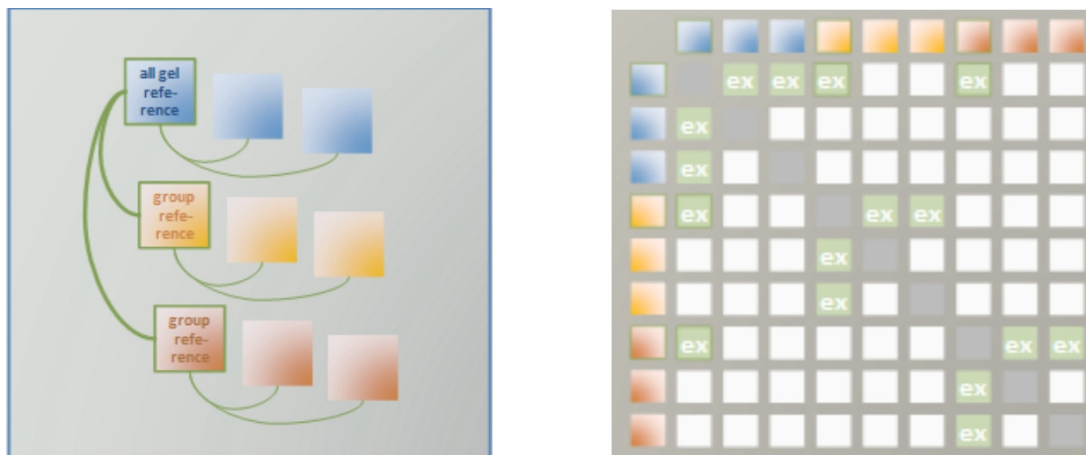


Abbildung 4-5 Zeigt die Gruppen-Warpstrategie. In einem Projekt von 9 (=n) Gelen müssen 8 (=n-1) von den 36 Gelpaaren direkt gewarpt werden. ex: explicit warp mode.

Als nächster Schritt wird ein Fused Image des gesamten Projekts erstellt. Nun kann man über die Tools Spots und Quantify das Spot Detecting starten, wobei das Programm alles, was es als Spot erkennt, markiert. Um schwache oder falsch positive Spots zu entfernen bzw. Markierungen zu korrigieren, gibt es das Spot Editing Tool. Editiert wird immer auf der Union Fusion, also dem Gel, das aus allen anderen generiert wurde. Hat man alle Spots kontrolliert, werden sie auf die anderen Gele transferiert. Nun kann man die Quantifizierungstabelle für die weitere Auswertung erstellen und durch bestimmte Filter z.B. die Spots markieren, die um den Faktor 2 hoch oder herunter reguliert sind.

4.2.3.6 Analyse ausgewählter Spots mittels MALDI-TOF-MS

Der Name MALDI-TOF-MS steht für Matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight mass-spectrometry.

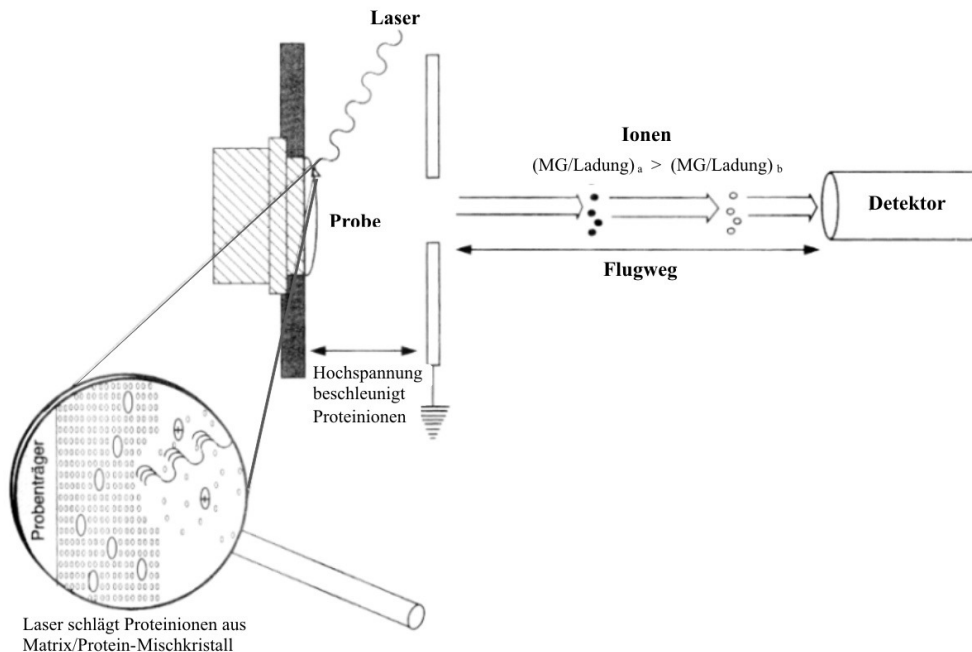


Abbildung 4-6 Matrix-assisted laser-desorption ionization Massenspektrometer (schematisch) (Verändert nach (Rehm, 2002)).

Die Proteine werden dafür in Kristalle von UV-absorbierenden Molekülen eingebaut, in die sogenannte Matrix. Die sauren UV-absorbierenden Moleküle übertragen dabei Protonen auf die Proteine, die dadurch positiv aufgeladen werden. Im Hochvakuum des Massenspektrometers wird die Proteinmatrix mit Laserpulsen bestrahlt, wobei die Matrixmoleküle und damit auch die eingebauten Proteine frei werden, die ohne Hydratwasser in die Gasphase übergehen. Diese positiv geladenen Proteinionen werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt und fliegen in eine Vakuum-Flugröhre, den Flugzeitanalysator (TOF). Alle Ionen fliegen die gleiche Strecke, bevor sie auf den Detektor treffen. Da sie aber unterschiedliche Masse/Ladungs-Verhältnisse aufweisen, sind sie unterschiedlich schnell. Aus Geschwindigkeit und Ladung ermittelt die MALDI-TOF die Masse eines Proteins und durch eine vergleichende Suche in Datenbanken kann dann die Identität des Proteins ermittelt werden. Für die Massenspektrometrie werden mit kolloidalem Coomassie gefärbte Gele, auf denen die zu analysierenden Spots gekennzeichnet sind, an den Lehrstuhl für Biomolekulare Chemie am ZMBH in Heidelberg geschickt. Die MS-Ergebnisse werden in einer Tabelle zusammengefasst.

4.3 Mikrobiologische Methoden

4.3.1 Isolierung von Reinkulturen

Um aus einem Bakteriengemisch aus Umweltproben oder kulturbedingter Variation Reinkulturen zu erhalten, wird eine Einzelkolonie gepickt und auf einem entsprechenden Nährmedium ein Einzelkoloniausstrich durchgeführt. Wiederum von einer Einzelkolonie wird nun eine Übernachtskultur im entsprechenden Medium angeimpft, um zu kontrollieren, ob die Koloniemorphologie nach einem erneuten Ausstreichen erhalten bleibt. Das wiederholte Ausstreichen und Kultivieren in Flüssigmedium wird 3 x durchgeführt. Als weitere Kontrolle werden die Bakterien mikroskopiert. Wenn die beobachtete Koloniemorphologie auch nach mehrmaligem Ausstreichen erhalten bleibt und auch die Mikroskopie eine einheitliche Morphologie zeigt, kann man von einer Reinkultur ausgehen.

4.3.2 Wachstumskurven

Für Wachstumsversuche werden 50 ml Kulturen 1:50 von Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C, 15°C und 42°C unter Schütteln inkubiert. In regelmäßigen Abständen werden Aliquots entnommen und die optische Dichte photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Für die Darstellung der Wachstumskurve wird der Logarithmus der OD₆₀₀ gegen die Zeit aufgetragen.

4.3.3 Langzeitwachstumsversuch

Langzeitwachstumsversuche mit Bordetellen werden wie bei Porter und Wardlaw beschrieben durchgeführt (Porter *et al.*, 1991; Porter & Wardlaw, 1993). Als Medien dienen sterilfiltriertes Milliporewasser, 1x PBS und Mainwasser. Als Inokulum werden die Bakterien mit 1 x PBS von Platte abgespült und die Suspension auf die OD₅₄₀ von 0,45 eingestellt ($\approx 1,5 \times 10^9$ CFU/ml). 1 ml der Bakteriensuspension wird 3 x für 15 min bei 10.500 rpm und RT abzentrifugiert und das Pellet jeweils in 1 ml 1 x PBS resuspendiert. Die Suspension wird nun 1:20.000 in 1 x PBS verdünnt ($\approx 7,6 \times 10^4$). Es werden je 1950 μ l Medium mit 50 μ l der Bakteriensuspension inokuliert (\approx ca. 2000 CFU/ml) und bis zu 9 Monate bei 37°C im Schüttler inkubiert. Zu bestimmten Zeiten (0 h, 24 h, 48 h, 20 d, 110 d, 195 d, 263 d) werden 100 μ l entnommen, in 1 x PBS seriell verdünnt und davon je 100 μ l ausplattiert.

4.3.4 Antibiotikatest

Um die Sensitivität von Bakterien auf Gentamycin bzw. Polymyxin B während der Invasionsstudien zu untersuchen, werden die Bedingungen analog der Zellkulturbedingungen gewählt. Sollen 1×10^6 Makrophagen/ml mit einer MOI = 100 infiziert werden, werden 1×10^8 Bakterien/ml benötigt. In RPMI Medium wird die entsprechende Menge Bakterien mit dem zu testenden Antibiotikum gemischt, die Ansätze 90 min bei 37°C inkubiert und geeignete Verdünnungen ausplattiert. Das Inokulum wird wie folgt eingestellt: Die Bakterien werden mit RPMI Medium von Platte abgespült und die OD₆₀₀ auf 5,9 für *E. coli* ($\approx 7,16 \times 10^9$ CFU/ml) und die OD₅₄₀ für *Bordetellen* auf 3 ($\approx 7 \times 10^9$ CFU/ml) eingestellt. Dies entspricht etwa 30 μ l Bakteriensuspension pro Ansatz. Zur Bestimmung der CFU/ml werden geeignete Verdünnungen ausplattiert und die Platten nach 24 - 48 h ausgezählt.

Antibiotikum [μ g/ml]	Antibiotikum 5 mg/ml [μ l]	Bakteriensuspension [μ l]	RPMI [μ l]
0	0	30	1970
10	4	30	1966
25	10	30	1960
50	20	30	1950
100	40	30	1930
150	60	30	1910

Tabelle 4-5 Pipettierschema für einen Antibiotikatest im 2 ml Maßstab

4.3.5 Anlegen von Glycerinkulturen

Zum Aufbewahren von Bakterien in einer Stammsammlung werden 25 %ige Glycerinkulturen angelegt und bei -80°C eingefroren. Hierfür wird 50 % Glycerin im entsprechenden Medium angesetzt und autoklaviert. 500 μ l einer Übernachtskultur werden dann mit 500 μ l 50 % Glycerin in einem Kryoröhrchen gemischt und zügig eingefroren.

4.4 Zellkultur

Eukaryotische Zellen werden in humider Atmosphäre in CO₂-Begasungsbrutschränken bei 37°C und 5 % CO₂ in speziellen Petrischalen oder Kulturflaschen gehalten. Die verwendeten Puffer und Medien werden stets auf 37°C vorgewärmt.

4.4.1 Auftauen und Einfrieren von Makrophagen

Die Lagerung eukaryotischer Zellen erfolgt in flüssigem Stickstoff (-196°C). Um Kristallbildung innerhalb und außerhalb des Cytoplasmas sowie Dehydration zu vermeiden, werden üblicherweise 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) zugesetzt. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen werden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und sofort in einer Flasche mit vorgewärmtem Kulturmedium ausgesät. Nach 3 - 6 h wird überprüft, ob sich die Zellen bereits am Flaschenboden abgesetzt haben, dann kann das Medium, das noch DMSO enthält, gewechselt werden.

Zum Einfrieren werden die Zellen mit einem Glasspatel, den man aus einer Pasteurpipette ausgezogen hat, vom Flaschenboden abgelöst, in 10,8 ml RPMI + FCS aufgenommen und ca. 2 min auf Eis gestellt. Nun werden 1,2 ml DMSO dazugegeben (12 % Endkonzentration) und 1 ml Aliquots auf Kryoröhrchen verteilt. In Papiertücher eingewickelt werden die Zellen langsam bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

4.4.2 Subkultivierung von Makrophagen

Eukaryotische Zellen bilden nach ca. 3 - 4 Tagen einen Monolayer und müssen auf neue Kulturflaschen gesplittet werden.

Nach dem Absaugen des Mediums aus der Kulturflasche werden die Zellen mit 10 ml 1 x PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen. Hierdurch werden Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen aus dem Medium entfernt. Nach Absaugen des PBS werden 12 ml RPMI + FCS zugegeben, die Zellen mit einem Glasspatel vom Flaschenboden abgelöst und mit einer 10 ml Pipette vorsichtig resuspendiert. Die Zellen werden in einem Verhältnis von 1:2 - 1:5 in eine neue Kulturflasche ausgesät und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Bis sich wieder ein Monolayer gebildet hat wird das Medium regelmäßig kontrolliert und bei Farbumschlag sofort gewechselt.

4.4.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Der Farbstoff Trypanblau dient zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen. Bei toten Zellen dringt der Farbstoff durch die Zellwand in die Zelle ein und verursacht so eine Blaufärbung. Lebende Zellen nehmen Trypanblau nur sehr langsam auf und werden im Mikroskop als weiße Zellen sichtbar.

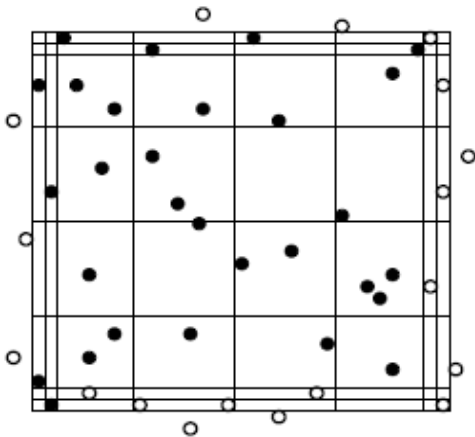


Abbildung 4-7 Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Großquadrat. Zellen auf dem linken und oberen Rand werden gezählt (schwarz), Zellen auf dem untern und rechten Rand werden nicht gezählt (weiß).

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgt mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer: 20 µl der abgelösten Zellen werden mit 20 µl Trypanblau versetzt und in der Zählkammer ausgezählt. Damit das Kammervolumen korrekt ist, muß das Deckgläschen mit gut erkennbaren Newton'schen Ringen auf die Deckglasstützen aufgelegt sein. Es werden vier Großquadrate mit je 16 Kleinquadraten ausgezählt und das arithmetische Mittel bestimmt. Zur Bestimmung der Zellzahl, multipliziert man den erhaltenen Wert mit dem Kammerfaktor 5000.

Lebendzellzahl / ml = Mittelwert Großquadrate x Kammerfaktor

Eine Anfärbung von Makrophagen ist jedoch nicht unbedingt nötig, da eine Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen auch ohne Farbstoff möglich ist.

4.4.4 Invasionsassay von *B. petrii* und *B. bronchiseptica* mit P388D1 makrophagenähnlichen Zellen

Um die Aufnahmesrate von *B. bronchiseptica* und *B. petrii* zu vergleichen, werden Makrophagen 1 h lang mit einer Bakteriensuspension (MOI=100) inkubiert. In dieser Zeit werden die Bakterien phagozytiert. Extrazelluläre und adhärenente Bakterien werden durch anschließendes Waschen und eine 90 minütige Antibiotikumbehandlung entfernt. Lysiert man nun die Zellen und bestimmt die Lebendzellzahl der Bakterien durch Ausplattieren, kann eine Aussage über die Invasivität der Bakterien getroffen werden.

24 h vor Versuchsbeginn wird mit dem Aussäen der Makrophagen begonnen. Diese werden abgelöst, ausgezählt (4.4.3) und auf 3×10^5 Zellen/ml eingestellt. Davon werden 2,5 ml/Well in 12-Well-Kulturplatten ausgesät ($\approx 7,5 \times 10^5$ Zellen/Well). Es werden je 3 Wells pro Bakterienstamm gerechnet.

Für das Inokulum werden die Bakterien auf Platte ausgestrichen, ü. N. bei 37°C inkubiert und am Versuchstag mit RPMI (-FCS) von Platte abgespült. Die Bakteriensuspension wird auf 1×10^8 CFU/ml eingestellt. Ein Aliquot wird für eine serielle Verdünnungsreihe zur Keimzahlkontrolle eingesetzt.

Für die Infektion wird zunächst das Medium von den Makrophagen abgesaugt und dann die Zellen mit 1 ml RPMI (-FCS) gewaschen. Dann wird pro Well jeweils 1 ml Bakteriensuspension eingesetzt und die Zellen 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nun erfolgt eine Antibiotikumbehandlung mit 100 µg/ml Polymyxin B. Hierfür wird zunächst die Bakteriensuspension abgesaugt und dann die Zellen mit 1 ml RPMI (-FCS) gewaschen. 1 ml Polymyxin B-haltiges RPMI (+FCS) wird zugefügt und der Assay 90 min bei 37°C inkubiert.

Für die Probennahme wird das Polymyxin B-haltige Medium abgesaugt, die Zellen 2 x mit PBS+Mg²⁺+Ca²⁺ gewaschen und dann unter dem Abzug getrocknet. Durch Zugabe von 1 ml kaltem H₂O_{dest.} und anschließendem Sonifizieren (2,5; timer hold; 5 s) werden die Zellen lysiert und aus dem Überstand wird eine serielle Verdünnungsreihe erstellt. Passende Verdünnungen werden ausplattiert und die Platten nach 24 - 48 h ausgezählt.

4.4.5 Infektionsassay von *B. petrii* und *B. bronchiseptica* mit P388D1 makrophagenähnlichen Zellen

Der Infektionsassay wird bis zur Antibiotikumbehandlung wie der Invasionsassay durchgeführt, wobei beim Aussäen der Zellen jeweils 12-Well-Platten für den 0 h-Wert (Invasionswert), 6 h-Wert, 24 h-Wert, 48 h-Wert und 72 h-Wert vorbereitet werden.

Während der 0 h-Wert wie oben beschrieben genommen wird, wird das antibiotikumhaltige Medium von den restlichen Well-Platten abgesaugt, die Zellen 1 x mit 1 ml RPMI (-FCS) gewaschen und dann RPMI (+FCS) Medium zugegeben, welches eine niedrigere Polymyxin B-Konzentration enthält (20 µg/ml). Dieses Medium wird alle 24 h gewechselt.

Die Probennahme erfolgt zu den entsprechenden Zeiten, wie unter 4.4.4 beschrieben.

4.4.6 Giemsa-Färbung und Mikroskopie zur Bestätigung der Invasionsdaten

Bei der Giemsa-Färbung werden sowohl Bakterien als auch eukaryotische Zellen angefärbt. Daher ist es möglich, die Anzahl phagozytierter Bakterien in Makrophagen zu bestimmen. Da bei dieser Färbemethode nicht zwischen intrazellulären und an der Zellwand adhärenen Bakterien unterschieden werden kann, ist es wichtig, die Zellen vor der Färbung gründlich zu waschen und ggf. die extrazellulären Bakterien mittels Antibiotikumbehandlung zu eliminieren. Um Dauerpräparate anzufertigen, werden die Makrophagen direkt auf sterilen Deckgläschen ausgesät und wie für den Invasionsassay beschrieben mit Bakterien infiziert (siehe 4.4.4). Nach der Polymyxin B-Behandlung werden die infizierten Makrophagen 3 x mit PBS+Mg²⁺+Ca²⁺ gewaschen und anschließend für 5 min mit MeOH fixiert. Die Deckgläschen werden dann auf Papier getrocknet, mit 150 µl Giemsa-Lösung (1:20 mit H₂O_{dest.} verdünnt) überschichtet und für ca. 25 min bei RT inkubiert. Nun wird der Farbstoff gut unter fließendem Wasser abgespült und die Glasplättchen dann noch mit 20 mM NaPi-Puffer gespült. Nach dem Trocknen werden die Deckgläschen mit der Zellseite nach oben mit Nagellack auf Objektträger geklebt. Die Auswertung erfolgt mit 1000facher Vergrößerung am Phasenkontrastmikroskop.

<u>NaPi-Puffer</u> (pH 7,4)	81 ml 20 mM Na ₂ HPO ₄ 19 ml 20 mM NaH ₂ PO ₄ zusammengenommen und pH überprüfen
<u>Na₂HPO₄</u> (pH ~ 9,8)	20 mM
<u>NaH₂PO₄</u> (pH ~ 4,5)	20 mM

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung des Umweltkeims *B. petrii* DSM 12804

B. petrii DSM 12804 wurde aus Flusssediment isoliert und vergleichende 16S rDNA-Sequenzanalysen zeigten eine enge Verwandtschaft zu der Gattung *Bordetella* sowie zu den Gattungen *Achromobacter* und *Alcaligenes*, welche neben fakultativen Pathogenen auch Umweltkeime umfassen. Von Wintzingerode *et al.* beschrieben den Keim als erstes Umweltisolat der Gattung *Bordetella* (von Wintzingerode *et al.*, 2001). Dabei bildet *B. petrii* einen eigenständigen Zweig, zu dem die anderen *Bordetella*-Arten die nächsten Nachbarn darstellen (von Wintzingerode *et al.*, 2001). Die Einordnung an der Basis der Gattung *Bordetella* wird auch durch die Genomannotation bestätigt, denn *B. petrii* weist sowohl Eigenschaften von Umweltkeimen, auf kodiert aber auch für Faktoren, die Ähnlichkeiten zu den Virulenzfaktoren der pathogenen *Bordetella*-Arten haben, wie z. B. Gene, die für FhaB und FhaC-ähnliche Proteine kodieren, sowie Fimbriengene und Autotransportergene. Des Weiteren besitzt *B. petrii* ein Äquivalent zum virulenzregulatorischen BvgAS-Zweikomponentensystem der pathogenen *Bordetella*-Arten (Gross *et al.*, 2008). Um den Umweltkeim näher zu charakterisieren, sollten vergleichende Studien mit *B. bronchiseptica* durchgeführt werden.

Von Porter *et al.* wurde beschrieben, dass der pathogene Keim *B. bronchiseptica* in PBS und verschiedenen Teichwasserproben wachsen und damit einem beträchtlichen, durch Nährstoffmangel verursachten Stress widerstehen kann. Ähnliches wurde auch für *B. avium* beobachtet, wohingegen *B. pertussis* und *B. parapertussis* unter diesen Bedingungen absterben. Für *B. bronchiseptica* konnte zudem eine Zunahme der Keimzahl nach 48 h Inkubation um das 1000fache beobachtet werden (Porter *et al.*, 1991). Ferner konnten verschiedene *B. bronchiseptica* Stämme in Teichwasser und PBS über einen Zeitraum von 24 Wochen nachgewiesen werden, ohne einen nennenswerten Rückgang der Keimzahlen zu verzeichnen (Porter & Wardlaw, 1993). Aus diesen Beobachtungen lässt sich folgern, dass *B. bronchiseptica* womöglich auch als frei lebender Organismus auftreten kann und Gewässer damit ein potentiell Reservoir für Infektionen darstellen könnten. Als erster Ansatz zur Untersuchung von *B. petrii* wurde daher, wie für *B. bronchiseptica* beschriebenen, ein Langzeitwachstumsversuch in Flusswasser durchgeführt und so das Verhalten des Umweltkeims unter vergleichenden Bedingungen beobachtet. Der Versuch wird im Kapitel 5.4 dieser Arbeit beschrieben.

Eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass die als extrazellulär beschriebenen Pathogene *B. pertussis*, *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* eine gewisse Fähigkeit für intrazelluläres Überleben in verschiedenen eukaryotischen Zellen haben. Erste Hinweise auf intrazelluläre Infektionsstadien wurden bereits 1959 von Crawford und Fishel (Crawford & Fishel, 1959) erbracht, die Zellkulturen zur Vermehrung von *B. pertussis* einsetzten und dabei Wachstum von Bakterienkulturen aus zuvor mit *B. pertussis* infizierten und anschließend mit Antibiotikum behandelten Zellen beobachten konnten.

Untersuchungen auf intrazelluläres Überleben wurden in einer Reihe von Zelllinien durchgeführt, wie z.B. HeLa-Zellen (Ewanowich *et al.*, 1989a; Ewanowich *et al.*, 1989b;

Savelkoul *et al.*, 1993), Epithelzellen (Schipper *et al.*, 1994), Leukozyten (Steed *et al.*, 1991) und dendritischen Zellen (Chhatwal *et al.*, 1997; Guzman *et al.*, 1994a). Ferner wurde auch die Aufnahme von *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* in eine ganze Reihe professioneller Phagozyten untersucht, wobei *B. pertussis* meist schon nach wenigen Stunden effizient abgetötet wurde, *B. bronchiseptica* dagegen auch nach einem Zeitraum von mehreren Tagen noch nachgewiesen werden konnte (Banemann & Gross, 1997; Forde *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 2000).

Die Bedeutung dieser Beobachtungen für Infektionen *in vivo* ist zwar noch nicht ganz klar, doch die Fähigkeit intrazellulär zu überleben, könnte bei chronischen Erkrankungen eine Rolle spielen und eine Art Ruhephase *in vivo* darstellen (Brockmeier & Register, 2000; Coote, 2001; Forde *et al.*, 1998).

Von *B. petrii* wurden zwar klinische Isolate aus Patienten mit mandibularer Osteomyelitis bzw. eitriger Mastoiditis beschrieben (Fry *et al.*, 2005; Stark *et al.*, 2007) über das pathogene Potential von *B. petrii* DSM 12804 herrscht aber trotz der Beschreibung putativer Virulenzfaktoren noch Unklarheit. Als weitere Charakterisierungsstudie für den Umweltkeim wurde daher die Aufnahme- und Überlebensfähigkeit in professionellen Phagozyten im Vergleich zu *B. bronchiseptica* untersucht, was im folgenden Kapitel (5.2) beschrieben wird.

5.2 Aufnahme und Überlebensfähigkeit von *B. petrii* DSM 12804 in P388D1 makrophagenähnlichen Zellen

Bevor mit den Invasions- und Infektionsstudien begonnen wurde, mussten die Parameter für diese Versuche festgelegt werden. Als Zelllinie wurden P388D1 makrophagenähnliche Zellen verwendet, da sie alle Charakteristika normaler Makrophagen aufweisen (Koren *et al.*, 1975) und ein repräsentatives Modell für das intrazelluläre Überleben von *B. bronchiseptica* darstellen (Forde *et al.*, 1998). Die Infektionen wurden immer mit einer MOI von 100 durchgeführt, wobei eine Infektionszeit von 60 min und eine sich anschließende Antibiotikum-Inkubationszeit von 90 min gewählt wurden (siehe Abschnitte 4.4.4 + 4.4.5). Da in verschiedenen Infektionsstudien mit *B. bronchiseptica* sowohl Gentamycin (Banemann & Gross, 1997; Schneider *et al.*, 2000) als auch Polymyxin B (Forde *et al.*, 1998) als Antibiotikum verwendet wurden, sollte deren Verwendbarkeit zunächst für *B. petrii* getestet werden.

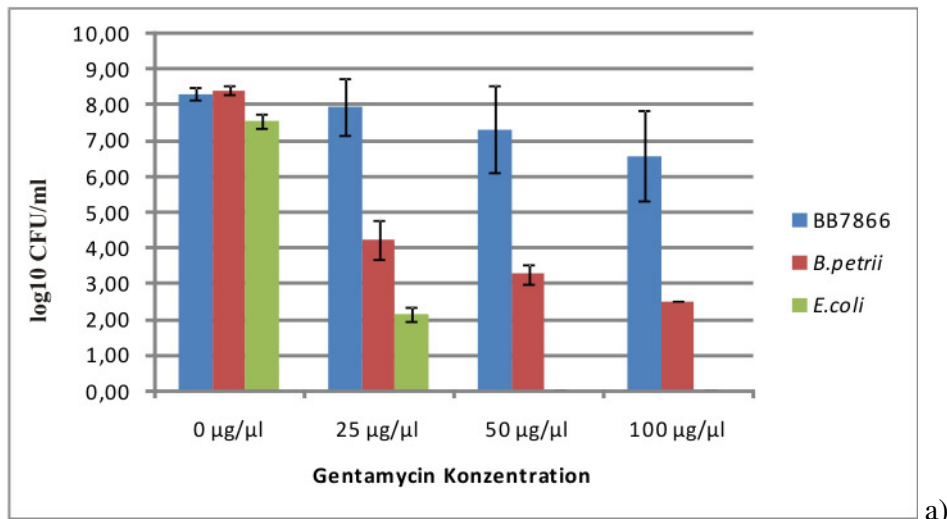
5.2.1 Untersuchung zur Gentamycin- und Polymyxin B-Sensitivität von *B. petrii* DSM 12804 und *B. bronchiseptica* 7866

Um die Wirksamkeit von Gentamycin und Polymyxin B zu testen, wurden die Bedingungen, d.h. verwendetes Medium, Bakteriendichte und Inkubationszeiten analog den Bedingungen in der Zellkultur gewählt (siehe Abschnitt 4.3.4). Die Tests wurden zweimal unabhängig voneinander wiederholt und die „colony forming units“ pro Milliliter (CFU/ml) per „plate count“ bestimmt. Für eine geeignete Darstellung wurde nun noch der Logarithmus zur Basis 10 berechnet, die Werte gemittelt und die Standardabweichung bestimmt.

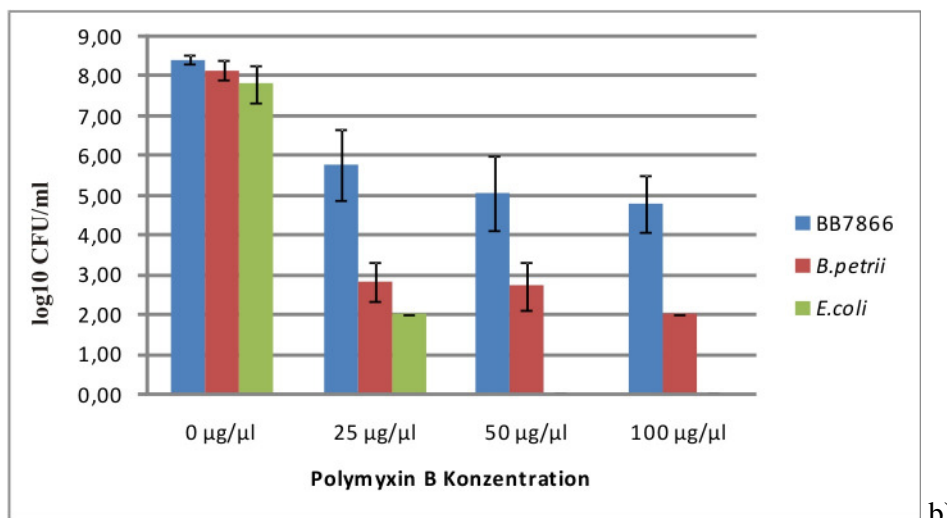
In Abbildung 5-1 a) ist der \log_{10} der CFU/ml gegen eine steigende Gentamycin-Konzentration aufgetragen, in Abbildung 5-1 b) gegen eine steigende Polymyxin B-

Konzentration. Die Effizienz der beiden getesteten Antibiotika ist für *E. coli* DH5 α und *B. petrii* DSM 12804 in beiden Ansätzen etwa gleich. Bereits mit 25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ des jeweiligen Antibiotikums werden mindestens 99,99 % der etwa 1×10^8 Bakterien über einen Zeitraum von 90 min abgetötet.

Die Phasenvariante *B. bronchiseptica* 7866 wird mit Gentamycin weniger effizient abgetötet als mit Polymyxin B. Mit 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Gentamycin werden nur 88,62 % der Bakterien im Ansatz eliminiert, mit 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Polymyxin B dagegen 99,8 %. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde Polymyxin B für die folgenden Versuche als Antibiotikum gewählt.



a)



b)

Abbildung 5-1 Gentamycin- und Polymyxin B-Sensitivitätstest mit *B. bronchiseptica* 7866, *B. petrii* DSM 12804 und *E. coli* DH5 α . Aufgetragen ist der Log₁₀ der CFU/ml gegen eine steigende a) Gentamycin-Konzentration bzw. b) Polymyxin B-Konzentration

5.2.2 Vergleich der Aufnahme von *B. petrii* DSM 12804 und *B. bronchiseptica* 7866 in P388D1 makrophagenähnliche Zellen

Zur Ermittlung der Aufnahme rate wurden fünf doppelt ausgeführte Assays mit *B. bronchiseptica* 7866 und *B. petrii* DSM 12804 (siehe Abschnitt 4.4.4) ausgewertet. Für *E. coli* DH5 α wurden drei Assays ausgewertet. Aus den CFU/ml des Inokulums und denen

des 0 h-Wertes wurde jeweils der prozentuale Anteil der internalisierten Bakterien berechnet. Diese Werte wurden gemittelt und die Standardabweichung bestimmt.

Die Abbildung 5-2 zeigt den pro Stamm gemittelten prozentualen Anteil der nach einer Stunde Infektionszeit aufgenommenen Bakterien. Um die Signifikanz zu ermitteln, wurde ein zweiseitiger Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Dieser ergab für *B. bronchiseptica* und *B. petrii* einen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$), nicht jedoch für *B. petrii* und *E. coli* ($p \geq 0,05$).

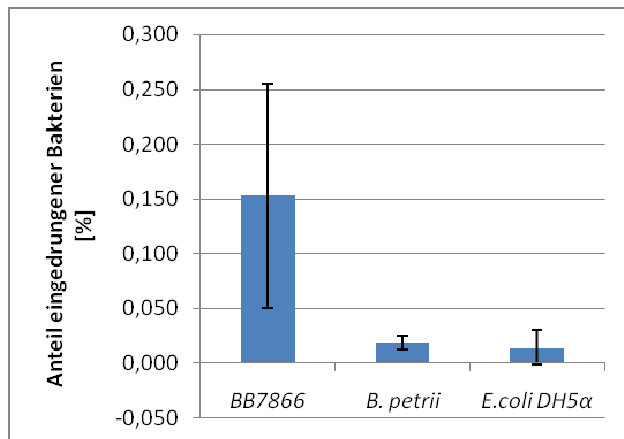


Abbildung 5-2 Anteil intrazellulärer *B. bronchiseptica* 7866, *B. petrii* DSM 12804 und *E. coli* DH5α in P388D1 Makrophagen nach 1 h Infektionszeit und 90 minütiger Antibiotikumbehandlung.

Etwa 0,15 % des Inokulums von *B. bronchiseptica* wurden von den P388D1 Makrophagen nach 1 h Infektionszeit aufgenommen. Dieser Wert passt zu den aus früheren Studien erhaltenen Werten für *B. bronchiseptica*, bei denen 0,1 – 5 % des Inokulums in Epithelzellen, P388D1 makrophagenähnliche Zellen und Knochenmarksmakrophagen aufgenommen wurden (Banemann & Gross, 1997; Forde *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 2000). Bei *B. petrii* dagegen beträgt der Anteil an aufgenommenen Bakterien nur 0,019 %, womit dieser etwa um den Faktor 7,5 weniger invasiv erscheint als *B. bronchiseptica*. Der Anteil internalisierter *E. coli* liegt bei 0,014 % und damit in einem ähnlichen Größenbereich wie bei *B. petrii*.

5.2.3 Giemsa-Färbung und Mikroskopie von P388D1 makrophagenähnlichen Zellen nach einstündiger Infektion mit *B. bronchiseptica* 7866 und *B. petrii* DSM 12804.

Um die Daten aus den Invasionsassays mikroskopisch zu bestätigen, wurden P388D1 makrophagenähnliche Zellen auf Deckgläschen ausgesät und für eine Stunde mit *B. bronchiseptica* 7866 bzw. mit *B. petrii* DSM 12804 oder *E. coli* DH5α infiziert, wie für die Invasionsassays beschrieben. Nach der Antibiotikumbehandlung wurden die Deckgläschen gewaschen und eine Giemsa-Färbung angeschlossen (Abschnitt 4.4.6). Es wurden jeweils drei Präparate hergestellt und etwa 100 bakterienhaltige Makrophagen ausgezählt. Die Signifikanz wurde mittels einer zweiseitigen t-Teststatistik untersucht. Die Datenreihen sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,01$). In mit *B. bronchiseptica* infizierten Makrophagen sind im Durchschnitt etwa ≥ 5 Bakterien internalisiert, was auch von Forde *et al.* beobachtet wurde (Forde *et al.*, 1998). In mit *B. petrii* infizierten Makrophagen sind im Durchschnitt etwa zwei Bakterien internalisiert. Da nur etwa 1/3 bis 1/4 der Makrophagen bei der *B. petrii*-Infektion Bakterien beinhalten, ergänzt dieses Ergebnis die oben beschriebenen Invasionsassays. In mit *E. coli* infizierten Makrophagen sind im Durchschnitt etwa vier Bakterien internalisiert, was,

auch bei einer geringeren Infektionsdichte als bei *B. bronchiseptica*, doch einen höheren Wert darstellt als bei den Invasionsassays beobachtet. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Lebensfähigkeit der aufgenommenen Bakterien beeinträchtigt wird und sich entsprechend im „plate count“ des Invasionsassays niederschlägt. Die Abbildung 5-3 zeigt repräsentative Ausschnitte der Giemsa-gefärbten Präparate, die die stärkere Invasion durch *B. bronchiseptica* im Vergleich zu *B. petrii* erkennen lassen.

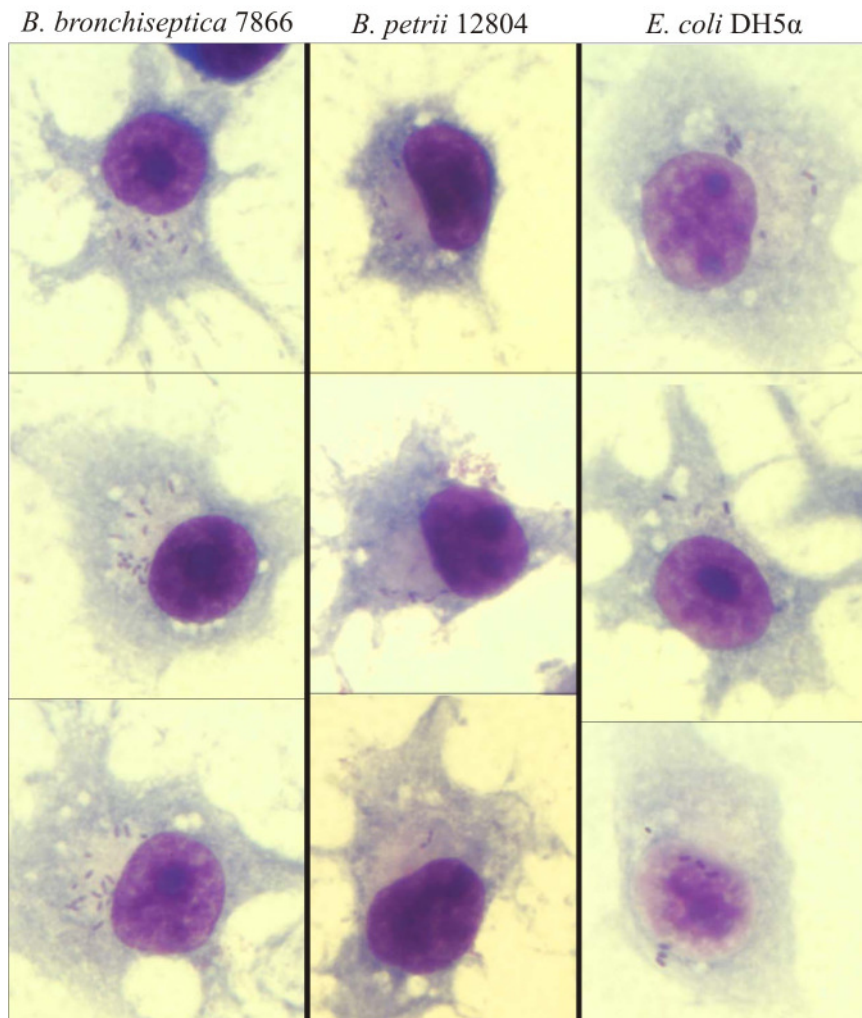


Abbildung 5-3 Ausschnitte aus Giemsa-gefärbten Präparaten nach einstündiger Infektion mit *B. bronchiseptica* 7866, *B. petrii* DSM 12804 oder *E. coli* DH5 α . MOI=100.

5.2.4 Infektion von P388D1 makrophagenähnlichen Zellen zur Untersuchung der Überlebensfähigkeit von *B. petrii* DSM 12804 in eukaryotischen Zellen

Die Infektion wurde wie unter Abschnitt 4.4.5 beschrieben durchgeführt. Bis zum 0 h-Wert entspricht die Infektion praktisch einem Invasionsassay, wird dann aber über einen längeren Zeitraum hinweg weiter geführt, wobei die Antibiotikummenge im Medium reduziert wird, um ein Abtöten der intrazellulären Bakterien zu vermeiden. Zu definierten Zeitpunkten nach der Infektion werden die Makrophagen lysiert und serielle Verdünnungen der Bakteriensuspension zur Keimzahlbestimmung ausplattiert. Für diese Auswertung wurden drei unabhängige Infektionen durchgeführt, die prozentuale Überlebensrate bestimmt, wobei der 0 h-Wert auf 100 % gesetzt wurde, die Werte gemittelt und die Standardabweichung

bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5-4 graphisch dargestellt. Als Teststatistik wurde ein zweiseitiger Mann-Whitney U-Test durchgeführt, der aufgrund der großen Schwankungen in den einzelnen Infektionen keine signifikanten Unterschiede erkennen läßt. Da eine Replikation von *B. bronchiseptica* in P388D1 Zellen bisher nicht beobachtet werden konnte (Forde *et al.*, 1998) und aufgrund der Teststatistik, ist der starke Zuwachs für *B. bronchiseptica* bei 72 h vorsichtig zu bewerten. Ebenso verhält es sich mit der Persistenz von *E. coli*, der als Negativkontrolle mitgeführt wurde. Hier muß über eine mögliche Veränderung in der Polymyxin B-Sensitivität diskutiert werden (Lacour *et al.*, 2006). Interessant ist allerdings, dass der Umweltkeim *B. petrii* auch 72 h nach der Infektion noch nachgewiesen werden kann, auch wenn die Teststatistik keine genauen Aussagen über eine Zu- oder Abnahme zuläßt.

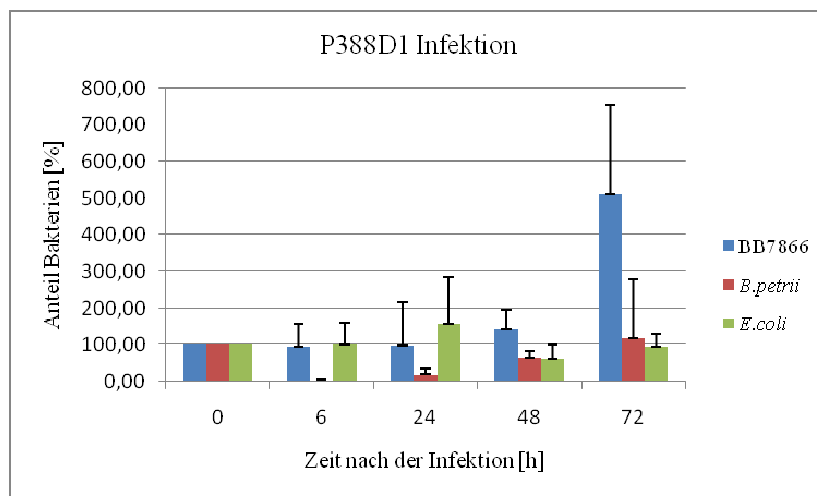


Abbildung 5-4 Graphische Darstellung der P388D1 Infektion mit *B. bronchiseptica* 7866, *B. petrii* DSM 12804 oder *E. coli* DH5a. Aufgetragen ist der Anteil der lebensfähigen Bakterien gegen die Zeiten der Probennahme nach der Infektion. MOI=100. Der Anteil der Bakterien des 0h-Wertes wurde auf 100 % gesetzt.

5.3 Untersuchungen zum Bvg Regulon von *B. petrii* DSM 12804

Das BvgS/BvgA Zweikomponentensystem (ZKS) der pathogenen *Bordetella*-Arten stellt den Master-Regulator der Virulenzgenexpression dar (Beier & Gross, 2006; Cotter & Jones, 2003) und reagiert *in vitro* auf Veränderungen der Temperatur und auf bestimmte Substanzen wie Nikotinsäure und Sulfationen (Melton & Weiss, 1989; Prugnola *et al.*, 1995). Des weiteren könnte auch die Osmolarität des Mediums einen Einfluss auf das BvgAS-System haben (Stenson & Pepler, 2007). BvgS ist zudem direkt mit der Atmungskette und dem Energiezustand der Zelle verknüpft, da gezeigt wurde, dass es *in vitro* den Oxidationszustand von Ubichinon wahrnehmen kann (Bock & Gross, 2002). Die Aktivierung der Virulenzgene bei 37°C und deren Reprimierung bei abnehmenden Temperaturen, führt zu der Vermutung, dass dieses ZKS einem fakultativ pathogenen Vorfahren der Bordetellen z.B. dazu gedient haben könnte, zwischen dem Aufenthalt in der Umwelt und im Wirt zu unterscheiden (Gerlach *et al.*, 2001).

Die Funktion des BvgAS-ZKS in einem Umweltkeim mit unbekanntem pathogenem Potential, könnte Rückschlüsse auf die Evolution der virulenzregulatorischen Eigenschaften

dieses Systems zulassen. Die Feststellung, dass bei *B. bronchiseptica* zusätzlich zu den Virulenzgenen auch eine große Zahl an Stoffwechselgenen durch das BvgAS-ZKS reguliert werden (Cummings *et al.*, 2006), könnte ein Hinweis darauf sein, dass die ursprüngliche Funktion des BvgAS-Systems mit dem Überleben in der Umwelt und der Anpassung an vielseitige Lebensräume zusammenhing.

Da die Infektionsstudien mit *B. petrii* keine besonderen Hinweise auf eine mögliche Pathogenität bzw. die Rolle der putativen Virulenzfaktoren ergaben, sollte mit einem neuen Ansatz die Rolle solcher Faktoren, wie z.B. des ZKS BvgS/BvgA untersucht werden. Hierfür sollten *in silico* Analysen durchgeführt werden und Mutanten im ZKS auf Proteomebene mit dem *B. petrii* Wildtyp verglichen werden.

5.3.1 Das BvgAS-System von *B. petrii* DSM 12804

Das BvgAS-ZKS von *B. petrii* unterscheidet sich in seiner Struktur von den BvgAS-Systemen, die aus pathogenen *Bordetella*-Spezies bekannt sind. Zwar besitzt *B. petrii* wie sie ein Gen, welches für den Response Regulator BvgA kodiert, das Äquivalent zur Histidinkinase BvgS hingegen ist komplexer strukturiert. Es besteht neben den zwei Genen, die für die Histidinkinasen BvgS1 und BvgS2 kodieren, aus einem separaten Gen für die Hpt-Domäne. Ein Gen, welches für den Repressor BvgR kodiert, fehlt. Abbildung 5-5 gibt die genomische Organisation des *bvgAS*-Lokus in *B. petrii* wieder.

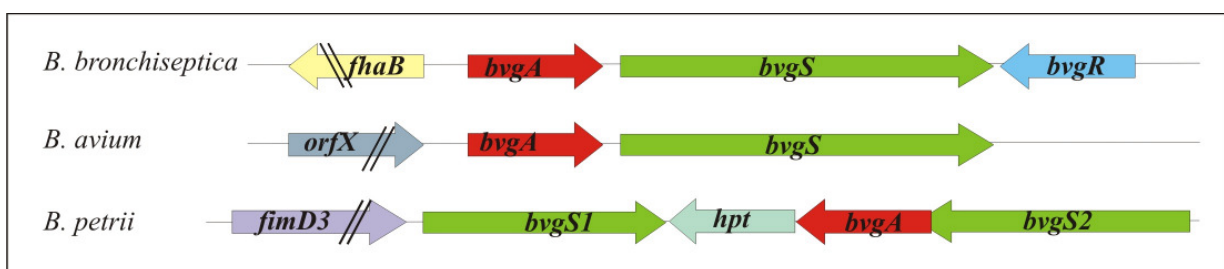


Abbildung 5-5 Genomische Organisation des *B. petrii* *bvgAS*-Lokus (<https://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/gendb-2.2>) im Vergleich zu den pathogenen *Bordetella*-Spezies *B. bronchiseptica* und *B. avium*. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

Das Vorhandensein von mehreren Histidinkinasen und einzelner Hpt-Domänen kennt man aus anderen Zweikomponentensystemen. So besitzt z.B. das Sporulierungs-Kontrollsystem von *Bacillus subtilis* eine membranständige und eine cytosolische Histidinkinase, und sowohl eine Receiver-Domäne als auch die Hpt-Domäne liegen zusätzlich zum Response Regulator separat vor (Perego, 1998; Perraud *et al.*, 1999). Es wäre vorstellbar, dass während der Evolution der pathogenen *Bordetella*-Arten eine Rationalisierung des *bvgAS*-Lokus stattgefunden hat, bei der ein Histidinkinase-Gen eliminiert wurde und durch die Eingliederung von *hpt* das zusammengesetzte Histidinkinase-Gen *bvgS* entstand. Die komplette Sequenz des Genlokus findet sich im Anhang 8.4.

Tabelle 5-1 zeigt eine Übersicht über die Größen der Response Regulatoren und Histidinkinasen der BvgS/BvgA-Systeme verschiedener *Bordetella*-Spezies. Die

Molekulargewichte wurden über eine PepStats-Analyse ermittelt (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/w2h/w2hdkfz/>).

	<i>B. pertussis</i> T1	<i>B. parapertussis</i> 12822	<i>B. bronchiseptica</i> RB50	<i>B. avium</i> 197N	<i>B. holmesii</i>	<i>B. petrii</i> DSM 12804
Leserahmen <i>bvgA</i>	630 bp	702 bp	684 bp	624 bp	624 bp	627 bp
Molekulargewicht BvgA	22,9 kDa	25,9 kDa	25,2 kDa	22,6 kDa	22,6 kDa	22,7 kDa
Leserahmen <i>bvgS</i>	3717 bp	3717 bp	3717 bp	3339 bp	3657 bp	SI: 1800 bp S2: 2055 bp hpt: 711 bp
Molekulargewicht BvgS	134,9 kDa	134,8 kDa	134,8 kDa	119,9 kDa	133,4 kDa	S1: 64,5 kDa S2: 72,2 kDa Hpt: 24,2 kDa

Tabelle 5-1 Übersicht über die Leserahmen und Molekulargewichte von *bvgA/bvgS* bzw. BvgA/BvgS verschiedener *Bordetella*-Spezies.

Zur Untersuchung der einzelnen Komponenten des *B. petrii* BvgAS-ZKS wurden die Programme PROSITE und TMHMM zur Vorhersage von Proteindomänen und Transmembranhelizes verwendet, welche über ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2003) zugänglich sind, sowie das Pfam Programm, welches ebenfalls Proteindomänen vorhersagt (Finn *et al.*, 2006). Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-6 dargestellt.

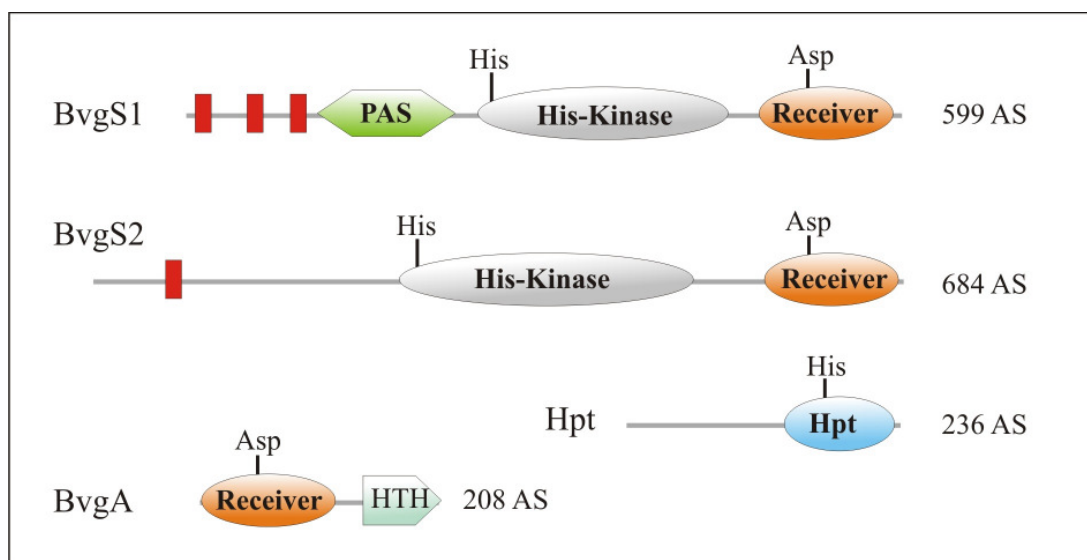


Abbildung 5-6 Schematische Übersicht über die Domänenstruktur der Komponenten des *B. petrii* BvgAS-Systems. AS: Aminosäuren; rote Balken: Transmembrandomänen; HTH: Helix-turn-Helix-Motiv der DNA-Bindedomäne des Response Regulators; Hpt: Histidin-beinhaltende Phosphotransfer-Domäne.

Für BvgS1 wurden drei Transmembrandomänen detektiert und direkt daran anschließend eine die Aminosäuren (AS) 97-211 umfassende PAS-Domäne. Die Histidinkinase umfasst die AS 229-455 und beinhaltet eine ATPase-Domäne. Die Phosphorylierung findet wahrscheinlich am Histidinrest H²³⁹ statt, von wo die Phosphorylgruppe mit großer Wahrscheinlichkeit auf

den Aspartatrest D⁵²⁵ des Receivers übertragen wird. Für BvgS2 wurde nur eine Transmembranhelix detektiert. Eine ATPase-Domäne beinhaltende Histidinkinase umfasst die AS 247-505, wobei die Autophosphorylierung voraussichtlich am Histidinrest H²⁵⁷ stattfindet. Es ist ebenfalls eine Receiver-Domäne mit dem konservierten Aspartatrest D⁶¹³ vorhanden. Eine potentielle PAS-Domäne von AS 134-214 wird von Pfam nur mit einem E-value von 0,082 angegeben. Periplasmatische Domänen sind in keiner der beiden Histidinkinasen von *B. petrii* vorhanden. Die Hpt-Domäne wird voraussichtlich am Histidin H¹⁸⁰ phosphoryliert. Der Response Regulator BvgA besteht aus einer Receiver-Domäne mit konserviertem Aspartatrest D⁵⁴ und einer Output-Domäne mit einem Helix-turn-helix-Motiv des LuxR-Typs. Die DNA-Bindung wird dabei vermutlich von den AS 164-183 vermittelt.

Zum Vergleich der Sequenzen der einzelnen Komponenten auf Aminosäureebene wurden unterschiedliche Alignments dieser Sequenzen durchgeführt. Das Ausmaß der Übereinstimmung wurde mit dem GAP-Programm ermittelt (Altschul *et al.*, 1997). Die prozentualen Ähnlichkeiten sowie die Identität sind in Tabelle 5-2 aufgelistet.

	<i>B. pertussis</i> T1 BvgS	<i>B. parapertussis</i> 12822 BvgS	<i>B. bronchiseptica</i> RB50 BvgS	<i>B. avium</i> 197N BvgS	<i>B. holmesii</i> BvgS
<i>B. petrii</i> BvgS1	48,9 (41,5)	49,2 (41,8)	49,6 (42,3)	46,6 (36,1)	46,0 (38,8)
<i>B. petrii</i> BvgS2	46,6 (38,5)	46,1 (38,4)	46,3 (38,4)	41,8 (32,6)	42,1 (33,3)
<i>B. petrii</i> Hpt	34,2 (25,1)	34,5 (25,0)	35,0 (25,0)	31,8 (26,0)	29,6 (22,3)
	<i>B. pertussis</i> T1 BvgA	<i>B. parapertussis</i> 12822 BvgA	<i>B. bronchiseptica</i> RB50 BvgA	<i>B. avium</i> 197N BvgA	<i>B. holmesii</i> BvgA
<i>B. petrii</i> BvgA	57,2 (44,2)	57,3 (44,2)	57,3 (44,2)	57,3 (41,7)	55,8 (40,8)

Tabelle 5-2 Prozentuale Ähnlichkeiten auf Aminosäureebene (fett) von Response Regulator, Histidinkinasen und HPT-Domäne aus BvgA/BvgS von *B. petrii*, mit den BvgA/BvgS-Komponenten pathogener Bordetellen. In Klammern ist die prozentuale Identität auf Aminosäureebene angegeben.

Von den Komponenten des BvgS/BvgA-Systems von *B. petrii* weist BvgA mit 57 % Ähnlichkeit auf Aminosäureebene die größte Homologie zu den pathogenen *Bordetella*-Arten auf. Die Histidinkinasen BvgS1 und BvgS2 sind mit 46 - 49 % bzw. 42 - 46 % Ähnlichkeit auf Aminosäureebene im Vergleich dazu weniger homolog, wobei BvgS1 die größere Ähnlichkeit zu BvgS der pathogenen *Bordetella*-Arten aufweist. Die Hpt-Domäne von *B. petrii* scheint mit etwa 30 - 35 % Ähnlichkeit auf Aminosäureebene am wenigsten konserviert zu sein. Diese Beobachtung wird durch die Clustal-Alignments der Histidinkinasen und Response Regulatoren, die in Abbildung 5-7 bis Abbildung 5-9 dargestellt sind, bestätigt. Da den Histidinkinasen BvgS1 und BvgS2 von *B. petrii* die periplasmatische Inputdomäne fehlt, beginnt das Alignment in Abbildung 5-9 erst im mittleren Bereich von BvgS der pathogenen Bordetellen.

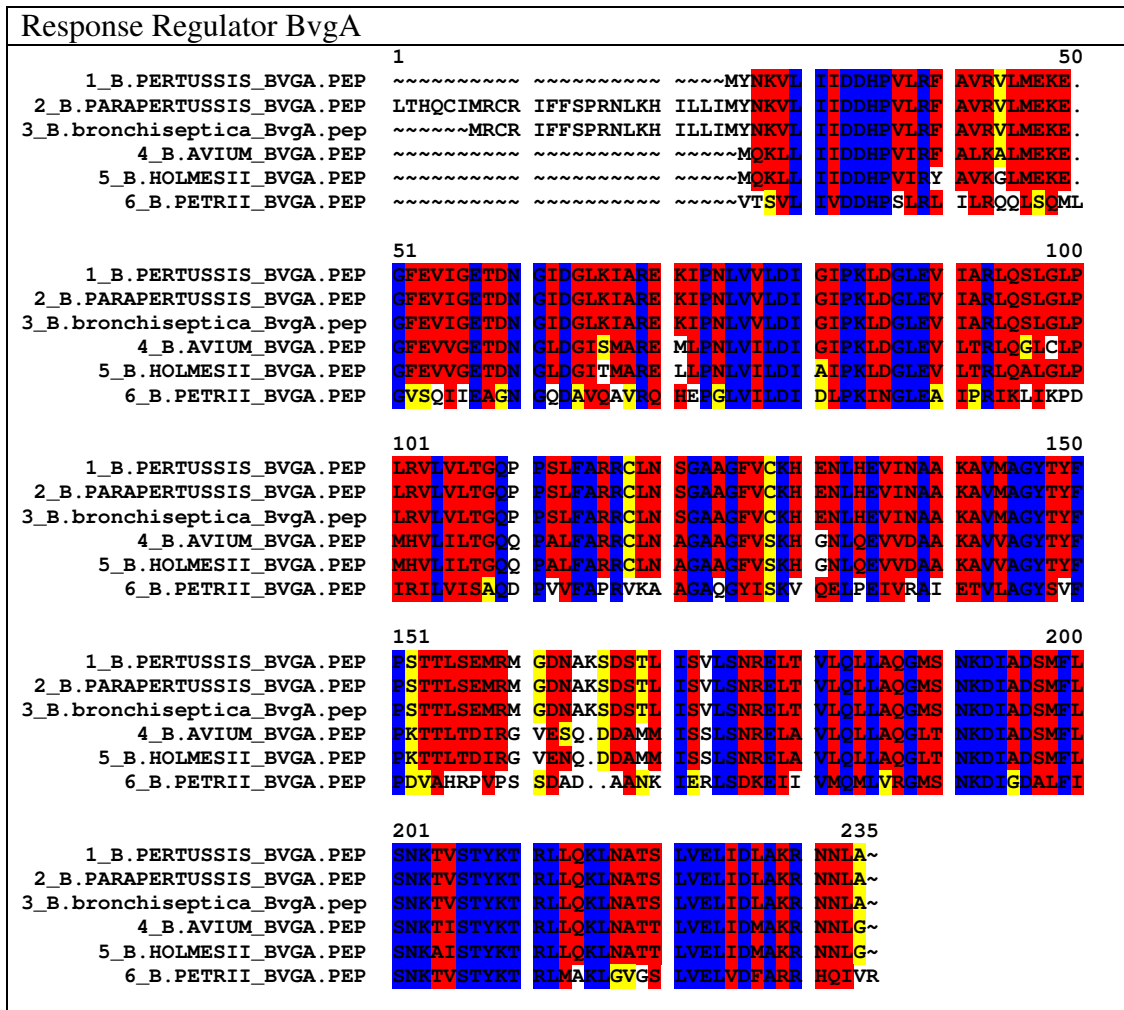
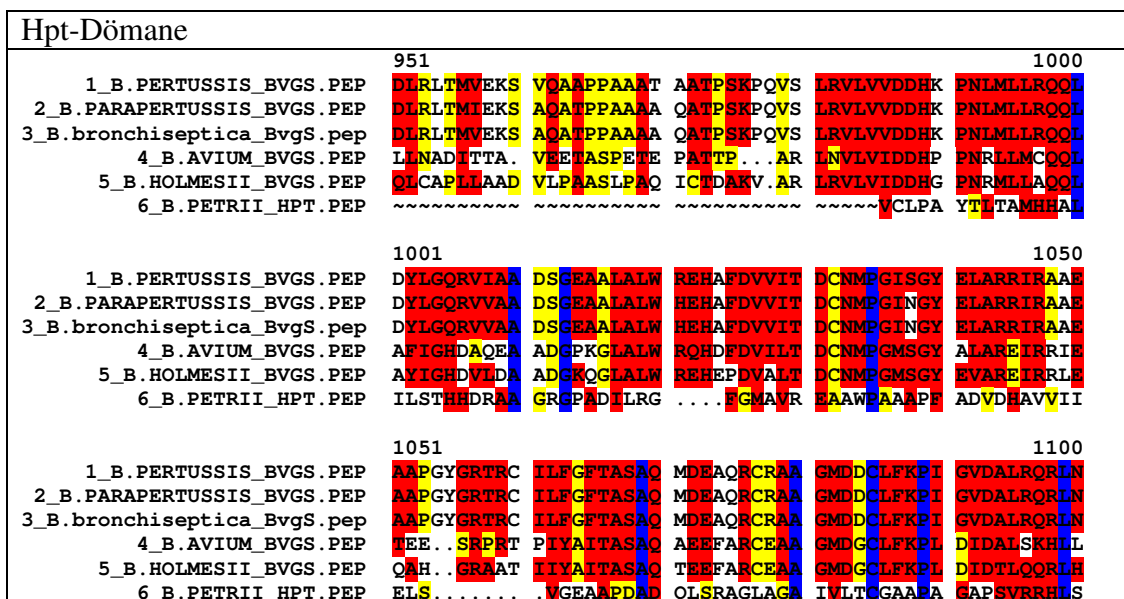


Abbildung 5-7 CLUSTAL-Alignment mit dem Response Regulator BvgA von *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium* und *B. holmesii*. Die Sequenzinformationen entstammen der GenDB Datenbank (<https://www.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/gendb>), die GenBank Accession No. für die BvgS-Sequenz von *B. holmesii* lautet AJ748854). Farbcode: blau: alle Aminosäuren einer Spalte sind identisch, rot: mehr als die Hälfte der Aminosäuren einer Spalte sind identisch oder gehören zu einer starken Ähnlichkeitsgruppe, gelb: mehr als die Hälfte der Aminosäuren einer Spalte gehören zu einer schwachen Ähnlichkeitsgruppe. Für die Erstellung des Alignments wurde die HUSAR W2H Software Version 4.1 (<http://genius.embnnet.dkfz-heidelberg.de/>) verwendet.



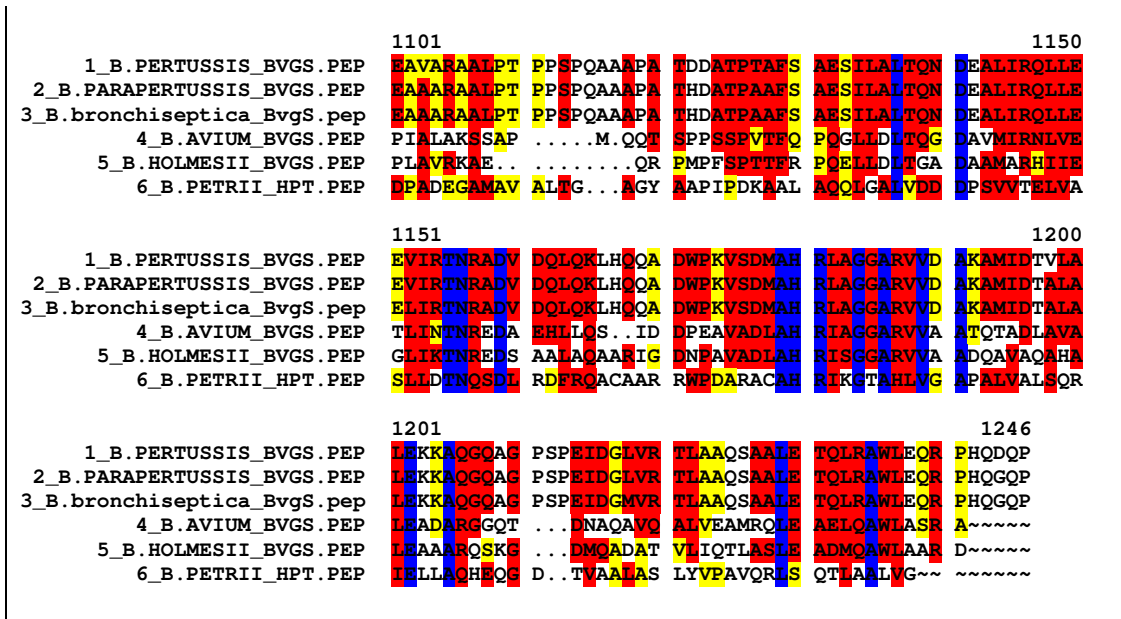
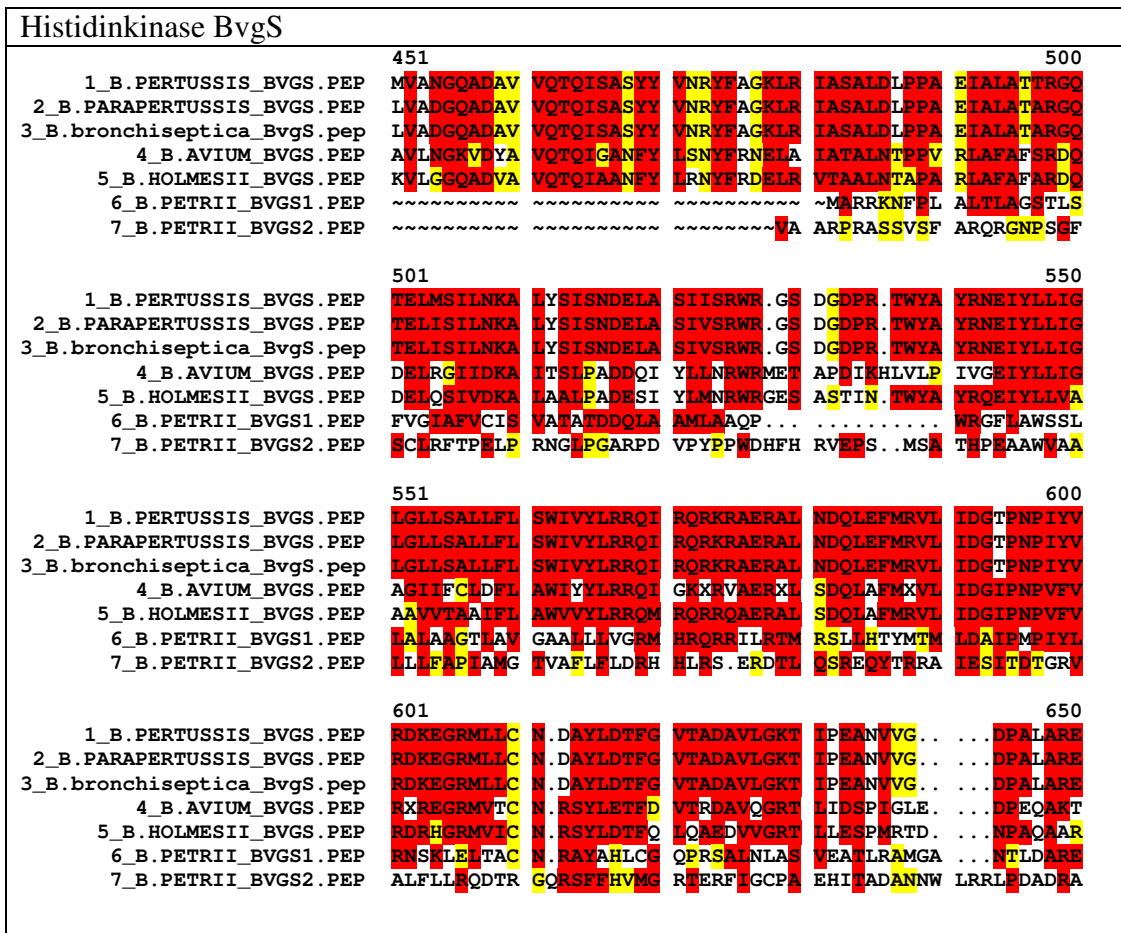


Abbildung 5-8 CLUSTAL-Alignment der *B. petrii* Hpt-Domäne mit den Aminosäuresequenzen der Histidinkinases von *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium* und *B. holmesii*. Die Sequenzen für *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium* und *B. holmesii* sind gekürzt, d.h. nur der C-terminale Bereich ist dargestellt. Die GenBank Accession No. für die BvgS-Sequenz von *B. holmesii* lautet AJ748854, die anderen Sequenzinformationen entstammen der GenDB Datenbank (<https://www.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/gendb>). Farbcode: blau: alle Aminosäuren einer Spalte sind identisch, rot: mehr als die Hälfte der Aminosäuren einer Spalte sind identisch oder gehören zu einer starken Ähnlichkeitsgruppe, gelb: mehr als die Hälfte der Aminosäuren einer Spalte gehören zu einer schwachen Ähnlichkeitsgruppe. Für die Erstellung des Alignments wurde die HUSAR W2H Software Version 4.1 (<http://genius.embnnet.dkfz-heidelberg.de/>) verwendet.



	651			700
1_B.PERTUSSIS_BVGS.PEP	MHEFLLRVA	AEREER.FED	RDVTLHGRTR	HVYQWTIPYG
2_B.PARAPERTUSSIS_BVGS.PEP	MHEFLLRMA	AEREER.FED	RDVTLHGRTR	HVYQWTVPYG
3_B.bronchiseptica_BvgS.pep	MHEFLLRMS	AEREER.FED	RDVTLHGRTR	HVYQWTVPYG
4_B.AVIUM_BVGS.PEP	VTSNIWTPAA	QQRRR..FQD	IEVTLHGEKR	YIYHWLXXYS
5_B.HOLMESII_BVGS.PEP	VHEQYLQAME	QEAGGPVFO	LELTLRGEKH	YLYHWLLPYA
6_B.PETRII_BVGS1.PEP	LEQYRLTMN	SATPA..IED	RTVRLRSGTA	TLOHWTSELR
7_B.PETRII_BVGS2.PEP	TLEQSIARSL	AESRE..IRVE	LQVRRSEGSA	WVRLGTGVDP
	701			750
1_B.PERTUSSIS_BVGS.PEP	GGWIDITERA	ELLRELHDAK	ESADAANRAK	TTFLATMSHE
2_B.PARAPERTUSSIS_BVGS.PEP	GGWIDITERA	ELLRELHDAK	ESADAANRAK	TTFLATMSHE
3_B.bronchiseptica_BvgS.pep	GGWIDITERA	ELLRELHDAK	ESADAANRAK	TTFLATMSHE
4_B.AVIUM_BVGS.PEP	GGWTDLTERI	RLIXDLHEAK	EEADAANRAK	STFLATMSHE
5_B.HOLMESII_BVGS.PEP	GGWTDLTERM	RLLDLDQEAK	EEADAANRAK	TTFLATMSHE
6_B.PETRII_BVGS1.PEP	GGWFVTERH	RALAELAGAR	DRAEAAYRAK	STFLASISHD
7_B.PETRII_BVGS2.PEP	GYWATTEPH	EQANILAQAK	HDAEASAEAK	ARFLAAMSHE
	751			800
1_B.PERTUSSIS_BVGS.PEP	MLELALLRPT	DQEPDRQSIQ	VAYDSARSLL	ELIGDILDIA
2_B.PARAPERTUSSIS_BVGS.PEP	MLELALLRPA	DQEPDRQSIQ	VAYDSARSLL	ELIGDILDIA
3_B.bronchiseptica_BvgS.pep	MLELALLRPA	DQEPDRQSIQ	VAYDSARSLL	ELIGDILDIA
4_B.AVIUM_BVGS.PEP	MLELELRPPA	DQATDRSALQ	ITYDSARSLL	DLIGDILDIS
5_B.HOLMESII_BVGS.PEP	MLELVLRREP	EQAVDRQALM	VAYDSARSLL	DLIGDILDIS
6_B.PETRII_BVGS1.PEP	MLELTLLQDS	LAAAARQOLE	MALQSARSLL	ALIDDLLDLS
7_B.PETRII_BVGS2.PEP	ALDLMR.ETG	LQTCGRHYO	LADDAARLLM	EIIGDILDFS
	801			850
1_B.PERTUSSIS_BVGS.PEP	PVRTALRVLP	EGAIRVFDGL	ARQKIEIVL	KTIIVGVDDV
2_B.PARAPERTUSSIS_BVGS.PEP	PVRTALRALP	EGAIRLFDGL	ARQKIEIVL	KTIIVGVDDV
3_B.bronchiseptica_BvgS.pep	PVRTALRALP	EGAIRVFDGL	ARQKIEIVL	KTIIVGVDDV
4_B.AVIUM_BVGS.PEP	PHPDLRKLK	DGINVFOQL	ARQHGLSITL	QIDPPHPXXV
5_B.HOLMESII_BVGS.PEP	PVPDLRRRL	ESVNVFQGM	ARQNGLSIRL	DIGADQPAHV
6_B.PETRII_BVGS1.PEP	PSIVSLRDIA	AEVSGVFSPM	AHSGVALDV	DIMPMVADHV
7_B.PETRII_BVGS2.PEP	AVPFDLRDVL	GOVLRVFELE	ARRKGIATL	DVAPGVAHTL
	851			900
1_B.PERTUSSIS_BVGS.PEP	LSNLVGNAIK	FTTEGQVVLA	VTARPDGE..
2_B.PARAPERTUSSIS_BVGS.PEP	LSNLVGNAIK	FTTEGQVVLT	VTARPDGE..
3_B.bronchiseptica_BvgS.pep	LSNLVGNAIK	FTTEGQVVLT	VTARPDGE..
4_B.AVIUM_BVGS.PEP	ISXLVSNALK	FTEVGGVIVS	LKVRTXEDX.
5_B.HOLMESII_BVGS.PEP	VSNLVSNALK	FTEKGGVTVS	MQVRPVEQG.
6_B.PETRII_BVGS1.PEP	LNNLLSNAIR	FTEQGSIQIQ	IRATSIRDA.
7_B.PETRII_BVGS2.PEP	VLNLVGNVAK	FTEQGGIHVS	ACLEAAPRTG	AQDDGQHEGO
	901			950
1_B.PERTUSSIS_BVGS.PEPA	AHVQFSVSDT	GCEISEADOR	QLFKPFSQVG
2_B.PARAPERTUSSIS_BVGS.PEPA	AHVQFSVSDT	GCEISEADOR	QLFKPFSQVG
3_B.bronchiseptica_BvgS.pepA	AHVQFSVSDT	GCEISEADOR	QLFKPFSQVG
4_B.AVIUM_BVGS.PEPR	AKIELAVDPS	GPETSSADRO	RLFEPPEXXVH
5_B.HOLMESII_BVGS.PEPL	ARIEIAVDDS	GPETSAADRR	RLFEPPTQVH
6_B.PETRII_BVGS1.PEPH	QWQFAVSDT	GIGTEPAVLP	TLEDPPVQAG
7_B.PETRII_BVGS2.PEP	DARASALPEV	QHIALTVADE	GVETPESVHS	QLFQAFQAD
	951			1000
1_B.PERTUSSIS_BVGS.PEP	PGTGLGLSIS	RRLVELMGGT	LVMR.SAPGV	GTTVSVDLRL
2_B.PARAPERTUSSIS_BVGS.PEP	PGTGLGLSIS	RRLVELMGGT	LVMR.SAPGV	GTTVSVDLRL
3_B.bronchiseptica_BvgS.pep	PGTGLGLSIS	RRLVELMGGT	LVMR.SAPGV	GTTVSVDLRL
4_B.AVIUM_BVGS.PEP	ACTGLGLVTS	RRLIEAMGGH	FDLS.SIPGK	GTRIDVLLNA
5_B.HOLMESII_BVGS.PEP	ACTGLGLAIS	RRIVQAMGGS	FDLS.SIPGK	GTRIDVQLCA
6_B.PETRII_BVGS1.PEP	G.ACLGLSIC	KRLVDIMGGY	IRIS.SKRNO	GTRVVVRLRF
7_B.PETRII_BVGS2.PEP	GGSGLGLAIC	HRLAGLLGGS	IRLLHSAPGO	GSAFOVSLPL
	1001			1050
1_B.PERTUSSIS_BVGS.PEP
2_B.PARAPERTUSSIS_BVGS.PEP
3_B.bronchiseptica_BvgS.pep
4_B.AVIUM_BVGS.PEP
5_B.HOLMESII_BVGS.PEP
6_B.PETRII_BVGS1.PEP
7_B.PETRII_BVGS2.PEP	AITGTIDASA	SASASADASV	NSDIDSGPDA	GADQAAARLAA
	1051			1100
1_B.PERTUSSIS_BVGS.PEP	VLVVDHDKPN	LMLLRQQLDY	LGQRVIAADS	GEAALALWRE
2_B.PARAPERTUSSIS_BVGS.PEP	VLVVDHDKPN	LMLLRQQLDY	LGQRVVAADS	GEAALALWHE
3_B.bronchiseptica_BvgS.pep	VLVVDHDKPN	LMLLRQQLDY	LGQRVVAADS	GEAALALWHE
4_B.AVIUM_BVGS.PEP	VLVIDDHPPN	RLLMCQQLAF	IGHDAQEAD	GPKGLALWRQ
5_B.HOLMESII_BVGS.PEP	VLVIDDHGPN	RMLLAQQLAY	IGHVDLDAAD	GKQGLALWRE
6_B.PETRII_BVGS1.PEP	ILVVDHHAAN	RTLKHLQQLK	LGHAVVCAEN	GLQALEAVGR
7_B.PETRII_BVGS2.PEP	VLAVDDHEPY	RIILRQLMLR	ABLNCDTVAD	AEQALEALRQ

	1101		1150
1_B.PERTUSSIS_BVGS.PEP	NMPGTSGYEL	ARRIRAAEAA	PGYGRTRCII
2_B.PARAPERTUSSIS_BVGS.PEP	NMPGINGYEL	ARRIRAAEAA	PGYGRTRCII
3_B.bronchiseptica_BvgS.pep	NMPGINGYEL	ARRIRAAEAA	PGYGRTRCII
4_B.AVIUM_BVGS.PEP	NMPGMSGYAL	AREIRRIETE	E..SRPPTPI
5_B.HOLMESII_BVGS.PEP	NMPGMSGYEV	AREIRRLQEA	H..GRAATII
6_B.PETRII_BVGS1.PEP	AMPRMNGMEF	VVALRAGPEE	N...ARMPV
7_B.PETRII_BVGS2.PEP	QMPGIDGCEL	ARRVRQQAQ	AQ..RPRLPI
	1151		1200
1_B.PERTUSSIS_BVGS.PEP	DDCLEFKPIGV	DALRQRLNEA	VARAALPTPP
2_B.PARAPERTUSSIS_BVGS.PEP	DDCLEFKPIGV	DALRQRLNEA	VARAALPTPP
3_B.bronchiseptica_BvgS.pep	DDCLEFKPIGV	DALRQRLNEA	VARAALPTPP
4_B.AVIUM_BVGS.PEP	DGCLFKPLDI	DALSKHLLPI	ALAKSSAP...
5_B.HOLMESII_BVGS.PEP	DGCLFKPLDI	DTLQORLHPL	AVRKAEL...
6_B.PETRII_BVGS1.PEP	DAVLEFKPAGL	AELQAALRAH	LPQPVLS...
7_B.PETRII_BVGS2.PEP	DDYLAKPVAE	IDLQKCIKAW	IN.....
	1201		1250
1_B.PERTUSSIS_BVGS.PEP	SILALTONDE	ALIRQLLEEV	IRTNRADVDQ
2_B.PARAPERTUSSIS_BVGS.PEP	SILALTONDE	ALIRQLLEEV	IRTNRADVDQ
3_B.bronchiseptica_BvgS.pep	SILALTONDE	ALIRQLLEEV	IRTNRADVDQ
4_B.AVIUM_BVGS.PEP	GLLDLTQGDA	VMIRNLVETL	INTNREDAEH
5_B.HOLMESII_BVGS.PEP	ELLDLTGADA	AMARHIIEGL	IKTNREDSAA
6_B.PETRII_BVGS1.PEP
7_B.PETRII_BVGS2.PEP
	1251		1300
1_B.PERTUSSIS_BVGS.PEP	AGGARVVDAK	AMIDTVLAL	KKAQGQAGPS
2_B.PARAPERTUSSIS_BVGS.PEP	AGGARVVDAK	AMIDTALAL	KKAQGQAGPS
3_B.bronchiseptica_BvgS.pep	AGGARVVDAK	AMIDTALAL	KKAQGQAGPS
4_B.AVIUM_BVGS.PEP	AGGARVVAAT	QTALAVALE	ADARGGQT...
5_B.HOLMESII_BVGS.PEP	SGGARVVAAD	QAVQAHALE	AAARQSKG...
6_B.PETRII_BVGS1.PEP
7_B.PETRII_BVGS2.PEP
	1301	1314	
1_B.PERTUSSIS_BVGS.PEP	LRAWLEQRPH	QDQP	
2_B.PARAPERTUSSIS_BVGS.PEP	LRAWLEQRPH	QGQP	
3_B.bronchiseptica_BvgS.pep	LRAWLEQRPH	QGQP	
4_B.AVIUM_BVGS.PEP	LQAWLASRA	~~~~	
5_B.HOLMESII_BVGS.PEP	MQAWLAARD	~~~~	
6_B.PETRII_BVGS1.PEP	~~~~	
7_B.PETRII_BVGS2.PEP	~~~~	

Abbildung 5-9 CLUSTAL-Alignment der *B. petrii* Histidinkinasen BvgS1 und BvgS2 mit den Aminosäuresequenzen der Histidinkinasen von *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium* und *B. holmesii*. Die BvgS-Sequenzen dieser Bakterienstämme sind für die Abbildung gekürzt, d.h. der N-terminale Bereich, der keine Homologien mit BvgS1 und BvgS2 aufweist, fehlt. Die GenBank Accession No. für die BvgS-Sequenz von *B. holmesii* lautet AJ748854, die anderen Sequenzinformationen entstammen der GenDB Datenbank (<https://www.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/gendb>). Farbcode: blau: alle Aminosäuren einer Spalte sind identisch, rot: mehr als die Hälfte der Aminosäuren einer Spalte sind identisch oder gehören zu einer starken Ähnlichkeitsgruppe, gelb: mehr als die Hälfte der Aminosäuren einer Spalte gehören zu einer schwachen Ähnlichkeitsgruppe. Für die Erstellung des Alignments wurde die HUSAR W2H Software Version 4.1 (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/>) verwendet.

5.3.2 Herstellung von BvgA- und BvgAS-Deletionsmutanten in *B. petrii* DSM 12804

Das BvgS/BvgA-System von *B. pertussis* stellt den Hauptregulator für fast alle seine Virulenzeigenschaften dar (Beier & Gross, 2006), reguliert aber auch viele grundlegende physiologische Funktionen (Cummings *et al.*, 2006; Hot *et al.*, 2003). Um die regulatorischen Eigenschaften des orthologen ZKS im Umweltkeim *B. petrii* zu untersuchen, wurden Deletionsmutanten hergestellt, welche für vergleichende Analysen, wie die 2D-Gelelektrophorese, herangezogen werden sollten. Hierfür wurden die zu deletierenden Gene

mittels homologer Rekombination durch eine Tetracyclin-Resistenzkassette ersetzt. Das Prinzip der homologen Rekombination ist im Abschnitt 4.1.5 näher erläutert.

5.3.2.1 Klonierung in den Vektor *pBluescript II KS (pKS)*

In Abbildung 5-10 a) ist eine Übersicht über die Klonierungsstrategie in den pKS-Vektor dargestellt.

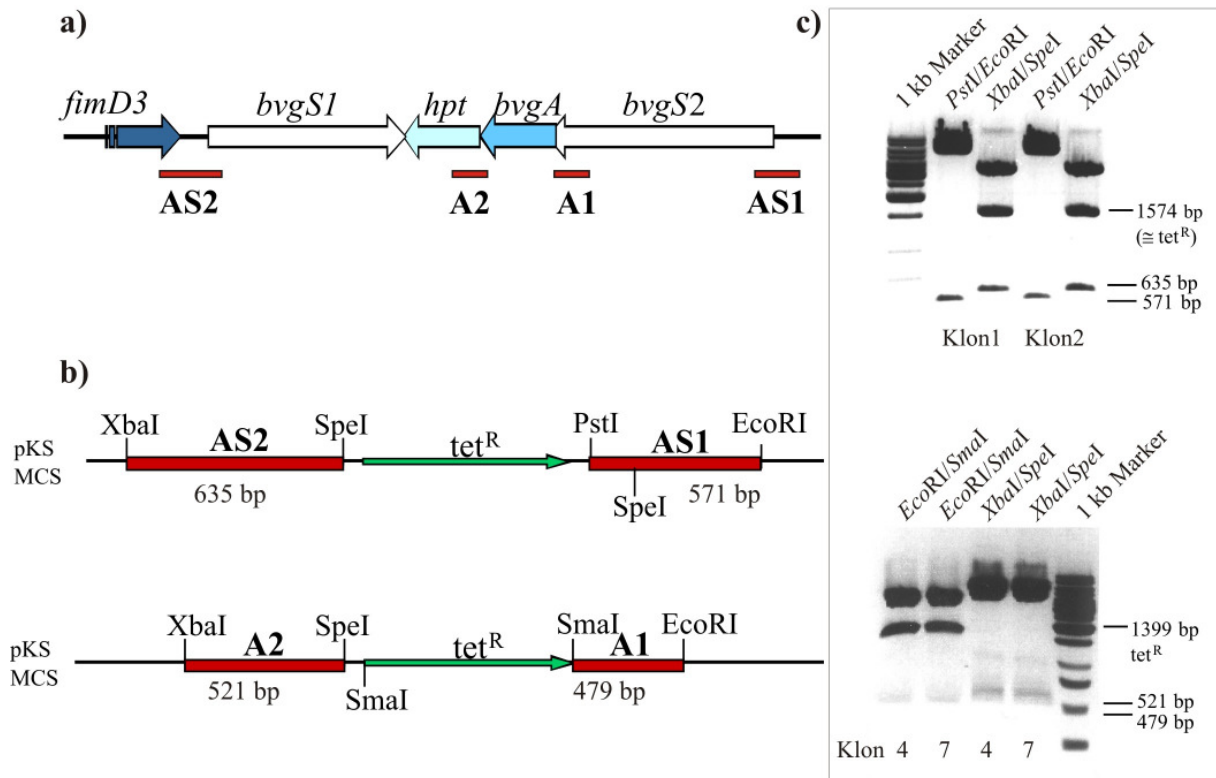


Abbildung 5-10 a) Schematische Übersicht über den *bvgAS*-Lokus von *B. petrii*. Rot markiert sind die für die nachfolgende Klonierung amplifizierten flankierenden Bereiche b) Klonierungsschema für die flankierenden Bereiche AS1/AS2 der $\Delta bvgAS$ -Mutante, A1/A2 der $\Delta bvgA$ -Mutante und der Tetracyclin-Resistenzkassetten in den pKS-Vektor. Über die flankierenden Bereiche soll später die homologe Rekombination im *B. petrii* Genom stattfinden. MCS: multiple cloning site. c) Restriktionskontrolle der pKS-Vektorkonstrukte. Aufgetragen sind jeweils 15 μ l Restriktionsverdau auf ein 1 % Agarosegel. Marker: Gene Ruler™ 1 kb DNA Leiter (siehe Abschnitt 3.8). In pKS::AS1 tet AS2 (oben) werden sowohl AS1 und AS2 mit den entsprechenden Restriktionsenzymen wieder ausgeschnitten, als auch die Tet^R -Kassette durch die zusätzliche *SpeI* Schnittstelle. In pKS::A1 tet A2 (unten) werden auch die flankierenden Bereiche A1 und A2 wieder richtig ausgeschnitten und über den *SmaI*-Verdau zusätzlich die Tet^R -Kassette.

Für die Deletion eines 5042 bp großen Bereichs des 5197 bp großen *BvgA/BvgS*-Lokus, bestehend aus *bvgS1*, *hpt*, *bvgA* und *bvgS2*, wurde zunächst die Tetracyclin-Resistenzkassette aus pBR322 amplifiziert. Hierfür wurde die Oligonukleotid-Kombination tet-Start/tet-End verwendet. Dies ergab ein 1385 bp großes Fragment, welches nach einer Filling-in Reaktion (Abschnitt 4.1.3.2) in den *SmaI* geschnittenen pKS-Vektor kloniert wurde. Mit der Oligonukleotid-Kombination AS1-*EcoRI*/*BvgAS*-*PstI*-S2 wurde ein 571 bp großes Fragment aus chromosomaler DNA von *B. petrii* amplifiziert, welches den flankierenden Bereich von *bvgS2* darstellt (AS1). Der flankierende Bereich von *bvgS1* (AS2) wurde mit den Oligonukleotiden AS2-*XbaI*(*AatII*)/AS2-*SpeI* amplifiziert, was ein 635 bp großes PCR-

Produkt ergab. Die PCR-Fragmente wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und in zwei Schritten in den Vektor pKS::tet kloniert, was den Vektor pKS::AS1 tet AS2 ergab (siehe Abbildung 5-11 a))

Für die Deletion von 506 bp des 627 bp großen Response Regulator Gens *bvgA*, wurden zunächst die flankierenden Bereiche A1 und A2 amplifiziert, wofür die Oligonukleotid-Kombinationen BvgA1-*SmaI***/BvgA1*EcoRI** bzw. BvgA2-*XbaI*(*AatII*)/BvgA2-*SpeI** verwendet wurden. Die entsprechenden Größen der PCR-Produkte sind 497 bp für A1 und 521 bp für A2. Nach dem Verdau der PCR-Produkte mit den entsprechenden Restriktionsenzymen wurden sie in zwei Schritten in den pKS-Vektor kloniert, was den Vektor pKS::A1A2 ergab. Für die Herstellung der Tetracyclin-Resistenzkassette wurden die Oligonukleotide tet-Start-*SmaI*/tet-End-*SmaI* verwendet und das 1405 bp große PCR-Fragment nach einem *SmaI*-Verdau in den *SmaI* geschnittenen Vektor pKS::A1A2 kloniert. Nach einer Screening-PCR mit Vektor und Tet^R spezifischen Oligonukleotiden wurde ein Vektorkonstrukt ausgewählt, in welchem die Tet^R-Kassette in entgegengesetzter Orientierung zum deletierten Gen eingebaut war (Oligonukleotid-Kombination tet-End/T7). Dies resultierte in dem Vektor pKS::A1 tet A2 (siehe Abbildung 5-11 b)).

Als Kontrollen sind in Abbildung 5-10 c) die Ergebnisse von verschiedenen Restriktionsverdauen für pKS::AS1 tet AS2 bzw. pKS::A1 tet A2 aufgeführt, welche zeigen, dass jeweils alle Komponenten im entsprechenden Vektorkonstrukt vorhanden sind. Um die korrekte Amplifikation der PCR-Produkte sowie korrekte Übergänge zwischen Vektor und Insert zu bestätigen, wurde eine Sequenzierung angeschlossen. In Tabelle 5-3 sind die Oligonukleotide aufgeführt, welche für die Sequenzierreaktionen verwendet wurden. Mit den korrekten Konstrukten pKS::AS1 tet AS2 Klon1 bzw. mit pKS::A1 tet A2 Klon 4 wurde die Transformation in *B. petrii* DSM 12804 durchgeführt.

AS2 + Übergänge	T7 635-Kontroll-fw BvgAS-Kontr(rev) tet-Start tet2-rev	AS1 + Übergänge	T3 571-Kontroll-rev BvgAS-Kontr(fw) tet-End tet1-fw
A2 + Übergänge	T7 BvgA2- <i>SpeI</i> * tet-Start tet2-rev	A1 + Übergänge	T3 BvgA1- <i>SmaI</i> ** tet-End tet1-fw

Tabelle 5-3 Für die Sequenzierung der Vektorkonstrukte pKS::AS1 tet AS2 und pKS::A1 tet A2 eingesetzte Oligonukleotide.

5.3.2.2 Transformation in elektrokompetente *B. petrii* DSM 12804 Zellen und Kontrolle der erhaltenen Mutanten

Ein spezieller Klonierungsvektor für die Mutagenese via homologe Rekombination in *B. pertussis* ist das Plasmid pSS1129, welches über konjugalen Transfer übertragen wird (Stibitz & Yang, 1991). Es handelt sich dabei um ein pRTP1-Derivat, welches in *B. pertussis* nicht repliziert. Aufgrund eines Fehlers in der „multiple cloning site“ (die *XbaI*-Schnittstelle war nicht mehr vorhanden) konnte dieses Plasmid jedoch nicht verwendet werden. Da ColE1

basierende Plasmide nicht in *B. pertussis* replizieren sollten (Stibitz *et al.*, 1986; Zealey *et al.*, 1990), wurde versucht die pKS-Vektorkonstrukte mittels Elektroporation direkt in *B. petrii* zu transformieren. Hierfür wurden zunächst elektrokompente *B. petrii* Zellen, wie im Abschnitt 4.1.4.2 beschrieben, hergestellt. Für die Elektroporation wurden 45 µl kompetenter Zellen mit 1 µl Ligationsansatz in einer Elektroporationsküvette gemischt und wie im Abschnitt 4.1.4.4 erläutert transformiert.

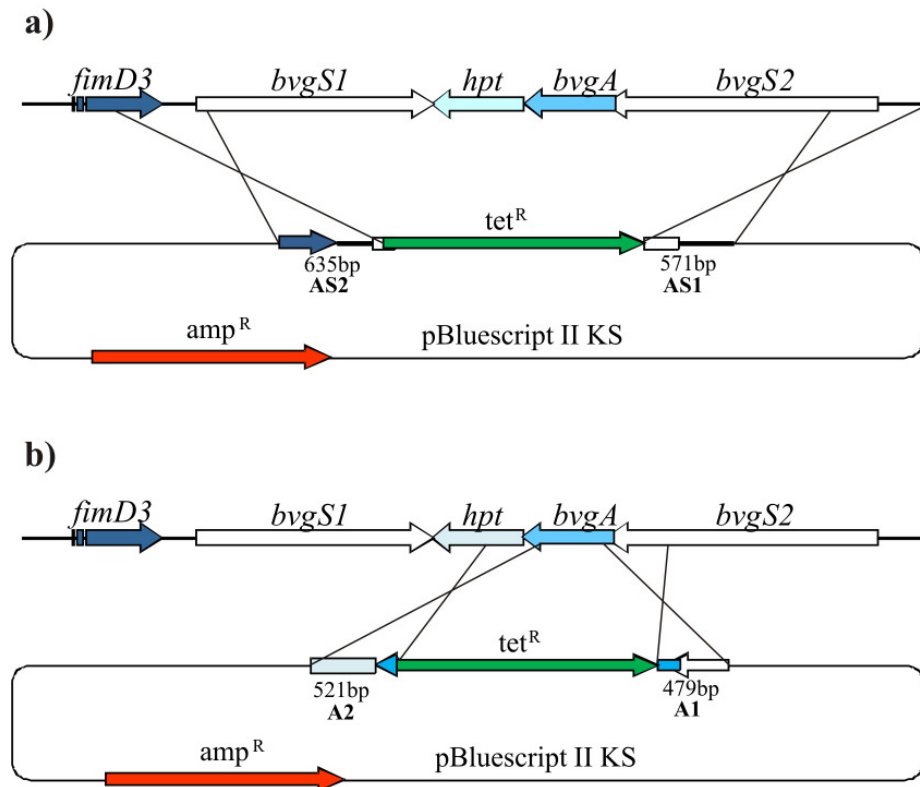


Abbildung 5-11 Prinzip des Allelaustausches. a) Über Doppelcrossover an AS1 und AS2 des Vektors pKS::AS1 tet AS2 wird der komplette BvgA/BvgS-Lokus im *B. petrii*-Chromosom deletiert und durch die Tet^R-Kassette ersetzt. b) Deletion des Response Regulator-Gens *bvgA*, vermittelt durch die flankierenden Bereiche A1 und A2 des Vektors pKS::A1 tet A2.

Mit einem PCR-Screening sollten Transformanten detektiert werden, bei denen durch Doppelcrossover der entsprechende Genbereich deletiert und durch die Tet^R-Kassette ersetzt worden war (siehe Abbildung 5-11). Um „single crossover“-Ereignisse auszuschließen, die ebenfalls tetracyclinresistente Transformanten erzeugen, wurden pro Klon zwei PCR Ansätze durchgeführt. Hierfür wurden jeweils ein Tet^R-spezifischer und ein chromosomaler Primer außerhalb des jeweiligen flankierenden Bereichs verwendet und damit beide Seiten der Tet^R-Integration untersucht. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 5-4 aufgeführt. Bei einem „single crossover“-Ereignis ist nur bei einer der beiden Oligonukleotid-Kombinationen ein Signal zu erwarten, da hier zusätzlich noch ein Vektoranteil im Chromosom vorliegt (siehe Abbildung 4-2). Nur wenn ein Doppelcrossover stattgefunden hat, erhält man für beide PCR-Reaktionen Signale. Positive Klone waren *B. petrii* Δ*bvgAS* (7) und (12), sowie *B. petrii* Δ*bvgA* (4).

<i>B. petrii</i> $\Delta bvgAS$	AS2 Kontroll fw/ tet2-rev	1060 bp
	AS1 Kontroll rev/tet1-fw	955 bp
<i>B. petrii</i> $\Delta bvgA$	A2 kontroll fw/ tet2-rev	953 bp
	A1 kontroll fw/ tet1-fw	896 bp

Tabelle 5-4 Oligonukleotid-Kombinationen für den Transformanten-Screen auf Doppelcrossoverereignisse.

Als weitere Kontrolle wurden Southern Blot Analysen durchgeführt. Die Sonden ΔA -Screen und ΔAS -Screen wurden so gewählt, dass durch die Deletion und den Einbau der Tet^R-Kassette ein deutlicher Shift zwischen Wildtyp und Mutante erkennbar wird. Die Lage dieser beiden Sonden auf dem *B. petrii* Chromosom ist in Abbildung 5-12 a) schematisch wiedergegeben. Abbildung 5-12 b) zeigt den dazugehörigen Southern Blot.

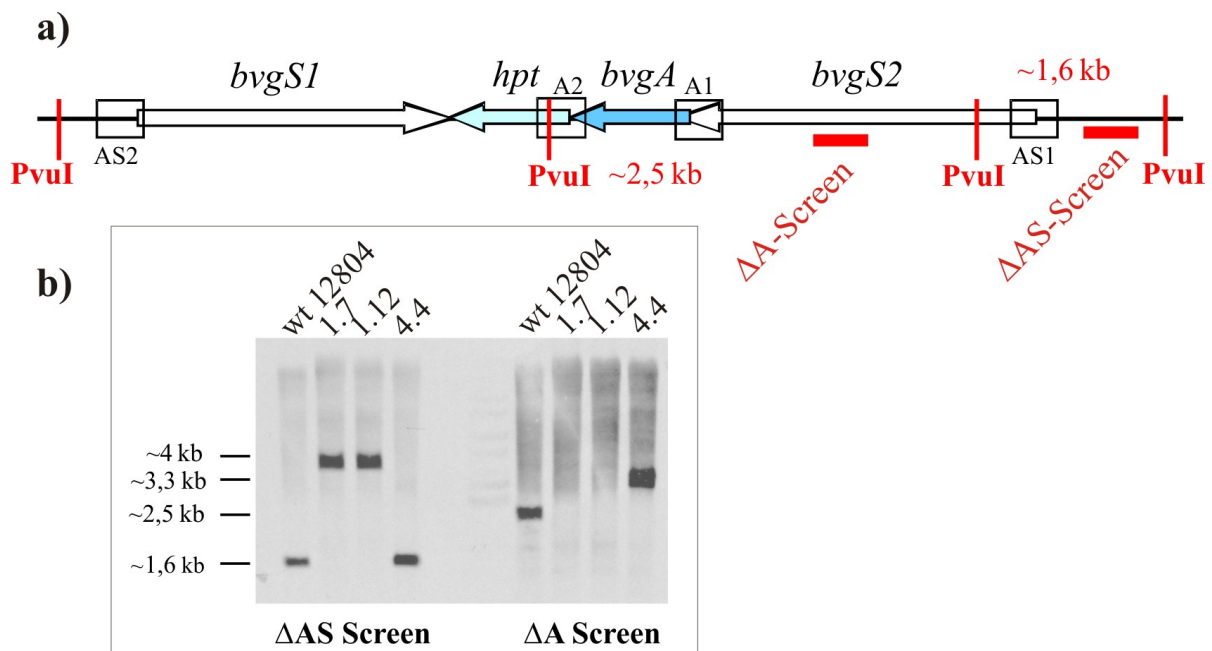


Abbildung 5-12 a) Schema des BvgA/BvgS Lokus von *B. petrii*. Boxen markieren die flankierenden Bereiche, welche für die Herstellung der Deletionsmutanten verwendet wurden. Die *PvuI* Schnittstellen, welche für die Southern Blot-Analyse relevant waren, sind rot eingezeichnet. Rote Balken markieren die Lage der Sonden ΔAS -Screen und ΔA -Screen. 1,6 kb bzw. 2,5 kb bezeichnen die Größe der entsprechenden *PvuI*-Fragmente im Wildtyp. **b)** Southern Blot mit den Sonden ΔAS -Screen und ΔA -Screen zur Kontrolle der Deletionsmutanten. Verwendet wurde jeweils chromosomale DNA des Wildtyps *B. petrii* DSM 12804, der $\Delta bvgAS$ -Mutante Klon 7 und 12 und der $\Delta bvgA$ -Mutante Klon 4.

Mit ΔAS -Screen ist ein Shift von 1,6 kb auf etwa 4 kb in den $\Delta bvgAS$ -Mutanten zu erkennen, da durch die Deletion die beiden mittleren *PvuI* Schnittstellen wegfallen. Mit ΔA -Screen shiftet die Bande von 2,5 kb auf 3,3 kb, da durch den Einbau der Tet^R-Kassette die Bande in der $\Delta bvgA$ -Mutante vergrößert wird. Zusätzlich wurden Southern Blots mit einer pKS-Sonde, einer *bvgA*-Sonde und einer *tet*-Sonde durchgeführt, wobei die pKS-Sonde weder im Wildtyp noch in den Mutanten ein Signal ergab, die *bvgA*-Sonde nur im Wildtyp eine Bande aufwies und die *tet*-Sonde nur in den Mutanten jeweils eine Bande ergab (nicht gezeigt). Eine abschließende Sequenzierung der Übergänge bestätigte die korrekte Integration der Tet^R-Kassette in das *B. petrii* Chromosom (Daten nicht gezeigt).

5.3.3 Wachstumsversuche mit den *B. petrii* DSM 12804 Deletionsmutanten bei verschiedenen Temperaturen

Die Wachstumsversuche wurden wie im Abschnitt 4.3.2 beschrieben durchgeführt. Bei 37°C und 42°C waren keine Unterschiede zwischen den beiden Mutanten zu erkennen und gegenüber dem Wildtyp wiesen sie nur ein sehr geringes Wachstumsdefizit auf. Bei 15°C zeigten beide Mutanten ein deutliches Wachstumsdefizit gegenüber dem Wildtyp, wobei die $\Delta bvgA$ -Mutante noch etwas langsamer wuchs als die $\Delta bvgAS$ -Mutante. Die Wachstumskurven sind in Abbildung 5-13 (nächste Seite) dargestellt.

5.3.4 Vergleichende Proteomanalyse mit *B. petrii* DSM 12804 und der $\Delta bvgA$ -Mutante

Da sich die $\Delta bvgA$ - und $\Delta bvgAS$ -Mutanten sowohl im Wachstumsversuch als auch in einer ersten 2D-Gelelektrophorese nur sehr geringfügig unterschieden, wurde die Response Regulator-Mutante *B. petrii* $\Delta bvgA$ für den Proteomvergleich mit dem Wildtyp eingesetzt. Es wurden Proteomanalysen mit 37°C-Kulturen und mit 15°C-Kulturen durchgeführt, da die Wachstumsversuche bei niedrigerer Temperatur auf ein Wachstumsdefizit der Mutante gegenüber dem Wildtyp hindeuteten. Für jeden Elektrophorese-Durchgang wurde Gesamtzellprotein aus drei unabhängig gezogenen Kulturen isoliert (4.2.1), und es wurden für jede Wachstumstemperatur zwei Durchgänge analysiert. Die Konzentration der Proteinproben wurde mittels Bradford-Assay bestimmt (Abschnitt 4.2.2). Es wurden 75 µg Gesamtzellprotein mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) in einem pH-Gradienten von pH4 bis pH7 aufgetrennt. Nachfolgend wurden die Proteine in einem 12 % Polyacrylamidgel entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt.

Nach Silberfärbung der Proteingele, wurden diese eingescannt und die Spotmuster mit Hilfe der Delta2D-Software (Version 3.5) von DECODON ausgewertet. Den jeweiligen Spotmustern wurden Falschfarben zugeordnet: der Wildtyp wurde grün, die $\Delta bvgA$ -Mutante rot markiert. Durch einen Overlay erscheinen regulierte Proteinspots entweder grün, d.h. im Wildtyp stärker exprimiert oder rot, was eine stärkere Expression in der $\Delta bvgA$ -Mutante wiedergibt. Spots, die gelb erscheinen, werden als nicht reguliert betrachtet. Nach „Matching“ und „Spot detection“ wurde manuell editiert und gefiltert. Es wurden nur solche Spots berücksichtigt, die um den Faktor zwei und mehr hoch oder herunter reguliert waren (Anhang 8.5). Von diesen signifikant regulierten Spots war etwa die Hälfte aufgrund der geringen Größe im Gel nicht eindeutig zu erkennen (Tabelle 5-5).

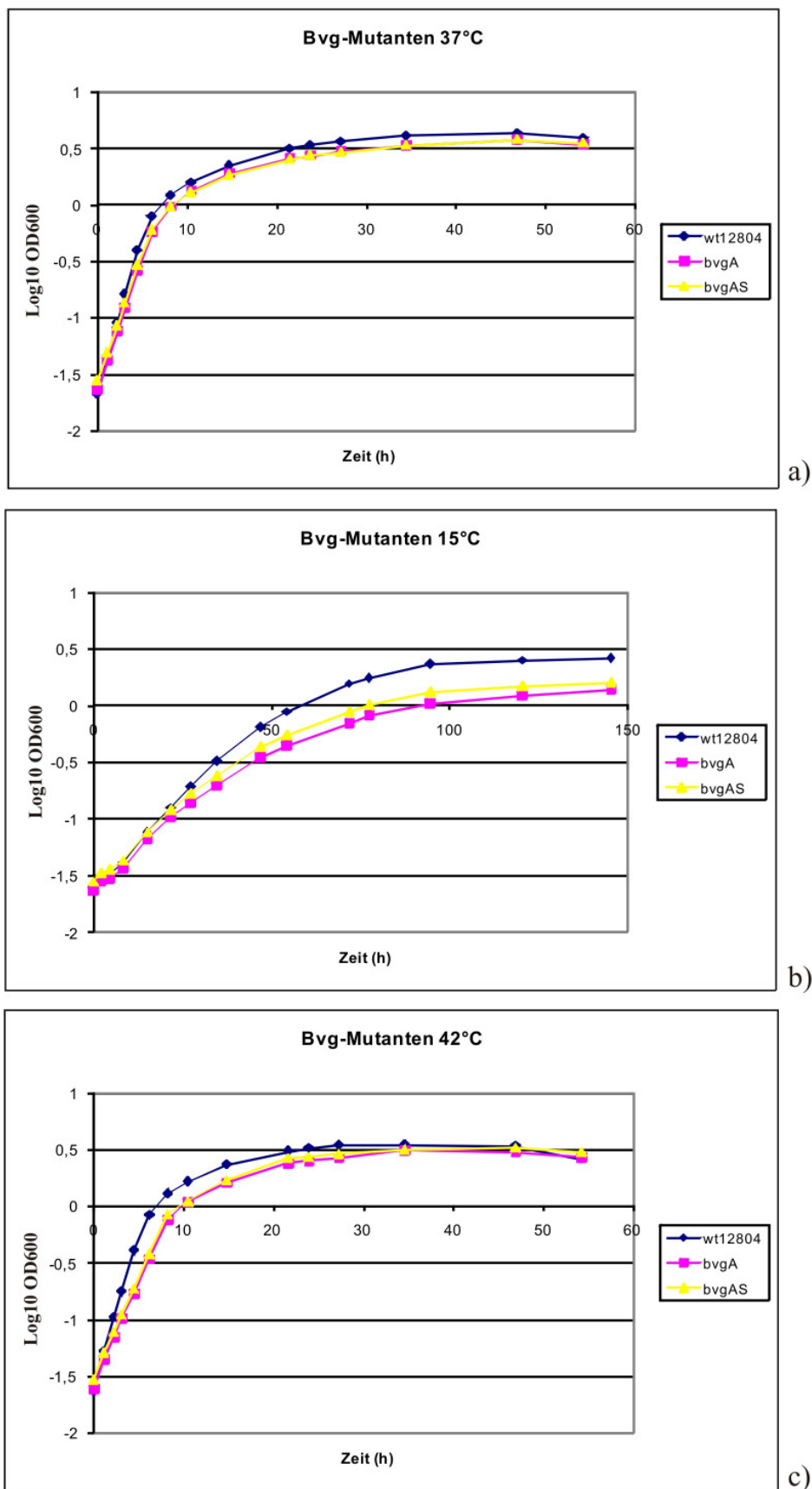


Abbildung 5-13 Wachstumskurven der *B. petrii* $\Delta bvgAS$ - und $\Delta bvgA$ -Mutanten in LB-Medium bei a) 37°C, b) 15°C und c) 42°C. Der Log_{10} der OD_{600} ist gegen die Zeit in Stunden aufgetragen. Blau: *B. petrii* DSM 12804; rosa: *B. petrii* $\Delta bvgA::\text{tet}^R$; gelb: *B. petrii* $\Delta bvgAS::\text{tet}^R$.

	Anzahl detektierter Spots	Signifikant reguliert [$\leq 0,5/\geq 2$]	Davon im Gel eindeutig erkennbar
37°C D1	1064	42 (3,9 %)	50 %
37°C D2	758	50 (6,5 %)	54 %
15°C D1	1053	38 (3,6 %)	42 %
15°C D2	1114	52 (4,7%)	42 %

Tabelle 5-5 Vergleich der Delta2D-Projekte. D1: Durchgang 1, D2: Durchgang 2. Die Werte in runden Klammern geben den Anteil der signifikant regulierten Spots an der Gesamtpotmenge an.

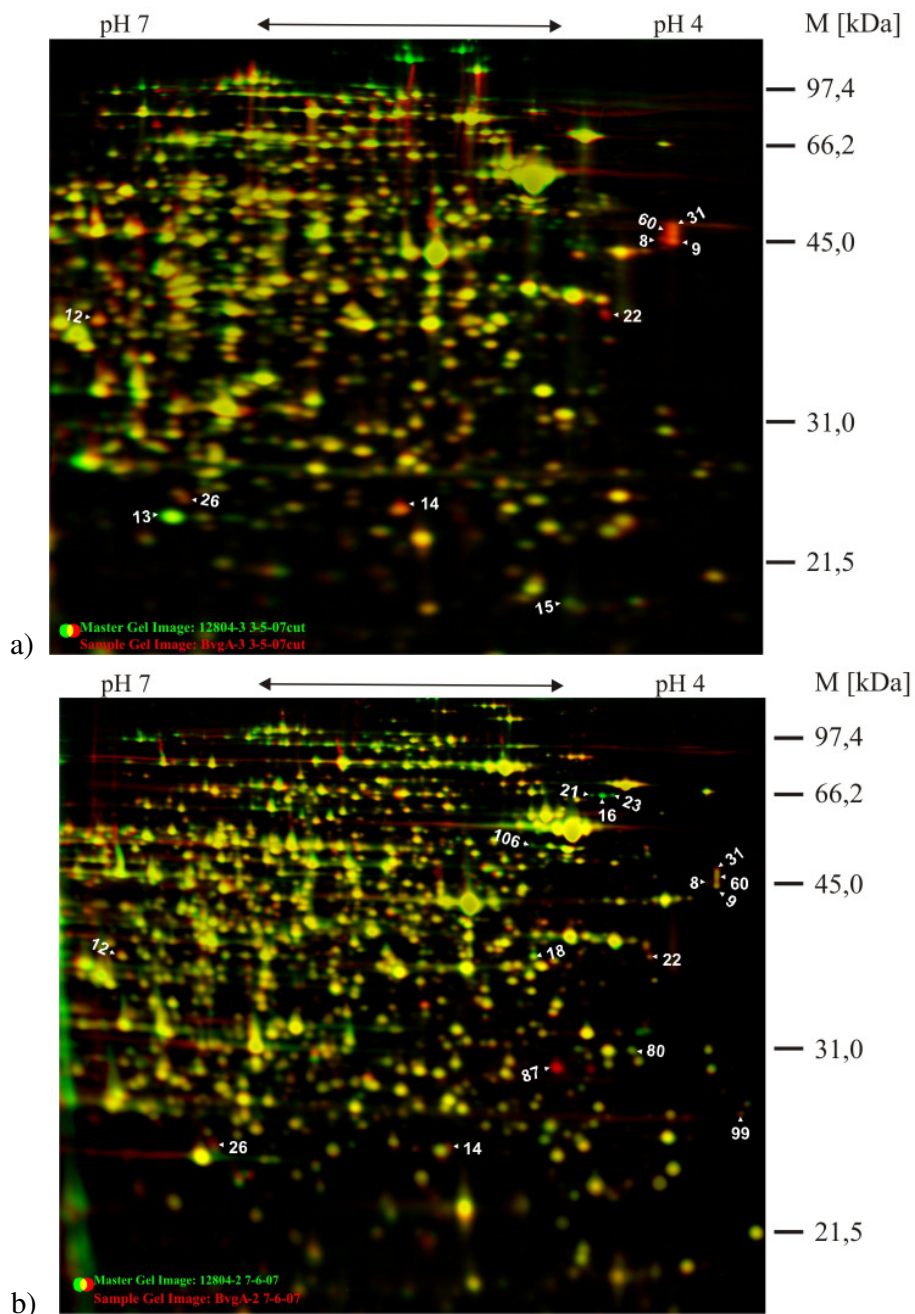


Abbildung 5-14 Mit Delta2D (DECODON) erstellte repräsentative Zweikanalbilder von *B. petrii* DSM 12804 und der $\Delta bvgA$ -Mutante. a) 37°C-Durchgang 2. b) 15°C-Durchgang 2. Die nummerierten Spots wurden über MALDI-TOF MS analysiert. Dem Wildtyp *B. petrii* ist die Falschfarbe Grün zugeordnet, der $\Delta bvgA$ -Mutante die Falschfarbe Rot. Nicht regulierte Proteinspots erscheinen in der Überlagerung gelb. Als Molekulargewichtsmarker wurde der Broad Range Protein Marker von Biorad verwendet (Abschnitt 3.8).

Beim Vergleich beider Durchgänge eines Projektes wurden wiederum nur solche Spots berücksichtigt, die in beiden Durchgängen signifikant reguliert wurden, oder zumindest in einem Durchgang signifikant und im andern mit dem entsprechenden Trend reguliert wurden. Zwei Ausnahmen stellten die Spots 87 und 15 dar. Spot 87 wurde in die Analyse mit aufgenommen da er in einem der vier Durchgänge besonders stark hoch reguliert erschien, d.h. in allen drei Gelen dieses Durchgangs als großer roter Spot zu erkennen, in allen anderen Gelen aber kaum zu sehen war. Spot 15 wurde zusätzlich ausgewählt, da er im Gel deutlich herunter reguliert als grüner Spot erschien, aber nicht in die Quantifizierungstabelle aufgenommen worden war. Es wurden insgesamt 18 Spots für MALDI-TOF MS Analysen ausgewählt, die in der Abbildung 5-14 a) und b) markiert sind.

Für die MALDI-TOF Analysen wurden neue 2D-Gele mit 750 µg Zellextraktprotein von *B. petrii* und der $\Delta bvgA$ -Mutante angefertigt, welche mit kolloidalem Coomassie angefärbt (Abschnitt 4.2.3.4) und zur Analyse versandt wurden (Armin Bosserhoff, Lehrstuhl für Biomolekulare Chemie, ZMBH Heidelberg). In Tabelle 5-6 ist eine Übersicht über die analysierten Spots, die Ergebnisse der MALDI-TOF MS und ein Vergleich mit Microarray Analysen der „klassischen“ *Bordetella*-Arten (Cummings *et al.*, 2006) aufgezeigt.

Spot	37°C D1	37°C D2	15°C D1	15°C D2	Gen	Protein	Regulation im <i>Bordetella</i> - Microarray
8/9/31/ 60	↑ 4-20	↑ 3-15	↑ 2-3	↑ 2-9	(b_petrii_3465)	Putatives exportiertes Protein, wahrscheinlich Iron-regulated protein A precursor (IrpA)	nein
12	↑ 1,1	↑ 2,3	↑ 2	↑ 1,6	(b_petrii_2282)	Put. Eisenbindeprotein. Periplasmatischer Teil des ABC Transporter Komplexes fbpABC	nein
14	↑ 3,5	↑ 2,5	↑	↑ 1,7	(b_petrii_4085)	Put. Superoxid-Dismutase SodA (Mn)	nein
22	↑ 4	↑ 8	↑ 2	↑ 2,6	(b_petrii_0464)	Outer membrane porin protein. Wässrige Kanäle für die Diffusion von kleinen hydrophilen Molekülen	aktiviert
26	↑ 1,4	↑ 2,6	↑ 1,7	↑ 2,4	(b_petrii_2871)	Hypothetisches Protein	nein
16/21/2 3	↓ 16	()	↓ 20	↓ 90	(b_petrii_4236)	Mod Typ III Restriktionssystem-Methylase (GI6)	nein
13	↓ 1,6	↓ 2			(b_petrii_2667)	Superoxid-Dismutase SodB (Fe)	nein
15	↓ 1,6	↓ 1,9			(b_petrii_0087)	Bacterioferritin	aktiviert
18	↓ 2,2	()	↓ 2,3	↓ 1,7	(b_petrii_0825)	PurM Purinbiosynthese/-metabolismus	nein
87				↑ 26	(b_petrii_2539)	Put. Glutharedoxin. Entgiftung von H ₂ O ₂ , Peroxynitrat, organ. Hydroperoxide. Antioxidanz	nein

99		↑ 2,3 ↑ 5	(b_petrii_2123)	FlgD basal body rod modification. Benötigt für die Hakenbildung, essentiell für das Flagellen Assembling	reprimiert
106		↓ 2 ↓ 3	(b_petrii_2792)	Tig Triggerfaktor. ATP unabhängiges Chaperon, Peptidyl-Prolyl-Isomerase	nein
80		↓ 3,6 ↓ 1,6	(b_petrii_4238)	Hypothetisches Protein (GI6)	nein

Tabelle 5-6 Übersicht über die analysierten Spots und die Ergebnisse der MALDI-TOF MS. Für die einzelnen Durchgänge (D1 und D2) bei 37°C und bei 15°C ist, bezogen auf die $\Delta bvgA$ -Mutante, für jeden Spot die Regulation durch einen Pfeil und den entsprechenden Faktor angezeigt. Eine Herunterregulation würde somit eine BvgA-Aktivierung bedeuten, eine Hochregulation eine BvgA-Reprimierung. Leere Klammern: Spot nicht erfasst. Gennummer und Proteinbeschreibung beziehen sich auf das GenDB Programm (<https://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/gendb-2.2>). Der Vergleich mit dem *Bordetella*-Microarray bezieht sich auf die Arbeit von Cummings *et al.* in der das BvgA-Regulon von *B. petruis* und *B. bronchiseptica* untersucht wurde (Cummings *et al.*, 2006).

5.3.5 Untersuchung der Regulation ausgewählter Gene auf Transkriptionsebene mittels quantitativer Realtime-PCR

Zum Vergleich der Proteomdaten mit der Regulation auf Transkriptionsebene wurden Realtime-PCR Analysen mit neun ausgewählten Genen durchgeführt. Auffällig war, dass mehrere Proteine aus den 2D-Proteomanalysen eine mögliche Rolle im Eisenstoffwechsel und in der Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies spielen, was wiederum auf Virulenzeigenschaften hinweisen könnte (Brickman *et al.*, 2007; Graeff-Wohlleben *et al.*, 1997; Vidakovics *et al.*, 2007a; Vidakovics *et al.*, 2007b). Daher wurden die Gene b_petrii_3465/ 2282/ 4085/ 2667/ 0087/ 2539 ausgewählt (siehe Tabelle 5-6). Zusätzlich wurden solche Gene gewählt, die auch im *Bordetella*-Microarray eine Regulation zeigten (b_petrii_0464/ 0087/ 2123). Aufgrund der starken Regulation wurde das Gen b_petrii_4236 in die Realtime-PCR Analysen mit aufgenommen. Aus jeweils zwei unabhängigen Kulturen von *B. petrii* DSM 12804 und der $\Delta bvgA$ -Mutante bei 37°C und 15°C wurde wie im Abschnitt 4.1.9 beschrieben RNA präpariert. Von jeder RNA wurde zweimal cDNA synthetisiert (Abschnitt 4.1.10) und diese in Realtime-PCR Analysen (Abschnitt 4.1.11) eingesetzt. Als interner Standard wurde die 16S rRNA verwendet und die einzelnen cDNAs zusätzlich auf die cDNA1.1 (1. RNA, 1. cDNA Synthese) normalisiert. Die Ergebnisse sind von Abbildung 5-15 bis Abbildung 5-17 dargestellt.

Die Signifikanz der Regulation wurde über eine Mann-Whitney U-Teststatistik, wie für Realtime-PCR Analysen empfohlen, ermittelt (Yuan & Stewart Jr., 2005). Eine entsprechende Tabelle befindet sich im Anhang 8.6.

In Abbildung 5-15 sind die Gene dargestellt, welche von den neun ausgewählten Genen am stärksten exprimiert werden. Der größte Effekt ist bei der Porinexpression zu erkennen, die bei 37°C, aber auch bei 15°C in der $\Delta bvgA$ -Mutante signifikant hochreguliert ist. Dies stimmt mit den Proteomdaten überein, stellt aber im Gegensatz zur Regulation im *Bordetella*-Microarray eine Reprimierung durch BvgA dar. Auch das Gen, welches für das putative Eisenbindeprotein kodiert (b_petrii_2282), ist bei 37°C signifikant stärker in der $\Delta bvgA$ -Mutante exprimiert. Das Gen für die Superoxid-Dismutase (SodB) zeigt eine weniger

ausgeprägte Regulation und ist in der $\Delta bvgA$ -Mutante etwas schwächer exprimiert, wobei die Werte für beide Temperaturen signifikant sind.

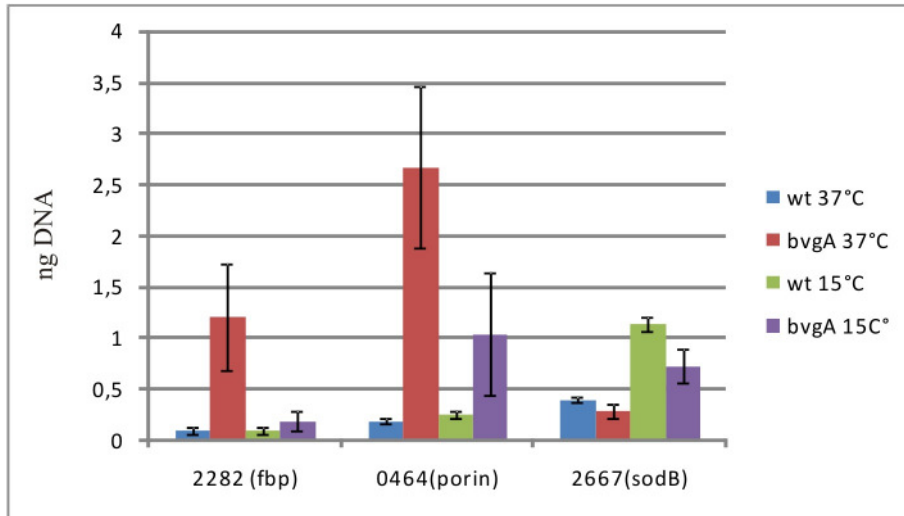


Abbildung 5-15 Ergebnisse der Realtime-PCR für die *B. petrii*-Gene *b_petrii_2282* / *0464* und *2267*. Es wurden sechs PCR Läufe zusammengefasst und die Standardabweichung bestimmt.

Das *mod*-Gen in Abbildung 5-16 zeigt für die $\Delta bvgA$ -Mutante bei beiden Temperaturen eine leichte Herunterregulation in der Expression, wobei nur die Werte bei 37°C signifikant sind. Diese eher geringen Unterschiede zwischen Wildtyp und $\Delta bvgA$ -Mutante spiegeln allerdings nicht die starke Regulation auf Proteinebene wieder (Tabelle 5-6). *flgD* ist in der $\Delta bvgA$ -Mutante bei 37°C signifikant stärker exprimiert als im Wildtyp. Interessanterweise ist bei 15°C für beide Stämme viel weniger Transkript vorhanden, was in Gegensatz zu den Proteomdaten steht, wo eine entsprechende Regulation nur bei den 15°C-Proteinproben, nicht aber bei den 37°C-Proteinproben zu erkennen war.

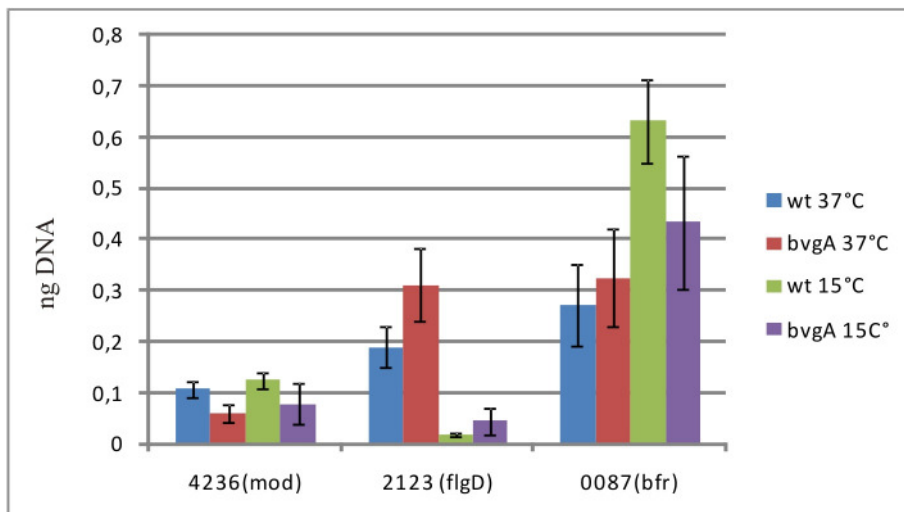


Abbildung 5-16 Ergebnisse der Realtime-PCR für die *B. petrii*-Gene *b_petrii_4236* / *2123* und *0087*. Es wurden sechs PCR-Läufe zusammengefasst und die Standardabweichung bestimmt.

Eine BvgA-Reprimierung wurde für *flgD* aber auch im *Bordetella*-Microarray beschrieben. Bacterioferritin (*bfr*), welches im *Bordetella*-Microarray als BvgA aktiviert beschrieben

wurde und welches dementsprechend in den Proteomanalysen bei 37°C in der $\Delta bvgA$ -Mutante herunter reguliert war, erscheint hier bei 37°C nicht reguliert. Bei 15°C läßt sich dieser Trend auf Transkriptebene zwar erkennen, aber die Signifikanz ist gering.

Die Gene, welche von den neun ausgewählten Genen am geringsten exprimiert werden, sind in Abbildung 5-17 dargestellt. Die geringste Expression zeigt hier das Superoxid-Dismutase (SodA)-Gen, wobei die verstärkte Expression in der $\Delta bvgA$ -Mutante bei 37°C signifikant ist. Dies stimmt mit der stärkeren Expression auf Proteinebene bei 37°C im Vergleich zu 15°C überein. Das Gleiche gilt für b_petrii_3465, welches für ein putatives exportiertes Protein kodiert. Auch hier ist die verstärkte Expression in der $\Delta bvgA$ -Mutante bei 37°C signifikant und auf Proteinebene liegt ebenfalls bei den 37°C-Proben eine stärkere Expression vor, als bei den 15°C-Proben. Das putative Glutharedoxin, welches auf Proteinebene nur einmal in einem 15°C-Durchgang in der $\Delta bvgA$ -Mutante stark hoch reguliert erschien, zeigt auf Transkriptebene bei keiner der beiden Temperaturen eine Regulation.

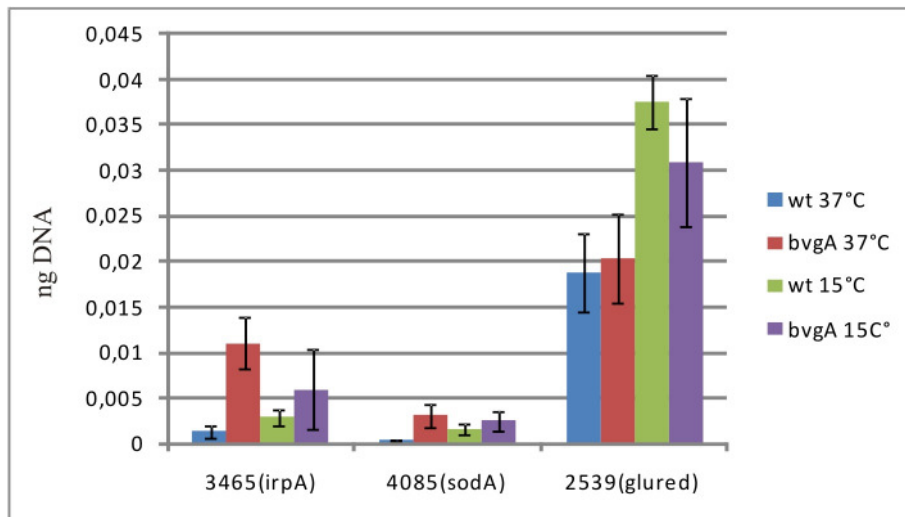


Abbildung 5-17 Ergebnisse der Realtime-PCR für die *B. petrii*-Gene b_petrii_3465 / 4085 und 2539. Es wurden sechs PCR Läufe zusammengefasst und die Standardabweichung bestimmt.

5.3.6 Zusammenfassung der Proteom- und Realtime-PCR-Daten

In Tabelle 5-7 sind die Ergebnisse aus Proteom- und Realtime-PCR Analysen zusammengefasst. Die *Bordetella*-Microarray Analysen sind wieder als Vergleich aufgeführt (Cummings *et al.*, 2006).

Gen	Protein	Proteom		qRT-PCR		Temperatureffekt in der qRT-PCR	<i>Bordetella</i> - Microarray
		37°C	15°C	37°C	15°C		
(b_petrii_2282)	Put. Eisenbindeprotein. Periplasmatischer Teil des ABC Transporter Komplexes fbpABC	↑	↑	↑	ns	bei 37°C mehr Transkript in $\Delta bvgA$ als bei 15°C	nein

(b_petrii_0464)	Outer membrane porin protein. Wässrige Kanäle für die Diffusion von kleinen hydrophilen Molekülen	↑	↑	↑	↑	bei 37°C mehr Transkript in $\Delta bvgA$ als bei 15°C	BvgA aktiviert
(b_petrii_2667)	Superoxid-Dismutase SodB (Fe)	↓	-	↓	↓	mehr Transkript bei 15°C als bei 37°C	nein
(b_petrii_2436)	Mod Typ III Restriktions-system-Methylase (GI6)	↓	↓↓	↓	n s	-	nein
(b_petrii_2123)	FlgD basal body rod modification. Benötigt für die Hakenbildung, essentiell für das Flagellen Assembling	-	↑	↑	n s	weniger Transkript bei 15°C als bei 37°C	BvgA reprimiert
(b_petrii_0087)	Bacterioferritin	↓	-	k R	↓	mehr wt Transkript bei 15°C als bei 37°C	BvgA aktiviert
(b_petrii_3465)	Putatives exportiertes Protein, wahrscheinlich Iron-regulated protein A precursor (IrpA)	↑↑	↑	↑	n s	mehr wt Transkript bei 15°C als bei 37°C	nein
(b_petrii_4085)	Put. Superoxid-Dismutase SodA (Mn)	↑	↑	↑	n s	mehr wt Transkript bei 15°C als bei 37°C	nein
(b_petrii_2539)	Put. Glutharedoxin. Entgiftung von H ₂ O ₂ , Peroxynitrat, organ. Hydroperoxide. Antioxidanz	-	↑↑	k R	k R	mehr wt Transkript bei 15°C als bei 37°C	nein

Tabelle 5-7 Zusammenfassung der Proteom- und Realtime-PCR-Daten. Die Pfeile geben eine ↑ Hoch- oder ↓ Herunterregulation in der $\Delta bvgA$ -Mutante an. n s: nicht signifikant. k R: keine Regulation. Gennummer und Proteinbeschreibung beziehen sich auf das GenDB Programm (<https://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/gendb-2.2>). Der Vergleich mit dem *Bordetella*-Microarray bezieht sich auf die Arbeit von Cummings *et al* in der das BvgA-Regulon von *B. petrusis* und *B. bronchiseptica* untersucht wurde (Cummings *et al.*, 2006).

5.4 Beschreibung von *B. petrii* Varianten, die während eines Langzeitwachstumsversuchs in Mainwasser isoliert wurden

Wie unter 5.1 erläutert, wurde für *B. petrii* DSM 12804 ein Langzeitwachstumsversuch in Gewässerproben und PBS durchgeführt.

5.4.1 Langzeitwachstumsversuch

Die Langzeitwachstumsversuche wurden wie in Abschnitt 4.3.3 beschrieben durchgeführt. Als Medien wurden Milliporewasser, PBS und eine Wasserprobe aus dem Main verwendet. Alle Medien wurden sterilfiltriert. Da das Mainwasser sehr trüb war, wurde es zunächst durch einen 595 ½ Faltenfilter und dann durch einen 0,45 µm Sterilfilter gefiltert. Die pH-Werte der Mainwasserprobe, des PBS und des Milliporewassers lagen bei 8,2 bzw. 7,2 und 6,7. Als

Sterilitätskontrolle wurden Aliquots der Medien vor und nach einer 48 stündigen Inkubation bei 37°C auf BG-Agar, Blood-Agar, Nutrient-Agar und Yeast-Extract-Agar ausplattiert. Es wurde kein Wachstum beobachtet. Die Bakterienstämme, die verglichen wurden, waren *B. bronchiseptica* 7866, *B. pertussis* T1 Δ tox und *B. pertussis* DSM 12804. Da *B. pertussis* in keinem der drei Medien nach 24 h noch nachweisbar war, wurde der Stamm nicht in die Auswertung mit aufgenommen. Die Versuche wurden insgesamt dreimal durchgeführt.

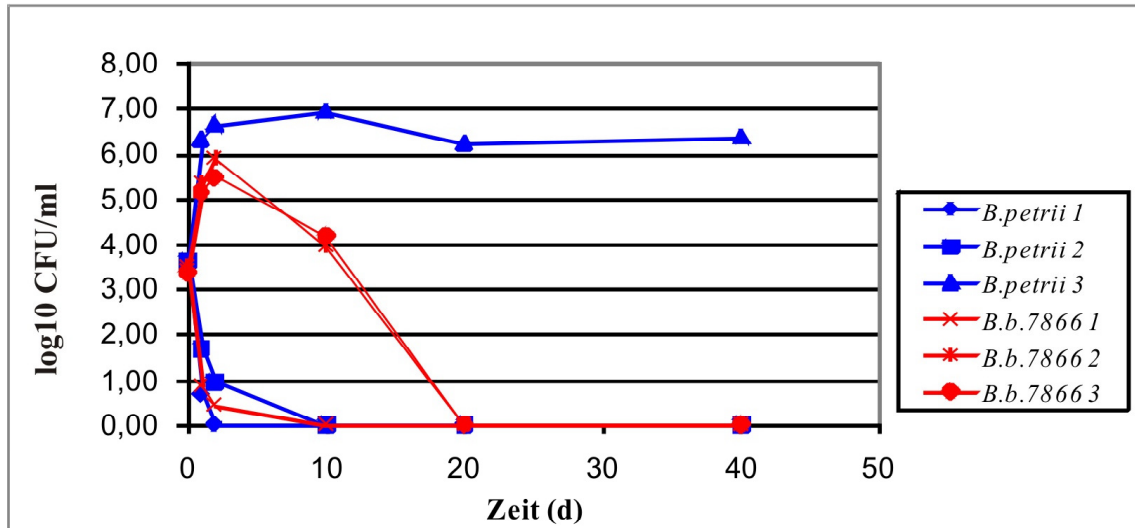


Abbildung 5-18 Wachstumsversuch in Milliporewasser (1), PBS (2) und Mainwasser (3) mit *B. pertussis* DSM 12804 und *B. bronchiseptica* 7866. Der Logarithmus zur Basis 10 der CFU/ml ist gegen die Inkubationszeit in Tagen aufgetragen.

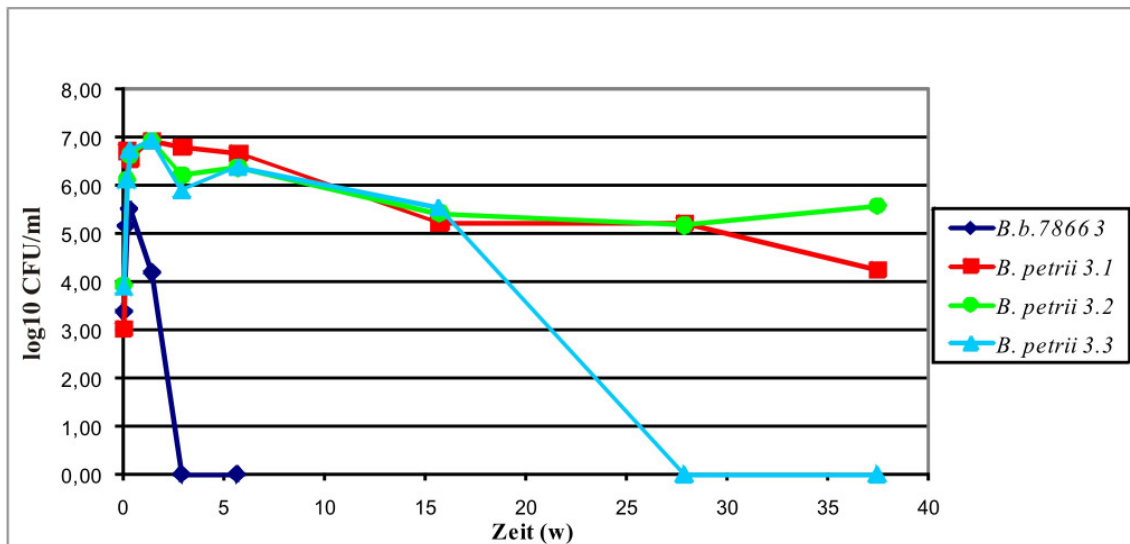


Abbildung 5-19 Fortführung des Wachstumsversuchs über 37 Wochen. Der Logarithmus zur Basis 10 der CFU/ml ist gegen die Inkubationszeit in Wochen aufgetragen. Für *B. bronchiseptica* sind drei Ansätze zusammengefasst, für *B. pertussis* sind sie einzeln aufgetragen.

Abbildung 5-18 zeigt den Wachstumsversuch bis zum Tag 40. Sowohl *B. pertussis* als auch *B. bronchiseptica* sind schon nach den ersten Tagen in Milliporewasser nicht mehr nachweisbar. In PBS und Mainwasser kommt es bei *B. bronchiseptica* in den ersten 48 h des Versuchs zu einem 150 - 200fachen Zuwachs, danach nimmt die Keimzahl beständig ab und der Stamm ist nach 20 Tagen nicht mehr nachweisbar. *B. pertussis* zeigt dagegen kein Wachstum

in PBS und ist nach 10 Tagen bereits nicht mehr nachweisbar. In Mainwasser kann dafür ein Wachstum um den Faktor 1000 beobachtet werden, wobei die Bakteriendichte über den Zeitraum von 40 Tagen nur wenig abnimmt.

In Abbildung 5-19 ist die Fortführung des Versuchs für *B. petrii* in Mainwasser dargestellt, dabei sind die drei Ansätze für *B. petrii* separat dargestellt, die drei Ansätze für *B. bronchiseptica* sind als Vergleich dazu zusammengefasst dargestellt. Bei zwei der drei Ansätze mit *B. petrii* lassen sich die Bakterien auch nach neun Monaten noch nachweisen, wobei die Werte zwischen $3,8 \times 10^5$ und $1,7 \times 10^4$ CFU/ml schwanken, aber immer noch über dem Inokulum liegen.

5.4.2 Isolierung und Beschreibung der Varianten: g, k, f

Nach Tag 20 des Langzeitwachstumsversuchs wiesen die ausplattierten *B. petrii* Proben eine Mischung aus großen und kleinen Kolonien auf, wie dies auch Porter und Wardlaw bei *B. bronchiseptica* beobachtet hatten (Porter & Wardlaw, 1993). Für Umweltkeime wird das Auftreten von kleinen Formen unter Nährstoffmangel häufiger beschrieben und als Starvation-Survival Reaktion bezeichnet (Leclerc & Moreau, 2002; Morita, 1997; Siegele & Kolter, 1992). Dies ist ein Zustand veränderter und/oder reduzierter Stoffwechselaktivität und erhöhter Resistenz gegenüber Umweltreizen. Ein häufig auftretendes Muster ist dabei eine anfängliche Zunahme der Zellzahl durch Teilung ohne anschließende Zunahme der Zellgröße, gefolgt von einem Rückgang der Zellzahl (Morita, 1997). Des weiteren kennt man das Auftreten von „small colony variants“ (scv) von pathogenen Keimen, wie z.B. *Staphylococcus aureus* (von Eiff *et al.*, 2006), *Pseudomonas aeruginosa* (Haussler, 2004) oder *Burkholderia cepacia* (Haussler *et al.*, 2003). Diese Formen sind zum einen durch langsames Wachstum und der damit verbundenen Ausbildung von Mikrokolonien gekennzeichnet, zum andern weisen sie veränderte pathogene Eigenschaften auf, wie vermehrte Antibiotikaresistenz, die Fähigkeit zur Persistenz im Wirt oder verstärkte Biofilmbildung.

Durch wiederholtes Ausstreichen auf Einzelkolonien und Kultivierung in Flüssigkultur (siehe Abschnitt 4.3.1), konnten drei phänotypisch unterscheidbare Varianten in Reinkultur erhalten werden (siehe Abbildung 5-20): Eine Variante g, die den gleichen Phänotyp wie der Wildtyp aufweist, eine langsam wachsende „small colony“ Variante k und eine Variante f, deren Kolonien zum Ineinanderfließen tendieren und deren Verdoppelungszeit zwischen der des Wildtyps und der der Variante k liegt.

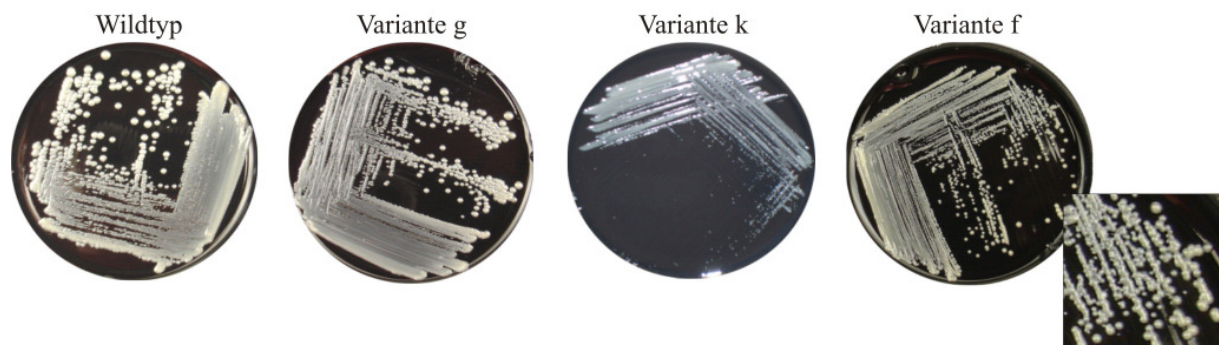


Abbildung 5-20 Koloniemorphologie des *B. petrii* Wildtyps und der Varianten g, k, und f auf Charcoal-Agar nach 72 h Inkubation bei 37°C.

Um zu zeigen, dass es sich bei den Varianten g, k und f tatsächlich um *B. petrii*-Varianten handelt, wurde eine partielle Sequenzierung des 1158 bp großen *fimD* Gens durchgeführt. Die sequenzierten Bereiche betragen für Variante g 975 bp, für Variante k 754 bp und für Variante f 761 bp und stimmen jeweils zu 100 % mit der wildtypischen Sequenz überein.

Der geringe Unterschied zwischen Varianten und Wildtypstamm zeigt sich auch in der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), da sie sich jeweils nur in drei Banden von *B. petrii* DSM 12804 unterscheiden (Tenover *et al.*, 1995). Die PFGE wurde wie in Abschnitt 4.1.2.2 beschrieben durchgeführt. Um einen Überblick über die genotypische Variation zu erhalten, wurde ein zweistufiger Lauf gefahren, mit einer ersten Pulszeit von 0,2 – 20 Sekunden und einer Laufzeit von 14 h und einer zweiten Pulszeit von 30 – 60 Sekunden und einer Laufzeit von 12 h. Der Gellauf ist in Abbildung 5-21 dargestellt.

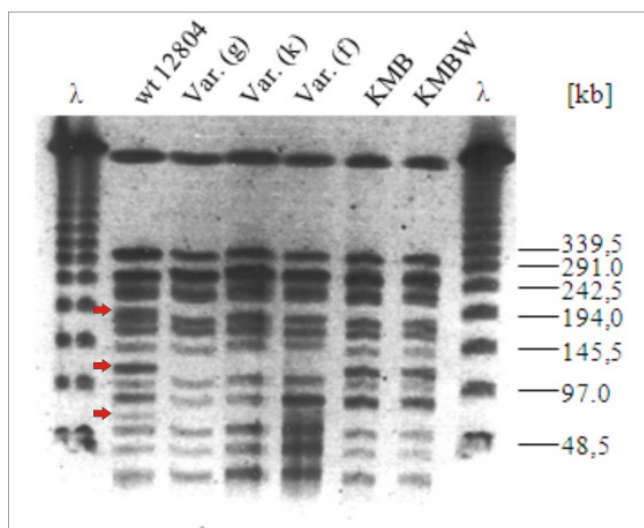


Abbildung 5-21 Pulsfeldgel zum Vergleich von *B. petrii* DSM 12804 mit den Varianten g, k und f. Die drei zusätzlichen Banden im Wildtyp sind mit Pfeilen markiert. Die Proben wurden *BcuI* verdaut und auf einem 1 % PFC-Agarosegel aufgetrennt. KMB und KMBW sind Varianten aus einer früheren Arbeit, die sich nur in einer Bande vom Wildtyp unterscheiden (Klein, 1999).

Zur weiteren Charakterisierung der Varianten g, k und f wurden Wachstumsversuche mit *B. petrii* DSM 12804 und den Varianten bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt (4.3.2). Wie in Abbildung 5-22 zu sehen ist, ist das Wachstumsverhalten von Wildtyp und Variante g bei allen drei Temperaturen annähernd gleich. Am langsamsten wächst Variante k, wobei das größte Wachstumsdefizit bei 15°C auftritt. Dies gilt auch für Variante f, die im mittleren Wachstumsbereich anzusiedeln ist. Bei 37°C und 42°C erreicht diese annähernd Wildtypdichte mit einer OD₆₀₀ von etwa 4, bei 15°C hingegen erreicht sie eine maximale optische Dichte von nur 0,3. Variante k erreicht bei 15°C nur eine optische Dichte von etwa 0,2. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Variation von k und f sich unter umweltnahen Bedingungen am stärksten auswirkt.

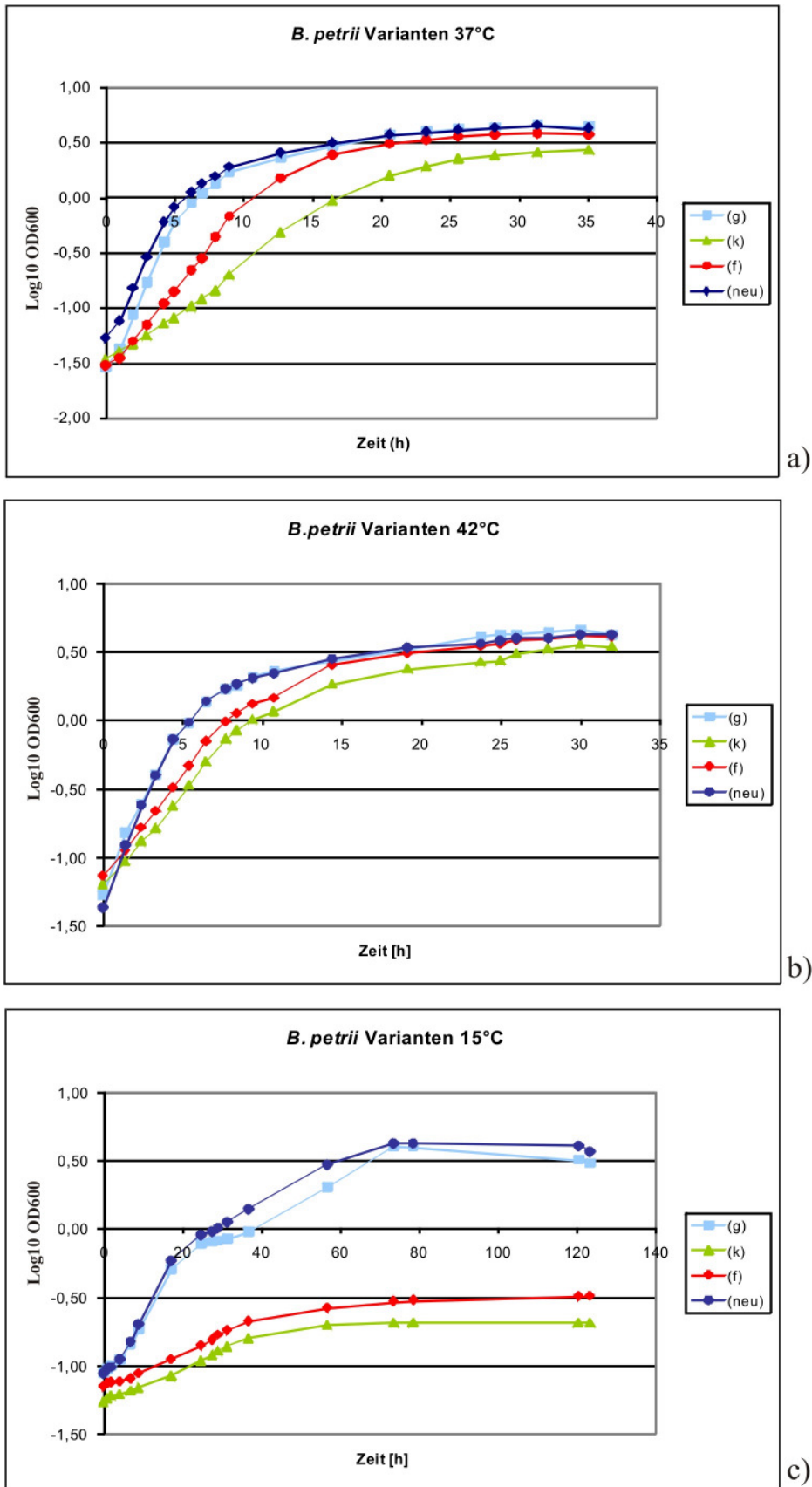


Abbildung 5-22 Wachstumsversuche mit *B. petrii* DSM 12804 (neu) und den Varianten g, k, und f in LB-Medium bei (a) 37°C, (b) 42°C und (c) 15°C. Der Log₁₀ der OD₆₀₀ ist gegen die Zeit in Stunden aufgetragen. Dunkelblau: *B. petrii* DSM 12804; hellblau: *B. petrii* Variante g; grün: *B. petrii* Variante k; rot: *B. petrii* Variante f.

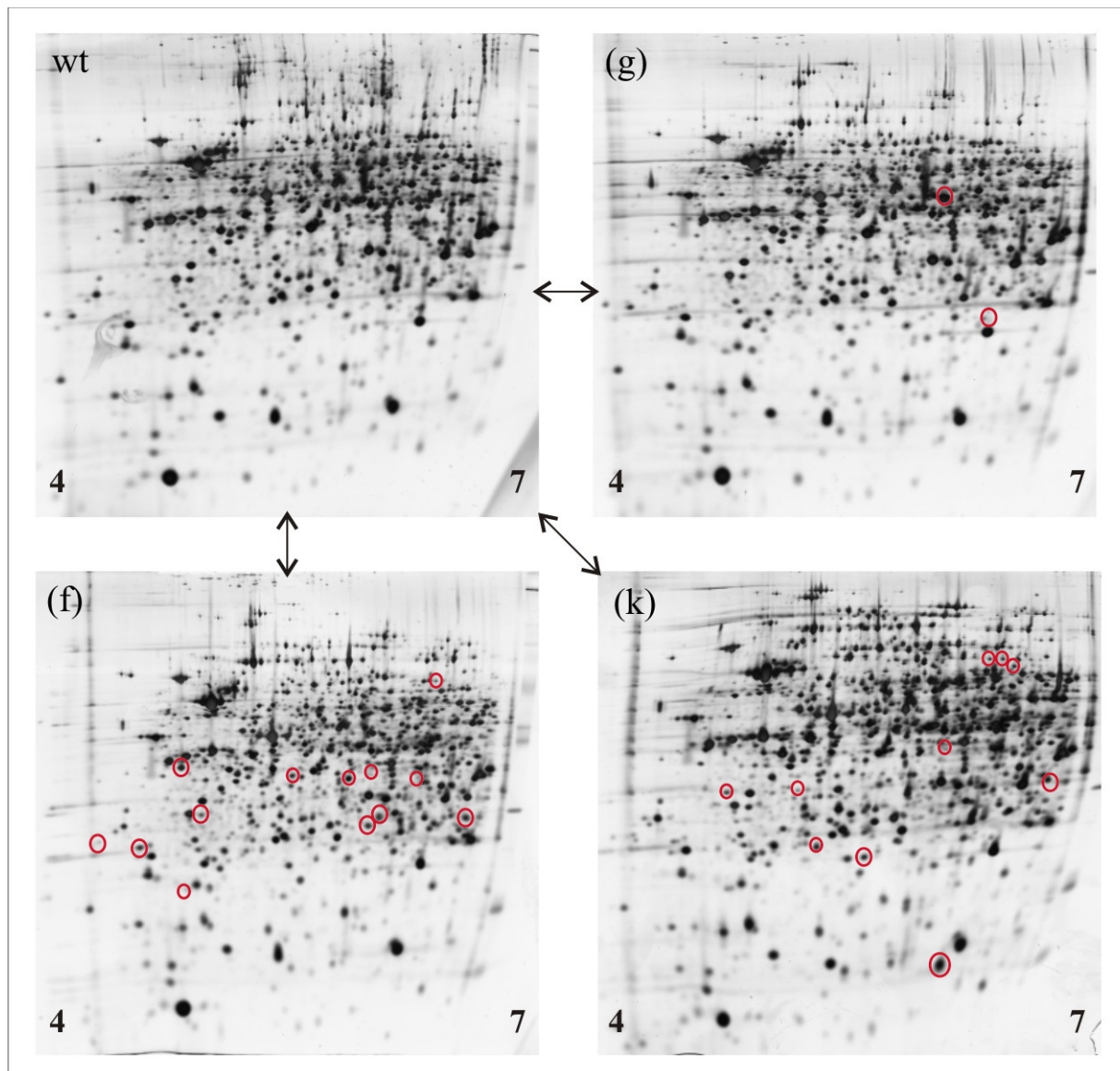


Abbildung 5-23 2D-Gelelektrophorese der *B. petrii* Varianten g, k und f im Vergleich zum Wildtyp (wt). Es wurden 75 µg Gesamtzellprotein auf 12 % Acrylamidgele aufgetragen. Der Gellauf erfolgte über Nacht bei 90 V und 14°C. Im Anschluss wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Jeweilige Unterschiede zum Wildtyp sind rot umrandet. pH Range: 4-7

Um einen Überblick darüber zu erhalten, wie sehr sich die einzelnen Varianten auf Proteinebene voneinander und vom Wildtyp unterscheiden, wurde eine 2D-Gelelektrophorese wie im Abschnitt 4.2.3.2. beschrieben durchgeführt. Die Gesamtzellproteine wurden wie im Abschnitt 4.2.1 beschrieben isoliert. Da dieser Gellauf zunächst einen ersten Vergleich ermöglichen sollte, wurden die Proben nicht in Triplets gefahren.

Der Proteomvergleich zum *B. petrii* Wildtyp ist in Abbildung 5-23 dargestellt. Offensichtliche Unterschiede zum Wildtyp sind in den einzelnen Varianten rot umrandet. Hier zeigt sich, dass sich alle drei Varianten in ihrer Proteinexpression von Wildtyp unterscheiden, wobei für die Varianten k und f die meisten Unterschiede zu verzeichnen sind. Auch die Varianten untereinander unterscheiden sich in einzelnen Spots voneinander wie in Abbildung 5-24 zu sehen ist.

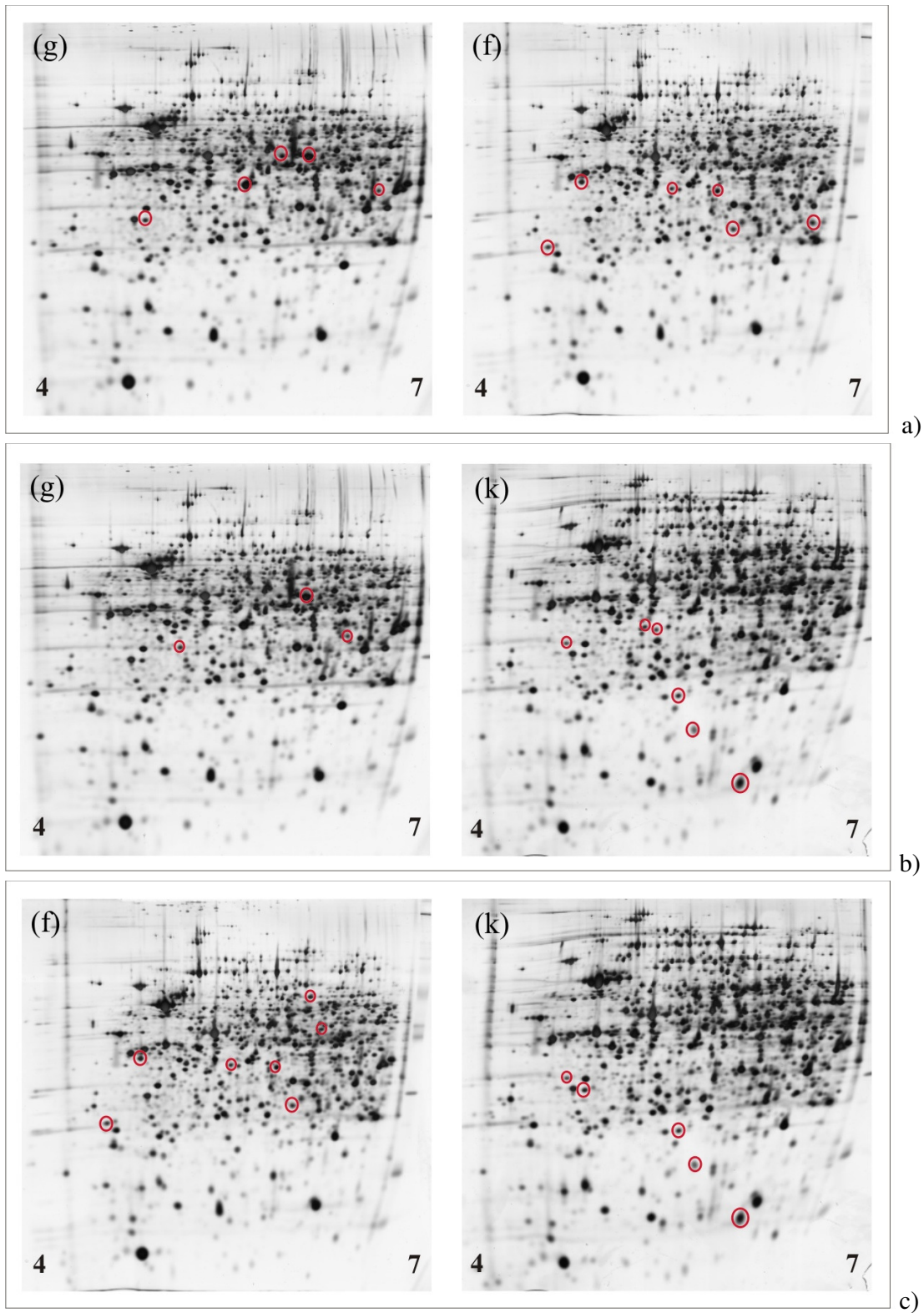


Abbildung 5-24 2D-Gelelektrophorese der *B. petrii* Varianten g, k und f. a) Vergleich der *B. petrii* Varianten g und f. b) Vergleich der *B. petrii* Varianten g und k. c) Vergleich der *B. petrii* Varianten f und k. Spots, die im Gegensatz zum Vergleichsgel vorhanden sind, sind rot umrandet. Es wurden 75 µg Gesamtzellprotein auf 12 % Acrylamidgele aufgetragen. Der Gellauf erfolgte über Nacht bei 90 V und 14°C. Im Anschluss wurde eine Silberfärbung durchgeführt. pH Range: 4-7

5.5 Genomische Variabilität von *B. petrii* DSM 12804

Die Sequenzierung des *B. petrii* Genoms erbrachte für diesen Genus neue Erkenntnisse hinsichtlich der Strukturierung und Veränderbarkeit des Bakteriengenoms durch horizontalen Gentransfer (Gross *et al.*, 2008). Letzterer spielt eine wichtige Rolle in der Bakterienevolution und ermöglicht auch innerhalb kurzer Zeiträume tiefgreifende Veränderungen in der Zusammensetzung bakterieller Genome (Eisen, 2000; Ochman *et al.*, 2000). Als Elemente des horizontalen Gentransfers sind die integrativen und konjugativen Elemente (ICEs), zu denen auch die genomischen Inseln gehören (siehe Abschnitt 2.5.1), von besonderer Bedeutung (Burrus *et al.*, 2002; Dobrindt *et al.*, 2004; Hacker & Carniel, 2001)

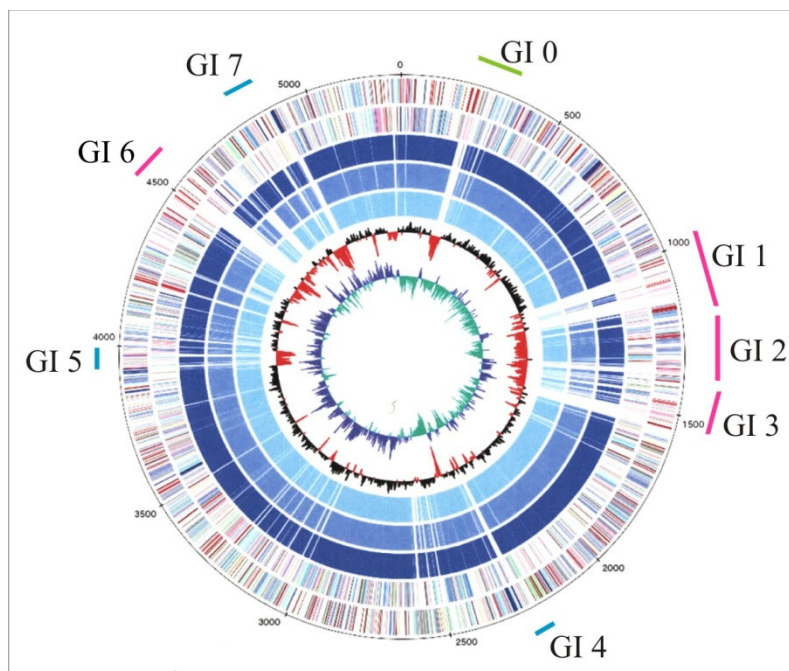


Abbildung 5-25 Ring Plot des *B. petrii* Genoms. Die äußere Skala gibt die Größe in kb wieder. Die nächsten beiden Ringe geben die Positionen der *B. petrii* Gene wieder, die im Uhrzeigersinn bzw. gegen den Uhrzeigersinn transkribiert werden. Die blauen Ringe stellen die Genome der Vertreter des *B. bronchiseptica*-Clusters dar (*B. bronchiseptica*, *B. parapertussis*, *B. pertussis*). Der GC-Gehalt ist mit schwarz (hoch) und rot (niedrig) markiert. Die innere Skala zeigt den GC-Skew. Balken geben die ungefähre Lage der genomischen Inseln GI0-GI7 an. (Verändert nach (Gross *et al.*, 2008)).

Während des Sequenzierungsprojekts von *B. petrii* DSM 12804 kam die Frage auf, ob *B. petrii* möglicherweise über extrachromosomale DNA verfügt, da ein etwa 260 kb großes Contig nicht eindeutig in das Chromosom eingegliedert werden konnte (Rosa Martinez, persönliche Mitteilung). Verschiedene Versuche der Plasmidpräparation sowohl mit dem Nucleobond® AX100 Midi-Kit für „low copy“ Plasmide, als auch mittels einer Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation (Sambrook *et al.*, 1989) erbrachten allerdings keinen Hinweis auf das Vorhandensein von Plasmid-DNA. Dies führte zu der Vermutung, dass es sich bei der fraglichen DNA-Sequenz um ein mehr oder weniger instabiles Element, wie z.B. eine genomische Insel, handeln könnte, die, falls sie im entsprechenden Organismus nicht repliziert, nur zu einem sehr geringen Anteil als ringförmige Struktur im Bakterium vorliegen würde (Mohammed Sebhaia, persönliche Mitteilung). Weitere Sequenzanalysen, die vom *B. petrii* Genomkonsortium (Blöcker, H.; Göbel, U.; Guzman, C.; Kaiser, O. und Mitarbeiter) durchgeführt wurden, schlugen das Vorhandensein von acht ICEs vor. Ihre Lokalisation auf dem *B. petrii* Genom ist in Abbildung 5-25 schematisch durch verschiedenfarbige Balken dargestellt. Ein erster Hinweis darauf, dass diese DNA-Elemente durch horizontalen Gentransfer verbreitet wurden, ist ihr niedrigerer GC-Gehalt im Vergleich zum restlichen Genom (Hacker & Carniel, 2001).

5.5.1 Untersuchung der *B. petrii* Varianten g, k und f auf das Vorhandensein von genomischen Inseln mittels Southern Blot Analysen.

Da während des Langzeitwachstumsversuchs das Auftreten von Varianten beschrieben worden war, sollten diese Varianten auf das Vorhandensein der entsprechenden DNA-Bereiche hin untersucht werden bzw. die vorgeschlagenen Grenzen der genomischen Inseln bestätigt werden. Hierfür wurden Southern Blot Analysen wie unter Abschnitt 4.1.8 beschrieben durchgeführt. Für die Untersuchung der genomischen Inseln GI1-GI3 und GI6 wurden unter anderem die in Tabelle 5-8 aufgeführten Sonden mittels PCR hergestellt. Ihre entsprechende Lage auf dem *B. petrii*-Chromosom ist schematisch in Abbildung 5-26 als hellblaue Balken wiedergegeben, wobei die Auflistung in der Tabelle der Anordnung in der Abbildung von links nach rechts entspricht. Die Sonden wurden jeweils so gewählt, dass sie im Wildtypstamm *B. petrii* DSM 12804 nahe der putativen Grenzen der genomischen Inseln einmal innerhalb und einmal außerhalb binden. Die Oligonukleotide, die für die Sondenherstellung verwendet wurden, sind im Materialteil aufgelistet.

Genomische Insel	Name	Koordinaten (Größe)	Fragmentgröße im Southern Blot
GI1 (außerhalb)	Sonde 9down	1082983-1083477 (495 bp)	4122 bp
GI1 (innerhalb)	Sonde 9up	1084551-1085414 (864 bp)	4122 bp
GI1 (innerhalb)	Sonde 10down	1336618-1337329 (712 bp)	1429 bp
GI1 (außerhalb)	Sonde 10up	1339782-1340602 (821 bp)	3286 bp
GI2 (außerhalb)	Sonde GI2-End	1350018-1350979 (961 bp)	1846 bp
GI2 (innerhalb)	Sonde GI3 Anf	1353142-1353978 (837 bp)	2194 bp
GI2 (innerhalb)	Sonde Int down	1490359-1491400 (1042 bp)	4160 bp
GI3 (innerhalb)	Sonde Int up	1493540-1494367 (828 bp)	4160 bp
GI3 (innerhalb)	Sonde 11down	1592880-1593574 (695 bp)	1533 bp
GI3 (außerhalb)	Sonde 11up	1595825-1596644 (820 bp)	4207 bp
GI6 (außerhalb)	Sonde VI down	4416688-4417547 (860 bp)	3911 bp
GI6 (innerhalb)	Sonde VI up	4418386-4419272 (787 bp)	3911 bp
GI6 (innerhalb)	Sonde 44down	4575874-4576671 (798 bp)	2628 bp
GI6 (außerhalb)	Sonde 44up	4577371-4578242 (872 bp)	5694 bp

Tabelle 5-8 Auflistung, der in Abbildung 5-26 eingezeichneten Sonden zum Testen der *B. petrii* Varianten g, k und f auf das Vorhandensein der genomischen Inseln GI1-GI3 und GI6 und zur Bestätigung der Grenzen der genomischen Inseln. Die Koordinaten bezeichnen die entsprechende Position auf dem *B. petrii* Genom.

Die einzelnen Southern Blots sind im Anhang 8.3 aufgeführt. Eine Übersicht über die Ergebnisse ist in Abbildung 5-26 schematisch dargestellt. Alle drei *B. petrii* Varianten zeigten im Southern Blot einen Verlust der genomischen Inseln GI1, GI3 und GI6, waren jedoch positiv für GI2. Die vorgeschlagenen Grenzen der genomischen Inseln konnten bestätigt werden. Auffällig ist die Excision von GI1, da hier nicht wie vermutet das 18 bp „direct repeat“ (DR) vom 3' Ende der tRNA^{Gly} zur homologen Rekombination dient, sondern das 14 bp lange DR von GI2, das in seiner Sequenz einen Basenaustausch (C-T) gegenüber dem 18 bp 3' Ende der tRNA^{Gly} aufweist. Southern Blot Analysen zu den genomischen Inseln GI0,

GI4, GI5 und GI7 ergaben für die drei *B. petrii* Varianten zusätzlich einen Verlust in GI5. Die genomischen Inseln GI0, GI4 und GI7 waren hingegen in den Varianten vorhanden (Karin Schmitt, persönliche Mitteilung).

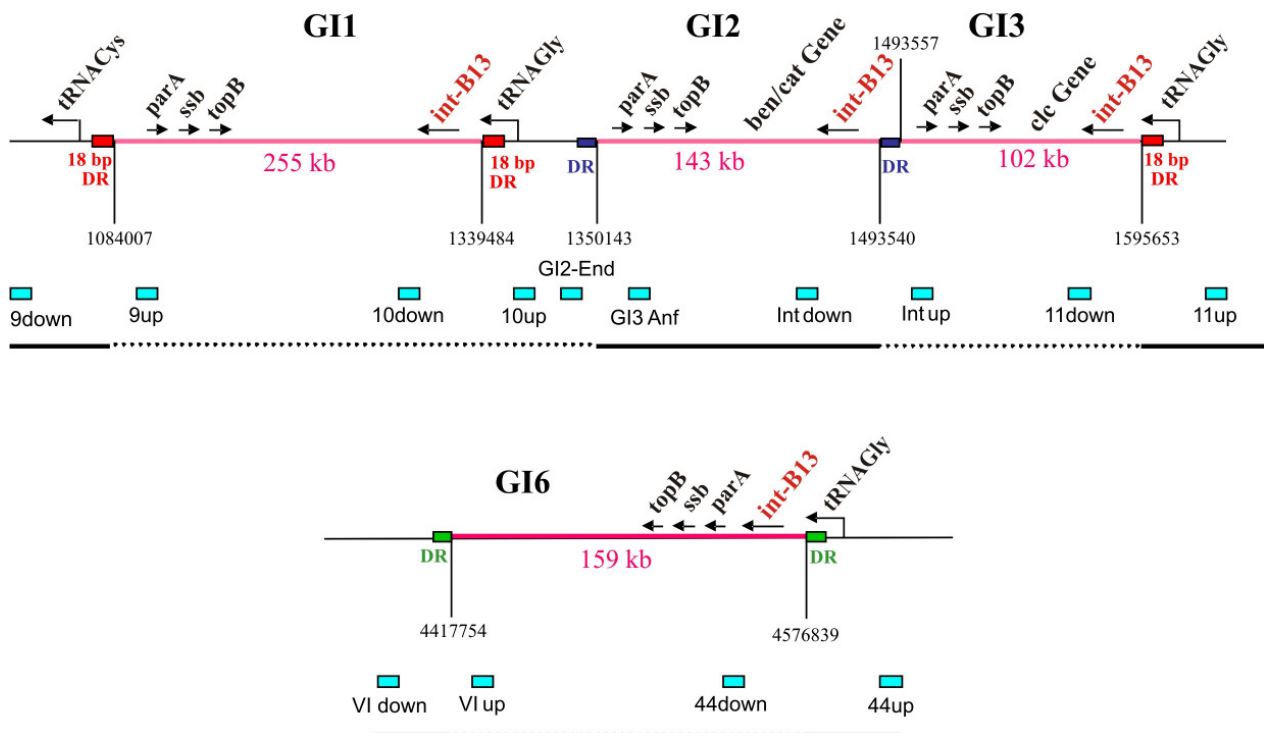


Abbildung 5-26 Grafische Zusammenfassung der Southern Blot Experimente zu den genomischen Inseln GI1, GI2, GI3 und GI6 von *B. petrii*. Blaue Kästchen markieren die ungefähre Lage der Southern Blot Sonde auf dem Wildtypchromosom. Die gestrichelte Linie zeigt an, in welchen Blots kein Variantensignal auftrat. Die Anordnung der genomischen Inseln ist nicht maßstabsgetreu wiedergegeben.

5.5.2 Tabellarische Übersicht über die ICEs von *B. petrii* DSM 12804

Die ICEs von *B. petrii* DSM 12804 weisen verschiedene Eigenschaften von genomischen Inseln auf, wie z.B. das Vorhandensein einer Integrase, welche die gerichtete Integration und z.T. Excision eines ringförmigen DNA Moleküls katalysieren kann, sowie das Auftreten von DRs als Ergebnis der Integration, welche an spezifischen Stellen im Bakteriengenom stattfindet, z.B. in tRNA Genen. Ferner liegen alle Inseln im entsprechenden Größenbereich von 10 – 502 kb (Gaillard *et al.*, 2006). GI0 weicht insofern von dieser Definition für genomische Inseln ab, da sie kein Integrasegen oder DRs aufweist. Für die Auflistung als genomische Insel sprechen aber der niedrige GC-Gehalt und das Vorhandensein von auffälligen Genclustern, z.B. für den Aromatenabbau (Lawrence & Roth, 1996; van der Meer & Sentschilo, 2003) (siehe Tabelle 5-9).

Vier der genomischen Inseln weisen zudem eine große Ähnlichkeit zum *clc*-Element von *Pseudomonas* sp. Strain B13 auf, da sie eine Int-B13 Integrase besitzen. GI3 hat die größte Ähnlichkeit zum *clc*-Element: Sie hat annähernd die gleiche Größe (Ravatn *et al.*, 1998a) und wie dieses trägt sie Gene für den Chlorobenzoat-Stoffwechsel (Frantz & Chakrabarty, 1987; Gaillard *et al.*, 2006). In Tabelle 5-9 sind die Hauptmerkmale der genomischen Inseln von *B. petrii* zusammengefasst.

Genomische Insel	Koordinaten (Größe)	Merkmale
GI0 (b_petrii_0187-0310)	201731..346691 (144961 bp)	Keine Integrase und DRs 2 Autotransporter (Bpet0190 und Bpet0193), Gene für kapsuläre Polysaccharide und deren Transport (Bpet0233-0240), Phthalat-Metabolismus (Bpet0248-0252), Protocatechuat-Metabolismus (Bpet0254-0260), Harnstoff-Metabolismus (Bpet0293 und Bpet0294), AquaporinZ (Bpet0309)
GI1 (b_petrii_1009-1275)	1084007..1339483 (255477 bp)	<i>clc</i> -ähnlich, Int-B13 Integrase, DR (18 bp vom 3' Ende der tRNA ^{Gly} : GAC TCG TCT CCC GCT CCA), verschiedene Enzym-Gencluster für den Metabolismus unbekannter aromatischer Komponenten (Bpet1131-1133, Bpet1151-1159, Bpet1209-1233, Bpet1238-1247, Bpet1257-1263), 3 „branched chain“ Aminosäuretransportsysteme (Bpet1127-1130, Bpet1165-1169, Bpet1184-1188), Arsenatreduktase (Bpet1022), putativer Zinktransporter (Bpet1017)
GI2 (b_petrii_1288-1437)	1350143..149359 (143397 bp)	<i>clc</i> -ähnlich, Int-B13 Integrase, DR (14 bp: CG TTT CCC GCT CCA), Benzoat- und Catechol-Stoffwechsel (Bpet1385-1402), Nitril-Stoffwechsel (Bpet1415 und Bpet1416), 2,4-dichlorphenol 6-monooxygenase (Bpet1331), 2 putative Chemotaxisproteine (Aerotaxis Signal Transduktion) (Bpet1369 und Bpet1420)
GI3 (b_petrii_1438-1545)	1493557..1595653 (102097 bp)	Größte Ähnlichkeit zum <i>clc</i> -Element, Int-B13 Integrase, DR (18 bp vom 3' Ende der tRNA ^{Gly} : GAC TCG TCT CCC GCT CCA), Chlorobenzoat- und Anthranilat-Stoffwechsel (Bpet1533-1543), Enzym-Gencluster für den Metabolismus einer unbekannt aromatischen Komponente (Bpet1512-1520)
GI4 (b_petrii_2166-2216)	2250672..2297721 (47050 bp)	Tn4371-ähnlich, Integrase, DR (TTT TTT), Metabolismus einer unbekannt aromatischen Komponente (Bpet2191-2195), konjugaler Transfer (Bpet2204-2215)
GI5 (b_petrii_3699-3770)	3912214..3979917 (67704 bp)	Plasmidähnlich, Integrase, DR (CGG GGC A), Typ IV Sekretionssystem (VirB Gene) (Bpet3701-3719), Glutathion S-Transferase Gene (Bpet3724-3727), Chlorocatechol-Stoffwechsel (2 Cluster) (Bpet3734-3752)

GI6 (b_petrii_4174-4316)	4417761..4576856 (159096 bp)	<i>clc</i> -ähnlich, Int-B13 Integrase, DR (18 bp vom 3' Ende der tRNA ^{Gly} : TTC CCA TCA CCC GCT CCA), Multi Drug Resistenzgene (Bpet4187-4189 und Bpet4228-4229), Eisentransportsystem (Bpet4207-4210), Typ III Restriktions-Modifikationssystem (Bpet4236 und Bpet4237)
GI7 (b_petrii_4544-4630)	4804478..4893272 (88795 bp)	Plasmidähnlich, Integrase, DR (3' Ende der tRNA ^{Phe} : GCC CCA GGC CAC CAT TC), Schwermetall-Resistenzsysteme (Bpet4570-4573, Bpet4584, Bpet4587-4594, Bpet4589, Bpet4606-4611), Arsen-Resistenz (Bpet4550 und Bpet4551), Gene für konjugalen Transfer (Bpet4615-4626)

Tabelle 5-9 Übersicht über die genomischen Inseln von *B. petrii* DSM 12804 (verändert nach (Gross *et al.*, 2008)). Gennummern beziehen sich auf die Sequenz in der GenDB Datenbank (<https://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/gendb-2.2/cgi-bin>)

5.5.3 Detektion von ringförmigen Intermediaten nach Excision der genomischen Inseln

Zur Definition ICEs gehört das gerichtete Ausschneiden mittels homologer Rekombination, was zur Entstehung eines zirkulären Intermediats führt (Burrus *et al.*, 2002). Die homologe Rekombination wird hierbei durch ein DR vermittelt, welches auf dem Plasmid die attP-Stelle bildet und auf dem Chromosom die attB-Stelle darstellt (att = attachment site) (siehe auch Einleitung). Eine zirkuläre Form des *clc*-Elements von *Pseudomonas* sp. Strain B13, mit einer zum 3' Ende der tRNA^{Gly} identischen 18 bp langen DNA-Sequenz als Teil der Rekombinationsstelle attP, konnte von Ravtan *et al.* beschrieben werden (Ravtan *et al.*, 1998b). Aber auch für andere genomische Inseln, wie PAPI-1 von *Pseudomonas aeruginosa* (Qiu *et al.*, 2006) oder die Pathogenitätsinseln II und III von *E. coli* 536 (Middendorf *et al.*, 2004), wurden zirkuläre Intermediate detektiert. In Abbildung 5-27 ist die mögliche Excision für GI6 schematisch dargestellt.

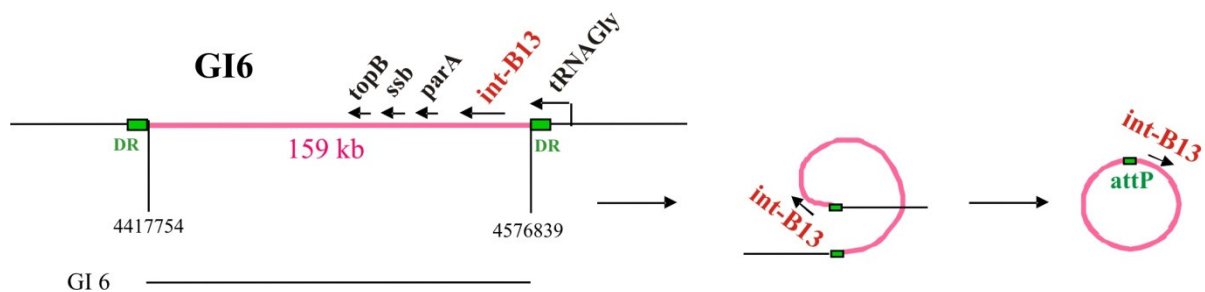


Abbildung 5-27 Excision von GI6 über homologe Rekombination am DR, die in einem ringförmigen Intermediat resultiert. Int-B13: Integrase, topB: DNA Topoisomerase III, ssb: single stranded DNA-binding Protein, parA: chromosome partitioning protein, DR: 3' Ende der tRNA^{Gly} (TTC CCA TCA CCC GCT CCA). Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

Um ein solches ringförmiges Intermediat zu detektieren, wurden PCRs mit Gesamt-DNA durchgeführt und die resultierenden PCR-Produkte anschließend sequenziert. Die verwendeten Oligonukleotide sind im Materialteil aufgeführt. Sie wurden so gewählt, dass sie in einem Plasmid von links und rechts in Richtung der attP Stelle amplifizieren. Für die genomischen Inseln GI1-GI3 sind verschiedene Excisionsmuster denkbar, da drei DRs aus den 18 bp vom 3' Ende der tRNA^{Gly} bestehen und zwei DRs sich davon nur in wenigen Basen unterscheiden (siehe Abbildung 5-28), so dass eine homologe Rekombination zwischen allen DRs stattfinden könnte.

Die verschiedenen Möglichkeiten zur Excision, die für GI1-GI3 getestet wurden, sind in Abbildung 5-28 als Linien unter dem entsprechenden Bereich des *B. petrii*-Chromosoms dargestellt. Zusätzlich zu den Inseln GI1-GI3 wurden auch die genomischen Inseln GI6 (Abbildung 5-27), GI4, GI5 und GI7 (Abbildung 5-29) auf Excision hin untersucht.

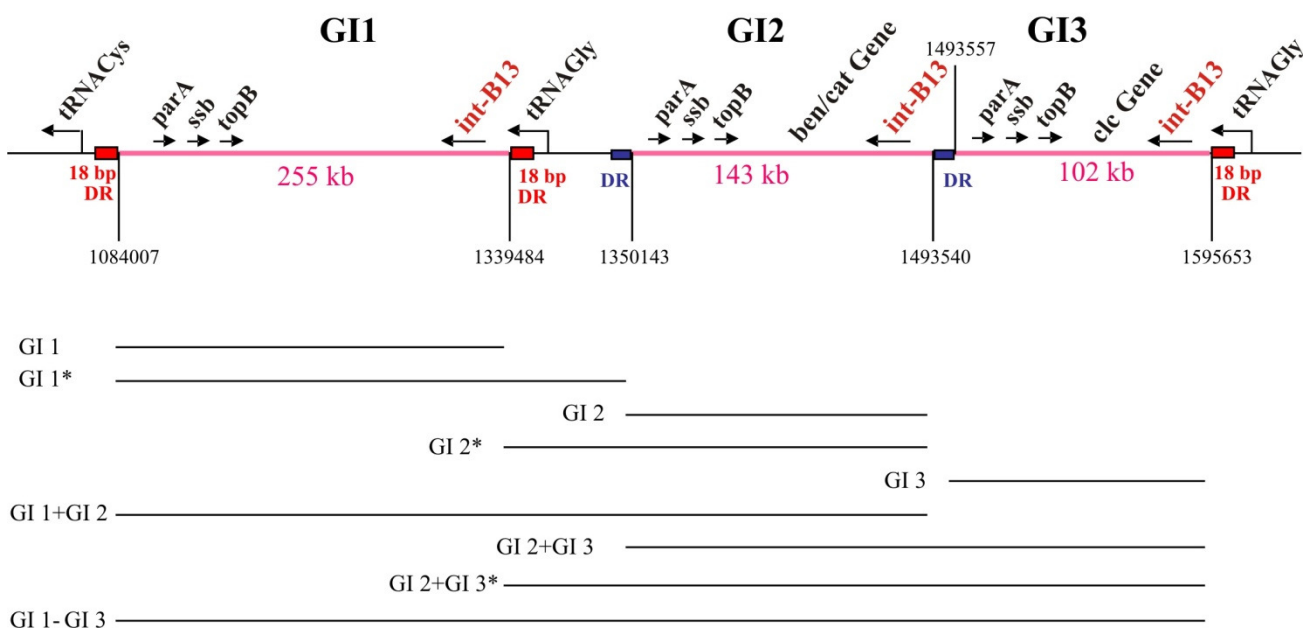
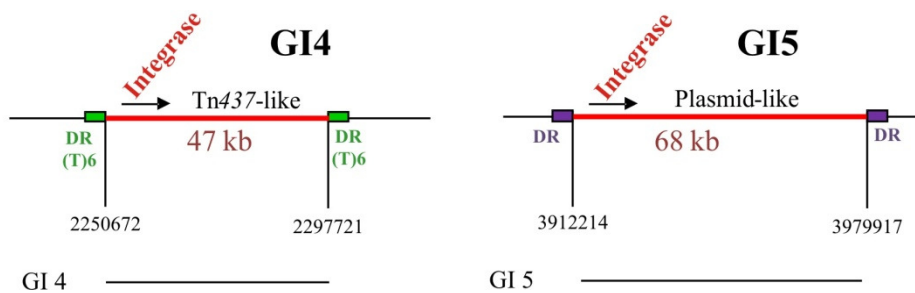


Abbildung 5-28 Übersicht über die möglichen Excisionsmuster der genomischen Inseln GI1-GI3. Int-B13: Integrase, topB: DNA Topoisomerase III, ssb: single stranded DNA-binding protein, parA: chromosome partitioning protein, 18 bp DR: 3' Ende der tRNA^{Gly} (GAC TCG TCT CCC GCT CCA), DR: 14 bp „direct repeat“ (CG TTT CCC GCT CCA). Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

a)



b)

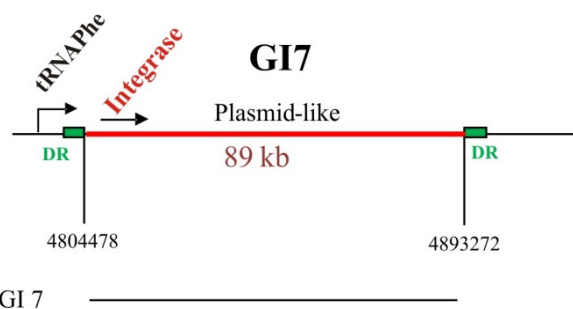


Abbildung 5-29 Excisionsschemata der genomischen Inseln a) GI4, GI5 und b) GI7. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

Für die Abschnitte GI1, GI1*, GI1+GI2, GI1-GI3, GI4, GI5 und GI7 wurden zusätzlich Nested-PCRs gefahren, um unspezifische PCR-Produkte zu reduzieren. Wurde auch nach der Nested-PCR kein spezifisches PCR-Produkt amplifiziert, wurde die Bildung eines ringförmigen Intermediats ausgeschlossen, was auf GI1, GI1+GI2 und GI5 zutraf. Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten stromaufwärts vom Integrase-Gen der genomischen Inseln GI1-GI3 wurden verschiedene Oligonukleotid-Kombinationen getestet. So wurden zunächst für die Abschnitte GI2, GI2*, GI3, GI2+GI3, GI2+GI3* und GI1-GI3 passende PCR-Produkte erhalten, die durch die Sequenzierung aber nicht eindeutig bestätigt werden konnten. Mit neuen Oligonukleotid-kombinationen konnten für die Abschnitte GI3, GI2+GI3 und GI1-GI3 PCR-Produkte mit der richtigen Sequenz amplifiziert werden. Für GI2 gelang dies erst, nachdem Gesamt-DNA der *B. petrii* Variante k, die laut Southern Blot Analysen in diesem Bereich nur noch die genomische Insel GI2 besitzt, verwendet wurde. Für die Abschnitte GI2* und GI2+GI3* konnten auch mit neuen Oligonukleotid-Kombinationen keine PCR-Produkte mehr amplifiziert werden, weshalb hier eine Ringbildung ausgeschlossen wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5-10 zusammengefasst.

	Oligonukleotid-Kombination	Größe des erwarteten PCR-Produkts	PCR-Amplifikation	Sequenzierung zur Bestätigung der Ringbildung
GI1	GI 1 outfw / GI 1 outREV Nested Primer	1331 bp	-	-
GI1*	GI 1 outfw* / GI 1 outREV Nested Primer	677 bp	+	+
GI2	GI2 outfw(neu) / GI2 out REV	624 bp	+	+
GI2*	GI2 outfw / trna10 REV	902 bp	+	-
GI3	GI3 outREV / GI3 outfw(neu)	967 bp	+	+
GI1+GI2	GI2 outfw/ GI 1 outREV Nested Primer	1175 bp	-	-
GI2+GI3	GI3 outfw(neu) / GI2 outREV	578 bp	+	+
GI2+GI3*	GI3 outfw / trna10 REV	494 bp	+	-

GI1-GI3	GI3 outfw(neu)/ GI1 outREV Nested Primer	720 bp	+	+
GI4	GI4 AnfRev/ GI4 EndFw Nested Primer	384 bp	+	+
GI5	GI5 AnfRev/ GI5 EndFw Nested Primer	571 bp	-	-
GI6	GI6 outfw / GI6 outREV	850 bp	+	+
GI7	GI7 AnfRev/ GI7EndFw Nested Primer	384 bp	+	+

Tabelle 5-10 Detektion ringförmiger Intermediate mittels PCR Analysen und Sequenzierung. + : PCR-Produkt in der richtigen Größenordnung und korrekte Sequenzierung. - : kein PCR-Produkt erhalten oder erhaltene Sequenz stimmt nicht mit der erwarteten überein.

5.5.4 Sequenzvergleiche der Int-B13 Integrasen der genomischen Inseln GI1, GI2, GI3 und GI6 mit der *Pseudomonas* sp. Strain B13 Integrase des *clc*-Elements

Die Int-B13 Integrase aus *Pseudomonas* sp. Strain B13 ist ein 657 Aminosäuren großes Protein der P4 Integrase Familie mit einem Molekulargewicht von 74 kDa (Ravatn *et al.*, 1998b). Die Größen der einzelnen Int-B13 Integrasen sind in Tabelle 5-11 aufgelistet. Die Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte wurden mittels einer PepStats Analyse ermittelt (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/w2h/w2hdkfz/>)

	<i>Pseudomonas</i> sp. Strain B13	<i>B. petrii</i> GI1	<i>B. petrii</i> GI2	<i>B. petrii</i> GI3	<i>B. petrii</i> GI6
Leserahmen des <i>int</i> -B13 Gens	1971 bp	1923 bp	1833 bp	1971 bp	1926 bp
MG von Int-B13	74 kDa	72 kDa	69 kDa	74 kDa	72,5 kDa
Iso- elektrischer Punkt	10,39	10,28	10,48	10,39	10,36

Tabelle 5-11 Größen der *int*-B13 Gene, Molekulargewichte (MG) und isoelektrische Punkte der Int-B13 Integrasen von *Pseudomonas* sp. Strain B13 und *B. petrii* DSM 12804.

Zum Vergleich der Integrasesequenzen aus GI1, GI2, GI3 und GI6 von *B. petrii* DSM 12804 mit der *Pseudomonas* sp. Int-B13 Integrase auf Nukleotid- und Aminosäureebene wurden unterschiedliche Alignments dieser Sequenzen durchgeführt. Das Ausmaß der Übereinstimmung wurde mit dem GAP-Programm ermittelt (Altschul *et al.*, 1997).

Die Analysen zeigen, dass die Integrasesequenz aus GI3 sowohl auf Nukleotid- als auch auf Proteinebene zu 100 % mit der Int-B13-Sequenz aus dem *clc*-Element von *Pseudomonas* sp. Strain B13 übereinstimmt. Aber auch die Integrasesequenz aus GI1 weist mit etwa 86 % Ähnlichkeit auf Nukleotidebene bzw. 89 % Ähnlichkeit auf Aminosäureebene eine deutliche

Übereinstimmung zur Int-B13-Sequenz aus dem *clc*-Element auf. Die Übereinstimmungen der einzelnen Integrasesequenzen auf Nukleotid- und Aminosäureebene sind in Tabelle 5-12 dargestellt.

Genomische Insel	Nukleotidsequenz (Prozentuale Ähnlichkeit)	Aminosäuresequenz (Prozentuale Ähnlichkeit)
GI1	85.98 %	89.2 %
GI2	64.7 %	68 %
GI3 (<i>clc</i>)*	100 %	100 %
GI6	60.7 %	61.9 %

Tabelle 5-12 Prozentuale Ähnlichkeiten der Int-B13 Integrasen aus GI1, GI2, GI3 und GI6 von *B. petrii* DSM 12804 Im Vergleich mit Int-B13 aus dem *clc*-Element von *Pseudomonas* sp. Strain B13

Ein CLUSTAL-Alignment (<http://genus.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/w2h/w2hdkfz/>) der Aminosäuresequenzen von Int-B13 aus GI1, GI2, GI3 und GI6 von *B. petrii* DSM 12804 und aus *clc* von *Pseudomonas* sp. Strain B13 ist in Abbildung 5-30 aufgeführt. Dieses zeigt, dass der N-terminale Bereich der Int-B13 Integrasen hoch konserviert ist. Hier finden sich auch die vier konservierten Aminosäurereste, die spezifisch für die Rekombinasen der Integrase-Familie sind und vermutlich für die katalytische Funktion der Integrasen verantwortlich sind (Pargellis *et al.*, 1988): Arg-261, His-365, Arg-368 und Tyr-401 (Positionen gelten für Int-B13 aus *Pseudomonas* sp. Strain B13) (Ravatn *et al.*, 1998b).

Der etwa 220 Aminosäuren lange C-terminale Teil ist weniger konserviert. Dieser Bereich fehlt in anderen phagenähnlichen Integrasen und zeigt Homologie zu einer putativen Transposase von *Pseudomonas* sp. Strain B4 (emb/CAB93963) (Larbig *et al.*, 2002).

	1				50
INT-B13_1275.PEP	~~~~~	~~~~MALSDL	TVRQARTPGK	RYTISDNDCL	GLMVSAAAGGK
INT-B13_1437.PEP	~~~~~	~~~~MALSDM	AAFNAKATPGK	AVTISIDNGL	SLAVSPTGGK
INT-B13_1545.PEP	MTSIGPKSLL	RSLEMALSDL	IVRQAKTPGK	RYTLYDNDCL	SIMVSAAGGK
INT-B13_4316.PEP	~~~~~	~~~~MLSDL	QVRQAKVPGK	AVSLVDFDGL	YFYISATGFK
Int-B13_Pseudomonas.pep	MTSIGPKSLL	RSLEMALSDL	IVRQAKTPGK	RYTLYDNDCL	SIMVSAAGGK
	51				100
INT-B13_1275.PEP	SWQFRYYRLG	KQKRMSLGGY	PALSLREARA	ERDKAQALLA	RGIDPQVERD
INT-B13_1437.PEP	TWHYRYYNAG	KQKRMSLQTY	PEVGLREARG	LRDAARALLA	KGINPFRADRK
INT-B13_1545.PEP	SMFRYSWLG	KQKRMLGGY	PALSLREARA	ERDKAQALLA	RGIDPQIERD
INT-B13_4316.PEP	AWHFRFTWGG	KRERMSFCGY	PALSLKDARN	LRDEARAMLA	KGINPHSERK
Int-B13_Pseudomonas.pep	SMFRYSWLG	KQKRMLGGY	PALSLREARA	ERDKAQALLA	RGIDPQIERD
	101				150
INT-B13_1275.PEP	QRRHAVRLAG	EYTFKTVFDA	WVEHRRKELK	.BGRQSTMSC	TIRIFNKDVL
INT-B13_1437.PEP	QKRQAVRLAD	EHTFQAVFDK	WVEHRRLVLK	.BGRQSTLTQ	ILRIFKKDIL
INT-B13_1545.PEP	QRRHAAKLAG	EYTFKTVFDA	WVEHRRKELK	.BGRQSTLSC	TIRIFNKDVL
INT-B13_4316.PEP	RKRHAIVLAG	EHTFQAIYDK	WLAHRSLSLE	NEGROSTPKQ	IQRVFAKDVV
Int-B13_Pseudomonas.pep	QRRHAAKLAG	EYTFKTVFDA	WVEHRRKELK	.BGRQSTLSC	TIRIFNKDVL
	151				200
INT-B13_1275.PEP	PTLGKMSIYD	IRRPOLLGVL	AALEKPKAFT	TAEKVRTWFN	QLFRYALVIA
INT-B13_1437.PEP	PTLGKRPVVE	IQRPDLEVV	AKTERRKALS	VAEKVRTWFR	QMFYALITV
INT-B13_1545.PEP	PTLGKMSIYD	IRRPOLLGVL	AALEKPKAFT	TAEKVRTWFN	QMFYALVIA
INT-B13_4316.PEP	PTLRHLTIYD	VTFAHLIDII	GRVEKRGSLG	VAEKLRWFSS	QLFTYASVVV
Int-B13_Pseudomonas.pep	PTLGKMSIYD	IRRPOLLGVL	AALEKPKAFT	TAEKVRTWFN	QMFYALVIA

	201				250
INT-B13_1275.PEP	EGLEVNPAAD	LDVVAEPKPP	VTHNPYLHLF	EMPEFLQKLR	LYNPRGWOTC
INT-B13_1437.PEP	PGLPQNPAFD	LDVVALPMP	VRHNPFLRMD	ELPAMLSRLR	KYHGR.LQTC
INT-B13_1545.PEP	EGLEVNPAAD	LDVVAEPKPP	VAHNPYLHLF	ELPEFLQKLR	RYNPRGWOTC
INT-B13_4316.PEP	PNMGDNPAKD	LDVVAMP LFP	VENNPFLRMP	ELPAMLQTLR	KYSGR.LINT
Int-B13_Pseudomonas.pep	EGLEVNPAAD	LDVVAEPKPP	VAHNPYLHLF	ELPEFLQKLR	RYNPRGWOTC
	251				300
INT-B13_1275.PEP	LGLRLLFLTG	VRTGELRLAE	PEQFDLDRGL	WIIPPQVVKQ	LQDEMRRKAGK
INT-B13_1437.PEP	LGLRLLFLTG	VRTGELRLAT	PDQFHLDQGL	WIIPPEVVVKQ	LQLEMRRKEGK
INT-B13_1545.PEP	LGVRLFLFLTG	VRTGELRLAE	PEQFDLDRGF	WIIPPEVVVKQ	LQDEMRRKAGK
INT-B13_4316.PEP	LGLRLLLLTG	VRTGELRYAT	PDQFDLERGL	WIIPVVR LKQ	RKQLTKKKRQ
Int-B13_Pseudomonas.pep	LGVRLFLFLTG	VRTGELRLAE	PEQFDLDRGF	WIIPPEVVVKQ	LQDEMRRKAGK
		*			
	301				350
INT-B13_1275.PEP	RPQDVPPYIV	PLSLQAI EIV	RYLLGVMRPA	QRYLLSHRSE	LKKRISSENTL
INT-B13_1437.PEP	RPQDVPPYIV	PLSAQAMEIV	QHMLEQFKPA	QRYLFSHGWD	LKKRISSENTL
INT-B13_1545.PEP	RPQDVPPYIV	PLSLQAI EIV	RYLLGVMRPA	QRYLLSHRSE	LKKRISSENTL
INT-B13_4316.PEP	RFADIPPPYIV	PLSLQAQEVV	RHLLGNLKPA	QVYLLPGDWC	LKNPLSENTL
Int-B13_Pseudomonas.pep	RPQDVPPYIV	PLSLQAI EIV	RYLLGVMRPA	QRYLLSHRSE	LKKRISSENTL
	351				400
INT-B13_1275.PEP	NKAVQLMGYE	GRLTGHGIRG	TISTALNEIG	YFKI WVDAQL	SHSDPNKVSS
INT-B13_1437.PEP	NQALKRMGYT	DQLTGHGIRA	TISTALNEIG	YFKVWVDAQL	SHSDPKVSA
INT-B13_1545.PEP	NKAVQLMGYE	GRLTGHGIRG	TISTALNEIG	YFKI WVDAQL	SHSDPNKVSS
INT-B13_4316.PEP	NGALKRMGYE	DQLTGHGVRA	TISTALNELG	YFPKWVDAQL	SHADPDRI SA
Int-B13_Pseudomonas.pep	NKAVQLMGYE	GRLTGHGIRG	TISTALNEIG	YFKI WVDAQL	SHSDPNKVSS
		*	*		
	401				450
INT-B13_1275.PEP	AYNHAKYVEE	RRRMMQDWAD	RDLLEQGEV	EAASAHLTIR	IDGVPAMA.E
INT-B13_1437.PEP	AYNHA EYVQ	RRRMMQDWAD	RDLDFEQHOV	EAASMHLTVH	LEGVPEVPDE
INT-B13_1545.PEP	AYNHAKYVEE	RRRMMQDWAD	RDLLEQGEV	QAASAHLTIR	IDGVPAMA.E
INT-B13_4316.PEP	TYNHA EYVQ	RRVMMQDWAD	RDLDFEQNOV	EVASTHLTIT	LQGLPTIAGO
Int-B13_Pseudomonas.pep	AYNHAKYVEE	RRRMMQDWAD	RDLLEQGEV	QAASAHLTIR	IDGVPAMA.E
		*			
	451				500
INT-B13_1275.PEP	VEEAVDALT	MAEPTTPCVV	PVVATPIVVT	FSSGGITFOR	LSQVPPPPH
INT-B13_1437.PEP	VPEGAEAAIP	PAPIVIVSKP	...GAGMPTL	PDS...VHR	LSAITGF..R
INT-B13_1545.PEP	VEEAVDVAPT	VAEPGVSGSP	PVAATPIVVT	PNSGGITFOR	LSQVPPPPAH
INT-B13_4316.PEP	AAQPPALNP	NAPQLIVAPA	F...DAPAVP	.AS...VYR	LSAVHLE..E
Int-B13_Pseudomonas.pep	VEEAVDVAPT	VAEPGVSGSP	PVAATPIVVT	PNSGGITFOR	LSQVPPPPAH
	501				550
INT-B13_1275.PEP	APESEVSAIQ	REREEMLTII	ESPSNLPVPI	FGKLAGSKD	QINRELKAGK
INT-B13_1437.PEP	TP.FVFLSESQ	REQLERLDIF	NSPHLISAAD	FAKMAGKSRR	WISYEISGRK
INT-B13_1545.PEP	APESEVSAIQ	REREEMLAMY	ESPNNLPVAL	FGKLAGSKD	QINRELKAGK
INT-B13_4316.PEP	YARETLSEVQ	REELQLLEIF	EASHNLSVAD	YAKLVGKSRR	WITYEIQAGN
Int-B13_Pseudomonas.pep	APESEVSAIQ	REREEMLAMY	ESPNNLPVAL	FGKLAGSKD	QINRELKAGK
	551				600
INT-B13_1275.PEP	LLSISLGNRG	QRVPDWQLVP	LKHKLAVL	NQCP.HADSW	ELYRMLTQPH
INT-B13_1437.PEP	MLALSGLNLR	QRVPDWHFPT	LKHKLIDAVL	KFAR.EADSW	EIYRALSQPH
INT-B13_1545.PEP	LLSISLGNRG	QRVPDWQLVP	LKRRLA QALM	NQCP.HVDSW	ALYRLITKPH
INT-B13_4316.PEP	LLSIHLGHRG	QRVPDWQLDP	IKRKLIDAVL	KLVPRGIDTW	HIYHALLRPY
Int-B13_Pseudomonas.pep	LLSISLGNRG	QRVPDWQLVP	LKRRLA QALM	NQCP.HVDSW	ALYRLITKPH
	601				650
INT-B13_1275.PEP	PDLGDRG AID	VVTPANLGVV	VQVIAGGQQA	VSPPLSISED	VROSVRRLLD
INT-B13_1437.PEP	DDFKGLAPVD	AVTAENLHEV	VMAVC...F	SLK...D..	SQPMRLA~~
INT-B13_1545.PEP	SNLGNRAAID	VVTPTNVGKV	LQAVTPYKEF	ERSSTDETPQ	FSEFVROLQR
INT-B13_4316.PEP	DALGKCPVIE	AVDPTNLHLA	ARLVAAHTIE	TDELAEQSEA	SPVLARCTVE
Int-B13_Pseudomonas.pep	SNLGNRAAID	VVTPTNVGKV	LQAVTPYKEF	ERSSTDETPQ	FSEFVROLQR
	651				668
INT-B13_1275.PEP	SAVVAEGA~~	~~~~~			
INT-B13_1437.PEP	~~~~~	~~~~~			
INT-B13_1545.PEP	HVNAL EEP C	~~~~~			
INT-B13_4316.PEP	RLVKTAMLVD	MPEDPVAR			
Int-B13_Pseudomonas.pep	HVNAL EEP C	~~~~~			

Abbildung 5-30 CLUSTAL-Alignment der Aminosäuresequenzen der Int-B13 Proteine von *Pseudomonas* sp. Strain B13 und *B. petrii* DSM 12804. Die vier konservierten Aminosäurereste, die vermutlich für die katalytische Funktion der Integrasen verantwortlich sind (Pargellis *et al.*, 1988), sind mit * markiert. Die GenBank Accession No. für die *Pseudomonas* sp. Strain B13 Integrasesequenz ist AJ004950. Die *B. petrii* Integrasesequenzen entstammen der GenDB Datenbank (<https://www.unibielefeld.de/groups/brf/software/gendb>). Farbcode: blau: alle Aminosäuren einer Spalte sind identisch,

rot: mehr als die Hälfte der Aminosäuren einer Spalte sind identisch oder gehören zu einer starken Ähnlichkeitsgruppe, gelb: mehr als die Hälfte der Aminosäuren einer Spalte gehören zu einer schwachen Ähnlichkeitsgruppe.

5.5.5 Beschreibung der Integrationsstelle von GI3 in *B. petrii* DSM 12804

Die Excisionsanalysen mittels PCR hatten gezeigt, dass differentielle Verluste der genomischen Inseln in *B. petrii* möglich sind. Um den Integrationsort der genomischen Inseln GI1-GI3 zu untersuchen, wurde angenommen, dass alle drei Inseln ausgeschnitten wären. Dann wurde eine Nested-PCR mit chromosomaler DNA durchgeführt, wobei die Oligonukleotide so gewählt wurden, dass sie stromabwärts der tRNA^{Cys} und stromaufwärts der tRNA^{Gly}, welche die GI3 begrenzt, binden (Abbildung 5-31).

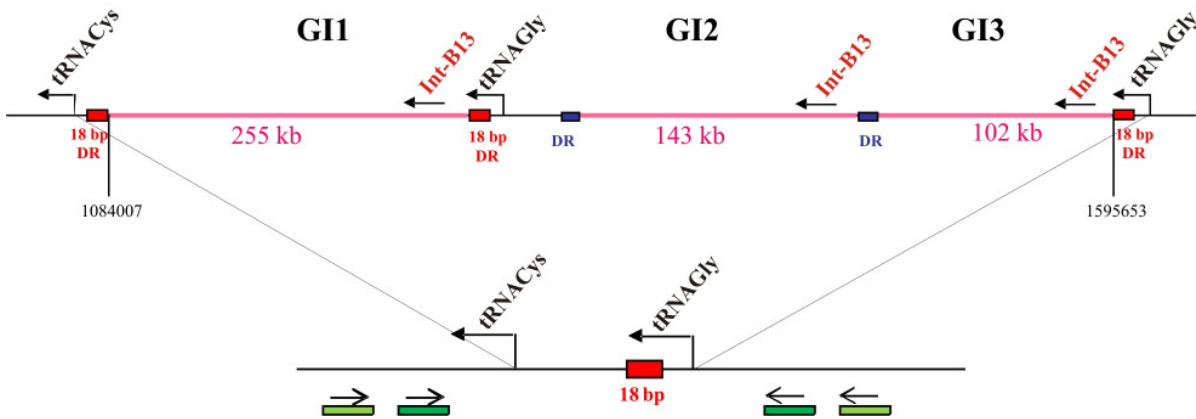


Abbildung 5-31 Schematische Darstellung des *B. petrii* DSM 12804-Chromosoms unter der Annahme eines Verlustes der genomischen Inseln GI1-GI3. Die Lage und Orientierung der Oligonukleotide für die Nested-PCR sind im unteren Teil als grüne Balken mit Pfeil dargestellt. Hellgrün: Extern fw/Extern rev, dunkelgrün: 18bpKon fw/18bpKon Rev.

Mit dem ersten Oligonukleotidpaar, Extern fw und Extern rev, sollte ein 761 bp großes Fragment amplifiziert werden, welches anschließend in eine zweite PCR-Reaktion eingesetzt wurde. Hierfür wurden die Oligonukleotide 18bpKon fw und 18bpKon Rev verwendet, mit denen ein 597 bp großes PCR-Produkt erhalten wurde, welches anschließend sequenziert wurde. Ein im Gel sichtbares PCR-Produkt wurde immer erst im zweiten Teil der Nested-PCR erhalten (Abbildung 5-32).

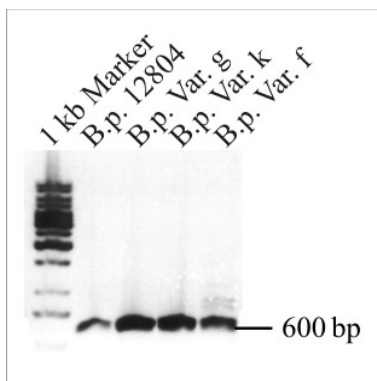


Abbildung 5-32 Nested-PCR mit der Oligonukleotid-Kombination 18bpKon fw und 18bpKon Rev. Auftrag von je 5 µl PCR-Produkt auf 1 % Agarose. Marker: Gene Ruler™ 1 kb DNA Leiter (Abschnitt 3.8). Von links nach rechts sind die Ansätze mit chromosomaler DNA von *B. petrii* DSM 12804, Variante g, Variante k und Variante f aufgetragen.

Die Sequenz beinhaltet wie erwartet die tRNA^{Cys} und die tRNA^{Gly} sowie ein IR 40 bp stromabwärts von tRNA^{Gly}, welches eine Haarnadelstruktur bildet und wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle für die Integration spielt, da der Einbau des *clc*-Elements bisher häufiger in solche tRNAs beobachtet wurde, denen eine Haarnadelstruktur folgte (van der Meer *et al.*, 2001). Strukturell entspricht dieser Integrationsbereich dem für *Ralstonia* sp. Strain S11 beschriebenen Integrationsbereich für das *clc*-Element, nur dass dort das IR bereits nach 4 bp auf die tRNA^{Gly} folgt (Ravatt *et al.*, 1998b). Die Sequenz der Integrationsstelle von *B. petrii* ist in Abbildung 5-33 wiedergegeben.

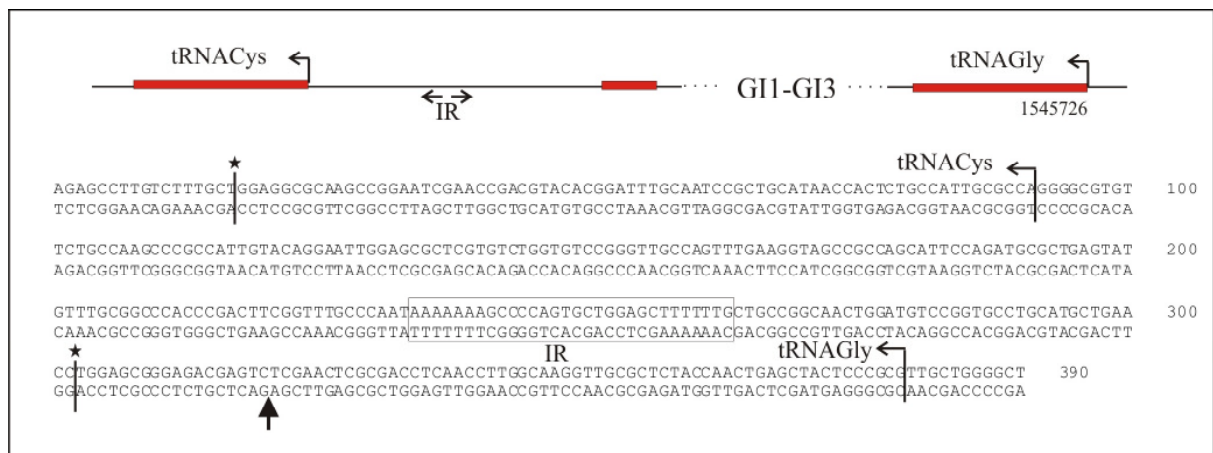


Abbildung 5-33 Schematischer Aufbau (oben) und Sequenz der Integrationsstelle (unten). Die Genomsequenz von *B. petrii*, links und rechts der genomischen Inseln GI1-GI3, entspricht zu 100 % dem sequenzierten PCR-Produkt. Die tRNAs und das 18 bp DR stromabwärts der GI1 sind als rote Balken dargestellt. Der Pfeil markiert den Ort der Integration in der Sequenz. IR: „inverted repeat“.

5.5.6 Untersuchungen zur Stabilität der genomischen Insel GI3

Sowohl die Ergebnisse der Nested-PCR zur Untersuchung der Integrationsstelle als auch die Untersuchungen zur differentiellen Excision haben gezeigt, dass ein Anteil der *B. petrii* DSM 12804 Wildtyp Population die Inseln GI1-GI3 verloren hat. Um die Stabilität der Insel GI3 zu untersuchen, wurde eine Tetracyclin-Resistenzkassette als Selektionsmarker eingebracht. Mit dieser Insertionsmutante wurden dann Wachstumsversuche durchgeführt, und in regelmäßigen Abständen wurde auf das Vorhandensein der genomischen Insel getestet. Die Bakterien, die die genomische Insel verloren haben, sollten nur noch auf LB-Platten wachsen, nicht aber auf LB_{tet12,5}-Platten.

5.5.6.1 Herstellung der Insertionsmutante

Das Prinzip der Herstellung einer Insertionsmutante über homologe Rekombination ist unter Abschnitt 4.1.5 erläutert. Ein Schema zur Integration einer Tetracyclin-Resistenzkassette in die genomische Insel GI3 ist in Abbildung 5-34 dargestellt.

Zunächst wurden die Homologiebereiche I1 und I2 amplifiziert. Mit den Oligonukleotiden Ins1-Not und Ins1-Bcu wurde das 417 bp große Fragment I1 mit den Restriktionsstellen *NotI* und *BcuI* amplifiziert. Für I2 wurden die Oligonukleotide Ins2-Eco und Ins2-Xho verwendet, welche die Restriktionsstellen *EcoRI* und *XhoI* in das 400 bp lange Fragment einbringen. Nach den entsprechenden Restriktionsverdauen wurden die Homologiebereiche in zwei

Schritten in den entsprechend geschnittenen Vektor pKS::tet kloniert, welcher für die Herstellung der Bvg-Mutanten hergestellt worden war und die Tetracyclin-Resistenzkassette aus pBR322 enthält. Dies resultierte zunächst in dem Vektor pKS::tet I2 und nach dem Einbringen des zweiten Homologiebereichs in pKS::I1 tet I2. Die Transformation in *E. coli* DH5 α wurde mittels Elektroporation (Abschnitt 4.1.4.4) durchgeführt und die erhaltenen Transformanten wurden über PCR mit den Primerkombinationen tet1/T3 für I2 (788 bp) und tet2/ T7 für I1 (814 bp) getestet.

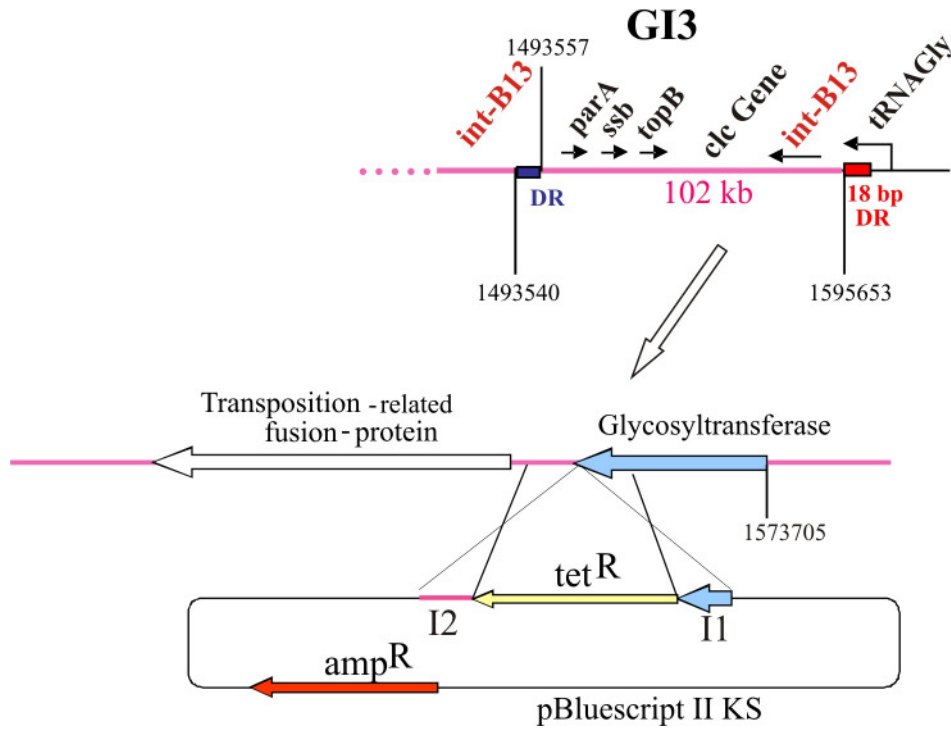


Abbildung 5-34 Schema zur Konstruktion einer Tetracyclin-Insertionsmutante. Die Resistenzkassette tet^R wird über homologe Rekombination in das *B. petrii* Genom integriert. Die Rekombinationsereignisse (siehe Abschnitt 4.1.5) werden hierbei durch die Bereiche I1 und I2 vermittelt.

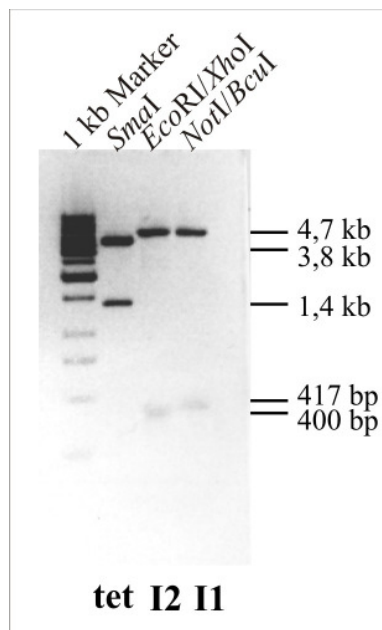


Abbildung 5-35 Restriktionskontrolle des Vektorkonstrukts pKS::I1 tet I2. Auftrag von je 10 μ l Restriktionsansatz auf 1 % Agarose. Marker: Gene Ruler™ 1 kb DNA Leiter (Abschnitt 3.8). Bei dem *Sma*I-Verdau wurde die 1391 bp große Tet^R-Kassette wieder ausgeschnitten. Der *Eco*RI/*Xho*I-Verdau zeigt das 400 bp große I2-Fragment, der *Not*I/*Bcu*I-Verdau zeigt das 417 bp große I1-Fragment.

Des weiteren wurde eine Restriktionskontrolle durchgeführt, die in Abbildung 5-35 wiedergegeben ist. Da die Kontrollen positiv ausfielen, wurde mit dem erhaltenen Vektorkonstrukt weiter gearbeitet. Dieses wurde über Elektroporation in kompetente *B. petrii* DSM 12804 Zellen eingebracht. Da nur Transformanten gesucht waren, die nach einem zweiten Rekombinationsschritt den Vektoranteil wieder verloren hatten, wurde ein PCR-Screen für beide Seiten der Tet^R-Kassette mit chromosomalen und Tet^R-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Hierbei konnten zwei Klone (5) und (20) detektiert werden, mit denen als weitere Kontrolle ein Southern Blot durchgeführt wurde (siehe Abbildung 5-36). Als Kontrollen wurden Wildtyp-DNA und Vektor-DNA eingesetzt.

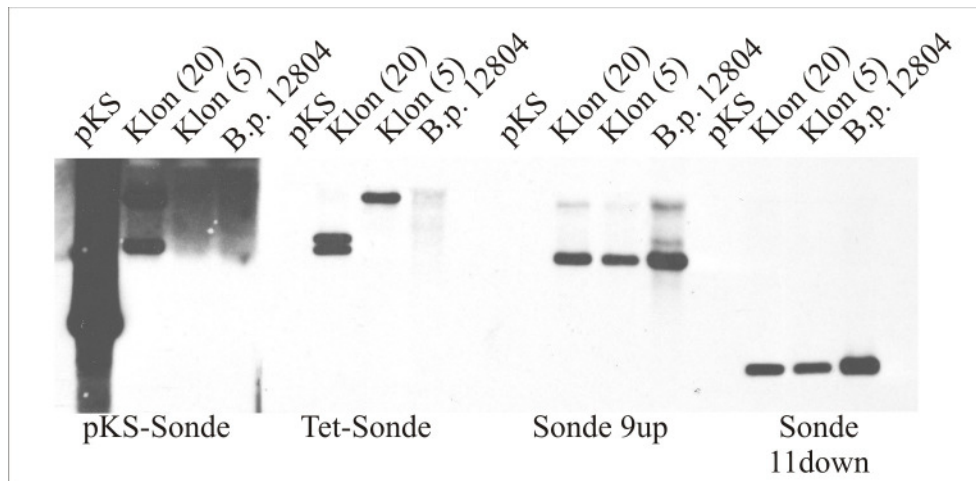


Abbildung 5-36 Southern Blot Kontrolle der *B. petrii* GI3::tet^R Insertionsmutante. Aufgetragen wurde Vektor-DNA (pKS), sowie chromosomale DNA der *B. petrii* GI3::tet^R Klone (5) und (20) und des Wildtypstammes *B. petrii* DSM 12804. Um zu untersuchen ob zwei Rekombinationsereignisse stattgefunden haben, d.h. der Vektoranteil wieder aus dem Chromosom entfernt wurde, wurde eine 1054 bp große pKS-Sonde verwendet. Als Tet-Sonde wurde die komplette Tet^R-Kassette eingesetzt. Die Sonden 9up und 11down sind unter 5.5.1 beschrieben.

Beide Klone zeigen mit den Sonden 9up und 11down (siehe Abbildung 5-36) ein wildtypisches Signal, d.h. die genomischen Inseln sind noch vorhanden. Klon (20) zeigt mit der pKS-Sonde und der Tet-Sonde jeweils zwei Banden, so dass man davon ausgehen kann, dass hier das komplette Vektorkonstrukt doppelt eingebaut ist. Nur Klon (5) zeigt ein einzelnes Signal für die Tet^R-Kassette und kein Vektorsignal mehr. Um die korrekte Eingliederung der Tet^R-Kassette ins Bakterienchromosom zu kontrollieren, wurden die entsprechenden Übergänge in *B. petrii* GI3::tet^R (5) sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte den korrekten Einbau (Daten nicht gezeigt).

5.5.6.2 Wachstumsversuche zum Stabilitätstest

Für die Wachstumsversuche wurden 20 ml LB-Medium 1:100 mit einer Übernachtskultur von *B. petrii* GI3::tet^R, welche in LB_{tet12,5} bei 37°C gezogen wurde, beimpft. Von dieser Kultur wurde zu Beginn eine Probe genommen, diese seriell verdünnt und geeignete Verdünnungen sowohl auf LB als auch auf LB_{tet12,5} ausplattiert. Dann wurde die Kultur 24 h bei 37°C inkubiert und erneut im Verhältnis 1:100 in LB-Medium verdünnt. Sowohl vor als auch nach der Verdünnung wurde eine Probe zur seriellen Verdünnung entnommen und davon wiederum geeignete Verdünnungsstufen auf LB und auf LB_{tet12,5} ausplattiert. Die verdünnte

Kultur wurde nun wieder für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Probennahme wurde entsprechend weitergeführt, bis der Anteil der tetracyclinresistenten Bakterien, d.h. also derjenigen, welche die Insel GI3 noch besaßen, gegen null ging. Anschließend wurde über die Gleichung:

Keimzahl der Selektion ($LB_{tet12,5}$) / Gesamtkeimzahl (LB) x 100

der Anteil der tetracyclinresistenten Bakterien ermittelt und daraus wiederum der Anteil der Varianten. Die Wachstumskonstante λ wurde mit der Gleichung

$$N_t = N_0 \times e^{\lambda t}$$

näherungsweise bestimmt. Für die Verdoppelungszeit ergab sich:

$$dt = \ln(2) / \lambda.$$

Mit Hilfe der Verdoppelungszeit wurden jeweils die Generationen zwischen der ersten und zweiten Probennahme für jede Kulturverdünnung berechnet und über die Dauer des Versuchs aufsummiert. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt. Der zweite Durchgang ist exemplarisch in Abbildung 5-37 dargestellt.

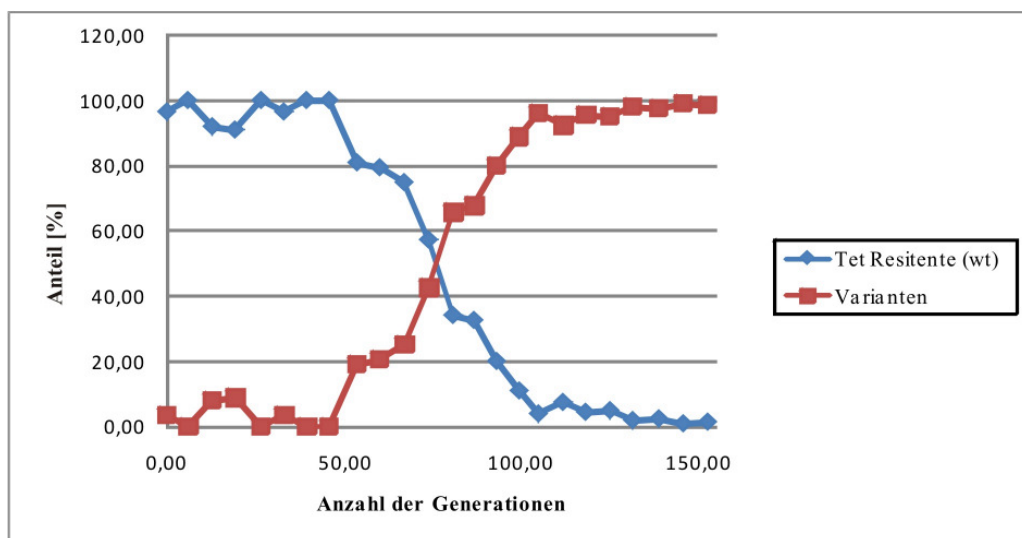


Abbildung 5-37 Stabilitätstest für die genomische Insel GI3 mit dem Stamm *B. petrii* GI3::tet^R. Die Anteile der Tetracyclinresistenten bzw. der Varianten sind gegen die Generationen aufgetragen.

Einer etwa 40 Generationen langen Anlaufphase, in der es zu leichten Schwankungen in der Variantenhäufigkeit kommt, folgt ein stetiger Verlust von GI3, bis diese nach etwa 120 - 150 Generationen zu 98,5 % eliminiert ist.

5.5.7 Versuche zur Übertragbarkeit der genomischen Inseln von *B. petrii* GI3::tet^R

5.5.7.1 Konjugationsexperiment mit *B. bronchiseptica* PS2 und *B. petrii* GI3::tet^R

Zur Übertragung einer genomischen Insel von *B. petrii* GI3::tet^R auf den kanamycinresistenten Stamm *B. bronchiseptica* PS2 wurde eine Konjugation wie im Abschnitt 4.1.6 beschrieben durchgeführt. Ein PCR-Screen auf die Int-B13 Integrase mit den Oligonukleotiden Int-B13 fw und Int-B13 REV ergab ein positives Signal in *B. petrii* GI3::tet^R und allen getesteten Konjuganten, nicht aber in *B. bronchiseptica* PS2. Um spontan kanamycinresistente *B. petrii* GI3::tet^R Klone auszuschließen, wurden die Konjuganten mit der Oligonukleotid-Kombination BBbvgS fw/ BBbvgS Rev zusätzlich auf ein *B. bronchiseptica* spezifisches Gen hin untersucht. PCR-Produkte wurden hier mit *B. bronchiseptica* PS2 und allen Konjuganten, nicht aber mit *B. petrii* GI3::tet^R erhalten.

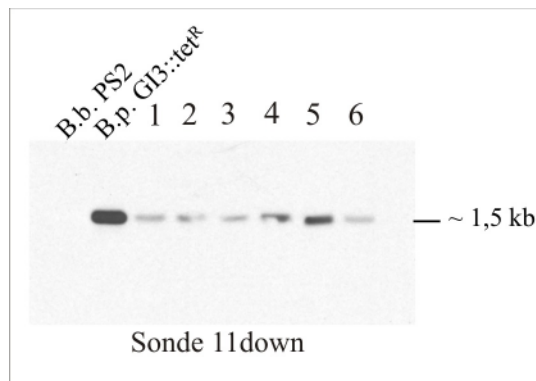


Abbildung 5-38 Southern Blot zur Kontrolle der *B. bronchiseptica* PS2 GI3::tet^R Konjuganten. Die Sonde 11down bindet in GI3 und ergibt nur ein Signal in *B. petrii* und den *B. bronchiseptica* Konjuganten (1-6), die die genomische Insel GI3 integriert haben.

Genomische Insel	Name	Koordinaten (Größe)	Fragmentgröße im Southern Blot
GI1	Sonde GI3-End	1441767-1442667 (901 bp)	4293 bp
	Sonde GI3-Anf	1353142-1353978 (837 bp)	2194 bp
GI2	Sonde GI1-End	1153212-1154133 (922 bp)	1517 bp
	Sonde9up	1084551-1085414 (864 bp)	4122 bp
GI6	Sonde VIup	4418386-4419272 (787 bp)	3911 bp
	Sonde 44down	4575874-4576671 (798 bp)	2628 bp

Tabelle 5-13 Übersicht über die Southern Blot Sonden, die zur Untersuchung der Übertragung der genomischen Inseln GI1, GI2 und GI6 in die *B. bronchiseptica* PS2 GI3::tet^R Klone (4) und (5) verwendet wurden.

Ferner wurde untersucht, ob die Konjuganten ebenso wie *B. bronchiseptica* PS2 hämolytisch sind. Von 6 Klonen, die sowohl in der PCR positiv waren als auch Lysehöfe auf Blutagarplatten aufwiesen, wurde chromosomale DNA für Southern Blot Experimente isoliert. Mit einer Int-B13-Sonde und der für GI3 spezifischen Sonde 11down (Abbildung 5-26), zeigten alle sechs Klone ein positives Signal. In Abbildung 5-38 ist exemplarisch der Southern Blot mit der Sonde 11down wiedergegeben. Um zu untersuchen ob noch weitere *clc*-ähnliche genomische Inseln übertragen wurden, wurden mit den Klonen (4) und (5) weitere Southern Blots durchgeführt, die aber keine Signale für die Konjuganten lieferten (Daten nicht gezeigt). Die verwendeten Sonden sind in Tabelle 5-13 aufgelistet.

Geht man also davon aus, dass nur die Insel GI3::tet^R übertragen wurde, würde man bei einem *BcuI*-Verdau im Pulsfeldgel zwei zusätzliche Banden erwarten, da *BcuI* genau einmal in GI3::tet^R schneidet. Dies trifft, wie in Abbildung 5-39 zu sehen ist, für die Klone (4) und (5) zu.

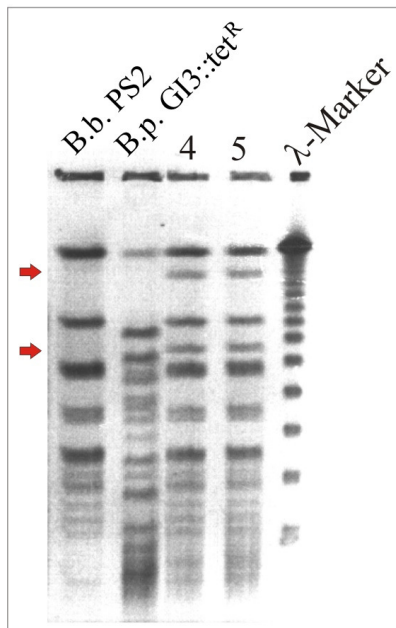


Abbildung 5-39 Pulsfeldgel zum Vergleich der *B. bronchiseptica* PS2 GI3::tet^R Klone (4) und (5) mit *B. bronchiseptica* PS2. Aufgetragen ist ein *BcuI*-Verdau. Als Marker wurde der Lambda Ladder PFG Marker (Abschnitt 3.8) verwendet. Die Pfeile markieren die zwei zusätzlichen Banden, die durch die Integration von GI3 in das *B. bronchiseptica* PS2 Genom entstanden sind. B.b.: *B. bronchiseptica*, B.p.: *B. petrii*.

5.5.7.2 Bestimmung des Integrationsortes von GI3::tetR in *B. bronchiseptica* PS2

B. bronchiseptica besitzt vier tRNA^{Gly} Gene, die als mögliche Integrationsstellen dienen könnten: BBt02, BBt08, BBt44 und BBt45 (<https://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/gendb-2.2/cgi-bin>). Mittels PCR sollten die tRNA Bereiche amplifiziert werden, wobei nur dann ein PCR-Produkt entstehen sollte, wenn kein Insertionsereignis stattgefunden hat. Die hierfür verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 5-14 aufgeführt.

<i>B. bronchiseptica</i> tRNA ^{Gly} Gene (Koordinaten)	Oligonukleotid-Kombination	PCR-Produkt
BBt02 (6496-6569)	trna02-fw trna02-Rev	1227 bp
BBt08 (544134-544207)	trna08-fw trna08-Rev	774 bp
BBt44 (4194126-4194201)	trna44-fw trna44-Rev	1185 bp
BBt45 (4217055-4217130)	trna45-fw trna45-Rev	625 bp

Tabelle 5-14 Oligonukleotide für das *B. bronchiseptica* tRNA-Screening. Die Koordinaten gelten für *B. bronchiseptica* RB50 (<https://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/gendb-2.2/cgi-bin>).

Das Ergebnis der PCR ist in Abbildung 5-40 dargestellt. Als Positivkontrolle wurde chromosomale DNA von *B. bronchiseptica* PS2 eingesetzt, als Negativkontrolle

chromosomale DNA von *B. petrii* GI3::tet^R. Nur bei der Oligonukleotid-Kombination für die tRNA BBt45 wird für die Klone (4) und (5) kein PCR-Produkt erhalten, so dass hier die GI3::tet^R Integration stattgefunden haben sollte.

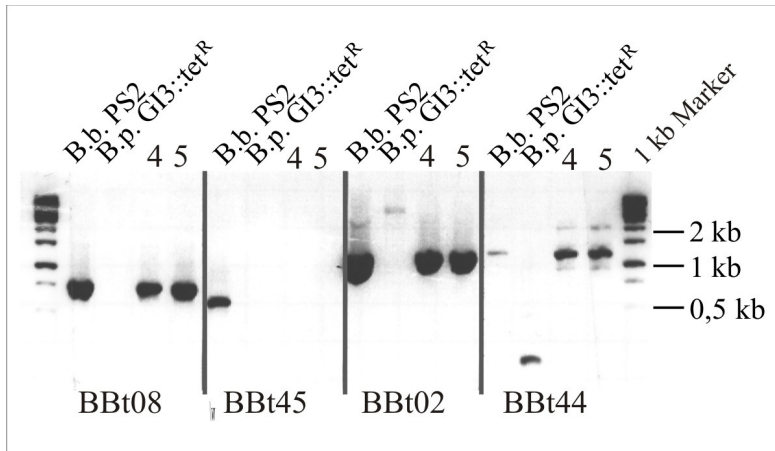


Abbildung 5-40 PCR zur Untersuchung der tRNA^{Gly} Gene in den *B. bronchiseptica* PS2 GI3::tet^R Klonen (4) und (5). Die PCR wurde mit chromosomaler DNA durchgeführt und je 10 µl PCR-Produkt auf 1 % Agarose aufgetragen. Marker: Gene Ruler™ 1 kb DNA Leiter (Abschnitt 3.8).

Um die Integration zu bestätigen, wurden PCR-Produkte mit den Oligonukleotid-Kombinationen GI3out (fw)/ tRNA45-fw (625 bp) und GI3out REV2/tRNA45-Rev (647 bp) amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Sequenzierung zeigte auf der linken Seite die tRNA^{Gly} von *B. bronchiseptica*, welcher der Anfang von GI3 folgte, und auf der rechten Seite folgte auf das Ende von GI3 eine Wiederholung der letzten 16 bp der tRNA^{Gly} als DR, dem in 6 bp Abstand eine Haarnadelstruktur folgte. Die Integrationsstelle ist in Abbildung 5-41 dargestellt.

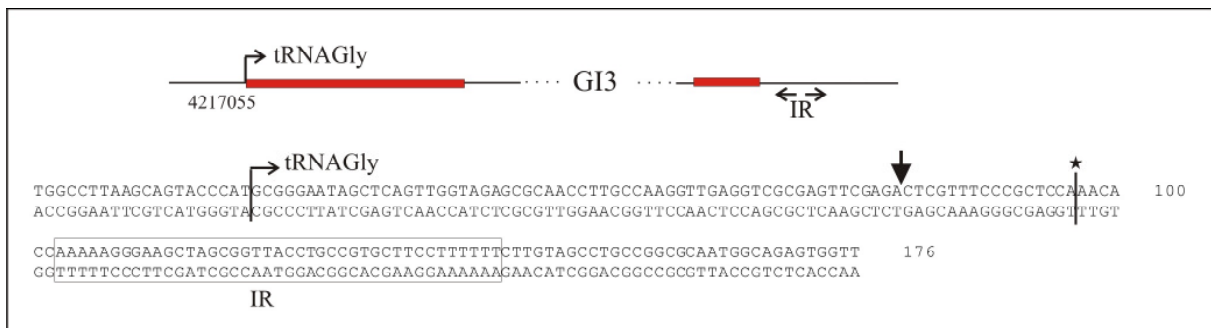


Abbildung 5-41 Schematischer Aufbau (oben) und Sequenz der Integrationsstelle (unten) der tRNA45 von *B. bronchiseptica* PS2. Die tRNA und das durch die Integration entstehende 16 bp lange DR sind als rote Balken dargestellt. Der Pfeil markiert den Ort der Integration in der Sequenz. IR: „inverted repeat“.

5.6 Vergleichende Analysen von verschiedenen *B. petrii* Isolaten

Wie einleitend beschrieben, wurde *B. petrii* DSM 12804 als erstes Umweltisolat der Gattung *Bordetella* aus Flusssediment isoliert (von Wintzingerode *et al.*, 2001). Vor kurzem wurden weitere Isolate aus den verschiedensten Habitaten beschrieben, darunter ein klinisches Isolat (GDH030510), welches aus einem Patienten mit mandibularer Osteomyelitis isoliert wurde (Fry *et al.*, 2005), sowie ein klinisches Isolat, welches aus einem Patienten mit eitriger Mastoiditis, einer Knochenentzündung im Mittelohr, isoliert wurde (Stark *et al.*, 2007). Aus

seit über 25 Jahren mit Chlorobenzenen verunreinigtem Erdreich (Schroll *et al.*, 2004) wurden des weiteren zwei Stämme isoliert (F2, E3), die 1,2,4-Trichlorbenzenen als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen können und somit eine mögliche Rolle in der mikrobiologischen Sanierung von Böden spielen könnten (Wang *et al.*, 2007). Bei der Untersuchung von Bakterien, welche mit den Wurzeln eines Wüstengrases (*Lasiurus indicus*) assoziiert sind, wurde ebenfalls ein gramnegatives β -Proteobakterium isoliert, welches eine hohe Ähnlichkeit zu *B. petrii* aufweist (Isolat C13) (Chowdhury *et al.*, 2007). Die Isolate N122, N123, N134 und R521 wurden hingegen bei der Untersuchung der mikrobiellen Diversität in Tiefseeschwämmen beschrieben (Sfanos *et al.*, 2005).

5.6.1 Pulsfeldgelelektrophorese mit den *B. petrii* Isolaten GDH030510, N122, N123, N134 und R521

Das klinische Isolat GDH030510 und die Schwammisolate N122, N123, N134 und R521, welche bereits 2005 beschrieben wurden, wurden uns freundlicherweise von den entsprechenden Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt und zunächst für PFGE Analysen eingesetzt. Die Proben wurden wie im Abschnitt 4.1.2.2.1 beschrieben präpariert und anschließend mit *BcuI* verdaut. Es wurde ein zweistufiger Lauf gefahren, mit einer ersten Pulszeit von 1 – 20 Sekunden und einer Laufzeit von 15 h und einer zweiten Pulszeit von 25 – 50 Sekunden und einer Laufzeit von 9 h. Der Gellauf ist in Abbildung 5-42 dargestellt.

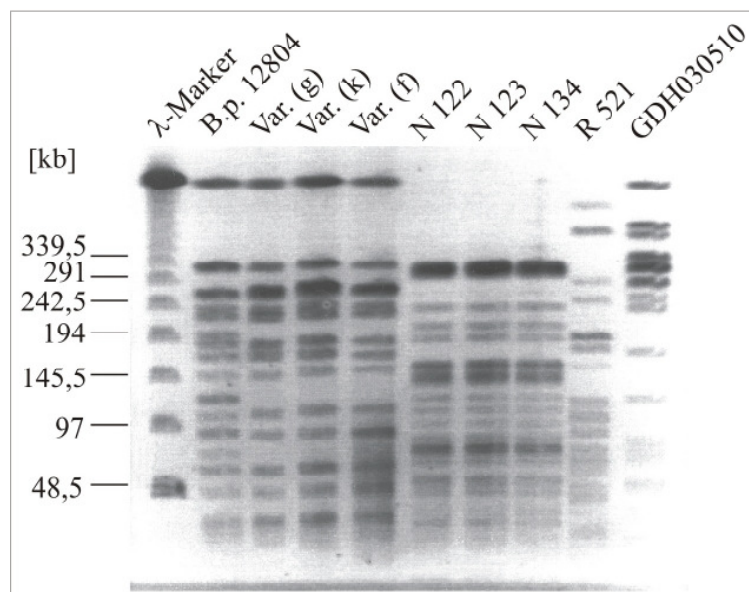


Abbildung 5-42 Pulsfeldgel der *B. petrii* Isolate GDH030510, N122, N123, N134 und R521. Die Proben wurden *BcuI* verdaut und auf einem 1 % PFC-Agarosegel aufgetrennt. Als Marker wurde der Lambda Ladder PFGE Marker (Abschnitt 3.8) verwendet. In Spuren 3 - 5 sind zusätzlich die *B. petrii* Varianten g, k und f aufgetragen, die in Kapitel 5.4.2 näher beschrieben sind. N122, N123, N134 und R521: Schwammisolate; GDH030510: klinisches Isolat.

Die drei Schwammisolate N122, N123 und N134 unterscheiden sich im Pulsfeldgel nicht voneinander, so dass es sich hier womöglich um denselben Stamm handeln könnte (Tenover *et al.*, 1995). Das Bandenmuster des vierten Schwammisolats R521 unterscheidet sich hingegen deutlich von den anderen Schwammisolaten. Im Vergleich zum Wildtyp zeigen alle 5 Isolate ein unterschiedliches Bandenmuster. Um die Verwandtschaftsverhältnisse besser beurteilen zu können, sollte anhand der 16S rDNA eine phylogenetische Analyse durchgeführt werden.

5.6.2 Phylogenetische Analyse anhand der 16S rDNA verschiedener *B. petrii* Isolate.

Hierfür sollten die als *B. petrii*-ähnlich beschriebenen Isolate, welche einleitend genannt wurden, herangezogen werden. Da die 16S rDNA-Sequenzen der Schwammisolate N122, N123, N134 und R521 nicht bekannt waren, mussten diese zunächst ermittelt werden.

5.6.2.1 Amplifikation und Sequenzierung der 16S rDNA von N122, N123, N134 und R521

Die 16S rRNA Gene wurden mit den Oligonukleotiden 16S A1 und 16S B1(neu) und einer „Proofreading“ Polymerase (Pfu) amplifiziert. Nach PNK-Behandlung wurden die Fragmente in den *Sma*I geschnittenen und dephosphorylierten pKS-Vektor kloniert. Dieser wurde anschließend in elektrokompetente *E. coli* DH5 α Zellen transformiert (Abschnitt 4.1.4.4) und nach einer Midi-Präparation (Abschnitt 4.1.1.2) zum Sequenzieren gegeben. Für die Sequenzierreaktion wurden folgende Oligonukleotide eingesetzt: 16S ALBO, 16S Seq1, 16S Seq2, 16S Seq 209, 16S Seq out Anf, 16S Seq out End, T7 und T3. Die erhaltenen Sequenzen wurden im GeneRunner-Programm (Version 3.05, Hastings Software, Inc.) zusammengefügt. Amplifikation und Sequenzierung wurden jeweils zweimal unabhängig voneinander durchgeführt und die erhaltenen Sequenzen mit dem GAP-Programm verglichen (Altschul *et al.*, 1997).

5.6.2.2 Erstellen eines Stammbaums mit MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007)

Um einen Stammbaum zu erstellen, wurden die erhaltenen 16S rDNA-Sequenzen der Schwammisolate und die in der NCBI (National Center for Biotechnology Information) Datenbank vorhandenen Sequenzen (Tabelle 5-15) in das BioEdit Programm (Version 7.0.9.0; (Hall, 1999)) geladen. Dort wurde ein ClustalW Alignment (Thompson *et al.*, 1994) durchgeführt und die Sequenzen editiert indem die Überhänge entfernt wurden, so dass das Alignment insgesamt 1429 bp lang war. In MEGA4 wurde mit diesem Alignment anhand der „neighbour-joining“ Methode (Saitou & Nei, 1987) mit einem Bootstrap von 1000 Wiederholungen der Stammbaum erstellt (Abbildung 5-43). Neben den bereits genannten *B. petrii*-ähnlichen Isolaten wurden zusätzlich Vertreter der „klassischen“ und „neuen“ *Bordetella*-Arten mit einbezogen. Als Outgroup wurde *Ralstonia eutropha* gewählt.

Stamm/Isolat	Quelle/Zugangsnummer (16S rDNA-Sequenz)
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama I	NCBI / NC 002929
<i>Bordetella parapertussis</i> 12822	NCBI / NC 002928
<i>Bordetella bronchiseptica</i> RB50	NCBI / NC 002927
<i>Bordetella holmesii</i>	NCBI / DQ409136
<i>Bordetella trematum</i> strain DSM 11334(T)	NCBI / AJ2779
<i>Bordetella hinzii</i>	NCBI / AF177667
<i>Bordetella avium</i> 197N	NCBI / AM167904
<i>Bordetella ansorpii</i>	NCBI / AY594190
<i>Bordetella petrii</i> DSM 12804	GenDB

<i>Bordetella petrii</i> GDH030510	NCBI / AJ870969
<i>Bordetella petrii</i> klinisches Isolat aus Australien	NCBI / EF212440
Schwammisolat N122	diese Arbeit
Schwammisolat N123	diese Arbeit
Schwammisolat N134	diese Arbeit
Schwammisolat R521	diese Arbeit
<i>Bordetella</i> sp. E3	NCBI / DQ453688
<i>Bordetella</i> sp. E3	NCBI / DQ453689
Uncultured bacterium clone C13	NCBI / DQ304804
<i>Ralstonia eutropha</i> VKPM B8562	NCBI / AJ633675

Tabelle 5-15 Übersicht über die Herkunft der 16S rDNA-Sequenzen, welche für die Erstellung des Stammbaums verwendet wurden. „diese Arbeit“ bezieht sich auf die, unter 5.6.2.1 beschriebene Sequenzierung des gesamten 16S rRNA Gens.

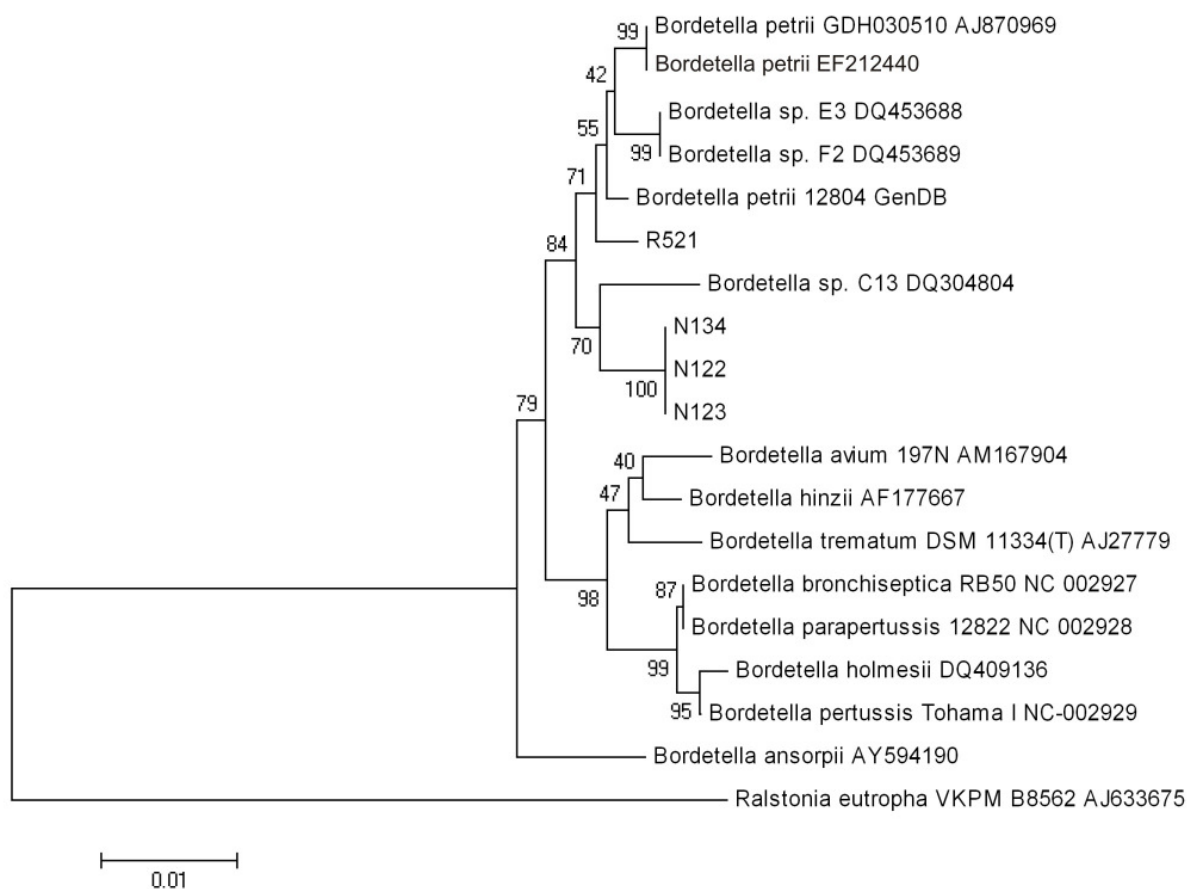


Abbildung 5-43 Stammbaum verschiedener *B. petrii* Isolate sowie Vertretern der „klassischen“ und „neuen“ *Bordetella*-Arten basierend auf der 16S rDNA. Der Balken ist eine Skala für den Nukleotidaustausch und steht für einen Austausch pro 100 Nukleotide. Die Nummern an den Verzweigungen beziehen sich auf die Bootstrap-Werte. Referenzen: Klinisches Isolat GDH030510 (Fry *et al.*, 2005), Klinisches Isolat EF212440 (Stark *et al.*, 2007), Isolate E3 und F2 (Schroll *et al.*, 2004), *Bordetella petrii* DSM 12804 (von Wintzingerode *et al.*, 2001), Schwammisolate R521, N134, N122, N123 (Sfanos *et al.*, 2005), Isolat C13 (Chowdhury *et al.*, 2007).

6 Diskussion

6.1 Charakterisierung des Umweltkeims *B. petrii* DSM 12804

B. petrii stellt den ersten Umweltkeim der Gattung *Bordetella* dar (von Wintzingerode *et al.*, 2001), der zum einen vielseitige metabolische Fähigkeiten aufweist, wie z.B. den Abbau von aromatischen Verbindungen wie Chlorbenzoat, Phenol oder Phthalat, sowie deutliche Kennzeichen von horizontalem Gentransfer trägt (Gross *et al.*, 2008). Zum andern besitzt *B. petrii* Gene, welche für putative Virulenzfaktoren der pathogenen *Bordetella*-Arten kodieren, darunter verschiedene Adhäsine wie Fimbrien und ein FHA-ähnliches Protein und orthologe Gene zum virulenzregulatorischen BvgAS-System (Gross *et al.*, 2008). *B. petrii* könnte demnach eine Art Bindeglied zwischen einem frei in der Umwelt lebenden, möglicherweise fakultativ anaeroben Vorfahren und der durch starke Anpassung an Wirtsorganismen gekennzeichneten pathogenen Bordetellen darstellen. Zum Vergleich von *B. petrii* mit pathogenen *Bordetella*-Arten, wurde *B. bronchiseptica* als ein gut charakterisierter Vertreter der „klassischen“ Bordetellen gewählt, der zudem ein breites Wirtsspektrum aufweist und der auch in tracheobronchialen Spülungen verschiedener Säugetiere (Porter & Wardlaw, 1994) und sogar in Teichwasserproben (Porter & Wardlaw, 1993) über einen längeren Zeitraum hinweg überleben kann. Da dies darauf hindeutet, dass *B. bronchiseptica* auch außerhalb des Respirationstraktes überleben und fakultativ in der Umwelt vorkommen kann, scheint dieser Keim für vergleichende Charakterisierungsstudien besonders geeignet zu sein.

6.1.1 Pathogene Eigenschaften von *B. petrii* DSM 12804: Untersuchung auf mit *B. bronchiseptica* vergleichbare intrazelluläre Stadien

Eine Reihe von Studien mit verschiedenen Zelllinien zeigte, dass sowohl *B. pertussis* als auch *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica* ein gewisses Potential für intrazelluläres Überleben aufweisen, d.h. sie können in eukaryotische Zellen eindringen oder aufgenommen werden und über einen bestimmten Zeitraum persistieren (Banemann & Gross, 1997; Ewanowich *et al.*, 1989a; Ewanowich *et al.*, 1989b; Forde *et al.*, 1998; Friedman *et al.*, 1992; Guzman *et al.*, 1994a; Lee *et al.*, 1990; Saukkonen *et al.*, 1991; Savelkoul *et al.*, 1993; Schipper *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 2000). Die Infektion von Mäusen mit *B. pertussis* und *B. bronchiseptica* verursacht außerdem eine signifikante Th1-Antwort, welche meist mit Infektionen, welche durch intrazelluläre Pathogene verursacht werden, assoziiert ist (Barnard *et al.*, 1996; Gueirard *et al.*, 1996). Alle diese Studien weisen darauf hin, dass während des Infektionsverlaufs intrazelluläre Stadien der Bordetellen auftreten können. Solche Stadien könnten eine Rolle für den langwierigen Verlauf der Krankheit spielen, aber auch für chronische Infektionen, welche v.a. für *B. bronchiseptica* beobachtet werden (Gueirard *et al.*, 1995; Woolfrey & Moody, 1991).

Im Gegensatz zu *B. pertussis*, für den Bvg-aktivierte Virulenzfaktoren für die Invasion von eukaryotischen Zellen eine Rolle spielen (Ewanowich *et al.*, 1989a; Friedman *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1990), sind Phasenvarianten von *B. bronchiseptica* genauso invasiv wie der Wildtyp oder zeigen diesem gegenüber sogar einen Selektionsvorteil für das intrazelluläre Überleben in Makrophagen (Banemann & Gross, 1997; Schipper *et al.*, 1994). Vergleicht

man *B. bronchiseptica* mit *B. pertussis* in Zellkulturassays, so überlebt in den meisten Fällen *B. pertussis* nur über kurze Zeiträume in eukaryotischen Zellen, während *B. bronchiseptica* auch nach mehreren Tagen noch nachgewiesen werden kann (Banemann & Gross, 1997; Schipper *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 2000). Da die Aufnahme von Bordetellen in Makrophagen ein mikrofilamentabhängiger phagozytischer Prozess ist, liegen die internalisierten Bakterien in der Zelle in einem Phagosom vor (Friedman *et al.*, 1992; Guzman *et al.*, 1994b). *B. bronchiseptica* kann dabei die Ansäuerung des Phagosoms, welche durch die Verschmelzung mit Lysosomen verursacht wird, überstehen (Schneider *et al.*, 2000). Eine solche Säuretoleranz wird z.B. für *Salmonella*-Arten und andere *Enterobacteriaceae* beobachtet, die so im reifenden Phagosom überleben können (Foster, 1999). Es gibt zudem Hinweise darauf, dass *B. bronchiseptica*, wenn auch nur selten, dem Phagosom entkommen kann und dann frei im Cytosol vorliegt (Forde *et al.*, 1998; Schipper *et al.*, 1994). Diese Strategie verfolgen beispielsweise die intrazellulären Pathogene *Listeria monocytogenes* und *Shigella flexneri*, die das Phagosom verlassen, um so dem lysosomalen Verdau zu entgehen (Cossart & Mengaud, 1989; Sansonetti *et al.*, 1986).

Für einen Vergleich von *B. bronchiseptica* mit dem Umweltkeim *B. petrii*, der verschiedene putative Virulenzfaktoren aufweist, wurden Invasions- und Infektionsstudien in eukaryotischen Zellen durchgeführt. Als Zelllinie wurden P388D1 makrophagenähnliche Zellen verwendet, welche alle Charakteristika normaler Makrophagen aufweisen (Koren *et al.*, 1975) und bereits für repräsentative Studien zum intrazellulären Überleben herangezogen wurden (Forde *et al.*, 1998). Aufgrund der größeren Effizienz im Sensitivitätstest (5.2.1) und der Tatsache, dass Polymyxin B bereits erfolgreich mit *B. bronchiseptica* Stämmen und P388D1 Makrophagen in Infektionsstudien zum Abtöten extrazellulärer Bakterien verwendet wurde (Forde *et al.*, 1998), wurden die nachfolgenden Invasions- und Infektionsassays mit Polymyxin B durchgeführt.

Die Invasionsstudien ergaben, dass etwa 0,15 % des Inokulums von *B. bronchiseptica* in die P388D1 Makrophagen aufgenommen wurde, was mit Beobachtungen aus früheren Studien für *B. bronchiseptica* übereinstimmt (Banemann & Gross, 1997; Forde *et al.*, 1998; Guzman *et al.*, 1994a; Schneider *et al.*, 2000). Die Aufnahme von *B. petrii* ist im Vergleich dazu um den Faktor 7,5 geringer und unterscheidet sich nicht signifikant von der Negativkontrolle (Abbildung 5-2). Eine geringere Aufnahme könnte z.B. durch das Vorhandensein einer Kapsel verursacht werden, welche die Adhäsine maskieren würde. *B. petrii* besitzt drei Gencluster, welche für die Biosynthese kapsulärer Polysaccharide kodieren (Gross *et al.*, 2008). Über die Regulation der Kapselbildung ist für *B. petrii* allerdings noch nichts bekannt. Auch *B. bronchiseptica* besitzt einen Genlocus für die Kapselbildung und es wird postuliert, dass eine Kapsel für *B. bronchiseptica* eine Rolle für das Überleben in der Umwelt spielen könnte, da die entsprechenden Gene Bvg-reprimiert sind (Cummings *et al.*, 2006; Parkhill *et al.*, 2003).

Da für Bordetellen in den einleitend genannten Infektionsstudien mit eukaryotischen Zelllinien keine Replikation, d.h. keine Zunahme der Bakterienzahl beobachtet werden konnte, ist die Zunahme von *B. bronchiseptica* 7866 im Verlauf der Infektionsassays (Abbildung 5-4) vermutlich nicht auf intrazelluläres Wachstum zurückführbar. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass ein Teil der extrazellulären Bakterien in einem Mikroenvironment im Makrophagen-Monolayer, wo er vor der Polymyxin B Wirkung geschützt war, überlebt und sich extrazellulär im Laufe des Versuchs vermehrt hat. Geht man

für *B. bronchiseptica* davon aus, dass extrazelluläre Bakterien der Antibiotikawirkung entkommen konnten, muss dasselbe auch für *B. petrii* angenommen werden, so dass der Zuwachs, der in Abbildung 5-4 für *B. petrii* zu sehen ist, wahrscheinlich ebenfalls nicht auf intrazelluläres Wachstum zurückzuführen ist. Auffällig ist in diesem Versuch die Persistenz der Negativkontrolle *E. coli* DH5 α . Dieser Stamm scheint für Überlebensstudien unter den gewählten Bedingungen ungeeignet zu sein, da kürzlich gezeigt wurde, dass die Proteintyrosinkinase Etk von *E. coli* K-12 unter bestimmten Wachstumsbedingungen eine wichtige Rolle für die Polymyxin B Resistenz spielt (Lacour *et al.*, 2006), was das Überleben von *E. coli* DH5 α mit einer Resistenzausprägung unter Zellkulturbedingungen erklären könnte. Aussagen über das intrazelluläre Überleben von *B. petrii* können anhand der Infektionsstudien nicht abschließend getroffen werden. Die geringere Aufnahme im Vergleich zu *B. bronchiseptica*, macht ein intrazelluläres Stadium von *B. petrii* unter den gewählten Bedingungen jedoch unwahrscheinlich.

Interessant wäre es dennoch, die klinischen *B. petrii* Isolate auf mögliche Interaktionen mit eukaryotischen Zellen zu untersuchen, da diese in Assoziation mit Entzündungsherden aus dem Menschen isoliert wurden (Fry *et al.*, 2005; Stark *et al.*, 2007).

6.1.2 Identifizierung von *B. petrii* Varianten während eines Langzeitwachstumsversuchs in Mainwasser

Wie für verschiedene *B. bronchiseptica* Stämme beschrieben (Porter & Wardlaw, 1993), kann auch *B. petrii* über längere Zeiträume hinweg, z.T. bis zu neun Monaten, in Gewässerproben überleben (Abbildung 5-19). Der Nährstoffgehalt des Mainwassers, scheint für ein anfängliches Wachstum um den Faktor 1000 ausreichend gewesen zu sein. Nach diesem anfänglichen Wachstum, waren die Nährstoffe wahrscheinlich so weit aufgebraucht, dass die Bakterien in eine Starvation-Survival Phase übergangen, wie dies für Umweltbakterien unter Nährstoffmangel häufig beschrieben wird (Leclerc & Moreau, 2002; Morita, 1997; Siegele & Kolter, 1992). PBS-Puffer allein ist für *B. petrii* nicht ausreichend, um zu überleben (Abbildung 5-18). Interessanterweise unterscheiden sich der *B. bronchiseptica* Stamm 7866 und *B. petrii* deutlich in ihrer Überlebensfähigkeit. Im Gegensatz zu *B. petrii* kann *B. bronchiseptica* z.B. in PBS-Puffer nach einem anfänglichen Zuwachs um das 200fache etwa 10 - 20 Tage lang nachgewiesen werden und zugleich zeigt *B. bronchiseptica* keinen Unterschied in der Überlebensfähigkeit bei der Kultivierung in PBS-Puffer und Mainwasser. Zudem können *B. bronchiseptica* Stämme auch in tracheobronchialen Spülungen längere Zeit überleben (Porter *et al.*, 1994). Da *B. petrii* ausschließlich in der Gewässerprobe überlebt und sich dadurch deutlich von dem pathogenen Keim unterscheidet, deutet auch dieses Ergebnis darauf hin, dass *B. petrii* eher als reiner Umweltkeim einzustufen ist.

Da die Starvation-Survival Reaktion als ein Zustand beschrieben wird, welcher durch einen veränderten, meist verlangsamten Stoffwechsel, eine erhöhte Resistenz gegenüber Stress und das Auftreten von kleinen Kolonieförmigkeiten gekennzeichnet ist (Morita, 1997; Siegele & Kolter, 1992), könnte das Auftreten von kleinen Kolonieförmigkeiten bei *B. petrii* während des Langzeitwachstums in Mainwasser ein Indiz für eine solche Starvation-Survival Reaktion sein. Durch die Isolierung von Reinkulturen und die Charakterisierung auf physiologischer und genomischer Ebene sowie auf Proteinebene (Abbildung 5-20 bis Abbildung 5-24) konnte

aber gezeigt werden, dass es sich bei den veränderten Kolonieformen um stabile und voneinander abgrenzbare Varianten des Wildtypstammes handelt (siehe auch 6.3). Die Reaktion auf den Nährstoffmangel ist also keine reversible Anpassung des Stoffwechsels, sondern ist vielmehr auf eine Erhöhung der spontanen Mutations- bzw. Variationsrate als Stressantwort zurückzuführen. Evolutionär betrachtet wird durch die Bildung verschiedener Genotypen die Chance erhöht, sich an veränderte Umweltbedingungen oder verschiedene Nischen in der Umwelt anzupassen. Eine solche adaptive Radiation spielt auch bei der Evolution biologischer Diversität eine wichtige Rolle (Moxon *et al.*, 1994; Rainey *et al.*, 1993; Rainey & Travisano, 1998). Kürzlich konnte mittels Microarray Analysen gezeigt werden, dass von zehn zufällig gepickten Einzelkolonien einer *B. petrii* Übernachtkultur neun genotypisch unterscheidbare Varianten erhalten wurden (persönliche Mitteilung Karin Schmitt). *B. petrii* scheint demnach ein hoch variabler Umweltkeim zu sein, der sich wahrscheinlich an eine Vielzahl veränderter Lebensbedingungen anpassen kann.

6.2 Das *B. petrii* BvgAS Zweikomponentensystem

6.2.1 *In silico*-Charakterisierung des BvgAS-Systems aus *B. petrii*

Im Rahmen der Sequenzierung des *B. petrii* Genoms konnten orthologe Gene zum BvgAS ZKS der pathogenen *Bordetella*-Arten identifiziert werden, welche für einen Response Regulator, eine Hpt-Domäne und zwei Histidinkinasen kodieren (Gross *et al.*, 2008). Eine Konservierung ist nur auf Aminosäureebene deutlich zu sehen (Tabelle 5-2), wohingegen die Sequenzen auf DNA-Ebene kaum konserviert sind. Am deutlichsten konserviert ist der Response Regulator BvgA, dessen Molekulargewicht und Leserahmen in einer ähnlichen Größenordnung wie die der pathogenen Bordetellen liegen (Tabelle 5-1). Die Leserahmen der beiden Histidinkinasen BvgS1 und BvgS2 sind deutlich kürzer, da ihnen eine periplasmatische Inputdomäne fehlt. Solche Sensordomänen können in verschiedenen ZKS zur Wahrnehmung von Umweltsignalen dienen, wie z.B. Osmolarität, Temperatur und Ionen (Bekker *et al.*, 2006; Stock *et al.*, 2000). Des weiteren können noch andere protein- oder ligandenbindende Domänen in der Sensorkinase vorhanden sein, wie z.B. die PAS-Domänen, welche als cytosolische Signaldomänen auf Reize wie Licht, Sauerstoff, kleine Liganden (FAD, ATP) oder den Energiezustand der Zelle reagieren können (Galperin *et al.*, 2001; Bekker *et al.*, 2006; Taylor & Zhulin, 1999). Über die Signale, welche *in vivo* durch BvgS in den „klassischen“ *Bordetella*-Arten wahrgenommen werden, ist noch wenig bekannt. Eine Modulation der Kinaseaktivität kann aber durch Temperaturveränderung, die Zugabe von Nikotinsäure und Sulfationen sowie durch eine Veränderung der Osmolarität und des Oxidationszustandes von Ubichinon beobachtet werden (Bock & Gross, 2002; Melton & Weiss, 1989; Prugnola *et al.*, 1995; Stenson & Pepler, 2007). Nur eine der beiden Histidinkinasen von *B. petrii*, BvgS1, weist eine PAS-Domäne auf, welche im Vergleich zu BvgS aus *B. bronchiseptica* eine etwa 43 %ige Ähnlichkeit auf Aminosäureebene aufweist. Für BvgS2 kann nur mit relativ geringer Wahrscheinlichkeit, d.h. mit einem E-value von 0,082, eine potentielle PAS-Domäne vorhergesagt werden. Aufgrund der fehlenden bzw. unterschiedlichen PAS-Domänen und der nicht vorhandenen periplasmatischen Sensordomänen, kann man davon ausgehen, dass die Signalwahrnehmung des Bvg-Systems

in *B. petrii* sich von der der pathogenen Bordetellen unterscheidet. Vermutlich spielen hier vermehrt intrazelluläre Reize eine Rolle.

Da das BvgAS-System ubiquitär in der Gattung *Bordetella* vorkommt, d.h. auch bei einem fakultativ anaeroben Umweltkeim wie *B. petrii*, könnte dieses System ursprünglich eine andere regulatorische Rolle gespielt haben. Der Einfluss von oxidiertem Ubichinon auf die Aktivität der Histidinkinase BvgS und die Beobachtung, dass Komponenten des Elektronentransports BvgAS reguliert sind, weist auf eine Verbindung von BvgAS mit der Atmungskette und damit dem Energiezustand der Zelle hin (Bock & Gross, 2002; Cotter & DiRita, 2000; Cummings *et al.*, 2006). Interessanterweise werden Komponenten der Cytochrom *bd* und Cytochrom *cbb₃* Komplexe in der intermediären Phase, d.h. bei zunehmender Aktivierung des BvgAS-Systems, exprimiert (Cummings *et al.*, 2006). Beide terminalen Oxidasen haben eine hohe Sauerstoffaffinität und werden in Bakterien unter mikroaerophilen Bedingungen gebildet (Tseng *et al.*, 1996). Es wäre daher denkbar, dass das BvgAS-System in einem fakultativ pathogenen Vorfahren der Bordetellen z.B. eine Rolle bei der Umstellung von aerobem zu anaerobem Wachstum gespielt haben könnte. Dafür spricht z.B. die fakultativ anaerobe Lebensweise von *B. petrii*, der wahrscheinlich ein evolutives Bindeglied zu den pathogenen *Bordetella*-Arten darstellt.

Ein ZKS, welches beispielsweise die aerobe Respiration kontrolliert, ist das ArcAB-System aus *E. coli*. Dabei handelt es sich ebenfalls um ein unorthodoxes ZKS, welches durch einen vierstufigen Phosphotransfer gekennzeichnet ist (Iuchi & Weiner, 1996; Stock *et al.*, 2000). Die Histidinkinase ArcB besitzt zwei Transmembrandomänen und keine periplasmatische Sensordomäne. Es wird postuliert, dass durch die Lokalisierung von ArcB in der Membran der Oxidationsstatus von membrangebundenen Quinonen detektiert werden kann (Georgellis *et al.*, 2001; Malpica *et al.*, 2004). Diese Strukturähnlichkeit mit den Histidinkinasen von *B. petrii* könnte ein weiterer Hinweis auf eine ursprüngliche Funktion des BvgAS-Systems sein. Die Regulation der Virulenzgene wäre demnach erst später in einen bereits vorhandenen regulatorischen Mechanismus eingegliedert worden, vielleicht aufgrund der Tatsache, dass auch im infizierten Wirt mikroaerophile Bedingungen, z.B. im Schleim des Respirationsepithels, auftreten können (Beier & Gross, 2006; Vergara-Irigaray *et al.*, 2005).

Kürzlich wurde mittels Microarray Analysen gezeigt, dass die Komplexität des BvgAS-Regulons größer ist, als bisher angenommen und für *B. bronchiseptica* auch in der intermediären und Bvg⁻-Phase eine wichtige Rolle spielt, da hier eine Funktion für das Überleben in der Umwelt und unter Nährstoffmangel postuliert wird (Bock & Gross, 2001; Cotter & Miller, 1994; Cummings *et al.*, 2006). Da die Veränderung der Temperatur modulierend auf die BvgAS-abhängige Genexpression wirkt, könnte in der Evolution des BvgAS-Systems der Bordetellen daher auch die Fähigkeit eines fakultativ pathogenen Vorfahren zur Unterscheidung zwischen dem Aufenthalt in der Umwelt und im Wirt eine Rolle gespielt haben (Gerlach *et al.*, 2001). Eine solche Funktion könnte z.B. für klinische *B. petrii* Isolate von Bedeutung sein.

Da die Signaltransduktion in Zweikomponentensystemen typischerweise über einen Histidinkinase vermittelten Phosphotransfer auf ein Regulatorprotein stattfindet, weisen besonders die Proteindomänen mit Kinasefunktion bzw. mit DNA-bindender Aktivität einen hohen Konservierungsgrad auf (Pao & Saier, 1995; Stock *et al.*, 2000; West & Stock, 2001). Eine genauere Analyse der Proteinsequenzen der einzelnen Domänen der *B. petrii* Histidinkinasen BvgS1 und BvgS2 und des Response Regulators BvgA mit den entsprechenden Domänen in *B. bronchiseptica* zeigte ebenfalls, dass sowohl die

Kinasedomäne von BvgS1 mit einer prozentualen Ähnlichkeit von 59 % als auch die Kinasedomäne von BvgS2 mit einer prozentualen Ähnlichkeit von 56 % stärker konserviert sind, als die entsprechenden Receiver-Domänen, welche eine prozentuale Ähnlichkeit von 46 % bzw. 50 % aufweisen. Die Konservierung bestimmter Domänen wird beim Vergleich des Response Regulators BvgA noch deutlicher, da die DNA-bindende Output-Domäne 78 % Ähnlichkeit zum *B. bronchiseptica* Protein aufweist, die Receiver-Domäne hingegen nur 54 %.

Von den beiden *B. petrii* Histidinkinasen zeigt BvgS1 die größte prozentuale Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz zu den Histidinkinasen der pathogenen Bordetellen. Interessanterweise ist die Ähnlichkeit zu den „klassischen“ *Bordetella*-Arten und unter diesen zu *B. bronchiseptica* größer, als zu den „neuen“ Arten, welche in Tabelle 5-2 durch *B. avium* und *B. holmesii* vertreten sind. Die BvgAS Proteine der „neuen“ Arten sind untereinander stärker konserviert als im Vergleich zu den ebenfalls untereinander stark konservierten BvgAS Proteinen der „klassischen“ *Bordetella*-Arten und auch in der Lokalisation des *bvgAS*-Lokus weisen sie untereinander eine größere Übereinstimmung auf, da sowohl stromaufwärts von *B. avium* als auch von *B. holmesii*, *B. trematum* und *B. hinzii* das *orfX*-Gen liegt, welches für einen putativen Response Regulator kodiert (Gerlach *et al.*, 2004; Spears *et al.*, 2003). Obwohl *B. petrii* über die 16S rDNA-Sequenz an die Basis der Gattung *Bordetella* eingeordnet wird (Gerlach *et al.*, 2001), zeigt der Vergleich der „upstream“-Region von *B. petrii* mit den „klassischen“ Bordetellen wiederum eine auffällige Ähnlichkeit durch das Vorhandensein eines Fimbrien-Genclusters (Abbildung 6-1).

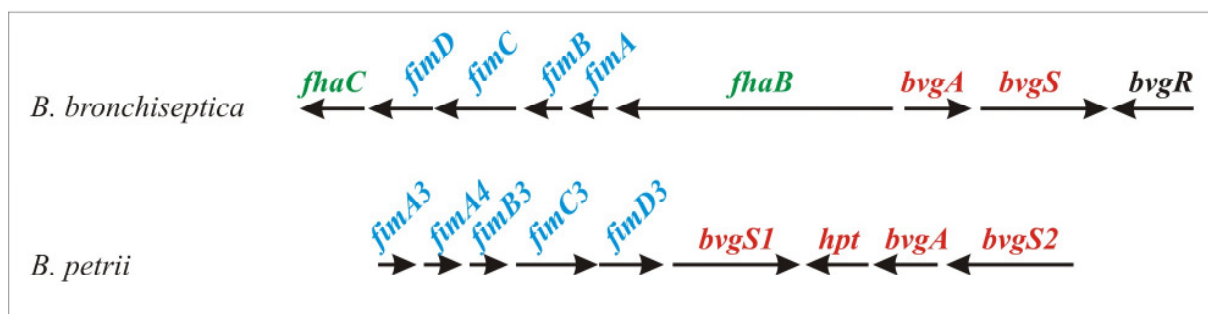


Abbildung 6-1 Genomische Lokalisation des *bvgAS*-Lokus in den „klassischen“ Bordetellen am Beispiel von *B. bronchiseptica* und im Vergleich dazu in *B. petrii* (<https://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/gendb-2.2>). Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

Eine mögliche Evolution des BvgAS-Systems könnte in einem Vorfahren der Bordetellen ausgehend von einem mehrteiligen ZKS mit separater Hpt-Domäne stattgefunden haben, von dem sich schon früh ein *B. petrii*-ähnliches Bakterium abgespalten hat. Dass bestimmte Domänen von ZKS, wie z.B. Receiver- oder Hpt-Domänen, einzeln vorliegen, ist nicht ungewöhnlich und kommt z.B. im Sporulierungs-Kontrollsystem von *Bacillus subtilis* oder dem osmoregulatorischen System von *Saccharomyces cerevisiae* vor (Perego, 1998; Perraud *et al.*, 1999; Wurgler-Murphy & Saito, 1997). Ob zu diesem Zeitpunkt bereits zwei Histidinkinasen vorgelegen haben, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, aber da BvgS1 und BvgS2 von *B. petrii* jeweils eine größere Ähnlichkeit zu den Histidinkinasen der pathogenen *Bordetella*-Arten aufweisen, als zueinander, könnte man für *B. petrii* eine Genduplikation postulieren, bei der eines der beiden Gene, vielleicht durch verminderte Funktionalität, einer stärkeren Mutationsrate unterworfen war. Da die Evolution von ZKS durch den lateralen

Erwerb von Domänen und damit durch eine zunehmende Komplexität gekennzeichnet ist (Zhang & Shi, 2005), könnte durch Integration der Hpt-Domäne eine komplexere Histidinkinase entstanden sein. Veränderungen in der genomischen Lokalisation könnten durch Umstrukturierungen im Genom, wie unter 2.5 beschrieben, stattgefunden haben, was dann zur Eingliederung von *fhaBC* in das *fim/bvg*-Cluster geführt hätte oder umgekehrt. Auch in den Vorfahren der „neuen“ Arten müssten demnach weitere Umstrukturierungen stattgefunden haben. So weist *B. avium* zwar eine vergleichbare *fim/fha*-Organisation auf dem Chromosom auf, der *bvgAS*-Lokus liegt aber, wie bei anderen Vertretern der „neuen“ Arten stromabwärts vom Leserahmen *orfX* (Sebahia *et al.*, 2006; Spears *et al.*, 2003). Eine Besonderheit der „klassischen“ *Bordetella*-Arten scheint der Erwerb des Repressorproteins BvgR zu sein, welches bisher nur für diese beschrieben wurde. Dies ist ein zusätzlicher regulatorischer Faktor, welcher BvgA-aktiviert ist und in der Bvg⁺-Phase die Reprimierung bestimmter Gene vermittelt (Merkel *et al.*, 2003).

6.2.2 Funktionelle Charakterisierung des BvgAS-Systems aus *B. petrii* DSM 12804

Das BvgAS-Zweikomponentensystem der Bordetellen stellt den Hauptregulator der Virulenzgenexpression dar (Beier & Gross, 2006). Kürzlich konnte über Microarray Analysen aufgezeigt werden, dass zudem noch eine Vielzahl weiterer Gene einer BvgAS-Regulation unterworfen sind. Für *B. bronchiseptica* und *B. pertussis* konnten insgesamt 288 BvgAS-aktivierte und 250 BvgAS-reprimierte Gene und für *B. bronchiseptica* zusätzlich noch 262 Gene, welche in einem intermediären Stadium BvgAS-abhängig exprimiert werden, identifiziert werden (Cummings *et al.*, 2006), was auf ein komplexes regulatorisches Netzwerk schließen lässt. Die funktionelle Untersuchung eines orthologen ZKS im Umweltkeim *B. petrii*, könnte Rückschlüsse auf die Evolution eines solchen Systems hinsichtlich einer zunehmenden Anpassung an eine pathogene Lebensweise ermöglichen.

B. petrii *bvgA*- bzw. *bvgAS*-Deletionsmutanten, bei denen *bvgA* bzw. der gesamte *bvg*-Lokus durch eine Tetracyclin-Resistenzkassette ersetzt sind, zeigten in Wachstumsversuchen bei 37°C und 42°C kein auffälliges Wachstumsdefizit gegenüber dem Wildtyp (siehe Abbildung 5-13). Lediglich bei einer Wachstumstemperatur von 15°C konnte ein vermindertes Wachstum der Deletionsmutanten nachgewiesen werden. In ihrem Wachstumsverhalten unterschieden sich die beiden Deletionsmutanten allerdings nicht wesentlich voneinander. Für die Proteomanalysen mittels 2D-Gelelektrophorese (4.3.4) wurde im weiteren die Response Regulator Deletionsmutante *B. petrii* $\Delta bvgA::tet^R$ verwendet.

In den einzelnen Durchgängen der 2D-Gelelektrophorese wurden unter den gewählten Bedingungen zwischen 758 und 1114 Spots detektiert, wovon nach der Auswertung mit der Delta2D Software etwa 4 - 5 % signifikant BvgA reguliert erschienen. Der Vergleich der Delta2D-Projekte ist in Tabelle 5-5 aufgelistet und zeigt auf, dass die Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Anzahl der detektierten Spots zwischen 70 % und 95 % schwankt. Leichte Abweichungen in der Proteinextraktion können die Reproduzierbarkeit beeinflussen, wobei die Hemmung von Proteasen eine entscheidende Rolle spielt (Berkelman & Stenstedt, 2001). Mit dem verwendeten Protease-Inhibitor wurden z.B. keine Metalloproteasen gehemmt, was zu leicht unterschiedlichen Degradationsmustern führen kann, je nachdem, wie gut die Proben, z.B. während des Zellaufschlusses, gekühlt waren. Schwankungen in der

Reproduzierbarkeit könnten aber auch durch die kürzlich beschriebene Variabilität (siehe auch 6.3) von *B. petrii* verursacht werden, welche in Microarray Analysen untersucht wurde. Wie im Abschnitt 6.1.2 bereits erwähnt, wurden von zehn zufällig gepickten Einzelkolonien einer *B. petrii* Übernachtskultur neun genotypisch unterscheidbare Varianten erhalten (persönliche Mitteilung Karin Schmitt). Da die Kulturen der einzelnen Durchgänge jeweils unabhängig voneinander angezogen wurden und auch die Durchgänge zeitlich über einen längeren Zeitraum hinweg durchgeführt wurden, könnten in den einzelnen Proben präferentiell unterschiedliche Klone vorgelegen oder sich ein Gemisch verschiedener Klone während des Wachstums herausgebildet haben. Dies würde Unterschiede in der Anzahl der Spots und auch in der Regulation bestimmter Spots sowohl innerhalb eines Durchgangs als auch zwischen verschiedenen Durchgängen eines Ansatzes erklären und gleichzeitig einen Vergleich der einzelnen Gele erschweren. Um Variationseffekte zu reduzieren, wurden daher nur die Spots berücksichtigt, welche in beiden Durchgängen eines Ansatzes signifikant reguliert wurden.

Unter den identifizierten Proteinen befinden sich eisenbindende Proteine wie das putative periplasmatische Eisenbindeprotein des ABC Transport Komplexes FbpABC und Bakterioferritin, sowie Proteine, die eine mögliche Rolle in der oxidativen Stressresistenz spielen können (Hassett & Cohen, 1989), wie die Superoxid-Dismutasen SodA und SodB oder das putative Glutharedoxin (Tabelle 5-6). Wong *et al.* konnten eine ArcA-abhängige Expression von Genen, die eine Rolle in der Eisenspeicherung und der Resistenz gegen oxidativen Stress spielen, unter anaeroben Bedingungen in *Haemophilus influenzae* beobachten (Wong *et al.*, 2007). Gleichzeitig besteht ein regulatorischer Einfluss des ArcAB-Systems auf Gene der Atmungskette und des TCA-Zyklus, welche unter anaeroben Bedingungen reprimiert werden (Salmon *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2007). Eine ähnliche Beobachtung wurde von Cummings *et al.* im *Bordetella*-Microarray gemacht, in welchem das BvgAS-Regulon von *B. bronchiseptica* und *B. pertussis* vergleichend untersucht wurden. In der Bvg⁻-Phase werden dort bestimmte Stoffwechselwege aktiviert, darunter z.B. der TCA-Zyklus. Auch Komponenten der Atmungskette erschienen BvgAS reguliert, weshalb, wie im vorhergehenden Abschnitt bereits erwähnt, eine BvgAS-vermittelte Anpassung an microaerophile Bedingungen vorgeschlagen wurde (Cummings *et al.*, 2006). Dieser Bezug zum ArcAB-System könnte auf eine ähnliche Funktion des BvgAS-Systems in *B. petrii* hindeuten, d.h. in der Unterscheidung zwischen aerobem und anaerobem Wachstum.

Eine Regulation entsprechender Stoffwechselgene konnte in *B. petrii* im 2D-Gel jedoch nicht festgestellt werden. Im Vergleich zu den Microarray Analysen von Cummings *et al.* wurden bei der Proteomuntersuchung von *B. petrii* nur wenige regulierte Faktoren identifiziert. Das liegt zum einen daran, dass aufgrund der Proteinpräparation und der Auftrennung in einem bestimmten pH-Bereich nicht alle Proteine erfasst werden, zum andern sind manche Spots zu klein, um im Gel erkennbar aufgetrennt zu werden. Daher stellen die über MALDI-TOF identifizierten Proteine nur einen kleinen Ausschnitt des Regulons dar.

Drei der auf Proteomebene ermittelten Faktoren erscheinen ebenfalls im *Bordetella*-Microarray BvgAS reguliert (Cummings *et al.*, 2006). FlgD, welches essentiell für das Flagellen Assembling ist, und Bakterioferritin werden vergleichbar zum *Bordetella*-Microarray BvgA reprimiert bzw. aktiviert, wobei leichte Unterschiede zwischen Proteom- und Realtime-PCR-Daten vermutlich auf zusätzliche regulatorische Mechanismen hinweisen. Die eindeutigste Regulation sowohl auf Proteinebene als auch auf Transkriptebene zeigt sich

für das Gen (b_petrii_0464), welches für ein Porin der äußeren Membran kodiert und BvgA reprimiert erscheint. Auf Aminosäureebene weist das Porin 69 % Ähnlichkeit zu einem *B. bronchiseptica* Porin auf, welches im *Bordetella*-Microarray reziprok reguliert erscheint und in *B. pertussis* als Pseudogen vorliegt. Eine prozentuale Ähnlichkeit auf Aminosäureebene von 68 % weist das *B. petrii* Protein zu einem Porin von *B. pertussis* auf, welches zwar nicht im *Bordetella*-Microarray BvgA reguliert erscheint, aber wahrscheinlich eine Rolle in der Biofilmbildung spielt (persönliche Mitteilung, Diego O. Serra). Interessanterweise werden dieses Porin sowie die Superoxid-Dismutase SodA in *B. pertussis* auch unter Eisenmangelbedingungen, wie sie im Wirt vorkommen, verstärkt exprimiert (Vidakovics *et al.*, 2007b).

Ob die im *B. petrii* 2D-Gel regulierten Faktoren eine Rolle für das Überleben unter niedrigen oder wechselnden Sauerstoff- oder Nährstoffkonzentrationen spielen, wie sie z.B. in Biofilmen auftreten können, müsste weiter untersucht werden. Die negative Regulation von FlgD sowie die Identifizierung eines positiv regulierten Faktors der Purinbiosynthese, PurM, könnten allerdings auf eine Regulation der Biofilmbildung hinweisen (Jefferson, 2004; Knobloch *et al.*, 2003). Eine Biofilmbildung wird für *B. bronchiseptica* in der Bvg⁺- und Bvgⁱ-Phase beobachtet (Mishra *et al.*, 2005), d.h. unter Bvg-Aktivierung, gleichzeitig ist die Flagellenexpression und damit die Motilität in der Bvg⁺-Phase herunter reguliert (Akerley & Miller, 1993). Die Biofilmbildung stellt für viele Bakterien eine alternative Lebensweise dar, die z.B. eine verbesserte Resistenz gegenüber Stressbedingungen und Möglichkeiten zum Gentransfer, und damit zu einer verbesserten Anpassungsfähigkeit, vermittelt (Jefferson, 2004). Für *B. petrii* konnte bisher allerdings noch keine Biofilmbildung nachgewiesen werden (Pohlert, In Vorbereitung). Da aber eine Rolle des BvgAS-Systems in der Wahrnehmung von aeroben bzw. anaeroben Lebensbedingungen postuliert wird, wurden in bisherigen Versuchen vielleicht die falschen Parameter verwendet. Interessant wäre es daher, eine Untersuchung des *B. petrii* Proteoms oder Transkriptomts unter anaeroben Bedingungen durchzuführen, zumal für das ArcAB-System eine maximale Aktivität unter niedrigen Sauerstoffbedingungen beschrieben wurde (Lynch & Lin, 1996; Salmon *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2007).

Da in den Realtime-PCR Analysen neben einem regulatorischen Effekt in der $\Delta bvgA$ -Mutante für manche Gene zusätzlich ein Temperatureffekt beobachtet werden konnte, scheinen zusätzliche regulatorische Mechanismen vorhanden zu sein.

Neueste Ergebnisse von Microarray Analysen mit der *B. petrii* $\Delta bvgA$ -Mutante erschweren die Interpretation der hier diskutierten Daten, da gezeigt wurde, dass neben dem Gen für den Response Regulator BvgA noch 22 weitere Gene deletiert sind, welche zu genomischen Inseln gehören und in Tabelle 6-1 aufgeführt sind (persönliche Mitteilung, Karin Schmitt). Da etwa die Hälfte der fehlenden Gene für transkriptionelle Regulatoren bzw. putative transkriptionelle Regulatoren kodieren, scheint eine Aussage über die $\Delta bvgA$ -vermittelten Eigenschaften in *B. petrii* $\Delta bvgA::tet^R$ kaum möglich. Andererseits liegen diese zusätzlich deletierten Regulatorgene ausschließlich auf genomischen Inseln und sind daher vielleicht auch nur für die Regulation von Inselgenen verantwortlich. Ob die Deletion der zusätzlichen Gene ein Effekt der *B. petrii* Transformation ist oder nur durch zufällige Variation hervorgerufen wurde ist nicht klar, wäre aber für zukünftige Microarray Analysen und Transkriptomstudien mit *B. petrii* von Interesse, da nur mit einem Wildtypstamm und einer $\Delta bvgA$ -Mutante, die, bis auf das *bvgA*-Gen, den selben genomischen Hintergrund aufweisen,

die BvgAS-Regulation in *B. petrii* aufgeklärt werden kann. Die bisherigen Schlussfolgerungen bleiben daher vorab rein spekulativ. Ein Bezug kann am ehesten noch zu den Genen gesehen werden, welche ebenfalls im *Bordetella*-Microarray als BvgAS reguliert beschrieben wurden.

Deletierte Gene der $\Delta bvgA$ -Mutante in <i>B. petrii</i>	Funktion	Genomische Insel
(b_petrii_4471)	Response Regulator BvgA	-
(b_petrii_0196)	Response Regulator. CheY-ähnlich	GI0
(b_petrii_0198)	mutmaßliche Transposase	
(b_petrii_0199)	putative Dehydrogenase	
(b_petrii_0200)	putatives DNA-Bindeprotein (transkriptioneller Regulator)	
(b_petrii_4176)	DNA-abhängige ATPase, SNF2 family protein	GI6
(b_petrii_4219)	transkriptioneller Regulator, TetR family	
(b_petrii_4220)	putative Octaprenyl-Diphosphat Synthase	
(b_petrii_4221)	bakterielles regulatorisches Protein, MarR family	
(b_petrii_4222)	putativer drug resistance Transporter, Bcr/CflA family	
(b_petrii_4223)	rob (transkriptioneller Regulator, AraC family)	
(b_petrii_4224)	transkriptioneller Regulator, LysR family	
(b_petrii_4225)	konserviertes hypothetisches Protein, DNA-bindend	
(b_petrii_4226)	transkriptioneller Regulator, LysR family	
(b_petrii_4227)	konserviertes hypothetisches Protein	
(b_petrii_4228)	mutmaßliches outer membrane Effluxprotein	
(b_petrii_4229)	mexD (putatives Transmembranprotein, Effluxsystem)	
(b_petrii_4230)	transkriptioneller Regulator, LysR family	
(b_petrii_4231)	mutmaßlicher transkriptioneller Regulator	
(b_petrii_4232)	transkriptioneller Regulator, LysR family	
(b_petrii_4233)	mutmaßlicher transkriptioneller Regulator	
(b_petrii_4234)	DNA-abhängige ATPase, SNF2 family protein	
(b_petrii_4235)	hypothetisches Protein	

Tabelle 6-1 Übersicht über die deletierten Gene der *B. petrii* $\Delta bvgA::tet^R$ Mutante. (mit freundlicher Genehmigung, Karin Schmitt).

6.3 Genomische Variabilität von *B. petrii* DSM 12804

Im Rahmen der Genomsequenzierung von *B. petrii* wurde das Vorhandensein von acht genomischen Inseln (GIs) vorgeschlagen (Gross *et al.*, 2008) (Tabelle 5-9). Genomische Inseln zählen zu den integrativen und konjugativen Elementen und können daher wesentlich zu einer mosaikartigen Struktur des Bakteriengenoms und zu dessen Plastizität beitragen. Solche mobilen DNA-Bereiche können aus dem Genom deletiert, mittels Konjugation übertragen und im Wirtsgenom an einer oder mehreren Stellen ortsspezifisch integriert werden (Burrus *et al.*, 2002). Die GIs von *B. petrii* zeichnen sich durch einen niedrigeren GC-Gehalt im Vergleich zum restlichen Genom aus und besitzen, bis auf die Insel GI0, ein der Bakteriophagen P4 Integrase-Familie verwandtes Gen, welches die gerichtete Integration

bzw. Excision der Insel vermittelt. GI0 weicht somit von der üblichen Definition einer genomischen Insel ab, da sie weder für ein Integrase-Gen kodiert, noch kurze, direkte Wiederholungssequenzen (DR) an den Enden aufweist, welche die ortsspezifische Rekombination zur Excision der Insel vermitteln (Hacker & Carniel, 2001; Hacker & Kaper, 2002). Mit einer Größe von etwa 145 kb liegt GI0 aber in der für genomische Inseln vorgeschlagenen Größenordnung von 10 - 502 kb (Gaillard *et al.*, 2006; Hacker & Carniel, 2001). Dass GI0 neben einem niedrigen GC-Gehalt auch verschiedene Gencluster aufweist, welche z.B. für den Abbau von aromatischen Verbindungen wie Phthalat oder Protocatechuat kodieren, ist ein deutlicher Hinweis auf horizontalen Gentransfer. Nach der Theorie des „selfish operons“ kommt es besonders auf mobilen genetischen Elementen zur Entwicklung von Genclustern, da Gene, deren Produkte zu einer bestimmten Funktion beitragen und die zudem gebündelt vorliegen, einen Selektionsvorteil hinsichtlich der lateralen Verbreitung besitzen (Lawrence & Roth, 1996).

	GI0	GI1	GI2	GI3	GI4	GI5	GI6	GI7
Größe [kb]	145	255	143	102	47	86	159	89
IS-Elemente	6	13	5	3	0	2	5	2

Tabelle 6-2 Bioinformatisch ermittelte Größen der genomischen Inseln von *B. petrii* (verändert nach (Gross *et al.*, 2008)) und Anzahl der IS-Elemente pro Insel (<https://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/gendb-2.2>).

Vier der genomischen Inseln von *B. petrii* (GI1, GI3, GI6 und GI7) integrieren in das 3'-Ende von tRNA-Genen, welches als attB bezeichnet wird und die chromosomale „attachment site“ darstellt. Durch die Wiederholung des 3'-Endes der jeweiligen tRNA entsteht dabei ein 14 - 18 bp langes DR am Ende der jeweiligen Insel. GI7 besitzt neben Schwermetall- und Arsen-Resistenzsystemen Gene für den konjugalen Transfer mit Ähnlichkeiten zu plasmid-assoziierten Typ IV Sekretionssystemen und somit Merkmale eines konjugativen Transposons (Burrus *et al.*, 2002; Cascales & Christie, 2003). Auch GI4 und GI5 weisen Merkmale von konjugativen Transposons auf, da sie ebenfalls ähnliche Gene für den konjugalen Transfer aufweisen und nicht an tRNAs gebunden ins Genom integriert vorliegen (Burrus *et al.*, 2002). Zudem weist GI4 eine große Ähnlichkeit zu Tn4371 von *Ralstonia* sp. Stamm A5 auf, welches für Gene des Biphenyl-Abbaus kodiert (Gross *et al.*, 2008; Toussaint *et al.*, 2003). Die Insel GI4 trägt allerdings Gene, welche den Metabolismus einer unbekannt aromatischen Komponente vermitteln.

Erste Hinweise auf eine genomische Variabilität von *B. petrii* ergaben sich bereits während des im Abschnitt 6.1.2 diskutierten Langzeitwachstums in Mainwasser. Während dieses Versuchs wurden drei phänotypisch unterscheidbare *B. petrii* Varianten isoliert, welche sich sowohl auf genomischer als auch auf Proteomebene vom Wildtypstamm unterschieden. Im Pulsfeldgel konnte gezeigt werden, dass diesen Varianten im Vergleich zum Wildtyp drei Banden fehlten. Dies entspricht einem Verlust von ungefähr 500 kb an genetischem Material, wenn man die zweite markierte Bande in Abbildung 5-21 als Doppelbande annimmt. Aufgrund ihrer Intensität könnte es sich aber auch um eine Dreifachbande handeln, was dann einem Verlust von etwa 615-620 kb entsprechen würde. Die Untersuchung der *B. petrii*

Varianten auf das Vorhandensein von genomischen Inseln mittels Southern Blot Analysen zeigte einen Verlust der Inseln GI1, GI3, GI5 und GI6, was etwa 584 kb DNA entspräche, wenn man allein die vorgeschlagenen Grenzen der genomischen Inseln berücksichtigt (siehe Tabelle 6-2). Für die genomische Insel GI1 konnte aber bereits im Southern Blot gezeigt werden, dass der Bereich bis zum DR der Insel GI2 fehlt (Abbildung 5-26). Dieses Ergebnis wurde auch durch die Detektion von ringförmigen Intermediaten, welche durch die Excision von genomischen Inseln gebildet werden (Qiu *et al.*, 2006; Sentchilo *et al.*, 2003a), bestätigt, da nur für GI1* und nicht für GI1 bzw. für GI2 und nicht für GI2* eine Ringbildung nachgewiesen werden konnte (Abbildung 5-28/Tabelle 5-10). Der fehlende DNA-Bereich wäre damit um etwa 11 kb größer. Interessanterweise konnte für die Insel GI5 kein ringförmiges Intermediat mit dem verwendeten PCR-Ansatz nachgewiesen werden. Kürzlich durchgeführte Microarray Analysen bestätigten aber das Fehlen der Insel GI5 in den *B. petrii* Varianten und zeigten zudem, dass der fehlende Bereich vermutlich um etwa 19 kb größer ist, als man aufgrund der bioinformatischen Untersuchungen erwartet hätte (persönliche Mitteilung Karin Schmitt). Die fehlende DNA-Menge in den *B. petrii* Varianten beläuft sich demnach auf etwa 614 kb, was auch das Ergebnis der PFGE unter Annahme einer Dreifachbande bestätigen würde.

Das unterschiedliche Wachstumsverhalten der *B. petrii* Varianten (Abbildung 5-22) und die Unterschiede in der Proteinexpression (Abbildung 5-24), welche zeigen, dass sich die Varianten voneinander unterscheiden, deuten darauf hin, dass zusätzlich zu den in allen drei Varianten fehlenden genomischen Inseln weitere Unterschiede vorliegen müssen. Mittels Mikroarray Analysen sollten solche Unterschiede, die z.B. nur einzelne Gene oder kleinere DNA-Bereiche betreffen können, detektierbar sein und könnten weitere Erkenntnisse zur Variabilität von *B. petrii* liefern.

Die Daten der Ringbildungs-PCRs zeigen zudem, dass auch die Inseln GI2, GI4 und GI7 sowie die Kombinationen GI2+GI3 und GI1-GI3 als ringförmige Intermediate vorliegen können. Mikroarray Analysen deuten zusätzlich darauf hin, dass in weiteren Varianten auch nur Teile verschiedener Inseln, darunter auch Teile der Insel GI0, fehlen können (persönliche Mitteilung Karin Schmitt). Solche differentiellen Excisionen können durch Rekombination an gleichen oder ähnlichen DR-Strukturen stattfinden, wie dies für die Inseln GI1 bis GI3 in Abschnitt 6.3.1 diskutiert wird. Vielleicht spielen aber auch in den Inseln vorkommende IS-Elemente, welche die homologe Rekombination innerhalb des Genoms erleichtern (Sigquier *et al.*, 2006), eine Rolle für den Verlust von bestimmten DNA-Bereichen. Dies könnte den teilweisen Verlust von genomischen Inseln erklären.

6.3.1 Die genomischen Inseln GI1, GI2, GI3 und GI6 von *B. petrii* DSM 12804 und ihre Ähnlichkeit zum *clc*-Element von *Pseudomonas* sp. Strain B13

Die genomischen Inseln GI1, GI2, GI3 und GI6 von *B. petrii* weisen bestimmte Merkmale auf, aufgrund welcher man sie in eine eigene Gruppe einteilen kann. Am auffälligsten ist das Vorhandensein eines Integrase-Gens mit einer großen Ähnlichkeit zur Int-B13 Integrase aus dem *clc*-Element von *Pseudomonas* sp. Strain B13. Das *clc*-Element vermittelt metabolische Fähigkeiten, wie den Abbau von chloroaromatischen Verbindungen, und lässt sich in zwei Bereiche einteilen. Der erste Teil dieser genomischen Insel beinhaltet das Integrase-Gen und die *clc*-Gene, der zweite Teil ist konserviert und spielt vermutlich eine Rolle für Konjugation

und Transfer (Gaillard *et al.*, 2006) (2.5.1.1). Die *clc*-ähnlichen GIs von *B. petrii* sind zudem vergleichbar zum *clc*-Element in *Pseudomonas* in das 3'-Ende einer tRNA^{Gly} integriert, was zur Bildung von 18 bp langen DR-Sequenzen führt (Abbildung 5-27 und Abbildung 5-28). Zwar ist die Insel GI2 nicht direkt in ein tRNA-Gen integriert, dafür weist sie an den Enden 14 bp lange DR-Sequenzen auf, welche mit dem 3'-Ende der tRNA^{Gly}-Gene der Inseln GI1 und GI3 bis auf eine Base übereinstimmen (siehe Tabelle 6-3). Interessanterweise stimmen die 14 bp DR-Sequenzen dafür genau mit dem 3'-Ende der tRNA^{Gly} aus *Pseudomonas putida* F1 überein, für die eine Integration des *clc*-Elements gezeigt wurde (Ravatn *et al.*, 1998a).

GAC TCG TCT CCC GCT CCA	18 bp DR-Sequenz von GI1 und GI3
. . . . CG TTT CCC GCT CCA	14 bp DR-Sequenz von GI2
TTC CCA TCA CCC GCT CCA	18 bp DR-Sequenz von GI6
GTC TCG TTT CCC GCT CCA	18 bp Ende der tRNA ^{Gly} von <i>P. putida</i>

Tabelle 6-3 DR-Sequenzen der genomischen Inseln GI1, GI2, GI3 und GI6 im Vergleich zur tRNA^{Gly} von *Pseudomonas putida* F1. Für GI1, GI3 und GI6 stellen die DR-Sequenzen das 3'-Ende der tRNA^{Gly} dar, in welche sie integriert sind.

Ähnlich wie beim *clc*-Element lassen sich die genomischen Inseln GI1, GI2, GI3 und GI6 in zwei Bereiche gliedern (Gaillard *et al.*, 2006). In GI1, GI2 und GI3 folgt auf das Integrase-Gen ein Bereich, der für die metabolischen Fähigkeiten, wie z.B. für den Umsatz von diversen aromatischen Komponenten kodiert und in den drei Inseln unterschiedlich groß ausgeprägt ist. In GI3 beinhaltet dieser Bereich Gencluster für den Chlorobenzoat-Stoffwechsel und für den Metabolismus einer unbekannt aromatischen Komponente, in GI2 befinden sich hier Gene für den Benzoat- und Catechol- sowie den Nitril-Stoffwechsel und in GI1 treten gleich mehrere Gencluster für den Abbau von unbekannt aromatischen Komponenten auf. In der zweiten Hälfte der Inseln befinden sich, vergleichbar zum *clc*-Element, Gene, welche für die DNA Topoisomerase III, ein „single stranded DNA-binding“ Protein und ein „chromosome partitioning“ Protein kodieren. Gaillard *et al.* postulieren, dass dieser Bereich im *clc*-Element eine Rolle für Konjugation und Transfer spielt, der ähnlich der Plasmidreplikation funktioniert, nachdem sich das *clc*-Element als ringförmiges Intermediat ausgeschnitten hat (Gaillard *et al.*, 2006). GI6 weicht von dieser Organisation dahingehend ab, dass die postulierten Konjugations- und Transfergene direkt dem Integrase-Gen folgen und sich dann erst der metabolische Bereich anschließt, was auf eine interne Umstrukturierung oder unterschiedliche Herkunft der Insel hindeuten könnte. Der metabolische Bereich kodiert hier z.B. für „Multi Drug“-Resistenzen, ein Eisenaufnahmesystem und ein Typ III Restriktions-Modifikationssystem, beinhaltet aber keine Gencluster für den Aromaten-Stoffwechsel.

Von Ihrer Struktur her lassen sich diese Inseln zu einer Familie syntenischer genomischer Inseln zuordnen, wie sie von Mohd-Zain *et al.* vorgeschlagen wurde (Mohd-Zain *et al.*, 2004). Diese Inseln sind auf β - und γ -Protobakterien beschränkt, integrieren in ein tRNA-Gen, besitzen ein Integrase-Gen und weisen einen Bereich konservierter Gene auf, welche z.T. unbekannte Funktion besitzen oder aber eine Rolle für Replikation und Transfer spielen können, wie z.B. *parA*, *dnaB*, *ssb* und *topB*. Diese Inseln besitzen zusätzlich einen variablen Bereich, welcher unterschiedliche Gene für eine habitatspezifische Anpassung trägt (Dobrindt *et al.*, 2004; Mohd-Zain *et al.*, 2004). Dies können z.B. Gene für eine Antibiotikaresistenz sein, wie für die GI ICEHin1056 von *H. influenzae* beschrieben (Dimopoulou *et al.*, 2002),

Virulenzfaktoren, wie für die GIs PAPI-1 oder pKLC102 von *P. aeruginosa* gezeigt wurde (Klockgether *et al.*, 2004; Qiu *et al.*, 2006), oder Gene mit metabolischer Funktion, wie sie für das *clc*-Element beschrieben wurden (Gaillard *et al.*, 2006). Ähnliche genomische Inseln finden sich u.a. auch in *Ralstonia eutropha* JS705 (Muller *et al.*, 2003), *Burkholderia xenovorans* LB400 (Mondello, 1989) oder *Xylella fastidiosa* 9a5c (Simpson *et al.*, 2000). Auch die Inseln PAPI-2 und PAPI-3 zweier verschiedener *P. aeruginosa* Klone zählen zu dieser Gruppe (Larbig *et al.*, 2002). Genomische Inseln dieser Familie sind demnach weit verbreitet und vermitteln verschiedenste Eigenschaften.

Die größte Ähnlichkeit zum *clc*-Element besitzt die genomische Insel GI3. Sie hat mit etwa 102 kb eine ähnliche Größe wie das *clc*-Element, welches 105 kb groß ist, und besitzt eine identische Int-B13 Integrase. Des weiteren kodiert GI3 ebenfalls für die *clc*-Gene des Chlorbenzoat-Stoffwechsels und weist einen zur zweiten Hälfte des *clc*-Elements homologen konservierten Bereich auf, welcher wahrscheinlich eine Rolle für Konjugation und Transfer spielt (Gaillard *et al.*, 2006). In Abbildung 6-2 ist zu sehen, dass sich die beiden Inseln hauptsächlich in zwei Genclustern unterscheiden.

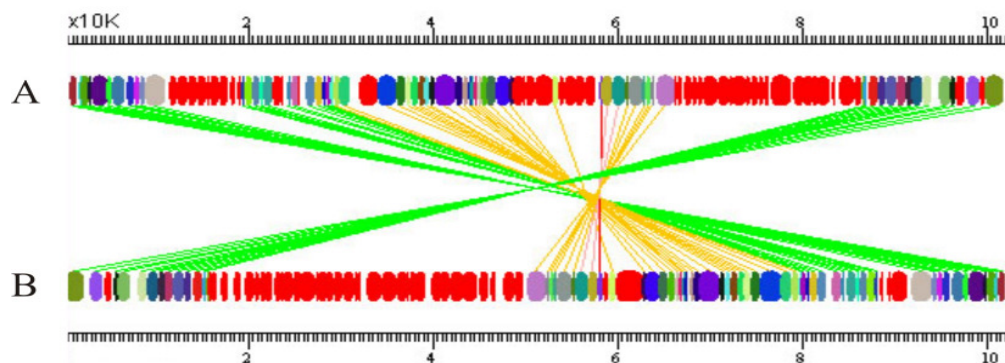


Abbildung 6-2 Vergleich der genomischen Insel GI3 aus *B. petrii* DSM 12804 (A) mit dem *clc*-Element aus *Pseudomonas* sp. Stamm B13 (B). Stammspezifische Gene sind rot gekennzeichnet. Für die Erstellung der Abbildung wurde das Programm InGeno verwendet (<http://ingenio.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>).

Im *clc*-Element beinhaltet dieses Cluster die *amn*-Gene für den Aminophenol-Stoffwechsel. Dieser Bereich stellt dort eine Region mit einem niedrigeren GC-Gehalt als im restlichen *clc*-Element dar und wurde vermutlich als Cluster in einen Vorläufer des *clc*-Elements integriert. In GI3 umfasst der spezifische Bereich, welcher für den Abbau einer unbekannt aromatischen Komponente kodiert, etwa 20 kb und ist an beiden Enden von Transposons begrenzt. Zudem weisen alle Leserahmen in diesem Bereich die gleiche Transkriptionsrichtung auf, so dass hier vermutlich ebenfalls ein komplettes Cluster integriert wurde. Weitere kleine spezifische Bereiche auf GI3 setzen sich hauptsächlich aus IS-Elementen oder Integrase/Rekombinase-Genen zusammen. Die Evolution des *clc*-Elements scheint demnach durch den Erwerb und vielleicht auch durch Austausch von Genen vorwiegend im variablen Bereich stattzufinden. *B. xenovorans* LB400 besitzt beispielsweise ein *clc*-Element mit beinahe 100 % Übereinstimmung zum *Pseudomonas clc*-Element. Die einzige Abweichung ist ein etwa 20 kb großer Bereich, welcher von IS-Elementen begrenzt ist und sekundär in das *clc*-Element integriert wurde (Gaillard *et al.*, 2006). *R. eutropha* JS705 besitzt ebenfalls ein *clc*-Element, welches durch den Erwerb einer 10 kb großen Region zusätzliche metabolische Gene erhalten hat (Muller *et al.*, 2003). Diese Daten bestätigen, dass

sich das *clc*-Element durch den Erwerb weiterer Gencluster zunehmend verändern kann. Möglicherweise sind so auch die anderen *clc*-ähnlichen GIs von *B. petrii* entstanden.

Prozentuale Ähnlichkeit (AS)	<i>clc</i> -Element	PAGI-2	<i>X. fastidiosa</i>
GI1	89,2 %	87,6 %	94,5 %
GI2	68 %	70,8 %	69,7 %
GI3	100 %	81 %	91,1 %
GI4	61,9 %	63 %	61,9 %

Tabelle 6-4 Prozentuale Ähnlichkeiten der Int-B13 Integrasen aus *B. petrii* mit ähnlich großen P4-Integrasen des *clc*-Elements, der genomischen Insel PAGI-2 aus *P. aeruginosa* Klon C und einer 67 kb großen genomischen Insel aus *X. fastidiosa*. (AS: Aminosäuresequenz).

Wie bereits erwähnt, lassen sich die genomischen Inseln GI1, GI2, GI3 und GI6 aufgrund ihres Integrase-Gens in eine Gruppe mit dem *clc*-Element einteilen. Dieses kodiert für eine ortsspezifische Integrase der Bakteriophagen P4 Integrase-Familie, welche sich aber in ihrer Länge von den typischen P4-Integrasen unterscheidet. Diese kommen z.B. in anderen GIs von *B. petrii* vor. Der N-terminale Bereich ist bei der längeren Integrase Form konserviert und die Erweiterung bezieht sich auf den C-terminalen Bereich, der Homologie zu einer putativen Transposase von *Pseudomonas* sp. Strain B4 zeigt. Integrasen mit einer ähnlichen C-terminalen Erweiterung sind bisher nur für das *clc*-Element, die Insel PAGI-2 und eine 67 kb große GI von *X. fastidiosa* beschrieben worden (Larbig *et al.*, 2002; van der Meer *et al.*, 2001). Da im *Xylella* Genom ein Leserahmen, der nur für den C-terminalen Integrasebereich kodiert, nochmals an anderer Stelle im Genom auftritt, liegt die Vermutung nahe, dass die Int-B13-ähnliche Integrase durch Rekombination dieses ORF mit einer typischen P4 Integrase entstanden ist (van der Meer *et al.*, 2001).

Die Integrasen der Inseln GI1 und GI3 sind den P4 Integrasen aus PAGI-2 und *Xylella* ähnlicher, als die Integrasen der Inseln GI2 und GI6. Dies spiegelt die leicht abweichende Struktur dieser Inseln wieder (siehe Tabelle 6-4), was besonders für die Insel GI6 deutlich wird, deren Integrase die geringste Ähnlichkeit aufweist und die sich strukturell am stärksten von den andern GIs unterscheidet. Interessant ist die größere Ähnlichkeit der GI1 Integrase zur *Xylella* Integrase im Vergleich zur Integrase aus GI3. Dies könnte auf eine unterschiedliche Herkunft der Inseln GI1 und GI3 hindeuten.

Da die Ringbildungs-PCR Analysen zeigten, dass sich die genomischen Inseln GI1, GI2 und GI3 von *B. petrii* in verschiedenen Kombinationen aus dem Genom ausschneiden lassen, ist es schwierig ein Integrationsereignis oder womöglich mehrere Integrationsereignisse dieser drei Inseln nachzuvollziehen. Betrachtet man den Integrationsbereich, wenn alle drei Inseln ausgeschnitten sind, so besitzt dieser die gleiche Struktur wie der Integrationsbereich für das *clc*-Element in *Ralstonia* sp. Strain S11 (Ravatn *et al.*, 1998b): eine tRNA^{Cys}, auf welche ein IR und eine tRNA^{Gly} folgt, in welche die Integration stattfindet. Es wäre aber auch denkbar, dass die beiden tRNA^{Gly}-Gene, d.h. das, in welches die GI1 und das, in welches die GI3 integriert sind, zum ursprünglichen *B. petrii* Genom gehören und dass die jeweilige Insel präferentiell in die eine oder andere tRNA integriert. In *P. aeruginosa* Klon C hat die Integration von zwei unterschiedlichen GIs zur Bildung zweier neuer Klone geführt, welche

aus unterschiedlichen Lebensräumen isoliert wurden. Die GI PAGI-2 integrierte dabei in die zweite und die GI PAGI-3 in die erste von zwei aufeinander folgenden tRNA^{Gly}-Genen (Larbig *et al.*, 2002). Auch in *B. petrii* könnten zwei unabhängige Integrationsereignisse in die beiden tRNA^{Gly}-Gene stattgefunden haben. Hierfür spräche z.B. der höhere GC-Gehalt in dem etwa 11 kb großen Bereich zwischen dem Anfang von GI1 und dem Ende von GI2, welcher mit 67,3 % eher dem typischen GC-Gehalt der Bordetellen entspricht und daher einen ursprünglichen Genombereich darstellen könnte. Ob die genomischen Inseln GI2 und GI3 gemeinsam übertragen wurden, oder ob GI2 erst nachträglich in GI3 integriert hat, kann daher nicht gesagt werden.

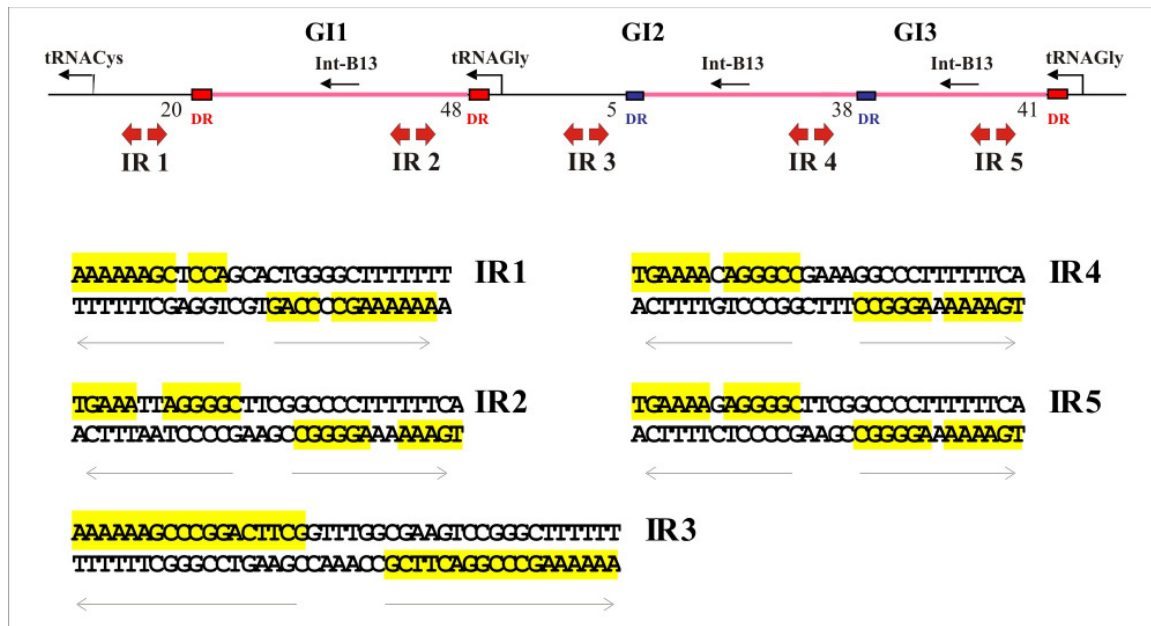


Abbildung 6-3 Schematische Übersicht und Sequenzen der IR-Strukturen des Integrationsbereichs der genomischen Inseln GI1-GI3 in *B. petrii*. Die Zahlen geben den Abstand vom DR an. DR: direct repeat; IR: inverted repeat.

Wenn die Insel GI1 unabhängig in das erste der beiden tRNA^{Gly}-Gene integriert ist, würde man erwarten, dass eine Excision ebenfalls an dieser Stelle stattfindet. Dies konnte aber in keinem Versuchsansatz gezeigt werden und auch Microarray Analysen bestätigten die Excision der Insel GI1 an der DR-Sequenz, welche die Insel GI2 begrenzt. Ein ringförmiges Intermediat wird demnach von der um etwa 11 kb größeren Insel GI1* gebildet. Interessanterweise konnte das Auftreten von IR-Sequenzen stromabwärts der DR-Sequenzen für verschiedene Integrationsbereiche von *clc*-ähnlichen genomischen Inseln beobachtet werden (Larbig *et al.*, 2002; Ravatn *et al.*, 1998b; van der Meer *et al.*, 2001). Diese spielen wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle für die Integration/Excision von genomischen Inseln, da der Einbau des *clc*-Elements nur in solche tRNA^{Gly}-Gene beobachtet wurde, welche stromabwärts ein IR aufwiesen (van der Meer *et al.*, 2001). In Nachbarschaft der DR-Sequenzen der genomischen Inseln GI1, GI2 und GI3 treten, wie in Abbildung 6-3 dargestellt, ebenfalls IR-Sequenzen auf. Nur das IR3, welches direkt nach dem Ende von GI2 lokalisiert ist, weist einen perfekten palindromischen Bereich von 18 bp und den geringsten Abstand zum DR auf. Es wäre denkbar, dass diese Struktur bevorzugt von der Integrase erkannt wird und die Excision der angrenzenden genomischen Inseln daher an dieser Stelle stattfindet. Da nicht bekannt ist, welche der Integrasen der Inseln GI1 bis GI3 an der Excision beteiligt sind,

könnte die genomische Insel GI1* auch durch eine der Integrasen der Inseln GI2 oder GI3 ausgeschnitten werden, was wiederum die auffällige Präferenz der Excisionsstelle am DR der Insel GI2 erklären könnte.

Um die Funktionalität der Integrasen zu untersuchen, wäre der Vergleich der Excisionsmuster verschiedener Integrase-Deletionsmutanten interessant. Expressionsstudien hingegen würden wahrscheinlich durch die große Ähnlichkeit der Integrasen v.a. im N-terminalen Bereich erschwert werden.

Am Integrationsort der genomischen Insel GI6 konnten nur relativ kurze und unvollständige IR-Strukturen detektiert werden. Dies könnte wiederum auf eine unterschiedliche Sequenzspezifität der entsprechenden Integrase hinweisen, da sie, wie in Tabelle 6-4 aufgeführt, die geringste Ähnlichkeit zu den IntB13-ähnlichen Integrasen aufweist.

6.3.2 Stabilität und Übertragbarkeit von GI3

In den *B. petrii* Varianten, welche unter nährstofflimitierten Bedingungen isoliert wurden, wurde zuerst ein Verlust der genomischen Inseln GI1, GI3, GI6 und GI5 detektiert. Da aber auch Hinweise auf den Verlust von GIs unter normalen Wachstumsbedingungen in LB auftraten (Daten nicht gezeigt) wurde die Stabilität am Beispiel der genomischen Insel GI3, welche die größte Ähnlichkeit zum *clc*-Element aufweist, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass unter nicht-selektiven Wachstumsbedingungen der Anteil an Bakterien, welche die Insel GI3 noch besitzen, nach 120-150 Generationen nur noch 1,5 % beträgt. Ein Verlust der genomischen Insel GI3, welche für den Abbau von aromatischen Komponenten, wie z.B. 3-Chlorbenzoat (3-CBA) kodiert, könnte durch das Fehlen der entsprechenden Komponenten hervorgerufen werden, da keine positive Selektion mehr stattfindet. Ein ähnlicher Zusammenhang mit der Substratverfügbarkeit wurde für *P. putida* F1 beobachtet (Ravatt *et al.*, 1998a). Bei der Übertragung des *clc*-Elements auf diesen Stamm, wurde in selektivem Medium (+ Chlorobenzol) eine Tandemamplifikation beobachtet, so dass bis zu acht Kopien im Genom des Rezipienten vorlagen. Unter nicht-selektiven Wachstumsbedingungen (- Chlorobenzol) wurde das *clc*-Element über einen Zeitraum von 220 Generationen bis auf eine Kopie deletiert.

Da *B. petrii* verschiedene aromatische Komponenten, darunter auch 3-CBA, abbauen kann, scheint die genomische Insel GI3 funktional zu sein (Gross *et al.*, 2008). Es wäre vorstellbar, dass sie in einem 3-CBA kontaminierten Lebensraum auf *B. petrii* übertragen wurde, wo sie für das Bakterium einen Selektionsvorteil hinsichtlich eines breiteren Spektrums an verwertbaren Nahrungsquellen darstellte. Unter der Annahme einer positiven Selektion der GIs ist der Verbleib der anderen GIs in den Varianten interessant, für die, bis auf GI0, mittels PCR eine mögliche Excision nachgewiesen werden konnte. Von den *clc*-ähnlichen GIs von *B. petrii* ist in den Varianten beispielsweise die Insel GI2 erhalten geblieben, welche unter bestimmten Bedingungen einzeln oder in Kombination mit GI3 bzw. GI1 und GI3 deletiert werden kann. Eine Stabilisierung dieser Insel könnte möglicherweise damit erklärt werden, dass im Kulturmedium des Langzeitwachstumsversuchs, d.h. im Mainwasser, eine für die Insel GI2 verwertbare Komponente vorhanden war, so dass ein Verlust von Nachteil für das Bakterium gewesen wäre. Möglicherweise spielt auch die Wachstumsphase eine Rolle für den Verlust von GIs. Für die Int-B13 Integrase des *clc*-Elements wurde z.B. eine Induktion der Integraseexpression bei Eintritt in die stationäre Phase beobachtet, wobei hier kein Verlust der

GI beobachtet wurde, sondern eine Zunahme des Anteils an ringförmigem Intermediat und damit verbunden eine erhöhte Übertragungsrate (Ravatt *et al.*, 1998b). Aktivierend auf eine Integraseexpression wirkten sich hier zudem nährstofflimitierte Bedingungen und die Zugabe von 3-CBA aus. Möglicherweise könnte in *B. petrii* eine verstärkte Integraseexpression nicht nur für die Übertragung eine Rolle spielen, sondern unter bestimmten Bedingungen auch zu einem Verlust von genomischen Inseln führen.

Für das *clc*-Element von *Pseudomonas* sp. Strain B13 wurde gezeigt, dass es sich selbst auf andere β - und γ -Proteobakterien übertragen kann. In einem Membran-Biofilm-Reaktor, in welchem Abwasser als 3-Chlorbenzoat-Quelle diente, wurde das *clc*-Element beispielsweise von dem Inokulumstamm *P. putida* BN210 auf verschiedene Bakterienarten übertragen, darunter *P. aeruginosa*, *Ralstonia* sp. und einen *Sphingobacterium*-ähnlichen Keim (Springael *et al.*, 2002). Eine Übertragung unter selektiven Bedingungen, d.h. in Gegenwart von 3-CBA, würde eine vermehrte Integraseexpression und damit eine erhöhte Transferrate bedeuten (Ravatt *et al.*, 1998b; Ravatt *et al.*, 1998c). Beim *clc*-Element spielen zwei Promotoren eine Rolle für die Transkription des Integrase-Gens, wobei nur der Promotor der integrierten Form, P_{int} , einer Regulation unterliegt. Diese Regulation ist interessanterweise nur jeweils in einem Teil der Bakterienzellen zu beobachten und die Transkription ist nie so stark wie die, welche vom zweiten Promotor vermittelt wird (Sentchilo *et al.*, 2003a). Dieser zweite Promotor, P_{circ} , ist konstitutiv und liegt am linken Ende der GI. Er vermittelt die *int-B13* Transkription in der zirkulären Form, was die ortsspezifische Integration des ringförmigen Intermediats nach der Konjugation gewährleistet (Sentchilo *et al.*, 2003a).

Welche Rolle die Regulation der Int-B13 Integrase für die Übertragbarkeit der genomischen Insel GI3 von *B. petrii* spielt, konnte bisher nicht geklärt werden. Eine Übertragung auf *B. bronchiseptica* konnte aber in einem Konjugationsexperiment nachgewiesen werden (Abschnitt 5.5.7), wobei die Konjugation unter nicht-selektiven Bedingungen durchgeführt wurde, d.h. ohne 3-CBA als stimulierendes Substrat. Um einen regulatorischen Einfluss auf die *int-B13* Transkription zu untersuchen, wurden erste Expressionsstudien via Realtime-PCR mit der Konjugante durchgeführt. Diese deuten auf eine sehr geringe Integraseexpression hin, welche im Gegensatz zum *clc*-Element in der exponentiellen Phase etwas höher zu sein scheint, als in der stationären Phase (persönliche Mitteilung, Susanne Bauer). Zwar findet beim *clc*-Element in der integrierten Form auch nur eine sehr geringe Integraseexpression statt (Sentchilo *et al.*, 2003a), möglicherweise liegt der GI3 Excision und Integration aber eine dem *clc*-Element abweichende Regulation zugrunde, so dass die Expression hier während des logarithmischen und nicht während des stationären Wachstums erhöht ist. Interessant wäre es, in diesem Zusammenhang den Einfluss von 3-CBA zu untersuchen, z.B. ob 3-CBA, wenn es als Kohlenstoffquelle genutzt wird, die Transkriptmenge der Integrase ebenfalls beeinflusst. Auch eine Untersuchung des Transkriptionsstarts könnte Rückschlüsse auf eine mögliche Regulation zulassen und aufzeigen, ob in GI3 auch zwei alternative Promotoren vorliegen, welche eine differentielle Integraseexpression vermitteln. Andererseits wäre es auch denkbar, dass die Expression der Integrase konstitutiv ist und somit eine Übertragung oder auch ein Verlust der Insel GI3 zu einem bestimmten Anteil immer stattfindet. Erste Versuche zur Ermittlung des Transkriptionsstartpunktes mittels 5'-RACE deuten auf eine gemeinsame Transkription mit dem stromaufwärts gelegenen tRNA-Gen hin (persönliche Mitteilung, Susanne Bauer), was wiederum ein Hinweis auf eine konstitutive Expression sein könnte. In

diesem Fall wäre es sicherlich interessant herauszufinden, ob möglicherweise stabilisierende Faktoren existieren. Auch hier könnte 3-CBA ein geeigneter Kandidat sein.

Es wurde gezeigt, dass nur die Insel GI3 von *B. petrii* in der *B. bronchiseptica* Konjugante ins Chromosom integriert (Abbildung 5-39). Möglicherweise werden die anderen Inseln unter den gewählten Bedingungen nicht oder nur zu einem viel geringeren Anteil übertragen. Ein stabilisierender Effekt der Tetracyclin-Resistenzkassette, welche zum Zweck des Konjuganten-Screenings in die genomische Insel GI3 integriert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden und könnte sich positiv auf die Übertragung dieser Insel ausgewirkt haben. Ein induzierbarer Effekt von bestimmten Antibiotika auf die Übertragungsrate von Prophagen oder konjugativen Transposons wurde z.B. für den Shigatoxin kodierenden Bakteriophagen in *E. coli* (Zhang *et al.*, 2000) oder das Tn916 beschrieben, welches verstärkt übertragen wird, nachdem der Donorstamm in tetracyclinhaltigem Medium angezogen wurde (Showsh & Andrews, 1992).

Die ortsspezifische Integration von GI3 wurde durch die Integration in ein *B. bronchiseptica* tRNA^{Gly}-Gen bestätigt. Drei der vier tRNA^{Gly}-Gene von *B. bronchiseptica* weisen stromabwärts eine IR-Sequenz auf. Die IR-Sequenzen der tRNA44 und tRNA45 besitzen zudem die größte Ähnlichkeit zu den *B. petrii* IR-Sequenzen, so dass in beide tRNA-Gene eine Integration der Insel GI3 vorstellbar gewesen wäre. Möglicherweise wurde die tRNA45 aufgrund ihres Abstandes vom IR bevorzugt, welcher nur 6 bp beträgt. Im Gegensatz dazu beträgt der Abstand von der tRNA44 zum IR 40 bp.

Dieses Ergebnis macht erneut die Bedeutung des HGT für die Bakterienevolution deutlich, durch den in einem einzigen Schritt neue Stoffwechselwege vermittelt werden. Ein pathogener Keim könnte somit genetisches Material von einem Umweltkeim erhalten, falls sie in einem gemeinsamen Habitat aufeinander treffen. Aber auch Umweltkeime könnten auf diese Weise z.B. Pathogenitätsfaktoren erhalten, was z.B. hinsichtlich der Entwicklung von klinisch relevanten Stämmen von *B. petrii* interessant sein könnte.

6.4 Phylogenetische Analyse verschiedener *B. petrii* Isolate

Seit der ersten Beschreibung des Umweltkeims *B. petrii* (von Wintzingerode *et al.*, 2001) wurden wiederholt Bakterien aus Umweltproben isoliert, welche der Gattung *Bordetella* zugeordnet wurden und den Abbau verschiedener aromatischer Verbindungen katalysierten (Eriksson *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007; Takenaka *et al.*, 2002). Aus mikrobiellen Konsortien, welche aromatische Verbindungen wie Naphthalin oder 1,2,4-Trichlorbenzol abbauen können, wurden weitere *B. petrii* Stämme isoliert (Bianchi *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007). Andere *B. petrii* Isolate wurden in Assoziation mit Pflanzenwurzeln und Tiefseeschwämmen beschrieben (Chowdhury *et al.*, 2007; Sfanos *et al.*, 2005). Interessanterweise wurden *B. petrii* Isolate nicht nur in Umweltproben nachgewiesen, sondern es wurden bereits mehrere klinische Isolate beschrieben. Zwei davon wurden aus entzündlichen Veränderungen des Knochens im Kiefer bzw. im Mittelohr isoliert (Fry *et al.*, 2005; Stark *et al.*, 2007) und kürzlich wurden vier *B. petrii* Isolate im Respirationstrakt von Patienten mit Zystischer Fibrose nachgewiesen (Spilker *et al.*, 2008).

Anhand der DNA-Sequenzen der 16S ribosomalen RNA-Gene sollte ein erweiterter *Bordetella*-Stammbaum erstellt werden, der verschiedene Vertreter der neu beschriebenen

B. petrii Isolate mit einschließt. Der Stammbaum der Gattung *Bordetella* enthielt bisher das *B. bronchiseptica*-Cluster und weitere Äste über welche die „neuen“ Arten eingegliedert wurden. *B. petrii* wurde an der Basis der Gattung *Bordetella* eingeordnet (Gerlach *et al.*, 2001). In Abbildung 5-43 wird deutlich, dass durch das Hinzufügen von *B. petrii* Isolaten aus unterschiedlichen Habitaten ein zu den pathogenen *Bordetellen* abgegrenztes Cluster gebildet wird. Bei den Schwammisolaten N122, N123 und N134 handelt es sich wahrscheinlich um Vertreter des gleichen Stammes, da sie sowohl identische 16S rDNA-Sequenzen aufweisen als auch ein identisches Bandenmuster im Pulsfeldgel zeigen (Abbildung 5-42). Interessanterweise scheinen sie anhand der 16S rDNA eine engere Verwandtschaft zum wurzellosoziierten Isolat C13 zu besitzen, als zum Schwammisolat R521. Die Isolate E3 und F2 werden zusammen mit den klinischen Isolaten direkt benachbart zu *B. petrii* eingeordnet. Diese nahe Verwandtschaft mit *B. petrii* spiegelt sich auch in ihrer Fähigkeit zum Aromatenabbau wieder. Diese beiden Isolate besitzen eine identische 16S rDNA-Sequenz, scheinen sich aber leicht in ihrer Kapazität zum Abbau von 1,2,4-Trichlorbenzen zu unterscheiden (Wang *et al.*, 2007). Interessant erscheint, dass die beiden klinischen Isolate ebenfalls recht nahe zu *B. petrii* eingeordnet werden. Auf der 16S rDNA Ebene erscheinen diese beiden Isolate wiederum identisch, genauere Untersuchungen haben aber gezeigt, dass sie sich deutlich in ihrer Fähigkeit zu anaerobem Wachstum und zur Motilität voneinander unterscheiden (Stark *et al.*, 2007).

Zwar ist das 16S rRNA-Gen ein häufig verwendeter phylogenetischer Marker, welcher die Vorteile besitzt, dass er ubiquitär vorhanden, funktional konstant und keinem Anpassungsdruck an verschiedene Lebensumstände unterworfen ist. Gleichzeitig ist er aber variabel genug, so dass zufällig angehäuften Mutationen die natürliche Mutationsrate widerspiegeln (Woese, 1987). Dennoch scheint er hier nicht ausreichend zu sein, um die genauen Verwandtschaftsverhältnisse wiederzugeben. Für eine genauere Analyse des Verwandtschaftsgrades der einzelnen Isolate könnten zusätzlich weitere Marker herangezogen werden. Dies können Haushaltsgene wie *rpoB* oder *gyrB* sein oder die in der Gattung *Bordetella* hochkonservierten Gene *risA* und *ompA* (Gerlach *et al.*, 2004). Ein gutes Beispiel für eine differentielle phylogenetische Einteilung anhand des 16S rRNA-Gens ist *B. holmesii*, der auf dieser Grundlage in eine enge Verwandtschaft zu *B. pertussis* gesetzt wird. Anhand des Vergleichs von Haushaltsgenen weist der Keim aber eine größere Ähnlichkeit zu *B. avium* und *B. hinzii* auf, was möglicherweise auf ein laterales Gentransferereignis bezüglich der 16S rDNA hinweist (Diavatopoulos *et al.*, 2006).

Es konnte also gezeigt werden, dass zwar ein *B. petrii*-Cluster besteht, welches deutlich von den pathogenen *Bordetella*-Arten abgegrenzt ist, aber für ein besseres Verständnis der evolutiven Vorgänge innerhalb dieses Clusters sind weitere Untersuchungen notwendig, wie z.B. DNA-DNA Hybridisierungen, PFGE, Multilokusenzymelektrophorese (MLEE) oder ähnliche Methoden zur phylogenetischen Analyse nahe verwandter Spezies.

7 Verzeichnisse

7.1 Literaturverzeichnis

- Abremski, K.E. & Hoess, R.H.** (1992) Evidence for a second conserved arginine residue in the integrase family of recombination proteins. *Protein Eng* **5**(1), 87-91.
- Aisenberg, G., Rolston, K.V. & Safdar, A.** (2004) Bacteremia caused by *Achromobacter* and *Alcaligenes* species in 46 patients with cancer (1989-2003). *Cancer* **101**(9), 2134-40.
- Akerley, B.J., Cotter, P.A. & Miller, J.F.** (1995) Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the *Bordetella*-host interaction. *Cell* **80**(4), 611-20.
- Akerley, B.J. & Miller, J.F.** (1993) Flagellin gene transcription in *Bordetella bronchiseptica* is regulated by the BvgAS virulence control system. *J Bacteriol* **175**(11), 3468-79.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**(17), 3389-402.
- Andersson, S.G. & Kurland, C.G.** (1998) Reductive evolution of resident genomes. *Trends Microbiol* **6**(7), 263-8.
- Andersson, S.G., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U.C., Podowski, R.M., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H. & Kurland, C.G.** (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**(6707), 133-40.
- Antoine, R., Raze, D. & Loch, C.** (2000) Genomics of *Bordetella pertussis* toxins. *Int J Med Microbiol* **290**(4-5), 301-5.
- Arber, W.** (2000) Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiol Rev* **24**(1), 1-7.
- Argos, P., Landy, A., Abremski, K., Egan, J.B., Haggard-Ljungquist, E., Hoess, R.H., Kahn, M.L., Kalionis, B., Narayana, S.V., Pierson, L.S., 3rd & et al.** (1986) The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *Embo J* **5**(2), 433-40.
- Arico, B., Miller, J.F., Roy, C., Stibitz, S., Monack, D., Falkow, S., Gross, R. & Rappuoli, R.** (1989) Sequences required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction proteins. *PNAS* **86**(17), 6671-6675.
- Arico, B. & Rappuoli, R.** (1987) *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. *J Bacteriol* **169**(6), 2847-53.
- Arico, B., Scarlato, V., Monack, D.M., Falkow, S. & Rappuoli, R.** (1991) Structural and genetic analysis of the *bvg* locus in *Bordetella* species. *Mol Microbiol* **5**(10), 2481-91.
- Armstrong, S. & Gross, R.** (2007) *Bordetella: Molecular Microbiology: Metabolism and physiology of Bordetella species*. Norfolk, U.K.: Horizon Scientific Press.
- Arp, L.H. & Cheville, N.F.** (1984) Tracheal lesions in young turkeys infected with *Bordetella avium*. *Am J Vet Res* **45**(10), 2196-200.
- Bach, S., de Almeida, A. & Carniel, E.** (2000) The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Lett* **183**(2), 289-94.
- Banemann, A., Deppisch, H. & Gross, R.** (1998) The lipopolysaccharide of *Bordetella bronchiseptica* acts as a protective shield against antimicrobial peptides. *Infect Immun* **66**(12), 5607-12.

- Banemann, A. & Gross, R.** (1997) Phase variation affects long-term survival of *Bordetella bronchiseptica* in professional phagocytes. *Infection and Immunity* **65**(8), 3469-73.
- Barnard, A., Mahon, B.P., Watkins, J., Redhead, K. & Mills, K.H.** (1996) Th1/Th2 cell dichotomy in acquired immunity to *Bordetella pertussis*: variables in the in vivo priming and in vitro cytokine detection techniques affect the classification of T-cell subsets as Th1, Th2 or Th0. *Immunology* **87**(3), 372-80.
- Beall, B. & Sanden, G.N.** (1995) A *Bordetella pertussis* *fepA* homologue required for utilization of exogenous ferric enterobactin. *Microbiology* **141** (Pt 12), 3193-205.
- Beier, D., Deppisch, H. & Gross, R.** (1996) Conserved sequence motifs in the unorthodox BvgS two-component sensor protein of *Bordetella pertussis*. *Mol Gen Genet* **252**(1-2), 169-76.
- Beier, D. & Gross, R.** (2006) Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol* **9**(2), 143-52.
- Bekker, M., Teixeira de Mattos, M.J. & Hellingwerf, K.J.** (2006) The role of two-component regulation systems in the physiology of the bacterial cell. *Sci Prog* **89**(Pt 3-4), 213-42.
- Berkelman, T. & Stenstedt, T.** (2001) *2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients: Principles and Methods*. Piscataway, NJ: Amersham Pharmacia Biotech Inc.
- Bianchi, F., Careri, M., Mustat, L., Malcevski, A. & Musci, M.** (2005) Bioremediation of toluene and naphthalene: development and validation of a GC-FID method for their monitoring. *Ann Chim* **95**(7-8), 515-24.
- Bjornstad, O.N. & Harvill, E.T.** (2005) Evolution and emergence of *Bordetella* in humans. *Trends Microbiol* **13**(8), 355-9.
- Bock, A. & Gross, R.** (2001) The BvgAS two-component system of *Bordetella* spp.: a versatile modulator of virulence gene expression. *Int J Med Microbiol* **291**(2), 119-30.
- Bock, A. & Gross, R.** (2002) The unorthodox histidine kinases BvgS and EvgS are responsive to the oxidation status of a quinone electron carrier. *European Journal of Biochemistry* **269**(14), 3479-84.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L. & Boyer, H.W.** (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**(2), 95-113.
- Bordet, J. & Gengou, O.** (1906) Le microbe de la coqueluche. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **20**, 731-741.
- Bordet, J. & Gengou, O.** (1909) L'endotoxine coquelucheuse. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **23**, 415-419.
- Boucher, P.E., Maris, A.E., Yang, M.S. & Stibitz, S.** (2003) The response regulator BvgA and RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain bind simultaneously to different faces of the same segment of promoter DNA. *Mol Cell* **11**(1), 163-73.
- Boucher, P.E., Menozzi, F.D. & 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* **241**(3), 363-77.
- Boucher, P.E., Murakami, K., Ishihama, A. & Stibitz, S.** (1997) Nature of DNA binding and RNA polymerase interaction of the *Bordetella pertussis* BvgA transcriptional activator at the *fha* promoter. *J Bacteriol* **179**(5), 1755-63.
- Boucher, P.E., Yang, M.-S. & Stibitz, S.** (2001a) Mutational analysis of the high-affinity BvgA binding site in the *fha* promoter of *Bordetella pertussis*. *Molecular Microbiology* **40**(4), 991-999.
- Boucher, P.E., Yang, M.S., Schmidt, D.M. & Stibitz, S.** (2001b) Genetic and biochemical analyses of BvgA interaction with the secondary binding region of the *fha* promoter of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **183**(2), 536-44.

- Bradford, W.L. & Slavin, B.** (1937) An Organism Resembling Hemophilus Pertussis: With Special Reference to Color Changes Produced by Its Growth Upon Certain Media. *Am J Public Health Nations Health* **27**(12), 1277-82.
- Brickman, T.J., Anderson, M.T. & Armstrong, S.K.** (2007) Bordetella iron transport and virulence. *Biometals* **20**(3-4), 303-22.
- Brickman, T.J. & Armstrong, S.K.** (1999) Essential role of the iron-regulated outer membrane receptor FauA in alcaligin siderophore-mediated iron uptake in Bordetella species. *J Bacteriol* **181**(19), 5958-66.
- Brockmeier, S.L. & Register, K.B.** (2000) Effect of temperature modulation and bvg mutation of Bordetella bronchiseptica on adhesion, intracellular survival and cytotoxicity for swine alveolar macrophages. *Vet Microbiol* **73**(1), 1-12.
- Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B. & Guedon, G.** (2002) Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol Microbiol* **46**(3), 601-10.
- Carbonetti, N.H., Artamonova, G.V., Mays, R.M. & Worthington, Z.E.** (2003) Pertussis toxin plays an early role in respiratory tract colonization by Bordetella pertussis. *Infect Immun* **71**(11), 6358-66.
- Cascales, E. & Christie, P.J.** (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **1**(2), 137-49.
- Cassiday, P., Sanden, G., Heuvelman, K., Mooi, F., Bisgard, K.M. & Popovic, T.** (2000) Polymorphism in Bordetella pertussis pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935-1999. *J Infect Dis* **182**(5), 1402-8.
- Cheetham, B.F. & Katz, M.E.** (1995) A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. *Mol Microbiol* **18**(2), 201-8.
- Cheng, L.W. & Schneewind, O.** (2000) Type III machines of Gram-negative bacteria: delivering the goods. *Trends Microbiol* **8**(5), 214-20.
- Cherry, J. & Heiniger, U.** (2004) *Textbook of pediatric infectious diseases: Pertussis and other Bordetella infections* Philadelphia: The W.B. Saunders Co.
- Cherry, J.D.** (2005) The epidemiology of pertussis: a comparison of the epidemiology of the disease pertussis with the epidemiology of Bordetella pertussis infection. *Pediatrics* **115**(5), 1422-7.
- Cherry, J.D., Gornbein, J., Heininger, U. & Stehr, K.** (1998) A search for serologic correlates of immunity to Bordetella pertussis cough illnesses. *Vaccine* **16**(20), 1901-6.
- Chhatwal, G.S., Walker, M.J., Yan, H., Timmis, K.N. & Guzman, C.A.** (1997) Temperature dependent expression of an acid phosphatase by *Bordetella bronchiseptica*: role in intracellular survival. *Microb Pathog* **22**(5), 257-64.
- Chowdhury, S.P., Schmid, M., Hartmann, A. & Tripathi, A.K.** (2007) Identification of diazotrophs in the culturable bacterial community associated with roots of Lasiurus indicus, a perennial grass of Thar Desert, India. *Microb Ecol* **54**(1), 82-90.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S. & Barrell, B.G.** (1998) Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* **393**(6685), 537-44.
- Cole, S.T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K.D., Thomson, N.R., Wheeler, P.R., Honore, N., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Mungall, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R.M., Devlin, K., Duthoy, S., Feltwell, T., Fraser, A., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Lacroix, C., Maclean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Quail, M.A.,**

- Rajandream, M.A., Rutherford, K.M., Rutter, S., Seeger, K., Simon, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Whitehead, S., Woodward, J.R. & Barrell, B.G.** (2001) Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* **409**(6823), 1007-11.
- Cone, T.C., Jr.** (1970) Whooping cough is first described as a disease sui generis by Baillou in 1640. *Pediatrics* **46**(4), 522.
- Cookson, B.T., Cho, H.L., Herwaldt, L.A. & Goldman, W.E.** (1989a) Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **57**(7), 2223-9.
- Cookson, B.T., Tyler, A.N. & Goldman, W.E.** (1989b) Primary structure of the peptidoglycan-derived tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Biochemistry* **28**(4), 1744-9.
- Cookson, B.T., Vandamme, P., Carlson, L.C., Larson, A.M., Sheffield, J.V., Kersters, K. & Spach, D.H.** (1994) Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, "B. hinzii". *J Clin Microbiol* **32**(10), 2569-71.
- Coote, J.G.** (2001) Environmental sensing mechanisms in *Bordetella*. *Adv Microb Physiol* **44**, 141-81.
- Cossart, P. & Mengaud, J.** (1989) *Listeria monocytogenes*. A model system for the molecular study of intracellular parasitism. *Mol Biol Med* **6**(5), 463-74.
- Cotter, P.A. & DiRita, V.J.** (2000) Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annu Rev Microbiol* **54**, 519-65.
- Cotter, P.A. & Jones, A.M.** (2003) Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol* **11**(8), 367-73.
- Cotter, P.A. & Miller, J.F.** (1994) BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model. *Infect Immun* **62**(8), 3381-90.
- Cotter, P.A. & Miller, J.F.** (1997) A mutation in the *Bordetella bronchiseptica* bvgS gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation, and identifies a new class of Bvg-regulated antigens. *Mol Microbiol* **24**(4), 671-85.
- Cotter, P.A. & Miller, J.F.** (2000) *Principles of bacterial pathogenesis: Bordetella* London: Academic Press, Ltd.
- Cowell, J.L., Hewlett, E.L. & Manclark, C.R.** (1979) Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **25**(3), 896-901.
- Crawford, J.G. & Fishel, C.W.** (1959) Growth of *Bordetella pertussis* in tissue culture. *J Bacteriol* **77**(4), 465-74.
- Crowcroft, N.S., Andrews, N., Rooney, C., Brisson, M. & Miller, E.** (2002) Deaths from pertussis are underestimated in England. *Arch Dis Child* **86**(5), 336-8.
- Crowcroft, N.S., Stein, C., Duclos, P. & Birmingham, M.** (2003) How best to estimate the global burden of pertussis? *Lancet Infect Dis* **3**(7), 413-8.
- Cummings, C.A., Bootsma, H.J., Relman, D.A. & Miller, J.F.** (2006) Species- and strain-specific control of a complex, flexible regulon by *Bordetella* BvgAS. *J Bacteriol* **188**(5), 1775-85.
- Cummings, C.A., Brinig, M.M., Lepp, P.W., van de Pas, S. & Relman, D.A.** (2004) *Bordetella* species are distinguished by patterns of substantial gene loss and host adaptation. *J Bacteriol* **186**(5), 1484-92.
- Dawe, C. & Potter, M.** (1957) Morphologic and biologic progression of a lymphoid neoplasm of the mouse in vivo and in vitro. *Am J Pathol* **33**(603).
- De Jong, M.F.** (1992) *Diseases of swine: (Progressive) atrophic rhinitis*. Iowa: Wolfe, Ames.

- de Melker, H.E., Conyn-van Spaendonck, M.A., Rumke, H.C., van Wijngaarden, J.K., Mooi, F.R. & Schellekens, J.F.** (1997) Pertussis in The Netherlands: an outbreak despite high levels of immunization with whole-cell vaccine. *Emerg Infect Dis* **3**(2), 175-8.
- Deora, R.** (2002) Differential regulation of the *Bordetella bipA* gene: distinct roles for different BvgA binding sites. *J Bacteriol* **184**(24), 6942-51.
- Deora, R., Bootsma, H.J., Miller, J.F. & Cotter, P.A.** (2001) Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Mol Microbiol* **40**(3), 669-83.
- Diavatopoulos, D.A., Cummings, C.A., Schouls, L.M., Brinig, M.M., Relman, D.A. & Mooi, F.R.** (2005) *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica*. *PLoS Pathog* **1**(4), e45.
- Diavatopoulos, D.A., Cummings, C.A., van der Heide, H.G.J., van Gent, M., Liew, S., Relman, D.A. & Mooi, F.R.** (2006) Characterization of a Highly Conserved Island in the Otherwise Divergent *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis* Genomes. *J. Bacteriol.* **188**(24), 8385-8394.
- Dimopoulou, I.D., Russell, J.E., Mohd-Zain, Z., Herbert, R. & Crook, D.W.** (2002) Site-specific recombination with the chromosomal tRNA(Leu) gene by the large conjugative *Haemophilus* resistance plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* **46**(5), 1602-3.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. & Hacker, J.** (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2**(5), 414-24.
- Dorn, E., Hellwig, M., Reineke, W. & Knackmuss, H.J.** (1974) Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading pseudomonad. *Arch Microbiol* **99**(1), 61-70.
- Eisen, J.A.** (2000) Assessing evolutionary relationships among microbes from whole-genome analysis. *Curr Opin Microbiol* **3**(5), 475-80.
- Eldering, G. & Kendrick, P.** (1938) *Bacillus Para-Pertussis*: a Species Resembling Both *Bacillus Pertussis* and *Bacillus Bronchisepticus* but Identical with Neither. *J Bacteriol* **35**(6), 561-72.
- Eriksson, M., Sodersten, E., Yu, Z., Dalhammar, G. & Mohn, W.W.** (2003) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from northern soils. *Appl Environ Microbiol* **69**(1), 275-84.
- Essam, T., Amin, M.A., El Tayeb, O., Mattiasson, B. & Guieysse, B.** (2006) Biological treatment of industrial wastes in a photobioreactor. *Water Sci Technol* **53**(11), 117-25.
- Ewanowich, C.A., Melton, A.R., Weiss, A.A., Sherburne, R.K. & Pepler, M.S.** (1989a) Invasion of HeLa 229 cells by virulent *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **57**(9), 2698-704.
- Ewanowich, C.A., Sherburne, R.K., Man, S.F. & Pepler, M.S.** (1989b) *Bordetella parapertussis* invasion of HeLa 229 cells and human respiratory epithelial cells in primary culture. *Infect Immun* **57**(4), 1240-7.
- Farizo, K.M., Huang, T. & Burns, D.L.** (2000) Importance of holotoxin assembly in Ptl-mediated secretion of pertussis toxin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **68**(7), 4049-54.
- Fennelly, N.K., Sisti, F., Higgins, S.C., Ross, P.J., van der Heide, H., Mooi, F.R., Boyd, A. & Mills, K.H.** (2008) *Bordetella pertussis* expresses a functional type III secretion system that subverts protective innate and adaptive immune responses. *Infect Immun* **76**(3), 1257-66.
- Fernandez, R.C. & Weiss, A.A.** (1994) Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun* **62**(11), 4727-38.
- Ferry, N.** (1912) *Bacillus bronchisepticus (bronchicanis)*: the cause of distemper in dog and a similar disease in other animals. *Vet. J* **68**, 376-391.

- Finn, R.D., Mistry, J., Schuster-Bockler, B., Griffiths-Jones, S., Hollich, V., Lassmann, T., Moxon, S., Marshall, M., Khanna, A., Durbin, R., Eddy, S.R., Sonnhammer, E.L. & Bateman, A.** (2006) Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue), D247-51.
- Finn, T.M. & Amsbaugh, D.F.** (1998) Vag8, a *Bordetella pertussis* bvg-regulated protein. *Infect Immun* **66**(8), 3985-9.
- Finn, T.M. & Stevens, L.A.** (1995) Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol Microbiol* **16**(4), 625-34.
- Flak, T.A. & Goldman, W.E.** (1999) Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cell Microbiol* **1**(1), 51-60.
- Forde, C.B., Parton, R. & Coote, J.G.** (1998) Bioluminescence as a reporter of intracellular survival of *Bordetella bronchiseptica* in murine phagocytes. *Infect Immun* **66**(7), 3198-207.
- Forsyth, K.** (2007) Pertussis, Still a Formidable Foe. *Clin Infect Dis* **45**(11).
- Forsyth, K.D., Wirsing von Konig, C.H., Tan, T., Caro, J. & Plotkin, S.** (2007) Prevention of pertussis: recommendations derived from the second Global Pertussis Initiative roundtable meeting. *Vaccine* **25**(14), 2634-42.
- Foster, J.W.** (1999) When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. *Curr Opin Microbiol* **2**(2), 170-4.
- Frantz, B. & Chakrabarty, A.M.** (1987) Organization and nucleotide sequence determination of a gene cluster involved in 3-chlorocatechol degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(13), 4460-4.
- Freeman, V.J.** (1951) Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *J Bacteriol* **61**(6), 675-88.
- Friedman, R.L., Nordensson, K., Wilson, L., Akporiaye, E.T. & Yocum, D.E.** (1992) Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun* **60**(11), 4578-85.
- Fry, N.K., Duncan, J., Malnick, H. & Cockcroft, P.M.** (2007) The first UK isolate of '*Bordetella ansorpii*' from an immunocompromised patient. *J Med Microbiol* **56**(Pt 7), 993-5.
- Fry, N.K., Duncan, J., Malnick, H., Warner, M., Smith, A.J., Jackson, M.S. & Ayoub, A.** (2005) *Bordetella petrii* clinical isolate. *Emerg Infect Dis* **11**(7), 1131-3.
- Fuchs, T. & Gross, R.** (2001) Mechanismen bakterieller Pathogenität: Die "molekularen Talente" des Keuchhustenerregers. *Biologie in unserer Zeit* **31**(1), 10-20.
- Funke, G., Hess, T., von Graevenitz, A. & Vandamme, P.** (1996) Characteristics of *Bordetella hinzii* strains isolated from a cystic fibrosis patient over a 3-year period. *J Clin Microbiol* **34**(4), 966-9.
- Gaillard, M., Vallaey, T., Vorholter, F.J., Minoia, M., Werlen, C., Sentchilo, V., Puhler, A. & van der Meer, J.R.** (2006) The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13, a genomic island with various catabolic properties. *J Bacteriol* **188**(5), 1999-2013.
- Gal-Mor, O. & Finlay, B.B.** (2006) Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol* **8**(11), 1707-19.
- Galperin, M.Y., Nikolskaya, A.N. & Koonin, E.V.** (2001) Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett* **203**(1), 11-21.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D. & Bairoch, A.** (2003) ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* **31**(13), 3784-8.
- Gentry-Weeks, C.R., Cookson, B.T., Goldman, W.E., Rimler, R.B., Porter, S.B. & Curtiss, R., 3rd** (1988) Dermonecrotic toxin and tracheal cytotoxin, putative virulence factors of *Bordetella avium*. *Infect Immun* **56**(7), 1698-707.

- Georgellis, D., Kwon, O. & Lin, E.C.** (2001) Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria. *Science* **292**(5525), 2314-6.
- Gerlach, G., Janzen, S., Beier, D. & Gross, R.** (2004) Functional characterization of the BvgAS two-component system of *Bordetella holmesii*. *Microbiology* **150**(Pt 11), 3715-29.
- Gerlach, G., von Wintzingerode, F., Middendorf, B. & Gross, R.** (2001) Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. *Microbes Infect* **3**(1), 61-72.
- Geuijen, C.A., Willems, R.J. & Mooi, F.R.** (1996) The major fimbrial subunit of *Bordetella pertussis* binds to sulfated sugars. *Infect Immun* **64**(7), 2657-65.
- Glaser, P., Danchin, A., Ladant, D., Barzu, O. & Ullmann, A.** (1988) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: the gene and the protein. *Tokai J Exp Clin Med* **13 Suppl**, 239-52.
- Gogol, E.B., Cummings, C.A., Burns, R.C. & Relman, D.A.** (2007) Phase variation and microevolution at homopolymeric tracts in *Bordetella pertussis*. *BMC Genomics* **8**, 122.
- 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**(4), 1002-3.
- Goodnow, R.A.** (1980) Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol Rev* **44**(4), 722-38.
- Graeff-Wohlleben, H., Killat, S., Banemann, A., Guiso, N. & Gross, R.** (1997) Cloning and characterization of an Mn-containing superoxide dismutase (SodA) of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **179**(7), 2194-201.
- Greco, D., Salmaso, S., Mastrantonio, P., Giuliano, M., Tozzi, A.E., Anemona, A., Ciofi degli Atti, M.L., Giammanco, A., Panei, P., Blackwelder, W.C., Klein, D.L. & Wassilak, S.G.** (1996) A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against *pertussis*. Progetto Pertosse Working Group. *N Engl J Med* **334**(6), 341-8.
- Groisman, E.A. & Ochman, H.** (1996) Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* **87**(5), 791-4.
- Gross, R., Guzman, C., Sebahia, M., Martins dos Santos, V., Pieper, D., Koebnik, R., Lechner, M., Bartels, D., Buhrmester, J., Choudhuri, J., Ebensen, T., Gaigalat, L., Herrmann, S., Larisch, C., Link, S., Linke, B., Meyer, V., Mormann, S., Nakunst, D., Rückert, C., Schneiker-Bekel, S., Schulze, K., Vorhölter, F., Yevesa, T., Engle, J., Goldman, W., Pühler, A., Göbel, U., Goesmann, A., Blöcker, H., Kaiser, O. & Martinez-Arias, R.** (2008) The missing link: *Bordetella petrii* is endowed with both the metabolic versatility of environmental bacteria and virulence traits of pathogenic *Bordetellae*. (*submitted*).
- Gueirard, P., Druilhe, A., Pretolani, M. & Guiso, N.** (1998) Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection in vivo. *Infect Immun* **66**(4), 1718-25.
- Gueirard, P., Minoprio, P. & Guiso, N.** (1996) Intranasal inoculation of *Bordetella bronchiseptica* in mice induces long-lasting antibody and T-cell mediated immune responses. *Scand J Immunol* **43**(2), 181-92.
- 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* **33**(8), 2002-6.
- Guris, D., Strebel, P.M., Bardenheier, B., Brennan, M., Tachdjian, R., Finch, E., Wharton, M. & Livengood, J.R.** (1999) Changing epidemiology of pertussis in the United States: increasing reported incidence among adolescents and adults, 1990-1996. *Clin Infect Dis* **28**(6), 1230-7.
- Guzman, C.A., Rohde, M., Bock, M. & Timmis, K.N.** (1994a) Invasion and intracellular survival of *Bordetella bronchiseptica* in mouse dendritic cells. *Infect Immun* **62**(12), 5528-37.
- Guzman, C.A., Rohde, M. & Timmis, K.N.** (1994b) Mechanisms involved in uptake of *Bordetella bronchiseptica* by mouse dendritic cells. *Infect Immun* **62**(12), 5538-44.

- Hacker, J. & Carniel, E.** (2001) Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep* **2**(5), 376-81.
- Hacker, J. & Kaper, J.B.** (2002) *Pathogenicity Islands and the Evolution of Pathogenic Microbes*. Berlin: Springer.
- Hackett, M., Guo, L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. & Hewlett, E.L.** (1994) Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science* **266**(5184), 433-5.
- Hall, T.A.** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**, 95-98.
- Halperin, S.A.** (2007) The control of pertussis--2007 and beyond. *N Engl J Med* **356**(2), 110-3.
- Hassett, D.J. & Cohen, M.S.** (1989) Bacterial adaptation to oxidative stress: implications for pathogenesis and interaction with phagocytic cells. *Faseb J* **3**(14), 2574-82.
- Haussler, S.** (2004) Biofilm formation by the small colony variant phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **6**(6), 546-51.
- Haussler, S., Ziegler, I., Lottel, A., von Gotz, F., Rohde, M., Wehmhohner, D., Saravanamuthu, S., Tummler, B. & Steinmetz, I.** (2003) Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *J Med Microbiol* **52**(Pt 4), 295-301.
- Hazenbos, W.L., van den Berg, B.M., Geuijen, C.W., Mooi, F.R. & van Furth, R.** (1995) Binding of FimD on *Bordetella pertussis* to very late antigen-5 on monocytes activates complement receptor type 3 via protein tyrosine kinases. *J Immunol* **155**(8), 3972-8.
- He, Q., Viljanen, M.K., Arvilommi, H., Aittanen, B. & Mertsola, J.** (1998) Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an immunized population. *Jama* **280**(7), 635-7.
- Heikkinen, E., Kallonen, T., Saarinen, L., Sara, R., King, A.J., Mooi, F.R., Soini, J.T., Mertsola, J. & He, Q.** (2007) Comparative genomics of *Bordetella pertussis* reveals progressive gene loss in Finnish strains. *PLoS ONE* **2**(9), e904.
- Heinemann, J.A. & Sprague, G.F., Jr.** (1989) Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. *Nature* **340**(6230), 205-9.
- Heininger, U., Cotter, P.A., Fescemyer, H.W., Martinez de Tejada, G., Yuk, M.H., Miller, J.F. & Harvill, E.T.** (2002) Comparative phenotypic analysis of the *Bordetella parapertussis* isolate chosen for genomic sequencing. *Infect Immun* **70**(7), 3777-84.
- Heininger, U., Stehr, K., Schmitt-Grohe, S., Lorenz, C., Rost, R., Christenson, P.D., Uberall, M. & Cherry, J.D.** (1994) Clinical characteristics of illness caused by *Bordetella parapertussis* compared with illness caused by *Bordetella pertussis*. *Pediatr Infect Dis J* **13**(4), 306-9.
- Heiss, L.N., Flak, T.A., Lancaster, J.R., Jr., McDaniel, M.L. & Goldman, W.E.** (1993a) Nitric oxide mediates *Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin damage to the respiratory epithelium. *Infect Agents Dis* **2**(4), 173-7.
- Heiss, L.N., Moser, S.A., Unanue, E.R. & Goldman, W.E.** (1993b) Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of pertussis. *Infect Immun* **61**(8), 3123-8.
- Henderson, I.R. & Nataro, J.P.** (2001) Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* **69**(3), 1231-43.
- Hinz, K.H., Glunder, G. & Luders, H.** (1978) Acute respiratory disease in turkey poults caused by *Bordetella bronchiseptica*-like bacteria. *Vet Rec* **103**(12), 262-3.
- Hofreuter, D., Odenbreit, S. & Haas, R.** (2001) Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Mol Microbiol* **41**(2), 379-91.

- Horvat, A.** (2007) Untersuchungen zur Signalwahrnehmung der Sensorkinase BvgS des BvgAS-Zwei-Komponentensystems aus *Bordetella bronchiseptica* und Struktur-Funktionsanalyse des Response Regulator-Proteins BvgA aus *Bordetella holmesii*. *Dissertation*.
- Hot, D., Antoine, R., Renauld-Mongenie, G., Caro, V., Hennuy, B., Levillain, E., Huot, L., Wittmann, G., Poncet, D., Jacob-Dubuisson, F., Guyard, C., Rimlinger, F., Aujame, L., Godfroid, E., Guiso, N., Quentin-Millet, M.J., Lemoine, Y. & Locht, C.** (2003) Differential modulation of *Bordetella pertussis* virulence genes as evidenced by DNA microarray analysis. *Mol Genet Genomics* **269**(4), 475-86.
- Huang, L.C., Ye, S.H., Zhang, Y., Li, Y.O., Wang, X.R. & Ding, D.** (2007) Microbial remediation and optimization of oil polluted wetlands at Dalian Bay in China. *Biomed Environ Sci* **20**(5), 414-9.
- Inatsuka, C.S., Julio, S.M. & Cotter, P.A.** (2005) *Bordetella* filamentous hemagglutinin plays a critical role in immunomodulation, suggesting a mechanism for host specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(51), 18578-83.
- Iuchi, S. & Weiner, L.** (1996) Cellular and molecular physiology of *Escherichia coli* in the adaptation to aerobic environments. *J Biochem* **120**(6), 1055-63.
- Jacob-Dubuisson, F., El-Hamel, C., Saint, N., Guedin, S., Willery, E., Molle, G. & Locht, C.** (1999) Channel formation by FhaC, the outer membrane protein involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Biol Chem* **274**(53), 37731-5.
- Jacob-Dubuisson, F., Locht, C. & Antoine, R.** (2001) Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol Microbiol* **40**(2), 306-13.
- Jefferson, K.K.** (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett* **236**(2), 163-73.
- Jiang, Y., Wen, J., Bai, J., Jia, X. & Hu, Z.** (2007) Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*. *J Hazard Mater* **147**(1-2), 672-6.
- Jones, A.M., Boucher, P.E., Williams, C.L., Stibitz, S. & Cotter, P.A.** (2005) Role of BvgA phosphorylation and DNA binding affinity in control of Bvg-mediated phenotypic phase transition in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol* **58**(3), 700-13.
- Karaolis, D.K., Somara, S., Maneval, D.R., Jr., Johnson, J.A. & Kaper, J.B.** (1999) A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. *Nature* **399**(6734), 375-9.
- 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* **20**(3), 489-96.
- Karimova, G. & Ullmann, A.** (1997) Characterization of DNA binding sites for the BvgA protein of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **179**(11), 3790-2.
- Katada, T., Oinuma, M. & Ui, M.** (1986) Mechanisms for inhibition of the catalytic activity of adenylate cyclase by the guanine nucleotide-binding proteins serving as the substrate of islet-activating protein, pertussis toxin. *J Biol Chem* **261**(11), 5215-21.
- Kattar, M.M., Chavez, J.F., Limaye, A.P., Rassouljian-Barrett, S.L., Yarfitz, S.L., Carlson, L.C., Houze, Y., Swanzy, S., Wood, B.L. & Cookson, B.T.** (2000) Application of 16S rRNA gene sequencing to identify *Bordetella hinzii* as the causative agent of fatal septicemia. *J Clin Microbiol* **38**(2), 789-94.
- Kerstens, K., Hinz, K., Hertle, A., Segers, P., Lievens, A., Siegman, O. & De Ley, J.** (1984) *Bordetella avium* sp. nov., isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**, 56-70.
- Khelef, N., Sakamoto, H. & Guiso, N.** (1992) Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. *Microb Pathog* **12**(3), 227-35.
- Klein, A.** (1999) Vergleichende genetische Charakterisierung verschiedener *Bordetella* Isolate. *Diplomarbeit*.

- Klockgether, J., Reva, O., Larbig, K. & Tummler, B.** (2004) Sequence analysis of the mobile genome island pKLC102 of *Pseudomonas aeruginosa* C. *J Bacteriol* **186**(2), 518-34.
- Klose, J. & Kobalz, U.** (1995) Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* **16**(6), 1034-59.
- Klose, J. & Spielmann, H.** (1975) Gel isoelectric focusing of mouse lactate dehydrogenase: heterogeneity of the isoenzymes A4 and X4. *Biochem Genet* **13**(9-10), 707-20.
- Knobloch, J.K., Nedelmann, M., Kiel, K., Bartscht, K., Horstkotte, M.A., Dobinsky, S., Rohde, H. & Mack, D.** (2003) Establishment of an arbitrary PCR for rapid identification of Tn917 insertion sites in *Staphylococcus epidermidis*: characterization of biofilm-negative and nonmucoid mutants. *Appl Environ Microbiol* **69**(10), 5812-8.
- Ko, K.S., Peck, K.R., Oh, W.S., Lee, N.Y., Lee, J.H. & Song, J.H.** (2005) New species of *Bordetella*, *Bordetella ansorpii* sp. nov., isolated from the purulent exudate of an epidermal cyst. *J Clin Microbiol* **43**(5), 2516-9.
- Koomey, M.** (1998) Competence for natural transformation in *Neisseria gonorrhoeae*: a model system for studies of horizontal gene transfer. *APMIS Suppl* **84**, 56-61.
- Koren, H.S., Handwerger, B.S. & Wunderlich, J.R.** (1975) Identification of macrophage-like characteristics in a cultured murine tumor line. *J Immunol* **114**(2 pt 2), 894-7.
- Lacey, B.W.** (1960) Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*. *J Hyg (Lond)* **58**, 57-93.
- Lacour, S., Doublet, P., Obadia, B., Cozzone, A.J. & Grangeasse, C.** (2006) A novel role for protein-tyrosine kinase Etk from *Escherichia coli* K-12 related to polymyxin resistance. *Res Microbiol* **157**(7), 637-41.
- Ladant, D. & Ullmann, A.** (1999) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol* **7**(4), 172-6.
- Lambert-Buisine, C., Willery, E., Loch, C. & Jacob-Dubuisson, F.** (1998) N-terminal characterization of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Mol Microbiol* **28**(6), 1283-93.
- Lapin, J.** (1943) *Whooping Cough*. Springfield, IL.
- Larbig, K.D., Christmann, A., Johann, A., Klockgether, J., Hartsch, T., Merkl, R., Wiehlmann, L., Fritz, H.J. & Tummler, B.** (2002) Gene islands integrated into tRNA(Gly) genes confer genome diversity on a *Pseudomonas aeruginosa* clone. *J Bacteriol* **184**(23), 6665-80.
- Lawrence, J.G. & Roth, J.R.** (1996) Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. *Genetics* **143**(4), 1843-60.
- Leclerc, H. & Moreau, A.** (2002) Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiol Rev* **26**(2), 207-22.
- Lee, C.K., Roberts, A.L., Finn, T.M., Knapp, S. & Mekalanos, J.J.** (1990) A new assay for invasion of HeLa 229 cells by *Bordetella pertussis*: effects of inhibitors, phenotypic modulation, and genetic alterations. *Infect Immun* **58**(8), 2516-22.
- Leininger, E., Roberts, M., Kenimer, J.G., Charles, I.G., Fairweather, N., Novotny, P. & Brennan, M.J.** (1991) Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(2), 345-9.
- Leslie, P.H. & Gardner, A.D.** (1931) The phases of *haemophilus pertussis*. *J. Hyg.* **31**, 423-455.
- Li, X., Ma, X., Zhao, Y., Jia, X., Kai, L., Guo, K. & Zhao, W.** (2007) Isolation and characterization of a new bacterium capable of biotransforming cis-epoxysuccinic acid to d(-)-tartaric acid. *FEMS Microbiology Letters* **267**(2), 214-220.

- Lindquist, S.W., Weber, D.J., Mangum, M.E., Hollis, D.G. & Jordan, J.** (1995) *Bordetella holmesii* sepsis in an asplenic adolescent. *Pediatr Infect Dis J* **14**(9), 813-5.
- Link, S.** (2006) Molekulare Charakterisierung des Filamentösen Hämagglutinins von *Bordetella holmesii*. *Dissertation*.
- Link, S., Schmitt, K., Beier, D. & Gross, R.** (2007) Identification and regulation of expression of a gene encoding a filamentous hemagglutinin-related protein in *Bordetella holmesii*. *BMC Microbiol* **7**(1), 100.
- Lipsitch, M. & Moxon, E.R.** (1997) Virulence and transmissibility of pathogens: what is the relationship? *Trends Microbiol* **5**(1), 31-7.
- Livey, I. & Wardlaw, A.C.** (1984) Production and properties of *Bordetella pertussis* heat-labile toxin. *J Med Microbiol* **17**(1), 91-103.
- Locht, C. & Antoine, R.** (1995) A proposed mechanism of ADP-ribosylation catalyzed by the pertussis toxin S1 subunit. *Biochimie* **77**(5), 333-40.
- Locht, C., Antoine, R. & Jacob-Dubuisson, F.** (2001) *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr Opin Microbiol* **4**(1), 82-9.
- Locht, C., Bertin, P., Menozzi, F.D. & Renault, G.** (1993) The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent *Bordetella* spp. *Mol Microbiol* **9**(4), 653-60.
- Locht, C., Geoffroy, M.C. & Renault, G.** (1992) Common accessory genes for the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the papC and papD gene families. *Embo J* **11**(9), 3175-83.
- Locht, C. & Keith, J.M.** (1986) Pertussis toxin gene: nucleotide sequence and genetic organization. *Science* **232**(4755), 1258-64.
- Lopez-Moreno, M.** (1952) El genero *Bordetella*. *Microbiol. Esp.* **5**(177-181).
- Luker, K.E., Tyler, A.N., Marshall, G.R. & Goldman, W.E.** (1995) Tracheal cytotoxin structural requirements for respiratory epithelial damage in pertussis. *Mol Microbiol* **16**(4), 733-43.
- Lynch, A.S. & Lin, E.C.** (1996) Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli*: characterization of DNA binding at target promoters. *J Bacteriol* **178**(21), 6238-49.
- Malpica, R., Franco, B., Rodriguez, C., Kwon, O. & Georgellis, D.** (2004) Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(36), 13318-23.
- Marques, R.R. & Carbonetti, N.H.** (1997) Genetic analysis of pertussis toxin promoter activation in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol* **24**(6), 1215-24.
- Martinez de Tejada, G., Miller, J.F. & Cotter, P.A.** (1996) Comparative analysis of the virulence control systems of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Microbiol.* **22**(5), 895-908.
- Mastrantonio, P., Stefanelli, P., Giuliano, M., Herrera Rojas, Y., Ciofi degli Atti, M., Anemona, A. & Tozzi, A.E.** (1998) *Bordetella parapertussis* infection in children: epidemiology, clinical symptoms, and molecular characteristics of isolates. *J Clin Microbiol* **36**(4), 999-1002.
- Masuda, M., Betancourt, L., Matsuzawa, T., Kashimoto, T., Takao, T., Shimonishi, Y. & Horiguchi, Y.** (2000) Activation of rho through a cross-link with polyamines catalyzed by *Bordetella* dermonecrotizing toxin. *Embo J* **19**(4), 521-30.
- Mattoo, S. & Cherry, J.D.** (2005) Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* **18**(2), 326-82.

- Mattoo, S., Yuk, M.H., Huang, L.L. & Miller, J.F.** (2004) Regulation of type III secretion in *Bordetella*. *Mol Microbiol* **52**(4), 1201-14.
- Mazar, J. & Cotter, P.A.** (2006) Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol Microbiol* **62**(3), 641-54.
- Mazengia, E., Silva, E.A., Peppe, J.A., 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* **38**(6), 2330-3.
- McCandlish, I.A., Thompson, H., Cornwell, H.J. & Wright, N.G.** (1978) A study of dogs with kennel cough. *Vet Rec* **102**(14), 293-301.
- McDaniel, T.K. & Kaper, J.B.** (1997) A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol* **23**(2), 399-407.
- McGillivray, D.M., Coote, J.G. & Parton, R.** (1989) Cloning of the virulence regulatory (*vir*) locus of *Bordetella pertussis* and its expression in *B. bronchiseptica*. *FEMS Microbiol Lett* **53**(3), 333-7.
- McMillan, D.J., Shojaei, M., Chhatwal, G.S., Guzman, C.A. & Walker, M.J.** (1996) Molecular analysis of the *bvg*-repressed urease of *Bordetella bronchiseptica*. *Microb Pathog* **21**(5), 379-94.
- Melton, A.R. & Weiss, A.A.** (1989) Environmental regulation of expression of virulence determinants in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **171**(11), 6206-12.
- Menozi, D., Jensen, R.T. & Gardner, J.D.** (1990) Dispersed pancreatic acinar cells and pancreatic acini. *Methods Enzymol* **192**, 271-9.
- Merkel, T.J., Barros, C. & Stibitz, S.** (1998) Characterization of the *bvgR* locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **180**(7), 1682-90.
- Merkel, T.J., Boucher, P.E., Stibitz, S. & Grippe, V.K.** (2003) Analysis of *bvgR* expression in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **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* **262**(1), 189-98.
- Middendorf, B., Hochhut, B., Leipold, K., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G. & Hacker, J.** (2004) Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536. *J Bacteriol* **186**(10), 3086-96.
- Mira, A., Ochman, H. & Moran, N.A.** (2001) Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. *Trends Genet* **17**(10), 589-96.
- Mishra, M., Parise, G., Jackson, K.D., Wozniak, D.J. & Deora, R.** (2005) The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in *Bordetella*. *J Bacteriol* **187**(4), 1474-84.
- Mocny, J.C., Olson, J.S. & Connell, T.D.** (2007) Passively released heme from hemoglobin and myoglobin is a potential source of nutrient iron for *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* **75**(10), 4857-66.
- Mohd-Zain, Z., Turner, S.L., Cerdano-Tarraga, A.M., Lilley, A.K., Inzana, T.J., Duncan, A.J., Harding, R.M., Hood, D.W., Peto, T.E. & Crook, D.W.** (2004) Transferable antibiotic resistance elements in *Haemophilus influenzae* share a common evolutionary origin with a diverse family of syntenic genomic islands. *J Bacteriol* **186**(23), 8114-22.
- Monack, D.M., Arico, B., Rappuoli, R. & Falkow, S.** (1989) Phase variants of *Bordetella bronchiseptica* arise by spontaneous deletions in the *vir* locus. *Mol Microbiol* **3**(12), 1719-28.
- Mondello, F.J.** (1989) Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation. *J Bacteriol* **171**(3), 1725-32.
- Morita, R.** (1997) *Bacteria in oligotrophic environments. Starvation-survival lifestyle*. New York: Chapman and Hall.

- Morris, J.T. & Myers, M.** (1998) Bacteremia due to *Bordetella holmesii*. *Clin Infect Dis* **27**(4), 912-3.
- Moxon, E.R. & Kroll, J.S.** (1990) The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. *Curr Top Microbiol Immunol* **150**, 65-85.
- Moxon, E.R., Rainey, P.B., Nowak, M.A. & Lenski, R.E.** (1994) Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Curr Biol* **4**(1), 24-33.
- 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.* **21**(14), 3320.
- Muller, T.A., Werlen, C., Spain, J. & Van Der Meer, J.R.** (2003) Evolution of a chlorobenzene degradative pathway among bacteria in a contaminated groundwater mediated by a genomic island in *Ralstonia*. *Environ Microbiol* **5**(3), 163-73.
- Musser, J.M., Hewlett, E.L., Peppler, M.S. & Selander, R.K.** (1986) Genetic diversity and relationships in populations of *Bordetella* spp. *J Bacteriol* **166**(1), 230-7.
- Nethe-Jaenchen, R.** (2000) *Grundstudium Biologie, Mikrobiologie: Systematik und Phylogenie*. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.
- O'Farrell, P.H.** (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**(10), 4007-21.
- Ochman, H., Lawrence, J.G. & Groisman, E.A.** (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**(6784), 299-304.
- Ochman, H. & Moran, N.A.** (2001) Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science* **292**(5519), 1096-9.
- Pallen, M.J. & Wren, B.W.** (2007) Bacterial pathogenomics. *Nature* **449**(7164), 835-42.
- Pao, G.M. & Saier, M.H., Jr.** (1995) Response regulators of bacterial signal transduction systems: selective domain shuffling during evolution. *J Mol Evol* **40**(2), 136-54.
- Pargellis, C.A., Nunes-Duby, S.E., de Vargas, L.M. & Landy, A.** (1988) Suicide recombination substrates yield covalent lambda integrase-DNA complexes and lead to identification of the active site tyrosine. *J Biol Chem* **263**(16), 7678-85.
- Parkhill, J., Sebahia, M., Preston, A., Murphy, L.D., Thomson, N., Harris, D.E., Holden, M.T., Churcher, C.M., Bentley, S.D., Mungall, K.L., Cerdeno-Tarraga, A.M., Temple, L., James, K., Harris, B., Quail, M.A., Achtman, M., Atkin, R., Baker, S., Basham, D., Bason, N., Cherevach, I., Chillingworth, T., Collins, M., Cronin, A., Davis, P., Doggett, J., Feltwell, T., Goble, A., Hamlin, N., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., Leather, S., Moule, S., Norberczak, H., O'Neil, S., Ormond, D., Price, C., Rabinowitsch, E., Rutter, S., Sanders, M., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Unwin, L., Whitehead, S., Barrell, B.G. & Maskell, D.J.** (2003) Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet* **35**(1), 32-40.
- Parkhill, J., Wren, B.W., Thomson, N.R., Titball, R.W., Holden, M.T., Prentice, M.B., Sebahia, M., James, K.D., Churcher, C., Mungall, K.L., Baker, S., Basham, D., Bentley, S.D., Brooks, K., Cerdeno-Tarraga, A.M., Chillingworth, T., Cronin, A., Davies, R.M., Davis, P., Dougan, G., Feltwell, T., Hamlin, N., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Leather, S., Moule, S., Oyston, P.C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S. & Barrell, B.G.** (2001) Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* **413**(6855), 523-7.
- Perego, M.** (1998) Kinase-phosphatase competition regulates *Bacillus subtilis* development. *Trends Microbiol* **6**(9), 366-70.

- Perraud, A.L., Kimmel, B., Weiss, V. & Gross, R.** (1998) Specificity of the BvgAS and EvgAS phosphorelay is mediated by the C-terminal HPt domains of the sensor proteins. *Mol Microbiol* **27**(5), 875-87.
- Perraud, A.L., Rippe, K., Bantscheff, M., Glocker, M., Lucassen, M., Jung, K., Sebald, W., Weiss, V. & Gross, R.** (2000) Dimerization of signalling modules of the EvgAS and BvgAS phosphorelay systems. *Biochim Biophys Acta* **1478**(2), 341-54.
- Perraud, A.L., Weiss, V. & Gross, R.** (1999) Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol* **7**(3), 115-20.
- Pittman, M.** (1984) The concept of pertussis as a toxin-mediated disease. *Pediatr Infect Dis* **3**(5), 467-86.
- Pizza, M., Covacci, A., Bartoloni, A., Perugini, M., Nencioni, L., De Magistris, M.T., Villa, L., Nucci, D., Manetti, R., Bugnoli, M. & al., e.** (1989) Mutants of pertussis toxin suitable for vaccine development. *Science* **246**(4929), 497-500.
- Pohlert, J.** (In Vorbereitung) Molekulare Charakterisierung der Fimbrien von *Bordetella petrii*. *Dissertation*.
- Poolman, J.T. & Hallander, H.O.** (2007) Acellular pertussis vaccines and the role of pertactin and fimbriae. *Expert Rev Vaccines* **6**(1), 47-56.
- Porter, J.F., Connor, K. & Donachie, W.** (1994) Isolation and characterization of *Bordetella parapertussis*-like bacteria from ovine lungs. *Microbiology* **140** (Pt 2), 255-61.
- Porter, J.F., Parton, R. & Wardlaw, A.C.** (1991) Growth and survival of *Bordetella bronchiseptica* in natural waters and in buffered saline without added nutrients. *Applied and Environmental Microbiology* **57**(4), 1202-6.
- Porter, J.F. & Wardlaw, A.C.** (1993) Long-term survival of *Bordetella bronchiseptica* in lakewater and in buffered saline without added nutrients. *Fems Microbiology Letters* **110**(1), 33-6.
- Porter, J.F. & Wardlaw, A.C.** (1994) Tracheobronchial washings from seven vertebrate species as growth media for the four species of *Bordetella*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **8**(3), 259-69.
- Pradel, E., Guiso, N. & Locht, C.** (1998) Identification of AlcR, an AraC-type regulator of alcaligin siderophore synthesis in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **180**(4), 871-80.
- Pradel, E., Guiso, N., Menozzi, F.D. & Locht, C.** (2000) *Bordetella pertussis* TonB, a Bvg-independent virulence determinant. *Infect Immun* **68**(4), 1919-27.
- Prasad, S.M., Yin, Y., Rodzinski, E., Tuomanen, E.I. & Masure, H.R.** (1993) Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **61**(7), 2780-5.
- Preston, A., Parkhill, J. & Maskell, D.J.** (2004) The bordetellae: lessons from genomics. *Nat Rev Microbiol* **2**(5), 379-90.
- Prugnola, A., Arico, B., Manetti, R., Rappuoli, R. & Scarlato, V.** (1995) Response of the bvg regulon of *Bordetella pertussis* to different temperatures and short-term temperature shifts. *Microbiology* **141** (Pt 10), 2529-34.
- Qiu, X., Gurkar, A.U. & Lory, S.** (2006) Interstrain transfer of the large pathogenicity island (PAPI-1) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(52), 19830-5.
- Raffel, T.R., Register, K.B., Marks, S.A. & Temple, L.** (2002) Prevalence of *Bordetella avium* infection in selected wild and domesticated birds in the eastern USA. *J Wildl Dis* **38**(1), 40-6.
- Rainey, P.B., Moxon, E.R. & Thompson, I.P.** (1993) Intraclonal polymorphism in bacteria. *Adv. Microb. Ecol.* **13**, 263-300.
- Rainey, P.B. & Travisano, M.** (1998) Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature* **394**(6688), 69-72.

- Ravatn, R., Studer, S., Springael, D., Zehnder, A.J. & van der Meer, J.R.** (1998a) Chromosomal integration, tandem amplification, and deamplification in *Pseudomonas putida* F1 of a 105-kilobase genetic element containing the chlorocatechol degradative genes from *Pseudomonas* sp. Strain B13. *J Bacteriol* **180**(17), 4360-9.
- Ravatn, R., Studer, S., Zehnder, A.J. & van der Meer, J.R.** (1998b) Int-B13, an unusual site-specific recombinase of the bacteriophage P4 integrase family, is responsible for chromosomal insertion of the 105-kilobase *clc* element of *Pseudomonas* sp. Strain B13. *J Bacteriol* **180**(21), 5505-14.
- Ravatn, R., Zehnder, A.J. & van der Meer, J.R.** (1998c) Low-frequency horizontal transfer of an element containing the chlorocatechol degradation genes from *Pseudomonas* sp. strain B13 to *Pseudomonas putida* F1 and to indigenous bacteria in laboratory-scale activated-sludge microcosms. *Appl Environ Microbiol* **64**(6), 2126-32.
- Reh fuss, M. & Urban, J.** (2005) *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* subsp. nov. a phenol-degrading, denitrifying bacterium isolated from a graywater bioprocessor. *Syst Appl Microbiol* **28**(5), 421-9.
- Rehm, H.** (2002) *Der Experimentator: Proteinbiochemie/ Proteomics*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Relman, D., Tuomanen, E., Falkow, S., Golenbock, D.T., Saukkonen, K. & Wright, S.D.** (1990) Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell* **61**(7), 1375-82.
- Renauld-Mongenie, G., Cornette, J., Mielcarek, N., Menozzi, F.D. & Locht, C.** (1996) Distinct roles of the N-terminal and C-terminal precursor domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Bacteriol* **178**(4), 1053-60.
- Roy, C.R. & Falkow, S.** (1991) Identification of *Bordetella pertussis* regulatory sequences required for transcriptional activation of the *fhaB* gene and autoregulation of the *bvgAS* operon. *J Bacteriol* **173**(7), 2385-92.
- Roy, C.R., Miller, J.F. & Falkow, S.** (1990) Autogenous regulation of the *Bordetella pertussis* *bvgABC* operon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(10), 3763-7.
- Russell, F.M., Davis, J.M., Whipp, M.J., Janssen, P.H., Ward, P.B., Vyas, J.R., Starr, M., Sawyer, S.M. & Curtis, N.** (2001) Severe *Bordetella holmesii* infection in a previously healthy adolescent confirmed by gene sequence analysis. *Clin Infect Dis* **33**(1), 129-30.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**(4839), 487-91.
- Saitou, N. & Nei, M.** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**(4), 406-25.
- Salmon, K.A., Hung, S.P., Steffen, N.R., Krupp, R., Baldi, P., Hatfield, G.W. & Gunsalus, R.P.** (2005) Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12: effects of oxygen availability and ArcA. *J Biol Chem* **280**(15), 15084-96.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sansonetti, P.J., Ryter, A., Clerc, P., Maurelli, A.T. & Mounier, J.** (1986) Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. *Infect Immun* **51**(2), 461-9.
- Saukkonen, K., Cabellos, C., Burroughs, M., Prasad, S. & Tuomanen, E.** (1991) Integrin-mediated localization of *Bordetella pertussis* within macrophages: role in pulmonary colonization. *J Exp Med* **173**(5), 1143-9.

- Savelkoul, P.H., Kremer, B., Kusters, J.G., van der Zeijst, B.A. & Gastra, W. (1993) Invasion of HeLa cells by *Bordetella bronchiseptica*. *Microb Pathog* **14**(2), 161-8.
- Scarlato, V., Arico, B., Domenighini, M. & Rappuoli, R. (1993) Environmental regulation of virulence factors in *Bordetella* species. *Bioessays* **15**(2), 99-104.
- Scarlato, V., Arico, B., Prugnola, A. & Rappuoli, R. (1991) Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*. *Embo J* **10**(12), 3971-5.
- 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* **87**(24), 10067.
- Schipper, H., Krohne, G.F. & Gross, R. (1994) Epithelial cell invasion and survival of *Bordetella bronchiseptica*. *Infection and Immunity* **62**(7), 3008-11.
- Schmidt, G., Goehring, U.M., Schirmer, J., Lerm, M. & Aktories, K. (1999) Identification of the C-terminal part of *Bordetella* dermonecrotic toxin as a transglutaminase for rho GTPases. *J Biol Chem* **274**(45), 31875-81.
- Schneider, B., Gross, R. & Haas, A. (2000) Phagosome acidification has opposite effects on intracellular survival of *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. *Infection and Immunity* **68**(12), 7039-48.
- Schneider, B., Stubs, D. & Gross, R. (2002) Identification and genomic organization of gene loci negatively controlled by the virulence regulatory BvgAS two-component system in *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Genet Genomics* **267**(4), 526-35.
- Schroll, R., Brahushi, F., Dorfler, U., Kuhn, S., Fekete, J. & Munch, J.C. (2004) Biomineralisation of 1,2,4-trichlorobenzene in soils by an adapted microbial population. *Environ Pollut* **127**(3), 395-401.
- Sebahia, M., Preston, A., Maskell, D.J., Kuzmiak, H., Connell, T.D., King, N.D., Orndorff, P.E., Miyamoto, D.M., Thomson, N.R., Harris, D., Goble, A., Lord, A., Murphy, L., Quail, M.A., Rutter, S., Squares, R., Squares, S., Woodward, J., Parkhill, J. & Temple, L.M. (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 Bacteriol* **188**(16), 6002-15.
- Sentchilo, V., Ravatn, R., Werlen, C., Zehnder, A.J. & van der Meer, J.R. (2003a) Unusual integrase gene expression on the *clc* genomic island in *Pseudomonas* sp. strain B13. *J Bacteriol* **185**(15), 4530-8.
- Sentchilo, V., Zehnder, A.J. & van der Meer, J.R. (2003b) Characterization of two alternative promoters for integrase expression in the *clc* genomic island of *Pseudomonas* sp. strain B13. *Mol Microbiol* **49**(1), 93-104.
- Sfanos, K., Harmody, D., Dang, P., Ledger, A., Pomponi, S., McCarthy, P. & Lopez, J. (2005) A molecular systematic survey of cultured microbial associates of deep-water marine invertebrates. *Syst Appl Microbiol* **28**(3), 242-64.
- Shepard, C.W., Daneshvar, M.I., Kaiser, R.M., Ashford, D.A., Lonsway, D., Patel, J.B., Morey, R.E., Jordan, J.G., Weyant, R.S. & Fischer, M. (2004) *Bordetella holmesii* bacteremia: a newly recognized clinical entity among asplenic patients. *Clin Infect Dis* **38**(6), 799-804.
- Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y. & Ishikawa, H. (2000) Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature* **407**(6800), 81-6.
- Showsh, S.A. & Andrews, R.E., Jr. (1992) Tetracycline enhances Tn916-mediated conjugal transfer. *Plasmid* **28**(3), 213-24.
- Siddiqui, R.A., Warnecke-Eberz, U., Hengsberger, A., Schneider, B., Kostka, S. & Friedrich, B. (1993) Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16. *J Bacteriol* **175**(18), 5867-76.

- Siegele, D.A. & Kolter, R. (1992) Life after log. *Journal of Bacteriology* **174**(2), 345-8.
- Siguier, P., Filee, J. & Chandler, M. (2006) Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Curr Opin Microbiol* **9**(5), 526-31.
- Simpson, A.J., Reinach, F.C., Arruda, P., Abreu, F.A., Acencio, M., Alvarenga, R., Alves, L.M., Araya, J.E., Baia, G.S., Baptista, C.S., Barros, M.H., Bonaccorsi, E.D., Bordin, S., Bove, J.M., Briones, M.R., Bueno, M.R., Camargo, A.A., Camargo, L.E., Carraro, D.M., Carrer, H., Colauto, N.B., Colombo, C., Costa, F.F., Costa, M.C., Costa-Neto, C.M., Coutinho, L.L., Cristofani, M., Dias-Neto, E., Docena, C., El-Dorry, H., Facincani, A.P., Ferreira, A.J., Ferreira, V.C., Ferro, J.A., Fraga, J.S., Franca, S.C., Franco, M.C., Frohme, M., Furlan, L.R., Garnier, M., Goldman, G.H., Goldman, M.H., Gomes, S.L., Gruber, A., Ho, P.L., Hoheisel, J.D., Junqueira, M.L., Kemper, E.L., Kitajima, J.P., Krieger, J.E., Kuramae, E.E., Laigret, F., Lambais, M.R., Leite, L.C., Lemos, E.G., Lemos, M.V., Lopes, S.A., Lopes, C.R., Machado, J.A., Machado, M.A., Madeira, A.M., Madeira, H.M., Marino, C.L., Marques, M.V., Martins, E.A., Martins, E.M., Matsukuma, A.Y., Menck, C.F., Miracca, E.C., Miyaki, C.Y., Monteriro-Vitorello, C.B., Moon, D.H., Nagai, M.A., Nascimento, A.L., Netto, L.E., Nhani, A., Jr., Nobrega, F.G., Nunes, L.R., Oliveira, M.A., de Oliveira, M.C., de Oliveira, R.C., Palmieri, D.A., Paris, A., Peixoto, B.R., Pereira, G.A., Pereira, H.A., Jr., Pesquero, J.B., Quaggio, R.B., Roberto, P.G., Rodrigues, V., de, M.R.A.J., de Rosa, V.E., Jr., de Sa, R.G., Santelli, R.V., Sawasaki, H.E., da Silva, A.C., da Silva, A.M., da Silva, F.R., da Silva, W.A., Jr., da Silveira, J.F., Silvestri, M.L., Siqueira, W.J., de Souza, A.A., de Souza, A.P., Terenzi, M.F., Truffi, D., Tsai, S.M., Tsuhako, M.H., Vallada, H., Van Sluys, M.A., Verjovski-Almeida, S., Vettore, A.L., Zago, M.A., Zatz, M., Meidanis, J. & Setubal, J.C. (2000) The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. *Nature* **406**(6792), 151-9.
- Skeeles, D.W. & Arp, L.H. (1997) *Diseases of poultry: Bordetellosis (turkey coryza)*. Ames, Iowa: Iowa State University Press.
- Skowronski, D.M., De Serres, G., MacDonald, D., Wu, W., Shaw, C., Macnabb, J., Champagne, S., Patrick, D.M. & Halperin, S.A. (2002) The changing age and seasonal profile of pertussis in Canada. *J Infect Dis* **185**(10), 1448-53.
- Smith, A.M., Guzman, C.A. & Walker, M.J. (2001) The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. *FEMS Microbiol Rev* **25**(3), 309-33.
- Spears, P.A., Temple, L.M., Miyamoto, D.M., Maskell, D.J. & Orndorff, P.E. (2003) Unexpected similarities between *Bordetella avium* and other pathogenic *Bordetellae*. *Infect Immun* **71**(5), 2591-7.
- Spilker, T., Liwienski, A.A. & Lipuma, J.J. (2008) Identification of *Bordetella* spp. in respiratory specimens from individuals with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Infect* **14**(5), 504-6.
- Springael, D., Peys, K., Ryngaert, A., Van Roy, S., Hooyberghs, L., Ravatn, R., Heyndrickx, M., van der Meer, J.R., Vandecasteele, C., Mergeay, M. & Diels, L. (2002) Community shifts in a seeded 3-chlorobenzoate degrading membrane biofilm reactor: indications for involvement of in situ horizontal transfer of the *clc*-element from inoculum to contaminant bacteria. *Environ Microbiol* **4**(2), 70-80.
- Stachel, S.E. & Zambryski, P.C. (1986) *Agrobacterium tumefaciens* and the susceptible plant cell: a novel adaptation of extracellular recognition and DNA conjugation. *Cell* **47**(2), 155-7.
- Stark, D., Riley, L.A., Harkness, J. & Marriott, D. (2007) *Bordetella pertussis* from a clinical sample in Australia: isolation and molecular identification. *J Med Microbiol* **56**(Pt 3), 435-7.
- Steed, L.L., Setareh, M. & Friedman, R.L. (1991) Intracellular survival of virulent *Bordetella pertussis* in human polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol* **50**(4), 321-30.
- Steffen, P., Goyard, S. & Ullmann, A. (1996) Phosphorylated BvgA is sufficient for transcriptional activation of virulence-regulated genes in *Bordetella pertussis*. *Embo J* **15**(1), 102-9.
- Steinmann-Keller, D. (2000) *Grundstudium Biologie, Mikrobiologie: Genetik und Evolution*. Heidelberg: Spektrum, Akd. Verl.

- Stenson, T.H. & Peppler, M.S.** (2007) Osmolarity affects Bvg-mediated virulence regulation by *Bordetella pertussis*. *Can J Microbiol* **53**(9), 1053-61.
- Stibitz, S., Aaronson, W., Monack, D. & Falkow, S.** (1989) Phase variation in *Bordetella pertussis* by frameshift mutation in a gene for a novel two-component system. *Nature* **338**(6212), 266-9.
- Stibitz, S., Black, W. & Falkow, S.** (1986) The construction of a cloning vector designed for gene replacement in *Bordetella pertussis*. *Gene* **50**(1-3), 133-40.
- Stibitz, S. & Yang, M.S.** (1991) Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the *vir* locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **173**(14), 4288-96.
- Stock, A.M., Robinson, V.L. & Goudreau, P.N.** (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**, 183-215.
- Stockbauer, K.E., Fuchslocher, B., Miller, J.F. & Cotter, P.A.** (2001) Identification and characterization of BipA, a *Bordetella* Bvg-intermediate phase protein. *Mol Microbiol* **39**(1), 65-78.
- Storsaeter, J., Hallander, H.O., Gustafsson, L. & Olin, P.** (1998) Levels of anti-pertussis antibodies related to protection after household exposure to *Bordetella pertussis*. *Vaccine* **16**(20), 1907-16.
- Sullivan, J.T. & Ronson, C.W.** (1998) Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9), 5145-9.
- Takenaka, S., Asami, T., Orii, C., Murakami, S. & Aoki, K.** (2002) A novel meta-cleavage dioxygenase that cleaves a carboxyl-group-substituted 2-aminophenol. Purification and characterization of 4-amino-3-hydroxybenzoate 2,3-dioxygenase from *Bordetella* sp. strain 10d. *European Journal of Biochemistry* **269**(23), 5871-5877.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S.** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**(8), 1596-9.
- Tamura, M., Nogimori, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T., Ui, M. & Ishii, S.** (1982) Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry* **21**(22), 5516-22.
- Tan, K., Conway, S.P., Brownlee, K.G., Etherington, C. & Peckham, D.G.** (2002) *Alcaligenes* infection in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **34**(2), 101-4.
- Tang, Y.W., Hopkins, M.K., Kolbert, C.P., Hartley, P.A., Severance, P.J. & Persing, D.H.** (1998) *Bordetella holmesii*-like organisms associated with septicemia, endocarditis, and respiratory failure. *Clin Infect Dis* **26**(2), 389-92.
- Taylor, B.L. & Zhulin, I.B.** (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(2), 479-506.
- Temple, L.M., Weiss, A.A., Walker, K.E., Barnes, H.J., Christensen, V.L., Miyamoto, D.M., Shelton, C.B. & Orndorff, P.E.** (1998) *Bordetella avium* virulence measured in vivo and in vitro. *Infect Immun* **66**(11), 5244-51.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. & Swaminathan, B.** (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**(9), 2233-9.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**(22), 4673-80.
- Toussaint, A., Merlin, C., Monchy, S., Benotmane, M.A., Leplae, R., Mergeay, M. & Springael, D.** (2003) The biphenyl- and 4-chlorobiphenyl-catabolic transposon Tn4371, a member of a new family of genomic islands related to IncP and Ti plasmids. *Appl Environ Microbiol* **69**(8), 4837-45.

- Tsang, R.S., Lau, A.K., Sill, M.L., Halperin, S.A., Van Caesele, P., Jamieson, F. & Martin, I.E.** (2004) Polymorphisms of the fimbria fim3 gene of *Bordetella pertussis* strains isolated in Canada. *J Clin Microbiol* **42**(11), 5364-7.
- Tsay, R.W., Lin, L.C., Chiou, C.S., Liao, J.C., Chen, C.H., Liu, C.E. & Young, T.G.** (2005) *Alcaligenes xylooxidans* bacteremia: clinical features and microbiological characteristics of isolates. *J Microbiol Immunol Infect* **38**(3), 194-9.
- Tseng, C.P., Albrecht, J. & Gunsalus, R.P.** (1996) Effect of microaerophilic cell growth conditions on expression of the aerobic (cyoABCDE and cydAB) and anaerobic (narGHJI, frdABCD, and dmsABC) respiratory pathway genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**(4), 1094-8.
- Tuomanen, E.** (1986) Piracy of adhesins: attachment of superinfecting pathogens to respiratory cilia by secreted adhesins of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **54**(3), 905-8.
- Tuomanen, E. & Weiss, A.** (1985) Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory-epithelial cells. *J Infect Dis* **152**(1), 118-25.
- Tuomanen, E.I., Nedelman, J., Hendley, J.O. & Hewlett, E.L.** (1983) Species specificity of *Bordetella* adherence to human and animal ciliated respiratory epithelial cells. *Infect Immun* **42**(2), 692-5.
- Uhl, M.A. & Miller, J.F.** (1994) Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(3), 1163-7.
- Uhl, M.A. & Miller, J.F.** (1996a) Central role of the BvgS receiver as a phosphorylated intermediate in a complex two-component phosphorelay. *J Biol Chem* **271**(52), 33176-80.
- Uhl, M.A. & Miller, J.F.** (1996b) Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *Embo J* **15**(5), 1028-36.
- van't Wout, J., Burnette, W.N., Mar, V.L., Rozdzinski, E., Wright, S.D. & Tuomanen, E.I.** (1992) Role of carbohydrate recognition domains of pertussis toxin in adherence of *Bordetella pertussis* to human. *Infect Immun*. **60**(8), 3303-8.
- van der Meer, J.R., Ravatn, R. & Sentschilo, V.** (2001) The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13 and other mobile degradative elements employing phage-like integrases. *Arch Microbiol* **175**(2), 79-85.
- van der Meer, J.R. & Sentschilo, V.** (2003) Genomic islands and the evolution of catabolic pathways in bacteria. *Curr Opin Biotechnol* **14**(3), 248-54.
- van der Woude, M.W.** (2006) Re-examining the role and random nature of phase variation. *FEMS Microbiol Lett* **254**(2), 190-7.
- van der Zee, A., Groenendijk, H., Peeters, M. & Mooi, F.R.** (1996) The differentiation of *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* from humans and animals as determined by DNA polymorphism mediated by two different insertion sequence elements suggests their phylogenetic relationship. *Int J Syst Bacteriol* **46**(3), 640-7.
- van der Zee, A., Mooi, F., Van Embden, J. & Musser, J.** (1997) Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella* spp.: phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences. *J Bacteriol* **179**(21), 6609-17.
- Vandamme, P., Heyndrickx, M., Vancanneyt, M., Hoste, B., De Vos, P., Falsen, E., Kersters, K. & Hinz, K.H.** (1996) *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* **46**(4), 849-58.
- Vandamme, P., Hommez, J., Vancanneyt, M., Monsieurs, M., Hoste, B., Cookson, B., Wirsing von Konig, C.H., Kersters, K. & Blackall, P.J.** (1995) *Bordetella hinzii* sp. nov., isolated from poultry and humans. *Int J Syst Bacteriol* **45**(1), 37-45.
- Vanderpool, C.K. & Armstrong, S.K.** (2001) The *Bordetella* *bhu* locus is required for heme iron utilization. *J Bacteriol* **183**(14), 4278-87.

- Veal-Carr, W.L. & Stibitz, S.** (2005) Demonstration of differential virulence gene promoter activation in vivo in *Bordetella pertussis* using RIVET. *Mol Microbiol* **55**(3), 788-98.
- Vergara-Irigaray, N., Chavarri-Martinez, A., Rodriguez-Cuesta, J., Miller, J.F., Cotter, P.A. & Martinez de Tejada, G.** (2005) Evaluation of the role of the Bvg intermediate phase in *Bordetella pertussis* during experimental respiratory infection. *Infect Immun* **73**(2), 748-60.
- Vidakovics, M.L., Lamberti, Y., Serra, D., Berbers, G.A., van der Pol, W.L. & Rodriguez, M.E.** (2007a) Iron stress increases *Bordetella pertussis* mucin-binding capacity and attachment to respiratory epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* **51**(2), 414-21.
- Vidakovics, M.L., Paba, J., Lamberti, Y., Ricart, C.A., de Sousa, M.V. & Rodriguez, M.E.** (2007b) Profiling the *Bordetella pertussis* proteome during iron starvation. *J Proteome Res* **6**(7), 2518-28.
- von Eiff, C., Peters, G. & Becker, K.** (2006) The small colony variant (SCV) concept -- the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury* **37 Suppl 2**, S26-33.
- von Wintzingerode, F., Schattke, A., Siddiqui, R.A., Rosick, U., Gobel, U.B. & Gross, R.** (2001) *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**(4), 1257-1265.
- Waldor, M.K. & Mekalanos, J.J.** (1996) Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* **272**(5270), 1910-4.
- Wang, F., Grundmann, S., Schmid, M., Dorfler, U., Roherer, S., Charles Munch, J., Hartmann, A., Jiang, X. & Schroll, R.** (2007) Isolation and characterization of 1,2,4-trichlorobenzene mineralizing *Bordetella* sp. and its bioremediation potential in soil. *Chemosphere*.
- Weingart, C.L. & Weiss, A.A.** (2000) *Bordetella pertussis* virulence factors affect phagocytosis by human neutrophils. *Infect Immun* **68**(3), 1735-9.
- Weiss, A.A.** (1992) *The procaryotes: The Genus Bordetella*. Berlin Heidelberg New York: Springer.
- Weiss, A.A. & Falkow, S.** (1984) Genetic analysis of phase change in *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **43**(1), 263-9.
- Weiss, A.A. & Goodwin, M.S.** (1989) Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model. *Infect Immun* **57**(12), 3757-64.
- Weiss, A.A., Johnson, F.D. & Burns, D.L.** (1993) Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(7), 2970-4.
- Weiss, J.V. & Cozzarelli, I.M.** (2008) Biodegradation in Contaminated Aquifers: Incorporating Microbial/Molecular Methods. *Ground Water*.
- West, A.H. & Stock, A.M.** (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**(6), 369-76.
- Weyant, R.S., Hollis, D.G., Weaver, R.E., Amin, M.F., Steigerwalt, A.G., O'Connor, S.P., Whitney, A.M., Daneshvar, M.I., Moss, C.W. & Brenner, D.J.** (1995) *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J Clin Microbiol* **33**(1), 1-7.
- WHO** (2005) Pertussis vaccines--WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* **80**(4), 31-39.
- Willems, R., Paul, A., van der Heide, H.G., ter Avest, A.R. & Mooi, F.R.** (1990) Fimbrial phase variation in *Bordetella pertussis*: a novel mechanism for transcriptional regulation. *Embo J* **9**(9), 2803-9.
- Willems, R.J., Geuijen, C., van der Heide, H.G., Matheson, M., Robinson, A., Versluis, L.F., Ebberink, R., Theelen, J. & Mooi, F.R.** (1993) Isolation of a putative fimbrial adhesin from *Bordetella pertussis* and the identification of its gene. *Mol Microbiol* **9**(3), 623-34.

- Willems, R.J., Geuijen, C., van der Heide, H.G., Renauld, G., Bertin, P., van den Akker, W.M., Locht, C. & Mooi, F.R. (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* **11**(2), 337-47.
- Willems, R.J., van der Heide, H.G. & Mooi, F.R. (1992) Characterization of a *Bordetella pertussis* fimbrial gene cluster which is located directly downstream of the filamentous haemagglutinin gene. *Mol Microbiol* **6**(18), 2661-71.
- Williams, C.L., Boucher, P.E., Stibitz, S. & Cotter, P.A. (2005) BvgA functions as both an activator and a repressor to control Bvg phase expression of *bipA* in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol* **56**(1), 175-88.
- Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**(2), 221-71.
- Wong, S.M., Alugupalli, K.R., Ram, S. & Akerley, B.J. (2007) The ArcA regulon and oxidative stress resistance in *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol* **64**(5), 1375-90.
- Woolfrey, B.F. & Moody, J.A. (1991) Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin Microbiol Rev* **4**(3), 243-55.
- Wurgler-Murphy, S.M. & Saito, H. (1997) Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends Biochem Sci* **22**(5), 172-6.
- Yih, W.K., Lett, S.M., des Vignes, F.N., Garrison, K.M., Sipe, P.L. & Marchant, C.D. (2000) The increasing incidence of pertussis in Massachusetts adolescents and adults, 1989-1998. *J Infect Dis* **182**(5), 1409-16.
- Yih, W.K., Silva, E.A., Ida, J., Harrington, N., Lett, S.M. & George, H. (1999) *Bordetella holmesii*-like organisms isolated from Massachusetts patients with pertussis-like symptoms. *Emerg Infect Dis* **5**(3), 441-3.
- Yuan, J. & Stewart Jr., C. (2005) Real-time PCR Statistics. *PCR Encyclopedia* **1**, 101127-49.
- Yuk, M.H., Harvill, E.T., Cotter, P.A. & Miller, J.F. (2000) Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF-kappaB activation by the *Bordetella* type III secretion system. *Mol Microbiol* **35**(5), 991-1004.
- Yuk, M.H., Heininger, U., Martinez de Tejada, G. & Miller, J.F. (1998) Human but not ovine isolates of *Bordetella paraptussis* are highly clonal as determined by PCR-based RAPD fingerprinting. *Infection* **26**(5), 270-3.
- Zealey, G.R., Loosmore, S.M., Yacoob, R.K., Cockle, S.A., Boux, L.J., Miller, L.D. & Klein, M.H. (1990) Gene replacement in *Bordetella pertussis* by transformation with linear DNA. *Biotechnology (N Y)* **8**(11), 1025-9.
- Zhang, W. & Shi, L. (2005) Distribution and evolution of multiple-step phosphorelay in prokaryotes: lateral domain recruitment involved in the formation of hybrid-type histidine kinases. *Microbiology* **151**(Pt 7), 2159-73.
- Zhang, X., McDaniel, A.D., Wolf, L.E., Keusch, G.T., Waldor, M.K. & Acheson, D.W. (2000) Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis* **181**(2), 664-70.
- Zhang, Y.L. & Sekura, R.D. (1991) Purification and characterization of the heat-labile toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **59**(10), 3754-9.
- Zu, T., Manetti, R., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (1996) Differential binding of BvgA to two classes of virulence genes of *Bordetella pertussis* directs promoter selectivity by RNA polymerase. *Mol Microbiol* **21**(3), 557-65.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
Ag	Silber
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
att	attachment site
<i>B.</i>	<i>Bordetella</i>
<i>BcuI</i>	<i>SpeI</i>
bp	Basenpaar(e)
BG	Bordet-Gengou
BSA	Rinderserumalbumin
BvgA	Response Regulator Protein des BvgAS
BvgAS	Zweikomponentensystem in Bordetellen
BvgS	Histidinkinase Protein des BvgAS
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CFU	colony forming units
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propane sulfonate
CHEF	clamped homogeneous electric field
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
Cm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
C-terminal	Carboxyterminal
CTP	Cytidintriphosphat
CYA	Adenylatzyklase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNT	Dermonekrotisches Toxin
DR	direct repeat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Etylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	et alteri (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FHA	Filamentöses Hämagglutinin

Fim	Fimbrien
G	Guanin
g	Gramm
GC-Gehalt	Guanin/Cytosin-Gehalt
GI	genomische Insel
h	Stunde
HGT	horizontaler Gentransfer
His	Histidin
HTH	Helix-turn-helix-Motiv
IAA	Iodacetamid
ICE	integratives und konjugatives Element
IR	inverted repeat
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Lysogeny-Broth-Medium
LMP-Agarose	Low melting point Agarose
log.	logarithmisch
Lsg.	Lösung
μ	Mikro- (10^{-6})
m	Milli- (10^{-3})
M	Molar
mA	Milliampere
max.	maximal
mbp	Megabasenpaare
MCS	multiple cloning site
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	multiplicity of infection
MS	Massenspektrometrie
n	Nano- (10^{-9})
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
N-terminal	Aminoterminal
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ORF	open reading frame
p	Pico- (10^{-12})
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFC	pulse field certified
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PNK	Polynukleotid-Kinase
PRN	Pertaktin
PTX	Pertussis-Toxin

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rpoB	RNA-Polymerase (β -Untereinheit)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
Spsp	Spatelspitze
SS	Steiner-Scholte-Medium
ssDNA	einzelsträngige DNA
T	Thymin
t	Zeit
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TCA-Zyklus	Tricarbonsäure-Zyklus, Citratzyklus
TCT	Tracheales Zytotoxin
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethlendiamin
T_m	Schmelztemperatur
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett-
V	Volt
Vhs	Voltstunden
Vol.	Volumen
v/v	volume per volume
W	Watt
w/v	weight per volume
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZKS	Zweikomponentensystem
z.T.	zum Teil

8 Anhang

8.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Melanie Lechner
Geboren:	05.09.1977
Geburtsort:	Villingen-Schwenningen
Familienstand:	ledig

Schulbildung

1984 – 1988	Besuch der GHS Tannheim
1988 – 1997	Besuch des Gymnasiums am Romäusring, Villingen-Schwenningen, Abschluss: Abitur mit der Note 1,6

Studium

1997-2003	Diplomstudium der Biologie an der Universität Konstanz. Hauptstudium mit den Schwerpunkten: Phytopathologie, Pflanzenphysiologie, Entwicklungsphysiologie und mikrobielle Ökologie
Mai 2002	Mündliche Diplomprüfung in den Fächern Phytopathologie und Limnologie
Aug. 2002 - Aug. 2003	Diplomarbeit an der Universität Konstanz, Lehrstuhl für Phytopathologie von Prof. Dr. K. Mendgen Thema: „Die Rolle pilzlicher und pflanzlicher Invertasen im Pathosystem <i>Uromyces fabae</i> / <i>Vicia faba</i> “ Abschluss als Diplom-Biologin Univ. mit der Note sehr gut

Hilfswissenschaftliche Tätigkeit

Juli 2000 – Dez. 2000	wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für mikrobielle Ökologie, Universität Konstanz
Aug. 2001- Okt. 2001	wissenschaftliche Hilfskraft, Lehrstuhl für Phytopathologie, Universität Konstanz

Promotion

seit Apr. 2004	Promotion an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Lehrstuhl für Mikrobiologie von Prof. Dr. W. Goebel Betreuer der Doktorarbeit: Prof. Dr. Roy Gross
----------------	---

8.2 Publikationen

Originalarbeiten

Desulfonation and degradation of the disulfodiphenylethercarboxylates from linear alkyldiphenyletherdisulfonate surfactants.

Schleheck D, Lechner M, Schonenberger R, Suter MJ, Cook AM

Appl Environ Microbiol 2003 Feb **69:2** 938-44

Cloning and Characterization of a Novel Invertase from the Obligate Biotroph *Uromyces fabae* and Analysis of Expression Patterns of Host and Pathogen Invertases in the Course of Infection.

Voegele RT, Wirsal S, Möll U, Lechner M, Mendgen K

MPMI 2006 Feb **19:6** 625-634

The missing link: *Bordetella petrii* is endowed with both the metabolic versatility of environmental bacteria and virulence traits of pathogenic *Bordetellae*.

Gross R, Guzman CA, Sebahia M, Martins dos Santos VAP, Pieper DH, Koebnik R, Lechner M, Bartels D, Buhrmester J, Choudhuri JV, Ebensen T, Gaigalat L, Herrmann S, Larisch C, Link S, Linke B, Meyer F, Mormann S, Nakunst D, Rückert C, Schneiker-Beke SI, Schulze K, Vorhölder F, Yevesa T, Engle JT, Goldman WE, Pühler A, Göbel UB, Goesmann A, Blöcker H, Kaiser O & Martinez-Arias R

(submitted)

Horizontal gene transfer and molecular characterization of genomic islands in *Bordetella petrii*.

Lechner M, Schmitt K, Hot D, Loch C, Lemoine Y, Gross R

(in preparation)

Vorträge

DPG Tagung in Aachen, März 2003

Arbeitskreis Wirt-Parasit-Beziehungen

„Das süße Leben der Rostpilze: Invertasen im Pathosystem *Uromyces fabae* / *Vicia faba*“.

Kolloquium des SFB 479 in Würzburg, Jan. 2007

Erregervariabilität und Wirtsreaktion bei Infektiösen Krankheitsprozessen

„*Bordetella petrii* – Genome Structure and Bvg Regulon“.

Posterpräsentationen

57. Jahrestagung der DGHM und VAAM Jahrestagung, Göttingen, Sept. 2005

„*B. petrii* – *Bordetella* of the environment. Characterisation starting from ecological questions“

Lechner M, Gross R

26. Symposium on Mechanisms of Gene Regulation, Uni Köln, Königswinter, Sept. 2006

„*Bordetella petrii* – an environmental *Bordetella* species. Insights in genomic variation“

Lechner M, The *Bordetella petrii* genome consortium, Gross R

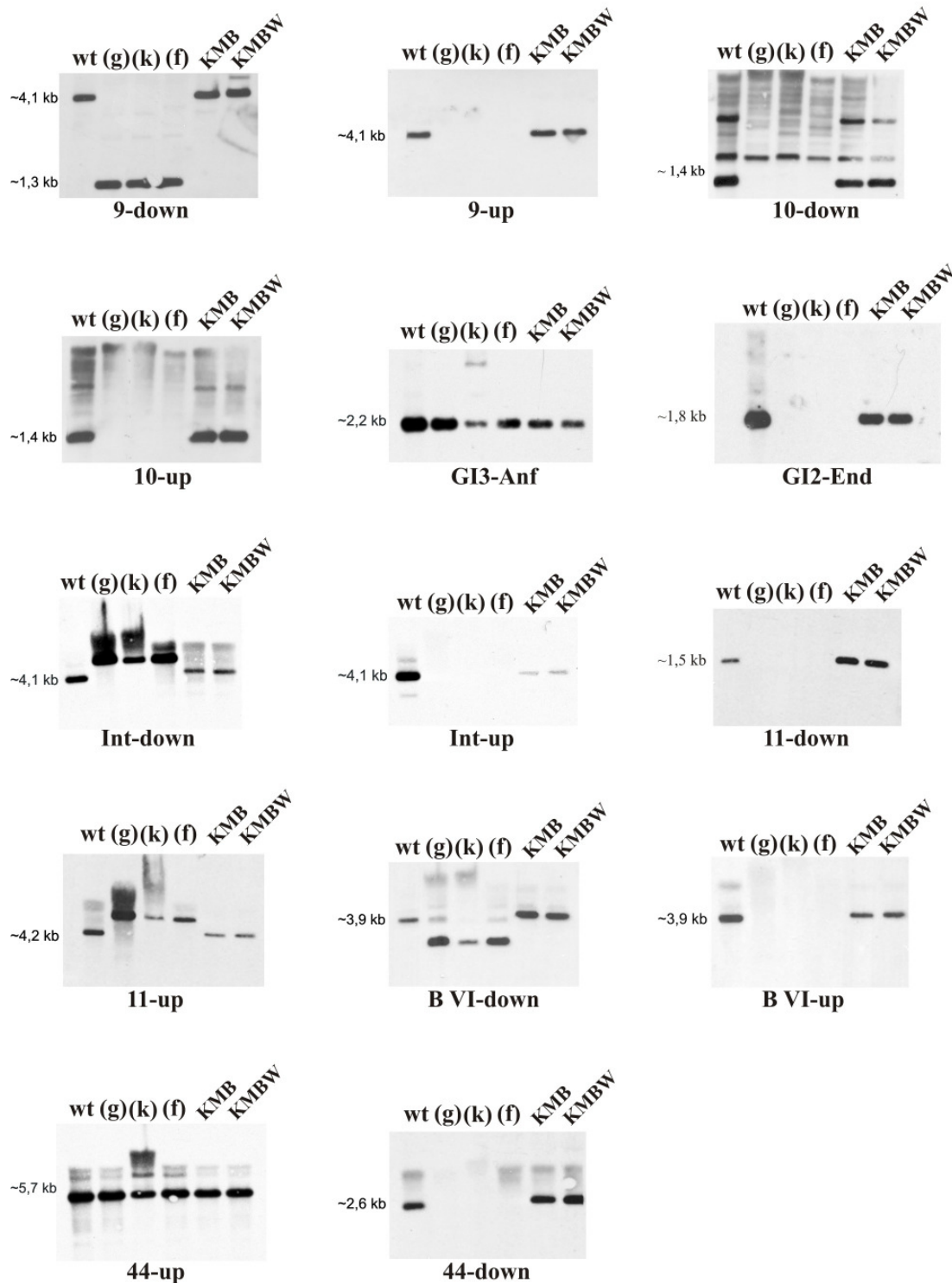
Young Investigator Meeting, Research Center for Infectious Diseases, Uni Würzburg, Jan. 2007

„*Bordetella petrii* – an environmental *Bordetella* species. Insights in genomic variation“

(aktualisierte Version)

Lechner M, The *Bordetella petrii* genome consortium, Gross R

8.3 Southern Blots zur Untersuchung der genomischen Inseln GI1-GI3 und GI6



Anhang 8.3 Übersicht über die Southern Blots, die mit den in Tabelle 5-13 aufgeführten bzw. in Abbildung 5-26 dargestellten Sonden durchgeführt wurden. Es wurden jeweils 1,5 µg *PvuI* geschnittene chromosomale DNA von *B. petrii* DSM 12804 aufgetragen. KMB und KMBW sind Varianten aus einer früheren Arbeit, die sich in der PFGE in einer Bande vom Wildtyp unterscheiden (Klein, 1999). Die Größenangaben beziehen sich auf das *PvuI*-Fragment im Wildtyp.

GAGGTTTTCTGGTGTGTTTTTACCCATGGCCACAGCAAAGGCGTGGCGCTGGATGTCGACATCATGCCCATGGTTGCCGA
 1521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1600
 CTCCAAAGACCACAAAAAGTGGGTACCGGGTGTCTTTCCGCACCGCGACCTACAGCTGTAGTACGGGTACCAACGGCT

CCATCATTGGTTGACCCGCTGCGGCTGAAGCAGATTCTGAACAACCTGCTTTCCAATGCGATACGCTTACGGAACAGG
 1601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
 GGTAGTAAACCAACTGGGCGACGCCGACTTCGTCTAAGACTTGTGGACGAAAGTTACGCTATGCGAAGTGCCTTGTCC

GCAGCATTCAAATTCAGATACGCGCAGACAAGCATCCGCGACGCACACCAATGGGTGCAGTTGCCGTCAGCGATACCGGC
 1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1760
 CGTCGTAAGTTAAGTCTATGCGCGCTGTTCGTAGGCGCTGCGTGTGGTTACCCACGTCAAACGGCAGTCGCTATGGCCG

ATTGGCATCGAACCCGCCGATTGCCCCACGTTGTTTCGACCCGTTTCGTGCAAGCCGGGGCGTCGGCCACGGTTGGCGGGG
 1761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1840
 TAACCGTAGCTTGGGCGGCATAACGGGTGCAACAAGCTGGGCAAGCAGCTTCGGCCCCGACGGGTGCCAACCGCCCCG

CGGGTGGGGCTGTCCATTTGCAAGCGGCTGGTCGACATCATGGGCGGGTATATACGCATTAGCAGCAAGCGGAATCAAG
 1841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
 GCCCAACCCCGACAGGTAACGTTTCGCCGACCAGCTGTAGTACCCGCCATATATGCGTAATCGTCGTTTCGCCCTTAGTTTC

GCACCCGCGTGGTGGTTCGCCTGCGGTTTCCCGTAAAAGCGCTGCCTCAGCTTTCGCCAGGCGGCCAGGCCAATGCACCC
 1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2000
 CGTGGGCGCACCACCAAGCGGACGCCAAAGGGCATTTTCGCGACGGAGTCGAAAGCGGTCCGCCGTTCCGGTTACGTGGG

GAGCCGCAAGCGCCGATATTGGTTGTGGACGACCATGCGGCCAACCGTACGTTGCTTAAGCACCAGCTGCAAAAAGCTTGG
 2001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2080
 CTCGGCTTCGCGCTATAACCAACACCTGCTGGTACGCGGTTGGCATGCAACGAATTCGTGGTCGACGTTTTTCGAACC

TCATGCCGTCGCTGCGCCGAGAATGGTCTGCAGGCGCTGGAAGCCGTCGGCAGGCAGGTTTTCAAGCTGGCGATCTGCG
 2081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160
 AGTACGGCAGCAGACGCGGCTCTTACCAGACGTCGCGACCTTCGCGACCGCTCCGTCCAAAAGTTCGACCGCTAGACGC

ACTGCGCCATGCCAGGATGAACGGCATGGAGTTTCGTGCGCGCATTGCGGGCAGGCCCCGAACCCAATGCCCGCATGCCG
 2161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2240
 TGACCGGTTACGGGTCCTACTTGCCTACCTCAAGCAGCGCGTAAACGCCGTCGGGGCTTGGGTTACGGGCGTACGGC

GTCTTGGGTTATACGGCGGGTGCACAAGATAACTACGCCAGCAAGCCATCGACGCGGCATGGACGCGCTGTGTTCAA
 2241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2320
 CAGAACCCAATATGCCGCCACGCGTTCTATTGATGCGGGTTCGTTCCGTTAGCTGCGGCCGTACCTGCGGCACGACAAGTT

GCCGGCAGGGTTGGCGGAATTGCAAGCGGCGCTGCGGGCACACTTGCCACAGCCGTTATTGCTTAA
 2321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400
 CGGCCGTCCCAACCGCCTTAACGTTTCGCCGCGACGCCCGTGTGAACGGTGTGCGGCATAACAGAAATGGTTGGTTCGCGTC

CCAACGTCGCGACAAGCGCTGCACAGCGGGCACGTACAGGCTGCCCAGCGCCGCTACTGTGTCGCTTGCATCATGCTGG
 2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2480
 GGTGACAGCGCTGTTTCGCGACGTGTCGCCCGTGCATGTCCGACCGGTGCGGCGATGACACAGCGGAACGAGTACGACC

GCCAGCAATTCAATGCGCTGGCTGAGCGCTACCAGCGCGGGCGCGCCACCAGATGTGCCGTGCCCTTGATGCGATGCGC
 2481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2560
 CGGTCGTTAAGTTACGCGACCGACTCGCGATGGTTCGCGCCCGCGGGTGGTCTACACGGCACGGGAACGACTACGCTACGCG

GCAAGCGCGGGCGTCGGGCGACGCGCGCGCGCGCAGGCTGGCGGAAGTCGCGCAAGTCAGACTGATTGGTGTGCGAGCA
 2561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640
 CGTTCGCGCCCGCAGCCCGTCCGCGCGCGCCGCTCCGACCGCCTTCAGCGGTTTCAGTCTGACTAACCCACAGCTCGT

AACTGGCGACGAGTTCCGTCACCACCGACGGATCGTCGTCCACCAAGGCGCCAAGCTGCTGCGCCAGCGCCGCTTTATCT
 2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2720
 TTGACCGCTGCTCAAGGCAGTGGTGGCTGCTAGCAGCAGGTGGTTCGCGGTTTCGACGACGCGGTCGCGCGGAAATAGA

GGAATCGGCGCCGATAGCCGGCGCCGTTCAACGCAACGGCCATGGCGCCTTCGTCGGCCGGATCGGATAAATGCCGACG
 2721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2800
 CCTTAGCCGCGGCTATCGGCCGCGGCGATTGCGTTGCCGGTACCAGCGGAAGCAGCCGGCCTAGCCTATTTACGGCTGC

CACGGACGCGCACACAGCCGGCGCGGCGCACAGGTAAGACGATGGCGCCCGCAACCCGCCCCGCTCAGTTGGTTCGG
 2801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2880
 GTGCTGCGCGTGGTTCGGCCGCGCGGCTGTCATTTCCTGCTACCGCGGGCGGTTGGGACGGGCGAGTCAACCAGCC

CATCGGGAGCGGCCTCGCCTACCGATAGCTCGATGATAACGACAGCGTGGTTCGACATCGGGCAAAGGCGCGCCGCGCCG
 2881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2960
 GTAGCCCTCGCCGAGCGGATGGCTATCGAGCTACTATTGCTGTGACACAGCTGTAGCCGCTTTCGCGCCGGCGCGCCG

CAGGACGCTTCGCGCACGGCCATGCCGAACCCGCGCAAGATATCGGCCGGGCGCGCCCGGCGCGGCGATCGTGTGCGT
 2961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3040
 GTCGTCGAAGCGGTCGCGGTACGGCTTGGGCGGTTCTATAGCCGGCCGCGCGGGCGCGGCGCTAGCACTACGCA

AGACAGGATCAAGGCATGGTGCATGGCGGTAAGTGTGTAGCGGGAAGGCACACGGGCTTAGCGCACGATTTGGTGCCTG
 3041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3120
 TCTGTCTAGTTCCGTTACACGTAACCGCATTACACATCCGCCCTTCGTTGGCCGAAATCGCGTGTAAACACGGAC

◀ *hpt-Start* || *bvgA-Stop*

CGCGCGAAGTCGACCAGTTCTACCAACGAACCCACACCCCAATTTGGCCATGAGGCGGGTTTTGTAAGTGCTGACGGTTTT
 3121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3200
 GCGCGCTTCAGCTGGTCAAGATGGTTGCTTGGGTGTGGGTAAACC GGTA CTCCGCCAAAAACATTACGACTGCCAAAA
 GTTGCTGATGAACAGCGCGTCGCCGATGTCTTTATTGGACATGCCGCGCACCAGCATCTGCATGACGATGATTTCTTTGT
 3201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3280
 CAACGACTACTTGTGCGCAGCGGCTACAGAAATAACCTGTACGGCGCGTGGTCTGACGACTACTGCTACTAAAGAAAA
 CGGACAGCCGCTCGATTTTATTGGCGCGTCGGCATCGCTGCTTGAACCGGGCGATGGGCAACATCGGGAAAAACACTG
 3281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3360
 GCCTGTGCGGAGCTAAAATAACCGCCGAGCCGTAGCGACGAACCTTGGCCCGTACC GGTTGTAGCCCTTTTGTGAC
 TAGCCCGCCAGCACGGTTTTCGATGGCGCGCACGATTTCAAGTAGTTCTGCACCTTGCTGATGTAGCCTTGCGCGCCAGC
 3361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3440
 ATCGGGCGGTCTGCCAAAGCTACCGCGGTGCTAAAGTCCATCAAGGACGTGGAACGACTACATCGGAACGCGCGGTCTG
 CGCCTTGACCCGCGGCGGAAAAACGACGGGATCTTGCGCGGAAATGACCAGAATGCGGATGTGGGCTTGATAAGCTTGA
 3441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3520
 GCGGAACTGGGCGCGCTTTTGTGCTGCCCTAGAACGCGCTTTACTGGTCTTACGCTACAGCCGAACTATTGAACT
 TGCGGGGAATGGCCTCAAGGCCGTTGATCTTGGGCAGATCGATGTCCAGAATGACGAGGCCGGGCTCGTGCTGGCGCACG
 3521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3600
 ACGCCCTTACCGGAGTTCGGCAACTAGAACCCGTCTAGCTACAGGTCTTACTGCTCCGCGCCGAGCAGACCGCGTGC
 GCCTGCACGGCGTCTTGGCCGTTGCCGGCCTCGATGATCTGCGACACGCCAGCATCTGGGACAGTTGCTGCCTGAGTAT
 3601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3680
 CGGACGTGCCGAGGACCGCAACGGCCGGAGCTACTAGACGCTGTGGGTCTGACACCTGTCAACGACGGACTCATA
 CAGCCGCAACGAAGGATGGTCTGACGATGAGTACGCTGGTCACGGGTTCAAGTTGATCCATTTATTGATGCATTTTTGC
 3681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3760
 GTGCGGCTTGTCTTCTACCAGCAGCTGCTACTCATGCGACCAAGTCAACTAGGTAAATAACTACGTA AAAACG
 AGGTCGATGAAAGCGACGGGCTTGGCAAGGTAGTCGTCCATGCCGCTGGCGCGGACGCGTGCATCTGCTGAGTGTGCA
 3761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3840
 TCCAGTACTTTTCCGCTGCCGAAACCGTTCCATCAGCAGGTACGGCGACCGCGCTCGCGACGTAGACACTCACGACGT
 ◀ *bvgA-Start*
 GTCGGCCGTCACGCCACGATGGGCAGGCGCGGCCGCTGCGCTTGCCTTCTTGCTGGCGCACGCGCCGCGCAAGTTCGC
 3841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3920
 CAGCCGGCAGTGGCGGTCTACCGTCCGCGCGGCGACGCGAAGCGAAGAACGACCGCGTGGCGGGCGGTTCAAGCG
 AGCCGTCGATGCCGGGCATCTGGCAGTCGGTAAACAGCATGGCGTAGTCGCTGCTGGCGCAGGGCTTCGAGCGCCTGTTG
 3921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4000
 TCGGCAGCTACGGCCGTCAGCCATTTGTCGTACCGCATCAGCACGACCGCGTCCC GAAGCTCGCGGACAAGC
 GCGTCGGCCACGGTGTGCGAGTTCAGGCCGGCCGAAGCATCAGTTGGCGCAGGATGATGCGGTAAGGTTCTGTTGCTG
 4001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4080
 CGCAGCCGTTGCCACAGCGTCAAGTCCGGCCGGGCTTCGTAGTCAACCGCGTCTACTACGCCATTCCAAGCACCCAGC
 CACGGCCAGGACGCGTGGGTTTTGGGCGCCAGAAGCGGGGCGGGCGGCGAGCCGAGCCGCTGGTGGCGCCGGCGTCCG
 4081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4160
 GTGCCGTTCTGCGCACGCCAAACCCGCGTCTTCGCCCCGCGCGCTCGGCTCGGCGGACCGCCGCGCCGAGCC
 GGCCGCTATCGATGCTGAGTTGACGCTCGCATCGCGCTGGCGCTGGCGCTGGCATCGATAGTCCCGGTAATC
 4161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4240
 CCGCGATAGCTACAGACTCAACTGCGAGCGTAGCCGCGACCGCGACCGCGACCGTAGCTATCACGGCCATTAG
 GCGTTGACGGTGGCGGAAGCGTGGCCACGGGTAGCGGCAAGCTCACCTGGAAGCGCTGCTTGGCCGCGCGTGTG
 4241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4320
 CGCAACTGCCACCGCTTCGACGCGGTGCCATCGCCGTTTCAGTGGACCTTTTCGCGACGGAACGGGACCGCGCGAC
 CAGCAGGCGTATGAGCCGCCAGCAGGCCGCGCCAGCCTGTGGCAGATGGCCAGCCAGCCGCTGCCGCGTATCGCC
 4321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4400
 GTCGTCGCGATACCTCGGCGGGTCTCGGCCGGTCCGGACACCGTCTACCGGTCGGGTCGGCGACGGCGCATAGCGG
 GCGGGTGGAAATAFCGGCCTGGGTAAACGCTTGAACAGCTGACTGTGTACCGACTCGGGAATACCGACGCTGTGTCA
 4401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4480
 CGCGCCACCTTTATAGCCGGACCCATTTGCGGACCTTGTGACTGACACATGGCTGAGCCCTTATGGCTGCGGACACAGT
 GCGACCGTAAGCGGATGTGCTGCACTTCGGGCAAGCGGACGCCCGCGCATCGGCGCGCGAGTCATATCTAGCGCACA
 4481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4560
 CGCTGGCATTTCGCGCTACACGACGTGAAGCCGTTTCGCCTGCGGGCGCGTAGCCGCGCGGTCACTATAGATCGGGTGT
 ATCTTGCCCTTCATGTTGCCCGTCATCTTGGGCGCGGTGCGCGCGCGGCTTCGAGACAGGCGCTGACGTGGATGCCG
 4561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4640
 TAGAACGGGAAGTACAACGGGCAGTAGAACCCGCGGCCACGCGCGCGCGAAGCTCTGTCCGCGACTGCACCTACGGCG
 CCTGCTCGGTGAACCTGACGGCGTTGCCACCAGGTTTCAAGCATTTGCTGAATGCGGGTGGGATCGCCATTAACGTG
 4641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4720
 GGACGAGCCACTTGAAGTCCGCAACGGGTGGTCCAAGTCTTGTAAACGACTTACGCCACCCTAGCGGGTAATTGCAC

TGGGCCACACCCGGCGCGACGTCGAGCGTCAGCGCGATGCCTTTGCGCCGCGCCAGCAGTTCGAATACGCGCAGCACCTG
 4721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4800
 ACCCGGTGTGGGCCGCGCTGCAGCTCGCAGTCGCGCTACGGAAACGCGGCGCGTCTCAAGCTTATGCGCGTCTGGAC
 ACCCAGTACGTCGCGCAGATCGAAGGGCACGGCCTCGGCTTCTGCATAGCCGATTGAGGGCGGAGAAATCGAGAATGT
 4801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4880
 TGGGTATGACAGCGCTAGCTTCCCGTCCCGGAGCCGAAGACGTATCGGCCAAGCTCCGCGCTCTTTAGTCTTTACA
 CGCCGATGATCTCCATCAGCAGGCGGGCGCGCTCGTCGGCAAGCTGGTAGTGTGGCGCTGCCCGGTTTGCAGGCCGGTT
 4881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4960
 GCGGCTACTAGAGGTAGTCTCGCCCGCGCAGCAGCCGTTCCGACCATCACGACCGCGACGGGCCAAACGTCCGGCCAA
 TCACGCATGAGGTGAGCGCCCCGATGATGGTGGCCAGCGCGTGCGAATTTCTGGTCTCATGGCCGCCAGGAAGCGGGC
 4961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5040
 AGTGCCTACTCCAGCTCGCGGGGCTACTACCACCGGTGCGCCGACGCTTAAAGCACCGAGTACCGCGGTCTTCGCCCCG
 CTTTGTCTCGGCGCTGGCTTCGGCATCGTGTCTGGCCTGGGCCAGGATTCGCGCCTGTTTATGCTCGGGCGTGGTGTCCG
 5041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5120
 GAAACGAAGCCGCGACCGAAGCCGTAGCAGAACCGGACCCGCTCTAAGCGGGACAAGTACGAGCCCGCACCACAGCC
 CCCAGTAGCCGGCCAGATCACGGATTGGTCCGGCCGCGGTCGGGCACGCCTGTGCCAGGGCGCACCCAGGCCGATCCG
 5121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5200
 GGGTCATCGGCCGGTCTAGTGCCTAACAGCCCGCGCCAGCCGTCGCGACACGGGTCCGCGTGGGTCCGGCTAGGC
 CCTGAGCGCCGACTTGGAGATCGACACGAATGGGGCGCGATTCCGGCCAGCGACCGGGCGATGGACTGTTCAAGCGTGGC
 5201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5280
 GGACTCGCGCGGTGAACCTCTAGCTGTGCTTACCCCGCGCTAAGCCGCTGCTGGCCCGCTACCTGACAAGTTCGCACCG
 GCGGTGCGCATCGGGCAGACGGCGCAGCCAGTTGTTGGCATCGCGGTGATGTGTTCCGGTGGGCAGCCGATAAAGCGCT
 5281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5360
 CGCCAGCCGTAGCCGCTGCGCGTCAACAACCGTAGCCGCCACTACACAAGCCGACCCGTCGGCTATTTCCGCA
 CGGTGCGGCCATTACATGGAAGAAGCTGCGCTGCCCGCGGGTGTCTGGCGCAGGAGGAACAGCGCGACCCGGCCGGTG
 5361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5440
 GCCACGCCGGTAATGTACCTTCTTCGACGCGACGGGCGCCACAGGACCGCTCTCCTTGTGCGCTGGGCCGGCCAC
 TCGGTGATGCTTTTCGATGGCGCGGGGTGATTGCTCGCGGACTGCAGGGTGTGCGCTTCGGACCGCAGATGGTGGCG
 5441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5520
 AGCCACTACGAAAGCTACCGCGCCGCCACATAACGAGCGCGCTGACGTCACAGCGCAAGCCTGGCGTCTACCACCGC
 ATCAGAAAACAAAAAGCCACCGTACCCATTGCAATGGGTGCAAAGAGCAGCAGGGCGGCAACCCAGGCCGCTTCGGGAT
 5521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5600
 TAGTCTTTGTTTTTCGGTGGCATGGGTAACGTACCCACGTTTCTCGTCTCCGCGCTGGGTCCGGCGAAGCCCTA
 GAGTGGCTGACATGGAAGGCTCGACCCGATGGAATGATCCACGGCGGATAGGGTACATCCGGACGGGCGCCAGGCAAA
 5601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5680
 CTCACCGACTGTACCTCCGAGCTGGGCTACCTTTACTAGGGTGGCGCTATCCCATGTAGGCCTGCCCGGGTCCGTTT
 CCATTTCTTGAAGTTTCAGAGTAAAGCGCAAGCAGGAAAGCCGGACGGGTACCGCGCTGGCGTGCAAATGACACTGA
 5681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5760
 GGTAAGAACCTTCAAGTCTCATTTCGCGTTCGTCTTTTCGGCTGCCAATGGCGCGACCCGACGTTTACTGTGACT
 TGACGCCCTGGCCGCGCGCCACGGCATAGCGGGCTGACGGCTGCAAGCAAGGCATCGGGGCAACGCGCGGATTGAA
 5761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5840
 ACTGCGGGCACCGCGCGCGGTGCCGTATCGCCGCGACGTCCGGACGTTGTTCCGTAGCCCCGTTGCGCCGCTAACTT
 ATGACAAACGAAGGGCCAGGCAGCGCGACGGCGAGTACGGCTGCGAGGCGCTTAACTTGTGGATTCTGATGGACTAGTCA
 5841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 5920
 TACTGTTTGGCTTCCCGTCCGTCGCGCTGCCGCTCATGCCGACGCTCCGCGAATTGAACACCTAAGACTACCTGATCAGT
 ◀ *bvgS2-Start*
 GAAAGCACGCTTGTCTGCCGTCAGGTTGACCGATCAATAGTTGGCGGCGGGATTTCGTAACCGGCCCTTGCAGTTC
 5921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6000
 CTTTCGTGCGAACAGACGGCAGTTCCAACCTGGCTAGTTAATCAACCGCCGCGCCCTAAGCCATTGGCCGGGAACGTCAAG
 GGCGCAACGAAGTCGGCAACCGCCGCACTTTGGCCGCCACATGGCGGCGGAGGATAGACCGCATAAAGATAGGTAT
 6001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6080
 CCGCGCTTGCTTACGCCGTTTGGGGCGTGAAACCGGCGGTGTACCGCCGCGCTCCCTATCTGGCGTATTTCTATCCATA
 CGACCATGGCCAGTCTGTCAGCAGGCGCGCAGCGGCCCTGCGCGAGGTCTGCTTCTACATAAGTGCAGCGCCACAGG
 6081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6160
 GCTGGTACCGGGTACGAAGTCTGTCGCGCGTCCGCCGGACGCGCTCCAGCAGAAGATGTATTACGCGCCGTTGGTCC
 CTCAGGCCGAAGCCGGCCCGCAGCGCTGCGCACGGCCAGGCTGGAATTGACCTGGTAGCGTCCGCGCACAGGCACGCG
 6161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6240
 GAGTCCGGCTTCGGCCGGGCTGCGCGAGCGGTGCCGGTCCGACCTTAACTGGACCATCGCAGGCGGTGTCGTTGCGC
 CACGGTCTGCCGTTGCCGGCGAAAGTCCACTCGTCCGGTGGCCAGACAGGGTGAAGCGCAGGCAGTTATGGCCCTCGCA
 6241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 6320
 GTGCCAGACGGGCACGGCCGCTTTCAGGTGAGCAGCCGACCGGTCTGTCCACTTCGCGTCCGTCAATACCGGAGCGT

```
GCGCCTGGGGGGTATCAGGCTCGCCGTGCCGTTGGAAGTA
6321 -----+-----+-----+-----+ 6360
CGCGGACCCCCATAGTCCGAGCGGCACGGCAACCTTCAT
```

Anhang 8.4 Sequenz des *bvgS/bvgA*-Lokus, welche für die Konstruktion der Deletionsmutanten herangezogen wurde. Die jeweiligen Start-Codons sind mit dem Gennamen beschriftet. Die Stop-Codons mit einem Stern gekennzeichnet.

8.5 Tabellen zur Spotauswahl mit Delta2D (DECODON)

37°C Durchgang 1

Spot Nr.	% Vol 12804-1	% Vol 12804-2	% Vol 12804-3	Mittel	Stabw	% Vol BvgA-1	% Vol BvgA-2	% Vol BvgA-3	Mittel	Stabw	Ratio BvgA/12804	t-test BvgA/12804
21	0,006	0,012	0,012	0,01	28,326	0	0	0	0	97,287	0,007	99,228
23	0,03	0,046	0,046	0,041	18,081	0	0	0	0	17,777	0,009	99,85
16	0,096	0,106	0,091	0,098	6,517	0,002	0,004	0,012	0,006	68,917	0,063	99,993
n.n.	0	0,001	0,002	0,001	67,666	0	0	0	0	118,417	0,096	86,398
n.n.	0,018	0,05	0,049	0,039	38,154	0,018	0,01	0,021	0,016	29,217	0,418	89,075
n.n.	0,029	0,092	0,089	0,07	41,641	0,041	0,021	0,028	0,03	28,315	0,429	86,378
n.n.	0,008	0,014	0,004	0,009	44,905	0,008	0,002	0,003	0,004	66,563	0,452	77,552
n.n.	0,004	0,009	0,005	0,006	38,583	0,006	0	0,003	0,003	78,552	0,455	78,332
18	0,114	0,15	0,12	0,128	12,41	0,042	0,055	0,08	0,059	26,396	0,462	98,805
n.n.	0,008	0,02	0,019	0,016	33,764	0,008	0,011	0,003	0,007	41,866	0,468	87,361
n.n.	0,005	0,005	0,012	0,007	48,116	0,004	0,003	0,003	0,003	6,045	0,475	80,143
n.n.	0,005	0,007	0,008	0,007	19,926	0,001	0,002	0,007	0,003	75,249	0,496	83,24
n.n.	0,003	0,002	0,007	0,004	53,058	0,011	0,004	0,01	0,008	35,643	2,009	81,543
n.n.	0,01	0,017	0,022	0,016	31,073	0,053	0,026	0,017	0,032	47,344	2,012	77,363
30	0,038	0,07	0,051	0,053	24,361	0,074	0,128	0,12	0,107	22,167	2,022	95,28
n.n.	0,043	0,038	0,051	0,044	12,444	0,078	0,059	0,131	0,089	34,355	2,027	89,066
33	0,012	0,04	0,03	0,028	41,728	0,069	0,044	0,057	0,057	17,967	2,068	94,607
n.n.	0,014	0,015	0,017	0,015	7,694	0,021	0,045	0,03	0,032	31,713	2,086	91,757
27	0,018	0,032	0,025	0,025	22,256	0,058	0,062	0,04	0,053	18,015	2,15	97,806
6	0,155	0,074	0,24	0,157	43,195	0,382	0,251	0,377	0,337	18,003	2,151	95,147
n.n.	0,008	0,012	0,016	0,012	26,224	0,049	0,013	0,031	0,031	46,874	2,503	84,822
n.n.	0,01	0,025	0,033	0,022	42,055	0,05	0,065	0,065	0,06	11,756	2,676	98,929
n.n.	0	0,006	0,003	0,003	71,094	0,004	0,005	0,019	0,009	72,347	2,827	70,128
n.n.	0,008	0,009	0,015	0,011	26,771	0,042	0,021	0,031	0,031	27,481	2,958	96,82
28	0,005	0,006	0,012	0,008	42,121	0,035	0,014	0,019	0,023	39,483	2,967	91,084
1	0,013	0,002	0,02	0,012	65,617	0,042	0,02	0,043	0,035	30,234	3,044	93,721
n.n.	0,003	0,006	0,007	0,005	29,532	0,006	0,008	0,038	0,017	84,847	3,22	68,304

n.n.	0,001	0,001	0,004	0,002	71,209	0,003	0,003	0,014	0,007	75,037	3,253	72,157
14	0,075	0,067	0,063	0,068	6,894	0,239	0,249	0,23	0,239	3,257	3,496	99,999
22	0,01	0,013	0,009	0,011	16,932	0,036	0,039	0,045	0,04	10,013	3,702	99,928
29	0,004	0,005	0,025	0,012	82,031	0,043	0,047	0,045	0,045	4,044	3,922	99,222
87	0,004	0,003	0,007	0,005	39,404	0,001	0,021	0,036	0,019	73,178	4,107	77,924
31	0,063	0,109	0,112	0,095	23,324	0,322	0,398	0,452	0,391	13,696	4,127	99,806
34	0,004	0,011	0,011	0,009	34,852	0,043	0,022	0,044	0,036	27,575	4,134	97,949
n.n.	0,002	0,005	0,014	0,007	77,572	0,021	0,037	0,03	0,029	22,676	4,211	97,901
24	0,008	0,006	0,009	0,008	13,655	0,034	0,047	0,028	0,036	22,086	4,772	99,261
7	0,005	0,002	0,003	0,003	45,871	0,011	0,008	0,034	0,018	65,297	5,366	84,448
9	0,034	0,026	0,049	0,036	25,927	0,218	0,244	0,217	0,226	5,475	6,234	99,993
n.n.	0	0,001	0	0	106,358	0,002	0,001	0,001	0,001	30,221	6,339	97,385
n.n.	0,001	0,002	0,003	0,002	44,575	0,028	0,009	0,002	0,013	86,415	7,635	77,109
17	0,001	0,002	0	0,001	73,12	0,006	0,012	0,01	0,009	23,423	11,32	99,394
8	0,001	0,001	0,001	0,001	21,943	0,016	0,022	0,017	0,018	13,163	21,162	99,948

42 Spots reguliert, 21 Spots n.n., 21 Spots nummeriert.

37°C Durchgang 2

Spot Nr.	% Vol 12804-1	% Vol 12804-2	% Vol 12804-3	Mittel	Stabw	% Vol BvgA-1	% Vol BvgA-2	% Vol BvgA-3	Mittel	Stabw	Ratio BvgA/12804	t-test BvgA/12804
46	0,02	0,027	0,02	0,022	16,129	0,005	0,004	0,003	0,004	18,227	0,171	99,796
62	0,04	0	0,119	0,053	92,776	0,012	0,013	0,009	0,011	13,097	0,211	70,43
n.n.	0,016	0,009	0,052	0,025	74,3	0,005	0,004	0,011	0,007	46,205	0,268	75,842
51	0,239	0,236	0,264	0,246	5,161	0,246	0	0,001	0,082	140,431	0,334	88,33
56	0,066	0,04	0,085	0,064	28,653	0,018	0,03	0,018	0,022	26,21	0,341	96,395
n.n.	0,003	0,025	0,005	0,011	91,188	0,004	0,003	0,004	0,004	14,305	0,344	63,256
n.n.	0,015	0,015	0,055	0,028	66,567	0,006	0,006	0,018	0,01	55,262	0,361	73,668
36	0,15	0,139	0,146	0,145	3,283	0,058	0,032	0,069	0,053	29,931	0,364	99,862
45	0,085	0,067	0,084	0,079	10,662	0,097	0	0	0,032	141,362	0,412	76,657
55	0,082	0,066	0,102	0,083	17,799	0,105	0	0	0,035	141,421	0,42	74,291
13	0,846	0,632	0,737	0,738	11,845	0,333	0,341	0,296	0,323	6,091	0,438	99,719

59	0,122	0,148	0,181	0,15	16,171	0,072	0,085	0,041	0,066	28,358	0,44	98,219
58	0,048	0,082	0,07	0,067	20,732	0,027	0,025	0,042	0,031	23,197	0,473	96,641
n.n	0,02	0,034	0,046	0,033	31,041	0,02	0,101	0,081	0,067	51,297	2,02	74,668
n.n	0,061	0,012	0,075	0,049	54,533	0,128	0,086	0,086	0,1	20,039	2,023	89,978
n.n	0,055	0,022	0,058	0,045	36,577	0,096	0,077	0,103	0,092	11,97	2,054	97,224
n.n	0,01	0,009	0,022	0,013	44,29	0,026	0,032	0,026	0,028	10,226	2,091	96,508
n.n	0,019	0,03	0,031	0,026	21,271	0,043	0,055	0,068	0,055	18,724	2,092	97,429
n.n	0,043	0,032	0,086	0,054	43,175	0,13	0,091	0,123	0,115	14,817	2,126	95,923
n.n	0,025	0,031	0,037	0,031	15,9	0,045	0,078	0,076	0,066	23,076	2,129	96,349
n.n	0,016	0,032	0,034	0,027	29,845	0,058	0,072	0,043	0,058	20,549	2,142	96,149
n.n	0,009	0,023	0,027	0,02	39,6	0,028	0,049	0,05	0,042	24,393	2,144	93,081
n.n	0,011	0	0,016	0,009	73,734	0,016	0,017	0,028	0,02	27,053	2,167	84,537
47	0,049	0,052	0,05	0,05	2,533	0,114	0,143	0,07	0,109	27,502	2,168	94,956
n.n	0,032	0,026	0,053	0,037	32,277	0,084	0,081	0,081	0,082	1,92	2,214	99,38
37	0,026	0,04	0,04	0,035	18,884	0,062	0,082	0,092	0,079	15,826	2,219	98,758
20	0,025	0,038	0,034	0,032	16,487	0,047	0,08	0,092	0,073	25,862	2,252	95,698
n.n	0,03	0,017	0,049	0,032	41,372	0,076	0,077	0,066	0,073	6,557	2,28	98,533
n.n	0,004	0,003	0,02	0,009	84,763	0,015	0,027	0,021	0,021	24,148	2,318	85,956
n.n	0,013	0,008	0,033	0,018	60,317	0,034	0,035	0,06	0,043	28,11	2,406	90,679
n.n	0,014	0,009	0,026	0,017	43,256	0,036	0,049	0,036	0,04	15,388	2,42	97,55
n.n	0,03	0,037	0,137	0,068	71,587	0,167	0,147	0,188	0,167	9,989	2,457	94,72
14	0,181	0,222	0,176	0,193	10,695	0,437	0,489	0,514	0,48	6,668	2,486	99,956
49	0,013	0,01	0,014	0,012	13,941	0,028	0,028	0,034	0,03	8,999	2,493	99,867
26	0,076	0,103	0,107	0,095	14,435	0,214	0,274	0,249	0,246	9,981	2,58	99,837
11	0,084	0,077	0,082	0,081	3,868	0,211	0,259	0,215	0,228	9,566	2,819	99,93
12	0,14	0,092	0,153	0,128	20,565	0,365	0,392	0,343	0,367	5,486	2,862	99,948
n.n	0,006	0,007	0,018	0,01	53,347	0,028	0,03	0,034	0,03	7,904	2,974	99,128
n.n	0,005	0,01	0,032	0,016	73,765	0,049	0,047	0,052	0,05	4,071	3,192	98,562
53	0,007	0,01	0,008	0,008	12,912	0,029	0,029	0,024	0,027	8,124	3,289	99,96
31	0,068	0,182	0,077	0,109	47,265	0,393	0,336	0,347	0,358	6,889	3,29	99,651
61	0,011	0,013	0,019	0,014	26,01	0,043	0,056	0,067	0,055	17,404	3,888	99,512
60	0,034	0,071	0,06	0,055	27,714	0,256	0,281	0,252	0,263	4,844	4,773	99,988

n.n	0,004	0,001	0,021	0,009	98,44	0,067	0,035	0,027	0,043	40,402	4,827	93,16
9	0,041	0,066	0,061	0,056	19,682	0,284	0,334	0,317	0,312	6,657	5,586	99,99
22	0,011	0,019	0,015	0,015	22,474	0,077	0,134	0,146	0,119	25,271	8,141	99,184
n.n	0,008	0,01	0,006	0,008	24,046	0,057	0,079	0,061	0,066	14,523	8,318	99,89
8	0,005	0,007	0,009	0,007	21,44	0,106	0,114	0,104	0,108	3,956	15,232	99,999
17	0,002	0,003	0,002	0,002	20,888	0,04	0,044	0,039	0,041	5,426	16,747	99,998
29	0,003	0	0,006	0,003	70,955	0,085	0,078	0,103	0,089	11,739	30,186	99,966

50 Spots reguliert, 23 Spots n.n., 27 Spots nummeriert.

15°C Durchgang 1

Spot Nr.	% Vol 12804-1	% Vol 12804-2	% Vol 12804-3	Mittel	Stabw	% Vol BvgA-1	% Vol BvgA-2	% Vol BvgA-3	Mittel	Stabw	Ratio BvgA/12804	t-test BvgA/12804
16	0,081	0,085	0,083	0,083	2,165	0	0,001	0,011	0,004	119,14	0,05	99,997
21	0,016	0,025	0,019	0,02	20,181	0	0	0,004	0,001	133,767	0,064	99,621
n.n	0,019	0,045	0,008	0,024	64,741	0	0,001	0,005	0,002	109,322	0,081	88,227
n.n	0,007	0,018	0,008	0,011	46,053	0,001	0,001	0,002	0,001	25,337	0,118	94,614
n.n	0,035	0,044	0,014	0,031	40,317	0,001	0,003	0,013	0,006	87,11	0,184	94,37
83	0,119	0,136	0,061	0,105	30,23	0,009	0,012	0,056	0,025	84,462	0,242	95,757
23	0,027	0,04	0,04	0,035	17,546	0	0,002	0,027	0,009	129,236	0,265	94,565
n.n	0,07	0,093	0,051	0,072	23,776	0,046	0,009	0,003	0,019	99,814	0,27	95,486
80	0,064	0,103	0,049	0,072	31,662	0,013	0,021	0,026	0,02	27,318	0,274	96,566
n.n	0,016	0,017	0,016	0,017	1,665	0,004	0,003	0,007	0,005	37,563	0,288	99,922
n.n	0,057	0,052	0,03	0,047	24,81	0,006	0,005	0,033	0,015	87,661	0,316	93,99
78	0,038	0,038	0,036	0,037	2,169	0,011	0,004	0,027	0,014	69,564	0,37	97,407
n.n	0,108	0,131	0,094	0,111	13,891	0,09	0,035	0,003	0,043	83,366	0,386	93,182
18	0,137	0,155	0,116	0,136	11,514	0,056	0,054	0,064	0,058	7,427	0,424	99,758
70	0,086	0,071	0,089	0,082	9,464	0,033	0,024	0,047	0,035	27,289	0,425	99,444
n.n	0,008	0,013	0,009	0,01	21,022	0,006	0,006	0,001	0,004	49,982	0,442	93,92
n.n	0,075	0,084	0,054	0,071	17,629	0,06	0,04	0,001	0,034	72,734	0,474	87,279
n.n	0,017	0,032	0,015	0,021	35,934	0,005	0,008	0,018	0,01	52,988	0,474	83,476

n.n	0,019	0,033	0,027	0,026	22,148	0,009	0,017	0,012	0,013	23,773	0,485	95,649
n.n	0,089	0,073	0,042	0,068	28,765	0,015	0,017	0,069	0,034	73,261	0,496	80,066
74	0,059	0,053	0,059	0,057	5,147	0,026	0,032	0,027	0,028	9,576	0,498	99,946
22	0,031	0,056	0,054	0,047	23,624	0,061	0,158	0,066	0,095	46,893	2,022	78,689
n.n	0,012	0,022	0,013	0,016	29,654	0,014	0,037	0,046	0,032	42,705	2,041	81,489
n.n	0,006	0,022	0,001	0,01	92,077	0,002	0,004	0,057	0,021	124,168	2,15	40,451
n.n	0,017	0,026	0,017	0,02	21,947	0,05	0,055	0,029	0,045	25,404	2,254	95,554
n.n	0,004	0,008	0,005	0,006	35,165	0,012	0,025	0,003	0,013	71,275	2,261	65,947
12	0,096	0,073	0,086	0,085	10,863	0,248	0,164	0,172	0,194	19,568	2,291	98,329
99	0,007	0,029	0,017	0,017	51,541	0,039	0,03	0,05	0,04	20,288	2,299	94,261
n.n	0,009	0,033	0,003	0,015	86,765	0,039	0,03	0,037	0,036	10,354	2,349	89,834
n.n	0,068	0,071	0,097	0,079	16,622	0,218	0,208	0,185	0,204	6,721	2,595	99,928
n.n	0,001	0,016	0,012	0,01	65,274	0,015	0,044	0,016	0,025	54,61	2,612	78,022
31	0,02	0,033	0,029	0,028	19,433	0,108	0,064	0,064	0,079	26,249	2,854	97,242
8	0,002	0,011	0,011	0,008	51,406	0,03	0,031	0,029	0,03	2,337	3,7	99,815
n.n	0,005	0,009	0	0,005	74,51	0,016	0,026	0,024	0,022	20,083	4,447	98,621
84	0,011	0,007	0,005	0,007	32,113	0,032	0,047	0,026	0,035	24,994	4,739	98,744
n.n	0,001	0,002	0,005	0,003	74,049	0,004	0,018	0,016	0,013	46,238	5,004	91,982
n.n	0,001	0	0,002	0,001	84,458	0,02	0,001	0	0,007	135,655	8,094	58,618
17	0	0	0	0	60,579	0,003	0,006	0,002	0,004	45,249	11,7	95,312

38 Spots reguliert, 22 Spots n.n., 16 Spots nummeriert.

15°C Durchgang 2

Spot Nr.	% Vol 12804-1	% Vol 12804-2	% Vol 12804-3	Mittel	Stabw	% Vol BvgA-1	% Vol BvgA-2	% Vol BvgA-3	Mittel	Stabw	Ratio BvgA/12804	t-test BvgA/12804
21	0,028	0,015	0,02	0,021	23,913	0	0	0	0	82,215	0,003	99,586
23	0,026	0,026	0,031	0,028	8,095	0,001	0	0	0	113,489	0,007	99,993
16	0,074	0,075	0,072	0,074	1,865	0,002	0	0	0,001	122,037	0,011	100
n.n.	0,01	0,005	0,015	0,01	41,354	0	0,002	0,001	0,001	52,732	0,113	96,014
n.n.	0,019	0,011	0,023	0,017	27,684	0,002	0,003	0,008	0,004	56,784	0,243	97,428

n.n.	0,043	0,047	0,056	0,049	11,383	0,016	0,009	0,016	0,014	23,993	0,283	99,843
n.n.	0,025	0,018	0,029	0,024	18,582	0,009	0,007	0,007	0,008	10,653	0,31	99,333
106	0,034	0,03	0,021	0,028	19,115	0,006	0,011	0,013	0,01	31,555	0,357	98,513
111	0,082	0,089	0,157	0,109	30,975	0,031	0,043	0,049	0,041	17,38	0,375	95,076
85	0,048	0,04	0,075	0,055	27,528	0,013	0,024	0,033	0,023	36,236	0,422	93,957
n.n.	0,028	0,027	0,029	0,028	3,134	0,009	0,011	0,016	0,012	23,497	0,432	99,836
n.n.	0,019	0,014	0,033	0,022	35,09	0,005	0,008	0,015	0,01	43,257	0,436	88,41
n.n.	0,043	0,045	0,053	0,047	9,673	0,014	0,016	0,032	0,021	39,98	0,44	98,309
n.n.	0,056	0,055	0,069	0,06	10,179	0,018	0,028	0,037	0,027	28,301	0,458	99,04
n.n.	0,152	0,084	0,12	0,119	23,271	0,016	0,121	0,032	0,056	81,188	0,475	82,552
n.n.	0,012	0,015	0,016	0,014	10,96	0,005	0,007	0,008	0,007	15,794	0,479	99,479
n.n.	0,072	0,068	0,108	0,083	21,731	0,033	0,055	0,032	0,04	26,101	0,482	95,677
n.n.	0,055	0,042	0,06	0,052	14,542	0,011	0,036	0,028	0,025	40,989	0,484	95,886
110	0,057	0,057	0,059	0,058	1,646	0,026	0,037	0,021	0,028	23,817	0,484	99,668
n.n.	0,034	0,015	0,017	0,022	38,442	0,041	0,046	0,045	0,044	4,64	2	97,677
100	0,023	0,015	0,016	0,018	20,156	0,04	0,036	0,033	0,036	8,102	2,006	99,465
109	0,028	0,027	0,036	0,03	13,238	0,069	0,053	0,061	0,061	10,572	2,01	99,533
n.n.	0,014	0,007	0,007	0,009	34,249	0,017	0,014	0,027	0,019	27,622	2,034	90,966
n.n.	0,024	0,007	0,005	0,012	71,188	0,019	0,03	0,025	0,024	17,447	2,064	86,757
n.n.	0,035	0,012	0,024	0,024	39,462	0,034	0,064	0,05	0,05	24,752	2,083	92,223
n.n.	0,078	0,064	0,069	0,07	8,52	0,148	0,155	0,143	0,149	3,384	2,112	99,985
31	0,019	0,028	0,019	0,022	18,889	0,044	0,044	0,05	0,046	6,276	2,115	99,76
67	0,012	0,017	0,018	0,016	15,66	0,041	0,032	0,031	0,035	11,998	2,168	99,446
9	0,023	0,041	0,027	0,03	25,629	0,061	0,064	0,07	0,065	5,346	2,17	99,583
112	0,013	0,017	0,011	0,014	18,195	0,019	0,033	0,038	0,03	26,078	2,185	95,125
n.n.	0,045	0,012	0,006	0,021	81,764	0,052	0,071	0,019	0,047	45,573	2,269	75,494
n.n.	0,018	0,006	0,015	0,013	38,953	0,023	0,043	0,025	0,03	29,055	2,323	92,571
n.n.	0,011	0,003	0,001	0,005	89,418	0,015	0,006	0,011	0,011	34,342	2,324	80,677
n.n.	0,02	0,032	0,031	0,028	19,691	0,068	0,064	0,066	0,066	2,444	2,382	99,932
26	0,062	0,021	0,033	0,039	44,211	0,093	0,102	0,083	0,092	8,379	2,399	98,484
22	0,019	0,016	0,031	0,022	29,242	0,052	0,058	0,06	0,056	6,05	2,592	99,754
n.n.	0,02	0,017	0,013	0,017	18,616	0,059	0,038	0,043	0,047	18,895	2,805	98,954

95	0,069	0,038	0,04	0,049	29,276	0,137	0,144	0,146	0,142	2,882	2,9	99,909
60	0,021	0,033	0,024	0,026	18,447	0,066	0,078	0,11	0,085	21,849	3,231	98,759
n.n.	0,01	0,008	0,007	0,008	16,978	0,017	0,041	0,025	0,028	34,76	3,298	95,14
n.n.	0,01	0,007	0,006	0,007	22,285	0,022	0,024	0,031	0,026	14,009	3,449	99,713
n.n.	0,004	0,002	0,003	0,003	27,597	0,008	0,01	0,019	0,012	41,601	3,809	93,104
n.n.	0,036	0,012	0,011	0,019	59,178	0,077	0,068	0,081	0,075	7,091	3,877	99,663
91	0,009	0,002	0,001	0,004	94,016	0,015	0,014	0,016	0,015	4,437	3,898	98,723
99	0,014	0,009	0,01	0,011	19,849	0,033	0,076	0,058	0,056	31,966	5,104	97,58
n.n.	0,007	0,004	0,004	0,005	29,636	0,01	0,042	0,049	0,034	49,602	6,999	92,84
n.n.	0,007	0,001	0,003	0,004	66,065	0,043	0,016	0,022	0,027	43,056	7,448	95,044
n.n.	0,012	0,002	0,005	0,006	68,758	0,058	0,041	0,042	0,047	16,928	7,5	99,688
n.n.	0,001	0,001	0,002	0,001	43,248	0,006	0,012	0,01	0,009	27,141	7,768	98,873
8	0,001	0,001	0,002	0,001	30,68	0,011	0,007	0,015	0,011	29,337	9,485	98,722
87	0,022	0,001	0,005	0,009	96,238	0,265	0,225	0,251	0,247	6,707	26,228	99,994
88	0,004	0	0,001	0,002	83,077	0,071	0,05	0,081	0,067	18,905	35,57	99,804

52 Spots reguliert, 30 Spots n.n., 22 Spots nummeriert.

Anhang 8.5 Signifikant regulierte Spots in den 2D-Gelelektrophorese Durchgängen 1 + 2 bei 37°C und bei 15°C. Grau unterlegt sind die Proteinspots, die für die MALDI-TOF MS Analysen eingesetzt wurden, wobei die fett umrandeten Spots spezifisch für 15°C sind. Das prozentuale Volumen (% Vol.) stellt die relative Quantität eines Spots im Vergleich zur Quantität aller Spots auf dem Gel dar. Das % Vol. wurde gemittelt und die Ratio zwischen BvgA-Mutante und Wildtyp bestimmt. Es wurden alle Spots deren Ratios $\leq 0,5$ und ≥ 2 waren als signifikant reguliert angesehen. Hellgrau unterlegt sind die herunterregulierten Spots, und dunkelgrau unterlegt sind die hochregulierten Spots. n.n : diese Spots sind nicht eindeutig zuzuordnen oder aufgrund ihrer geringen Größe im Gel nicht gut zu erkennen

8.6 Mann-Whitney U-Test der Realtime-PCR Daten

3465(irpA)	wt/Mut 37°C	signifikant unterschiedlich	p< 0,01
	wt/Mut 15°C	nicht signifikant	p>=0,05
	wt37/wt15	Signifikanz gering	P<0,05
	Mut37/Mut15	nicht signifikant	p>=0,05
4085(sodA)	wt/Mut 37°C	signifikant unterschiedlich	p< 0,01
	wt/Mut 15°C	nicht signifikant	p>=0,05
	wt37/wt15	signifikant unterschiedlich	p< 0,01
	Mut37/Mut15	nicht signifikant	p>=0,05
4236(mod)	wt/Mut 37°C	signifikant unterschiedlich	p< 0,01
	wt/Mut 15°C	nicht signifikant	p>=0,05
	wt37/wt15	nicht signifikant	p>=0,05
	Mut37/Mut15	nicht signifikant	p>=0,05
2539(glured)	wt/Mut 37°C	nicht signifikant	p>=0,05
	wt/Mut 15°C	nicht signifikant	p>=0,05
	wt37/wt15	signifikant unterschiedlich	p< 0,01
	Mut37/Mut15	Signifikanz gering	P<0,05
2123(flgD)	wt/Mut 37°C	signifikant unterschiedlich	p< 0,01
	wt/Mut 15°C	nicht signifikant	p>=0,05
	wt37/wt15	signifikant unterschiedlich	p< 0,01
	Mut37/Mut15	signifikant unterschiedlich	p< 0,01
2282(fbp)	wt/Mut 37°C	signifikant unterschiedlich	p< 0,01
	wt/Mut 15°C	nicht signifikant	p>=0,05
	wt37/wt15	nicht signifikant	p>=0,05
	Mut37/Mut15	signifikant unterschiedlich	p< 0,01
0464(porin)	wt/Mut 37°C	signifikant unterschiedlich	p< 0,01
	wt/Mut 15°C	Signifikanz gering	P<0,05
	wt37/wt15	signifikant unterschiedlich	p< 0,01

2667(sodB)	Mut37/Mut15	signifikant unterschiedlich	p< 0,01
	wt/Mut 37°C	signifikant unterschiedlich	p< 0,01
	wt/Mut 15°C	signifikant unterschiedlich	p< 0,01
	wt37/wt15	signifikant unterschiedlich	p< 0,01
0087(bfr)	Mut37/Mut15	signifikant unterschiedlich	p< 0,01
	wt/Mut 37°C	nicht signifikant	p>=0,05
	wt/Mut 15°C	Signifikanz gering	P<0,05
	wt37/wt15	signifikant unterschiedlich	p< 0,01
	Mut37/Mut15	nicht signifikant	p>=0,05

Anhang 8.6 Mann-Whitney U-Teststatistik für die Realtime-PCR-Ergebnisse mit *B. petrii* DSM 12804 und der Δ *bygA*-Mutante bei 37°C und 15°C. Für die Kalkulation wurde das Programm utest verwendet (<http://elegans.swmed.edu/~leon/stats/utest.html>). Es wurden jeweils Wildtyp und Δ *bygA*-Mutante miteinander bei 37°C und bei 15°C verglichen. Ein möglicher Temperatureffekt wurde durch den Vergleich von wildtypischer Expression bzw. Expression der Mutante bei 37°C und 15°C ermittelt.