

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut  
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie  
Lehrstuhl Bakteriologie  
der Universität München  
Vorstand: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. J. Heesemann

**Proteomanalyse von *Bartonella henselae*: Entwicklung neuer proteombasierter  
Strategien zur Untersuchung von Pathogenitätsfaktoren von *Bartonella henselae***

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Sonja Behrendt

aus München

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. I. B. Autenrieth

Mitberichterstatter: Prof. Dr. T. Löscher  
Prof. Dr. B. H. Belohradsky

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. V. A. J. Kempf

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2005

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Überblick über das Pathogen <i>B. henselae</i></b>	<b>4</b>
1.1.1 Geschichte und Taxonomie der Gattung <i>Bartonella</i>	4
1.1.2 Entdeckung von <i>B. henselae</i>	6
1.1.3 Epidemiologie	7
1.1.4 Mikrobiologie und Morphologie	7
1.1.5 Übertragung	8
1.1.6 Pathogenese und Immunität	9
1.1.7 Klinik von Bartonellen-Infektionen beim Menschen	11
1.1.8 Diagnose und Therapie von <i>B. henselae</i> -Infektionen	14
<b>1.2 Proteomik</b>	<b>15</b>
<b>1.3 Zielsetzung</b>	<b>16</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Material: Geräte, Chemikalien, Puffer und Lösungen</b>	<b>18</b>
2.1.1 Geräte	18
2.1.2 Chemikalien	20
2.1.3 Medien und Puffer für Zell- und Bakterienkultur	21
2.1.4 Puffer und Lösungen	22
2.1.4.1 Puffer und Lösungen für die 1- und 2-dimensionale Elektrophorese	22
2.1.4.2 Lösungen für Proteinfärbungen	23
2.1.4.3 Puffer und Lösungen für Western Blotting	23
2.1.4.4 Puffer und Lösungen für PCR und DNA-Gele	23
<b>2.2. Bakterielle Stämme und humane Zelllinien</b>	<b>24</b>
<b>2.3 Kulturbedingungen: Anzucht von Bakterien und Zellkultur</b>	<b>24</b>
2.3.1 Anzuchtbedingungen für Bakterien	24
2.3.2 Zellkultur	24
2.3.3 Infektionsversuche	25
<b>2.4 Protein-chemische Methoden</b>	<b>25</b>
2.4.1 Probenherstellung für die Proteomanalyse	25
2.4.1.1 Herstellung von Proteinproben mittels Detergenslyse	25
2.4.1.1.1 Detergenslyse mit SDS-THC-Puffer	25
2.4.1.1.2 Detergenslyse mit THC-Puffer	25

Inhaltsverzeichnis	2
2.4.1.1.3 Detergenslyse mit SDS-Puffer	26
2.4.1.2 Herstellung von Proteinproben mithilfe der French pressure cell	26
2.4.2 Quantifizierung von Proteinen	27
2.4.2.1 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford	27
2.4.2.2 Szintillationszählung von radioaktiv markierten Proteinen	27
2.4.3 Zweidimensionale Elektrophorese (2D-Elektrophorese)	27
2.4.3.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF)	27
2.4.3.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
2.4.4 Färbung von Proteinen (CBB, Silber)	31
2.4.4.1 Färbung mit Coomassie Brilliant-Blau	31
2.4.4.3 Autoradiographie	32
2.4.5 Western Blot und Immunodetektion	33
2.4.5.1 Proteintransfer	33
2.4.5.2 Immunodetektion	33
2.4.6 Pulse trace: radioaktive Markierung von Proteinen	34
2.4.7 Identifizierung von Proteinen	35
2.4.7.1 Bildauswertung	35
2.4.7.2 Tryptischer Verdau von Proteinen	35
2.4.7.3 Massenspektroskopie mithilfe von MALDI-TOF	36
2.4.7.4 Chromatographie (RP-HPLC)	36
2.4.7.5 Analyse von Aminosäuresequenzen nach Edman-Abbau	36
2.4.7.6 Datenbanksuche	37
<b>2.5 Molekularbiologische Methoden: Reverse Genetics</b>	<b>38</b>
2.5.1 Konstruktion der Primer	38
2.5.2 Isolierung genomischer DNA	38
2.5.3 Amplifikation durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	39
2.5.4 Auftrennung der PCR-Produkte	40
2.5.5 Sequenzierung der PCR-Produkte	40
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Etablierung einer reproduzierbaren Proteomik für <i>B. henselae</i></b>	<b>41</b>
<b>3.2 Erstellen einer Proteinkarte von <i>B. henselae</i></b>	<b>45</b>
<b>3.3 Identifizierung der Spezifität monoklonaler Antikörper gegen <i>B. henselae</i> mittels 2D-Western Blot</b>	<b>47</b>
3.3.1 Testung monoklonaler Antikörper in 1-dimensionalen Western-Blots	47
3.3.2 Testung monoklonaler Antikörper in 2-dimensionalen Western-Blots	48
<b>3.4 Vergleichende Proteomanalysen</b>	<b>50</b>
3.4.1 Vergleich von Wildtyp- <i>B. henselae</i> mit pilinegativen Spontanmutanten	50

Inhaltsverzeichnis	3
3.4.2 Analyse der Hitzestressantwort von <i>B. henselae</i> mittels 2D-Gelelektrophorese	52
3.4.3 Analyse der Proteinexpression von <i>B. henselae</i> in Endothelzellkulturen	54
<b>3.5 Reverse Genetik am Beispiel der Phosphoserinaminotransferase von <i>B. henselae</i></b>	<b>59</b>
3.5.1 Konstruktion der Primer	59
3.5.2 Ergebnis der PCR des Phosphoserinaminotransferase-Gens mit abgeleiteten Primern	62
3.5.3 Sequenzierungsergebnisse der PCR-Produkte	63
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>65</b>
4.1 Proteomik: Vorteile und Limitationen der Methode bei <i>B. henselae</i>	66
4.2 Etablierung einer Methode zur Proteinpräparation bei <i>B. henselae</i>	69
4.3 Erstellen einer 2-dimensionalen Proteinkarte von <i>B. henselae</i>	71
4.4 Einsatz der Proteomik zur schnellen und akkuraten Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern	73
4.5 Validierung der Methode für regulative Studien: Vergleich von Hitzestress- mit Nicht-Hitzestress-Proteomen von <i>B. henselae</i>	76
4.6 Untersuchung pilusassoziierter Proteine von <i>B. henselae</i>	77
4.7 Kombination von Pulse Chase und zwei-dimensionaler Elektrophorese: Potential dieses Ansatzes	79
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>81</b>
<b>6. ABKÜRZUNGEN</b>	<b>83</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>86</b>
<b>8. DANKSAGUNG</b>	<b>100</b>
<b>9. PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE</b>	<b>101</b>
<b>10. LEBENSLAUF</b>	<b>102</b>

## 1. Einleitung

Bis in die 80er Jahre des letzten Jahrhunderts stieg die Inzidenz von Malignomen - ob durch genauere diagnostische Mittel oder tatsächliches Mehrauftreten der Krankheiten - in Deutschland jährlich an und stagniert seitdem. Gleichzeitig werden immer potentere Chemotherapeutika entdeckt und eingesetzt, sodass sich die Überlebenszeiten für Patienten mit neoplastischen Erkrankungen verlängern (17). In ähnlicher Weise stiegen auch bei HIV-Infektionen durch die Einführung immer potenterer antiretroviraler Therapeutika die durchschnittlichen Überlebenszeiten in den letzten Jahren (95). Insgesamt steigt also die Zahl der immunsupprimierten Patienten stetig.

Daher ist es wichtig, opportunistische Krankheitserreger, die speziell bei Immunsupprimierten besondere Pathogenitätsstrategien benutzen bzw. neuartige Krankheitsbilder verursachen, zu untersuchen. Hierdurch kann nicht nur die Bekämpfung dieser Erreger vorangetrieben werden. Durch das Verständnis der Wirt-Pathogen-Interaktion können auch Rückschlüsse auf grundlegende Funktionen des menschlichen Immunsystems einerseits und mikrobielle Ausweichstrategien andererseits gezogen werden. Das hier untersuchte Bakterium, *Bartonella henselae*, ist ein Beispiel hierfür, da es je nach Immunstatus des Patienten sehr unterschiedliche klinische Bilder verursacht. In dieser Arbeit wurden deshalb Methoden entwickelt, die es erlauben sollen, die zugrunde liegenden Mechanismen der Pathogenese dieses Erregers besser zu verstehen.

### 1.1 Überblick über das Pathogen *B. henselae*

#### 1.1.1 Geschichte und Taxonomie der Gattung *Bartonella*

In den letzten zehn Jahren hat die Gattung *Bartonella* stetig neue Mitglieder erhalten: Im Jahr 1993 gehörte zur Gattung *Bartonella* nur eine Spezies, *B. bacilliformis*, inzwischen sind durch Umklassifizierung oder Neuentdeckung 18 weitere Spezies dazugekommen.

Brenner et al. (25) schlugen aufgrund von Ergebnissen aus DNA-Hybridisierungen und 16S-RNA-Vergleichen vor, die Gattung *Rochalimea*, die bis dato zur Familie der *Rickettsiaceae* gezählt wurden, in die Gattung *Bartonella* aufzunehmen. Somit

erweiterte sich die Gattung *Bartonella* um *B. quintana*, *B. elizabethae*, *B. vinsonii* und *B. henselae* und die Gattung *Rochalimea* existiert nicht mehr.

Von den heute bekannten 19 *Bartonella* Spezies sind nach derzeitigem Wissensstand nur sieben humanpathogen: *B. bacilliformis*, *B. quintana*, *B. henselae*, *B. vinsonii*, *B. elizabethae*, *B. grahamii* und *B. clarridgeae*.

*B. bacilliformis* ist die am längsten bekannte Spezies dieser Gattung und wurde als eines der Bakterien mit dem höchsten Pathogenitätspotential bezeichnet (64). Es ist der Erreger der Carrion'schen Krankheit, deren Vorkommen geographisch auf das Gebiet der Anden (vor allem in Peru) beschränkt ist, da der Übertragungsvektor, eine Sandfliege (*Lutzomyia verrucarum*), dort endemisch ist. Die Krankheit, die laut Chronisten schon im 16. und 17. Jahrhunderts spanische Eroberer das Leben kostete, verläuft in zwei klinischen Varianten:

- Das Oroya-Fieber, benannt nach einer Bahnstrecke zwischen Lima und Oroya, bei deren Bau im Jahr 1871 ca. 7000 (von insgesamt 10000) Bahnarbeiter einer *B. bacilliformis*-Epidemie zum Opfer fielen, ist eine akute hämolytische Anämie, die auf parasitäre Invasion von Erythrozyten zurückzuführen ist und unbehandelt eine Letalität von 40 bis zu 85% zeigt (64). Noch im Jahr 1987 starben 14 Menschen während einer Oroya-Fieber-Epidemie (56).
- Die zweite mögliche Manifestation, die „Verruga peruana“, tritt mit oder ohne eine vorausgegangene Episode von Oroya-Fieber auf und ist wahrscheinlich Ausdruck einer chronischen Infektion. Man versteht darunter morphologisch unterschiedliche, tumoröse Hautläsionen, die aus proliferierten Endothel- und Epithelzellen bestehen und zu Blutungen neigen.

Der Name „Carrion“ geht auf einen Medizinstudenten zurück, der sich 1885 im Selbstversuch ein Extrakt aus einer Verruga injizierte, daraufhin Oroya-Fieber entwickelte und daran verstarb. Er hatte somit den Zusammenhang beider Erkrankungen bewiesen (64). Alberto L. Barton, ein Arzt aus Lima, hatte 1905 das auslösende Bakterium bei Patienten mit Oroya-Fieber untersucht und wurde so zum Namensgeber der Gattung.

*B. quintana* ist der Erreger des 5-Tage-Fiebers („trench fever“), das im ersten Weltkrieg über eine Million Soldaten befiel, von denen viele starben (144). Diese Erkrankung manifestiert sich durch rezidivierendes hohes Fieber (5-Tage-Fieber),

plötzlichen Kopfschmerz, aseptische Meningitis, starke Muskelschmerzen, Unwohlsein, Gewichtsverlust und andere unspezifische Symptome. Die Übertragung findet durch die Körperlaus statt und obwohl der Erreger für ausgestorben gehalten wurde, wurden in den letzten Jahren zunehmend Fälle von 5-Tage-Fieber bei Obdachlosen beschrieben (139, 48). Zudem konnte *B. quintana* in einer Reihe von Fällen von bazillärer Angiomatose (siehe unten) aus den Läsionen isoliert werden (75).

Als Endokarditiserreger beim Menschen beschrieben wurden *B. vinsonii ssp berkhoffii* (123), *B. henselae* und *B. quintana* (49) sowie *B. elizabethae* (94).

Insgesamt sind Bartonella-Infektionen häufig: in den USA werden z.B. allein von Katzenkratzkrankheit jährlich über 40.000 Fälle gezählt, das sind mehr als die jährlich neu aufgetretenen Fälle von Lyme-Borreliose (144).

### 1.1.2 Entdeckung von *B. henselae*

Lange bevor im Jahr 1992 *B. henselae* charakterisiert wurde (111), existierten schon Berichte von den durch *B. henselae* ausgelösten Krankheitsbildern (133):

Nachdem Parinaud 1889 das nach ihm benannte okuloglanduläre Syndrom (Konjunktivitis mit präaurikulärer Lymphadenopathie) in Zusammenhang mit Tierkontakt gebracht hatte, beschrieb Robert Debre 1932 zum ersten Mal das Auftauchen regionaler Lymphadenopathie bei Menschen, die von einer Katze gekratzt worden waren. Der Begriff „Katzenkratzkrankheit“ (KKK) wurde 1950 von Debre und Lamy geprägt, das auslösende Agens blieb allerdings lange unbekannt (45).

1983 gelang mittels Warthin-Starry-Färbung zum ersten Mal der Nachweis von Bakterien in Lymphknoten von Patienten mit KKK (153). 5 Jahre später konnte aus Lymphknoten von KKK-Patienten ein gramnegatives Bakterium isoliert und angezüchtet werden (46), das 1991 *Afipia felis* genannt wurde (24). In einer nachfolgenden serologischen Studie (112) zeigte sich allerdings, dass 88% der untersuchten KKK-Patienten Antikörper gegen *B. henselae* hatten, keiner jedoch seropositiv für *A. felis* war.

Gleichzeitig häuften sich Berichte über durch *B. henselae* ausgelöste Fälle von Bazillärer Angiomatose (BA) und Peliosis (BP) (12, 109, 138, 155). Inzwischen wurde durch eine Reihe serologischer (112, 149, 162) und molekularbiologischer

(115) Untersuchungen nachgewiesen, dass *B. henselae* den Erreger der Katzenkratzkrankheit und, zusammen mit *B. quintana*, auch der BA darstellt.

### 1.1.3 Epidemiologie

Aus der Tatsache, dass *B. henselae* ein erst vor kurzem entdeckter Erreger ist, erklärt sich die mangelhafte Datenlage zur Epidemiologie. Es sollen hier dennoch einige vorhandene Studien vorgestellt werden:

*B. henselae* ist ein weltweit verbreiteter Erreger. Bei Hauskatzen schwankt die Seroprävalenz gegen *B. henselae* zwischen 8,3 (54) und 81 % (32). Beim Menschen sind die Daten über den Antikörperstatus gegen *B. henselae* ähnlich divergent: Die erhobenen Seroprävalenzen bei Gesunden bewegen sich zwischen 3,5 (126) und 36,8 % (34). Aufgrund derartig hoher Seroprävalenzen bei gesunden Personen wird davon ausgegangen, dass dies Ausdruck stattgehabter, nicht aktueller Infektionen sein muss.

Klimatische Bedingungen spielen offensichtlich bei der Verbreitung des Erregers eine Rolle: Jameson et al. (66) konnten zeigen, dass die Seroprävalenz bei Hauskatzen in den USA mit wärmerem Klima zunimmt und führten dies auf die besseren Lebensbedingungen für den Katzenfloh, den Übertragungsvektor, zurück.

1993 wurde in den USA eine breit angelegte Studie zur Epidemiologie der Katzenkratzkrankheit durchgeführt, in der 2923 Fälle von KKK-Patienten aus 3 nationalen Datenbanken ausgewertet wurden (65). Durch Extrapolierung dieser Daten wurde eine Inzidenz der KKK von 9,3 pro 100.000 Einwohner für ambulant behandelte Patienten und von 0,8 pro 100.000 Einwohner für hospitalisierte Patienten berechnet. Die jährlichen Kosten, die durch Katzenkratzkrankheit in den USA verursacht werden, belaufen sich nach dieser Studie auf 12 Millionen US-Dollar.

### 1.1.4 Mikrobiologie und Morphologie

*B. henselae* sind fakultativ intrazellulär lebende, gramnegative Stäbchenbakterien mit einer Größe von 2 x 0,5 µm (111). Die Anzucht ist schwierig: Am besten wachsen die anspruchsvollen Bakterien in Zellkultur oder auf heminhaltigem Agar (Schokoladen- oder Columbiaagar mit 5% fibrinfreiem Blut). Flüssigmedien für die

Anzucht von *B. henselae* wurden getestet (134, 160), die Wachstumsraten in Flüssigkultur bleiben aber nach wie vor unbefriedigend. Auf Agarböden erscheinen nach 5-21 Tagen Bebrütung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kleine weisse Kolonien. Beim pilierten Typ weisen diese eine raue, eher trockene Oberfläche auf („rough form“), während die nicht-pilierten Stämme, die nach langer Passage entstehen, eher schleimige und flachere Kolonien bilden („smooth form“) (16). Während die Generationszeit auf Agarplatten mind. 18 h beträgt, ist die Replikationsrate in Endothelzellen mit einer Generationszeit von ca. 3 h deutlich verkürzt (72), was Anlass zu der Vermutung gibt, dass *B. henselae* intrazellulär bessere Lebensbedingungen vorfinden.

Was den Zelltropismus von *B. henselae* betrifft, so sind die *in vivo*-Daten nicht schlüssig: Kordick und Breitschwerdt (79) berichten über das Vorhandensein von *B. henselae* in Erythrozyten von bakteriämischen Katzen. Diese Untersuchung beruhte auf elektronenmikroskopisch analysierten Erythrozyten-Schnitten und wird stark angezweifelt (58), da es sich um Artefakte durch Fixierung oder die Schnittebene handeln könnte. In humanen Endothelzellen von KKK-Patienten (153) wurden Bakterien histologisch mittels Warthin-Starry-Färbung, die für Bartonellen geeignet, aber nicht spezifisch ist, nachgewiesen. *In vitro* konnte die Invasion von einer Reihe anderer Zelltypen durch *B. henselae* gezeigt werden, u. a. von Epithelzellen (16), feline Zellen des ZNS (97) und murinen Makrophagen (98).

Das Genom von *B. henselae* ist ca.  $2,0 \times 10^6$  Basenpaare groß. In *B. henselae* (7) und in *B. bacilliformis* (146), nicht jedoch in den anderen *Bartonella* spezie, konnten 40 nm große Phagenpartikel und eine 40 kb lange, extrachromosomale Doppelstrang-DNA nachgewiesen werden.

### 1.1.5 Übertragung

Die Hauskatze ist das natürliche Reservoir von *B. henselae* (50). Mit 57 Millionen Katzen in den USA (158) nimmt sie dort die Stellung des beliebtesten Haustieres ein (144) und die Prävalenz von *B. henselae*-Infektionen bei Katzen ist, wie oben beschrieben, hoch (32). Infizierte Katzen, die teils lang andauernde Bakteriämien aufweisen (80), können asymptomatisch sein (1), oder auch milde Symptome wie Erythem, Fieber und Lethargie entwickeln (100).

Die Übertragung von Katze zu Katze durch den Katzenfloh (*Ctenocephalides felis*) ist gesichert, ebenso die Infektiosität der Flohfaeces (33). Da sich im Fell von Flohbefallenen Katzen Flohfaeces sammelt, ist die Infektion des Menschen über Katzenkratzer (neben der direkten Inokulation beim Biss durch einen Katzenfloh) wahrscheinlich. Diese Annahme wird auch von einer Koinzidenz von *B. henselae*-Infektion beim Menschen und vorausgegangenem Kontakt mit bakteriämischen (74) Katzen gestützt.

### 1.1.6 Pathogenese und Immunität

Wie bereits oben beschrieben, dringen die Erreger über Hautläsionen oder durch einen Stich von Arthropoden in den Menschen ein. Danach kommt es typischerweise zu einer selbst limitierenden Lymphadenitis, doch auch systemische Verläufe mit Absiedlung des Erregers in fast allen Organen sind möglich.

Über die Pathogenitätsmechanismen von *B. henselae* ist bislang wenig bekannt. Klar ist jedoch, dass die schwersten Krankheitsverläufe Patienten mit geschwächtem Immunsystem betreffen (4, 51, 150, 159). *B. henselae* verfügt über ein Set an so genannten *virB*-Genen (84), die das Bakterium zum Aufbau eines Typ-IV-Sekretionssystems befähigen. Die *vir*-Genfamilie konnte in einer Reihe von Bakterien nachgewiesen werden. Beim Typ-IV-Sekretionssystem werden Proteine oder an Translokationsproteine gebundene Einzelstrang-DNA in die Zielzellen transloziert. Für das Pflanzenpathogen *Agrobacterium tumefaciens* stellt das Typ-IV-Sekretionssystem einen essentiellen Virulenzfaktor dar (18). Durch den Translokationsapparat werden hier bakterielle DNA-Fragmente in die (pflanzliche) Zielzelle gebracht, die dort in die DNA inserieren und Tumorwachstum auslösen. Die entstehenden Wurzelknötchen dienen dem Pflanzenpathogen als Lebensgrundlage, weil sie Opine produzieren, die von den Bakterien verstoffwechselt werden. Da *B. henselae* endotheliales Tumorwachstum auslöst, wird spekuliert, dass sich der Erreger durch diese Gefäßneubildung sein eigenes Habitat schafft (71,73). Intrazellulär findet das Bakterium offenbar bessere Lebensbedingungen vor als extrazellulär, erhöht sich doch die Replikationsrate nach Invasion von Endothelzellen um das 40- bis 50-fache (72). Ob die angioproliferative Tumorgenese auf den *virB*-Apparat zurückzuführen ist, bleibt

hypothetisch, sicher ist aber, dass die Expression des *virB*-Operons von *B. henselae* intrazellulär stark induziert wird (132).

Zudem spielt das Typ-IV-Sekretionssystem bei der Induktion von Zytokinen eine Rolle: *Helicobacter pylori* induziert die Bildung von Interleukin-8 (47) nur mit intaktem Typ-IV-Sekretionssystem. *B. henselae*-infizierte Zellen produzieren ebenfalls Zytokine, IL-8 und VEGF (vascular endothelial growth factor) (73, 116). Diese Zytokinbildung stellt möglicherweise das Bindeglied zwischen Typ-IV-Sekretionssystem und Gefäßproliferation dar.

Ein weiterer wichtiger Pathogenitätsfaktor sind die so genannten Pili: *B. henselae* durchläuft nach extensivem Passagieren auf unbelebten Medien eine Phasenvariation, die zum Verlust bzw. zur deutlichen Reduktion der Pili führt (82). Der nicht-pilierte Organismus adhärirt und invadiert Wirtszellen deutlich schlechter als der pili-positive Wildtyp (16). Auch die oben beschriebene VEGF-Induktion ist bei den pili-negativen Bakterien reduziert (73). Zu Beginn dieser Arbeit waren keine pilusassoziierten Proteine von *B. henselae* bekannt, bei *B. bacilliformis* und *B. clarridgeae* waren Flagellinene beschrieben (127, 130).

Ein Bakteriophage, der nur in *B. henselae* und *B. bacilliformis*, nicht aber in anderen *Bartonella ssp.* detektiert werden konnte, wurde spekulativ mit der vaskuloproliferativen Potenz dieser beiden Organismen in Zusammenhang gebracht (7). Bisher gibt es aber keine Daten, die diese Vermutung stützen könnten.

Eine Infektion mit *B. henselae* hinterlässt Immunität (113), wobei nicht bekannt ist, ob diese humoraler oder zellulärer Natur ist. Für die Abwehr von intrazellulären Erregern spielt v. a. die zelluläre Immunantwort eine Rolle (129). Dies könnte die Ursache dafür sein, dass das intrazellulär lebende Bakterium bei Patienten mit geschwächter zellulärer Abwehr (v. a. HIV-Infizierte) schwerere und andere Krankheitsbilder als bei Immunkompetenten hervorruft.

### 1.1.7 Klinik von Bartonellen-Infektionen beim Menschen

Folgende Übersicht zeigt in verkürzter Form die klinisch relevantesten Formen von Bartonellen-Infektionen:

Tab. 1: Die wichtigsten humanpathogenen *Bartonella*-Spezies und ihre jeweiligen Krankheitsspektren.

<b><i>Bartonella</i>-Spezies</b>	<b>Krankheitsbilder</b>
<i>B. bacilliformis</i>	Carrion'sche Krankheit: Verruga peruana Oroyafieber
<i>B. quintana</i>	5-Tage-Fieber, bazilläre Angiomatose, Endokarditis
<i>B. henselae</i>	Katzenkratzkrankheit (Komplikationen: Endokarditis, Enzephalitis, Osteomyelitis) Bazilläre Angiomatose / Peliosis hepatis

Prinzipiell kann es bei einer Infektion mit *B. henselae* abhängig vom Immunstatus des Betroffenen zu zwei verschiedenen Verlaufsformen kommen:

1. Katzenkratzkrankheit (KKK): Diese tritt im Regelfall bei Immunkompetenten auf. Sie ist eine Erkrankung des Kindes- und Jugendalters, 80% der Patienten mit unkompliziertem Krankheitsverlauf sind unter 21 Jahre alt (65). Das Leitsymptom ist eine schmerzhafte Lymphadenopathie des Lymphknotens, der die Stelle des Katzenkratzers drainiert. Laut Margileth (93) ist die KKK der häufigste Grund regionaler Lymphadenopathie bei Kindern und Erwachsenen. Histologisch sind diese Lymphknoten durch granulomatöse Strukturen und Mikroabszesse bis hin zur makroskopischen Vereiterung gekennzeichnet. 30% der Patienten klagen zudem über Fieber und Krankheitsgefühl (8). Die unkomplizierte KKK heilt spontan in 2-6 Monaten aus (92). Komplikationen treten in 5-20% der Fälle auf und können beinahe jedes Organsystem betreffen (8), mit oder ohne vorausgegangene typische KKK: Beginnend bei Parinaud's Okuloglandulärem Syndrom, einer Konjunktivitis mit präaurikulärer Lymphadenopathie und anderen ophthalmologischen Manifestationen (38) über Osteomyelitis (63), Leber- und Milzabszesse (124) persistierendes Fieber (137) und andere, seltener beschriebene Manifestationen ist das klinische Spektrum sehr breit.

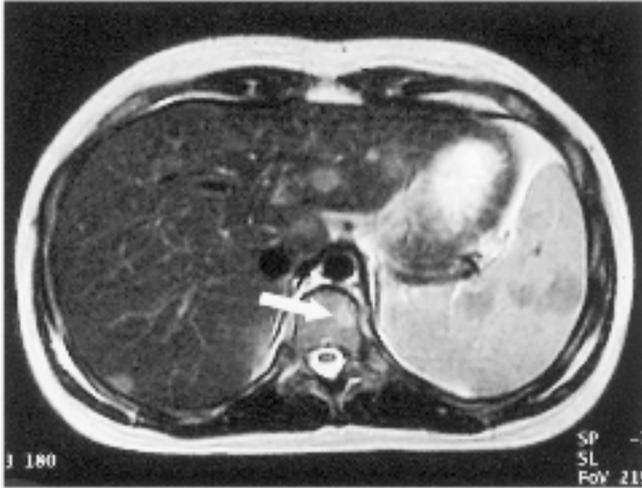


Abb. 1: Abdominelle Magnetresonanztomographie eines 12-jährigen Mädchens mit klinisch und serologisch gesicherter KKK: Neben zahlreichen Milz- und Leberabszessen ist eine osteolytische Läsion eines Lendenwirbelkörpers zu sehen (124).

Auch das zentrale Nervensystem kann betroffen sein, es häufen sich Berichte über *B. henselae*-assoziierte Enzephalitiden (13). Neuere Studien erbrachten Hinweise darauf, dass *B. henselae* auch eine Rolle bei der HIV-Enzephalopathie spielen könnte: Schwartzman et al (135) stellten für eine Gruppe neurologisch auffälliger HIV-Patienten eine Seroprävalenz von 32% im Vergleich zu 4-5,5% in der unselektionierten Patientengruppe fest. Außerdem wurde von den Autoren eine intrathekale Antikörperbildung und somit eine ZNS-Invasion des Erregers oder von Teilen davon postuliert.

Zudem kann *B. henselae* Endokarditiden hervorrufen (14, 36, 108). Es wird angenommen, dass eine nicht unbeträchtliche Zahl der Blutkultur-negativen Endokarditiden auf *B. henselae* bzw. *B. quintana* zurückzuführen ist (27).

2. Bazilläre Angiomatose und Peliosis hepatis: Bei immunsupprimierten Patienten, vor allem bei HIV-Infizierten, kann es zu einer grundsätzlich anderen Manifestation der *B. henselae*-Infektion kommen: Hier werden durch *B. henselae* angioproliferative Prozesse ausgelöst, die zur Bildung von fokalen Tumoren, bestehend aus ungeordneten Endothelzellformationen, führen. Treten diese Läsionen an der Haut auf, so werden sie bazilläre Angiomatose (BA) genannt, treten sie an inneren Organen wie Lunge oder Leber auf, so heißen sie bazilläre Peliosis (BP) (36, 85, 141). Die Affektion innerer Organe ist potentiell lebensbedrohlich (36). Begleitet werden diese Krankheitsbilder von unspezifischen Symptomen wie Fieber, abdominellen Schmerzen und Gewichtsverlust. Die Prävalenz von BA und BP in Deutschland beträgt nach einer

Studie, in der Daten von 17000 HIV-Patienten ausgewertet wurden, 1,2/1.000 HIV-Patienten (105). Klinisch besteht große Ähnlichkeit mit dem Kaposi-Sarkom, histologisch ist die Differenzierung dagegen eindeutig zu treffen (86). Die indizierte Therapie ist selbstverständlich eine andere: Die durch Bartonellen verursachten Gefäßwucherungen können sich unter antibiotischer Behandlung (z. B. mit Makroliden oder Doxycyclin) vollständig zurückbilden. Die Erfolgchancen werden allerdings mit Remissionsraten zwischen 30% (105) und 100% (154) unterschiedlich bewertet.



Abb. 2: Bazilläre Angiomatosen eines 38-jährigen HIV-Patienten. Die Läsionen sind schmerzhaft und können verschiedene Morphologien aufweisen. Die BA der Kopfhaut ähnelt z. B. einem pyogenen Granulom, die über der Augenbraue eher einem Kaposi-Sarkom (91).

*B. quintana* kann ebenfalls bazilläre Angiomatosen verursachen und auch die von *B. bacilliformis* verursachte Verruga peruana ist eine angioproliferative Erkrankung. Die vaskuloproliferative Potenz scheint also im Genus *Bartonella* verankert zu sein. Nachdem *B. henselae* erst seit kurzer Zeit bekannt ist und die diagnostischen Möglichkeiten noch nicht lange definitive Aussagen über den Zusammenhang bestimmter Krankheitsbilder und einer Infektion mit *B. henselae* erlauben, ist es möglich, dass Teile des klinischen Spektrums noch nicht erkannt wurden bzw. in ihrer Häufigkeit unterschätzt werden (160). Ebenso gut ist es aber möglich, dass einige der oben genannten Krankheitsbilder nicht *B. henselae* zuzuschreiben sind, da Berichte darüber zum Teil aus der Zeit vor der Identifizierung des KKK-Erregers stammen, sich also allein auf die klinische Diagnose der KKK stützen. Um das genaue Ausmaß des klinischen Spektrums einer *B. henselae*-Infektion zu erfassen, wird es in Zukunft nötig sein, mehr Daten aus molekularbiologischen Untersuchungen (PCR, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) zu gewinnen.

### 1.1.8 Diagnose und Therapie von *B. henselae*-Infektionen

Vor der Entdeckung von *B. henselae* wurde die Diagnose einer KKK gestellt, wenn mindestens drei der vier folgenden Kriterien erfüllt waren (8):

- Regionale Lymphadenopathie nach Ausschluss anderer Ursachen einer Lymphadenopathie
- Kontakt mit Katzen und Entwicklung einer primären Hautaffektion
- Positiver Hauttest
- Charakteristische histopathologische Befunde

Der Hauttest bestand aus einer intradermalen Injektion hitzeinaktivierten Materials aus Lymphknoten von KKK-Patienten. Trat nach 48-96 h eine allergische Reaktion vom Spättyp auf, so war der Test positiv. Obwohl der Test mit 95-98% sehr sensitiv war, haben mangelnde Verfügbarkeit des Antigens, das erhebliche Gesundheitsrisiko für die Patienten und die in letzter Zeit entwickelten, spezifischeren Diagnosemethoden zur Abschaffung dieses Tests geführt.

Bergmans et al. (19) entwickelten erstmals einen sensitiven PCR-Test für KKK und verglichen die Ergebnisse mit serologischen Tests an den gleichen Patienten. Sie fanden eine starke Korrelation zwischen beiden Tests. Die Aussagekraft eines einzelnen erhöhten Titers im indirekten Immunfluoreszenztest (IFT) wurde von mehreren Gruppen untersucht (40, 112, 162). Die Sensitivität für die Diagnose KKK wird hier mit 84% und die Spezifität mit 96% angegeben (162). Gerade bei der Untersuchung des klinischen Spektrums ist aber trotz der guten Validität des IFT ein zusätzlicher Nachweis des Erregers aus dem jeweiligen Material mittels PCR oder durch Anzucht sinnvoll, um eine Koexistenz von KKK und einer anderen Erkrankung auszuschließen.

Die Diagnose der BA erfolgt nach klinischem Verdacht am besten durch PCR aus Hautbiopsien, wie von Relman et al. (115) beschrieben. Auch die rein pathohistologische Befundung (76) oder die spezielle Warthin-Starry-Färbung (85) können zielführend sein.

Was die Therapie der oben genannten Erkrankungen angeht, so fehlen groß angelegte klinische Studien und die Veröffentlichungen beziehen sich größtenteils auf empirische klinische Daten und *in vitro*-Experimente. *B. henselae* sind zwar *in vitro*

empfindlich gegenüber den meisten Antibiotika (Penicilline, Cephalosporine, Tetracykline, Makrolide, Chinolone, Trimethoprim, Sulfamethoxazol, Aminoglykoside und Rifampicin (37, 119)). Dies korreliert aber nicht zwingend mit der klinischen Wirksamkeit: Es wurden auch Therapieversager unter Monotherapie mit einzelnen der oben genannten Antibiotika beschrieben (140). Abgesehen davon bedarf die unkomplizierte KKK zumeist keiner Therapie (37).

Bislang existiert nur eine prospektive Doppelblindstudie, bei der nach Azithromycin-Behandlung im Vergleich mit der Placebogruppe ein schnellerer Rückgang der Lymphknotenschwellung bei KKK-Patienten beobachtet werden konnte (15). Nach Empfehlung des „Sanford Guide to Antimicrobial Therapy“ (53) werden *B. henselae*-assoziierte Infektionen wie folgt behandelt: Für die Katzenkratzkrankheit wird Azithromycin empfohlen, für die *Bartonella*-Endokarditis Aminoglykoside und chirurgische Sanierung und für die bazilläre Angiomatose/Peliosis Makrolide oder Doxycyclin. Tompkins wies darauf hin, dass zur Vorbeugung dieser neu auftauchenden Infektionskrankheiten eine Zusammenarbeit mit Vertretern anderer Fachbereiche, u. a. mit Tiermedizinern und Verantwortlichen der Public Health (z.B. Verminderung von Obdachlosigkeit, Senkung von HIV-Neuinfektionsraten), nötig ist (144).

## 1.2 Proteomik

Das Proteom ist die Gesamtheit von Proteinen, die von einer Zelle unter bestimmten Bedingungen exprimiert wird. Das Genom stellt eine Matrix für alle Proteine dar, die eine Zelle zu synthetisieren im Stande ist. Gerade an komplexen Organismen wird klar, dass die Untersuchung des Genoms alleine nicht ausreicht, um Aussagen über den Zustand bestimmter Zellen zu machen: Beispielsweise produzieren menschliche Leberzellen kein Melanin, obwohl sie auch die genetische Ausstattung dafür besitzen, und Bakterien exprimieren nur zu Beginn einer Infektion Adhäsine (31).

Die Proteomanalyse dagegen ermöglicht einen Einblick in die dynamischen Prozesse, mit denen Organismen auf verschiedene Umweltbedingungen reagieren. Regulative Veränderungen der „Genomnutzung“ können untersucht werden.

Dazu wird eine hoch auflösende Trennmethode für Proteine benötigt. Die zweidimensionale Gelelektrophorese, mit deren Hilfe inzwischen bis zu mehrere tausend Proteine gleichzeitig aufgetrennt werden können, ist derzeit das potenteste Mittel hierfür (52). Die im Vergleich zur eindimensionalen Elektrophorese zusätzliche Dimension des isoelektrischen Punktes ermöglicht es, dass verschiedene Proteine, die im eindimensionalen Gel aufgrund gleicher Größe in der gleichen Bande zu liegen kommen, durch ihre unterschiedliche Ladung getrennt werden können.

Die Flut von Bildinformationen, die mit der 2D-Elektrophorese generiert wird, kann mit speziell hierfür entwickelter Computersoftware ausgewertet werden. Zur anschließenden Identifikation von Proteinen stehen eine Reihe von Methoden, unter anderem Massenspektrometrie, mit der auch posttranslationale Veränderungen detektiert werden können, und die Sequenzierung von Aminosäuresequenzen, zur Verfügung.

Außerdem bietet sich die Möglichkeit der Immunodetektion: Mit bekannten Antikörpern können gezielt Proteine im Proteom nachgewiesen werden und immunogene Proteine von Mikroorganismen können zum Beispiel durch Reaktion mit Patientenserum gefunden werden. Umgekehrt ist es auch möglich, neu hergestellte Antikörper auf ihre Spezifität und ihre Bindungsproteine zu untersuchen. Diese Verfahren kommen in der eindimensionalen Elektrophorese schon lange, auch routinemäßig, z. B. in der serologischen Infektionsdiagnostik zur Anwendung, erlangen aber durch Einführung der zweidimensionalen Elektrophorese eine um ein Vielfaches gesteigerte Spezifität.

### **1.3 Zielsetzung**

Der genetische Ansatz ist, wie oben beschrieben, bei der Untersuchung von *B. henselae* schwierig und hat bis jetzt nicht zur Klärung grundlegender Pathogenitätsstrategien dieses Erregers geführt.

Die Methode der Proteomanalyse bietet einen alternativen Weg zur Erforschung von Pathogenitätsfaktoren. Genregulation kann auf Proteinebene studiert werden.

Ziele dieser Doktorarbeit waren daher

- die Etablierung der 2-dimensionalen Elektrophorese für *B. henselae*

- das Erstellen einer Referenzkarte des Proteoms: Durch Identifikation einiger Landmarkenproteine auf zweidimensionalen Referenzgelen sollte die Orientierung innerhalb des aufgetrennten Proteoms erleichtert werden. So genannte „house-keeping proteins“, also Proteine, die auch im Ruhezustand des Bakteriums für den Grundumsatz benötigt werden (z. B. die Malatdehydrogenase), können als Referenzpunkte in Regulationsstudien benützt werden: Proteine, deren Expression unter bestimmten Bedingungen herauf- oder herunterreguliert wird, können in ihren Mengen verglichen werden, indem deren Intensität auf die eines Referenzproteins bezogen wird, das durch diese Bedingung nicht beeinflusst wird.
- Vergleichende Proteomstudien:
  1. Pilierte Wildtyp-*B. henselae* sollten auf Proteomebene mit nicht-pilierten Spontanmutanten verglichen werden.
  2. Genregulation sollte am Beispiel der Hitzestressantwort demonstriert werden.
  3. Das Proteom von *B. henselae*, das nach Infektion von Zellkulturen exprimiert wurde, sollte mit dem von auf Agarplatten gewachsenen *B. henselae* verglichen werden (Pulse-Chase-Experimente).
- Testung monoklonaler Antikörper am aufgetrennten Proteom von *B. henselae*: Monoklonale Antikörper sollten mithilfe von 2-dimensionalen Western Blots auf ihre Spezifität getestet werden und die Bindeproteine der monoklonalen Antikörper sollten identifiziert werden. Die Eignung der 2-dimensionalen Elektrophorese für diesen Zweck sollte eruiert werden.

All diese Experimente sollten eine Grundlage dafür liefern, in nachfolgenden Studien die Pathogenität von *B. henselae* besser verstehen zu können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material: Geräte, Chemikalien, Puffer und Lösungen

#### 2.1.1 Geräte

Analysenwaage : Kern 510-63	Kern, Albstadt
Brutschränke:	
CO <sub>2</sub> -Incubator MCO-17AI	Sanyo, Japan
Cytoperm2	Heraeus, Hanau
Certomat BS-1 (Schüttelinkubator)	B. Braun, Melsungen
Eppendorfpipetten	Eppendorf, Hamburg
French Pressure Cell Sim Aminco	SLM Instruments Inc., Rochester, NY, USA
Gel Drying System Modell 583	Biorad, München
GeneAmp PCR System 2400/9600	Perkin-Elmer, Überlingen
GS-710 Calibrated Imaging Densitometer	Biorad
HeraSafe Laminar Flow Bank (Sterilwerkbank)	Heraeus
Mikroskope:	
Aiovert 25 Plattenmikroskop	Zeiss, Jena
Tischmikroskop KF-2	Zeiss
Mini-PROTEAN II (8,3x7,3cm Proteingele)	Biorad
Multiphor II (isoelektrische Fokussierung)	amersham-pharmacia, Freiburg
Neubau-Zählkammer	Brand, Landshut
pH-Meter pH 530	WTW, Weilheim
Photometer Ultrospec 3000	amersham-pharmacia
Pipetus standart	Hirschmann, Eberstadt
Protean II XL Cell (20x18,5cm Proteingele)	Biorad
Quarzküvetten (für Photometer) QS 1000 blue point	Hellma, Mühlheim
Reax 2000 (Vortexer)	Heidolph, Kehlheim
Rehydrierungstablett (reswelling tray)	amersham-pharmacia
Röntgenfilme BioMax Mr Film	Kodak, Stuttgart

Röntgenfilmkassetten Kodak XOMatic C2	Kodak
Scanner GS-710	BioRad
Software:	
Adobe Photoshop 7.0	Adobe, Mountain View, CA, USA
DNA man™	Lynnon BioSoft, Quebec, Kanada
GCG-Programm (41)	
Micrososoft Office 2000	Microsoft, Redmont, USA
PD-Quest	BioRad
SpeedVac SC 110 (Evaporator)	Savant Instruments, New York, USA
Stromversorgungsgerät E862	Consort, Turnhout, Belgien
Stromversorgungsgerät PowerPac 1000	BioRad
Stromversorgungsgerät PowerPac 300	BioRad
Sub-Cell GT DNA-Electrophoresekammer	Biorad
Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell	BioRad
Trilux MicroBeta 1450 (Szintillationszähler)	Wallac, Turku, Finnland
Zentrifugen:	
Megafuge 1.0	Heraeus
Megafuge 3.0	Heraeus
Omnifuge 2.0 RS	Haereus
Sigma 3K30	B. Braun
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf

Plastik- und Verbrauchsmaterialien werden hier nicht im Einzelnen aufgeführt und wurden von folgenden Firmen bezogen: B. Braun, Melsungen; Eppendorf, Hamburg; Falcon/Beckton and Dickinson, Heidelberg; Greiner, Nürtingen; Nunc, Roskilde, Dänemark; Sartorius, Göttingen; Schleicher & Schuell, Kassel.

### 2.1.2 Chemikalien

Sofern nicht anders aufgeführt, wurden Chemikalien von der Firma E. Merck, Darmstadt, Feinchemikalien von der Firma Sigma, Deisenhofen, Medien und Zusätze für die Zellkultur von der Firma Biochrom, Berlin, bezogen.

6-amino-n-Caproat	Fluka, Buchs
Accugel, 40% (w/v) 29:1 Acrylamid/Bisacrylamid	national diagnostics, Atlanta, USA
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Biomol, Hamburg
BenchMark Prestained Protein Ladder	Gibco BRL, Karlsruhe
BenchMark Protein Ladder	Gibco BRL
Bradford Reagenz	BioRad
CHAPS	Fluka
Columbia Agar	Beckton and Dickinson, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue R250	Biomol
DAB (3,3´Diaminobenzidinhydrochlorid)	Serva, Heidelberg
dNTPs	Boehringer Mannheim
DryStrip Cover Fluid	amersham-pharmacia
ECL-Kit	amersham-pharmacia
Endothelzellmedium	PromoCell, Heidelberg
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL
GeneRuler 1kb DNA Ladder	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
Glycerol	Biomol
Glycine electrophoresis grade	ICN Biomedicals, Irvine, CA, USA
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Roth
Immobilon P Transfer Membrane	Millipore, Eschborn
Kollagen G	Biochrom, Berlin
Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) p. A.	Serva
PBS (Phosphate buffered saline)	Gibco BRL

Perkin Elmer GenAmp (10x PCR-Puffer)	Perkin Elmer, Überlingen
Ponceau S solution 0,2% in 3% TCA	Serva
Protogel, 31% (w/v) 37,5:1 Acrylamid/Bisacrylamid	national diagnostics
QIAGEN tissue kit	Qiuagen, Hilden
QUIAquick PCR Purification Kit	Qiuagen
Rabbit-Anti Mouse IgG horse raddish peroxidase	DAKO, Neuss
Redivue PRO-MIX	amersham-pharmacia
Servalyt pH 3-10, 40% w/v	Serva
Servalyt pH 4-7, 40% w/v	Serva
Szintillationsflüssigkeit	Wallac
Ampli-taq (Taq DNA-Polymerase)	Perkin Elmer
TEMED	Fluka
Thiourea	Fluka
Tributylphosphin	Fluka
Tricine-Tris p. A.	Biomol
Tris p. A.	ICN Biomedicals
Urea (ultrarein)	ICN Biomedicals

### 2.1.3 Medien und Puffer für Zell- und Bakterienkultur

Die Medien wurden steril gehandhabt und bei 4°C gelagert. Das FCS wurde vor Benutzung 30 min bei 60°C inaktiviert.

Tab. 2: Zellkulturmedium und Waschpuffer

Zellkulturmedium	Endothelzellmedium (PromoCell) mit 10% FCS, 10 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	80 g NaCl; 2 g KCl; 11,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O; 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , mit H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> ad 1 l; pH 7,4

Tab. 3: Bakterienmedien und Niedrigsalzpuffer

Luria-Bertani (LB)-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl ad 1 l A. dest; pH 7,5
Einfriermedium für Bakterien	20% Glycerol in LB-Medium
Niedrigsalzpuffer (LSB)	3 mM KCl; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 68 mM NaCl; 9 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (wurde als 50x Stocklösung angesetzt)

## 2.1.4 Puffer und Lösungen

### 2.1.4.1 Puffer und Lösungen für die 1- und 2-dimensionale Elektrophorese

Tab. 4: Proteinprobenpuffer (alle Aliquots wurden bei -80°C gelagert)

SDS-Puffer	0,5% w/v SDS; 2 mM TBP; 10 mM Tris/HCl; pH 8
Harnstoffpuffer (HC)	8 M Harnstoff; 4% w/v CHAPS; 2 mM TBP, wird erst kurz vor Gebrauch dazugegeben
Thioharnstoffpuffer (THC)	7 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 4% w/v CHAPS; 2 mM TBP, wird erst kurz vor Gebrauch dazugegeben
Tributylphosphin-Lösung (TBP)	200 mM Tributylphosphin in Isopropanol (getrocknet), unter O <sub>2</sub> -Abschluss verdünnt und gelagert

Tab. 5: Puffer und Lösungen für die Vorbereitung zur zweiten Dimension

Equilibrierungspuffer	300 g Glycerin; 50 mM Tris/HCl ; 2% w/v SDS 6 M Harnstoff, mit H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> ad 1 l; pH 6,8
IEF-Waschpuffer	50 mM Tris/HCl; 2% w/v SDS; pH 6,8

Tab. 6: Puffer und Lösungen für die Tricin-SDS-Gele (128)

Gelpuffer	3 M Tris; 0,3% w/v SDS; pH 8,45
Accugel	40 % 29:1 Acrylamid/Bisacrylamid
Protogel	30% w/v Acrylamid; 0,8% Bisacrylamid
5 x Anodenpuffer	1 M Tris; pH 8,9
5 x Kathodenpuffer	0,5 M Tris; 0,5 M Tricin-Tris; 0,5% w/v SDS

Tab. 7: Puffer und Lösungen für die Glycin-SDS-Gele (83)

4 x „Upper“-Tris-Puffer	1,5 M Tris/HCl; pH 8,8
4 x „Lower“-Tris-Puffer	0,5 M Tris; pH 8,8
Ammoniumpersulfat (APS)	10 % in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Protogel	30% w/v Acrylamid; 0,8% Bisacrylamid
Laufpuffer	0,25 M Tris; 14,4% Glycin; 0,1% SDS
10%SDS	10% SDS in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

### 2.1.4.2 Lösungen für Proteinfärbungen

Tab. 8: Lösungen für die Coomassie-Färbung

Fixier- bzw. Entfärbelösung	30% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Acetat; 60% (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>
Färbelösung	0,05% (w/v) Coomassie Brilliant-Blue R250 in Fixierlösung

Tab. 9: Lösungen für die Silberfärbung

Thiosulfatlösung	0,02% (w/v) Thiosulfat in H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>
Silbernitratlösung	0,2% (w/v) Silbernitrat 0,02% (v/v) Formaldehydlösung (37%ig) in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Entwicklerlösung	3% (w/v) Natriumcarbonat; 0,0004% (w/v) Natriumthiosulfat; 0,05% (v/v) Formaldehydlösung (37%ig) in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Stopplösung	0,5% (w/v) Glycin in H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>

### 2.1.4.3 Puffer und Lösungen für Western Blotting

Tab. 10: Laufpuffer für den Blotvorgang (halbtrockenes System)

Anodenpuffer I	0,3 M Tris; 10% Methanol; pH 10,4
Anodenpuffer II	25 mM Tris; 10% Methanol; pH 10,4
Kathodenpuffer	25 mM Tris; 40 mM 6-amino-n-Caproat; pH 9,4

Tab. 11: Puffer für Inkubation und Entwicklung der Blots

Waschpuffer (WPT)	0,9% NaCl; 10mM Tris/HCl; 0,2% Tween 20 in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> ; pH 7,4
Substratlösung	50 mg Diaminobenzidin; 5 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,4; ad 100 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> ; kurz vor der Färbung Zugabe von 50 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%ig)
Stopplösung	27,4 ml einer 1 N Schwefelsäurelösung ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

### 2.1.4.4 Puffer und Lösungen für PCR und DNA-Gele

Tab. 12: Übersicht über Puffer und Lösungen für PCR und DNA-Gele

50x-TAE-Puffer	242 g Tris; 57,1 ml Eisessig; 37,2 g Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O; mit H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> ad 1 l; pH 8,5
5x-Auftragspuffer	15% Ficoll 400; 0,05% Bromphenolblau; 0,05% Xylencyanol in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Ethidiumbromidbad	10 µg Ethidiumbromid ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

## **2.2. Bakterielle Stämme und humane Zelllinien**

In allen Experimenten wurden *B. henselae* vom Stamm Marseille (43) verwendet. Durch extensives Passagieren auf Agarplatten wurden Pilus-negative Spontanvarianten von *B. henselae* hergestellt (16). Die fehlende Pilusexpression wurde mithilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen morphologisch bestätigt (72).

Die humanen Zellen für Infektionsversuche waren Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVECs), die, wie von Äpfelbacher et al. (3) beschrieben, gewonnen wurden.

## **2.3 Kulturbedingungen: Anzucht von Bakterien und Zellkultur**

### **2.3.1 Anzuchtbedingungen für Bakterien**

Bakterielle Stämme wurden auf Columbia-Blutagar-Platten (5% fibrinfreies Schafsblut, Beckton and Dickinson) ausgestrichen und 4 bis 5 Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit bebrütet. Für die Versuche mit hitzestressierten Bakterien wurden die Agarplatten am Tag der Ernte für 4 Stunden in einen Brutschrank mit 44°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit überführt.

Zum Herstellen von bakteriellen Stocklösungen wurden die Bakterien nach 5 Tagen Bebrütung mit sterilen Wattestäbchen in PBS geerntet, in Luria-Bertani-Medium gewaschen und in Einfriermedium (LB-Medium mit 20% Glycerin) aufgenommen. Die Aliquots wurden bei -80°C gelagert. Die Zahl der viablen Bakterien in dieser Vorratslösung wurde durch Auszählen von seriellen Verdünnungsreihen auf Agarplatten bestimmt. Für Infektionsversuche wurden die Stocklösungen aufgetaut, mit PBS gewaschen und in Zellkulturmedium (siehe 2.3.3) aufgenommen.

### **2.3.2 Zellkultur**

HUVEC-Zellen wurden auf kollagenbeschichteten 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen ausgesät und mit Endothelzellmedium mit 10% FCS, 10 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C in befeuchteter Atmosphäre kultiviert. Das

Medium wurde bis zur Konfluenz der Zellen (ca. 6 Millionen Zellen pro Flasche) alle zwei bis drei Tage gewechselt.

### **2.3.3 Infektionsversuche**

Am Tag vor der Infektion wurde die Zellkultur mit antibiotikafreiem Medium gewaschen und inkubiert. Die Bakterien wurden, wie oben beschrieben, aufgetaut und mit einer Konzentration von 300 Bakterien pro Endothelzelle zur Zellkultur gegeben (multiplicity of infection = MOI: 300). Eine kurze Zentrifugation (1.000 g, 5 min) der Zellkulturflaschen erleichterte die Sedimentierung der Bakterien auf die Zellen.

## **2.4 Protein-chemische Methoden**

### **2.4.1 Probenherstellung für die Proteomanalyse**

#### **2.4.1.1 Herstellung von Proteinproben mittels Detergenslyse**

##### **2.4.1.1.1 Detergenslyse mit SDS-THC-Puffer**

40 bis 90 mit *B. henselae* bewachsene Blutagar-Platten wurden fünf Tage nach Ausstreichen in 30 ml PBS geerntet und pelletiert (4000 g/4°C/10 min). Danach wurden die Pellets zum Auswaschen störender Salze aus der Probe je zweimal in 20 ml Niedrig-Salz-Puffer aufgenommen und wieder zentrifugiert. Daraufhin wurden sie in SDS-Puffer (1 ml/ 20 Agarplatten) aufgenommen und 3 min bei 104°C inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden bei Raumtemperatur abzentrifugiert (4.000 g/2 min), der Überstand wurde in einem Evaporator gefriergetrocknet. Die Pellets wurden in THC-Puffer + 1%TBP aufgenommen: Das Volumen war hierbei doppelt so groß wie das ursprüngliche Volumen des SDS-Puffers, um die SDS-Konzentration auf unter 0,25% zu senken. Die weitere Probenpräparation erfolgte, wie unter 2.4.1.1.2 beschrieben.

##### **2.4.1.1.2 Detergenslyse mit THC-Puffer**

Der Aufschluss der Bakterien und die Solubilisierung der Proteine erfolgte durch Aufnahme des bakteriellen Pellets in THC-Puffer. Die Menge des benötigten Puffers wurde auf die optische Dichte (OD) der bakteriellen Suspension bezogen:

Vor dem letzten Zentrifugationsschritt wurde die Lösung 1:10 mit doppelt destilliertem Wasser verdünnt. Davon wurde bei 600 nm Wellenlänge die OD bestimmt. Die Bakterien-Pellets wurden in 5% des berechneten (virtuellen) Volumens mit einer OD von 1 mit THC + 1% TBP aufgenommen und gründlich resuspendiert. Diese Suspension wurde dann zum Zellaufschluss und zur Proteinsolubilisierung eine Stunde geschüttelt. Unlösliche Bestandteile (Proteine, Membranfragmente, DNA, RNA) wurden daraufhin durch eine Ultrazentrifugation (100.000 g/60 min/4°C) weitgehend eliminiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (siehe 2.4.2.1).

#### 2.4.1.1.3 Detergenslyse mit SDS-Puffer

Nach der Ernte der Bakterien und dem Waschen der bakteriellen Pellets (siehe oben) wurden diese in SDS-Puffer aufgenommen (ca. 1 ml Puffer für Bakterien von 20 Agarplatten), resuspendiert und 5 min bei 105 °C im Heizblock inkubiert. Daraufhin wurden die Proben auf Eis gekühlt und zentrifugiert (10.000 g/ 30 min/ 4°C). Die Überstände wurden bis zur Verwendung bei – 80°C aufbewahrt.

#### 2.4.1.2 Herstellung von Proteinproben mithilfe der French pressure cell

*B. henselae* von Columbia-Blutagar-Platten wurden fünf Tage nach Ausstreichen in PBS geerntet und pelletiert (4.000 g/10 min/4°C). Das Pellet wurde in PBS mit 3 mM Proteinaseinhibitor (Pefabloc) aufgenommen.

Das Zubehör der French Press wurde im Kühlschrank aufbewahrt, um zu starke Hitzeentwicklung zu vermeiden und einen schonenden Proteinaufschluss zu gewährleisten. Die Probe wurde in den Kolben eingesaugt und bei Drücken von 1000 psi (= pounds per square inch, d. h.  $7 \times 10^6 \text{ N/m}^2$ ) dreimal ausgepresst. Das Zelllysate wurde dabei klar. Ein kurzer Zentrifugationsschritt (6.000 g/10 min/4°C) eliminierte die großen unlöslichen Konglomerate, danach wurde in der Ultrazentrifuge bei 100.000 g (60 min/4°C) der Überstand der löslichen Proteine von der unlöslichen Fraktion der Membranproteine getrennt. Dieser Überstand wurde 1:5 mit Aceton verdünnt und bei -20°C 30 min lang gefällt. Währenddessen wurden die unlöslichen Pellets mit THC +1% TBP resuspendiert und wie unter 2.4.1.1.2 beschrieben geschüttelt. Die gefällten Proteine aus dem Überstand wurden pelletiert (10.000 g/10 min/4°C). Die resultierenden Pellets wurden an der

Luft getrocknet, bis sie Risse bildeten. Daraufhin wurden die Pellets ebenfalls mit THC + 1% TBP resuspendiert und geschüttelt.

## **2.4.2 Quantifizierung von Proteinen**

### **2.4.2.1 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben erfolgte nach der Methode von Bradford (23). Für die Standard-Messreihe wurden aus einer Stocklösung von bovinem Serumalbumin in einer Konzentration von 2 mg/ml (in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) Verdünnungen von 20, 10, 5, 2,5 und 1,25 µg/ml (ebenfalls in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) hergestellt. Die zu vermessenden Proben wurden je zweimal 1:100 und zweimal 1:200 verdünnt. Das BioRad Bradford Reagenz wurde im Verhältnis 1:5 zu den Proben und zur Standard-Messreihe gegeben, gut resuspendiert und nach fünf Minuten Inkubationszeit bei 595 nm photometrisch vermessen. Die Lichtabsorption durch die Proben ist dabei proportional zur Proteinmenge. Aus der Standardmessreihe wurde mit Hilfe von Microsoft Excel ein Graph erstellt, sodass aus den Absorptionen der Proben deren Proteinmenge bestimmt werden konnte.

### **2.4.2.2 Szintillationszählung von radioaktiv markierten Proteinen**

Die Proteinprobe aus dem Pulse-chase-Verfahren (siehe unten) wurde mit Wasser 1:10 verdünnt (1 µl Probe ad 10 µl). Dann wurden 100 µl Szintillationsflüssigkeit zugesetzt und die Aktivitäten im Szintillationszähler (Trilux MicroBeta 1450, Wallac) vermessen.

## **2.4.3 Zweidimensionale Elektrophorese (2D-Elektrophorese)**

### **2.4.3.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF)**

Bei der isoelektrischen Fokussierung oder der „ersten Dimension“ der zweidimensionalen Elektrophorese werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Dies geschieht in einer Gelmatrix, in der ein pH-Gradient vorhanden ist und an die eine Spannung angelegt wird. Da die Proteine bei pH-Werten außerhalb ihres isoelektrischen Punktes (pI) geladen sind, wandern sie im elektrischen Feld solange, bis sie an ihrem pI ankommen. Hier

sind sie ungeladen, werden daher vom elektrischen Feld nicht mehr beeinflusst und bleiben folglich dort fixiert.

Die erstmalig von O'Farrell (99) beschriebene Methode, bei der der pH-Gradient durch Trägerampholyte nach Anlegen der Spannung kreierte wird, unterlag einer starken Zeitabhängigkeit, da der ganze Gradient im Laufe der Zeit zur Kathode wanderte (cathodic drift). Die von Bjellqvist et al 1982 (20) eingeführte Methode der immobilisierten pH-Gradienten (IPG) verringerte dieses Problem: Hier werden Chemikalien, die den pH-Gradienten erzeugen, mit dem Acrylamid copolymerisiert. Sie sind dann kovalent gebunden und unbeweglich, wodurch die kathodische Drift minimiert wird.

In dieser Arbeit wurden kommerziell erhältliche IPGs (pH 4-7 und pH3-10), also Gele, die auf Folienstreifen fixiert sind, verwendet. Die Rehydratation der getrockneten Gele mit der Probe erfolgte nach Rabilloud (107) sowie Sanchez (125), da gezeigt werden konnte, dass hierbei durch das gleichmäßige Einwandern der Proteine in die Gelmatrix die Auflösung im gesamten pH-Bereich verbessert wird.

Das Protokoll für die eindimensionale Proteinauftrennung war wie folgt:

- 450 µl der Probe wurden gleichmäßig in die Vertiefung des Rehydrierungstabletts (amersham-pharmacia, Freiburg) aufgetragen und das Acrylamidgel mit der Gelseite zur Probe blasenfrei aufgelegt.
- Nach Überschichten mit Paraffinöl gegen das Austrocknen der Probe wurde der Strip bei Raumtemperatur über 12 h mit der Probe rehydriert.
- Die rehydrierten Gelstreifen wurden zwischen zwei mit A. bidest. getränkten Blotpapieren vom Paraffin und von überschüssigem Harnstoff, der auf der Oberfläche des Streifens kristallisieren könnte, befreit.
- Auf dem auf 20°C vortemperierten Kühlelement der Flachbettkammer für die erste Dimension wurden nach Herstellerangaben die benötigten Aufsätze aufgebracht, worauf die rehydrierten Strips platziert wurden.
- Auf jeden Streifen wurde am kathodischen und anodischen Ende je ein 3 mm breites und 1,5 cm langes Blotpapier, das mit deionisiertem Wasser und je ca. 20 µl HC-Puffer (mit 4 mM TBP) getränkt war, aufgebracht.

- die Elektrodenbügel wurden direkt über diese Elektrodenstreifen gelegt und fest angedrückt, die Gele bedeckend mit Paraffinöl überschichtet, die Kammer verschlossen und der Spannungsgradient gestartet:

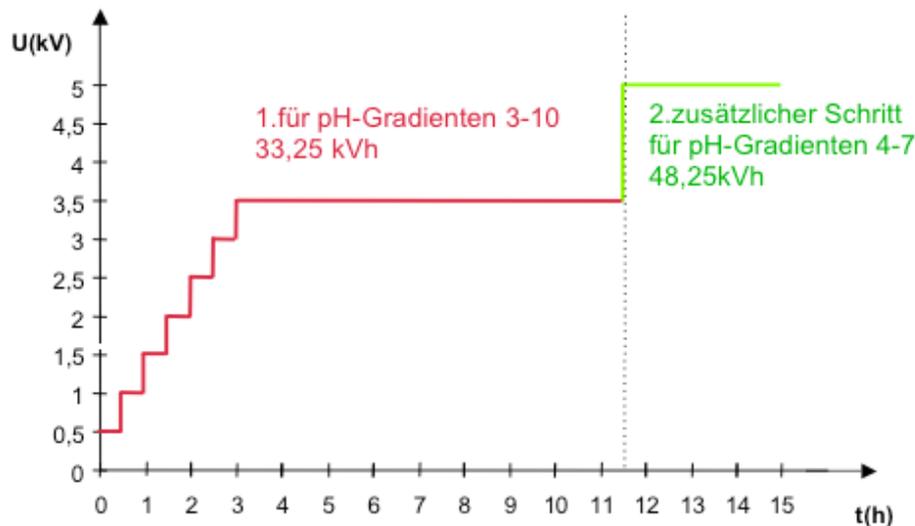


Abb. 3: Übersicht über die verwendeten Spannungsgradienten zur IEF

- Nach Ende der Fokussierung wurden die Gelstreifen entweder gleich für die zweite Dimension vorbereitet oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung aufgehoben.
- Vor dem Aufbringen der Streifen auf die Gele der zweiten Dimension wurden diese in einer Glasröhre in 12,5 ml Equilibrierungspuffer plus 325  $\mu\text{l}$  TBP-Lösung für 20 min unter ständiger Bewegung inkubiert. Daraufhin wurden die Gelstreifen in IEF-Waschpuffer gewaschen und auf das Gel (siehe 2.4.3.2) aufgebracht. Der Streifen wurde mit einer flüssigen Lösung aus 0,7% Agarose in Kathodenpuffer fixiert und die Gelelektrophorese (siehe 2.4.3.2) wurde gestartet.

#### 2.4.3.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurden hier zwei verschiedene Gelsysteme verwendet. Für eindimensionale SDS-Gele wurden Glycin-Gele nach Laemmli (83) mit einer Acrylamidkonzentration von 10% verwendet, mit denen sich

vor allem höher molekulare Proteine gut auftrennen lassen. Das Gel-System von H. Schägger und G. von Jagow (128) mit Tricin als Folgeion, das für die 2-D-Gele benutzt wurde, zeigt eine verbesserte Auflösung von Proteinen vor allem im niedermolekularen Bereich. Die bessere Auftrennung wird damit begründet, dass Tricin im Gegensatz zu Glycin (das im Laemmli-System das Folgeion hinter der Proteinfront ist) eine höhere Mobilität aufweist und so die Protein-SDS-Micellen (vor allem von kleinen Proteinen, die als erste am Übergang zum Trenngel anlangen) nicht so stark mit den "leeren" SDS-Micellen des Trenngels aggregieren. Die zwei verschiedenen Gelsysteme sind aus folgenden Tabellen zu entnehmen:

Tab. 13: Glycin-SDS-Gele (Laemmli)

<b>Glycin-SDS-Gele (Laemmli); Gelgröße 7,3 x 8,3 cm</b>	
Trenngel (2 Gele)	2 ml Protogel; 1,675 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> ; 1,25 ml „Lower“-Tris-Puffer; 10 min entgasen 50 µl 10% SDS; 10 µl 10% APS; 1 µl TEMED
Sammelgel (2 Gele)	0,65 ml Protogel; 3,05 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> ; 1,25 ml „Upper“-Tris-Puffer; 10 min entgasen; einige Kristalle Bromphenolblau zufügen 50 µl 10% SDS; 10 µl 10% APS; 1 µl TEMED

Tab. 14: Tricin-SDS-Gele (Schägger und von Jagow)

<b>Tricin-SDS-Gele (Schägger und von Jagow), Gelgröße 18,5 x 20 cm</b>	
Trenngel (12 Gele)	143,7 ml Gelpuffer; 129 ml Akkugel; 57,8 g Glycerin; ad 430 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> auffüllen; 5 min entgasen 582 µl APS; 58,2 µl TEMED
Sammelgel (12 Gele)	17,4 ml Gelpuffer; 9,1 ml Protogel; 43,4 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> ; 5 min entgasen; einige Kristalle Bromphenolblau zufügen 582 µl APS; 58,2 µl TEMED

Nach Polymerisation der Gele wurde bei den eindimensionalen Auftrennungen folgendermaßen verfahren: Die mit SDS-Puffer hergestellten Proteinproben (2.4.1.1.3) wurden in die Taschen des Sammelgels eingebracht, daraufhin wurde an das Gel Spannung (80 V) angelegt. Sobald die Front des Bromphenolblaus unten aus dem Gel herauszulaufen begann, wurde die Elektrophorese beendet. Bei den großen Gelen der zweiten Dimension wurden zunächst die fokussierten Gelstreifen der ersten Dimension vorbereitet: Die Streifen wurden in einer Glasröhre (A. Görg: [www.weihenstephan.de/blm/deg/2D-Manual.pdf](http://www.weihenstephan.de/blm/deg/2D-Manual.pdf)) in je 12,5 ml

Equilibrierungspuffer plus 325 µl TBP für 20 min unter ständiger Bewegung inkubiert. Dabei werden die Proteine mit SDS beladen, der hohe Gehalt an Harnstoff und Glycerin verbessert die Proteinlöslichkeit und vermindert elektroendosmotische Effekte (A. Görg, [www.weihenstephan.de/blm/deg/2D-Manual.pdf](http://www.weihenstephan.de/blm/deg/2D-Manual.pdf)), die für einen verminderten Proteintransfer von der ersten zur zweiten Dimension verantwortlich gemacht werden. Das Reduktionsmittel TBP schließlich sorgt dafür, dass die Proteine in ungefaltetem Zustand verbleiben.

Nach diesem Equilibrierungsschritt wurden die Streifen mit IEF-Waschpuffer gewaschen und blasenfrei auf das Sammelgel aufgebracht. Der Größenmarker wurde in eine neben dem Streifen befindliche Tasche pipettiert und mit 0,7% Agarose in Kathodenpuffer (75°C) eingebettet, um einen besseren Kontakt zwischen dem Gelstreifen und dem Sammelgel herzustellen. Nach Einfüllen von Anoden- und Kathodenpuffer erfolgte die Elektrophorese bei 4°C nach folgendem Spannungsgradienten:

Tab. 15: Spannungsgradient für die zweite Dimension der Elektrophorese

<b>Zeit in h</b>	1	2	3	4	4	4	10	<b>Gesamt:</b>	<b>28 h</b>
<b>Spannung in V</b>	30	80	100	130	150	175	200		<b>4310 Vh</b>

## 2.4.4 Färbung von Proteinen (CBB, Silber)

### 2.4.4.1 Färbung mit Coomassie Brilliant-Blau

Die Nachweisgrenze der Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung liegt bei 0,2-0,5 µg pro Spur, d. h. von komplexen Proteingemischen müssen einige hundert µg pro Gel aufgetragen werden. Die Färbeintensität korreliert mit der Proteinmenge. Die Gele wurden nach Beendigung der zweiten Dimension entnommen, mindestens eine Stunde in Fixierlösung geschwenkt und so von überschüssigen Ionen und SDS befreit. Durch Überführen in die Coomassielösung (Färbedauer ca. eine Stunde) wurden die Proteine angefärbt. Das Entfärben des Hintergrundes erfolgte durch Schwenken der Gele in Fixierlösung für einige Stunden.

### 2.4.4.2 Silberfärbung nach Blum et al. (22)

Die Silberfärbung ist zum Nachweis von Proteinen 10-100 mal sensitiver als die Coomassie-Färbung, die Nachweisgrenze eines Spots liegt bei 10–100 ng. Von

Nachteil ist, dass die Färbeintensität hierbei nicht mit der Proteinmenge korreliert und zudem kleine Änderungen der Temperatur oder Entwicklungsdauer zu unterschiedlichen Färbeergebnissen führen, was die Reproduzierbarkeit erschwert. Zunächst wurden die Gele wie in der Coomassie-Färbung mindestens eine Stunde lang in Fixierlösung inkubiert. Danach wurden sie mit folgenden Lösungen und unten angegebenen Arbeitsschritten gefärbt.

Tab. 16: Vorgehen bei der Silberfärbung

Arbeitsschritt	Reagenz	Dauer
Wachschritt	30%(v/v) Ethanol	3 x 20 min
Thiosulfatschritt	Thiosulfatlösung	1 min
Waschschrift	H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	3 x 20 sek
Färbeschritt	Silbernitratlösung	20 min
Waschschrift	H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	2 x 20 sek
Entwicklerschritt	Entwicklerlösung	5 min
Waschschrift	H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	2 x 1 min
Stopschritt	Stoplösung	5 min
Waschschrift	H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	30 min

#### 2.4.4.3 Autoradiographie

Pro Gel wurde eine Probenmenge aufgetragen, die eine Aktivität von ca.  $1 \times 10^6$ /min aufwies. Nach dem Lauf wurden die Gele von <sup>35</sup>S-Methionin-Cystein-markierten Proben für mindestens eine Stunde in einer Lösung mit 10% Essigsäure und 1% Glycerin inkubiert, um sie während des anschließenden Trockenvorgangs reißfester zu machen. Danach wurden die Gele auf ein gut angefeuchtetes Blotpapier in einen Geltrockner (Gel Drying System Modell 583, Biorad) gelegt und unter Vakuum bei 74°C eine Stunde lang getrocknet. Die getrockneten Gele wurden aus dem Blotpapier ausgeschnitten und in eine Prospekthülle so eingeschweißt, dass auf einer Seite noch der Film (BioMax Mr Film) eingeschoben werden konnte. Der Film in der so befüllten Prospekthülle wurde in einer Expositionskassette 3-4 Tage lang belichtet. Die Schwärzung des Films entstand durch die  $\beta$ -Strahlung der neu synthetisierten Proteine, in die <sup>35</sup>S-Methionin oder -Cystein eingebaut worden war.

### 2.4.5 Western Blot und Immunodetektion

Unter "Western Blotting" versteht man den Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine aus dem Elektrophoreseigel auf eine immobilisierende Matrix. Die von Towbin et al. (145) entwickelte Methode ermöglicht die Kombination hochauflösender Elektrophoreseverfahren mit Immunoassays und somit den spezifischen Nachweis von Proteinen mittels Antikörperbindungs- und Färbereaktion.

In dieser Arbeit wurde der Proteintransfer leicht modifiziert nach Kyhse-Andersen et al. (81) im horizontalen Semi-dry Verfahren durchgeführt. Vorteilhaft ist hierbei der im Vergleich zum Puffertank-Blot geringere Pufferverbrauch, die kürzere Transferdauer und geringere Wärmeentwicklung.

#### 2.4.5.1 Proteintransfer

In die Blotkammer (Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell, BioRad) wurden auf die Anodenplatte zunächst 6 in Anodenpuffer 1, darauf 3 in Anodenpuffer 2 getränkte Whatman-Papiere gelegt, gefolgt von der Polyvinylidenfluorid (PVDF, Immobilon P) Membran, die zuvor kurz in Methanol geschwenkt wurde. Das mit Kathodenpuffer angefeuchtete Gel wurde blasenfrei aufgelegt und mit 9 in Kathodenpuffer getränkten Blotpapieren bedeckt. Nach jedem Schritt (außer direkt auf dem Gel) wurde mit einem Tapetenroller sichergestellt, dass sich keine Blasen zwischen den Schichten befanden. Der Deckel (Kathode) wurde dicht verschlossen und der Proteintransfer mit  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  (150-200 mA bei 2D-Gelen der hier verwendeten Größe) begonnen. Nach 1,5 h wurden die Markerproteine mit Ponceau-S-Lösung angefärbt und mit Bleistift angezeichnet. Die Membranen wurden mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  entfärbt und 1 Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  in Waschpuffer mit 1% Milchpulver blockiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Nach dem Trocknen wurden die Membranen bis zur Verwendung bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

#### 2.4.5.2 Immunodetektion

Als Primärantikörper wurden (nach Standardprotokollen hergestellte) monoklonale sowie polyklonale Antikörper von Mäusen verwendet, die zuvor mit hitzegetöteten *B. henselae* Marseille immunisiert worden waren (nicht Bestandteil dieser Arbeit). Als Sekundärantikörper wurden kommerziell erhältliche Antikörper aus dem Kaninchen, die gegen den Fc-Teil der Mäuseantikörper gerichtet und mit

Meerrettichperoxidase gekoppelt sind, benutzt. Für das Sichtbarmachen der gebundenen Antikörper wurden zwei verschiedene Systeme benutzt: (i) die direkte Farbreaktion durch Diaminobenzidin und (ii) die Chemilumineszenzkopplung (ECL-Kit von amersham-pharmacia) des Sekundärantikörpers mit anschließender Belichtung eines Kodak Biomax-Films. Die Chemilumineszenz hat den Vorteil, dass die „Färbung“ nicht irreversibel ist, sondern die Belichtung des Films mehrfach durchgeführt werden kann, solange die Membran feucht gehalten wird und frisches ECL-Reagenz zugegeben wird.

Tab. 17: Immunodetektion von *B. henselae*-Proteinen mittels monoklonaler Antikörper

Arbeitsschritte und Lösungen	Dauer
Inkubation mit Primärantikörper: Konzentration 1:1 bis 1:1000 in WPT	über Nacht bei 4°C, unter Schütteln
Waschen in WPT	4x
Konjugation mit dem Sekundärantikörper: Konzentration 1:1000 in WPT	2 h bei Raumtemperatur, unter Schütteln
<u>(i) Färbereaktion mit Diaminobenzidin:</u> Inkubation in Substratlösung Stoppen mit Schwefelsäurelösung, Waschen in H <sub>2</sub> O und Trocknen	bis zum Farbumschlag 1 min
<u>(ii) Chemilumineszenz:</u> Inkubation in 1:1 Mischung von ECL-A- und ECL-B-Lösung (ECL-Kit, amersham-pharmacia) Blot in Frischhaltefolie dicht einpacken, zur Belichtung auf einen BioMax-Film legen und entwickeln	2 min

#### 2.4.6 Pulse trace: radioaktive Markierung von Proteinen

Konfluente HUVEC-Zellen in 260 ml-Zellkulturflaschen (ca.  $5 \times 10^6$  Zellen) wurden mit einer MOI von 300 mit *B. henselae* infiziert (siehe 2.3.3). Nach 18 h wurde der Überstand abgenommen und 10 ml Methionin/Cystein-freies Medium (+10% dialysiertes FCS) auf die Zellen gegeben. Dadurch wurden die intrazellulären Methionin- und Cysteinspeicher geleert („starving“), damit der Einbau des radioaktiven Methionin/Cysteins möglichst effektiv erfolgt. Nach 30 min Inkubation wurde Cycloheximid (CHX), das die eukaryote Proteinbiosynthese unterdrückt, in

einer Konzentration von 200 µg/ml zugegeben. CHX bindet selektiv an 80S Ribosomen von Eukaryoten. Die Einwirkzeit für CHX betrug ebenfalls 30 Minuten. Im nächsten Schritt wurde nun das mit radioaktivem Schwefel (<sup>35</sup>S)-markierte Methionin und Cystein mit einer Aktivität von 1,2 mCi pro Flasche zugegeben. Für den Einbau der markierten Aminosäuren wurden die Flaschen 3 h im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen einmal mit RPMI 1640-Medium gewaschen. Zur Zellyse wurden pro Flasche 3 ml Triton-X-100 (0,1% in PBS) zugegeben und die Flaschen für 3 min auf Eis inkubiert. Dann wurde das Lysat mithilfe einer Spritze und einer langen Kanüle kräftig resuspendiert und zur Lösung aller Zellen mit Druck gegen die Seite der Zellkulturflasche gespritzt, an der die Zellen adhärent waren. Das Lysat wurde in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und 15 min bei 4°C und 5.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets mit je 1 ml Niedrig-Salz-Puffer resuspendiert. 50 µl davon wurden zur seriellen Keimzahlverdünnung entnommen, der Rest nochmals wie oben beschrieben zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurden die Pellets auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte wie unter 2.4.2.2 beschrieben.

## 2.4.7 Identifizierung von Proteinen

### 2.4.7.1 Bildauswertung

Es wurden folgende Softwareprogramme zur Auswertung und Bildverarbeitung der mit dem Scanner (GS-710, Biorad) eingescannten Bilder verwendet:

- Adobe Photoshop 7.0
- Microsoft Powerpoint
- PDQuest 6.1

### 2.4.7.2 Tryptischer Verdau von Proteinen

Die Proteine wurden mit abgeschnittenen Pipettenspitzen (Eppendorf) aus den Gelen ausgestochen und nach der von J. Rosenfeld et al. (120) beschriebenen Methode direkt aus dem Gel tryptisch verdaut (Kooperation mit der Firma Toplab, Martinsried). Trypsin spaltet Peptidbindungen C-terminal von Arginin und Lysin. Durch diese zwei Schnittmöglichkeiten erhält man kleinere Peptidfragmente, bei denen die Chance, sie komplett sequenzieren zu können, größer ist.

#### 2.4.7.3 Massenspektroskopie mithilfe von MALDI-TOF

Mit der MALDI-Technik („matrix-assisted laser desorption ionisation“) können Proteinmengen im femtomolaren Bereich untersucht werden. Nach tryptischem Verdau eines Proteins erhält man eine Reihe von Peptidfragmenten unterschiedlicher Masse. Die Gesamtheit der Massen ist spezifisch für jedes Protein und wird auch als „peptide mass fingerprint“ des Proteins bezeichnet, der mit den Fingerabdrücken von theoretisch verdauten Proteinen aus Datenbanken verglichen werden kann. Dazu wird die Peptidlösung mit einer UV-absorbierenden Matrix gemischt und zusammen mit dieser auskristallisiert. Bei der MALDI werden die Peptidfragmente mittels kurzer Laserimpulse in einzeln geladene Ionen umgewandelt (69) und daraufhin in einem elektrischen Feld beschleunigt. Als Detektor ist ein TOF („time of flight“)-Massenanalysator angeschlossen, der aus der Flugzeit der Ionen das Verhältnis aus Masse zu Ladung ( $m/z$ ) berechnet (70) (Kooperation mit der Fa. Toplab, Martinsried).

#### 2.4.7.4 Chromatographie (RP-HPLC)

Die RP-HPLC (reversed phase high performance liquid chromatography) dient zur Separation von Peptiden aus einem Peptidgemisch. Dabei erfolgt die Trennung nach der Hydrophobizität der Peptidfragmente.

Zunächst wird der Trypsin-Verdau mit einem polaren Lösemittel (Laufmittel A: 0,08% Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser) über eine Säule gegeben, an deren Kohlenwasserstoffketten die Peptide durch hydrophobe Wechselwirkungen binden. Eluiert wird mit einem organischen Lösungsmittel (Laufmittel B: 0,05% TFA in 80% Acetonitril), dessen Konzentration kontinuierlich gesteigert wird. Je hydrophober ein Protein, desto länger bleibt es auf der Säule gebunden und desto später wird es ausgewaschen. Die einzelnen Peptide werden photometrisch (bei 206 nm) anhand der Peptidbindungen detektiert und können so getrennt aufgefangen werden (Kooperation mit der Fa. Toplab, Martinsried).

#### 2.4.7.5 Analyse von Aminosäuresequenzen nach Edman-Abbau

Bei diesem Verfahren kann die Aminosäuresequenz eines Peptids oder Proteins bestimmt werden. N-terminal wird eine Aminosäure nach der anderen abgespalten und chromatographisch identifiziert (142). Prinzipiell besteht die Möglichkeit, das gesamte Protein dieser Prozedur zu unterziehen oder

verschiedene Peptidfragmente nach enzymatischem Verdau zu sequenzieren. Die Sequenzierung vieler Proteine ist aber N-terminal blockiert, sei es durch Acetylierung oder Formylierung oder auch durch nicht-polymerisiertes Acrylamid aus dem Elektrophoresegel (52), so dass sie dieser Methode nicht zugänglich sind. Das Sequenzieren von Peptiden aus der Mitte des Proteins ist zwar durch Verluste aufgrund von zusätzlichen Arbeitsschritten weniger sensitiv und liefert keine Information über die Lage des Peptids im Protein, dafür wird das Problem der N-terminalen Blockierung umgangen und mehrere Peptide können aus einem Protein sequenziert werden (2). Dadurch ist die Chance, Homologien in den Datenbanken zu finden, erhöht (Kooperation mit der Fa. Toplab, Martinsried).

#### 2.4.7.6 Datenbanksuche

Ende der 80er Jahre wurden die ersten Proteindatenbanken auf der Basis von 2D-Gelanalysen angelegt (29). Seitdem ist ein explosives Wachstum sowohl der Protein- als auch der Gendatenbanken zu verzeichnen. Dadurch wurde und wird die Grundlage für immer schnellere und spezifischere Identifizierung von Proteinen aus Proteomanalysen geschaffen. Sowohl die erhaltenen Massenspektren, als auch die Genom- und Aminosäuresequenzen dienen als Grundlage für Datenbanksuchen, um Homologien zu Proteinen von *B. henselae* und anderer Organismen zu finden. Es wurden verschiedene Suchmaschinen (Swiss Institute of Bioinformatics, NCBI, European Bioinformatics Institute, EMBL u. a.) benutzt, die im Internet frei zugänglich sind und auf verschiedene Datenbanken zugreifen können (SwissProt, EMBL Data Library, TrEMBL, NCBI, SWALL u. a.). Für die Daten der Massenspektrometrie stehen hierbei Suchmaschinen zur Verfügung, die die Peptidmassen-Fingerabdrücke mit Fingerabdrücken von theoretisch verdauten Proteinen aus Datenbanken vergleichen.

Für Genom- und Aminosäuresequenzen wurden andere Suchmaschinen, sog. BLASTs (6) benutzt. Innerhalb dieser Suchmaschinen werden unterschiedliche Suchmodi angeboten, mit deren Hilfe man Nukleotidsequenzen gegen Genbanken (blastn), Peptidsequenzen gegen Proteinbanken (blastp), translatierte Nukleotidsequenzen gegen Proteinbanken (blastx) oder Peptidsequenzen gegen translatierte Genbanken (tblastn) vergleichen lassen kann. All diese Suchmodi wurden mit den erhaltenen Aminosäure- und Genomsequenzen sowie mit den

Massenspektren in verschiedenen Suchmaschinen und Datenbanken durchgeführt.

## **2.5 Molekularbiologische Methoden: Reverse Genetics**

### **2.5.1 Konstruktion der Primer**

In dieser Arbeit wurden Primer aufgrund von Aminosäuresequenzen konstruiert („Reverse Genetics“). Ziel war dabei die Identifikation von Proteinen, die durch ihre Aminosäuresequenz alleine nicht zu identifizieren waren. Nachdem die Gendatenbanken weit umfangreicher sind als die Proteindatenbanken, ergibt sich die Chance, auf diesem Wege ein unbekanntes Protein auf genomischer Ebene über translatierte Sequenzen zu identifizieren.

Da der genetische Code degeneriert ist und mehrere Basentriplets für eine Aminosäure codieren können, wurde zunächst mithilfe des im Internet frei zugänglichen GCG-Programmes (41) eine Tabelle zum bevorzugten Gebrauch bestimmter Triplets bei *B. henselae* erstellt. Um die Chance erfolgreicher Bindung zu erhöhen, wurden die Primer trotzdem so konstruiert, dass bei Aminosäuren mit mehreren möglichen Codons alle berücksichtigt wurden und in dem Primergemisch vorhanden waren („wobbles“). Demzufolge war auch die Anlagerungstemperatur der Primer nicht genau zu berechnen, da der GC- und AT-Gehalt je nach individueller Primerzusammensetzung schwankte: Für die Basen A und T werden je 2°C, für C und G je 4°C und für die variablen „Wobbles“ (Basen, die in der Peptidsequenzierung nicht exakt bestimmbar sind) näherungsweise je 2°C addiert, um eine ungefähre Anlagerungstemperatur zu bestimmen.

### **2.5.2 Isolierung genomischer DNA**

5 mit *B. henselae* bewachsene Columbia-Agar-Platten wurden nach 5 Tagen Inkubation in PBS abgeerntet und pelletiert (4.000 g, 5 min). Die genomische DNA wurde mit dem QIAGEN tissue kit nach Anweisungen des Herstellers extrahiert.

### 2.5.3 Amplifikation durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Es wurden mehrere Ansätze und PCR-Zyklusprotokolle getestet. Bei folgender Vorgehensweise konnten am spezifischsten Primer-Template-Bindungen erzeugt werden:

50 µl-Ansatz:

- 10 µl jedes Primers (4,5 pmol/µl)
- 5 µl Puffer (10x-Puffer Perkin Elmer GenAmp)
- 5 µl dNTPs
- 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase (Ampli-Taq Gold<sup>TM</sup>, Perkin Elmer)
- 5 µl genomische DNA (ca. 70 ng/µl)
- 14,5 µl A. bidest., steril

Tab. 18: Zyklusprotokoll der Touch-down-PCR (\* siehe unten)

Schmelzen	Touch-down Zyklen (15x)			Konstante Zyklen (20x)			Ende	
10 min	30s	30s	90s	30s	30s	90s	72°C	4°C
94°C	94°C	55°C*	72°C	94°C	50°C	72°C	15 min	

Die so genannte Touch-down-PCR (42) führt auch dann zum Erfolg, wenn, wie hier, die Anlagerungstemperatur des Primers nicht genau vorausgesagt werden kann, bzw. wenn der Grad der Übereinstimmung von Primer und Template nicht bekannt ist (122).

Hierbei wird in 15-20 Zyklen (\*) die Anlagerungstemperatur kontinuierlich um 1°C pro Zyklus verringert (in oben genanntem Protokoll bis 41 °C). Begonnen wird dieser Prozess bei einem Wert, der über der geschätzten tatsächlichen Anlagerungstemperatur liegt. Man geht davon aus, dass die erste Primer-Template-Bindung dabei an der gewünschten Stelle auftritt, da diese am stärksten komplementär sein muss. Unspezifische Produkte, die bei niedrigeren Temperaturen entstehen, werden somit erst später amplifiziert und sind mengenmäßig unterlegen. In den folgenden 20 Zyklen mit einer Anlagerungstemperatur, die sicher unterhalb oder bei der idealen Anlagerungstemperatur des gewünschten Produkts liegen, hat das spezifische Produkt einen kompetitiven Vorsprung und kann nun stark amplifiziert werden.

### **2.5.4 Auftrennung der PCR-Produkte**

Die PCR-Produkte wurden mit 5x-Auftragspuffer vermischt in die Taschen eines 1%igen Agarosegels (1% Agarose in TAE-Puffer) eingebracht. Die Auftrennung erfolgte für 1-2 Stunden bei 80 V. Danach wurden die Gele für 15 Minuten in das Ethidiumbromidbad eingelegt und die PCR-Fragmente unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht.

### **2.5.5 Sequenzierung der PCR-Produkte**

Die PCR-Produkte wurden nach Kontrolle im Agarosegel direkt aus dem PCR-Ansatz eluiert (QUIAquick PCR Purification Kit; Protokoll nach Angaben des Herstellers), und mit den entsprechenden Primern sequenziert (Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg). Mithilfe des Softwareprogramms DNAMAN (Lynnon Biosoft, Quebec, Kanada), wurden die erhaltenen Sequenzen in den drei verschiedenen Leserastern in Aminosäuresequenzen translatiert und, wie unter 2.4.7.6 beschrieben, der Datenbanksuche zugeführt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Etablierung einer reproduzierbaren Proteomik für *B. henselae*

Als Grundlage für alle Forschungsvorhaben der Proteomik ist es unverzichtbar, dass das Proteom des zu untersuchenden Organismus reproduzierbar in gleichen zweidimensionalen Mustern dargestellt werden kann. Von großer Bedeutung ist dabei die Präparation der Proteine, bei der die Zellen aufgeschlossen, die Proteine in Lösung gebracht und alle nicht-kovalenten Bindungen aufgebrochen werden, so dass die Proteine als einzelne Polypeptide vorliegen. Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften verschiedener Zelltypen existiert kein universell anwendbares Protokoll zur Proteinherstellung (A. Görg: [www.weihenstephan.de/blm/deg/2D-Manual.pdf](http://www.weihenstephan.de/blm/deg/2D-Manual.pdf)).

Nachdem bislang noch keine publizierten Daten zur Proteomik von *B. henselae* existieren, wurde in dieser Arbeit ein für *B. henselae* geeignetes Protokoll zur Proteinpräparation und –auftrennung etabliert: Zunächst wurden die bakteriellen Pellets mit der SDS-THC-Methode präpariert (siehe 2.4.1.1.1). Es zeigten sich nach zweidimensionaler Auftrennung der Proteine Muster, die auf der sauren und der basischen Seite der Streifen nicht ausreichend fokussiert waren:

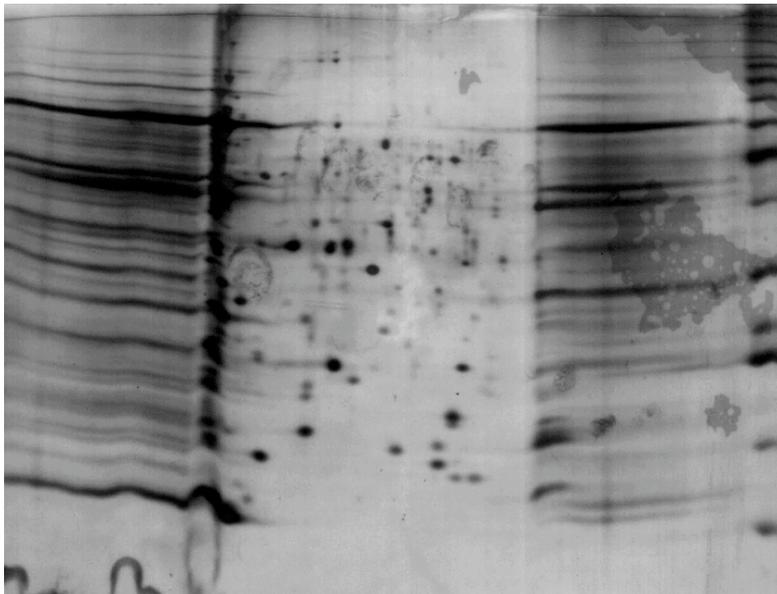


Abb. 4: Auftrennung von 300 µg *B. henselae*-Gesamtzelllysat nach Präparation mit der SDS-THC-Methode (pH 3-10, Silberfärbung).

Als Grund für die mangelhafte Auftrennung im sauren und basischen Bereich wurde angenommen, dass auf der sauren Seite in der Probe befindliche Nukleinsäuren die Poren des Gelstreifens der ersten Dimension verstopft hatten. Auf der basischen Seite wurde eine zu hohe Salzkonzentration der Probe für die schlechte Fokussierung verantwortlich gemacht. Daher wurden ein zweiter Waschschrift mit dem Niedrigsalzpuffer und eine halbstündige Zentrifugation (100.000 g, 4°C) zur Entfernung der Nukleinsäuren eingeführt. Dies führte zu einer deutlichen Verbesserung der Fokussierung vor allem im sauren Bereich, aber immer noch zu keinem akzeptablen Ergebnis, wie in der folgenden Abbildung zu sehen ist.

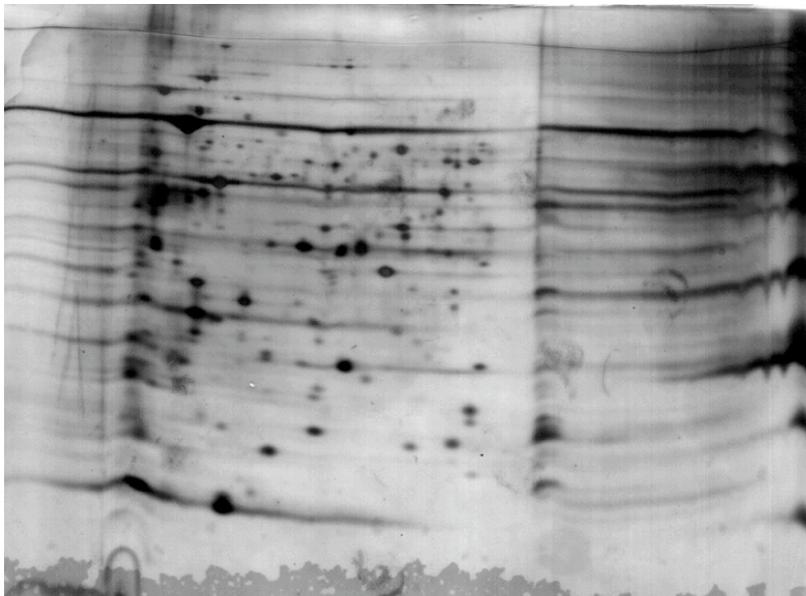


Abb. 5: Auftrennung von 300 µg *B. henselae*-Gesamtzelllysat nach Präparation mit der SDS-THC-Methode und Waschen in Niedrigsalzpuffer sowie Ultrazentrifugation (pH 3-10, Silberfärbung).

Es wurden folglich zwei andere Methoden zur Proteinpräparation in den Vergleich mit aufgenommen: die Lyse mit THC-Puffer alleine und die Präparation mit der French pressure cell, jeweils mit dem halbstündigen Zentrifugationsschritt in der Ultrazentrifuge (100.000 g).

Der Aufschluss mit THC alleine und derjenige mit SDS-THC führten dabei zu ähnlichen Mustern, die allerdings noch etwas streifig waren (Abb. 6).

Da die zytosolischen Proteinproben aus den Versuchen mit der French pressure cell keine schärfere Auftrennung im Vergleich zur Detergenlyse erbrachten (Abb. 7), wurde diese aufwändige Methode nicht weiter verfolgt. Aus der Membranfraktionierung wurden dennoch Proteine identifiziert (siehe 3.2).

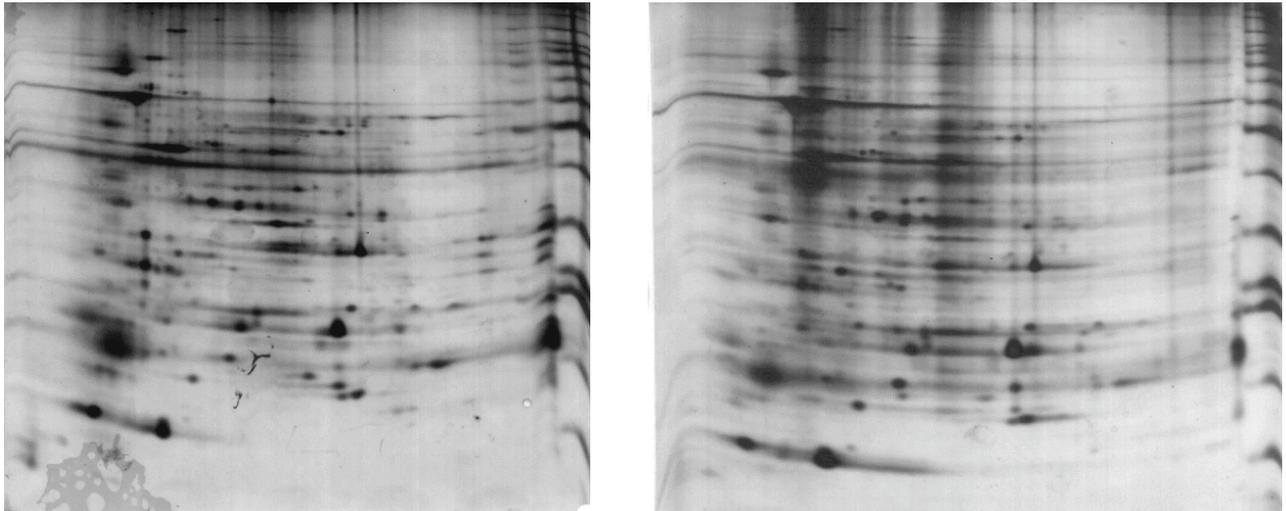


Abb. 6: Links: SDS-THC-Präparation. Rechts: THC-Präparation, je mit Ultrazentrifugation (je 100 µg Gesamtzelllysat, pH 3-10, Silberfärbung).

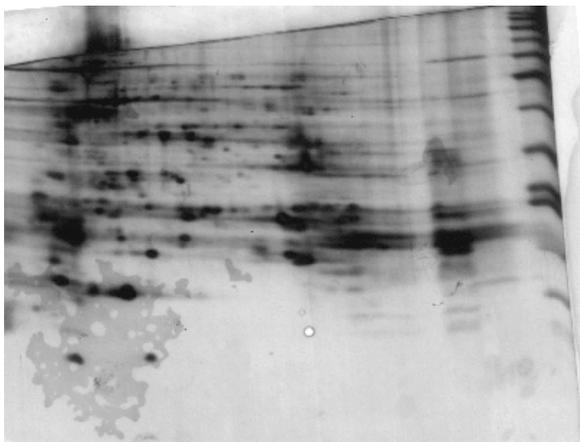


Abb. 7: 100 µg Gesamtzelllysat nach Proteinpräparation mit French pressure cell, zytosolische Proteinfraktion (pH 3-10, Silberfärbung).

Eine weitere Verbesserung konnte dadurch erzielt werden, dass zusätzlich zu den schon beschriebenen Protokollpunkten der Anteil des THC-Puffers am Rehydrierungsvolumen des Streifens verkleinert wurde: Statt das in THC solubilisierte Probenvolumen, das die benötigte Proteinmenge enthielt, wiederum mit THC zum Rehydrierungsvolumen (450 µl) aufzufüllen, wurde für das Auffüllen nun HC-Puffer verwendet (siehe Abb. 8).

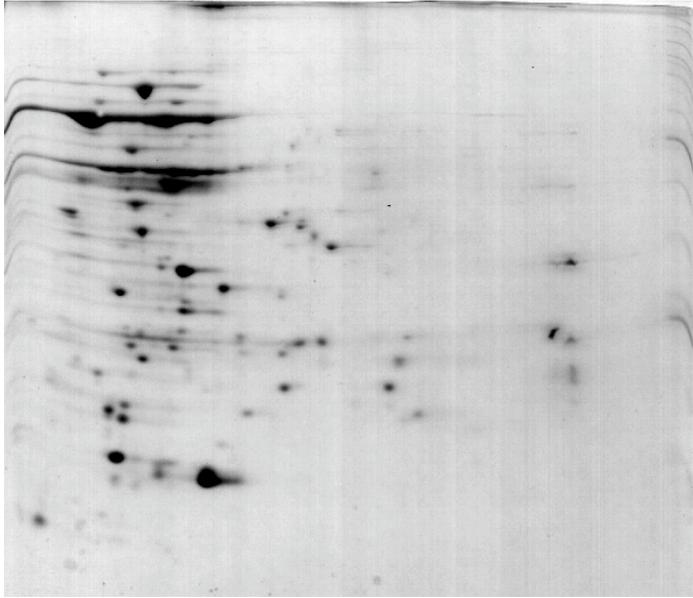


Abb. 8: Auftrennung *B. henselae*-Gesamtzelllysate (760 µg); Präparation mit SDS-THC, Verdünnung mit HC-Puffer (pH 3-10, Silberfärbung).

Schlussendlich konnten die am besten reproduzierbaren Muster mit der unter 2.4.1.1.2 beschriebenen Methode erzielt werden: die Ultrazentrifugation wurde auf eine Stunde verlängert, der Aufschluss erfolgte mit THC alleine (Abb. 9). SDS-THC zeigte keine bessere Auftrennung (Abb. 8).

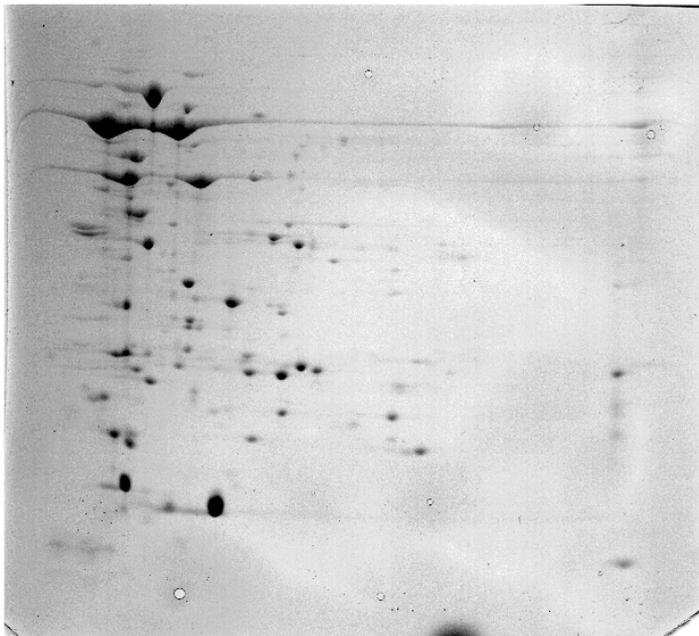


Abb. 9: Mit der hier entwickelten und unter 2.4.1.1.2 beschriebenen Methode präpariertes Gesamtzelllysate von *B. henselae* (1700 µg, Coomassie-Färbung, pH 3-10).

### 3.2 Erstellen einer Proteinkarte von *B. henselae*

Nach Etablierung der reproduzierbaren Methodik war das nächste Ziel das Erstellen einer zweidimensionalen Proteinkarte von *B. henselae*.

Das Identifizieren von so genannten Landmarkenproteinen dient im Wesentlichen der besseren Orientierung auf dem Proteinmuster. Da die Gele selbst unter exakter Einhaltung der Protokollbedingungen nie genau gleich laufen und somit die Proteinmuster identischer Proben nicht ganz deckungsgleich aufgetrennt werden, ist es nötig, einige Orientierungspunkte zu definieren, an denen man die Zuordnung der übrigen Proteine abgleichen kann. Dies ist insbesondere dann essentiell, wenn Proteome aus verschiedenen Bedingungen miteinander verglichen werden sollen und dabei neue Proteine erscheinen, die zuvor noch nicht gefunden wurden.

Es wurden daher aus der Vielzahl der unbekanntenen Proteine des *B. henselae*-Proteoms einige Proteine ausgewählt, die (i) möglichst gut über das gesamte Muster verteilt sind, (ii) unter allen getesteten Bedingungen auftauchen und (iii) aufgrund ihrer Größe oder Lokalisation in jedem Gel leicht wiederzufinden waren. Diese Proteine wurden, wie unter 2.4.7 beschrieben, ausgestochen und identifiziert.

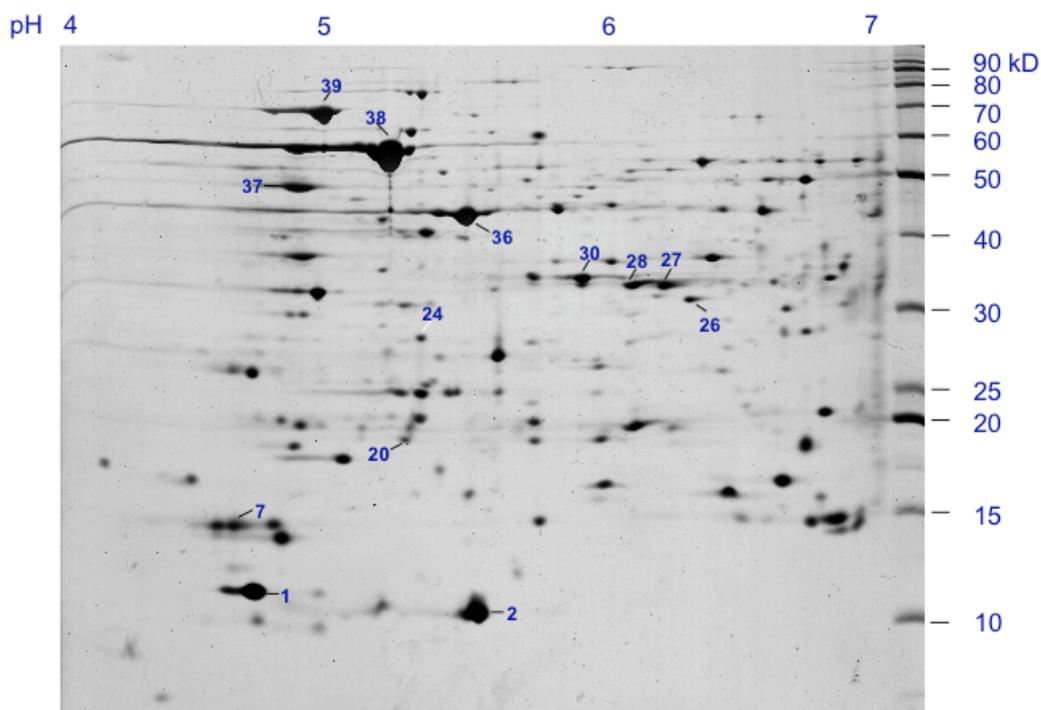


Abb. 10: Proteomkarte von auf Agarplatten kultivierten *B. henselae*, "Ruheproteom".

Tab. 19: Massen- und Sequenzinformationen der analysierten Spots.

Spot	kDa / pI experimentell	kDa / pI theoretisch	MALDI-TOF Massen-homologie (%)	Edman-Sequenz	Sequenz-homologie	Homologes Protein, NCBI access number
1	10,5/ 4,8		Keine Datenbank-übereinstimmung	keine Sequenzen erhalten		Funktion unbekannt
2	10,2 / 5,6	10,4 / 5,4	Keine Datenbank-übereinstimmung	(E)KPQE(G)EV(LIV)A, (A)NI(K)F	100%	10 kD-Chaperonin = GroEs ( <i>Brucella abortus</i> ), P25968
7	13,5 / 4,7		Keine Datenbank-übereinstimmung	YAGAQYIWWK, NNEVTLYDLL, NNEVTLYSLT		Funktion unbekannt
20	18,0 / 5,3	28,1 / 5,0	Keine Datenbank-übereinstimmung	DKEQPIWIR	100%	Pyruvat-Formatlyase aktivierendes Enzym ( <i>Listeria monocytogenes</i> ), T46708
24	28,5 / 5,3	29,9 / 5,4	Keine Datenbank-übereinstimmung	VAGGVSYAQVQAVSST K	100%	Phagenprotein Pap 31 ( <i>B. henselae</i> ), AF001274
26	31,0 / 6,3		Keine Datenbank-übereinstimmung	NQQEVEGNHLTFSHTLK, LL?HLSEVSKP?V		Funktion unbekannt
27	33,0 / 6,2	33,6 / 5,3	6 / 50 (12%)	DTYVGVPPVIGAGGVER	88%	Malatdehydrogenase ( <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> ), O33525
28	33,0 / 6,1		Keine Datenbank-übereinstimmung	DNVLQQLYFK		Funktion unbekannt
30	34,0 / 5,9		Massen stimmen mit Spot 28 überein			Funktion unbekannt
35	41,0 / 5,2	41,5 / 7,0	Keine Datenbank-übereinstimmung	IGIVPASDTGAVEM, VLGGEAAHGMLILSPR, RPGWTEVLK	86%, 94%	Phosphoserin-Aminotransferase ( <i>Methanosarcina barkeri</i> ), P52878
37	48,0 / 4,9	35,9 / 4,8	Keine Datenbank-übereinstimmung	[V(S)G(G)LLEEF(G)]TR, [TIRP(M)(D)](L)P	70% 66%	Pyruvatdehydrogenase ( <i>Rickettsia prow.</i> ), P10515
36	42,0 / 5,2	38,3 / 4,9	17 / 50 (34%)			EF-Tu, Elongationsfaktor ( <i>B. henselae</i> ), AF299079
38	59,0 / 5,2	57,6 / 5,1	61 / 102 (59%)			Hsp60 ( <i>B. henselae</i> ), U78514
39	69,0 / 5,0	67,8 / 4,8	11 / 69 (15%)	[IQASGGLSDADIEK]	100%	DnaK ( <i>Brucella ovis</i> ), P25968
82	28,0 / 5,34	29,9 / 5,4	10 / 43 (23%)			Pap31 (siehe Spot 24)
91	30,0 / 4,2	29,9 / 5,4	29 / 46 (63% Homologie zu Spot 24)			Pap31 (siehe Spot 24)
92	29,5 / 4,4	29,9 / 5,4	15 / 46 (33% Homologie zu Spot 24)			Pap31 (siehe Spot 24)
93	29,0 / 4,6	29,9 / 5,4	32 / 46 (69% Homologie zu Spot 24)			Pap31 (siehe Spot 24)

Aus Proben von mittels French pressure cell hergestellten Membranfraktionen wurden ebenfalls Proteine ausgestochen und identifiziert. Bei allen vier analysierten Spots (82, 91, 92 und 93) handelte es sich um das Phagenprotein Pap31 (siehe Abb. 11).

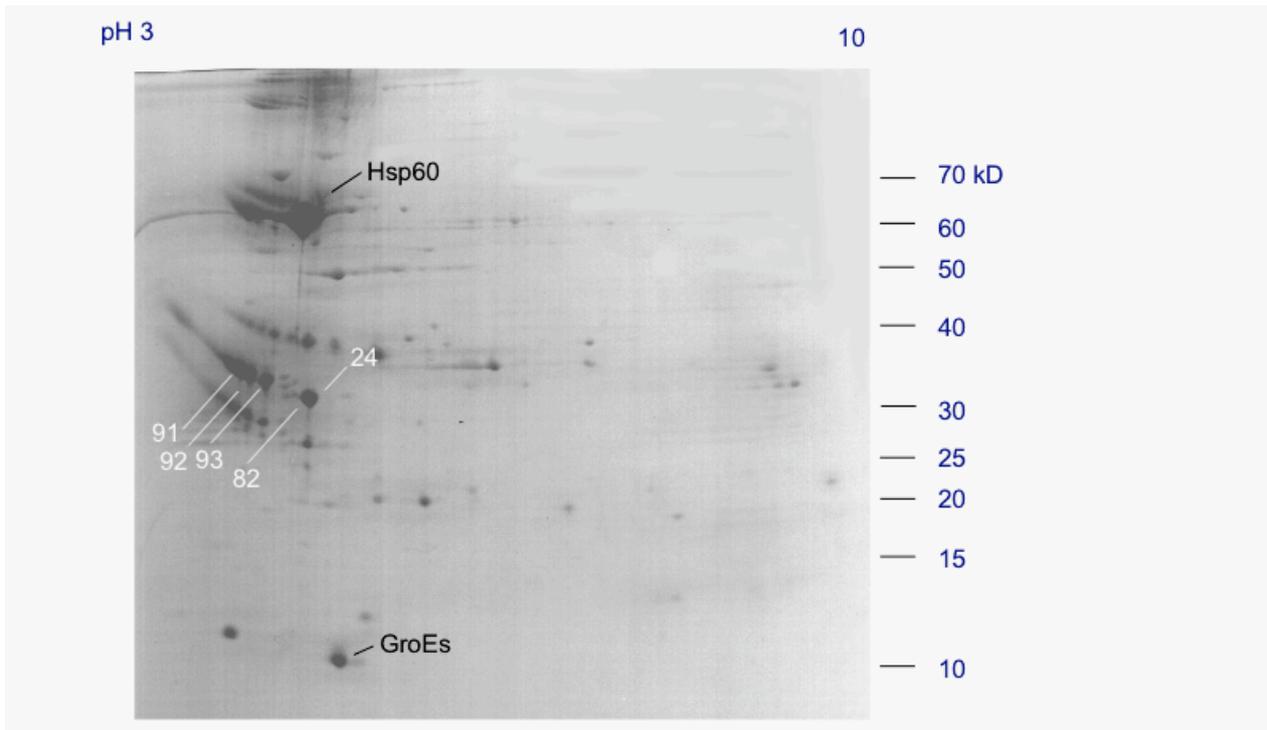


Abb. 11: Membranfraktion von mit French pressure cell präpariertem *B. henselae*-Ruheproteom (300 µg, pH 3-10, Coomassie-Färbung). Spots 82, 91, 92 und 93 zeigten hohe Massenhomologie zu Pap31 und sind höchstwahrscheinlich Modifikationen des gleichen Proteins.

### 3.3 Identifizierung der Spezifität monoklonaler Antikörper gegen *B. henselae* mittels 2D-Western Blot

Murine monoklonale Antikörper wurden nach Immunisierung von Mäusen mit hitzegetöteten *B. henselae* generiert (V. Kempf, nicht veröffentlicht). Die Hybridome (fusioniert aus murinen Milzzellen und AG-8 Myelomzellen) wurden benutzt, um antikörperhaltige Überstände zu produzieren. Diese Überstände wurden wie folgt eingesetzt.

#### 3.3.1 Testung monoklonaler Antikörper in 1-dimensionalen Western-Blots

Zunächst wurde die Spezifität der Antikörper in 1D-Western Blots getestet. Es konnten für Antikörper von 7 verschiedenen Hybridomazelllinien spezifische Bindungen an *B. henselae*-Proteine gezeigt werden:

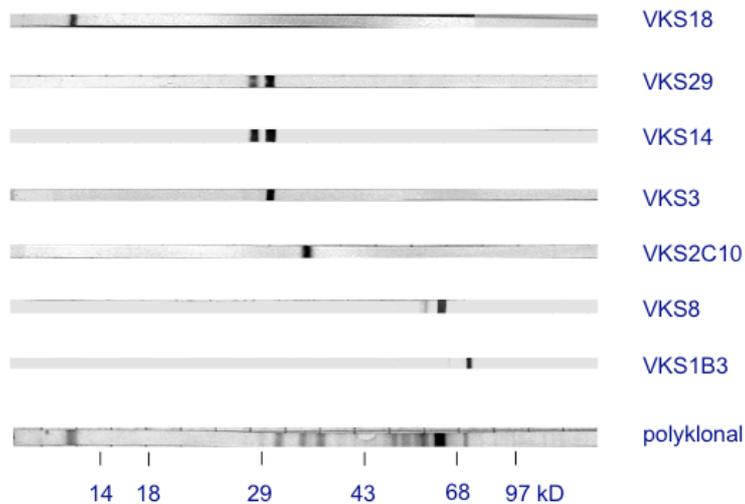


Abb. 12: 1D-Western-Blots von Gesamtzelllysaten von *B. henselae*, inkubiert mit den Antikörpern VKS 18, VKS 29, VKS14, VKS 3, VK2C10, VKS8, VK1B3 und polyklonalem Maus-anti-*B. henselae*-Serum.

Tab. 20: Größe der Proteine, gegen die die monoklonalen Antikörper gerichtet sind.

Antikörper	Größe des Antigens (kD)
VKS18	9
VKS29	27 und 30
VKS 14	27 und 30
VKS3	30
VK2C10	35
VKS8	60
VK1B3	70

### 3.3.2 Testung monoklonaler Antikörper in 2-dimensionalen Western-Blots

In Western Blots von zweidimensionalen Gelen kann zusätzlich zur Größe des Bindungspartners auch dessen isoelektrischer Punkt bestimmt werden. Da in 1D-Gelen häufig mehrere Proteine in einer Bande zu liegen kommen, ist durch die verbesserte Auftrennung bei der 2D-Elektrophorese eine schnelle und spezifische Charakterisierung von Antikörperspezifität möglich. Über die genaue Bestimmung der Koordinaten des Bindeproteins im 2D-Blot kann dieses Protein in einem vergleichbaren Coomassie-gefärbten Gel gefunden und analysiert werden. Auf diese Weise konnten für vier der sieben beschriebenen Antikörper der

Bindungspartner im 2D-Gel bestimmt werden. Drei dieser Bindungsproteine wurden nach Vergleichen mit der Proteinkarte identifiziert. Somit konnte einerseits die Spezifität der Antikörper bestimmt werden. Andererseits wurden drei (in der Maus) immunogen wirkende Proteine von *B. henselae* entdeckt.

Tab. 21: Analyse der Spezifität der monoklonalen Antikörper, bestimmt in 2D-Western Blots.

Antikörper	Anzahl und Größe der Antigene	Spezifität
VKS29	mehrere, 25 bis 35 kD	Pap31 (Phagenprotein)
VK2C10	zwei, 35 kD	Spots 30 und 28 (bisher keine Datenbanktreffer)
VKS8	60 kD	Hsp60 (Hitzestressprotein)
VK1B3	70 kD	DnaK (Hitzestressprotein)

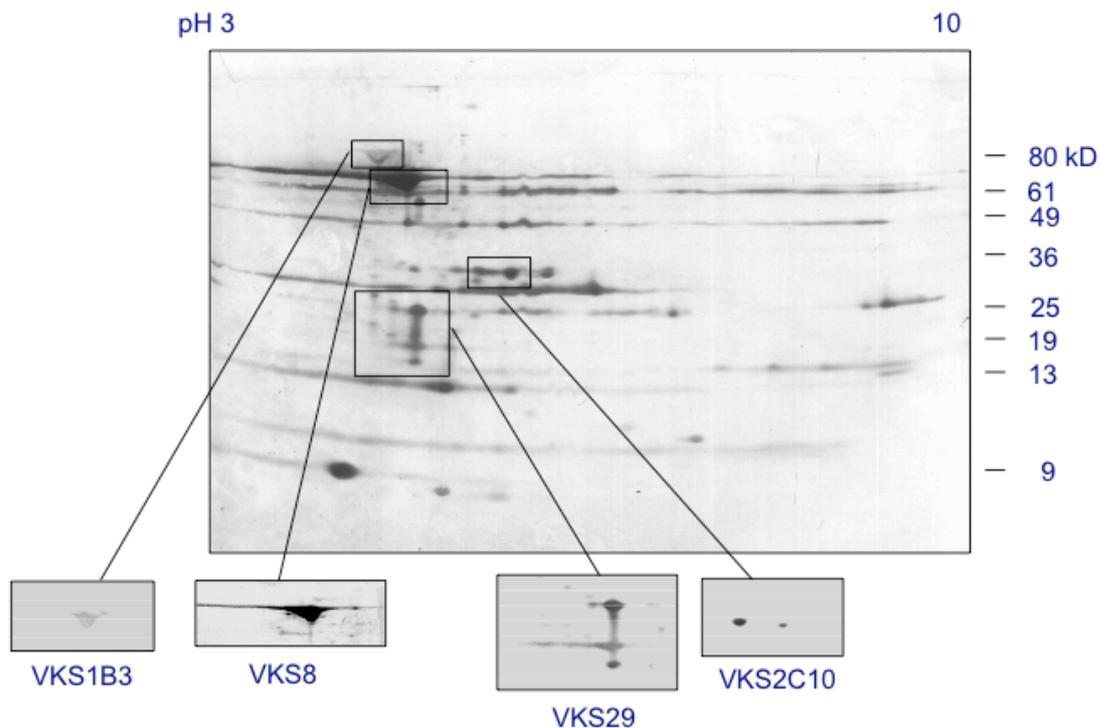


Abb. 13: Großes Bild: Zweidimensionaler Western-Blot von *B. henselae*-Gesamtzelllysaten, entwickelt mit polyklonalem Mäuseserum (Verdünnung 1:200). Kleine Bilder: Ausschnitte aus zweidimensionalen Blots von *B. henselae*-Gesamtzelllysaten, die mit den darunter angegebenen monoklonalen Mäusantikörpern entwickelt wurden (Verdünnung jeweils 1:1.000).

Der Grund dafür, dass die Antikörper VKS3 und VKS18 im zweidimensionalen Blot nicht binden, liegt wahrscheinlich in der unterschiedlichen Proteinaufarbeitung

begründet, da für die eindimensionalen Gele ein wesentlich einfacheres Verfahren (Lyse mit SDS-Puffer, siehe 2.4.1.1.3) zur Proteinpräparation benutzt wurde, bei dem eventuell mehr Proteine strukturell erhalten bleiben, als bei der Präparation für zweidimensionale Gele. Für letztere ist aufgrund der größeren Störanfälligkeit der zweidimensionalen Auftrennung das oben beschriebene, aufwändigere Protokoll (siehe 2.4.1.1.2) zur Probenherstellung notwendig.

Der Antikörper VKS14 zeigte im eindimensionalen Blot exakt das gleiche Bindungsmuster mit Doppelbande wie VKS29 und wurde daher im zweidimensionalen Blot nicht getestet. VKS29 bindet im Blot an eine Reihe von Proteinspots im Bereich zwischen 25 und 35 kD Größe, die alle Degradationen des Phagenproteins Pap31 darstellen (siehe Tabelle 22). Dieser Antikörper ist also spezifisch für Pap31.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass mit 2D-Western-Blots eine sehr effiziente und schnelle Methode zur Ermittlung der Spezifität monoklonaler Antikörper zur Verfügung steht. Zudem können so auch immunogene Proteine identifiziert werden: in dieser Arbeit wurden Pap31, Hsp60 und DnaK von *B. henselae* als immunogen in der Maus beschrieben.

### **3.4 Vergleichende Proteomanalysen**

Alle hier gezeigten Ergebnisse wurden mindestens dreifach reproduziert.

#### **3.4.1 Vergleich von Wildtyp-*B. henselae* mit pilinegativen Spontanmutanten**

*B. henselae* zeigen das Phänomen der Phasenvariation, d.h. nach Passagieren der Bakterien auf Agarplatten wird die Expression der Pili eingestellt (16). Dieser Phänotyp ist nach neuen Erkenntnissen wahrscheinlich mit genetischen Veränderungen assoziiert (82). Die nicht-pilierten Mutanten sind in ihrer Pathogenität deutlich eingeschränkt, weil Wirtszelladhärenz und -invasion reduziert sind (16, 73). Daher wurde hier auf Proteomebene zunächst der Unterschied zwischen Wildtyp-*B. henselae* und den pilinegativen *B. henselae* untersucht.

Die Gesamtzelllysate von *B. henselae* mit und ohne Pili wurden zunächst im eindimensionalen Gel verglichen. Dabei fielen differentielle Banden bei ca. 43 kD

und bei über 220 kD auf, die nur im Proteingemisch der pilierten *B. henselae* gefunden werden konnten.

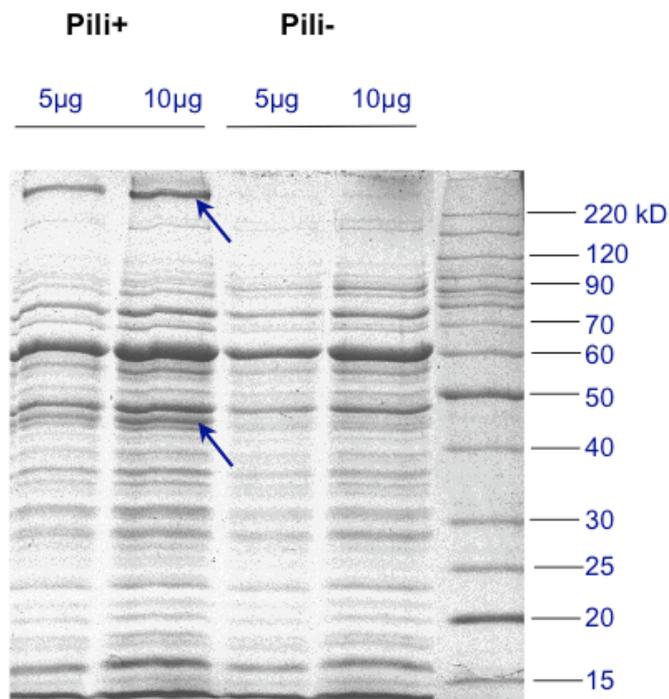


Abb. 14: Eindimensionales SDS-Polyacrylamidgel von *B. henselae*-Gesamtzelllysaten von Wildtyp- und pilinegativen *B. henselae*. Pfeile: Differentielle Banden bei ca. 43 kD und bei 220 kD. Aufgetragene Proteinmengen in µg-Angaben.

In den daraufhin angefertigten zweidimensionalen Gelen fand sich ebenfalls ein differentielles Protein bei 41 kD, das größere 220 kD-Protein kam nicht zur Darstellung. Mögliche Erklärungen hierfür sind, dass (i) sich das hier verwendete Gelsystem nach Schagger und von Jagow besser zur Auftrennung niedermolekularer Proteine eignet und dass sich (ii) Proteine, die größer als 160 kD sind, nur schwer von der ersten zur zweiten Dimension der Elektrophorese überführen lassen (A. Görg, [www.weihenstephan.de/blm/deg/2D-Manual.pdf](http://www.weihenstephan.de/blm/deg/2D-Manual.pdf)).

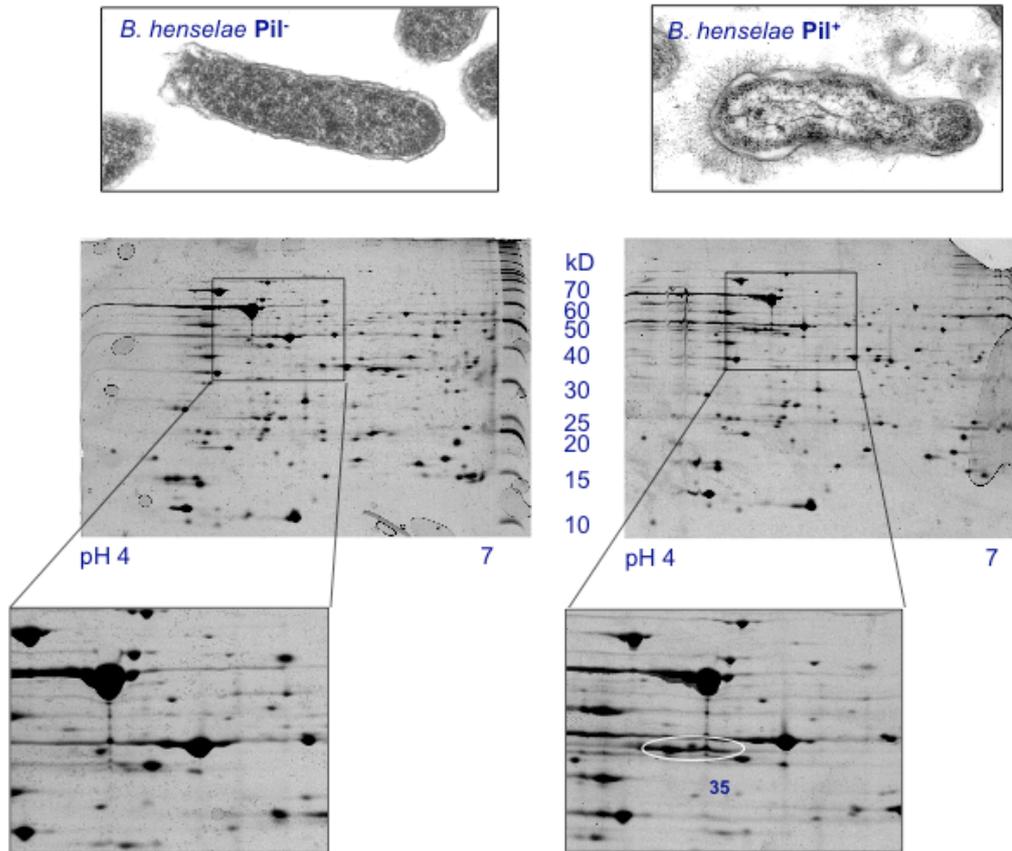


Abb. 15: Oben: Unterschiedliche Morphologie von Wildtyp- und pilnegativen *B. henselae*. Unten: Proteome von Wildtyp- und pilnegativen *B. henselae* mit einem differentiellen Protein (Spot 35) im vergrößerten Ausschnitt.

Die Analyse des 41 kD-Proteins ergab in den Peptidsequenzen hohe Homologie (94%) zur Phosphoserinaminotransferase von *Methanosarcina barkeri* (siehe Tabelle 23).

### 3.4.2 Analyse der Hitzestressantwort von *B. henselae* mittels 2D-Gelelektrophorese

Die Reaktion von Organismen auf veränderte, v. a. erhöhte Temperaturen, ist ein gut untersuchter Regulationsprozess. Um die grundsätzlichen Möglichkeiten von vergleichenden Regulationsstudien auf Proteomebene von *B. henselae* zu testen, wurde hier das Hitzeschockmodell gewählt.

Zunächst wurden eindimensionale SDS-Gele vom Gesamtzellprotein bei 37°C versus bei 44°C kultivierter *B. henselae* angefertigt. Hierbei zeigte sich, dass eine Reihe von Proteinen im Hitzeschock verstärkt exprimiert wird. Besonders deutlich

ist dies bei einer 60 kD großen Bande zu sehen, bei der es sich höchstwahrscheinlich um Hsp60 handelt.

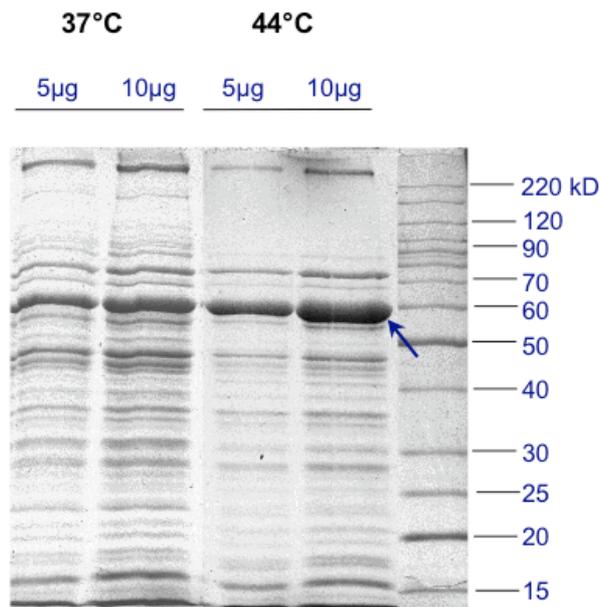


Abb. 16: Eindimensionales SDS-Polyacrylamidgel von Gesamtzelllysaten aus hitzestressierten (44°C) und nicht hitzestressierten (37°C) *B. henselae*, CBB-Färbung. Pfeil: scheinbar heraufreguliertes 60 kD-Protein. Aufgetragene Proteinmengen in µg-Angaben.

Auch in der zweidimensionalen Darstellung wurden diese beiden Konditionen verglichen. Aufgrund der begrenzten Zeit dieser Arbeit wurden silbergefärbte Gele, aber keine coomassiegefärbten Gele hergestellt. Da bei der Silberfärbung die Farbintensität nicht linear mit der Proteinmenge in der Bande oder im Spot korreliert, kann prinzipiell keine definitive quantitative Aussage über das Ausmaß der Herauf- oder Herunterregulation von Proteinen getroffen werden. Nach visueller Auswertung erscheinen die bekannten Hitzeschockproteine (siehe Proteinkarte, Abb. 10) Hsp60 und GroEs in der Hitzeschockgruppe stärker exprimiert, während DnaK in beiden Gruppen in etwa gleicher Menge vorhanden zu sein scheint.

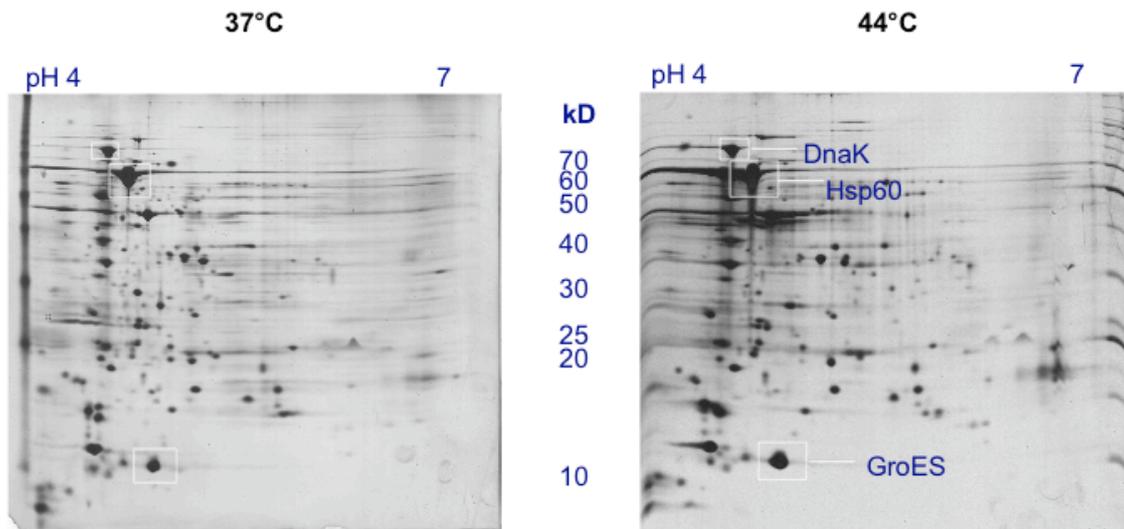


Abb. 17: Zweidimensionales SDS-Polyacrylamidgel von *B. henselae*-Gesamtzelllysaten aus hitzestressen (44°C für 4h) und nicht hitzestressen (37°C) *B. henselae*, Silberfärbung. Hsp60 und GroEs sind scheinbar heraufreguliert, DnaK scheinbar nicht.

Es konnte also gezeigt werden, dass regulative Unterschiede der Proteinexpression von *B. henselae* im Proteomansatz untersucht werden können, für quantitative Analysen wären, wie bereits erwähnt, eine größere Anzahl von Vergleichsgelen in Coomassie-Färbung notwendig.

### 3.4.3 Analyse der Proteinexpression von *B. henselae* in Endothelzellkulturen

*B. henselae* sind fakultativ intrazelluläre Erreger (10). Beim Übergang vom extrazellulären zum intrazellulären Leben, muss sich das Bakterium an eine neue Umgebung anpassen. Es ist daher anzunehmen, dass *B. henselae* bei diesem Prozess in den verschiedenen Stadien der Infektion gewisse Proteine neu synthetisiert, um trotz veränderter Umweltbedingungen überleben zu können. Weil vermutlich Endothelzellen das Habitat von *B. henselae* darstellen (39), wurde durch <sup>35</sup>S-pulse chase-Experimente die Expression von *B. henselae*-Genen nach Infektion von Endothelzellen (HUVECs) untersucht.

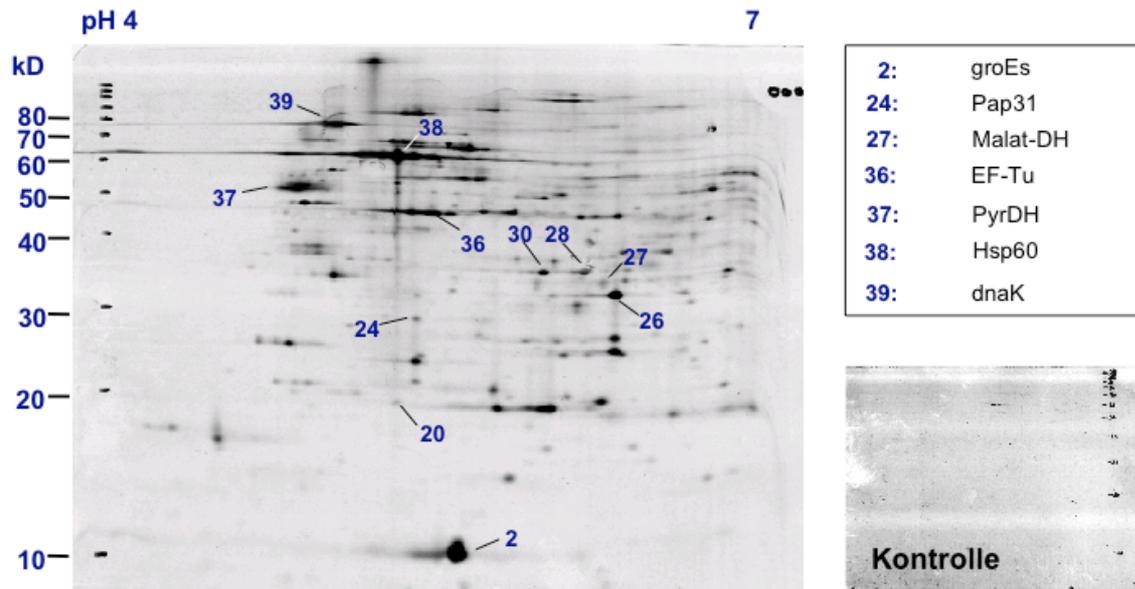


Abb. 18:  $^{35}\text{S}$ -markierte Proteine von *B. henselae* in Kokultur mit HUVEC: Autoradiographie des *B. henselae*-Proteoms, das 18 h nach Infektion von Endothelzellen exprimiert wird. Die angegebenen Proteine konnten durch Vergleich mit der Proteinkarte identifiziert werden (siehe Kasten oben rechts). Der Kontrollfilm auf der rechten Seite stammt von einer Probe uninfizierter HUVEC-Zellen.

In dieser Arbeit wurden *B. henselae*-Proteine 18 h nach Infektion von HUVECs für drei Stunden radioaktiv markiert, um das dabei exprimierte Proteom („Infektionsproteom“) mit dem von auf Platte kultivierten *B. henselae* exprimierten „House-keeping“ Proteom („Ruheproteom“) zu vergleichen. Es wurden daher Vergleiche gezogen zwischen zweidimensionalen Referenzgelen des „Ruheproteoms“ und des „Infektionsproteoms“ von *B. henselae*.

Als Negativkontrolle wurden uninfizierte HUVECs benutzt. Die zellulären Methionin/Cystein-Speicher wurden durch Inkubation mit Methionin-Cystein-freiem Medium entleert. Die eukaryote Proteinbiosynthese wurde mit CHX unterdrückt und schließlich wurde  $^{35}\text{S}$ -markiertes Methionin/Cystein zugesetzt. Die Daten der Kontrollgruppe belegen, dass die eukaryote Proteinbiosynthese suffizient unterdrückt und nur die mitochondriale Proteinexpression (die durch CHX nicht unterdrückt wird) vorhanden war. Wie in der Abbildung erkenntlich, ist diese bei guter Suppression der zellulären Proteinbiosynthese jedoch zu vernachlässigen. Folgende Abbildungen und Tabelle zeigen den Vergleich von 29 ausgewählten Proteinen im „House-keeping Proteom“ und im „Infektionsproteom“.

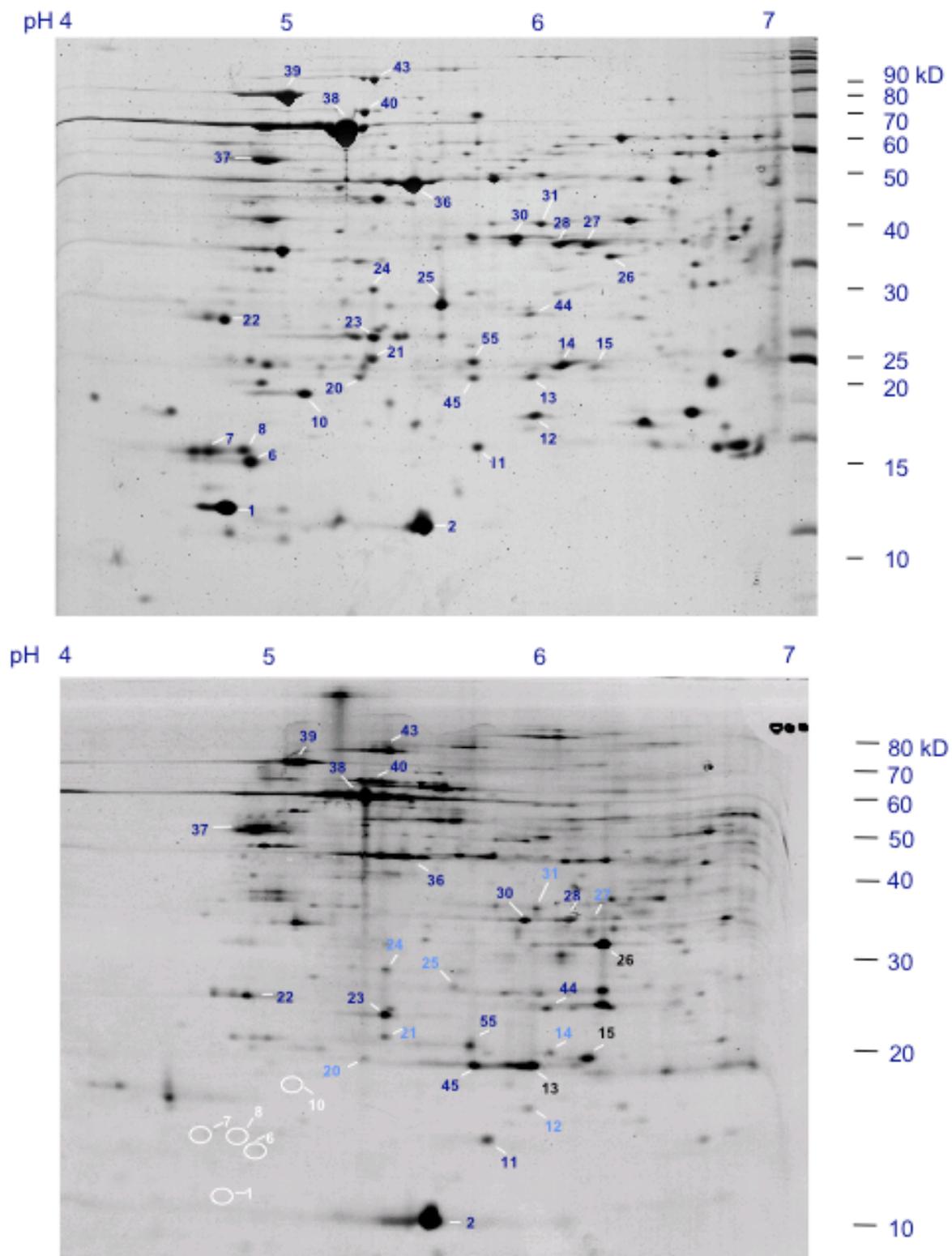


Abb. 19: Radioaktiv markiertes "Infections"- (unten) versus "House-keeping" Proteom (oben) in CBB-Färbung. Von den 29 hier verglichenen Proteinen fehlen in der Infektion fünf völlig (durch weiße Kreise veranschaulicht; es handelt sich eventuell um weniger wichtige "house-keeping"-Proteine oder Proteine mit langer Halbwertszeit und niedriger Syntheserate), 3 sind nach visueller Auswertung scheinbar heraufreguliert (schwarze Ziffern; v. a. Protein 26), 8 Proteine sind scheinbar herunterreguliert (hellblaue Ziffern). Die restlichen Proteine sind in beiden Gruppen etwa gleich stark exprimiert.

Tab. 24: Vergleich von ausgewählten Proteinen des Infektions- und "House-keeping" Proteoms.

Protein-Nr. :	Funktion des Proteins	"Infektionsproteom" verglichen mit "Ruheproteom"
1	Funktion unbekannt	fehlt
2	GroES (Hitzeschock)	~ <sup>a</sup>
6	keine Sequenz	fehlt
7	Funktion unbekannt	fehlt
8	keine Sequenz	fehlt
10	keine Sequenz	fehlt
11	keine Sequenz	~
12	keine Sequenz	- <sup>c</sup>
13	keine Sequenz	+ <sup>b</sup>
14	keine Sequenz	-
15	keine Sequenz	+
20	Funktion unbekannt	-
21	keine Sequenz	-
22	keine Sequenz	~
23	keine Sequenz	~
24	Pap31 (Phagenprotein)	-
25	keine Sequenz	-
26	Funktion unbekannt	+++
27	Malatdehydrogenase	(-)
28	Funktion unbekannt	(+)
30	Funktion unbekannt	-
31	keine Sequenz	-
36	EF-Tu (Elongationsfaktor)	~
37	Pyruvat-Dehydrogenase	~
38	Hsp60 (Hitzeschock)	~
39	DnaK (Hitzeschock)	~
40	keine Sequenz	~
43	keine Sequenz	~
44	keine Sequenz	-
45	keine Sequenz	~
55	keine Sequenz	~

a: ~: Expression ungefähr gleich stark wie im Ruheproteom,

b: +: scheinbar stärkere Expression während der Infektion als im Ruheproteom

c: -: scheinbar schwächere Expression während der Infektion als im Ruheproteom

Hier wurden nur die Ergebnisse des Vergleichs vom „Infektionsproteom“ zum „Ruheproteom“ dargestellt. Interessant sind natürlich auch die Proteine, die nur in der radioaktiv markierten Probe vorhanden sind, also während der Infektion neu synthetisiert werden. Diese Proteine konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden, weil die Proteinmengen in den aus Zellkulturen gewonnenen Proben zu gering waren. Deshalb müssen diese neu synthetisierten Proteine in weiterführenden Studien untersucht werden.

### 3.5 Reverse Genetik am Beispiel der Phosphoserinaminotransferase von *B. henselae*

In dieser Arbeit sollte die Möglichkeit der reversen Genetik bei *B. henselae* ausgelotet werden. Daher wurde ein Protein ausgewählt, an dem exemplarisch das Procedere etabliert wurde.

#### 3.5.1 Konstruktion der Primer

Zunächst wurde eine so genannte Codon-usage-Tabelle mit dem von *B. henselae* bevorzugten Gebrauch bestimmter Codons für die Codierung von Aminosäuren erstellt. Als Grundlage hierfür wurden folgende Proteine aus der NCBI-Datenbank verwendet (insgesamt 18.700 Basenpaare):

Tab. 25: Der Codon-usage-Tabelle zugrunde liegende Gene/Genprodukte von *B. henselae*.

Gen/Genprodukt:	NCBI accession number:
Citrat synthase	AAG43955
Elongationsfaktor-tu	AAG24621
RNA-Polymerase alpha-Untereinheit	AAG00506
17kD Antigen-like Protein	AAF26362
VirB4	AAD48921
VirB3	AAD48920
VirB2	AAD48919
RNA-Polymerase beta-Untereinheit	AAF87049
VirB11 Homolog	AAF00949
VirB10 Homolog	AAF00948
VirB9 Homolog	AAF00947
VirB8 Homolog	AAF00946
VirB6 Homolog	AAF00944
Omp43	AAF27661
FtsZ (Zellteilungsprotein)	AAD41957
FhaB (Hämagglutinin-Vorläufer)	AAF25587
FhaA (Hämagglutinin-Vorläufer)	AAF25586
GroEL	O33963

Mithilfe des CGC-Programmes (41) konnte erstmals eine Codon-usage-Tabelle für *B. henselae* erstellt werden:

Tab. 26: Codon-usage-Tabelle von *B. henselae*.

Aminosäure	Codon	Verwendung dieses Codons (%)	Aminosäure	Codon	Verwendung dieses Codons (%)	
Glycin	GGT	41	Asparagin	AAT	73	
	GGA	25		AAC	27	
	GGC	20	Methionin	ATG	100	
	GGG	14		Isoleucin	ATT	63
Glutamin	GAA	73		ATC	25	
	GAG	27		ATA	12	
Aspartat	GAT	83	Threonin	ACA	40	
	GAC	17			ACC	24
Valin	GTT	57		ACG	20	
	GTG	15		ACT	16	
	GTC	14	Tryptophan	TGG	100	
	GTA	13		Cystein	TGT	65
Alanin	GCT	34		TGC	35	
	GCA	32	Tyrosin	TAT	78	
	GCG	18			TAC	22
	GCC	16	Leucin	CTT	30	
Arginin	CGT	46			TTA	26
	CGC	24			TTG	18
	CGA	9			CTG	10
	AGA	9		CTC	10	
	CGG	7		CTA	5	
	AGG	5	Phenylalanin	TTT	83	
Serin	TCT	27			TTC	17
	TCA	24	Glutamin	CAA	75	
	AGT	17			CAG	25
	TCC	12	Histidin	CAT	77	
	AGC	11			CAC	23
	TCG	9	Prolin	CCA	37	
	Lysin	AAA		73		CCT
AAG		27			CCC	18
					CCG	10

Hierauf wurden aus drei Peptidsequenzen aus dem Protein 35 drei Primerpaare für das dazugehörige Gen konstruiert. Dieses Protein wurde gewählt, weil es differentiell nur in den Proteomen von Wildtyp-*B. henselae*, nicht in den pilinegativen Phasenvarianten vorhanden ist. Zudem schien das Ergebnis der Datenbanksuche, die auf den Peptidsequenzen allein basiert, schwer erklärbar, denn es war eine hohe Homologie zu einem Stoffwechsellzym, der Phosphoserinaminotransferase von *Methanosarcina barkeri*, zu finden. Da *M. barkeri* zu den Archebakterien gehört, also phylogenetisch sehr weit von *B. henselae* entfernt ist, wurde diskutiert, dass es sich trotz hoher Homologie der Peptidfragmente möglicherweise um ein anderes Protein handeln könnte. Die Primer wurden so gewählt, dass die Anlagerungstemperaturen aller drei Primerpaare ungefähr gleich hoch lagen, um eine Amplifikation unter den gleichen Bedingungen zu ermöglichen.

Tab. 27: Primer Design für Spot 35. In der jeweils ersten, fett gedruckten Zeile finden sich die Aminosäuresequenzen, in der zweiten Zeile die Basenfolge der daraus konstruierten 5'-3'-forward-Primer, in der dritten Zeile die dazu komplementären 3'-5'-reverse-Primer; N: universelles Wobble, d.h. jede Base wurde an dieser Stelle verwendet, Y: bindet an A oder G, R: bindet an C oder T; die Positivkontrollen sind Teilstücke aus den in der Referenz beschriebenen Primern für das *virB3*-Gen von *B. henselae*.

Primer- Nummer	Peptidsequenz und abgeleitete Primer								Anlagerungs- temperatur
	S	D	T	G	A	V	E	M	
<b>T59</b>									
<b>1</b>	TCN	GAY	ACN	CGN	GCN	GTN	GAR	ATG	60°C
<b>2</b>	CAT	YTC	NAC	NGC	NCG	NGT	RTC	NAG	
<b>T31</b>									
<b>3</b>	GN	GGN	GAR	GCN	GCN	CAY	GGN	ATG	61°C
<b>4</b>	CAT	NCC	RTG	NGC	NGC	YTC	NCC	NC	
<b>T40</b>									
<b>5</b>	CGN	CCN	GGN	TGG	ACN	GAR	GTN	CT	61°C
<b>6</b>	AG	NAC	YTC	NGT	CCA	NCC	NGG	NCG	
<b>Positivkontrolle (<i>B. henselae</i>, <i>virB3</i> (131))</b>									
<b>VB3F</b>	CTA	GAA	GCT	TCC	GCT	CTG	G		
<b>VB3R</b>	CCG	TGG	CGT	ATG	TAG	GGA	A		

### 3.5.2 Ergebnis der PCR des Phosphoserinaminotransferase-Gens mit abgeleiteten Primern

Wie unter 2.5 beschrieben, wurden mit den Primern PCRs an genomischer DNA von *B. henselae* durchgeführt. Nachdem die Aminosäuresequenzen, die der Primerkonstruktion zugrunde lagen, aus unbekanntenen Stellen des Proteins stammen (es wurde nicht vom N-Terminus der Proteine, sondern einzelne Peptide nach tryptischem Verdau sequenziert), wurden die Primerpaarkombinationen so permutiert (siehe Bildunterschrift Abb. 20), dass es bei allen möglichen Reihenfolgen der Teilstücke im Protein und im Genom zu sinnvollen Produkten kommen sollte. Folgende Abbildung zeigt die elektrophoretische Auftrennung der dabei entstandenen Produkte im Agarosegel:

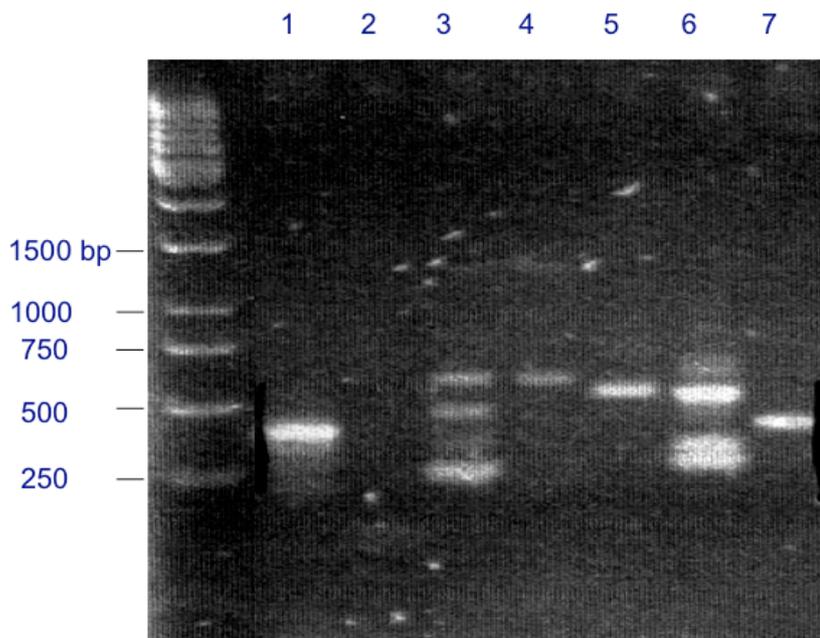


Abb. 20: Agarosegel, Amplifikation mit revers konstruierten Primern. Größenmarker: GeneRuler 1kb DNA Ladder; Spur 1: Primer 1 und 4 (siehe Primertabelle); Spur 2: Primer 1 und 6; Spur 3: Primer 3 und 2; Spur 4: Primer 3 und 6; Spur 5: Primer 5 und 2; Spur 6: Primer 5 und 4; Spur 7: Vorwärts- und Rückwärtsprimer der Positivkontrolle.

In der 1. und 5. Spur kamen nach Touch-down-PCR (siehe Tabelle 28, Abschnitt 2.5.3) spezifische Einzelbanden zur Darstellung, in Spur 1 ein ca. 330 bp langes, in Spur 5 ein ca. 600 bp langes Produkt. Die Primerkombination aus Spur 2 erbrachte kein Produkt, in den Spuren 3, 4 und 6 waren mehrere Banden zu sehen, was auf unspezifische Primerbindung schließen lässt. Daher wurde aus den Ansätzen 1

und 5 die PCR-Produkte aus dem Agarosegel eluiert (QUIAquick PCR Purification Kit, Quiagen) und mit den Primern 1 und 5 sequenziert (Firma MWG Biotech).

### 3.5.3 Sequenzierungsergebnisse der PCR-Produkte

Die genomischen Sequenzen wurden im Elektropherogramm auf ihre Richtigkeit überprüft und mithilfe des Softwareprogramms DNAMAN (Lynnon Biosoft, Quebec, Kanada) in den drei verschiedenen Leserastern in Aminosäuresequenzen translatiert:

#### 1. Sequenz 1 (365 bp):

```
TCTATGGTCTTTATTAGGTGAACGTGGTGTGCGATATGGCAGCGTGGGAAAGCTTTGGTTCAGGGTGGATTACAGA
TG TAGTTGAGAAATTA AACTTTCTGATGTGCGTCGTTTTGAAGCTCCTTATGGAGAACTGCCGGATTTAACACAA
ATAGATTTTGATCGTGATGTTGTTTTTACATGGAATGGGACAACCTCCGGTGTGCGTATTCTTAACGCAGATTTTAT
TCCAGAGAGGCGTGCAGGATTGACAATTTGTGATGCAACATCAGCAGCTTTTGCGAAAATCTTGATTTTTCAAAA
TTAGATGTTTTACTTTTTTTCATGGCAAAAAGTTTTGGGAGGCGAGGCCGCCCGGGCATGA
```

Translationen von Sequenz 1 (die Stopcodons sind mit \* bezeichnet):

- Leserahmen 1:
 

```
SMVFIR*TWC RYGSVGLWF RVDYRCS*EI KTF*CASF*S SLWRTAGFNT NRF*S*CCFY
MEWDNFRCA Y S*RRFHSREA CRIDNL* CNI SSFCAKS*FF KIRCCYFFMA KSFGRRRRPG H
```
- Leserahmen 2:
 

```
LWLLGERGV DMAAWESFGS GWITDVVEKL KLSVRRFEA PYGELPDLTQ IDFDRDVVFT
WNGTTSVRI PNADFIPERR AGLTICDATS AAFAQNDFS KLDVVTFSWQ KVLGGEAAPG M
```
- Leserahmen 3:
 

```
YGLY*VNVVS IWQRGKALVQ GGLQM*LRN* NFLMCVVLKL LMENCRI*HK *ILIVMLFLH
GMGQLPVCVF LTQISFQRGV QD*QFVMQHQ QLLRKILIFQ N*MLLLFHGK KFWEARPPRA *
```

#### 2. Sequenz 5 (500 bp):

```
TTCCATTGGAAGCCTGCACTTATACCGATNTCCTGCTTTGCTTATGCATTCATAAATTCATGCAAACCTCACTCATACG
TGAATCCATATCTTCAGGGGAAAATAGACTGGTTTCCAACCACATTTTGTCAAGGCTTGTGGGTCATCGCTTTAT
CGGCACCTGGTTTTTCCCACAATGCTAAAGTAGATGGAGGTGGTTGATTAAGACATCCAGCTATAGTTAAGACAA
CTATACAGCTTAATAGTTTCAAGATTTTTTTCATTTTTTCCCCTCTTTGAATGGATTTCTTTTTAATGCAATGGCTTGAA
AGCCTGTTGATTTTTCTGCCACCGCTGTTTCAAACAACGGTGAACAATATTGAGATGGTGGATGAAGAGAACAAT
CCCACACAAGCATGGGAACACATGAATGTGGGGACAGCAATATTTAAGGATAGCATTATATTGTTCTGGATGCT
TTTTACAAAAGGGCTGTTTAAGCGCTTNTAGACACCCG
```

Translationen von Sequenz 5 :

- Leserahmen 1:
 

```
FHWKPALIPX SCFAYAFINS CKLHT*IH I FRGKIDWFPT TFCQGLLGHR FIGTWFFPQC *SRWRWLIKT
SSYS*DNYTA **FQDFHFF PSLNGFLFNA MA*KPVDIFC HRCFKQR*TI LRWWMKRTIP HKHGNT*MWG
```

QQYLRIAFIL FWMLFTKRAV \*ALXDT

- Leserahmen 2:

SIGSLHLYRX PALLMHS\*IH ANSLIRESIS SGEK\*TGFQP HFVKACWVIA LSAPGFSHNA  
 KVDGGG\*LRH PAIVKTTIQL NSFKIFFIFS PL\*MDFFLMQ WLESLLIFSA TAVSNNGEQY  
 \*DGG\*REQSH TSMGTHECGD SNI\*G\*HSYC SGCFLQKGLF KRX\*TP

- Leserahmen 3:

PLEACTYTDX LLCLCIHKFM QTHSYVNPYL QGKNRLVSNH ILSRLVGSSL YRHLVFPTML K\*MEVVD\*DI  
 QL\*LRQLYSL IVSRFFSFFP LFEWISF\*CN GLKAC\*YFLP PLFQTTVNNI EMVDEENNPT QAWEHMNVGT  
 AIFKDSIHIV LDAFYKKGCL SAXRHP

Sowohl die Genomsequenzen als auch die Aminosäuresequenzen dienten als Grundlage für eine Datenbanksuche nach dem zugrunde liegenden Protein von Spot 35.

Bei den Gensequenzen konnte eine 84%ige Identität zum für die Phosphoserinaminotransferase codierenden Gen „serC“ von *Rhizobium loti* festgestellt werden. Damit bestätigten sich also die Befunde aus den Analysen der Aminosäuresequenzen (86 bzw. 94 % Identität zur Phosphoserinaminotransferase von *M. barkeri*). Warum die Phosphoserinaminotransferase als Stoffwechsellenzym, das sowohl bei der Biosynthese von Serin (phosphorylierter Stoffwechselweg), als auch von Vitamin B6 (Pyridoxin) benötigt wird, in den piliierten Wildtypen so viel stärker exprimiert wird, ist im Moment unklar.

## 4. Diskussion

*Bartonella henselae* verursacht verschiedenartige Krankheitsbilder wie die bazilläre Angiomatose (BA), bazilläre Peliosis (BP) und die Katzenkratzkrankheit (KKK). Die Seroprävalenz von *B. henselae*-Antikörpern in der Bevölkerung ist hoch und die geschätzten Kosten, die durch die von diesem Erreger verursachten Erkrankungen entstehen sind beträchtlich (allein in den USA 12 Millionen US-Dollar pro Jahr bei KKK (65)). Zudem betreffen die Krankheitsbilder BA und BP v. a. immunsupprimierte Patienten, deren Zahlen durch längere Überlebensraten bei Krebserkrankungen und HIV-Infektionen stetig steigen (17, 95).

Trotz intensiver Untersuchungen von *B. henselae* ist der derzeitige Wissensstand, die Genetik und die Pathogenität dieses Erregers betreffend, noch sehr unvollständig.

Im Dezember 2001, zum Ende des experimentellen Teils dieser Arbeit, waren in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information der National Institutes of Health ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) 31 teils komplette, teils partielle Gene von *B. henselae* zu finden. Unter diesen befanden sich Gene für ribosomale Proteine, Stoffwechsel- und Zellteilungsproteine, zwei Hitzestressproteine, das gesamte *virB*-Operon (das für einen Typ IV-Sekretionsapparat kodiert) und sechs Gene, die mit Pathogenität in Verbindung gebracht wurden.

Unbekannt waren bis dato Gene, die für klassische Pathogenitätsfaktoren wie z. B. Adhäsine oder Pili kodieren, obwohl die Existenz so genannter Pili bei *B. henselae* bekannt ist und diese auch nachgewiesenermaßen die Adhäsion an und Invasion von Wirtszellen fördern (16). *B. henselae* löst in menschlichen Zellen die Bildung von VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) (73) und damit höchstwahrscheinlich Endothelzellproliferationen (bazilläre Angiomasen, Peliosen) aus. Weitgehend ungeklärt ist aber die Frage, durch welche Mechanismen (bakterielle Pathogenitätsfaktoren, Wirtszell-Signaltransduktion) es zu diesem, für eine bakterielle Infektion einzigartigen Tumorwachstum kommt.

Die Ursache für diese mangelhafte Datenlage liegt vor allem in der Tatsache begründet, dass *B. henselae* ein sehr langsam wachsender und in der Kultur anspruchsvoller Organismus ist und dass demzufolge genetische Manipulationen nach wie vor schwierig sind.

### **4.1 Proteomik: Vorteile und Limitationen der Methode bei *B. henselae***

Nachdem der genetische Ansatz bei der Erforschung von *B. henselae* bisher nur begrenzten Einblick in Eigenschaften und Pathogenitätsstrategien dieses Erregers geboten hat, liegt es nahe, den Organismus auf Proteinebene zu untersuchen.

Das Proteom, ein von Marc Wilkins (152) geprägter Begriff bezeichnet die Gesamtheit aller Proteine, die in einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt unter bestimmten Bedingungen in bestimmten Konzentrationen vorhanden sind. Im Gegensatz zur Analyse des Genoms erhält man durch Analyse des Proteoms Aufschlüsse über den Zustand von Zellen oder Mikroorganismen unter bestimmten äußeren Bedingungen, da immer nur ein Teil des Genoms benötigt und das entsprechende Proteom exprimiert wird. Die Proteomik kann also gegenüber den eher statischen Aussagen der Genanalyse dynamische Prozesse in Organismen beschreiben.

Es ist zudem längst klar, dass es ein Irrglaube ist, „dass die Rätsel der Zellfunktion mit genetischen Informationen allein gelöst werden können“ (102). Die Organisation der Zelle ist kein Abbild der Organisation des Genoms vielmehr sind die „meisten Komponenten von Regelkreisläufen auf Proteinebene zu finden“ (102).

Durch den Vergleich von Proteomen ein und derselben Zellart bzw. desselben Mikroorganismus, die unter verschiedenen Bedingungen exprimiert wurden, ist es möglich, auf einmal ein ganzes Set potentiell interessanter, pathogenetisch relevanter, differentieller Proteine zu finden. So kann zum Beispiel durch Vergleich der Proteome von maligne entarteten mit gesunden Zellen der gleichen Art oder von antibiotikaresistenten mit antibiotikaempfindlichen Mikroorganismen ein Überblick über die quantitativen und qualitativen Veränderungen der Proteinzusammensetzung in diesen verschiedenen Zuständen gewonnen werden. Neben den eben beschriebenen zellulären Änderungen bei Antibiotikaresistenzen interessieren in der Mikrobiologie vor allem das Auffinden von Pathogenitätsfaktoren und immunogenen Proteinen. Neben der Verbesserung des grundlegenden Verständnisses von zellulären Vorgängen in gesunden und infizierten Wirtszellen sowie im pathogenen Mikroorganismus ist auch das

Auffinden neuer Therapiestrategien von großem Interesse. Die meisten therapeutischen „targets“, also Zielmoleküle, sind Proteine (102).

Auch im Durchsatz unterscheidet sich die Proteomik von anderen Methoden: Mit der zweidimensionalen Proteinelektrophorese, dem derzeit effektivsten Verfahren zur Auftrennung komplexer Proteingemische (52) können bis zu 1400 Proteine in einem Ansatz aufgetrennt werden (151). In Kombination mit der Massenspektroskopie und stetig wachsenden Datenbanken ist die Proteomik zu einer Methode geworden, mit der in einzelnen Experimenten so umfassende Datenmengen generiert werden können, die nur noch in Sequenzierungsprojekten und DNA- oder mRNA-Array-Versuchen übertroffen werden können.

Automatisiertes Sequenzieren und die Vorhersage von exprimierbaren Genen sind aber unter Umständen mit erheblichen Fehlerraten behaftet, wie am Beispiel von *Mycoplasma genitalium* gezeigt wurde: die theoretische Vorhersage von offenen Leserastern war in 8% der Fälle falsch (26). mRNA-Arrays hingegen sind von der Qualität der Aussage mit der Proteomik vergleichbar: Da die mRNA als Matrize für die Proteinsynthese dient, lässt die Zusammensetzung der unter bestimmten Bedingungen transkribierten mRNA prinzipiell die gleichen Rückschlüsse auf den Zustand von Zellen zu wie die Proteomzusammensetzung. Proteinmenge und zugehörige mRNA-Menge korrelieren aber schlecht (Korrelationskoeffizient 0,48 (9)). Daher ist für eine Untersuchung von quantitativen Veränderungen von Proteinen nur die Proteomik geeignet.

Die Proteomik, bzw. 2D-Elektrophorese in Kombination mit massenspektrometrischen Verfahren, ist derzeit die einzige Methode mit deren Hilfe auch posttranslationale Veränderungen an Proteinen festgestellt werden können. Diese beeinflussen ganz entscheidend Funktion und Lokalisation von Proteinen. So werden sezernierte Proteine häufig glykosiliert. Am Amino-Ende acetylierte Proteine werden weniger schnell abgebaut und Phosphorylierung dient oft zum Ab- oder Anschalten bestimmter Proteinfunktionen. Diese „Feinschliffmechanismen“(142) können nun durch die Proteomik untersucht werden.

Selbstverständlich sind auch die Möglichkeiten der Proteomik limitiert: Aufgrund technischer Begebenheiten und methodischer Unschärfe kann „niemals ein komplettes Proteinexpressionsprofil erfasst“ werden (148). Durch den pH-

Gradienten, der bei der ersten Dimension vorgegeben ist und der höchstens 8 pH-Stufen umfasst, erscheinen Proteine mit niedrigerem oder höherem pH nicht auf dem 2D-Gel. Ebenso ist auch bei der Größenverteilung nur ein Ausschnitt der Proteingesamtheit zu sehen, bei 12% Polyacrylamid-Gelen z.B. nur Proteine mit Molekulargewichten zwischen ca. 10 und 140 kD. Ein weiteres Problem stellt die Löslichkeit dar. Sehr hydrophobe oder basische Proteine sind immer noch nicht im gleichen Ansatz mit dem Rest des Proteoms auftrennbar (102), sondern müssen in besonderen Extraktionsschritten angereichert werden (55, 96).

Proteine, die nur in geringen Mengen vorhanden sind, können ebenfalls sehr schwer dargestellt werden (60). Um sie nach der Auftrennung sichtbar machen zu können, müssen sehr große Mengen des Proteingemisches aufgetragen werden. Selbst mit den größten derzeit üblichen Gelen können nur bis zu 15 mg Protein insgesamt (21) aufgetrennt werden. Das Gel muss dann mit einer sensitiven Methode gefärbt werden, um auch die „seltenen“ Proteine detektieren zu können. Je sensitiver aber die Färbemethode, desto größer wird auch der Radius der gefärbten Proteine und so wird es wahrscheinlicher, dass niedrig konzentrierte Proteine von dem unter diesen Bedingungen großen Radius hochkonzentrierter Proteine verdeckt werden.

Zudem wird das Verfahren auch durch die Nachweisgrenzen der verschiedenen Identifikationsmethoden (mit MALDI-TOF können 10-100 fmol Protein nachgewiesen werden) eingeschränkt. Teilweise gelingt es zwar noch, die Proteine sichtbar zu machen, aber nicht mehr, sie direkt zu identifizieren (z. B. bei der Pulse-Chase-Methode). Durch all diese Einschränkungen erklärt es sich auch, dass z. B. bei der Hefe mit der zweidimensionalen Elektrophorese auch unter optimalen Bedingungen nur etwa zwei Drittel des exprimierten Proteoms erfasst werden (114).

Nicht zuletzt ist die zweidimensionale Elektrophorese immer noch sehr zeit- und arbeitsintensiv (151). Obwohl einige Arbeitsschritte wie z. B. die Probenherstellung automatisiert werden können, sind andere, z. B. der kritische Übergang von der ersten zur zweiten Dimension, weiterhin nur per Hand durchzuführen (60).

Nichtsdestotrotz ist die Proteomik bei weitem die effektivste und umfassendste Methode zur Analyse von Proteingemischen (102) und bis jetzt ist kein Ersatz für das 2D-Gel in Sicht (30).

*B. henselae* ist ein langsam wachsendes und anspruchsvolles, nur auf hochsupplementiertem Agar oder belebten Medien kultivierbares Bakterium. Der genetische Ansatz ist und bleibt bei diesem Organismus daher schwierig. Die Einführung von Proteomics in die Untersuchung von *B. henselae* war daher notwendig und wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals etabliert. Weitere Vorteile dieser Methode sind (i) die große Menge an Daten pro Versuch (tausende von Proteinen werden in einem 2-D-Gel aufgelöst), (ii) die Anwendbarkeit *in vivo* (mittels <sup>35</sup>S-Pulse chase in *B. henselae*-infizierten Zellkulturen) und (iii) die Möglichkeit, für die Proteinfunktion entscheidende, posttranslationale Veränderungen zu erkennen.

## **4.2 Etablierung einer Methode zur Proteinpräparation bei *B. henselae***

Eine Methode zur Präparation von Proteinen umfasst die Schritte (i) Zellyse, (ii) Inaktivierung und Entfernung störender Substanzen und (iii) Solubilisierung der Proteine. Bei der Solubilisierung müssen die Proteine denaturiert und reduziert werden, um möglichst alle nichtkovalenten Bindungen zwischen Proteinkomplexen oder -aggregaten aufzulösen (62). Da jeder Organismus andere Ansprüche an die Aufschlusstechniken stellt, gibt es keine universell anwendbare Methode (A. Görg: [www.weihenstephan.de/blm/deg/2D-Manual.pdf](http://www.weihenstephan.de/blm/deg/2D-Manual.pdf)). Wie auch heute noch existierten zu Beginn dieser Arbeit keine veröffentlichten Protokolle zur Proteomik von *B. henselae*, weshalb zunächst eine geeignete Aufschlussmethode für diesen Erreger etabliert werden musste.

Zur Lyse von Zellen werden physikalische (Mörser, Ultraschall, osmotischer Schock, Tauen und Einfrieren, French Press) und chemische Verfahren (Detergentien, Enzyme) eingesetzt. Bei *B. henselae* erwies sich der Einsatz von Detergentien (CHAPS) alleine (wie auch in (68) beschrieben) als besonders effektiv, hierbei entstanden die besten Auftrennungsmuster. Außerdem sind bei der hier angewandten Methode der Zellyse direkt im Solubilisierungspuffer nur wenige zusätzliche Arbeitsschritte nötig, die diesen empfindlichen Prozess stören könnten. Bei der ebenfalls getesteten French Press, bei der die Zellen mechanisch durch hohe Drücke aufgebrochen werden, entsteht beispielsweise trotz Kühlung immer Wärme im Druckelement. Zudem müssen bei dieser Methode immer

Proteaseinhibitoren zugesetzt werden, um durch freiwerdende Proteasen zu verhindern. Diese Proteaseinhibitoren können aber ihrerseits wieder Proteine modifizieren und so deren Ladung verändern (44). Die dritte hier geprüfte Aufschlussmethode arbeitet mit dem anionischen Detergens SDS (157) das bei der Auflösung nichtkovalenter Bindungen effektiver ist als das zwitterionische CHAPS (A. Görg: [www.weihenstephan.de/blm/deg/2D-Manual.pdf](http://www.weihenstephan.de/blm/deg/2D-Manual.pdf)). SDS darf aber bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) nur in Konzentrationen von max. 0,25% in der Probe vorhanden sein, weil sonst die native Eigenladung der Proteine, auf der die IEF basiert, verschleiert wird. Daher impliziert eine Präparation der Proteinprobe mit SDS zwingend, dass die Probe danach mit einer entsprechenden Menge an HC oder THC-Puffer verdünnt werden muss, um die SDS-Konzentration zu minimieren. Da hierdurch auch die Konzentration der Proteine sinkt und keine besseren Resultate als mit CHAPS alleine erzielt wurden, wurde diese Methode nicht weiter benutzt.

Zur Inaktivierung störender Inhaltsstoffe stehen Ultrazentrifugation, Proteinfällung, Entsalzungsmethoden, Zusatz von DNase/RNase und Proteinaseinhibitoren zur Verfügung. Proteinase stellen kein wesentliches Problem in der Proteomanalysen von *B. henselae* dar, der Zusatz von Proteinaseinhibitoren (bei Aufschluss durch die French Press) lieferte keine anderen oder umfangreicheren Proteinmuster. Ein größeres Problem stellten Salze und Nukleinsäuren dar. Durch Waschen der Bakterien in Niedrig-Salz-Puffer konnte die Salzkonzentration gesenkt werden, die Ultrazentrifugation (11) eliminierte weitgehend die Artefakte durch Nukleinsäuren und andere große Aggregate (z. B. Membranfragmente). Zudem wurden Proteinfällungen mit Methanol/Chloroform (156) und Aceton getestet (Daten nicht gezeigt), führten jedoch ebenfalls nicht zu einer besseren Proteinauftrennung.

Die Solubilisierung der Proteine erfolgte mit einem nach O'Farrell (99) modifizierten Puffer:

Beibehalten wurde Harnstoff als denaturierendes Chaotrop. Thioharnstoff wurde zugegeben, weil sich gezeigt hatte (106), dass dies die Löslichkeit vieler (v. a. Membran-) Proteine verbessert. Als Detergens diente, wie bereits erwähnt, CHAPS, das sich als effektiver gegen hydrophobe Wechselwirkungen erwiesen hat, als die früher verwendeten nichtionischen Detergentien Triton-X-100 und NP-40 (104).

Tributylphosphin (TBP) schließlich wurde als Reduktionsmittel benutzt, weil es besser als Dithiotreitol Disulfidbrücken bricht (61). Ein anderer Vorteil gegenüber DTT ist, dass der Equilibrierungsvorgang zwischen erster und zweiter Dimension in einem Zug durchgeführt werden kann, weil TBP im Gegensatz zu DTT nicht mit einer späteren Silberfärbung interferiert (62).

### **4.3 Erstellen einer 2-dimensionalen Proteinkarte von *B. henselae***

Ebenso wie die Kartierung von Genomen eine wichtige Grundlage für genetische Untersuchungen aller Art ist, so bildet auch die Proteomkartierung die Grundlage für proteombasierte Studien. Dabei werden aus reproduzierbaren Proteommustern möglichst viele Proteine identifiziert, die dann als sog. „Landmarkenproteine“ eine Orientierung im Proteom ermöglichen. Diese Orientierungspunkte im Proteinmuster können als interne Reproduzierbarkeitskontrolle dienen, sind aber insbesondere in vergleichenden Proteomanalysen von Bedeutung: der Vergleich von Proteomen, die unter verschiedenen Bedingungen exprimiert werden oder von Proteomen aus verschiedenen Zellkomponenten (121) wird durch derartige Eichmarken erst möglich.

Das Erstellen von Proteinkarten ist insbesondere dann mit hohem Durchsatz möglich, wenn das Genom des jeweiligen Organismus vollständig oder weitgehend sequenziert ist, weil dadurch die Analyse der Proteine mittels MALDI-TOF oder anderer massenspektrometrischer Verfahren deutlich vereinfacht wird. Von einigen eukaryoten und prokaryoten Organismen existieren bereits umfangreiche Proteinkarten, die auch öffentlich zugänglich sind (z.B. unter [www.expasy.ch/ch2d/](http://www.expasy.ch/ch2d/) oder [www.ssi.dk/publichealth/tbimmun](http://www.ssi.dk/publichealth/tbimmun)). Das Genom von *B. henselae* wurde erst im Jahr 2004, nach dem Ende des experimentellen Teils dieser Arbeit, komplett veröffentlicht (5), sodass diese hocheffiziente Methode zur Proteinkartenerstellung hier nicht angewandt werden konnte.

In dieser Arbeit wurde das Proteom von unter „Ruhebedingungen“ gewachsenen *B. henselae*, kartiert, d.h. dass die Bakterien unter optimalen Wachstumsbedingungen auf unbelebten Nährmedien kultiviert wurden.

Insgesamt wurden aus diesem „House-keeping Proteom“ 18 Proteine mit Molekulargewichten zwischen 10,5 und 69 kD und isoelektrischen Punkten von 4,6 bis 6,3 analysiert. Die Proteine wurden dabei nach ihrer Verteilung im Proteom (sie

sollten möglichst weit voneinander entfernt liegen, um einen Orientierungszusammenhang im ganzen Proteom herzustellen) und ihrer Konzentration (die Proteine sollten in allen Proben in ausreichender Menge darzustellen sein) ausgewählt (siehe 3.2).

Bei drei der identifizierten Proteine handelt es sich um Stoffwechsellzyme: Die Malat- (Protein 27) und Pyruvat-Dehydrogenase (Protein 37) sind beide direkt oder indirekt am Zitratzyklus bzw. am bakteriellen Glykoxylatzyklus und daher an der Energiegewinnung der Zelle beteiligt. Sie wurden für *B. henselae* erstmalig beschrieben. Das dritte Stoffwechsellzym, die Phosphoserinaminotransferase (Protein 35), ist in seiner Funktion unklar (siehe 4.5). Drei weitere Proteine der Karte gehören zur Familie der Hitzeschockproteine: GroES (Protein 2), GroEL (Protein 38) und DnaK (Protein 39). Letzteres wurde hier erstmalig bei *B. henselae* beschrieben. Die Expression bzw. Überexpression von Proteinen dieser Familie ist eine Reaktion auf ganz unterschiedliche Stressoren wie z.B. Hitze oder pH-Wertänderung (59). Ebenfalls identifiziert werden konnte der Elongationsfaktor EF-Tu (Protein 36), der ein essentieller Faktor in der Translation, also in der Proteinbiosynthese, ist. Bei *S. aureofaciens* konnte mithilfe von proteombasierten Studien gezeigt werden, dass die Menge an EF-Tu der Menge aller neu synthetisierten Proteine (87) proportional ist. EF-Tu kann daher als internes Eichprotein für die Syntheserate von Proteinen verwendet werden.

Interessant ist die starke Expression des Phagenproteins Pap31 auch unter „Ruhebedingungen“. In der Auftrennung der Membranfraktion des *B. henselae*-Proteoms wurden vier weitere Isoformen des Phagenproteins gefunden und man könnte spekulieren, dass noch mehr Spots in dieser Reihe Isoformen des gleichen Proteins darstellen. Das gleiche Auftrennungsmuster dieser Proteine findet sich auch in den Immunoblots mit Anti-Pap31-Antikörper (siehe auch 4.3). Da diese Isoformen im Vergleich zu dem auch im Gesamtproteom auffindbaren Pap31 ein höheres Molekulargewicht und einen niedrigeren *pI* aufweisen, kann es sich bei diesem Phänomen nicht um Degradation handeln, da die Spots in diesem Fall an Größe abnehmen müssten. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten dieser Isoformen sind Modifikationen durch Phosphorylierungen. Da Pap31 schon im „Grundumsatz“ von *B. henselae* in so großer Menge vorhanden ist, scheint es eine wichtige, vielleicht sogar essentielle Rolle im Stoffwechsel des Bakteriums zu spielen. Durch eine Inaktivierung des zugrundeliegenden Gens

könnte die Wichtigkeit des Proteins für *B. henselae* näher untersucht werden. Zur Lokalisation von Pap31 war zum Zeitpunkt dieser Arbeit in der Literatur nichts bekannt, es konnten aber zwei Hinweise gefunden werden: Die schon erwähnte hohe Konzentration des Proteins und seiner Isoformen in der Membranfraktion des *B. henselae*-Proteoms und die Ergebnisse der Immunelektronenmikroskopie mit dem Anti-Pap31-Antikörper (siehe 4.3) deuten auf eine membranassoziierte Lage des Proteins hin. Interessanterweise weist Pap31 eine 58,4%ige Identität mit einem Oberflächenprotein von *B. quintana* auf, das die Fähigkeit hat, Hemin zu binden (28). Diese Vermutungen wurden inzwischen in weiteren Studien bestätigt, in denen gezeigt wurde, dass Pap31 ein heminbindendes, membranassoziiertes Protein darstellt (163).

Insgesamt 7 Proteine waren nicht identifizierbar. Da das Genom von *B. henselae* zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit noch nicht publiziert war, führte die Analyse der Massenspektren des MALDI-TOFs hier zu keinem Ergebnis, weil bereits Veränderungen von einigen Aminosäuren im Vergleich zu Datenbankeinträgen eine Identifikation unmöglich machen. Der Edman-Abbau lieferte bei einem Protein (Spot 1) keine Sequenzen, evtl. waren hier die N-Termini blockiert. Bei den restlichen 6 Proteinen führten auch die erhaltenen Aminosäuresequenzen nicht zur Identifikation. Es ist möglich, dass diese Peptidfragmente wenig konservierte Stellen im Protein darstellen, oder aber, dass das Protein selbst ein seltenes Protein mit wenig Homologien zu Datenbankproteinen ist. Um das herauszufinden, könnte man aus den Aminosäuresequenzen, wie in 2.5 dieser Arbeit beschrieben, revers Primer konstruieren und Teile des Gens amplifizieren, um die Trefferwahrscheinlichkeit über DNA-Datenbankeinträge zu erhöhen.

#### **4.4 Einsatz der Proteomik zur schnellen und akkuraten Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern**

Sieben in unserer Arbeitsgruppe hergestellte murine, gegen *B. henselae* gerichtete monoklonale Antikörper zeigten spezifische Reaktionen im eindimensionalen Immunoblot. Davon reagierten vier auch spezifisch in der zweidimensionalen Auftrennung. In Kombination mit MALDI-TOF und Edman-

Abbau sowie nachfolgender Datenbanksuche konnten die *B. henselae*-Proteine, gegen die diese Antikörper gerichtet sind, identifiziert werden: Zwei Antikörper binden Hitzeschockproteine, VKS8 bindet GroEL (Hsp60), der Antikörper VK1B3 bindet DnaK. Der Antikörper VKS29 bindet an das Phagenprotein Pap31. VKS 14 wurde im zweidimensionalen Blot nicht getestet, da er im eindimensionalen Blot exakt das gleiche Bindungsmuster zeigte, wie VKS29 und daher angenommen wurde, dass er ebenfalls Pap31 bindet. Der vierte im zweidimensionalen Western-Blot bindende Antikörper VK2C10 ist gegen zwei ca. 34 kD große Proteine mit einem pI von ca. 6 gerichtet (Isoformen des gleichen Proteins, wie sich aufgrund der MALDI-Ergebnisse herausstellte). Trotz vorliegender Peptidmassen-Fingerprints und einer 10 Aminosäuren langen Sequenz gelang bisher nicht die Identifizierung des von diesem Antikörper erkannten Proteins. Mithilfe der Sequenz wäre es aber möglich, eine Sonde zu konstruieren und das zugrunde liegende Gen durch Hybridisierung in einer Genbank zu finden. Der Ansatz der reversen Genetik (siehe 2.5) ist hier nicht in der oben beschriebenen Art möglich, da nur eine Aminosäuresequenz vorliegt. Es müsste also für diesen Ansatz entweder noch eine zweite Sequenz für die Konstruktion eines gegenläufigen Primers sequenziert werden oder eine Mischung aus kurzen Nukleotidsequenzen zufälliger Reihenfolge („arbitrary primer“) benutzt werden.

Es stellt sich die Frage, warum zwei der sieben monoklonalen Antikörper im zweidimensionalen Blot nicht gebunden haben. Aufgrund der Störanfälligkeit und auch technischer Besonderheiten der zweidimensionalen Elektrophorese ist schon zur Probenherstellung ein wesentlich komplexeres Verfahren notwendig, als für die hier verwendeten eindimensionalen Gele und Blots, bei denen die ganzen Bakterien in einem SDS-haltigen Puffer aufgekocht wurden. So darf bei der isoelektrischen Fokussierung z. B. kein SDS in der Proteinprobe vorhanden sein, Nukleinsäuren stören und müssen entfernt werden, usw. Es ist daher vorstellbar, dass bei der Probenherstellung für die eindimensionale Elektrophorese mehr Proteine erhalten bleiben als bei der zweidimensionalen Elektrophorese. Die Bindeproteine dieser zwei Antikörper sollten aber mit anderen Mitteln, z. B. durch Immunpräzipitation feststellbar sein.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten neben der Charakterisierung der Antikörper auch vier neue (bei Mäusen) immunogene *B. henselae*-Proteine identifiziert werden. In der Literatur ist der hier durchgeführte

Ansatz zur Charakterisierung monoklonaler Antikörper bis jetzt nicht beschrieben. Umgekehrt wurde aber die zweidimensionale Elektrophorese mit anschließendem Immunoblotting mit bekannten monoklonalen Antikörpern (das heißt, Antikörper, deren Bindungspartner schon bekannt war) bereits zur Detektion immunogener Proteine von Mikroorganismen z.B. bei *Brucella ovis*, eingesetzt (143). Unter diesen fanden sich, wie in unseren Untersuchungen, ebenfalls DnaK, GroEL und die Malatdehydrogenase (MDH). Die Hitzeschockproteine sind bei vielen Mikroorganismen als antigen wirkende Moleküle bekannt (siehe auch unter 4.5) und auch gegen mikrobielle Formen der MDH ist eine Immunreaktion im Versuchstier oder im Menschen nachweisbar. So ist z. B. die MDH von *Malassezia furfur* als Allergen mit der atopischen Dermatitis assoziiert (101).

Die hier charakterisierten Antikörper können nun zu weiteren Studien eingesetzt werden, beispielsweise wären die Antikörper gegen die Hitzeschockproteine in Immunfluoreszenztests als Marker für verschiedene Stresszustände zum Beispiel im Zeitverlauf einer Zellkulturinfektion einsetzbar. Denkbar ist auch eine Verwendung für diagnostische Zwecke, allerdings müsste hierfür noch, wie von Liang und Raoult an *B. quintana* durchgeführt (88), die Speziespezifität getestet und die Klasse der Antikörper bestimmt werden.

Außerdem könnten die monoklonalen Antikörper auf einen möglichen protektiven Effekt untersucht werden: Adoptiver Transfer von Serum *B. grahamii*-infizierter Mäuse auf immunsupprimierte Mäuse führte zur Elimination der Erreger aus dem Blut, ohne diesen Transfer hingegen persistierte die Bakteriämie. Die Antikörper zeigten also einen protektiven Effekt (77). Mit den monoklonalen Antikörpern aus dieser Arbeit könnten auf diese Weise die Auswirkungen einer Blockade einzelner immunogener *B. henselae*-Proteine bei Mäusen getestet und somit eventuell auch Rückschlüsse auf die Rolle dieser Proteine für das Überleben des Bakteriums oder die Pathogenese gezogen werden. Als möglicher Messparameter könnte hierbei, wie in einem Tiermodell beschrieben, der Nachweis von *B. henselae*-DNA in Lebergewebe dienen (110).

Zwischenzeitlich wurde mit dem in dieser Arbeit charakterisierten monoklonalen Antikörper VKS29 die Lokalisation des Proteins Pap31 in der Membran von *B. henselae* aufgedeckt. Des Weiteren wurde in dieser Studie auch die oben

genannte, hier entwickelte Hypothese, dass es sich bei Pap31 um ein heminbindendes Protein handelt, bestätigt (163).

#### **4.5 Validierung der Methode für regulative Studien: Vergleich von Hitzestress- mit Nicht-Hitzestress-Proteomen von *B. henselae***

Prokaryote und auch eukaryote Organismen sind mit einem Satz von Hitzestressproteinen (HSPs) ausgestattet, die ein Überleben auch in Umgebungen mit erhöhter Temperatur oder anderen Formen von Stress (oxidativer Stress, pH-Veränderungen, Nahrungsmangel, Antibiotika bei Mikroorganismen (147)) ermöglichen. Sie dienen im Wesentlichen dazu, als sog. Chaperone ordnungsgemäße Faltung, Aggregation und Sekretion von Proteinen und damit eine normale Zellfunktion sicherzustellen. Außerdem sind mikrobielle Hitzeschockproteine potente Antigene (136), wie auch in dieser Arbeit gezeigt wurde, zwei der hier charakterisierten monoklonalen Antikörper richten sich gegen Hitzestressproteine. Es besteht eine große Ähnlichkeit zwischen bakteriellen HSPs und den humanen Homologen (161). Dies könnte zweierlei mögliche Konsequenzen haben: (i) Eine Reihe von Autoimmunerkrankungen (unter anderem Rheumatoide Arthritis und Systemischer Lupus Erythematodes) wurden in Zusammenhang mit Kreuzreaktionen zwischen bakteriellen und humanen Hitzestressproteinen gebracht (89, 161), (ii) andererseits könnte die große Konserviertheit in dieser Gruppe von Proteinen auch zu „immunologischer Mimikry“ führen, weil bakterielle HSPs nicht gut von den Wirtszell-HSPs unterschieden werden können (78).

*B. henselae* ist sowohl bei der Übertragung vom ektoparasitären Vektor auf den Wirt (Katze oder Mensch), als auch beim Übergang von extra- zu intrazellulärem Leben stark veränderten Umweltbedingungen ausgesetzt, die Stressreaktionen in Bakterien auslösen (59). Da sich die Vorgänge, die sich bei Hitzestress und anderen Formen von Stress in den Zellen abspielen nicht auf einzelne Gene oder Proteine zurückführen lassen, sondern dabei eine ganze Reihe von Proteinen herauf- oder herunterreguliert werden, sollte hier getestet werden, ob sich mit der hier etablierten Methode derartige regulative Veränderungen beobachten lassen.

Wie in 3.4.2 gezeigt, konnte nach vierstündigem Hitzeschock eine deutlich gesteigerte Expression der Hitzestressproteine GroEL und GroES festgestellt

werden. DnaK war scheinbar in der Expression unverändert. Dies deckt sich mit der Beobachtung bei *Borrelia burgdorferi* (35) und anderen gramnegativen Erregern bei denen ebenfalls eine prolongierte Bildung von GroEL nachzuweisen war, während DnaK offensichtlich nur zu Beginn des Hitzeschocks gebildet wird und dessen Konzentration rasch wieder abfällt (57, 90).

DnaK wurde bei *B. henselae* erstmalig aufgrund von Sequenzdaten beschrieben, Haake et al. (59) hatten das Hitzeschockprotein aufgrund seiner Größe (70kD) als mögliches DnaK bezeichnet.

Die hier vorgestellte Methode eignet sich also zur Erforschung regulativer Vorgänge bei *B. henselae*. Für eine eingehende Untersuchung aller beteiligter Hitzestressproteine, quantitative Analysen oder das Erstellen einer Zeitkinetik des Hitzeschocks sind zukünftige Versuche, möglichst mit radioaktiver Markierung von Proteinen (siehe 4.7) zur Erfassung der neu synthetisierten Proteine nötig.

#### **4.6 Untersuchung pilusassoziierter Proteine von *B. henselae***

Auf Agarplatten kultivierte *B. henselae* durchlaufen nach einigen Passagen eine Phasenvariation, die sich sichtbar in einer Änderung ihrer Koloniemorphologie ausdrückt: aus kleinen, rauen Kolonien, die fest am Agar haften, werden größere, schleimige, dem Agar flach aufsitzende Kolonien. Batterman et al. (16) haben mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt, dass der Organismus bei diesem Vorgang die Pili verliert. Das Vorhandensein der Pili ist zudem mit zuckender Motilität und Autoagglutination der Bakterien verbunden und so wird spekuliert, dass es sich um „Typ IV-like Pili“ handeln könnte. Da die pilierte Form von *B. henselae* sowohl in der Adhärenz an humane Epithelzellen (um den Faktor 5), als auch in der Invasion dieser Zellen (um den Faktor 100) deutlich erfolgreicher ist, als pili-negative *B. henselae*, wurde vermutet, dass die Pili eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Erregers spielen (16). Dies wird unterstützt von der Tatsache, dass pilierte im Gegensatz zu pili-negativen *B. henselae* in Kokultur mit humanen Zellen die Bildung größerer Mengen VEGF induzieren, als nichtpilierte (73). Auf genetischer oder Protein-Ebene konnten bisher keine Pilusbestandteile identifiziert werden. Daher wurde hier versucht, im Vergleich zwischen pil<sup>+</sup> und pil<sup>-</sup> *B. henselae* mittels subtraktiver 2D-Elektrophorese pilusassoziierter Proteine zu finden. Hierbei konnte ein differentielles, nur bei pil<sup>+</sup> *B. henselae* auftretendes

Protein in Coomassie-gefärbten Gelen detektiert und ausgeschnitten werden. Die Sequenzanalyse mit Edman-Abbau und nachfolgender Datenbanksuche ergab hohe Homologie mit der Phosphoserinaminotransferase (serC) des Archaeobakteriums *Methanosarcina barkeri* (inzwischen durch neue Einträge auch anderer Organismen). Der Zusammenhang dieses Enzyms mit der Expression von Pili bei *B. henselae* ist unklar.

Da die erhaltene Homologie nicht zweifelsfrei erschien und aufgrund der Umstände (limitierten Länge der erhaltenen Aminosäuresequenzen und phylogenetisch weit entfernter homologer Organismus) nicht für absolut sicher gehalten wurde, sollte ein genetischer Ansatz Klärung bringen: Dabei gelang es mit revers hergestellten Primern, das zugrunde liegende Gen zu identifizieren, es konnten eine 365 bp und eine 500 bp lange Nukleotidsequenz amplifiziert werden. Beide zeigten in Vergleichen mit DNA-Datenbanken wiederum hohe Homologie zum Gen serC der Phosphoserinaminotransferase von *Methanosarcina barkeri*.

Auch bei anderen Organismen sind Enzyme beim Pilusaufbau beteiligt (z. B. TapD mit Methyltransferase-Aktivität bei Typ IV-Pili von *Aeromonas hydrophila* (103)). Welche Rolle der Phosphoserinaminotransferase bei der Expression der *B. henselae*-Pili zukommt, ist unklar.

In weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte ein zusätzliches pilusassoziiertes Protein identifiziert werden. Das Protein ist auch hier im 1D-Gel zu sehen, in den 2D-Gelen kommt es aufgrund des Schägger-Gelsystems, das v. a. für niedermolekulare Proteine geeignet ist, nicht zur Darstellung. Bei dem Protein mit einer Größe von 220kD handelt es sich um Fibronectin. Dieses eukaryote Protein, das beim Menschen gehäuft im retikulären Bindegewebe lymphatischer Organe aber auch in Leber und in Basalmembranen vorkommt, wird von pilierten *B. henselae* wahrscheinlich beim Wachstum auf der Blutagarplatte gebunden. Es ist bekannt, dass verschiedene Bakterien die Fähigkeit besitzen, Fibronectin zu binden und so ihre Adhärenz an Wirtszellen auch die Invasion in diese vermittelt wird. An diesem Prozess beteiligte MSCRAMMs (Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) sind bei grampositiven aber auch bei gramnegativen Bakterien beschrieben (67). Bei *E. coli* scheint die Fibronectin-Bindung durch mehrere Pili-Typen vermittelt zu sein. Auch bei *B. garinii* und *burgdorferi* konnten Fibronectin-bindende Oberflächenproteine bzw. die entsprechenden Gene gefunden werden.

Interessant wäre es, bei *B. henselae* in Zellkultur-Infektionsversuchen eine Blockade von Fibronectin (mit monoklonalen Antikörpern) durchzuführen, um die Rolle von Fibronectin bei Adhärenz und Invasion der Wirtszellen zu evaluieren. Außerdem steht die Identifikation des Fibronectin-bindenden Proteins von *B. henselae* noch aus. Sandwichblots, bei denen Fibronectin auf separierte und geblottete Gesamtzelllysate von *B. henselae* gegeben wird und dann Fibronectin mit einem Antikörper detektiert wird, könnten hier zum Ziel führen.

#### **4.7 Kombination von Pulse Chase und zwei-dimensionaler Elektrophorese: Potential dieses Ansatzes**

Beim „Pulse Chase“, wie hier durchgeführt, werden nach einem vom Untersucher festgelegten Zeitpunkt neu synthetisierte Proteine (z. B. durch Zugabe von <sup>35</sup>S-Methionin) radioaktiv markiert. Je nach Halbwertszeit liegen Proteine u. U. sehr lange in den Zellen vor, bei herkömmlichen Proteomstudien wird daher stets eine Mischung ganz unterschiedlich alter Proteine gefunden. Gerade bei der Untersuchung quantitativer Veränderungen im Vergleich zweier Bedingungen stört dieser Hintergrund aus alten Proteinen und verzerrt die Ergebnisse. Mit dem radioaktiven Pulsen von Proteinen über einen bestimmten Zeitraum werden nur die Proteine detektiert, die in dieser Zeit unter den jeweiligen Bedingungen synthetisiert wurden. Neben den für den Organismus essentiellen „House-keeping“ Proteinen können insbesondere diejenigen gefunden werden, die differentiell unter einer untersuchten Bedingung (beispielsweise Temperatur- oder pH-Veränderungen, Kontakt mit eukaryoten Zellen usw.) synthetisiert werden und damit potentiell als Pathogenitätsfaktoren in Frage kommen.

In der Mikrobiologie sind natürlich v. a. Proteine von Interesse, die der Mikroorganismus in Kontakt mit Wirtszellen neu synthetisiert, weil man sich hier die Entdeckung neuer Pathogenitätsfaktoren (z. B. Adhäsine, Invasine, Effektorproteine, die in Wirtszellen transloziert werden) und auch potentieller Angriffsziele neuer Therapeutika erhofft. Durch die auch in dieser Arbeit angewandte Unterdrückung der eukaryoten Proteinbiosynthese ist es möglich, Kokulturbedingungen zu schaffen und dennoch selektiv (wie in 3.4.3 mit Negativkontrollen gezeigt) die neu synthetisierten bakteriellen Proteine darzustellen.

Sowohl ein Vorteil als auch ein Nachteil der  $^{35}\text{S}$ -Pulse Chase-Methodik ist die sehr große Sensitivität. Es können auf der einen Seite Proteine nachgewiesen werden, die in so geringen Mengen vorliegen, dass sie mit keiner Färbemethode dargestellt werden können. Prinzipiell ist die Sensitivität nur eine Frage der Belichtungszeit in der Autoradiographie, theoretisch müssten bei genügend langer Belichtungszeit selbst singulär vorliegende, radioaktiv markierte Proteine sichtbar gemacht werden können). Auf der anderen Seite müssen die Proteine zur Identifizierung mit weit weniger sensitiven Färbemethoden sichtbar gemacht werden, um sie ausschneiden und analysieren zu können, was mit sehr seltenen Proteinen nicht gelingen dürfte. Ein weiteres Problem für die Analyse  $^{35}\text{S}$ -markierter Proteine ist die Gefährlichkeit der Methode für den Menschen durch radioaktive Kontamination von Analysegeräten (MALDI, HPLC usw.) durch die eingesetzte Probe.

In dieser Arbeit konnte durch Vergleich des „Infektionsproteoms“, also des *B. henselae*-Proteoms, das auf Kokultur mit humanen Endothelzellen hin exprimiert wird, mit dem „Ruheproteom“ (von auf Agarplatten gewachsenen *B. henselae*) ein verändertes Expressionsprofil festgestellt werden. Alle bei der Kartierung des Proteoms identifizierten Proteine wurden auch unter diesen Bedingungen hergestellt. Wenig erstaunlich ist dies bei den Stoffwechsellzymen, die vermutlich essentiell am Grundumsatz des Organismus beteiligt sind. Die Beobachtung, dass die Hitzeschockproteine neu synthetisiert werden, stimmt mit der Literatur überein, die eine Synthese dieser Proteine unter veränderten Umweltbedingungen (59) und die eines anderen Hitzeschockproteins (HtrA) speziell im intrazellulären Milieu beschreibt (117).

Erstmalig konnte in dieser Arbeit die Expression des Phagenproteins Pap31 bei Endothelzell-kokultivierten *B. henselae* beschrieben werden.

Um das Potential der Methode voll auszuschöpfen, ist es nötig, weitere Proteine zu identifizieren und zu versuchen, differentiell unter Infektionsbedingungen auftretende Proteine auch mit Färbemethoden sichtbar und damit einer Analyse zugänglich zu machen. Die Expression spezifischer Proteine im Kontakt mit Wirtszellen und im intrazellulären Milieu, die mit der hier gezeigten Methode untersucht werden kann, wird zu einem besseren Verständnis der neuen Pathogenitätsstrategien dieses Bakteriums führen.

## 5. Zusammenfassung

*Bartonella henselae* ist der Erreger der Katzenkratzkrankheit und vaskuloproliferativer Erkrankungen des Menschen. Das Bakterium wurde erstmals 1989 korrekt klassifiziert und den oben genannten Krankheitsbildern zugeordnet. Es ist ein langsam wachsendes, nicht in Flüssigmedien kultivierbares Bakterium. Genetische Untersuchungen sind deswegen schwierig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die zweidimensionale Elektrophorese zur Untersuchung möglicher Pathogenitätsfaktoren von *B. henselae* etabliert. Mithilfe dieser Methode sollte es möglich sein, das gesamte Proteom von *B. henselae* unter verschiedenen Kulturbedingungen aufzutrennen und so Rückschlüsse auf Pathomechanismen dieses Erregers zu ziehen.

Die vorliegende Dissertation lieferte folgende Ergebnisse:

1. Etablierung eines geeigneten Protokolls zum Aufschluss von *B. henselae* für die zweidimensionale Elektrophorese.
2. Erstellung einer Proteomkarte von auf Agarplatten kultivierten *B. henselae*. Hierdurch wurde die Grundvoraussetzung für weitere Proteom-basierte Studien geschaffen. Zudem wurden drei Proteine (Malatdehydrogenase, Pyruvatdehydrogenase und DnaK) erstmals bei *B. henselae* beschrieben.
3. Charakterisierung von vier monoklonalen anti-*B. henselae*-Antikörpern mithilfe von zweidimensionalen Proteom-Western-Blots. Dadurch wurden vier neue *B. henselae*-Proteine, unter anderem das Phagenprotein Pap31, als immunogen in der Maus beschrieben. Zudem wurde hier erstmalig die zweidimensionale Elektrophorese als schnelle und akkurate Methode zur Charakterisierung monoklonaler Antikörper eingesetzt.
4. Durch den Proteomvergleich hitzestresser und nicht-hitzestresser *B. henselae* wurde gezeigt, dass mit der hier etablierten Methodik regulative Vorgänge der Proteinsynthese von *B. henselae* erfasst werden können. Von den drei identifizierten Hitzestressproteinen (GroEL, GroES und DnaK) wurde DnaK für *B. henselae* zum ersten Mal beschrieben.
5. Zwei pilusassoziierte Proteine (220 kD und 43 kD) wurden durch Proteomvergleich gefunden. Bei dem in den zweidimensionalen Auftrennungen sichtbaren 43kD-Protein handelt es sich um die

Phosphoserinaminotransferase, ein bakterielles Stoffwechsellzym. Der Zusammenhang mit der Pilusexpression ist bis dato unklar. Die Identität dieses Proteins wurde mithilfe reverser Genetik verifiziert. Das zweite Protein erscheint aufgrund unterschiedlicher Gelsysteme nur in den eindimensionalen Auftrennungen und wurde daher im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

6. Durch die in dieser Arbeit etablierte radioaktive Markierung von *B. henselae*-Proteinen mittels  $^{35}\text{S}$ -Pulse-Chase wurde die Untersuchung neu synthetisierter Proteine nach Kokultur mit humanen Zelllinien ermöglicht.
7. Untersuchung neu synthetisierter *B. henselae*-Proteine nach Kokultur des Erregers mit humanen Endothelzellen mittels  $^{35}\text{S}$ -Pulse-Chase. Durch Vergleich mit der Proteomkarte konnten folgende in der Kokultur neu synthetisierte Proteine identifiziert werden: die Hitzestressproteine GroES, GroEL und DnaK, die Stoffwechsellzyme Malatdehydrogenase und Pyruvatdehydrogenase, der Elongationsfaktor EF-Tu und das Phagenprotein Pap31. Die Expression von Pap31 bei *B. henselae* in Endothelzellkultur wurde hier erstmals gezeigt.

Durch die vorliegende Arbeit wurde eine neue Methode für die weitergehende Erforschung von *B. henselae* etabliert, die in Zukunft die Untersuchung dieses genetisch schwer zugänglichen Organismus erleichtern wird. Eine Reihe von Proteinen wurde hier für *B. henselae* erstmals beschrieben bzw. wurde deren Expression unter bestimmten Lebensbedingungen zum ersten Mal beobachtet. Die Breite des methodischen Ansatzes dieser Arbeit legt den Grundstein für vielfältige weitere Untersuchungen. So konnte zwischenzeitlich die membranassoziierte Lage von Pap31 mithilfe eines in dieser Arbeit charakterisierten monoklonalen Antikörper aufgedeckt (163) und Fibronectin als Bindungspartner von *B. henselae*-Pili identifiziert werden (118).

## 6. Abkürzungen

1D-Gel	Eindimensionales Proteingel
2D-Gel	Zweidimensionales Proteingel
A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BA	Bazilläre Angiomatose
BP	Bazilläre Peliosis
CBB	Coomassie Brilliant-Blau
CHAPS	Cholamidopropyl-dimethylammonio-propansulfonat
CHX	Cycloheximid
Ci	Curie
cpm	counts per minute
d	Tage
DAB	3,3´Diaminobenzidinhydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum
Fc-Teil	konstantes Fragment der Immunglobuline
h	Stunden
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	zweifach destilliertes Wasser
HC	Harnstoffpuffer
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSP	Hitzestressprotein
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IEF	isoelektrische Fokussierung

IFT	Immunfluoreszenztest
IL	Interleukin
IPG	immobilisierter pH-Gradient
kD	Kilodalton
KKK	Katzenkratzkrankheit
LSB	low salt buffer
mA	milli-Ampere
mAk	monoklonale Antikörper
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionization
MDH	Malatdehydrogenase
min	Minuten
OD	optical density
p. A.	zur Analyse
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pI	isoelektrischer Punkt
psi	pounds per square inch
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
spp.	Spezies
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBP	Tributylphosphin
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
THC	Thioharnstoffpuffer
TOF	time of flight
U	Spannung
V	Volt
v/v	volume per volume
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vh	Voltstunde
w/v	weight per volume

## Aminosäuren:

<b>A</b>	Alanin	<b>G</b>	Glycin	<b>M</b>	Methionin	<b>S</b>	Serin
<b>C</b>	Cystein	<b>H</b>	Histidin	<b>N</b>	Asparagin	<b>T</b>	Threonin
<b>D</b>	Aspartat	<b>I</b>	Isoleucin	<b>P</b>	Prolin	<b>V</b>	Valin
<b>E</b>	Glutamat	<b>K</b>	Lysin	<b>Q</b>	Glutamin	<b>W</b>	Tryptophan
<b>F</b>	Phenylalanin	<b>L</b>	Leucin	<b>R</b>	Arginin	<b>Y</b>	Tyrosin

## Nukleotide:

<b>A</b>	Adenosinmonophosphat
<b>T</b>	Thyminmonophosphat
<b>G</b>	Guanosinmonophosphat
<b>C</b>	Cytosinmonophosphat

## 7. Literaturverzeichnis

1. **Abbott, R. C., B. B. Chomel, R. W. Kasten, K. A. Floyd-Hawkins, Y. Kikuchi, J. E. Koehler, and N. C. Pedersen.** 1997. Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **20**:41-51.
2. **Aebbersold, R. H., J. Leavitt, R. A. Saavedra, L. E. Hood, and S. B. Kent.** 1987. Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by one- or two-dimensional gel electrophoresis after in situ protease digestion on nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:6970-4.
3. **Aepfelbacher, M., M. Essler, E. Huber, M. Sugai, and P. C. Weber.** 1997. Bacterial toxins block endothelial wound repair. Evidence that Rho GTPases control cytoskeletal rearrangements in migrating endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**:1623-9.
4. **Ahsan, N., M. J. Holman, T. R. Riley, C. S. Abendroth, E. G. Langhoff, and H. C. Yang.** 1998. Peliosis hepatis due to *Bartonella henselae* in transplantation: a hemato-hepato-renal syndrome. *Transplantation* **65**:1000-3.
5. **Alsmark CM, F. A., Karlberg EO, Legault BA, Ardell DH, Canback B, Eriksson AS, Naslund AK, Handley SA, Huvet M, La Scola B, Holmberg M, Andersson SG.** 2004. The louse-borne human pathogen *Bartonella quintana* is a genomic derivative of the zoonotic agent *Bartonella henselae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:9716-21.
6. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389-402.
7. **Anderson, B., C. Goldsmith, A. Johnson, I. Padmalayam, and B. Baumstark.** 1994. Bacteriophage-like particle of *Rochalimaea henselae*. *Mol Microbiol* **13**:67-73.
8. **Anderson, B. E., and M. A. Neuman.** 1997. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin Microbiol Rev* **10**:203-19.
9. **Anderson, N. L., and N. G. Anderson.** 1998. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* **19**:1853-61.
10. **Andersson, S. G., and C. Dehio.** 2000. *Rickettsia prowazekii* and *Bartonella henselae*: differences in the intracellular life styles revisited. *Int J Med Microbiol* **290**:135-41.
11. **Anglade, P., E. Demey, V. Labas, J. P. Le Caer, and J. F. Chich.** 2000. Towards a proteomic map of *Lactococcus lactis* NCDO 763. *Electrophoresis* **21**:2546-9.

12. **Angritt, P., S. M. Tuur, A. M. Macher, K. J. Smith, C. S. Park, F. P. Hobin, and C. Myrie-Williams.** 1988. Epithelioid angiomatosis in HIV infection: neoplasm or cat-scratch disease? *Lancet* **1**:996.
13. **Armengol, C. E., and J. O. Hendley.** 1999. Cat-scratch disease encephalopathy: a cause of status epilepticus in school-aged children. *J Pediatr* **134**:635-8.
14. **Baorto, E., R. M. Payne, L. N. Slater, F. Lopez, D. A. Relman, K. W. Min, and J. W. St Geme, 3rd.** 1998. Culture-negative endocarditis caused by *Bartonella henselae*. *J Pediatr* **132**:1051-4.
15. **Bass, J. W., B. C. Freitas, A. D. Freitas, C. L. Sisler, D. S. Chan, J. M. Vincent, D. A. Person, J. R. Claybaugh, R. R. Wittler, M. E. Weisse, R. L. Regnery, and L. N. Slater.** 1998. Prospective randomized double blind placebo-controlled evaluation of azithromycin for treatment of cat-scratch disease. *Pediatr Infect Dis J* **17**:447-52.
16. **Batterman, H. J., J. A. Peek, J. S. Loutit, S. Falkow, and L. S. Tompkins.** 1995. *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. *Infect Immun* **63**:4553-6.
17. **Becker, N., and J. Wahrendorf.** 1998. Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990, 3 ed. Springer-Verlag, Heidelberg.
18. **Berger, B. R., and P. J. Christie.** 1994. Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* virB operon: virB2 through virB11 are essential virulence genes. *J Bacteriol* **176**:3646-60.
19. **Bergmans, A. M., J. F. Schellekens, J. D. van Embden, and L. M. Schouls.** 1996. Predominance of two *Bartonella henselae* variants among cat-scratch disease patients in the Netherlands. *J Clin Microbiol* **34**:254-60.
20. **Bjellqvist, B., K. Ek, P. G. Righetti, E. Gianazza, A. Gorg, R. Westermeier, and W. Postel.** 1982. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* **6**:317-39.
21. **Bjellqvist, B., J. C. Sanchez, C. Pasquali, F. Ravier, N. Paquet, S. Frutiger, G. J. Hughes, and D. Hochstrasser.** 1993. Micropreparative two-dimensional electrophoresis allowing the separation of samples containing milligram amounts of proteins. *Electrophoresis* **14**:1375-8.
22. **Blum, H., H. Beier, and H. J. Gross.** 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**:93-99.
23. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-54.
24. **Brenner, D. J., D. G. Hollis, C. W. Moss, C. K. English, G. S. Hall, J. Vincent, J. Radosevic, K. A. Birkness, W. F. Bibb, F. D. Quinn, and et al.** 1991.

- Proposal of *Afipia* gen. nov., with *Afipia felis* sp. nov. (formerly the cat scratch disease bacillus), *Afipia clevelandensis* sp. nov. (formerly the Cleveland Clinic Foundation strain), *Afipia broomeae* sp. nov., and three unnamed genospecies. *J Clin Microbiol* **29**:2450-60.
25. **Brenner, D. J., S. P. O'Connor, H. H. Winkler, and A. G. Steigerwalt.** 1993. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family Bartonellaceae from the order Rickettsiales. *Int J Syst Bacteriol* **43**:777-86.
  26. **Brenner, S. E.** 1999. Errors in genome annotation. *Trends Genet.* **15**:132-133.
  27. **Brouqui, P., Raoult, D.** 2001. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin Microbiol Rev* **14**:177-207.
  28. **Carroll, J. A., S. A. Coleman, L. S. Smitherman, and M. F. Minnick.** 2000. Hemin-binding surface protein from *Bartonella quintana*. *Infect Immun* **68**:6750-7.
  29. **Celis, J. E.** 1987. Toward establishing a database of human protein information derived from the analysis of two-dimensional gels. *Leukemia* **1**:706.
  30. **Celis, J. E., and P. Gromov.** 1999. 2D protein electrophoresis: can it be perfected? *Curr Opin Biotechnol* **10**:16-21.
  31. **Cheung, A. L., A. S. Bayer, G. Zhang, H. Gresham, and Y. Q. Xiong.** 2004. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **40**:1-9.
  32. **Chomel, B. B., R. C. Abbott, R. W. Kasten, K. A. Floyd-Hawkins, P. H. Kass, C. A. Glaser, N. C. Pedersen, and J. E. Koehler.** 1995. *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. *J Clin Microbiol* **33**:2445-50.
  33. **Chomel, B. B., R. W. Kasten, K. Floyd-Hawkins, B. Chi, K. Yamamoto, J. Roberts-Wilson, A. N. Gurfield, R. C. Abbott, N. C. Pedersen, and J. E. Koehler.** 1996. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J Clin Microbiol* **34**:1952-6.
  34. **Cimolai, N., L. Benoit, A. Hill, and C. Lyons.** 2000. *Bartonella henselae* infection in British Columbia: evidence for an endemic disease among humans. *Can J Microbiol* **46**:908-12.
  35. **Cluss, R. G., A. S. Goel, H. L. Rehm, J. G. Schoenecker, and J. T. Boothby.** 1996. Coordinate synthesis and turnover of heat shock proteins in *Borrelia burgdorferi*: degradation of DnaK during recovery from heat shock. *Infect Immun* **64**:1736-43.

36. **Cockerell, C. J., M. A. Whitlow, G. F. Webster, and A. E. Friedman-Kien.** 1987. Epithelioid angiomatosis: a distinct vascular disorder in patients with the acquired immunodeficiency syndrome or AIDS-related complex. *Lancet* **2**:654-6.
37. **Conrad, D. A.** 2001. Treatment of cat-scratch disease. *Curr Opin Pediatr* **13**:56-9.
38. **Cunningham, E. T., and J. E. Koehler.** 2000. Ocular bartonellosis. *Am J Ophthalmol* **130**:340-9.
39. **Dehio, C.** 2003. Recent progress in understanding Bartonella-induced vascular proliferation. *Curr Opin Microbiol* **6**:61-5.
40. **Demers, D. M., J. W. Bass, J. M. Vincent, D. A. Person, D. K. Noyes, C. M. Staeger, C. P. Samlaska, N. H. Lockwood, R. L. Regnery, and B. E. Anderson.** 1995. Cat-scratch disease in Hawaii: etiology and seroepidemiology. *J Pediatr* **127**:23-6.
41. **Devereux, J., P. Haeberli, and O. Smithies.** 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* **12**:387-95.
42. **Don, R. H., P. T. Cox, B. J. Wainwright, K. Baker, and J. S. Mattick.** 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* **19**:4008.
43. **Drancourt, M., R. Birtles, G. Chaumentin, F. Vandenesch, J. Etienne, and D. Raoult.** 1996. New serotype of Bartonella henselae in endocarditis and cat-scratch disease. *Lancet* **347**:441-3.
44. **Dunn, M. J.** 1993. Gel Electrophoresis of Proteins. BIOS scientific Publishers Ltd. Alden Press, Oxford.
45. **Emmons, R. W., J. L. Riggs, and J. Schachter.** 1976. Continuing search for the etiology of cat scratch disease. *J Clin Microbiol* **4**:112-4.
46. **English, C. K., D. J. Wear, A. M. Margileth, C. R. Lissner, and G. P. Walsh.** 1988. Cat-scratch disease. Isolation and culture of the bacterial agent. *Jama* **259**:1347-52.
47. **Fischer, W., J. Puls, R. Buhrdorf, B. Gebert, S. Odenbreit, and R. Haas.** 2001. Systematic mutagenesis of the Helicobacter pylori cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol* **42**:1337-48.
48. **Foucault, C., K. Barrau, P. Brouqui, and D. Raoult.** 2002. Bartonella quintana Bacteremia among Homeless People. *Clin Infect Dis* **35**:684-9.
49. **Fournier, P. E., H. Lelievre, S. J. Eykyn, J. L. Mainardi, T. J. Marrie, F. Bruneel, C. Roure, J. Nash, D. Clave, E. James, C. Benoit-Lemerrier, L. Deforges, H. Tissot-Dupont, and D. Raoult.** 2001. Epidemiologic and clinical

- characteristics of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* endocarditis: a study of 48 patients. *Medicine (Baltimore)* **80**:245-51.
50. **Freeland, R. L., D. T. Scholl, K. R. Rohde, L. J. Shelton, and K. L. O'Reilly.** 1999. Identification of *Bartonella*-specific immunodominant antigens recognized by the feline humoral immune system. *Clin Diagn Lab Immunol* **6**:558-66.
  51. **George, T. I., G. Manley, J. E. Koehler, V. S. Hung, M. McDermott, and A. Bollen.** 1998. Detection of *Bartonella henselae* by polymerase chain reaction in brain tissue of an immunocompromised patient with multiple enhancing lesions. Case report and review of the literature. *J Neurosurg* **89**:640-4.
  52. **Gevaert, K., and J. Vandekerckhove.** 2000. Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis* **21**:1145-54.
  53. **Gilbert, D. N., R. C. Moellering, and M. A. Sande.** 1999. *The Sanford Guide To Antimicrobial Therapy*, 29. Edition ed.
  54. **Glaus, T., R. Hofmann-Lehmann, C. Greene, B. Glaus, C. Wolfensberger, and H. Lutz.** 1997. Seroprevalence of *Bartonella henselae* infection and correlation with disease status in cats in Switzerland. *J Clin Microbiol* **35**:2883-5.
  55. **Gorg, A., C. Obermaier, G. Boguth, and W. Weiss.** 1999. Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis* **20**:712-7.
  56. **Gray, G. C., A. A. Johnson, S. A. Thornton, W. A. Smith, J. Knobloch, P. W. Kelley, L. Obregon Escudero, M. Arones Huayda, and F. S. Wignall.** 1990. An epidemic of Oroya fever in the Peruvian Andes. *Am J Trop Med Hyg* **42**:215-21.
  57. **Guglielmi, G., P. Mazodier, C. J. Thompson, and J. Davies.** 1991. A survey of the heat shock response in four *Streptomyces* species reveals two groEL-like genes and three groEL-like proteins in *Streptomyces albus*. *J Bacteriol* **173**:7374-81.
  58. **Guptill, L., C. C. Wu, L. Glickman, J. Turek, L. Slater, and H. HogenEsch.** 2000. Extracellular *Bartonella henselae* and artifactual intraerythrocytic pseudoinclusions in experimentally infected cats. *Vet Microbiol* **76**:283-90.
  59. **Haake, D. A., T. A. Summers, A. M. McCoy, and W. Schwartzman.** 1997. Heat shock response and groEL sequence of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana*. *Microbiology* **143 ( Pt 8)**:2807-15.
  60. **Harry, J. L., M. R. Wilkins, B. R. Herbert, N. H. Packer, A. A. Gooley, and K. L. Williams.** 2000. Proteomics: capacity versus utility. *Electrophoresis* **21**:1071-81.

61. **Herbert, B. R., M. P. Molloy, A. A. Gooley, B. J. Walsh, W. G. Bryson, and K. L. Williams.** 1998. Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. *Electrophoresis* **19**:845-51.
62. **Herbert, B. R., J. C. Sanchez, and L. Bini.** 1997. Two-dimensional Electrophoresis: The state of the art and future directions. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
63. **Hulzebos, C. V., H. A. Koetse, J. L. Kimpen, and T. F. Wolfs.** 1999. Vertebral osteomyelitis associated with cat-scratch disease. *Clin Infect Dis* **28**:1310-2.
64. **Ihler, G. M.** 1996. *Bartonella bacilliformis*: dangerous pathogen slowly emerging from deep background. *FEMS Microbiol Lett* **144**:1-11.
65. **Jackson, L. A., B. A. Perkins, and J. D. Wenger.** 1993. Cat scratch disease in the United States: an analysis of three national databases. *Am J Public Health* **83**:1707-11.
66. **Jameson, P., C. Greene, R. Regnery, M. Dryden, A. Marks, J. Brown, J. Cooper, B. Glaus, and R. Greene.** 1995. Prevalence of *Bartonella henselae* antibodies in pet cats throughout regions of North America. *J Infect Dis* **172**:1145-9.
67. **Joh, D., E. R. Wann, B. Kreikemeyer, P. Speziale, and M. Hook.** 1999. Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. *Matrix Biol* **18**:211-23.
68. **Jungblut, P. R., G. Grabher, and G. Stoffler.** 1999. Comprehensive detection of immunorelevant *Borrelia garinii* antigens by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **20**:3611-22.
69. **Karas, M., and F. Hillenkamp.** 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **60**:2299-301.
70. **Kaufmann, R., B. Spengler, and F. Lutzenkirchen.** 1993. Mass spectrometric sequencing of linear peptides by product-ion analysis in a reflectron time-of-flight mass spectrometer using matrix-assisted laser desorption ionization. *Rapid Commun Mass Spectrom* **7**:902-10.
71. **Kempf, V. A., N. Hitziger, T. Riess, and I. B. Autenrieth.** 2002. Do plant and human pathogens have a common pathogenicity strategy? *Trends Microbiol* **10**:269-75.
72. **Kempf, V. A., M. Schaller, S. Behrendt, B. Volkmann, M. Aepfelbacher, I. Cakman, and I. B. Autenrieth.** 2000. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. *Cell Microbiol* **2**:431-41.
73. **Kempf, V. A., B. Volkmann, M. Schaller, C. A. Sander, K. Alitalo, T. Riess, and I. B. Autenrieth.** 2001. Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. *Cell Microbiol* **3**:623-32.

74. **Koehler, J. E., C. A. Glaser, and J. W. Tappero.** 1994. Rochalimaea henselae infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir. *Jama* **271**:531-5.
75. **Koehler, J. E., M. A. Sanchez, C. S. Garrido, M. J. Whitfeld, F. M. Chen, T. G. Berger, M. C. Rodriguez-Barradas, P. E. LeBoit, and J. W. Tappero.** 1997. Molecular epidemiology of bartonella infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. *N Engl J Med* **337**:1876-83.
76. **Koehler, J. E., and J. W. Tappero.** 1993. Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* **17**:612-24.
77. **Koesling, J., T. Aebischer, C. Falch, R. Schulein, and C. Dehio.** 2001. Cutting edge: antibody-mediated cessation of hemotropic infection by the intraerythrocytic mouse pathogen *Bartonella grahamii*. *J Immunol* **167**:11-4.
78. **Koga, T., A. Wand-Wurtttenberger, J. DeBruyn, M. E. Munk, B. Schoel, and S. H. Kaufmann.** 1989. T cells against a bacterial heat shock protein recognize stressed macrophages. *Science* **245**:1112-5.
79. **Kordick, D. L., and E. B. Breitschwerdt.** 1995. Intraerythrocytic presence of *Bartonella henselae*. *J Clin Microbiol* **33**:1655-6.
80. **Kordick, D. L., K. H. Wilson, D. J. Sexton, T. L. Hadfield, H. A. Berkhoff, and E. B. Breitschwerdt.** 1995. Prolonged *Bartonella* bacteremia in cats associated with cat-scratch disease patients. *J Clin Microbiol* **33**:3245-51.
81. **Kyhse-Andersen, J.** 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**:203-9.
82. **Kyme, P., B. Dillon, and J. Iredell.** 2003. Phase variation in *Bartonella henselae*. *Microbiology* **149**:621-9.
83. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
84. **Lai, E. M., and C. I. Kado.** 2000. The T-pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *Trends Microbiol* **8**:361-9.
85. **LeBoit, P. E., T. G. Berger, B. M. Egbert, J. H. Beckstead, T. S. Yen, and M. H. Stoler.** 1989. Bacillary angiomatosis. The histopathology and differential diagnosis of a pseudoneoplastic infection in patients with human immunodeficiency virus disease. *Am J Surg Pathol* **13**:909-20.
86. **LeBoit, P. E., T. G. Berger, B. M. Egbert, T. S. Yen, M. H. Stoler, T. A. Bonfiglio, J. A. Strauchen, C. K. English, and D. J. Wear.** 1988. Epithelioid haemangioma-like vascular proliferation in AIDS: manifestation of cat scratch disease bacillus infection? *Lancet* **1**:960-3.

87. **Li, X. M., J. Vohradsky, and J. Weiser.** 1994. The use of protein synthesis elongation factor EF-Tu as internal calibration standard in two-dimensional electrophoretic studies of differentiation in *Streptomyces*. *Electrophoresis* **15**:1198-204.
88. **Liang, Z., and D. Raoult.** 2000. Species-specific monoclonal antibodies for rapid identification of *Bartonella quintana*. *Clin Diagn Lab Immunol* **7**:21-4.
89. **Life, P. F., E. O. Bassey, and J. S. Gaston.** 1991. T-cell recognition of bacterial heat-shock proteins in inflammatory arthritis. *Immunol Rev* **121**:113-35.
90. **Lin, J., L. G. Adams, and T. A. Ficht.** 1992. Characterization of the heat shock response in *Brucella abortus* and isolation of the genes encoding the GroE heat shock proteins. *Infect Immun* **60**:2425-31.
91. **Lipa, J., W. Peters, V. Fornasier, and B. Fisher.** 1995. Bacillary angiomatosis: a unique cutaneous complication of HIV infections. *Can J Plast Surg* **3**:96-101.
92. **Margileth, A. M.** 1992. Antibiotic therapy for cat-scratch disease: clinical study of therapeutic outcome in 268 patients and a review of the literature. *Pediatr Infect Dis J* **11**:474-8.
93. **Margileth, A. M.** 2000. Recent Advances in Diagnosis and Treatment of Cat Scratch Disease. *Curr Infect Dis Rep* **2**:141-146.
94. **Matar, G. M., J. E. Koehler, G. Malcolm, M. A. Lambert-Fair, J. Tappero, S. B. Hunter, and B. Swaminathan.** 1999. Identification of *Bartonella* species directly in clinical specimens by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a 16S rRNA gene fragment. *J Clin Microbiol* **37**:4045-7.
95. **Mocroft, A., B. Ledergerber, C. Katlama, O. Kirk, P. Reiss, A. d'Arminio Monforte, B. Knysz, M. Dietrich, A. N. Phillips, and J. D. Lundgren.** 2003. Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: an observational study. *Lancet* **362**:22-9.
96. **Molloy, M. P., B. R. Herbert, B. J. Walsh, M. I. Tyler, M. Traini, J. C. Sanchez, D. F. Hochstrasser, K. L. Williams, and A. A. Gooley.** 1998. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **19**:837-44.
97. **Munana, K. R., S. M. Vitek, B. C. Hegarty, D. L. Kordick, and E. B. Breitschwerdt.** 2001. Infection of fetal feline brain cells in culture with *Bartonella henselae*. *Infect Immun* **69**:564-9.
98. **Musso, T., R. Badolato, D. Ravarino, S. Stornello, P. Panzanelli, C. Merlino, D. Savoia, R. Cavallo, A. N. Ponzi, and M. Zucca.** 2001. Interaction of *Bartonella henselae* with the murine macrophage cell line J774: infection and proinflammatory response. *Infect Immun* **69**:5974-80.

99. **O'Farrell, P. H.** 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**:4007-21.
100. **O'Reilly, K. L., R. W. Bauer, R. L. Freeland, L. D. Foil, K. J. Hughes, K. R. Rohde, A. F. Roy, R. W. Stout, and P. C. Triche.** 1999. Acute clinical disease in cats following infection with a pathogenic strain of *Bartonella henselae* (LSU16). *Infect Immun* **67**:3066-72.
101. **Onishi, Y., M. Kuroda, H. Yasueda, A. Saito, E. Sono-Koyama, S. Tunasawa, T. Hashida-Okado, T. Yagihara, K. Uchida, H. Yamaguchi, K. Akiyama, I. Kato, and K. Takesako.** 1999. Two-dimensional electrophoresis of *Malassezia* allergens for atopic dermatitis and isolation of Mal f 4 homologs with mitochondrial malate dehydrogenase. *Eur J Biochem* **261**:148-54.
102. **Parekh, R.** 1999. Proteomics and molecular medicine. *Nature biotechnology* **17 Supplement**:BV19-BV20.
103. **Pepe, C. M., M. W. Eklund, and M. S. Strom.** 1996. Cloning of an *Aeromonas hydrophila* type IV pilus biogenesis gene cluster: complementation of pilus assembly functions and characterization of a type IV leader peptidase/N-methyltransferase required for extracellular protein secretion. *Mol Microbiol* **19**:857-69.
104. **Perdew, G. H., H. W. Schaup, and D. P. Selivonchick.** 1983. The use of a zwitterionic detergent in two-dimensional gel electrophoresis of trout liver microsomes. *Anal Biochem* **135**:453-5.
105. **Plettenberg, A., T. Lorenzen, B. T. Burtsche, H. Rasokat, T. Kaliebe, H. Albrecht, T. Mertenskotter, J. R. Bogner, A. Stoehr, and H. Schofer.** 2000. Bacillary angiomatosis in HIV-infected patients--an epidemiological and clinical study. *Dermatology* **201**:326-31.
106. **Rabilloud, T., C. Adessi, A. Giraudel, and J. Lunardi.** 1997. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **18**:307-16.
107. **Rabilloud, T., C. Valette, and J. J. Lawrence.** 1994. Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis* **15**:1552-8.
108. **Raoult, D., P. E. Fournier, M. Drancourt, T. J. Marrie, J. Etienne, J. Cosserat, P. Cacoub, Y. Poinsignon, P. Leclercq, and A. M. Sefton.** 1996. Diagnosis of 22 new cases of *Bartonella* endocarditis. *Ann Intern Med* **125**:646-52.
109. **Reed, J. A., D. J. Brigati, S. D. Flynn, N. S. McNutt, K. W. Min, D. F. Welch, and L. N. Slater.** 1992. Immunocytochemical identification of *Rochalimaea henselae* in bacillary (epithelioid) angiomatosis, parenchymal bacillary peliosis, and persistent fever with bacteremia. *Am J Surg Pathol* **16**:650-7.

110. **Regnath, T., M. E. Mielke, M. Arvand, and H. Hahn.** 1998. Murine model of *Bartonella henselae* infection in the immunocompetent host. *Infect Immun* **66**:5534-6.
111. **Regnery, R. L., B. E. Anderson, J. E. Clarridge, 3rd, M. C. Rodriguez-Barradas, D. C. Jones, and J. H. Carr.** 1992. Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin Microbiol* **30**:265-74.
112. **Regnery, R. L., J. G. Olson, B. A. Perkins, and W. Bibb.** 1992. Serological response to "*Rochalimaea henselae*" antigen in suspected cat-scratch disease. *Lancet* **339**:1443-5.
113. **Regnery, R. L., J. A. Rooney, A. M. Johnson, S. L. Nesby, P. Manzewitsch, K. Beaver, and J. G. Olson.** 1996. Experimentally induced *Bartonella henselae* infections followed by challenge exposure and antimicrobial therapy in cats. *Am J Vet Res* **57**:1714-9.
114. **Rehm, H. L.** 2000. *Proteinbiochemie/Proteomics*, 3 ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
115. **Relman, D. A., J. S. Loutit, T. M. Schmidt, S. Falkow, and L. S. Tompkins.** 1990. The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N Engl J Med* **323**:1573-80.
116. **Resto-Ruiz, S. I., M. Schmiederer, D. Sweger, C. Newton, T. W. Klein, H. Friedman, and B. E. Anderson.** 2002. Induction of a potential paracrine angiogenic loop between human THP-1 macrophages and human microvascular endothelial cells during *Bartonella henselae* infection. *Infect Immun* **70**:4564-70.
117. **Resto-Ruiz, S. I., D. Sweger, R. H. Widen, N. Valkov, and B. E. Anderson.** 2000. Transcriptional activation of the *htrA* (High-temperature requirement A) gene from *Bartonella henselae*. *Infect Immun* **68**:5970-8.
118. **Riess, T., Andersson, S. G., Lupas, A., Schaller, M., Kyme, P., Martin, J., Walzlein, J. H., Eehalt, U., Lindroos, H., Schirle, M., Nordheim, A., Autenrieth, I. B., Kempf, V. A.** 2004. *Bartonella* adhesin a mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp Med* **200**:1267-78.
119. **Rolain, J. M., M. Maurin, and D. Raoult.** 2000. Bactericidal effect of antibiotics on *Bartonella* and *Brucella* spp.: clinical implications. *J Antimicrob Chemother* **46**:811-4.
120. **Rosenfeld, J., J. Capdevielle, J. C. Guillemot, and P. Ferrara.** 1992. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem* **203**:173-9.
121. **Rosenkrands, I., K. Weldingh, S. Jacobsen, C. V. Hansen, W. Florio, I. Gianetri, and P. Andersen.** 2000. Mapping and identification of *Mycobacterium tuberculosis* proteins by two-dimensional gel

- electrophoresis, microsequencing and immunodetection. *Electrophoresis* **21**:935-48.
122. **Roux, K. H.** 1994. Using mismatched primer-template pairs in touchdown PCR. *Biotechniques* **16**:812-4.
123. **Roux, V., S. J. Eykyn, S. Wyllie, and D. Raoult.** 2000. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in a human. *J Clin Microbiol* **38**:1698-700.
124. **Ruess, M., A. Sander, M. Brandis, and R. Berner.** 2000. Portal vein and bone involvement in disseminated cat-scratch disease: report of 2 cases. *Clin Infect Dis* **31**:818-21.
125. **Sanchez, J. C., V. Rouge, M. Pisteur, F. Ravier, L. Tonella, M. Moosmayer, M. R. Wilkins, and D. F. Hochstrasser.** 1997. Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **18**:324-7.
126. **Sander, A., R. Berner, and M. Ruess.** 2001. Serodiagnosis of cat scratch disease: response to *Bartonella henselae* in children and a review of diagnostic methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **20**:392-401.
127. **Sander, A., A. Zagrosek, W. Bredt, E. Schiltz, Y. Piemont, C. Lanz, and C. Dehio.** 2000. Characterization of *Bartonella clarridgeiae* flagellin (FlaA) and detection of anti-flagellin antibodies in patients with lymphadenopathy. *J Clin Microbiol* **38**:2943-8.
128. **Schagger, H., and G. von Jagow.** 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**:368-79.
129. **Schaible, U. E., H. L. Collins, and S. H. Kaufmann.** 1999. Confrontation between intracellular bacteria and the immune system. *Adv Immunol* **71**:267-377.
130. **Scherer, D. C., I. DeBuron-Connors, and M. F. Minnick.** 1993. Characterization of *Bartonella bacilliformis* flagella and effect of anti-flagellin antibodies on invasion of human erythrocytes. *Infect Immun* **61**:4962-71.
131. **Schmiederer, M., and B. Anderson.** 2000. Cloning, sequencing, and expression of three *Bartonella henselae* genes homologous to the *Agrobacterium tumefaciens* VirB region. *DNA Cell Biol* **19**:141-7.
132. **Schmiederer, M., R. Arcenas, R. Widen, N. Valkov, and B. Anderson.** 2001. Intracellular induction of the *Bartonella henselae* virB operon by human endothelial cells. *Infect Immun* **69**:6495-502.
133. **Schwartzman, W. A.** 1992. Infections due to *Rochalimaea*: the expanding clinical spectrum. *Clin Infect Dis* **15**:893-900.

134. **Schwartzman, W. A., C. A. Nesbit, and E. J. Baron.** 1993. Development and evaluation of a blood-free medium for determining growth curves and optimizing growth of *Rochalimaea henselae*. *J Clin Microbiol* **31**:1882-5.
135. **Schwartzman, W. A., M. Patnaik, N. E. Barka, and J. B. Peter.** 1994. *Rochalimaea* antibodies in HIV-associated neurologic disease. *Neurology* **44**:1312-6.
136. **Shinnick, T. M., M. H. Vodkin, and J. C. Williams.** 1988. The Mycobacterium tuberculosis 65-kilodalton antigen is a heat shock protein which corresponds to common antigen and to the *Escherichia coli* GroEL protein. *Infect Immun* **56**:446-51.
137. **Slater, L. N., D. F. Welch, D. Hensel, and D. W. Coody.** 1990. A newly recognized fastidious gram-negative pathogen as a cause of fever and bacteremia. *N Engl J Med* **323**:1587-93.
138. **Slater, L. N., D. F. Welch, and K. W. Min.** 1992. *Rochalimaea henselae* causes bacillary angiomatosis and peliosis hepatis. *Arch Intern Med* **152**:602-6.
139. **Spach, D. H., A. S. Kanter, M. J. Dougherty, A. M. Larson, M. B. Coyle, D. J. Brenner, B. Swaminathan, G. M. Matar, D. F. Welch, R. K. Root, and et al.** 1995. *Bartonella* (*Rochalimaea*) *quintana* bacteremia in inner-city patients with chronic alcoholism. *N Engl J Med* **332**:424-8.
140. **Spach, D. H., and J. E. Koehler.** 1998. *Bartonella*-associated infections. *Infect Dis Clin North Am* **12**:137-55.
141. **Stoler, M. H., T. A. Bonfiglio, R. T. Steigbigel, and M. Pereira.** 1983. An atypical subcutaneous infection associated with acquired immune deficiency syndrome. *Am J Clin Pathol* **80**:714-8.
142. **Stryer, L.** 1996. *Biochemie*, 4. ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
143. **Teixeira-Gomes, A. P., A. Cloeckert, G. Bezard, R. A. Bowden, G. Dubray, and M. S. Zygmunt.** 1997. Identification and characterization of *Brucella ovis* immunogenic proteins using two-dimensional electrophoresis and immunoblotting. *Electrophoresis* **18**:1491-7.
144. **Tompkins, L. S.** 1997. Of cats, humans, and *Bartonella*. *N Engl J Med* **337**:1916-7.
145. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4350-4.
146. **Umemori, E., Y. Sasaki, K. Amano, and Y. Amano.** 1992. A phage in *Bartonella bacilliformis*. *Microbiol Immunol* **36**:731-6.

147. **VanBogelen, R. A., and F. C. Neidhardt.** 1990. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:5589-93.
148. **VanBogelen, R. A., E. E. Schiller, J. D. Thomas, and F. C. Neidhardt.** 1999. Diagnosis of cellular states of microbial organisms using proteomics. *Electrophoresis* **20**:2149-59.
149. **Waldvogel, K., R. L. Regnery, B. E. Anderson, R. Caduff, J. Caduff, and D. Nadal.** 1994. Disseminated cat-scratch disease: detection of *Rochalimaea henselae* in affected tissue. *Eur J Pediatr* **153**:23-7.
150. **Warren, K., E. Goldstein, V. S. Hung, J. E. Koehler, and W. Richardson.** 1998. Use of retinal biopsy to diagnose *Bartonella* (formerly *Rochalimaea*) *henselae* retinitis in an HIV-infected patient. *Arch Ophthalmol* **116**:937-40.
151. **Washburn, M. P., and J. R. Yates, 3rd.** 2000. Analysis of the microbial proteome. *Curr Opin Microbiol* **3**:292-7.
152. **Wasinger, V. C., S. J. Cordwell, A. Cerpa-Poljak, J. X. Yan, A. A. Gooley, M. R. Wilkins, M. W. Duncan, R. Harris, K. L. Williams, and I. Humphery-Smith.** 1995. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* **16**:1090-4.
153. **Wear, D. J., A. M. Margileth, T. L. Hadfield, G. W. Fischer, C. J. Schlagel, and F. M. King.** 1983. Cat scratch disease: a bacterial infection. *Science* **221**:1403-5.
154. **Webster, G. F., C. J. Cockerell, and A. E. Friedman-Kien.** 1992. The clinical spectrum of bacillary angiomatosis. *Br J Dermatol* **126**:535-41.
155. **Welch, D. F., D. A. Pickett, L. N. Slater, A. G. Steigerwalt, and D. J. Brenner.** 1992. *Rochalimaea henselae* sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis. *J Clin Microbiol* **30**:275-80.
156. **Wessel, D., and U. I. Flugge.** 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**:141-3.
157. **Wildgruber, R., A. Harder, C. Obermaier, G. Boguth, W. Weiss, S. J. Fey, P. M. Larsen, and A. Gorg.** 2000. Towards higher resolution: two-dimensional electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**:2610-6.
158. **Wise, J. K., and J. J. Yang.** 1994. Dog and cat ownership, 1991-1998. *J Am Vet Med Assoc* **204**:1166-7.
159. **Wong, M. T., M. J. Dolan, C. P. Lattuada, Jr., R. L. Regnery, M. L. Garcia, E. C. Mokulis, R. A. LaBarre, D. P. Ascher, J. A. Delmar, J. W. Kelly, and et al.** 1995. Neuroretinitis, aseptic meningitis, and lymphadenitis associated with *Bartonella* (*Rochalimaea*) *henselae* infection in immunocompetent patients

- and patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Clin Infect Dis* **21**:352-60.
160. **Wong, M. T., D. C. Thornton, R. C. Kennedy, and M. J. Dolan.** 1995. A chemically defined liquid medium that supports primary isolation of *Rochalimaea* (*Bartonella*) *henselae* from blood and tissue specimens. *J Clin Microbiol* **33**:742-4.
161. **Young, R. A., and T. J. Elliott.** 1989. Stress proteins, infection, and immune surveillance. *Cell* **59**:5-8.
162. **Zangwill, K. M., D. H. Hamilton, B. A. Perkins, R. L. Regnery, B. D. Plikaytis, J. L. Hadler, M. L. Cartter, and J. D. Wenger.** 1993. Cat scratch disease in Connecticut. Epidemiology, risk factors, and evaluation of a new diagnostic test. *N Engl J Med* **329**:8-13.
163. **Zimmermann, R., V. A. Kempf, E. Schiltz, K. Oberle, and A. Sander.** 2003. Hemin binding, functional expression, and complementation analysis of Pap 31 from *Bartonella henselae*. *J Bacteriol* **185**:1739-44.

## 8. Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Dr. Volkhard Kempf für die sehr gute und engagierte Betreuung dieser Arbeit bedanken. Sein Optimismus und Humor halfen bei der Überwindung von forschungsbedingten Tiefschlägen. Nicht zu vergessen die produktiven aber auch lustigen Kongressbesuche und das Gruppen-Skiwochenende in Vorarlberg!

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Ingo Autenrieth für die Überlassung des interessanten Themas und die Teilnahme am DFG - Graduiertenkollegs „Infektion und Immunität“, die mir ein arbeitsbegleitendes Stipendium ermöglichte.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Jürgen Heesemann, der als Vorsitzender des Graduiertenkollegs „Infektion und Immunität“ und als Vorstand des Max-von-Pettenkofer-Instituts diese Arbeit mit ermöglicht hat und stets mit großem Interesse und Diskussionsbereitschaft den Fortschritt der Arbeit verfolgte.

Herzlichen Dank an Niclas Hitziger, Guntram Grassl, Carolin Wiedig, Uwe Kramer und Sook Trogisch, bei denen ich viel gelernt und mit denen ich vor allem viel gelacht habe.

Dr. Jörg Deiwick („Stulle“) danke ich für die strenge und gründliche Einweisung in die Geheimnisse der 2D-Elektrophorese und die ständige Bereitschaft, Probleme hierbei zu analysieren und zu lösen.

Meinen Mitstreitern Moni Schwienbacher und Bärbel Stecher, die bei der 2D-Elektrophorese bzw. beim Zusammenschreiben mit gelitten und mich dadurch über Wasser gehalten haben.

Allen meinen Freunden, besonders aber Nana Bambuch und Karina Holak, die ich während der Doktorarbeit, der Examszeiten und auch jetzt im Beruf viel zu selten sehe, die aber immer für mich da waren und sind.

Meinem Vater danke ich für das Wecken des wissenschaftlichen Interesses bei mir und für die Vererbung der analytischen Fähigkeiten. Außerdem dafür, dass er immer an meinen Erfolg geglaubt hat.

Meiner Mutter danke ich dafür, dass sie mich immer meinen Weg hat gehen lassen, zuversichtlich war, dass ich das Richtige tue und mich trotz des einen oder anderen Auslandsaufenthalts und Freisemesters immer geduldig unterstützt hat.

Meinem Freund Tommi danke ich dafür, dass er dem Auf und Ab von Examsstress, Fertigstellung der Doktorarbeit, Arbeit usw. nicht nur mit bewundernswerter Ruhe begegnet sondern es auch noch schafft, mich in diesem Trubel zum Lachen zu bringen.

## 9. Publikationen und Kongressbeiträge

Publikation, die aus dieser Arbeit hervorging:

Kempf VAJ, Schaller M, Behrendt S, Volkmann B, Aepfelbacher M, Cakman I, Autenrieth, IB. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. Cell Microbiol 2000;2(5):431-41.

Kongressbeiträge, die aus dieser Arbeit hervorgingen:

Kempf VAJ, Schaller M, Behrendt S, Volkmann B, Aepfelbacher M, Cakman I, Autenrieth, IB. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in an upregulation of bacterial rRNA synthesis. ELSO–Meeting, Geneva, Switzerland, 2.-6. September 2000. In: Eur J Cell Biol, Vol. 79, Suppl. 52, 2000.

Behrendt S, Deiwick J, Kempf VAJ. Proteome analysis of *B. henselae*. 53. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Aachen, 30. September – 4. Oktober 2001

Riess T, Anderson B, Behrendt S, Autenrieth IB, Kempf VAJ. Proteomics and transposon mutagenesis of *Bartonella henselae*. 2nd International Conference Genomics in Infectious Diseases, Würzburg, 1.-3. Mai 2002.

Riess T, Anderson B, Behrendt S, Autenrieth IB, Kempf VAJ. Proteomics and transposon mutagenesis of *Bartonella henselae*. 54. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Heidelberg, 6.-10. Oktober 2002. In: Int J Med Microbiol., Vol. 292, Suppl. 34, 2002.

## 10. Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Sonja Behrendt  
 Adresse: Implersstr. 6  
 81371 München  
 Tel.: 089 48950994  
 E-mail: Sonja.Behrendt@med.uni-muenchen.de  
 Geburtstag: 7. November 1975  
 Geburtsort: München  
 Familienstand: ledig

### SCHULBILDUNG:

1982 -1986 Grundschule, München  
 1986 -1995 Käthe-Kollwitz-Gymnasium, München  
 1995 Abitur, Notendurchschnitt: 1,3

### STUDIUM:

11/1996 –11/2003 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität  
 09/1998 Physikum, Note: 2  
 08/1999 Erstes Staatsexamen, Note: 2  
 09/2002 Zweites Staatsexamen, Note: 1  
 11/2003 Drittes Staatsexamen, Note: 2, Gesamtnote: 1

### PRAKTISCHES JAHR:

10/2002 – 01/2003 Kinderheilkunde: Dr. von Haunersches Kinderspital,  
 München  
 02/2003 – 05/2003 Chirurgie: Great Ormond Street Hospital, London  
 Nussbaumstrasse, München  
 06/2003 – 09/2003 Innere Medizin: Klinikum Starnberg

### PROMOTIONSARBEIT:

02/2000 – 02/2002 "Proteomanalyse von *Bartonella henselae*: Entwicklung neuer proteombasierter Strategien zur Untersuchung von Pathogenitätsfaktoren von *Bartonella henselae* " im Max von Pettenkofer-Institut mit Unterstützung des DFG-Stipendiums im Rahmen des Graduiertenkollegs "Infektion und Immunität".

### KLINISCHE TÄTIGKEIT:

seit 03/2004 Klinikum der Universität München  
 Assistenzärztin im Dr. von Haunerschen Kinderspital