

Proteomuntersuchungen am humanpathogenen Bakterium
Bartonella henselae

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2009

vorgelegt von

Christian Eberhardt

Tag der mündlichen Prüfung:

13. Mai 2009

Dekan:

Prof. Dr. L. Wesemann

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. V. A. J. Kempf

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. M. Duszenko

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhalt:

1	Einleitung	1
1.1	Bakterien der Gattung <i>Bartonella</i>	1
1.1.1	Taxonomie und Geschichte	1
1.1.2	Erkrankungen durch <i>Bartonella bacilliformis</i>	1
1.1.3	Erkrankungen durch <i>Bartonella quintana</i>	2
1.1.4	Erkrankungen durch <i>Bartonella henselae</i>	2
1.1.4.1	<i>B. henselae</i> -Infektionen bei immunkompetenten Patienten - Katzenkratzkrankheit	3
1.1.4.2	<i>B. henselae</i> -Infektionen bei immunsupprimierten Patienten - Bazilläre Angiomatose und Peliosis hepatis	3
1.1.5	Epidemiologie	4
1.1.6	Diagnose und Therapie von <i>Bartonella</i> spp.	4
1.1.7	Pathogenese von <i>Bartonella</i> -Infektionen	5
1.1.7.1	Trimere Autotransporter-Adhäsine von <i>Bartonella</i> spp.	7
1.1.7.2	Typ IV-Sekretionssysteme von <i>Bartonella</i> spp.	7
1.1.7.3	Weitere Pathogenitätsfaktoren von <i>Bartonella</i> spp.	8
1.2	Angiogenese	9
1.2.1	Mechanismen und Regulation der Angiogenese	10
1.2.2	Der Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 (HIF-1)	11
1.2.3	Der Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor- κ B (NF- κ B)	12
1.3	Angiogeneseinduktion durch Infektionserreger	13
1.3.1	Angiogeneseinduktion durch virale Infektionserreger	13
1.3.2	Angiogeneseinduktion durch bakterielle Infektionserreger	14
1.4	Proteomanalyse	16
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Chemikalien	21
2.1.2	Materialien	23
2.1.3	Geräte	24
2.1.4	Bakterienstämme und Zelllinien	26
2.1.4.1	Bakterienstämme	26
2.1.4.2	Zelllinien	26
2.1.5	Kulturmedien, Puffer und Lösungen	27

2.1.5.1	Kulturmedien und Lösungen für die Bakterienkultur.....	27
2.1.5.2	Kulturmedien und Lösungen für die Zellkultur.....	27
2.1.5.3	Lösungen für die 2D-SDS-PA-Gelelektrophorese	28
2.1.5.4	Lösungen zum Herstellen eines Western-Blots.....	29
2.1.5.5	Lösungen zum Entwickeln eines Western-Blots	30
2.1.5.6	Lösungen zum Färben eines Western-Blots	30
2.1.5.7	Lösungen für die Silberfärbung von Proteinen.....	30
2.1.5.8	Lösungen für die Colloidal-Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen	31
2.1.5.9	Lösungen für die S ³⁵ -Markierung von Proteinen	31
2.1.5.10	Lösung für die Dialyse von FCS	32
2.1.5.11	Lösungen für den tryptischen Verdau von Proteinen	32
2.2	Methoden	33
2.2.1	Vorgehensweise bei der Bakterien- und Zellkultur	33
2.2.2	Stammhaltung und Kultivierungsbedingungen von <i>B. henselae</i> Marseille	33
2.2.2.1	Stammhaltung von <i>B. henselae</i>	33
2.2.2.2	Kultivierungsbedingungen von <i>B. henselae</i>	33
2.2.3	Isolierung und Kultivierungsbedingungen von HUVECs.....	34
2.2.3.1	Beschichtung von Zellkulturgefäßen.....	34
2.2.3.2	Isolierung der HUVECs.....	34
2.2.3.3	Kultivierung von HUVECs	34
2.2.3.4	Subkultivierung von HUVECs	34
2.2.3.5	Bestimmung der Lebendzellzahl	35
2.2.4	Infektionsexperimente.....	35
2.2.5	Markierung von <i>B. henselae</i> -Proteinen mit ³⁵ S-Methionin/ ³⁵ S-Cystein.....	35
2.2.5.1	Vorgehensweise beim Umgang mit Radiochemikalien.....	35
2.2.5.2	Dialysieren von FCS.....	35
2.2.5.3	³⁵ S-Markierung mit <i>B. henselae</i> -Proteinen in Kultur mit HUVECs	36
2.2.5.4	³⁵ S-Markierung von <i>B. henselae</i> -Proteinen ohne Kultur mit HUVECs	36
2.2.6	Probenvorbereitung für die 2D-SDS-PA-Gelelektrophorese.....	37
2.2.6.1	Proteinextraktion nicht-radioaktiver <i>B. henselae</i> -Proteine.....	37
2.2.6.2	Proteinextraktion radioaktiver ³⁵ S-markierter <i>B. henselae</i> -Proteine	38
2.2.6.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	38
2.2.6.4	Bestimmung der volumenbezogenen, spezifischen Radioaktivität	38
2.2.6.5	Bestimmung der proteinmassebezogenen, spezifischen Radioaktivität.....	39
2.2.7	Zweidimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-SDS-PAGE).....	39

2.2.7.1	Vorgehensweise bei der zweidimensionalen SDS-PA-Gelelektrophorese	39
2.2.7.2	Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)	39
2.2.7.3	Zweite Dimension: Vertikale SDS-PA-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
2.2.8	Visualisierung von Proteinen in 2D-SDS-Polyacrylamid-Gelen	41
2.2.8.1	Colloidal-Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen in 2D-SDS-PA-Gelen	41
2.2.8.2	Silberfärbung von Proteinen in 2D-SDS-PA-Gelen	42
2.2.8.3	Nachweis von ³⁵ S-radioaktiv markierten Proteinen in 2D-SDS-PA-Gelen	42
2.2.9	Computergestützte Datenanalyse der 2D-SDS-Polyacrylamid-Gele	43
2.2.9.1	Digitalisierung der 2D-SDS-PA-Gele	43
2.2.9.2	Filtern der Abbildungen der 2D-SDS-PA-Gele mittels PDQuest-Software	43
2.2.9.3	Punkt detektion mittels Delta-2D-Software	44
2.2.9.4	Punktbearbeitung mittels Delta-2D-Software	45
2.2.9.5	Punktannotation mittels Delta-2D-Software	45
2.2.9.6	Punktquantifizierung mittels Delta-2D-Software	45
2.2.10	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen - Western-Blot	47
2.2.11	Immundetektion von Proteinen auf PVDF-Membranen	47
2.2.12	Serologische Methoden zum Nachweis von <i>B. henselae</i> -Antikörpern in Patientenseren	48
2.2.13	Färbung von Proteinen auf PVDF-Membranen	49
2.2.13.1	Färbung der Blotmembran mit Ponceau S	49
2.2.13.2	Färbung der Blotmembran mit Amidoschwarz	49
2.2.14	Identifizierung von Proteinen auf PVDF-Membranen	49
2.2.15	Identifizierung von Proteinen mittels MALDI-TOF-MS	49
2.2.15.1	Isolierung und tryptischer Verdau von Proteinen aus 2D-SDS-PA-Gelen	50
2.2.15.2	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	51
2.2.15.3	MALDI-TOF-TOF Massenspektrometrie	52
2.2.15.4	Datenbankabfragen und Identifizierung der Proteine	52
2.2.16	Charakterisierung der Proteine durch <i>In-silico</i> -Analyse	53
3	Ergebnisse	54
3.1	Etablierung der Methode der zweidimensionalen SDS-PA-Gelelektrophorese	54
3.2	<i>In-silico</i>-Untersuchung des <i>B. henselae</i>-Proteoms	58
3.3	Untersuchung des <i>B. henselae</i>-Proteoms mittels 2D-SDS-PAGE	61
3.4	Hypothetische <i>B. henselae</i>-Proteine	63
3.5	Untersuchung der Immunreaktivität des <i>B. henselae</i>-Proteoms mit Patientenseren ...	83

3.6	Untersuchung des im Infektionsverlauf mit Endothelzellen ³⁵ S-radioaktiv markierten <i>B. henselae</i> -Proteoms mittels 2D-SDS-PAGE	94
4	Diskussion	114
4.1	Etablierung der Methode der zweidimensionalen SDS-PA-Gelelektrophorese.....	114
4.2	Untersuchung des <i>B. henselae</i> -Proteoms mittels 2D-SDS-PAGE.....	119
4.3	Untersuchung der Immunreaktivität des <i>B. henselae</i> -Proteoms mit Patientenseren.	123
4.4	Untersuchung des im Infektionsverlauf mit Endothelzellen ³⁵ S-radioaktiv markierten <i>B. henselae</i> -Proteoms mittels 2D-SDS-PAGE	128
5	Zusammenfassung.....	140
6	Literatur.....	142
7	Danksagung	164
8	Anhang	166

Abkürzungen:

In dieser Arbeit wurden SI-Einheiten sowie deren Vorsätze zur Bezeichnung von Vielfachen und Teilen der Basiseinheiten verwendet und diese sind hier nicht gesondert aufgeführt. Ebenso wurde auf die Erläuterung der gebräuchlichen Abkürzungen der deutschen Sprache verzichtet.

(v/v)	Volumenanteil pro Volumen
(w/v)	Massenanteil pro Volumen
% C	Anteil Bisacrylamid an Polyacrylamidmatrix
% T	Anteil Polyacrylamid
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
2D-LC	zweidimensionale Flüssigkeitschromatografie
2D-PAGE	zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese
2-ME	2-Mercaptoethanol
ad	lat.: zu
ADM	Adrenomedullin
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i> (erworbenes Immunschwäche-syndrom)
AK	Antikörper
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARNT	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i> (Transkriptionsfaktor)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BA	Bazilläre Angiomatose
BadA	<i>Bartonella</i> -Adhäsion A
Bep	<i>Bartonella</i> -transloziertes Effektorprotein
bp	Basenpaare (Einheit für Kettenlänge von Doppelstrang-DNA und RNA)
PH	Peliosis hepatitis
BSA	bovines Serumalbumin
CAI	<i>codon adaptation index</i> (Codonanpassungs-Index)
cAMP	cyclisches Adenosin-5'-monophosphat
CBB	Coomassie Brilliant Blue
cDNA	komplementäre DNA
CFU	<i>colony forming unit</i> (Kolonie-bildende Einheit)

CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonium]-propansulfonat
CLSM	<i>confocal laser scanning microscopy</i> (konfokale Laser-Raster-Mikroskopie)
CMP	<i>cytoplasmic membrane protein</i> (Protein der zytoplasmatischen Membran)
cpm	<i>counts per minute</i> (Ereignisse pro Minute)
Da	Dalton (= g/ mol)
DAB	3,3`-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DAPI	4`-6-Diamidino-2-phenylindol
DIF	Doppelimmunfluoreszenz
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
D-PBS	Dulbecco - PBS
DTNB	5,5`-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
DTE	1,4-Dithioerythritol (<i>erythro</i> -1,4-Dimercapto-2,3-butandiol)
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol (<i>threo</i> -1,4-Dimercapto-2,3-butandiol)
DUF	<i>domain of unknown function</i> (Proteindomäne unbekannter Funktion)
ECAT	<i>element coded affinity tag labelling</i> (Element-kodierte Affinitätsmarkierung)
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N`,N`-tetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
ESI-MS	<i>electrospray ionization mass spectrometry</i> (Elektrospray Ionisations-Massenspektrometrie)
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.: und andere)
etc.	<i>et cetera</i> (lat.: und so weiter)
EZ	Endothelzelle
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> (Fibroblast-Wachstumsfaktor)
FIH-1	<i>factor inhibiting HIF-1</i> (HIF-1 inhibierender Faktor)
FITC	Flouresceinisothiocyonat
Fn	Fibronectin
g	Erdbeschleunigung
GRAVY	<i>grand average of hydropathy</i> (Maß für die Hydropathie eines Proteins)
HHV-8	Humanes Herpesvirus-8
HIF	<i>hypoxia inducible factor</i> (Hypoxie induzierbarer Faktor - cytosolisches Monomer eines Transkriptionsfaktors)

HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> (Humanes Immundefizienz-Virus)
HRE	<i>hypoxia responsive element</i> (Hypoxie-Reaktionselement)
HRP	<i>horse-radish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i> (Endothelzelle der humanen Nabelschnurvene)
IAP	<i>inhibitor of apoptosis proteins</i> (Inhibitoren-Proteine der Apoptose)
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i> (interzelluläres Adhäsionsmolekül)
ICAT	<i>isotope coded affinity tag labelling</i> (Isotopen-kodierte Affinitätsmarkierung)
IEF	isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IGFBP-3	<i>Insulin-like growth factor binding protein-3</i> (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor Bindeprotein-3)
IFT	Immunfluoreszenz-Test
IgG	Immunglobulin G
IκB	<i>Inhibitor of κB</i> (Inhibitor von κB)
IL	Interleukin
IPG	immobilisierter pH-Gradient
kb	Kilobasen oder Kilobasenpaare (= 10 ³ Nukleotide oder Basenpaare)
KKK	Katzenkratzkrankheit
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
MW	Molekulargewicht
MALDI-TOF-MS	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i> (Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie)
MOI	<i>multiplicity of infection</i> (Anzahl der Bakterien pro Wirtszelle)
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
MS	Massenspektrometrie
MudPIT	<i>multidimensional protein identification technology</i> (mehrdimensionale Proteinidentifizierungs-Technologie)
M/Z	Masse/Ladung
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i> (Nuklearfaktor-κB - cytosolisches Monomer eines Transkriptionsfaktors)
OD	optische Dichte
OMP	<i>outer membrane protein</i> (Protein der äußeren Membran)
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)

p.a.	<i>per analysis</i> (Analysequalität)
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PHD	Prolylhydroxylase
p.i.	<i>post infectionem</i> (lat.: nach Infektion)
pI	isoelektrischer Punkt
PLGF	<i>placental growth factor</i> (Placenta-Wachstumsfaktor)
PMF	<i>peptide mass fingerprint</i> (charakteristische Zusammensetzung der Peptide nach proteolytischem Verdau)
ppm	<i>parts per million</i> (100 ppm = 0,1 %)
PTS	Phosphotransferasesystem
PVDF	Polyvinylidenfluorid
q.s.	<i>quantum satis</i> (lat.: ausreichend)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i> (ribosomale Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
SILAC	<i>stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i> (stabile Isotopenmarkierung mit Aminosäuren in Zellkultur)
SDS	Natriumdodecylsulfat
spp.	Spezies
TIVSS	Typ IV-Sekretionssystem
TAA	trimeres Autotransporter-Adhäsion
TBP	Tributylphosphin
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TCP	Tris-(2-cyanoethyl)-phosphin
TEMED	N,N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGFβ-1	<i>transforming growth factorβ-1</i> (transformierender Wachstumsfaktor β-1)
TLR	<i>toll like receptor</i> (Rezeptor auf der Zelloberfläche)
TNF	Tumornekrosefaktor
TMT	<i>tandem mass tag</i> (Massemarkierung für Massenspektrometrie)
TOF	<i>time of flight</i> (Flugzeit)

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> (Einheit)
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (vaskulärer Endothelzell-Wachstumsfaktor)
WT	Wildtyp
YadA	<i>Yersinia</i> -Adhäsion A

1 Einleitung

1.1 Bakterien der Gattung *Bartonella*

1.1.1 Taxonomie und Geschichte

Bei *Bartonella* spp. handelt es sich um stäbchenförmige, Gram-negative, aerob und fakultativ intrazellulär wachsende Bakterien, die der Klasse der α 2-Proteobakterien angehören und phylogenetisch eng mit *Brucella* spp., *Agrobacterium* spp. und *Rhizobium* spp. verwandt sind. Bis 1993 war *B. bacilliformis* der einzige Vertreter der Gattung *Bartonella*. Aufgrund molekulargenetischer Untersuchungen wurden die Gattungen *Rochalimaea* und *Grahamella* in die Gattung *Bartonella* überführt [25, 28, 231].

Derzeit umfasst diese Gattung 20 Arten, von denen 9 als humanpathogen eingeordnet sind: *B. bacilliformis*, *B. quintana*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. elizabethae*, *B. koehlerae*, *B. grahamii*, *B. vinsonii* und *B. washoensis* [69].

Die pathogenen *Bartonella* spp. sind innerhalb der Säugetiere auf bestimmte Reservoirwirte spezialisiert, bei denen sie die Endothelzellen und die Erythrozyten besiedeln. Letztlich resultiert die Infektion in einer langanhaltenden, intraerythrozytären Bakteriämie [72]. Die weitere Übertragung erfolgt dann vorwiegend durch blutsaugende Arthropoden (Flöhe, Zecken, Läuse, Sandfliege). Die Infektion von Fehlwirten kann zu verschiedensten klinischen Manifestationen führen [69, 139]. Einzigartig unter allen bakteriellen Infektionserregern sind die Bakterien *B. henselae*, *B. quintana* und *B. bacilliformis* durch die Fähigkeit, beim Menschen angioproliferative Krankheitsbilder auszulösen.

1.1.2 Erkrankungen durch *Bartonella bacilliformis*

Das Bakterium *B. bacilliformis* nutzt den Menschen als Reservoirwirt und verursacht die Carrionsche Krankheit [14]. Die Übertragung von Mensch zu Mensch erfolgt durch die Sandfliege (*Lutzomyia verrucarum*), die nur endemisch in den Hochlagen der Anden vorkommt [7]. Diese zweiphasige Erkrankung äußert sich zunächst in der akuten, oftmals letalen Phase durch eine hämolytische Anämie mit begleitenden Fieberschüben (Oroya-Fieber). Die folgende chronische Phase ist neben der persistierenden Bakteriämie durch lokalisierte Manifestationen „Verruga peruana“ an Gesicht und Extremitäten in Form von angioproliferativen, nodulösen Papeln (Peru-Warze) charakterisiert [11, 199, 259].

1.1.3 Erkrankungen durch *Bartonella quintana*

Auch das Bakterium *B. quintana* nutzt den Menschen als Reservoirwirt, wird aber durch die Kleiderlaus (*Pediculus humanus corporis*) von Mensch zu Mensch übertragen [15]. *B. quintana* verursacht das Fünftagefieber, das durch periodische, im Abstand von etwa fünf Tagen auftretende Fieberschübe, plötzlich einsetzende heftige Kopf- und Gliederschmerzen und eine aseptische Meningitis charakterisiert ist [16].

Durch die schlechten hygienischen Verhältnisse bedingt, trat diese Infektionskrankheit epidemisch bei Soldaten während des napoleonischen Russlandfeldzuges [250] und bei den Alliierten Truppen während des ersten Weltkrieges auf (Wolhynisches Fieber, Schützengrabenfieber) [209]. Heute entstammen Patienten mit *B. quintana*-Infektionen sozial benachteiligten Gruppen mit zeitweisem Befall mit Läusen [30, 138, 307]. Das Bakterium *B. quintana* verursacht neben der persistierenden Bakteriämie [72] auch Endokarditiden [3, 178] sowie vaskuloproliferative Krankheitsbilder wie Bazilläre Angiomatose (BA) [167].

1.1.4 Erkrankungen durch *Bartonella henselae*

Der natürliche Reservoirwirt von *B. henselae* ist die Katze (*Felis catus*). In dieser verursacht der Erreger eine asymptomatische Bakteriämie [165]. Die Übertragung von *B. henselae* auf den Fehlwirt Mensch erfolgt entweder indirekt durch den Katzenfloh (*Ctenocephalides felis*) [267] oder direkt durch Kratz- und Bissverletzungen von infizierten Katzen [54, 55].

Für den Krankheitsverlauf einer *B. henselae*-Infektion ist der Immunstatus des Patienten von entscheidender Bedeutung. Bei immunkompetenten Patienten äußert sich eine Infektion als zumeist selbstlimitierende Katzenkratzkrankheit (KKK) [68]. Bei immunsupprimierten Patienten hingegen, wie beispielsweise AIDS-Patienten, treten persistierende Bakteriämien mit vaskuloproliferativen Läsionen auf [29, 166, 251, 309].

Zudem ist *B. henselae* neben *B. quintana* eine Hauptursache für kulturnegative Endocarditis bei insbesondere obdachlosen, alkoholkranken Individuen. Es wird angenommen, dass *Bartonella* spp. für 3 - 4 % der Endocarditis-Fälle verantwortlich ist [3, 56, 178].

Das Bakterium *B. henselae* wurde 1990 erstmals beschrieben [253, 254] und bereits ein Jahr später gelang die Kultur aus vaskuloproliferativen Läsionen von Patienten [167, 342]. Da seitdem *B. henselae* zunehmend an medizinischer Bedeutung gewinnt, wird das Bakterium auch als „*new emerging pathogen*“ bezeichnet [10, 167].

1.1.4.1 *B. henselae*-Infektionen bei immunkompetenten Patienten - Katzenkratzkrankheit

Besonders junge Kinder mit Kontakt zu Katzen erkranken an der Katzenkratzkrankheit (KKK). Nach Infektion mit *B. henselae* kommt es zunächst zur Bildung einer Papel an der Inokulationsstelle. Dieser kann eine meist selbstlimitierende Schwellung der lokalen Lymphknoten (Lymphadenopathie) folgen (Abb. 1) [16]. Zusätzliche Symptome wie Fieber, Kopfschmerzen, Übelkeit, Gewichtsverlust und Splenomegalie (Vergrößerung der Milz) treten bei ungefähr der Hälfte der Patienten auf. In ungefähr 11 % der Fälle kommt es zu einem atypischen Verlauf der KKK mit Parinaudschem okuloglandulären Syndrom, Hepatosplenomegalie oder neurologischen Komplikationen wie Enzephalitis oder Meningitis [39, 103, 293, 348].

1.1.4.2 *B. henselae*-Infektionen bei immunsupprimierten Patienten - Bazilläre Angiomatose und Peliosis hepatis

Eine besondere Eigenschaft von *B. henselae* ist die Fähigkeit, angioproliferative Krankheitsbilder hervorzurufen. Man unterscheidet dabei die „Bazilläre Angiomatose“ (BA), die sich mit vaskuloproliferativen Symptomen an der Haut manifestiert, von der „*Peliosis hepatis*“ (PH) bei einem Befall der inneren Organe, z.B. Leber (Abb. 1) [10]. Solche Manifestationen einer *B. henselae*-Infektion treten vor allem bei Patienten mit verminderter zellulärer Immunität auf, z.B. AIDS-Patienten [61]. Die BA wird deshalb entsprechend der Richtlinien des U.S. Center for Disease Control and Prevention als AIDS definierende Krankheit eingestuft. In sehr seltenen Ausnahmefällen können auch immunkompetente Patienten an BA erkranken [60, 169].

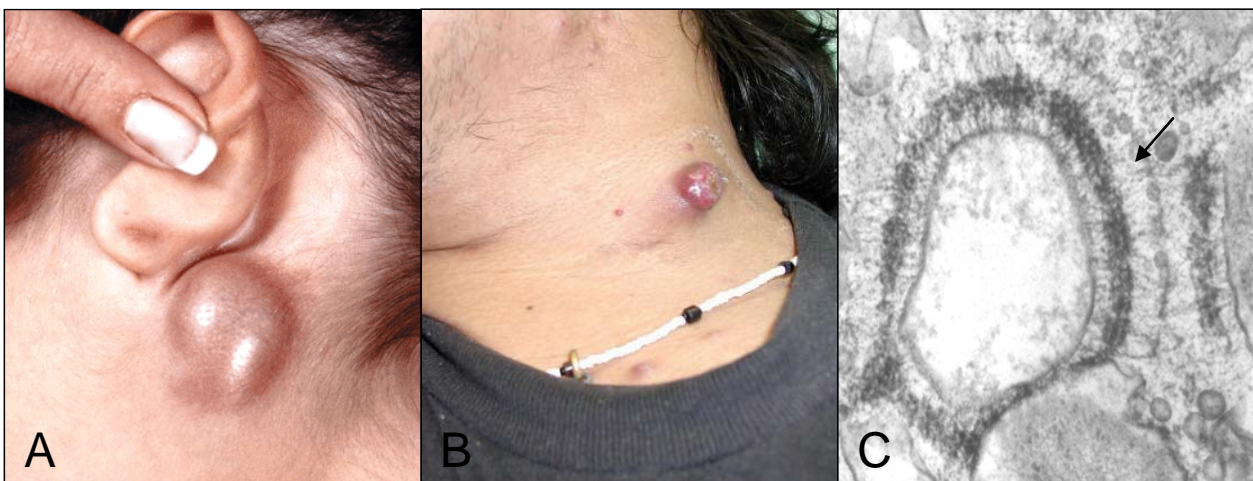


Abb. 1: Klinische Manifestationen von *B. henselae*-Infektionen. Gezeigt sind (A) Katzenkratzkrankheit mit Lymphadenopathie bei einem sonst gesunden Kind nach *B. henselae*-Infektion [83]; (B) Kutane Form der bazillären Angiomatose [206] und (C) *B. henselae* als elektronenmikroskopische Abbildung mit gut erkennbarem *Bartonella*-Adhäsion A (Aufnahme Heinz Schwarz 2007 Photo 27791/ ES-4).

Bei der BA wird eine kutane Form mit einzeln oder multipel auftretenden rötlichen kutanen oder subkutanen Läsionen [181] von einer parenchymatösen Form differenziert, bei der ausschließlich innere Organe wie Milz, Lymphknoten oder Knochenmark betroffen sind [341]. Die bazilläre PH hingegen ist eine durch zystisch-gekammerte, blutgefüllte Endothelzell-Proliferationen gekennzeichnete Hepatopathie und wird als Sonderform der BA betrachtet [166, 169, 293, 304, 315]. Auch *B. quintana* kann eine im klinischen und histopathologischen Bild vergleichbare BA verursachen [167, 201].

1.1.5 Epidemiologie

In Abhängigkeit von der geographischen Lage und von der Bewertungsgrenze besitzen ungefähr 6 - 30 % der gesunden Blutspender in Europa *Bartonella*-spezifische Antikörper [48]. Ungefähr 13 % der unklaren, Kultur-negativen Halslymphknotenschwellungen lassen sich auf *Bartonella*-Infektionen zurückführen [261].

Etwa 80 % der KKK-Fälle treten bei Kindern auf, die meist vor Erkrankung Kontakt zu Katzen hatten [354]. Es wird davon ausgegangen, dass ca. 30 % der Hauskatzen in den USA chronisch und asymptomatisch mit *B. henselae* infiziert sind [171]. Die Seroprävalenz in der Freiburger Region liegt mit ca. 13 % deutlich niedriger [273]. In den USA schätzt man die Anzahl der jährlichen Erkrankungen an KKK auf 22000 Fälle, von denen ungefähr 2000 stationär behandelt werden müssen [137, 165].

1.1.6 Diagnose und Therapie von *Bartonella* spp.

Die KKK wird meist nur symptomatisch therapiert, treten Komplikationen auf, wird antibiotisch mit Makrolid-Antibiotika behandelt. Das Auftreten einer BA und PH erfordert immer eine meist dreiwöchige antibiotische Behandlung (Makrolid-, Tetracyclin-, Rifamycin-Antibiotika), was in der Regel zu einer vollständigen Rückbildung der vaskuloproliferativen Läsionen führt [1, 10]. Entscheidend bei der Wahl des Antibiotikums ist das Erreichen einer ausreichenden intrazellulären Wirkstoffkonzentration.

Die derzeitige klinische Diagnose von *Bartonella*-Infektionen basiert entweder auf der Kultivierung des Erregers, auf PCR-Techniken, oder auf Immunfluoreszenztests (IFT). Dabei hat sich der indirekte serologische Erregernachweis mittels IFT als Standardmethode etabliert und basiert auf dem Nachweis von gegen *Bartonella* spp. gerichteten Antikörpern im Patientenserum [48]. So wurden mittels IFT bei Patienten mit KKK in ca. 80 % der Fälle Antikörper gegen *B. henselae* festgestellt [252]. Der IFT besitzt eine sehr hohe Sensitivität, jedoch ist die Durchführung zeitintensiv und das Ergebnis unterliegt stark der subjektiven Beurteilung der

untersuchenden Person. Zudem sind Kreuzreaktivitäten der Antikörper gegenüber weiteren humanpathogenen Bakterien wie *Coxiella burnetii*, *Chlamydia spp.*, *Rickettsia rickettsii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Treponema pallidum*, *Francisella tularensis* sowie *Mycoplasma pneumoniae* bekannt [65, 79, 213].

Der direkte Nachweis des Erregers kann durch die Anzucht [308] oder durch den DNA-Nachweis mittels PCR, z.B. über die Amplifikation der 16S rRNA-Gene, erfolgen [8, 80, 210]. Beide Verfahren machen jedoch einen invasiven Eingriff notwendig. Für die technisch aufwändige kulturelle Anzucht von *Bartonella spp.* werden Wachstumsbedingungen mit längeren Inkubationsphasen von 21 d bis 45 d empfohlen [177, 308]. Deswegen gilt die Erregeranzucht für *Bartonella*-Infektionen nicht als effektive und reproduzierbare diagnostische Methode [177, 211].

1.1.7 Pathogenese von *Bartonella*-Infektionen

Nach einer *Bartonella spp.*-Infektion der natürlichen Reservoirwirte kommt es zu einer Besiedlung der Endothelzellen und der Erythrozyten und zu einer langanhaltenden, intraerythrozytären Bakteriämie [72]. Bei einer *B. henselae*-Infektion der Katze als natürlichem Reservoirwirt wurde eine unmittelbare Invasion der Bakterien in die Erythrozyten gezeigt [214]. Bei einer *B. henselae*-Infektion des Fehlwirtes Mensch war das nicht der Fall - jedoch erfolgt die Ausbildung einer langanhaltenden, intraerythrozytären Bakteriämie in immunsupprimierten Individuen wahrscheinlich über die CD34⁺-Vorläuferzellen der Erythrozyten [135, 202]. Letztlich stellen die Endothelzellen die Zielzellen einer *Bartonella spp.*-Infektion in allen Reservoirwirten dar [69]. Auch beim Menschen konnte *B. henselae* in engem Kontakt zum proliferierenden Endothel nachgewiesen werden [10].

Für *B. bacilliformis*, *B. quintana* und *B. henselae* wurde gezeigt, dass die Invasion in Endothelzellen sowohl über den klassischen Invasionsprozess einer Bakterien-vermittelten Endozytose [77] oder über die Aufnahme sogenannter „Invasomen“ erfolgen kann [31, 74, 327]. Letzterer Mechanismus ermöglicht durch Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts die Internalisierung ganzer Bakterien-Aggregate [74]. In den Endothelzellen konnte die intrazelluläre Replikation mikroskopisch über die Zunahme der Bakterienzahl von *B. henselae* und *B. quintana* sowie indirekt durch Quantifizierung der bakteriellen rRNA verfolgt werden [31, 158]. In Endothelzellen internalisierte *B. henselae* replizieren wesentlich schneller als auf unbelebten Standardnährböden [158].

Erste Einblicke in die beteiligten Pathogenitätsstrategien von *Bartonella spp.* wurden durch *In-vitro*- und *In-vivo*-Infektionsmodelle ermöglicht und einige Virulenzfaktoren konnten beschrieben werden (Tab. 1). Davon sind lediglich zwei genauer untersucht - das trimäre

Autotransporter-Adhäsın *Bartonella*-Adhäsın A (BadA) [262] und das VirB/VirD4-Typ IV-Sekretionssystem (VirB/VirD4-TIVSS) [281].

Tab. 1: Übersicht über genetisch determinierte Pathogenitätsfaktoren von *Bartonella* spp.

Bezeichnung	Spezies	Charakterisierung	Funktion	Referenz
BadA	<i>B. henselae</i>	<i>Bartonella</i> -Adhäsın A Außenmembranprotein	Adhärenz an Zellen und extrazelluläre Matrixproteine, Induktion der proangiogenetischen Reaktion	[262]
VompA-D	<i>B. quintana</i>	<i>variably expressed outer membrane protein A-D</i>		[291, 357]
BrpA-C	<i>B. vinsonii</i>	<i>Bartonella repeat proteins</i> (BrpA-C) (VompA-D, BrpA-C homologe Proteine zu BadA)		[102]
BepA-G	<i>B. henselae</i>	<i>Bartonella effector protein A-G</i> , durch VirB-TIVSS sekretiert	Rearrangements des Zytoskeletts (Bildung des Invasoms), Hemmung der Apoptose	[289]
VirB/VirD4-TIVSS	<i>B. henselae</i> <i>B. quintana</i> <i>B. tribocorum</i>	Typ IV-Sekretionssystem (VirB2-10/VirD4)	Translokation der Beps/ Vermittlung der Bep-abhängigen Wirtszellantworten/ NF-κB abhängige proinflammatorische Wirtszellantwort	[235, 281, 290]
Vbh-TIVSS	<i>B. tribocorum</i> <i>B. schoenbuchensis</i>	VirB-homologous-TIVSS (Homologien zu VirB/VirD4-TIVSS)	evtl. Translokation von Substraten	[272]
Trw-TIVSS	<i>B. henselae</i> <i>B. quintana</i> <i>B. tribocorum</i>	hohe Sequenzhomologie zum Konjugationssystem R388 von <i>E. coli</i>	Kontakt/Vermittlung der erythrozytären Infektion	[299]
LPS	<i>B. henselae</i> , <i>B. quintana</i>	niedrig-endotoxisches LPS	Vermeidung des septischen Schocks während der Bakteriämie	[245, 356]
Deformin	<i>B. bacilliformis</i>	1,4 kDa-36 kDa Protein/ Proteinkomplex	Deformierung der Erythrozytenmembran	[76, 352]
Hämolysin	<i>B. bacilliformis</i>	Hämolysin	kontaktvermittelte Hämolyse	[122, 131]
IalA-B	<i>B. bacilliformis</i>	Invasin	Eindringen in Erythrozyten	[218, 219]
Iba	<i>B. henselae</i>	Autotransporter	Autotransporter/ mögliches Adhäsın	[71, 300]
Fla	<i>B. bacilliformis</i> <i>B. clarridgeiae</i>	Flagellum (unipolar)	Beweglichkeit/ Bindung an Erythrocyten	[274, 278]
OMP43	<i>B. henselae</i>	43 kDa, äußeres Membranprotein	Adhärenz an Endothelzellen	[33, 34]
Pap31	<i>B. henselae</i>	Hämin-Bindeproteine	Kontaktvermittlung mit Wirtszelle über Fn-Bindung/ Hämin-Bindung	[46, 67, 359]
HbpA	<i>B. quintana</i>			

Verwendete Abkürzungen: BadA, *Bartonella*-Adhäsın A; Vomp, *variably expressed outer membrane protein*; TAA, Trimeres Autotransporter-Adhäsın; Bep, *Bartonella-effector protein*, OMP, *outer membrane protein*; Pap, *phage-associated membrane protein*.

1.1.7.1 Trimere Autotransporter-Adhäsine von *Bartonella* spp.

Die Trimeren Autotransporter-Adhäsine (TAAs) sind bedeutende Pathogenitätsfaktoren Gram-negativer Bakterien und bilden charakteristische trimere Außenmembranproteine mit einer Kopf-Stiel-Anker-Architektur (*head-stalk-anchor*) [127, 191]. Das bislang irrtümlich als „Pilus“ beschriebene *Bartonella*-Adhäsin A (BadA) ist ein Vertreter dieser TAA [19, 262]. Es ist mit ca. 340 kDa ein außerordentlich großes Protein in der äußeren Membran von *B. henselae* und weist sequenzielle und strukturelle Homologien zu dem am besten charakterisierten TAA, dem *Yersinia*-Adhäsin A (YadA) von *Yersinia enterocolitica*, auf [262].

Das stark immunogene BadA wird während des Infektionsverlaufes exprimiert, bindet an Komponenten der extrazelluläre Matrix (Fibronectin, Kollagen) und vermittelt so maßgeblich die Interaktion des Bakteriums mit der Wirtszelle. Nur BadA-exprimierende Bartonellen führten zu einer Aktivierung des Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktors-1 (*hypoxia-inducible factor-1*, HIF-1), dem „Hauptschalter“ des Angiogenese-Programms, um schließlich eine HIF-1-abhängige proangiogenetische Wirtszellantwort auszulösen. Lediglich bei Infektion von Epithelzellen mit BadA-positiven *B. henselae* konnte eine Sekretion von proangiogenetischen Zytokinen „*vascular endothelial growth factor*“ (VEGF), Adrenomedullin (ADM) beobachtet werden [262]. BadA-homologe Proteine wurden in *B. quintana* als „*variably expressed outer membrane proteins*“ (VOMPs) [357] und in *B. vinsonii* als „*Bartonella repeat proteins*“ (BrpA-C) [102] beschrieben. Kürzlich wurde gezeigt, dass auch ein zu BadA-homologes Protein bei *B. tribocorum* einen essentiellen Pathogenitätsfaktor für die Ausbildung einer Bakteriämie darstellt [272].

1.1.7.2 Typ IV-Sekretionssysteme von *Bartonella* spp.

Verschiedene pathogene Bakterien besitzen Typ IV-Sekretionssysteme (TIVSS), um bakterielle Effektormoleküle wie Proteine oder an Proteine gekoppelte Transfer-DNA in Wirtszellen zu injizieren und schließlich deren Zellfunktionen zu beeinflussen. Diese vielseitigen Transportsysteme haben sich aus den bakteriellen Konjugationsapparaten entwickelt [47, 57].

B. henselae besitzt zwei verschiedene TIVSS, wobei das VirB/VirD4-TIVSS zu dem von *A. tumefaciens* homolog ist [282], das Trw-TIVSS ist hingegen mit dem Trw-Konjugationssystem von *E. coli* verwandt [299].

Das VirB/VirD4-TIVSS von *B. henselae* ist ein Komplex aus mehreren Proteinen. Diese bilden zusammen einen nadelartigen Pilus, der den anfänglichen Kontakt zur Wirtszelle vermittelt, und einen kanalartigen Porenkomplex, welcher beide Membranen der bakteriellen Zellhülle durchspannt und schließlich bestimmte bakterielle, zytoplasmatische Proteine in das Wirtszellzytoplasma

transloziert [57, 69, 73]. Als Substrate des VirB/VirD4-TIVSS konnten die Effektorproteine BepA-G (*Bartonella-translocated effector proteins*) identifiziert werden [289].

Das VirB/VirD4-TIVSS ist für eine Reihe von spezifischen Endothelzell-Reaktionen im Infektionsverlauf mit *B. henselae* verantwortlich. Dazu zählen (i) Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts mit der Bildung der bakteriellen Aggregate und der Invasom-vermittelten Aufnahme von *B. henselae* in Endothelzellen [281], (ii) Aktivierung der Transkriptionsfaktor-NF- κ B-abhängigen proinflammatorischen Endothelzellantwort [281] mit der verstärkten Expression der Adhäsionsproteine E-Selektin, ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) auf der Endothelzelloberfläche [94] sowie der Sekretion diverser Zytokine (z.B. IL-8) [281] und (iii) Apoptoseinhibition durch die Translokation des BepA, das die Caspase-3/-7-Aktivierung hemmt [281]. Letzteres sichert das Überleben der Endothelzellen und trägt somit indirekt zur den *Bartonella*-induzierten Vaskuloproliferationen bei [161, 280, 289]. Die mitogene Stimulation der Endothelzellen ist jedoch unabhängig von diesem TIVSS [281, 289].

Das Trw-TIVSS besitzt alle Komponenten eines TIVSS-Porenkomplexes, jedoch fehlt der für eine Translokation notwendige Substratrezeptor (VirD4-Homolog). Soweit bekannt, transloziert das Trw-TIVSS keine Effektorproteine, ist aber dennoch für die Invasion von *B. henselae* in Erythrozyten und die Ausbildung der intraerythrozytären Bakteriämie verantwortlich [288, 299]. Ein drittes TIVSS, Vbh-TIVSS wurde zuerst bei *B. tribocorum* identifiziert und danach bei anderen *Bartonella* spp. nachgewiesen [272]. Es weist starke Homologien zu dem beschriebenen VirB/VirD4-TIVSS auf. Es wird vermutet, dass es sich um ein funktionelles, Substrat-translozierendes TIVSS handelt [272].

1.1.7.3 Weitere Pathogenitätsfaktoren von *Bartonella* spp.

Weitere Pathogenitätsfaktoren von *B. henselae* sind verschiedene Außenmembranproteine (*outer membrane proteins*, OMPs) [33], die eine proinflammatorische Wirtszellantwort in Endothelzellen [94] und eine Endothelzellproliferation [62] induzieren. Das 43 kDa-Außenmembranprotein bindet neben anderen OMPs besonders stark an Endothelzellen und stellt eines der wesentlichen Adhäsine dar [33, 34].

Das Wachstum von *B. henselae* ist stark Hämin-abhängig. Mindestens fünf Außenmembran-assoziierte Proteine von *B. henselae* binden Hämin, wobei besonders dem Pap31 eine Bedeutung in der Hämin-Bereitstellung zukommt [359] und auch für *B. quintana* wurden solche Hämin-Bindeproteine nachgewiesen [46].

Die durch *Bartonella* spp. verursachte Bakteriämie verursacht keinen septischen Schock, ein Phänomen, das bei einer Vielzahl von anderen humanpathogenen Erregern beobachtet wird. Dies

lässt sich mit der strukturell bedingten, geringen endotoxischen Aktivität des LPS erklären. Diese endotoxische Aktivität ist, gemessen an der TLR4-Reaktion (*toll like receptor*), 1000 - 10000fach schwächer als die des enterobakteriellen LPS [207, 356], so dass im Falle von *Bartonella quintana* das LPS als natürlicher TLR4-Antagonist diskutiert wurde [245].

Der sekretierte, bakterielle Pathogenitätsfaktor Deformin wurde im Kulturüberstand von *B. henselae* und *B. bacilliformis* gefunden. Dabei handelt es sich um ein hydrophobes Molekül, welches Vertiefungen in der Membran der Erythrozyten verursacht [22, 76]. Auch wenig charakterisiert ist der aus den beiden Genen *ialA* und *ialB* bestehende Invasion-assoziierte Locus (*ial*). Dieser ist in der Gattung *Bartonella* konserviert und möglicherweise an der Invasion in die Erythrozyten beteiligt [218]. Über die Rolle der *iba*-Genprodukte (*inducible Bartonella autotransporter*) ist nicht viel bekannt, jedoch werden diese verstärkt während der Infektion von Endothelzellen exprimiert, was eine Beteiligung am Infektionsverlauf nahelegt [300].

Das phylogenetisch älteste Bakterium der Gattung, *B. bacilliformis*, nimmt in mancherlei Hinsicht eine Sonderstellung ein - als einziger Vertreter der Gattung besitzt es überhaupt kein TIVSS, hat aber, wie auch *B. clarridgeiae*, eine hohe Beweglichkeit aufgrund mehrerer unipolarer Flagellen [278], die auch zu der Invasion in die Erythrozyten beitragen [216]. Im Gegensatz zu den anderen *Bartonella* spp., bei denen die Invasion in die Erythrozyten einen nicht hämolytischen Verlauf nimmt [170, 290], exprimiert *B. bacilliformis* das Hämolysin, das für die starke hämolytische Anämie des Oroya-Fiebers wesentlich ist [122].

1.2 Angiogenese

Die Entstehung der Blutgefäße während der Embryonalentwicklung umfasst zunächst die Vaskulogenese, worunter man die Bildung eines primären Gefäßnetzes aus endothelialen Vorläuferzellen versteht [41]. Dieser schließt sich dann die Angiogenese und Arteriogenese an. Dabei expandiert das noch unreife Gefäßbett durch Sprossung aus bereits bestehenden Gefäßen und reift zu einem System stabiler Gefäße heran [40, 264].

Dieses angiogenetische Wachstum geschieht durch eine gesteuerte Abfolge von Migration und Proliferation der Endothelzellen, die die Gefäßwände auskleiden, und mündet in die Differenzierung organspezifischer Kapillarstrukturen. Diesem Prozess der Angiogenese kommt während der Embryonalentwicklung eine äußerst wichtige Rolle zu, da das kardiovaskuläre System als erstes funktionierendes Organsystem die Versorgung aller entstehender Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen sicherstellt [264].

Die Hypoxie stellt einen entscheidenden Stimulus für die Expansion des Gefäßbettes dar. Übersteigt die Gewebedicke wachstumsbedingt das Diffusionsvermögen des Sauerstoffs, wird

neues Gefäßwachstum durch die Aktivierung des Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktors-1 (*hypoxia-inducible factor-1*, HIF-1) eingeleitet. Dieser Transkriptionsfaktor kontrolliert eine Vielzahl von Genen, deren Genprodukte eine angioproliferative Wirkung zeigen [246]. Dabei kommt dem proangiogenetisch wirksamen VEGF (*vascular endothelial growth factor*) eine herausragende Bedeutung zu [43].

Beim Erwachsenen tritt Angiogenese üblicherweise nur im Verlauf des weiblichen Menstruationszyklus, während der Schwangerschaft und bei Wundheilungsprozessen auf [40] und ein Ungleichgewicht im Wachstum von Blutgefäßen führt zu verschiedenen Krankheitsbildern [40]. So ist Angiogenese im Zusammenhang mit einer Vielzahl von pathologischen Vorgängen, wie bei neoplastischen [92] und entzündlichen Erkrankungen (Psoriasis, Arthritis, Arteriosklerose), zu beobachten [42, 44]. Hingegen kann auch eine unzureichende Vaskularisierung die Ursache für diverse Krankheiten darstellen, z.B. koronare Herzerkrankungen [44]. Bei Durchblutungsstörungen aufgrund des Mangels an Blutgefäßen könnte in Zukunft eine gezielte, lokale Stimulation der Angiogenese als mögliche Therapie in Frage kommen [184].

Eine wichtige Voraussetzung zur Ausbildung solider Tumore ist eine ausreichende Vaskularisierung des entstehenden Gewebes [44]. Die Grenze der Sauerstoffdiffusion im Gewebe liegt bei 100 - 200 µm. Wenn ein Tumor diese Größe erreicht hat, so muss er zwangsläufig Angiogenese induzieren, um über diese Größe hinauswachsen zu können [44].

1.2.1 Mechanismen und Regulation der Angiogenese

Die physiologische und pathologische Angiogenese wird ausgelöst, wenn sich das Gleichgewicht von proangiogenetischen Zytokinen und antiangiogenetischen Zytokinen zugunsten der Induktion der Angiogenese verschiebt („*angiogenic switch*“) [117]. Unter den proangiogenetischen Zytokinen kommt dabei VEGF eine zentrale Bedeutung zu [44, 264].

Die bedeutendste Gruppe der proangiogenetischen Zytokine stellt die durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 regulierte Familie der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) dar, die ihre Wirkung über Rezeptor-Tyrosinkinasen (VEGF-Rezeptor-1, -2) vermitteln. Zu der VEGF-Familie gehören neben VEGF-A, -B, -C, -D, -E auch die plazentalen Wachstumsfaktoren 1 und 2 (*placenta growth factor*, PLGF-1, -2). VEGF-A spielt eine Schlüsselrolle bei der Induktion des Blutgefäßwachstums [186], hingegen regulieren VEGF-C und VEGF-D das Lymphgefäßwachstum [155]. Darüber hinaus stimulieren auch die Zytokine FGF (*fibroblast growth factor*) sowie EGF (*epidermal growth factor*) die Angiogenese [264].

Auf der Seite der antiangiogenetisch wirksamen Zytokine sind u.a. die von Monozyten, Makrophagen, Blutplättchen, Mastzellen, Tumorzellen und hämatopoetischen Zellen gebildeten Zytokine Endostatin, Angiostatin, Vasostatin, Tumstatin, Thrombospondin und Interferon- γ zu nennen [44].

Erfolgt ein solcher proangiogenetischer Stimulus, müssen die Endothelzellen aus ihren gereiften Strukturen austreten und ein neues Gefäßwachstum durch koordinierte Sprossung herbeiführen. Dies bedingt zunächst, dass der Kontakt der Endothelzelle zu der umgebenden extrazellulären Matrix durch Proteinasen gelöst wird [41]. Dann sind die Endothelzellen befähigt, an einem provisorisch angelegten Gerüst, bestehend aus Komponenten der extrazellulären Matrix, z.B. Fibronectin, Fibrin, in das umgebende Gewebe einzuwandern [128], wobei ein gerichtetes Wachstum des Kapillarsprosses durch kontaktabhängige Rezeptor-Liganden-Systeme kontrolliert wird. Nach Abschluss der Sprossung und nach Ausbildung des Gefäßlumens reifen die Endothelzellen wieder zu einem funktionellen und belastbaren Gefäß aus.

Dabei bewirken die Zytokine VEGF und Angiopoetin sowie die Wechselwirkung zwischen muralen Zellen (Perizyten, glatte Muskelzellen) mit den Endothelzellen eine Stabilisierung des noch unreifen Endothels [264]. Die Perizyten stabilisieren die Kapillarstruktur, indem sie den Endothelzellen aufgelagert sind und mit ihren Fortsätzen das neugebildete Gefäß umfassen [42, 91, 140]. Zudem hemmen Kontakte zwischen muralen und endothelialen Zellen über TGF β -1 (*transforming growth factor β -1*) eine weitere Proliferation der Endothelzellen [264]. Dieser angiogenetische Prozess endet schließlich mit einem gereiften und stabilisierten Gefäß.

1.2.2 Der Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 (HIF-1)

Der Hypoxie-induzierbare Faktor-1 (HIF-1) ist der bedeutendste Transkriptionsfaktor bei der Angiogenese [296], da er die Expression verschiedener proangiogenetischer Zytokine reguliert, z.B. VEGF [82, 87], ADM (Adrenomedullin) [45, 162] und IGFBP-3 (*Insulin-like growth factor binding protein-3*) [260, 279].

Unter hypoxischen Bedingungen wird der Transkriptionsfaktor HIF-1 sofort aktiviert [297]. In seiner aktiven Form bildet der Transkriptionsfaktor ein Heterodimer aus einer HIF-1 α - und einer HIF-1 β -Untereinheit, letztere wird auch als ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) bezeichnet [246, 337]. Beide Untereinheiten werden konstitutiv exprimiert, jedoch liegt unter Normoxie nur die nukleäre HIF-1 β Untereinheit in konstanter Konzentration in der Zelle vor. Die zytosolische Untereinheit HIF-1 α hingegen wird durch eine O₂-abhängige Hydroxylierung zweier Prolylreste durch die Prolylhydroxylase PHD-2 (*prolyl hydroxylase domain protein-2*) und eine O₂-abhängige Hydroxylierung eines Asparaginylrestes durch die Asparaginylhydroxylase

FIH-1 (*factor inhibiting HIF-1*) reguliert. Die beteiligten Fe(II)-abhängigen Hydroxylasen (Dioxygenasen) benötigen Sauerstoff und 2-Oxoglutarat als Kosubstrate und produzieren CO₂ und Succinat als Nebenprodukte. Unter normoxischen Bedingungen vermittelt die Hydroxylierung der zwei Prolylreste von HIF-1 α durch die PHD-2 die Bindung des „von Hippel-Lindau“- Tumorsuppressorproteins, was zu einer Ubiquitinylierung und einem schnellen proteasomalen Abbau des HIF-1 α führt [130, 134, 136]. Die Hydroxylierung des Asparaginyrestes von HIF-1 α durch FIH-1 blockiert die Bindung des 300 kDa-Koaktivatorproteins (p300) und des CBP (*Cyclic AMP Response Element-Binding Protein*), was schließlich die Transkriptionsaktivität des HIF-1 Heterodimers vermindert [148, 180, 200]. Dieser duale Regulationsmechanismus verknüpft die Verfügbarkeit von molekularem Sauerstoff in der Zelle über die Aktivität der HIF-Hydroxylasen mit der HIF-abhängigen Transkription und letztlich mit der Sekretion von angiogenetischen Wachstumsfaktoren [149, 246, 313].

Bleibt unter hypoxischen Bedingungen die Hydroxylierung der HIF-1 α -Untereinheit aus, wird aufgrund der Kernlokalisationssequenz die Untereinheit vom Zytoplasma in den Zellkern transportiert [148], die Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β assoziieren und bilden das aktive HIF-1 Heterodimer. Dieses bindet an seine spezifische HRE-Erkennungssequenz (*hypoxia responsive element*) in der Promotorregion der Zielgene und die Transkription dieser Hypoxie-induzierbaren Gene wird initiiert [296].

Die durch HIF induzierten Gene stellen das Überleben der Zelle unter hypoxischen Bedingungen kurzfristig und langfristig sicher. Kurzfristig reguliert der Transkriptionsfaktor HIF-1 den Stoffwechsel der Zellen entsprechend des aktuellen Sauerstoffangebotes und ermöglicht, z.B. die Bewältigung eines Sauerstoffmangels mittels anaerober Energiegewinnung durch die Aktivierung von Genen der Glykolyse. Langfristig leitet HIF-1 die Angiogenese mit Aussprossung neuer Gefäße ein und sichert so der Zelle eine ausreichende Sauerstoffversorgung [295, 297].

1.2.3 Der Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor- κ B (NF- κ B)

Der Nukleäre Faktor- κ B (NF- κ B) stellt einen weiteren bedeutenden Transkriptionsfaktor für die Angiogenese dar. Verschiedene mikrobielle Strukturen, z.B. bakterielle Lipopolysaccharide sowie diverse Zytokine, z.B. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1), aktivieren NF- κ B [187]. NF- κ B reguliert verschiedene Gene, deren Genprodukte an einer Reihe von Vorgängen wie der Angiogenese, der Apoptoseinhibition und der inflammatorischen Immunantwort beteiligt sind [4, 298, 360]. Von besonderem Interesse ist die anti-apoptotische Wirkung von NF- κ B (siehe 1.3.1) sowie die Induktion des sowohl proinflammatorischen als auch proangiogenetischen Zytokins IL-8 [164]. In den meisten Zellen schützt eine NF- κ B-Aktivierung vor Apoptose [101, 154], da eine

verstärkte Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*) [335] sowie Proteinen der Bcl-2-Familie [121, 182] stattfindet.

NF- κ B ist ein Heterodimer, das sich aus verschiedenen Untereinheiten zusammensetzen kann [101]. Derzeit sind fünf Untereinheiten von NF- κ B bekannt: NF- κ B1 (Alternativbezeichnung p50 bzw. p105), NF- κ B2 (p52 bzw. p100), RelA (p65), RelB und c-Rel [154], wobei das Heterodimer aus den p65/p50-Untereinheiten am häufigsten vorkommt. Durch Bindung an seinen spezifischen Inhibitor κ B (I κ B) wird NF- κ B inaktiviert und im Zytoplasma zurückgehalten [4]. Nach Phosphorylierung von I κ B durch IKK (I κ B-Kinase-Komplex) und dessen anschließender Ubiquitinylierung und Degradierung durch das Proteasom wird NF- κ B freigesetzt und vom Zytoplasma in den Zellkern transportiert. Schließlich bindet der Transkriptionsfaktor an der Promotorregion vieler Zielgene und initiiert deren Transkription [100, 154, 236]. Eine weitere Regulation der Transkriptionsaktivität erfolgt durch Phosphorylierung seiner DNA-bindenden Untereinheiten, was die Bindung von DNA als auch von Koaktivatoren beeinflusst [284].

1.3 Angiogeneseinduktion durch Infektionserreger

1.3.1 Angiogeneseinduktion durch virale Infektionserreger

Einige virale Infektionen führen zu Erkrankungen, die sich in pathologischen angiogenetischen Veränderungen manifestieren. Am besten bekannt sind die Infektionserreger Humanes Herpesvirus-8 (HHV-8) und Orf-Virus.

Das HHV-8, auch als Kaposi-Sarkom Herpesvirus bekannt, ist ein opportunistischer Krankheitserreger, der erst bei einer Schwächung des Immunsystems, z.B. bei AIDS-Patienten, zur Entstehung sogenannter Kaposi-Sarkome führt, die sich durch starke Endothelzell-Proliferation auszeichnen [276]. HHV-8 ist ein Herpesvirus, das ein großes doppelsträngiges DNA-Genom besitzt [188]. Es kann latent in den B-Lymphozyten verweilen und später in die lytische Phase übergehen. Die DNA dieses HHV-8 wurde 1994 aus Tumoren eines Patienten mit Kaposi-Sarkom isoliert [50] und es konnte nachgewiesen werden, dass das virale Genom exprimiert wird [90]. HHV-8 kodiert Faktoren, die anti-apoptotisch und proliferativ auf die Endothelzellen wirken [90]. So wurde z.B. ein viraler G-Protein-gekoppelter Rezeptor (*viral G-protein-coupled receptor*, vGPCR) als virales Onkogen in den HHV-8-infizierten Zellen nachgewiesen. Dieser aktiviert HIF-1 α und führt durch VEGF-Expression und Sekretion zur Angiogenese [13, 306].

Das Orf-Virus ist ein epitheliotropes Parapox-Virus, das bei Schafen, Ziegen und Menschen Hautläsionen infiziert und in regenerierenden epidermalen Keratinozyten repliziert. Diese Läsionen zeichnen sich durch starke Proliferation und Dilatation von Kapillaren aus [215]. Das Orf-Virus ist ein Parapox-Virus, das mit 140 kb ein relativ kleines doppelsträngiges DNA-Genom besitzt [114].

Dieses kodiert bereits das angioproliferativ wirksame VEGF-E, ein neues Mitglied der VEGF-Familie [196]. Dieses VEGF-E verhält sich biologisch wie das proangiogenetische Schlüsselzytokin VEGF-A (siehe 1.2.1) d.h. es bindet an den VEGF-Rezeptor 2 und induziert die Proliferation der Endothelzellen [215, 233].

Somit resultieren die viralen Infektionen (HHV-8, Orf-Virus) in einer Sekretion der proangiogenetischen Zytokine VEGF-A bzw. VEGF-E und erklärt die vaskuloproliferativen Läsionen.

1.3.2 Angiogenesinduktion durch bakterielle Infektionserreger

Für bakterielle Infektionen sind solche Erkrankungen mit pathologischen angiogenetischen Veränderungen bislang lediglich für *B. bacilliformis*, *B. quintana* und *B. henselae*, den Erregern der vaskuloproliferativen Erkrankungen Verruga peruana, BA und PH bekannt [96, 168, 209].

In-vitro-Untersuchungen ergaben, dass sich mindestens drei verschiedene Mechanismen in der Induktion der vaskuloproliferativen Erkrankungen BA und PH durch *B. henselae* überlagern: (i) direkte Stimulation der Endothelzellproliferation, (ii) Hemmung der Endothelzellapoptose und (iii) Auslösung der Sekretion vaskuloproliferativer Zytokine, jedoch ist der genaue Mechanismus, durch den *B. henselae* die Stimulation der Endothelzellproliferation herbeiführt, noch nicht bekannt. In *In-vitro*-Experimenten wurde gezeigt, dass ein Trypsin-sensitiver, mitogener Aktivator in der partikulären, nicht zytoplasmatischen Fraktion von *B. henselae* die Endothelzellproliferation bewirkt [62, 197]. Auch resultiert eine *B. henselae*-Infektion in einem gesteigerten zellulären Sauerstoffverbrauch [157] und es konnte nachgewiesen werden, dass bei einer *B. henselae*-Infektion eine Hypoxie-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 stattfindet [157]. Zudem kommt es im Infektionsverlauf mit *B. henselae* zur TIVSS-abhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B [281].

Diese HIF-abhängige proangiogenetische Endothelzellantwort sowie die NF- κ B-abhängige proinflammatorische Endothelzellantwort während einer *B. henselae*-Infektion äußert sich letztlich in der Sekretion parakrin wirkender proangiogenetischer Zytokine wie VEGF und IL-8, die ihrerseits wieder eine starke Endothelzellproliferation herbeiführen [157, 159, 255].

Die Induktion der Endothelzellproliferation durch *B. henselae*, *B. quintana* und *B. bacilliformis* [62, 96, 197, 237] stellt eine bislang einzigartige Pathogenitätsstrategie humanpathogener Bakterien dar. Durch die Ausbildung vaskuloproliferativer, tumoröser Strukturen sichert sich der Erreger sein eigenes Habitat. Eine ähnliche Strategie ist für das nahe verwandte Pflanzenpathogen *Agrobacterium tumefaciens* bekannt, welches das Wachstum der Wurzelhalsgalle auslöst [53]. Dabei wird Protein-gebundene Transfer-DNA von *A. tumefaciens* nach TIVSS-abhängiger

Translokation stabil ins Pflanzengenom integriert. Diese DNA kodiert für wachstumsanregende Auxine und Zytokinine der Pflanze und führt zur Bildung eines vaskulären Pflanzentumors, mit dem sich *A. tumefaciens* in ähnlicher Weise sein eigenes Habitat sichert.

Die Bakterien *B. henselae* und *A. tumefaciens* sind phylogenetisch eng miteinander verwandt und verfügen beide über ein homologes VirB/VirD4-TIVSS [9, 235, 282]. Aufgrund des Vergleiches der Pathogenitätsstrategie beider Bakterien wurde das „paracrine-loop“-Modell (Abb. 2) postuliert. Dieses Modell zeigt die Analogien bei der Induktion der Wirtszellproliferation beider Bakterien [156]. Entsprechend des Modells führt die Infektion der Wirtszelle durch *B. henselae* zur Bildung von Wachstumsfaktoren, z.B. VEGF, welche anschließend die Endothezellen zur Proliferation anregen und damit letztendlich zur Angiogenese führen.

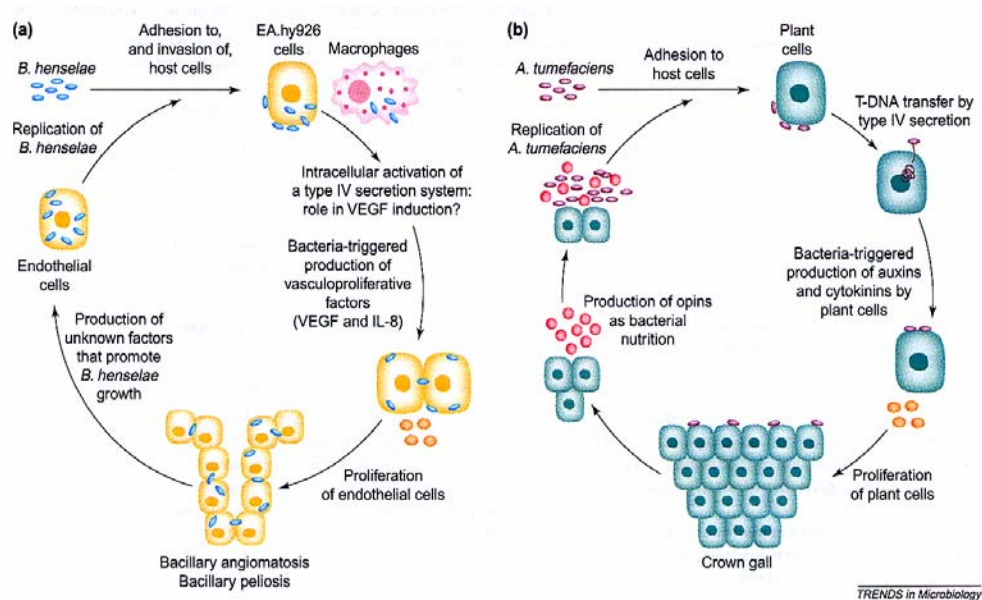


Abb. 2: Vergleich der Pathogenitätsmechanismen von *B. henselae* und *A. tumefaciens*. (a) Das „paracrine loop“-Modell für die Induktion von Vaskuloproliferationen durch *B. henselae* sowie (b) das „Opin-Konzept“ von *A. tumefaciens*. Die jeweils übereinstimmenden Schritte der Pathogenitätsmechanismen beider Erreger sind nebeneinander schematisch dargestellt. Nach der Infektion der Wirtszellen verursachen beide Pathogene die Produktion von bestimmten Wachstumsfaktoren (*B. henselae*: VEGF, *A. tumefaciens*: Auxine und Zytokine), welche zur Proliferation von Wirtszellen führen (*B. henselae*: „Bazilläre Angiomatose“ von Endothelzellen, *A. tumefaciens*: „Wurzelhalsgalle“ von Pflanzenzellen). Beide stark vaskularisierten Tumore bieten optimale bakterielle Wachstumsbedingungen, indem sie die Pathogene mit Nährstoffen versorgen. Die Substrate, die das Wachstum von *B. henselae* in Endothelzellen bedingen, sind bislang nicht bekannt - Abbildung entnommen [156].

1.4 Proteomanalyse

Die Gesamtheit aller aus einem Genom resultierenden Proteine wird als Proteom bezeichnet [340], wobei das Proteom im Gegensatz zu dem relativ statischen Genom sehr dynamisch ist. Die Proteomanalyse, auch „Proteomics“ genannt, umfasst alle Methoden zur quantitativen und qualitativen Untersuchung der Proteine bzw. Proteinspezies eines Organismus zu einem definierten Zeitpunkt und unter definierten Bedingungen [241, 347]. Der Begriff Proteinspezies bezeichnet eine bestimmte Isoform eines Proteins. Diese Isoformen können durch posttranskriptionale Modifikationen (z.B. Spleißen bei mRNA-Prozessierung) sowie durch kotranslationale (z.B. N-terminale Methioninspaltung, N-terminale N-Acetylierung) bzw. posttranslationale Modifikationen (z.B.: O-Phosphorylierung, N-Phosphorylierung, N-Methylierung) gebildet werden. Da Proteine direkt und unmittelbar an der Ausführung der meisten Funktionen der Zelle beteiligt sind, spiegelt sich der aktuelle Zustand einer Zelle (z.B. Phase im Zellzyklus, Stress) zu einem definierten Zeitpunkt sehr genau durch die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Proteine wider.

Neben den erst kürzlich aufgekommenen 2D-LC-Technologien, die enzymatisch hydrolysierte Proteine mit Flüssigkeits-Chromatographie trennen und schließlich die Peptide mittels massenspektrometrischer Methoden wie ESI-MS (*electrospray ionization mass spectrometry*, Elektrospray Ionisations-MS) oder MALDI-TOF-MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*, Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie) identifizieren [194, 310], stellt die zweidimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-SDS-PAGE) [108] in Kombination mit o.g. massenspektrometrischen Methoden [2] eine weit verbreitete und sehr aussagekräftige Methode dar, um vergleichende Momentaufnahmen der Proteine eines Organismus, eines Gewebes, eines Zellverbandes o.ä. zu erstellen.

Unabhängig von der verwendeten Methode gestaltet sich jegliche Proteomanalyse technisch schwierig, da die Größenordnung verschiedener zeitgleich exprimierter Proteine einer Zelle unter definierten biologischen Bedingungen von einer Anzahl mehrerer tausend Proteine (Prokaryoten), bzw. zehntausender Proteine (Eukaryoten) (z.B. Haushaltsproteine), bis hinunter zu weniger als 100 Kopien reicht (z.B. Rezeptor- und Regulatorproteine). Da die meisten Methoden einen eingeschränkten dynamischen Bereich besitzen, ist es schwierig, diese Proteine mit niedriger Kopienanzahl nachzuweisen. Zudem stellt das Proteingemisch einer Zelle eine Mischung von physikochemisch heterogenen Molekülen dar, deren gesamtheitliche Erfassung mit lediglich einer Trennmethode schwer beizukommen ist.

Die zweidimensionale Gelelektrophorese wurde ursprünglich 1975 von P. H. O'Farrell und J. Klose [163, 232] eingeführt. Jedoch fand die 2D-SDS-PAGE als biochemische Trennmethode erst nach Einführung von immobilisierten pH-Gradienten (IPG) bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) [104, 107], der Entwicklung von neuen massenspektrometrischen Techniken wie MALDI-TOF-MS [125, 153, 314] bzw. ESI-MS [86] sowie verbesserter Computer-, Software- und Datenbankentwicklungen eine weitere Verbreitung. Zudem sind in den letzten Jahren zunehmend Genomsequenz-Daten einer Vielzahl von Organismen verfügbar, was eine schnellere Identifikation der Proteine erlaubt.

Mittels 2D-SDS-PAGE können tausende verschiedener Proteine bzw. Proteinspezies komplexer Proteinmischungen nach isoelektrischem Punkt (pI), Molekulargewicht (MW), Löslichkeit und relativer Häufigkeit gleichzeitig aufgetrennt werden. Dabei werden die Proteine zunächst im ersten Schritt entsprechend des isoelektrischen Punktes (pI) mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) und nachfolgend im zweiten Schritt entsprechend des Molekulargewichtes (MW) mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt. Dies ergibt eine sehr genaue Auftrennung nicht nur einzelner Proteine, sondern auch einzelner Proteinspezies, welche bei Detektion (z.B. Färbung, Autoradiografie) auf dem 2D-Gel als einzelne Punkte erscheinen. In Abhängigkeit von der verwendeten Gelgröße und des verwendeten pH-Gradienten können mehr als 5000 Proteinpunkte aufgetrennt und detektiert werden (Nachweisgrenze < 1 ng Protein) [108]. Die anschließende Identifizierung der Proteine bzw. Proteinspezies erfolgt üblicherweise nach enzymatischer Hydrolyse mittels massenspektrometrischer Verfahren sowie Datenbanksuchen der gemessenen und oftmals charakteristischen Peptidmassen eines Proteins, des Peptidmassen-Fingerabdruckes (*peptide mass fingerprint*, PMF), mit theoretisch erstellten Massen aller fragmentierter Proteine. Zudem können die Sequenzen einzelner Peptide durch eine weitere Fragmentierung mittels sogenannter Tandem-Massenspektrometrie durch Kollision mit inerten Gasen gewonnen werden.

Die besondere Stärke der 2D-SDS-PAGE liegt in der Auftrennung intakter Proteine. Somit spiegeln sich Änderungen im Expressionsniveau in der Intensität der Proteinpunkte wider. Mögliche Isoformen der Proteine, die sich aus der Genomsequenz nicht ableiten lassen, z.B. Proteinmodifikationen, sind gut nachzuweisen, da diese meist als zusätzliche Punkte auf dem 2D-Gel erscheinen. Demnach erfasst diese Technik sehr übersichtlich die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Proteinmischung. Diese Erkenntnisse erlauben schließlich eine genaue Charakterisierung des momentanen Zustandes einer Zelle bzw. des Gewebes. Da einige Proteine in denaturierter Form schlecht löslich sind, kann sich die Trennung intakter Proteine auch nachteilig auswirken, z.B. bei hydrophoben Membranproteinen [220, 275].

Dieses Problem wird bei den auf LC-MS basierenden Methoden, genauer den 2D-LC-Technologien wie z.B.: MudPIT (*multidimensional protein identification technology*) [339, 349] vermieden, indem die Peptide enzymatisch hydrolysierter Proteine einer Probe mittels Flüssigkeitschromatografie getrennt und letztlich mittels massenspektrometrischer Methoden (ESI-MS/ MALDI-TOF-MS) identifiziert werden. Quantitative Daten für vergleichende Proteomuntersuchungen können aber nur gewonnen werden, wenn diese Technik mit chemischen Markierungsverfahren wie ICAT-Markierung (*isotope coded affinity tag labelling*) [111, 112], ECAT-Markierung (*element coded affinity tag labelling*) [345], TMT-Markierung (*tandem mass tag*) [318] oder aber metabolischen Markierungsverfahren wie SILAC (*stable isotope labeling with amino acids in cell culture*) [234, 338] kombiniert wird.

Die Vorstellung, mit der Sequenzierung eines Genoms das „Buch des Lebens“ zu verstehen, ist bereits überholt - zunehmend muss man wissen, aus welchem „Kapitel“ die Zelle „liest“. Da diese Information aus Proteomanalysen gewonnen werden kann, finden diese z.B. bei der Aufklärung der Zelldifferenzierung [51, 328, 351], der Erkennung von frühen Krankheitsanzeichen [118, 133, 183], der Wirkstoffentdeckung [305, 312, 353] und bei der Impfstoffentwicklung [120, 147, 350] eine breite Anwendung.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die auf 2D-Gelelektrophorese basierende Proteomanalyse mit anschließender massenspektrometrischer Identifizierung der getrennten Proteine stellt einen geeigneten experimentellen Ansatz dar, um anhand der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung des Proteingehaltes den jeweiligen physiologischen Zustand eines Organismus zu charakterisieren [37, 108]. *B. henselae* besitzt neben *B. quintana* und *B. bacilliformis* die unter humanpathogenen Bakterien einzigartige Fähigkeit vaskuloproliferative Krankheitsbilder auszulösen, jedoch ist über den zu Grunde liegenden pathogenetischen Mechanismus noch immer wenig bekannt [69].

In dieser Arbeit sollte die Zusammensetzung des *B. henselae*-Proteoms im Infektionsverlauf mit Endothelzellen, den eigentlichen Zielzellen einer *Bartonella* spp.-Infektion, charakterisiert werden. Dazu sollten *in vitro* *B. henselae* in Gegenwart von Endothelzellen (HUVECs) kultiviert, die im Infektionsverlauf neu synthetisierten bakteriellen Proteine ³⁵S-radioaktiv markiert und anschließend mittels 2D-SDS-PAGE getrennt werden. Die zwischen den zwei Vergleichszuständen (*B. henselae* –/+ HUVECs) unterschiedlich stark auftretenden Proteine stellen somit Proteine dar, die während der Infektion reguliert werden und somit möglicherweise als *B. henselae*-Pathogenitätsfaktoren fungieren. Diese Proteine sollten mittels MALDI-TOF-MS identifiziert werden.

Weiterhin sollte die Reaktivität gegen *B. henselae* gerichteter Seren analysiert und die während des Infektionsverlaufs *in vivo* exprimierten, immunogenen *B. henselae*-Proteine identifiziert werden. Die derzeitige diagnostische Standardmethode für *B. henselae*-Infektionen basiert auf dem indirekten serologischen Nachweis von gegen *Bartonella* spp. gerichteten Antikörpern im Patientenserum [48] mittels Immunfluoreszenztests (IFT). Dieser IFT liefert stark subjektiv bewertete Ergebnisse und Kreuzreaktivitäten gegenüber weiteren humanpathogenen Bakterien sind bekannt [65, 79, 213]. Zukünftig könnten deshalb die immunreaktiven *B. henselae*-Proteine in serologischen Untersuchungen als Markerproteine für die Diagnose von *B. henselae*-Infektionen verwendet werden. Dazu sollte in dieser Arbeit zunächst eine 2D-Proteomkarte von *B. henselae* erstellt werden. Dies umfasst die Auftrennung des gesamten Proteoms von *B. henselae* mittels 2D-SDS-PAGE und die Identifizierung aller detektierbaren Proteine mittels MALDI-TOF-MS, was nicht nur Einblicke in die Zusammensetzung der *B. henselae*-Proteoms ermöglicht, sondern darüber hinaus in Kombination mit 2D-Immunoblot-Verfahren unter Verwendung entsprechender Patientenseren den Nachweis der *in vivo* exprimierten immundominanten *B. henselae*-Antigene erlaubt.

Dazu sollte ein 2D-SDS-PAGE-System etabliert werden, das zugleich eine zuverlässige, reproduzierbare Trennung, eine hohe Nachweisempfindlichkeit sowie eine exakte Quantifizierbarkeit kleinster, analytischer Proteinmengen des komplexen Gemischs ³⁵S-radioaktiv markierter Proteine sowie eine anschließende zuverlässige, reproduzierbare Trennung großer, präparativer Proteinmengen des komplexen Gemischs nicht radioaktiver Proteine für die massenspektrometrische Identifikation möglich macht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien in *p.a.*-Qualität verwendet.

<u>Chemikalien:</u>	<u>Hersteller:</u>
α -Cyano-4-hydroxymizimtsäure	Merck, Darmstadt
ϵ -Aminocaprinsäure	Applichem, Darmstadt
Acetonitril <i>p. a.</i>	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/ Bisacrylamid (30,8 % T/ 2,6 % C)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Merck, Darmstadt
Amidoschwarz	Serva, Heidelberg
Ammoniumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Butanol	Merck, Darmstadt
CHAPS	Fluka, Buchs, Schweiz
Coomassie Brilliant Blau G 250	Serva, Heidelberg
L-Cystin x 2HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Cystein x HCl x H ₂ O	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAB	Applichem, Darmstadt
DAPI	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
DTT	Fluka, Buchs, Schweiz
DTNB	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO	Fluka, Buchs, Schweiz
Dry Strip Cover Fluid	GE Healthcare, München
EDTA	Applichem, Darmstadt
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Glutardialdehyd	Merck, Darmstadt

Harnstoff	MP Chemicals, Eschwege
Iodacetamid	Fluka, Buchs, Schweiz
IPG-Puffer 4 - 7	GE Healthcare, München
IPG-Puffer 6 - 9	GE Healthcare, München
L-Methionin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat x 3H ₂ O	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat x 5H ₂ O	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat x 5H ₂ O	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pharmalyte 3 - 10	GE Healthcare, München
Phosphorsäure (ortho-Phosphorsäure)	Merck, Darmstadt
Ponceau S	Applichem, Darmstadt
Protease Inhibitor Complete	Roche, Mannheim
Rediview Promix L- ³⁵ S-Methionine/ L- ³⁵ S-Cysteine	GE Healthcare, München
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Sulfosalicyläure	Applichem, Darmstadt
TBP	Fluka, Buchs, Schweiz
TCA	Merck, Darmstadt
TCP	ABCR, Karlsruhe
TCEP	Fluka, Buchs, Schweiz
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
TFA	Merck, Darmstadt
Thioharnstoff	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris (Trizma Base)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Merck, Darmstadt

2.1.2 Materialien

Enzyme, Proteine, Antikörper und Lösungen:

BSA
 FCS
 Kollagen-G-Stammlösung 0,4 % (w/v)
 Magermilchpulver
 polyklonaler Kaninchen-anti-Mensch-IgG
 konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)
 polyklonaler Kaninchen-anti-Mensch-IgG
 konjugiert mit FITC
 Page Ruler-Protein Größenstandard
 Dulbecco-PBS (D-PBS)
 L-Glutamin-Lösung
 Trypsin/EDTA-Lösung für Zellkultur
 Trypsin für Proteinverdau
 RC DC Protein Assay

Hersteller:

Biomol, Hamburg
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Biochrom, Berlin
 Sucofin, Düsseldorf
 Dako, Neuss
 Dako, Neuss
 Fermentas, St.Leon-Rot
 Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
 Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
 Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
 Promega, Madison, USA
 BioRad, München

Verbrauchsmaterialien:

80-cm²-Zellkulturgefäße
 96-Loch-Mikrotiterplatte
 Dialyseschlauch, Spectra Por MWCO 3.500
 Einmalküvetten
 IEF-Elektrodenstreifen
 Immobilon-P-Transfermembran (PVDF)
 Injektionsnadeln 0,80 x 120 mm
 Injektionsspritzen 2 ml
 IPGphor-Streifen 3 - 10/ 4 - 7/ 6 - 9
 LumaPlate 96
 Molekularsieb 3 Å
 Parafilm
 Pasteurpipetten
 Plastikpipetten Costar (5; 10 und 25 ml)
 Reaktionsgefäße (0,2; 0,5; 1,5; 2 ml)
 Reaktionsgefäße (15, 50 ml)
 Skalpell Cutfix®
 Sterilfilter „Stericup“ 0,22 µm 250 ml

Hersteller:

Nunc, Roskilde, DK
 Becton-Dickinson, Heidelberg
 Roth, Karlsruhe
 Sarstedt, Berlin
 GE Healthcare, München
 Millipore, Schwalbach
 Braun, Melsungen
 Braun, Melsungen
 GE Healthcare, München
 Perkin-Elmer LAS, Rodgau-Jügesheim
 Roth, Karlsruhe
 Pechiney Plastic Packaging Menasha, USA
 Hilgenberg, Malsfeld
 Vitaris, Baar
 Eppendorf, Hamburg
 Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg
 Braun, Melsungen
 Millipore, Schwalbach

Whatman-Papier (1,5 mm)	Schleicher&Schuell
Whatman-Papier (0,3 mm)	Schleicher&Schuell
Zellschaber	Becton-Dickinson, Heidelberg

2.1.3 Geräte

Allgemeine Geräte:

Abschirmschild für β -Strahler
 Filme (Kodak X-OMAT)
 Imaging Plate BAS-MS 2025
 BAS 1800 (Reader für Imaging Plate)
 Imaging Plate Cassette 2025
 Imaging Plate Eraser
 Analysenwaage BP610, PT1200
 Brutschrank BBD 6220
 Eppendorfpipetten und Multistepper
 Ettan Dalt 6 Elektrophoreseapparatur
 Ettan Spot Handling Workstation
 Ettan Spot Picker
 Filmentwickler Curix 60
 Geiger-Müller-Zählrohr Rados MicroCont
 Geldokumentation GS 800
 Calibrated Densitometer
 Gelrockner Gel Dryer 583
 Gelblot-Apparatur Trans-Blot Semi Dry Cell
 Glaskolben und Flaschen
 Horizontalschüttler HS 501
 IPG Tablett "Dry Strip Reswelling Tray"
 Kühlgerät Multitemp III
 Laborwaage Kern 470
 Labormikroskop Axiovert 25
 Labormikroskop Axiolab
 Magnetrührer MR 3001 K
 Massenspektrometer
 Proteome-Analyzer 4700
 Mikrowellenherd: Mikromat

Hersteller:

GE Healthcare, München
 Sigma-Aldrich, Deisenhofen
 Fuji Photo Film, Düsseldorf
 Fuji Photo Film, Düsseldorf
 Fuji Photo Film, Düsseldorf
 Raytest, Straubenhardt
 Sartorius, Göttingen
 Heraeus, Hanau
 Eppendorf, Hamburg
 GE Healthcare, München
 GE Healthcare, München
 GE Healthcare, München
 AGFA, Köln
 Rados, Hamburg
 BioRad, München

 BioRad, München
 BioRad, München
 Schott Duran, Mainz
 IKA-Werke, Staufen
 GE Healthcare, München
 GE Healthcare, München
 Kern u. Sohn, Balingen
 Zeiss, Jena
 Zeiss, Jena
 Heidolph, Kelheim
 Applied Biosystems, Darmstadt
 AEG, Frankfurt/Main

Mutiphor II IEF-Kammer	GE Healthcare, München
Neubauer Zählkammer	Superior, Lauda-Koenigshofen
Pinzetten	Roth, Karlsruhe
pH-Meter Modell inoLab Level 2	WTW, Weilheim
Photometer Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Pumpstand PC 2004 Vario	Vacuubrand, Wertheim
Pumpstand Controller CVC 2000	Vacuubrand, Wertheim
Rollenmischer	Greiner, Nürtingen
Rotator	neoLab, Heidelberg
Spannungsquellen „Power Pack 300“ für Gelelektrophorese	BioRad, München
Spannungsquellen „Power Pack 1000“ für Gelelektrophorese	BioRad, München
Spannungsquellen „Power Pack 1000“ für IEF	GE Healthcare, München
Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL	GE Healthcare, München
Sterilwerkbank	BDK, Sonnenbühl
Szintillationszähler TopCount NXT	Perkin-Elmer LAS, Rodgau-Jügesheim
Microplate Scintillation and Luminescence Counter	
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge Eppendorf 5417R	Eppendorf
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus
Zentrifuge Biofuge Stratus	Heraeus
Zentrifuge MiniSpin plus	Eppendorf
<u>Computerprogramme:</u>	<u>Hersteller:</u>
4700 Explorer Software	Applied Biosystems, Darmstadt, BRD
AIDA Image Analyzer	Raytest, Straubenhardt, BRD
Delta-2D	Decodon, Greifswald, BRD
GPS Explorer	Applied Biosystems, Darmstadt, BRD
Mascot	Matrix Science Ltd, London, UK
PDQuest™ Version 7.0	Bio-Rad, München, BRD
Photoshop 7.0	Adobe Systems, Mountain View, CA, USA

<u>Datenbanken/ Suchmasken:</u>	<u>URL:</u>
Conserved Domain Database:	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml
COG-Database:	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/
JCAT:	Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, BRD http://www.jcat.de
KEGG-Database:	Bioinformatics Center, Kyoto University, Kyoto, Japan http://www.genome.jp/kegg/
MW-pI-Calculator:	State University of Campinas, Campinas, BR http://proteome.ibi.unicamp.br/tools/pimw/index.htm
Mascot:	Matrix Science Ltd., London, UK http://www.matrixscience.com
NCBI:	National Center for Biotechnology Information, USA http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
Pfam-Library:	Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/
PSORTb v.2.0:	Simon Fraser University, Burnaby, Canada http://www.psорт.org/genomes/genomes.pl
Sequence Manipulation Suite:	University of Alberta, Edmonton, Canada http://bioinformatics.org/sms2/
SignalP:	Center for Biological Sequence Analysis; Lyngby, DK http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
STRING 8.0-Database:	European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Heidelberg, BRD http://string.embl.de/

2.1.4 Bakterienstämme und Zelllinien

2.1.4.1 Bakterienstämme

In den hier vorgestellten Arbeiten wurde der Bakterienstamm *Bartonella henselae* Marseille [78] verwendet.

2.1.4.2 Zelllinien

In den hier vorgestellten Arbeiten wurden aus Nabelschnur isolierte HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) verwendet.

2.1.5 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

2.1.5.1 Kulturmedien und Lösungen für die Bakterienkultur

Columbia-Blutagarplatten mit 5 % Schafsblut:	Becton Dickinson, Heidelberg	
Luria-Bertani (LB)-Medium (pH 7,5):	1,0 % (w/v)	Trypton
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	0,5 % (w/v)	NaCl
Stammhaltungsmedium:	20 % (w/v)	Glycerol in LB-Medium

2.1.5.2 Kulturmedien und Lösungen für die Zellkultur

<i>Endothelial Cell Growth Medium</i> mit Supplement-Mix:	PromoCell, Mannheim	
<i>Endothelial Cell Basal Medium</i> :	PromoCell, Mannheim	
Medium RPMI 1640 Medium ohne Cys/Met/Gln:	Sigma, Steinheim	
Medium RPMI 1640:	Biochrom, Berlin	
Zellkulturmedium:	Endothelial Cell Growth Medium Supplement-Mix 10 % (v/v) FCS	
Infektionsmedium:	<i>Endothelial Cell Basal Medium</i> 10 % (v/v) FCS	
Waschmedium:	Medium RPMI 1640 Medium ohne Cys/Met/Gln 1 % (v/v) L-Glutamin-Lösung (Gibco)	
Markierungsmedium:	Medium RPMI 1640 Medium ohne Cys/Met/Gln mit: 1 % (v/v) L-Glutamin-Lösung (Gibco) 10 % (v/v) FCS (dialysiert)	
Aufbewahrungsmedium:	10 % (v/v) FCS 10 % (v/v) DMSO	
Kollagen-G-Lösung:	0,01 % (w/v) in D-PBS (Gibco)	

Die Medien für Zellkultur wurden steril angesetzt und bei 4 °C gelagert. Das fötale Kälberserum (FCS) wurde vor Benutzung 30 min bei 56 °C im Wasserbad Komplement-inaktiviert.

2.1.5.3 Lösungen für die 2D-SDS-PA-Gelelektrophorese

2D-Lysepuffer: (1,25-fach konzentriert)	8,75 M	Harnstoff
	2,50 M	Thioharnstoff
	5 % (w/v)	Chaps
	2,5 % (v/v)	Pharmalyte 3 - 10
	1 Tablette	Proteaseinhibitor "Complete Protease Inhibitor TM"
	0,025 M	Tris-HCl pH 9,5
	q.s. 40 ml	H ₂ O

Nach der Herstellung wurde der Puffer aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Unmittelbar vor Nutzung wurde entweder 6,25 mM TBP, 12,5 mM TCP oder 81,25 mM DTT als Reduktionsmittel zugesetzt.

2D-Rehydratisierungspuffer:	7,0 M	Harnstoff
	2,0 M	Thioharnstoff
	4 % (w/v)	Chaps
	Zugabe der Ampholyte abhängig vom pH-Gradienten des IPG:	
pH 3 - 10	2,0 % (v/v)	Verwendung von IPG 3 - 10: Pharmalyte 3 - 10
pH 4 - 7	2,0 % (v/v)	Verwendung von IPG 4 - 7: IPG-Puffer 4 - 7
pH 6 - 9	2,0 % (v/v)	Verwendung von IPG 6 - 9: IPG-Puffer 6 - 9

Nach der Herstellung wurde der Puffer aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Unmittelbar vor Verwendung wurde entweder 5,0 mM TBP, 10,0 mM TCP oder 65,0 mM DTT als Reduktionsmittel zugesetzt.

Äquilibrierungspuffer:	6,0 M	Harnstoff
	30 % (w/v)	Glycerol
	2 % (w/v)	SDS
	0,05 M	Tris-HCl 1,5 M pH 8,8
	Spatelspitze	Bromphenolblau
Äquilibrierungspuffer _{Red} :	5,0 M	TBP in Äquilibrierungspuffer
Äquilibrierungspuffer _{Alk} :	4,8 % (w/v)	Iodacetamid in Äquilibrierungspuffer

Trenngelpuffer:	1,5 M	Tris-HCl pH 8,8
-----------------	-------	-----------------

Acrylamidlösung:	30 % (w/v)	Acrylamid/ Bisacrylamid (30,8 % T/ 2,6 % C)
------------------	------------	---

APS-Lösung:	10 % (w/v)	APS (frisch hergestellt)
-------------	------------	--------------------------

SDS-Stammlösung:	10 % (w/v)	SDS
Kathodenpuffer:	50 mM	Tris-HCl pH 8,8
	384 mM	Glycin
	0,2 % (w/v)	SDS
Anodenpuffer:	50 mM	Tris-HCl pH 8,8
	384 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
Überschichtungsagarose:	0,4 % (w/v)	Agarose in Kathodenpuffer
Lösung für 15 % Trenngel:	15 % (v/v)	Acrylamid/ Bisacrylamid (30,8 % T/ 2,6 % C)
	375 mM	Tris-HCl pH 8,8 (Trenngelpuffer)
	0,1 % (w/v)	SDS (SDS-Lösung)
	0,05 % (w/v)	APS (APS-Lösung)
	0,005 % (v/v)	TEMED

2.1.5.4 Lösungen zum Herstellen eines Western-Blots

Anodenpuffer I:	0,3 M	Tris-HCl pH 10,4
	10 % (v/v)	Methanol
Anodenpuffer II:	0,025 M	Tris-HCl pH 10,4
	10 % (v/v)	Methanol
Kathodenpuffer I:	25 mM	Tris-HCl pH 9,4
	40 mM	ϵ -Aminocaprinsäure
	10 % (v/v)	Methanol
Waschpuffer:	10 mM	Tris/ HCl pH 7,4
	150 mM	NaCl
	0,5 % (v/v)	Tween 20
Blockpuffer:	5 % (w/v)	Magermilchpulver in Waschpuffer

2.1.5.5 Lösungen zum Entwickeln eines Western-Blots

Substratpuffer:	50 mM	Tris-HCl pH 7,4
	3,5 mM	Imidazol
DAB-Färbelösung:	0,1 % (w/v)	DAB
	0,005 % (w/v)	H ₂ O ₂

DAB-Färbelösung wurde unmittelbar vor Verwendung in Substratpuffer angesetzt.

Stopplösung:	2,6 % (w/v)	H ₂ SO ₄ (95 - 98 %)
--------------	-------------	--

2.1.5.6 Lösungen zum Färben eines Western-Blots

Ponceau-S-Färbelösung:	0,2 % (w/v)	Ponceau S
	3 % (w/v)	Sulfosalicyläure
	3 % (w/v)	TCA

Amidoschwarz-Färbelösung:	0,1 % (w/v)	Amidoschwarz
	25 % (v/v)	Isopropanol
	10 % (v/v)	Essigsäure

Amidoschwarz-Entfärbelösung:	25 %	Isopropanol
	10 %	Essigsäure

2.1.5.7 Lösungen für die Silberfärbung von Proteinen

Fixierlösung:	40 % (v/v)	Ethanol
	10 % (v/v)	Eisessig

Sensitivierlösung:	30 % (v/v)	Ethanol
	6,8 % (w/v)	Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O
	0,2 % (w/v)	Natriumacetat x 3H ₂ O
	0,125 % (v/v)	25 % (v/v) Glutaraldehyd

Silbernitratlösung:	0,1 % (w/v)	AgNO ₃
	0,015 % (v/v)	37 % (v/v) Formaldehyd

Entwicklerlösung:	2,5 % (w/v)	Na ₂ CO ₃
	0,015 % (v/v)	37 % (v/v) Formaldehyd
Stopplösung:	1,5 % (w/v)	Na ₂ EDTA x 2H ₂ O
Konservierungslösung:	20 % (v/v)	Ethanol

2.1.5.8 Lösungen für die Colloidal-Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen

Colloidal-Coomassie-Lösung:	0,08 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue G250
	1,6 % (v/v)	ortho-Phosphorsäure
	8 % (w/v)	Ammoniumsulfat
	20 % (v/v)	Methanol
Entfärbelösung:	1,0 % (v/v)	Essigsäure

2.1.5.9 Lösungen für die S³⁵-Markierung von Proteinen

L-Methionin-Lösung: 0,01 mM L-Methionin

Die Lösung wurde nach Herstellung mit Sterilfilter (0,2 µm) filtriert und bei -20 °C gelagert.

L-Cystein-Lösung: 0,01 mM L-Cystein

Die Lösung wurde nach Herstellung mit Sterilfilter (0,2 µm) filtriert und bei -20 °C gelagert.

Cycloheximid-Lösung: 1,0 % (w/v) Cycloheximid in D-PBS (Gibco)

Die Lösung wurde nach Herstellung mit Sterilfilter (0,2 µm) filtriert und bei -20 °C gelagert.

Triton X-100-Lösung: 0,1 % (v/v) Triton X-100 in D-PBS (Gibco)

Die Lösung wurde nach Herstellung bei -20 °C gelagert.

2.1.5.10 Lösung für die Dialyse von FCS

Dialysat für FCS:	136,9 mM	NaCl
(Dulbecco-PBS)	2,68 mM	KCl
	8,10 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,47 mM	KH ₂ PO ₄
	0,90 mM	CaCl ₂
	0,49 mM	MgCl ₂

2.1.5.11 Lösungen für den tryptischen Verdau von Proteinen

NH₄HCO₃-Lösung: 50 mM NH₄HCO₃-Lösung pH 8,0

Protein-Waschlösung I: 50 % (v/v) Acetonitril
50 % (v/v) NH₄HCO₃-Lösung

Protein-Waschlösung II: 75 % (v/v) Acetonitril
25 % (v/v) NH₄HCO₃-Lösung

Trypsin-Stammlösung: 0,02 % (w/v) Trypsin
Trypsin-Stammlösung wurde in Promega-Trypsin-Puffer (50 mM Essigsäure) angesetzt.

Trypsin-Arbeitslösung: 0,002 % (w/v) Trypsin
Trypsin-Lösung wurde in 50 mM NH₄HCO₃-Lösung angesetzt.

Extraktionslösung: 0,1 % (v/v) TFA
50 % (v/v) Acetonitril

Resuspensionslösung: 0,5 % (v/v) TFA
50 % (v/v) Acetonitril

Matrixlösung: α-Cyano-4-hydroxymizinsäure q.s. 70 % (v/v) Acetonitril

2.2 Methoden

2.2.1 Vorgehensweise bei der Bakterien- und Zellkultur

Alle Arbeitsschritte bei der Bakterien- und Zellkultur erfolgten unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank. Alle dafür benötigten Materialien wurden entweder autoklaviert, im Trockenschrank bei 200 °C sterilisiert oder steril bezogen. Vor dem Arbeiten an der Sterilbank wurden die Handschuhe und die Arbeitsfläche mit 70 % (v/v) Isopropanol desinfiziert. Die Bakterien- und Zellkulturen wurden in getrennten Brutschränken kultiviert.

2.2.2 Stammhaltung und Kultivierungsbedingungen von *B. henselae* Marseille

2.2.2.1 Stammhaltung von *B. henselae*

Der verwendete Bakterienstamm *B. henselae* Marseille [78] ist in der Stammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Tübingen hinterlegt.

2.2.2.2 Kultivierungsbedingungen von *B. henselae*

Die Kultivierung von *B. henselae* erfolgte auf Columbia Blut Agarplatten mit einem Anteil von 5 % defibriniertem Schafsblood bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit. Nach einer Inkubationsdauer von 5 d wurde *B. henselae* mit Wattestäbchen abgenommen und in eisgekühltem D-PBS resuspendiert. Die Bakterien wurden zentrifugiert (5000 g, 5 min, 4 °C) und in Stammhaltungsmedium aufgenommen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Keimzahl wurde durch Auszählen serieller Verdünnungsreihen auf Columbia Blut Agarplatten nach 14 d bestimmt. Diese Stammsuspension von *B. henselae* ($1,3 \times 10^9$ Bakterien/ml) wurde für die beschriebenen Experimente verwendet.

Zur Gewinnung von Proteinextrakten von *B. henselae* wurde ein Aliquot der Stammlösung aufgetaut. Die Bakterien wurden in LB-Medium gewaschen, verdünnt und nochmals auf Columbia Blut Agarplatten überimpft. Nach Kultivierung für 5 d wurden die Bakterien in D-PBS geerntet, sedimentiert (5000 g, 5 min, 4 °C), in D-PBS mit 20 % (w/v) Glycerol resuspendiert, aliquotiert und bis zur Lyse bei -80 °C gelagert.

2.2.3 Isolierung und Kultivierungsbedingungen von HUVECs

2.2.3.1 Beschichtung von Zellkulturgefäßen

Um die Zellkulturgefäße mit Kollagen G zu beschichten, wurde der Boden der 80-cm²-Zellkulturflasche mit 5 ml 0,01 % (w/v) Kollagen-G-Lösung bei RT über Nacht benetzt. Nach dem Entfernen der Kollagen-G-Lösung wurden die Zellkulturgefäße bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.3.2 Isolierung der HUVECs

Die Nabelschnur wurde unter sterilen Bedingungen ausgeblutet, mit einem Skalpell die Enden um 2 cm eingekürzt und anschließend in 5 cm lange Stücke geschnitten. Mit einer Spritze wurde die Vene zunächst mit 37 °C warmer Trypsin-Lösung klargespült. Nach Inkubation der Vene mit 1 ml Trypsin-Lösung für 5 min wurde die HUVEC-haltige Zellsuspension in ein kollagenisiertes 80-cm²-Zellkulturgefäß mit 14 ml Zellkulturmedium überführt und kultiviert (siehe 2.2.3.3). Die HUVECs adherierten nach 1 - 2 d am Gefäßboden. Nach einmaliger Subkultivierung (siehe 2.2.3.4) wurden die HUVECs kurz vor Erreichen von Konfluenz durch Einwirken von 3 ml Trypsin/ EDTA-Lösung für 2 - 5 min bei 37 °C vom Gefäßboden gelöst, sedimentiert (300 g, 5 min, RT), schonend in Aufbewahrungsmedium resuspendiert, aliquotiert (10⁶ Zellen/ ml Aliquot) und in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.3.3 Kultivierung von HUVECs

Die Kultivierung der adhären wachsenden HUVECs erfolgte in Zellkulturmedium in Kollagen-G-beschichteten 80-cm²-Zellkulturgefäßen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit. Zur Aussaat wurde ein aufgetautes Aliquot der HUVECs zu 14 ml Zellkulturmedium gegeben und kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde direkt am Tag nach Aussaat des DMSO-haltigen HUVEC-Aliquots, sonst alle 2 - 3 d, gewechselt. Alle Kulturmedien bzw. Lösungen waren vor Zugabe zu der Zellkultur auf 37 °C temperiert. Nach Adhärenz der HUVECs am Gefäßboden bedeckten die Zellen nach 4 - 5 d die gesamte Bodenfläche.

2.2.3.4 Subkultivierung von HUVECs

Vor Erreichen von Konfluenz wurde das Zellkulturmedium entfernt. Die HUVECs wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung gewaschen und durch Einwirken von 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 2 - 5 min bei 37 °C vom Gefäßboden gelöst. Die Zellsuspension wurde dann in der 5-fachen Menge

Zellkulturmedium aufgenommen, nach Bedarf 1:3 bis 1:10 verdünnt und in neuen Zellkulturgefäßen weiterkultiviert.

2.2.3.5 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Konzentration lebender Zellen in Suspension wurde ein Aliquot der abgelösten Zellen mit Trypan-Blau verdünnt und mittels einer Neubauer-Zählkammer die Anzahl der lebenden, d.h. ungefärbten Zellen ausgezählt. Aus dem Mittelwert der Zellzahl der äußeren Eckquadrate multipliziert mit dem Kammerfaktor (10^4 / ml) und dem Verdünnungsfaktor ergab sich die Konzentration der Zellen.

2.2.4 Infektionsexperimente

Zwei Stunden vor dem geplanten Infektionszeitpunkt wurde das Zellkulturmedium einer konfluenten HUVEC-Zellkultur gegen antibiotikafreies Infektionsmedium gewechselt. Kurz vor Infektionsbeginn wurde die benötigte Menge der *B. henselae*-Stammlösung aufgetaut, zentrifugiert (5000 g, 5 min, RT) und in Infektionsmedium resuspendiert. In den Zellkulturgefäßen wurde nochmals das Infektionsmedium gewechselt und *B. henselae* in der gewünschten Konzentration auf die Zellen gegeben, anschließend zentrifugiert (300 g, 2 min, RT) und kultiviert. Die Infektionsexperimente wurden mit einer MOI 300 d. h. einer Bakterienzahl von 300 Bakterien pro Zelle durchgeführt (MOI = *multiplicity of infection*). Die tatsächlich verwendete Keimzahl wurde im Anschluss durch serielle Verdünnungsreihen, Ausplattieren und Auszählen der CFU (*colony forming unit*, Kolonie-bildende Einheit) überprüft. Als Negativkontrollen dienten HUVECs, die mit reinem Infektionsmedium inkubiert wurden.

2.2.5 Markierung von *B. henselae*-Proteinen mit ^{35}S -Methionin/ ^{35}S -Cystein

2.2.5.1 Vorgehensweise beim Umgang mit Radiochemikalien

Die Experimente unter Verwendung von ^{35}S -Radiochemikalien wurden in einem Isotopenlabor unter den entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen (Schutzmaßnahmen vor β -Strahlung/ Überwachung der Strahlendosis) durchgeführt.

2.2.5.2 Dialysieren von FCS

Um das bereits durch Hitzeeinwirkung Komplement-inaktivierte FCS von Aminosäuren zu befreien und somit den Einbau der radioaktiven ^{35}S -markierten Aminosäuren L-Methionin und

L-Cystein in die synthetisierten Proteine zu optimieren, wurde das FCS gegen Dulbecco-PBS dialysiert. Ein Abschnitt des in 1 % (v/v) Formaldehyd-Lösung gelagernden Dialyseschlauches (Celluloseester Spectra/Por® 7 MWCO 3500 Da) wurde zunächst in 500 ml sterilem H₂O_{dest} unter sterilen Bedingungen dreimal für jeweils eine Stunde äquilibriert. Mit einer sterilen Pipette wurde der Schlauch geöffnet, mit 100 ml FCS befüllt und anschließend mit Dialyseschlauchklemmen verschlossen. Die Dialyse erfolgte bei 4 °C. Als Dialysat wurde 5 l Dulbecco-PBS bei 4 °C verwendet und nach 4 h, 6 h, 10 h, 12 h, 12 h gegen entsprechend temperiertes Dulbecco-PBS gewechselt. Um etwaige mikrobielle Kontaminationen auszuschließen, wurde das FCS mit einem Sterilfilter „Stericup“ steril gefiltert (Ausschlussgröße 0,22 µm), aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.5.3 ³⁵S-Markierung mit *B. henselae*-Proteinen in Kultur mit HUVECs

Die mit *B. henselae* infizierten HUVEC-Zellkulturen wurden nach 18 h mit 5 ml Waschmedium gewaschen und in 5 ml Markierungsmedium weiterkultiviert (siehe 2.2.3.3). Nach 30 min wurde 150 µl CHX-Lösung, nach 60 min 37 MBq (1mCi) L-³⁵S-Methionin/ L-³⁵S-Cystein-Mix dem Markierungsmedium hinzugefügt und die infizierten HUVEC-Zellkulturen für weitere 3 h kultiviert. Dann wurde das Markierungsmedium entfernt und es erfolgte ein Waschschriff mit 5 ml RPMI 1640 bei RT.

Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt, alle Lösungen und Geräte waren gekühlt. Die HUVECs wurden mit einem Zellschaber vom Gefäßboden gelöst. Beim mehrmaligen Resuspendieren mit 1 ml Triton X-100-Lösung mittels Spritze und Injektionsnadel wurden die Zellen durch die Scherkräfte aufgeschlossen. Die Suspension wurde in 2-ml-Reaktionsgefäße überführt, zentrifugiert (4500 g, 15 min, 4 °C) und das Pellet in 1 ml D-PBS gewaschen. Die Suspension wurde zentrifugiert (4500 g, 15 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet bei -80 °C gelagert.

Um später den Proteinextrakt der radioaktiv markierten *B. henselae* auf eine spezifische Aktivität (MBq/ mg Protein) einstellen zu können, wurde der beschriebene Versuchsablauf parallel, jedoch nicht-radioaktiv mit *B. henselae* infizierten HUVEC-Zellkulturen unter Zugabe von entsprechend 69,9 µl L-Methionin-Lösung und 30,2 µl L-Cystein-Lösung zu 5 ml Markierungsmedium durchgeführt.

2.2.5.4 ³⁵S-Markierung von *B. henselae*-Proteinen ohne Kultur mit HUVECs

Als Referenzkultur zu den HUVEC-Infektionsexperimenten wurde *B. henselae* Marseille unter den gleichen Kulturbedingungen, jedoch ohne HUVECs, kultiviert. Dazu wurden die Bakterien wie bei Infektionsexperimenten (siehe 2.2.4) in gleicher Konzentration, jedoch in unkollagenisierte

80-cm²-Zellkulturgefäße ausgebracht, anschließend zentrifugiert (300 g, 2 min, RT) und kultiviert. Nach 18 h wurde *B. henselae* mit einem Zellschaber vom Gefäßboden gelöst, die Suspension in 15-ml-Reaktionsgefäße überführt, sedimentiert (4500 g, 10 min, RT) und in 5 ml Waschmedium resuspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation (4500 g, 5 min, RT) wurden die Bakterien in 5 ml Markierungsmedium aufgenommen und in neuen, unkollagenisierten Zellkulturgefäßen ausgesät.

Die Markierung der Proteine erfolgte wie in Kapitel 2.2.5.3 beschrieben. Nach 3 h wurden die *B. henselae* mit einem Zellschaber vom Gefäßboden gelöst, die Suspension in 15-ml-Reaktionsgefäße überführt, zentrifugiert (4500 g, 5 min, RT) und das Pellet mit 5 ml RPMI 1640 bei RT gewaschen. Die Bakterien wurden nochmals sedimentiert (4500 g, 5 min, RT) und der Überstand verworfen. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt, alle Lösungen und Geräte waren gekühlt. Das Pellet wurde in 1 ml Triton X-100-Lösung resuspendiert und in 2-ml-Reaktionsgefäße überführt, zentrifugiert (4500 g, 15 min, 4 °C) und anschließend das Pellet in 1 ml D-PBS gewaschen. Die Bakteriensuspension wurde zentrifugiert (4500 g, 15 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet bei -80 °C gelagert.

Um später den Proteinextrakt der radioaktiv markierten *B. henselae* auf eine spezifische Aktivität (MBq/mg Protein) einstellen zu können, wurde der beschriebene Versuchsablauf parallel, jedoch nicht-radioaktiv mit *B. henselae* in Zellkulturgefäßen unter Zugabe von entsprechend 69,9 µl L-Methionin-Lösung und 30,2 µl L-Cystein-Lösung zu 5 ml Markierungsmedium durchgeführt.

2.2.6 Probenvorbereitung für die 2D-SDS-PA-Gelelektrophorese

2.2.6.1 Proteinextraktion nicht-radioaktiver *B. henselae*-Proteine

Ein Aliquot der zur Lyse bestimmte *B. henselae*-Suspension (siehe 2.2.2) wurde nach dem Auftauen sedimentiert (5000 g, 5 min, 4 °C), mit D-PBS gewaschen und zentrifugiert (5000 g, 5 min, 4 °C). Das Bakterien-Pellet wurde erneut in D-PBS aufgenommen und sedimentiert (5000 g, 5 min, 4 °C). Zur Gewinnung der Gesamtzell-Proteinextrakte wurden die *B. henselae* dann in 1,25 x 2D-Lyse-Puffer resuspendiert und mit q.s. H₂O_{dest} auf 1 x 2D-Lyse-Puffer verdünnt. Die Extraktion der Proteine erfolgte durch Schwenken der Proben für 1 h bei RT mittels eines Rotators. Anschließend wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation (20000 g, 30 min, 20 °C) vom Proteinextrakt abgetrennt. Die Proteinextrakte wurden bis zur endgültigen Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.6.2 Proteinextraktion radioaktiver ³⁵S-markierter *B. henselae*-Proteine

Die gewonnenen *B. henselae*-Bakterienpellets nach Abschluss der ³⁵S-Markierung der bakteriellen Proteine aus der Kultur von *B. henselae* mit und ohne HUVECs sowie aus den jeweiligen nicht-radioaktiven Parallelexperimenten (siehe 2.2.5.3/4) wurde nach dem Auftauen in eiskaltem 40 µl H₂O_{dest.} resuspendiert und dann mit 160 µl 1,25 x 2D-Lyse-Puffer versetzt. Die Extraktion der Proteine erfolgte durch Schwenken der Proben für 1 h bei RT mittels eines Rotators. Anschließend wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation (20000 g, 30 min, 20 °C) vom Proteinextrakt abgetrennt. Die Proteinextrakte wurden bis zur endgültigen Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zellextrakte erfolgte in Dreifachbestimmung mit dem Reduktionsmittel- und Detergenz-kompatiblen RC-DC Proteinbestimmungstest-Kit, einem auf der Lowry-Methode [195] basierenden kolorimetrischen Testsystem nach Peterson [244]. Zunächst wurden die Proteine mittels Natriumdesoxycholat-Lösung (Reagenz I) und TCA-Lösung (Reagenz II) aus 25 µl Proteinextrakt komplett ausgefällt, sedimentiert (20000 g, 10 min, RT) und das Pellet in SDS-haltiger, alkalischer Kupfertartrat-Lösung resuspendiert (Reagenz A). Schließlich ergab die Zugabe von 1 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (Reagenz B) die charakteristische Blaufärbung. Nach 15 min Inkubation wurde die Extinktion bei 750 nm bei RT gemessen. Für die Nulleinstellung des UV-Spektrometers wurde 1 x 2D-Lyse-Puffer verwendet. Anhand einer BSA-Eichreihe (0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,5 mg/ml) ließ sich die Proteinkonzentration ermitteln.

2.2.6.4 Bestimmung der volumenbezogenen, spezifischen Radioaktivität

Die Bestimmung der Radioaktivität [cpm] erfolgte in Dreifachbestimmung am Szintillationszähler TopCount NXT im niedrigerenergetischen Strahlungsbereich bis 256 keV, d.h. mit Einstellung auf höchste Szintillatoreffektivität. Dazu wurden 5 µl des Proteinextraktes in eine Glas-Szintillator-haltige Kavität der LUMA-Plate pipettiert, für 24 h bei RT getrocknet und mit Klarsichtfolie versiegelt. Wurde dieser Wert auf das eingesetzte Probenvolumen bezogen, ergab sich die volumenbezogene, spezifische Radioaktivität des Proteinextraktes.

2.2.6.5 Bestimmung der proteinmassebezogenen, spezifischen Radioaktivität

Aus der Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 2.2.6.3) und der Bestimmung der volumenbezogenen, spezifischen Radioaktivität (siehe 2.2.6.4) ergab sich die proteinmassebezogene, spezifische Radioaktivität des Proteinextraktes.

2.2.7 Zweidimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-SDS-PAGE)

2.2.7.1 Vorgehensweise bei der zweidimensionalen SDS-PA-Gelelektrophorese

Mittels der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurden die komplexen Proteinextrakte durch zwei aufeinanderfolgende Schritte aufgetrennt. In der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), erfolgte die Trennung nach der Gesamtladung des Proteins entsprechend des isoelektrischen Punktes. Die zweite Dimension basiert auf einer Trennung der Proteine entsprechend der molekularen Masse (SDS-PAGE).

2.2.7.2 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die IEF wurde nach Rabilloud, [248, 249], Görg [107] und Herbert [123] mit Modifikation durchgeführt. In diesen Arbeiten wurde als Reduktionsmittel vorzugsweise 10 mM TCP [333] anstelle von TBP oder DTT dem Rehydratisierungspuffer zugesetzt. Zur Beladung der 24-cm-IPG-Gelstreifen wurde der Proteinextrakt in analytischen bzw. präparativen Proteinmengen auf ein Endvolumen von 460 µl mit dem entsprechenden Rehydratisierungspuffer verdünnt und in eine Vertiefung der Rehydratisierungskassette gegeben (Tab. 2, 3, 4) Dann wurden die IPG-Gelstreifen luftblasenfrei, mit der Gelseite nach unten in den Proteinextrakt eingelegt, mit 3 ml Silikonöl überschichtet und für 16 h bei RT rehydratisiert. Die beladenen IPG-Gelstreifen wurden für 10 s mit H₂O_{dest.} gewaschen, mit H₂O_{dest.}-angefeuchtetem Whatman-Papier 0,3 mm geblottet und mit der Gelseite nach oben in die Multiphor-II Fokussierkammer überführt, die Enden überlappend mit 5 mm breiten, H₂O_{dest.}-angefeuchteten Elektrodenstreifen bedeckt, die Elektrodenbrücken darauf platziert und mit Silikonöl überschichtet. Die Dauer und der Spannungsverlauf der IEF wurden in Abhängigkeit vom gewählten IPG-Gelstreifen und von der geladenen Proteinmenge gewählt (Tab. 5, 6). Nach beendeter IEF wurden die IPG-Streifen in einer Klarsichthülle bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Bei der Untersuchung verschiedener Reduktionsmittel auf ihre Eignung für die 2D-SDS-PAGE wurden diese im IPG-Streifen (pH 6 - 9, 7 - 11, 3 - 10) ohne jegliche Proteinbeladung nach beendeter IEF (Tab. 5) mit 1 mM DTNB in 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0 nach 3 min Inkubation nachgewiesen [84, 85].

Tab. 2: Beladungsschema der analytischen 2D-Gele unter Verwendung von 24-cm-IPG-Gelstreifen pH 3 - 10, 4 - 7 und 6 - 9 (Endvolumen 460 µl Proteinextrakt im entsprechenden Rehydratisierungspuffer)

pH-Gradient	IPG 3 - 10	IPG 4 - 7	IPG 6 - 9
Proteinmenge [µg]	30	50	50

Tab. 3: Beladungsschema der präparativen 2D-Gele unter Verwendung von 24-cm-IPG-Gelstreifen pH 3 - 10, 4 - 7 und 6 - 9 (Endvolumen 460 µl Proteinextrakt im entsprechenden Rehydratisierungspuffer)

pH-Gradient	IPG 3 - 10	IPG 4 - 7	IPG 6 - 9
Proteinmenge [µg]	200	400	450

Tab. 4: Beladungsschema der analytischen ³⁵S-radioaktiven 2D-Gele unter Verwendung von 24-cm-IPG-Gelstreifen pH 3 - 10, 4 - 7 und 6 - 9 (Endvolumen 460 µl Proteinextrakt im entsprechenden Rehydratisierungspuffer)

pH-Gradient	IPG 3 - 10	IPG 4 - 7	IPG 6 - 9
Proteinmenge [µg]	15	30	30
Radioaktivität [cpm]	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶

Tab. 5: IEF-Parameter unter Verwendung der Multiphor II bei 20 °C, max. Stromstärke: 0,05 mA/ IPG-Gelstreifen, max. Spannung 3500 V (Fokussierungsprogramm für IPG-Gelstreifen mit analytischer Beladung)

Schritt:	Spannung [V]	Zeit [h]	Spannungsverlauf
<u>Initiale IEF:</u>	200	2	Stufe
	500	2	Stufe
<u>IEF der Proteine bis 3500 V:</u>	500-3500	5	Gradient
IPG 3 - 10 (Gellänge 24 cm)	3500	9:30	Stufe
IPG 4 - 7 (Gellänge 24 cm)	3500	18:30	Stufe
IPG 6 - 9 (Gellänge 24 cm)	3500	19:00	Stufe
IPG 7 - 11 (Gellänge 24 cm)	3500	17:30	Stufe

Tab. 6: IEF-Parameter unter Verwendung der Multiphor II bei 20 °C, max. Stromstärke: 0,05 mA/ IPG-Gelstreifen, max. Spannung 3500 V (Fokussierungsprogramm für IPG-Gelstreifen mit präparativer Beladung)

Schritt:	Spannung [V]	Zeit [h]	Spannungsverlauf
<u>Initiale IEF:</u>	200	4	Stufe
	500	2	Stufe
<u>IEF der Proteine bis 3500 V:</u>	500-3500	5	Gradient
IPG 3 - 10 (Gellänge 24 cm)	3500	17	Stufe
IPG 4 - 7 (Gellänge 24 cm)	3500	27:30	Stufe
IPG 6 - 9 (Gellänge 24 cm)	3500	27:30	Stufe

2.2.7.3 Zweite Dimension: Vertikale SDS-PA-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die elektrophoretische Trennung der Proteine wurden 15 % (w/v) SDS-Polyacrylamidgele der Größe 190 mm x 237 mm x 1 mm in Glaskassetten gegossen und mit jeweils 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ -gesättigtem n-Butanol überschichtet. Dieses wurde nach 1 h mit jeweils 1 ml 0,1 % (w/v) SDS-haltigem Trenngelpuffer ersetzt und erst 15 min vor Auflegen des IPG-Gelstreifens entfernt. Das Polyacrylamidgel polymerisierte 4 h bei RT.

Im Anschluss an die IEF, nach dem Auftauen der IPG-Gelstreifen, wurden diese für 10 s in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gespült. Danach wurden die fokussierten Proteine in den IPG-Gelstreifen für 15 min in 10 ml Äquilibrierungspuffer_{Red}, einem SDS-haltigen Puffer unter reduzierenden Bedingungen auf pH 8,8 äquilibriert und anschließend für weitere 15 min in 10 ml Äquilibrierungspuffer_{Alk} zur Vermeidung der Reoxidation der Sulfhydrylgruppen des Cysteins alkyliert [106, 123]. Anschließend wurde der IPG-Gelstreifen für 10 s in Kathodenpuffer gespült, auf die Oberseite des in den Glaskassetten befindlichen Polyacrylamidgeles gelegt und mit 3 ml Agaroselösung fixiert.

Die Glaskassetten wurden in die Elektrophoresekammer Ettan Dalt 6 überführt, bis auf max. Füllhöhe Kathodenpuffer und Anodenpuffer eingefüllt und die Elektrophorese gestartet. Die Elektrophoreseparameter betragen 1 W/ Gel für 2 h für den Probeneintritt, anschließend gesamtheitlich 200 V bei 20 °C. Nach einer Laufzeit von etwa 10 h, wenn die Bromphenolblaufront den unteren Rand des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet. Danach wurden die Glaskassetten herausgenommen und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ kurz abgespült. Die Gele wurden entnommen und von Agaroseresten sowie den IPG-Gelstreifen befreit.

2.2.8 Visualisierung von Proteinen in 2D-SDS-Polyacrylamid-Gelen

2.2.8.1 Colloidal-Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen in 2D-SDS-PA-Gelen

Die Colloidal-Coomassie-Blau-Färbung der Proteine erfolgte nach dem Protokoll von Neuhoff *et al.* [227]. Um Kontaminationen mit Keratin für nachfolgende massenspektrometrische Untersuchungen auszuschließen, wurden alle Färbeschritte in geschlossenen Behältnissen durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese (siehe 2.2.7.3) wurden die Polyacrylamidgele sofort in die Färbelösung überführt, 1 d bei niedriger Schüttelfrequenz inkubiert, anschließend 3 x 5 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gewaschen und der Hintergrund mit 1 % (v/v) Essigsäure entfärbt. Im Anschluss wurden die Gele durch Einlesen mit einem Flachbettscanner GS-800 digitalisiert und in Folie eingeschweißt gelagert.

2.2.8.2 Silberfärbung von Proteinen in 2D-SDS-PA-Gelen

Die Silberfärbung der Proteine erfolgte nach dem Protokoll von Heukeshoven und Dernick [124]. Alle Färbeschritte wurden in Edelstahlwannen durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese (siehe 2.2.7.3) wurden die Polyacrylamidgele sofort in die Fixierlösung überführt. Nachfolgend wurde von jeder zur Färbung benötigten Lösung 0,5 l pro Gel eingesetzt und die 2D-Gele darin bei niedriger Schüttelfrequenz für die in Tab. 7 angegebene Zeitdauer inkubiert. Die Farbreaktion nach Zugabe der Entwicklerlösung wurde abgebrochen, sobald die Proteinpunkte vor klarem Hintergrund sichtbar wurden. Die entwickelten Gele wurden anschließend konserviert, durch Einlesen mit einem Flachbettscanner GS-800 digitalisiert und dann in Folie eingeschweißt gelagert.

Tab. 7: Protokoll für die Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick [124]

Arbeitsschritt	Reagenz	Zeit
Fixieren	Fixierlösung	60 min - 12 h
Sensitivieren	Sensitivierlösung	40 min
Waschen	H ₂ O _{dest.}	3 x 10 min
Versilbern	Silbernitratlösung	60 min
Waschen	H ₂ O _{dest.}	2 min
Entwickeln	Entwicklerlösung	7 min
Stoppen	Stopplösung	15 min
Konservieren	Konservierungslösung	30 min

2.2.8.3 Nachweis von ³⁵S-radioaktiv markierten Proteinen in 2D-SDS-PA-Gelen

Nach der Auftrennung der ³⁵S-radioaktiv markierten Proteine mittels 2D-SDS-PAGE (siehe 2.2.7.2/3) und anschließender Silberfärbung (siehe 2.2.8.2) erfolgte zunächst die Trocknung der 2D-Gele. Dazu wurde jedes Gel auf einen feuchten Bogen Whatman-Filterpapier 0,3 mm platziert und auf einen mit Whatman-Papier 3 mm ausgelegten Vakuum-Geltrockner platziert, luftblasenfrei mit Cellophanfolie sowie der Dichtungsmatte des Geltrockners abgedeckt und bei angelegtem Vakuum von 70 mbar bei einer Temperatur von 80 °C für 2 h Stunden getrocknet. Um die β -Strahlung der ³⁵S-radioaktiv markierten Proteine zu detektieren, wurden die getrockneten Gele auf BAS-MS 2025 Imaging Plates, also auf Folien mit Eu²⁺-dotierten BaFBr-Kristallgitter aufgelegt und für 3 - 5 d exponiert. Die durch β -Strahlung erzeugten, delokalisierten Elektronen (Eu²⁺ - Eu³⁺) lieferten ein quantifizierbares Lumineszenzsignal beim Überführen des angeregten Zustandes in den Grundzustand beim Scannen der Folien mit dem BAS 1800 Reader (He-Ne-Laser). Dieses so

genannte „Phosphoimaging“ ermöglichte neben einer extrem hohen Nachweisempfindlichkeit eine genaue Quantifizierung des Radiosignals innerhalb eines weiten dynamischen Bereiches [238, 344].

2.2.9 Computergestützte Datenanalyse der 2D-SDS-Polyacrylamid-Gele

2.2.9.1 Digitalisierung der 2D-SDS-PA-Gele

Der Informationsgehalt der 2D-Gele wurde durch Digitalisierung mit einem kalibrierbaren Densitometer GS-800 einer qualitativen und quantitativen Analyse durch Computerprogramme zugänglich. Vor jedem Einlesen erfolgte ein Abgleich der tatsächlichen, gescannten Graustufen anhand eines Graukeils definierter optischer Dichten im Durchlichtmodus mittels der Laborsoftware PDQuest. Die Gele wurden luftblasenfrei auf die Glasplatte des Densitometers gelegt und bei 8-bit Graustufen, 64 µm Pixelgröße gescannt. Anschließend wurden die digitalisierten Abbildungen der Gele im PDQuest-eigenen TDS-Format gespeichert sowie wahlweise in gleicher Auflösung als quantifizierbare Rohdaten in Tiff-Format überführt.

Die BAS-MS 2025 Imaging Plates wurden am BAS 1800 Reader bei 8-bit Graustufen und 50 µm Pixelgröße gescannt und die digitalisierten Abbildungen vom PCB-Format mittels AIDA Image Analyser ins Gel-Format konvertiert und die Graustufenskala der Abbildungen mit PDQuest invertiert. Schließlich wurden die digitalisierten Abbildungen im PDQuest-eigenen TDS-Format gespeichert sowie in gleicher Auflösung als quantifizierbare Rohdaten in Tiff-Format überführt. Es wurde abgesichert, dass die Quantifizierbarkeit innerhalb des dynamischen Bereiches nicht durch unterschiedliche Gewichtung der Graustufen bei den verwendeten Dateiformaten verfälscht wurde.

2.2.9.2 Filtern der Abbildungen der 2D-SDS-PA-Gele mittels PDQuest-Software

Für alle zu analysierenden 2D-SDS-Gele wurde die Pixelgröße auf 100 µm festgesetzt. Die Abbildungen wurden mit folgenden Filterparametern aufgearbeitet: Filtergröße 5 x 5 Pixel, Gaussverteilung als Verteilung der optischen Dichte, Entfernung des Hintergrundrauschens (Salt/ Pepper-Removal). Folglich wurden aus einem originalen Gelbild noch jeweils zwei weitere Datensätze („Filtered Image“ und „Gaussian Image“) generiert. Das „Filtered Image“ enthält die Daten des Gelbildes nach Einsatz aller verwendeten Filter, während im „Gaussian Image“ zusätzlich noch der Hintergrund geglättet wurde. Schließlich wurden die „Filtered Image“-Dateien in gleicher Auflösung als quantifizierbare Rohdaten in Tiff-Format überführt und in Delta-2D importiert.

2.2.9.3 Punktdetektion mittels Delta-2D-Software

Das Computerprogramm Delta-2D wurde für die qualitative und quantitative Analyse der 2D-SDS-PA-Gele von aufgetrennten ^{35}S -radioaktiv markierten *B. henselae*-Proteinen, für die Zusammenstellung der Proteomkarte von *B. henselae* und für die Auswertung der 2D-Immunoblots verwendet.

Da eine geringfügige, gesamtheitliche Verschiebungen des Proteinmusters, nicht der Position einzelner Proteinpunkte, trotz guter qualitativer und quantitativer Reproduzierbarkeit der 2D-Punktmuster innerhalb einer Gelserie durch Handhabung der 2D-Gele, z.B. Gelfärbung, Gel Trocknung als auch durch Laufunterschiede in der SDS-PAGE unvermeidbar ist, enthält das Programm Delta-2D Funktionen, die es ermöglichen, diese Positionsabweichungen auszugleichen. Dazu wurden bei Überlagerung der Abbildungen mit Delta-2D korrespondierende Punkte mit derselben Position in den 2D-Gelen durch manuelles Setzen von Vektoren (Exakt Warp Mode), so genannten „Match Vectors“ verbunden und mit einem „Warp-Algorithmus“, d.h. einen programminternen Verrechnungsalgorithmus für Vektoren, dann untereinander exakt zur Deckung gebracht. Wenn die Gelabbildungen in verschiedene Gruppen unterteilt wurden, z.B. Vergleich unterschiedlicher Zustände, dann wurde jedes Gel einer Gruppe mit einem definierten Referenzgel der Gruppe und dieses wiederum mit einem definierten Referenzgel des ganzen Projektes zur Deckung gebracht (Group Warping Strategy). Durch additive Abbildungsfusion aller mit dem Referenzgel abgeglichenen Gele einer Gruppe bzw. des ganzen Projektes wurde über die Funktion „Fuse All Images“ ein virtuelles Fusionsbild, ein Mastergel, geschaffen, das die Punktmuster aller Gele in sich vereint.

Bei der Herstellung der Proteomkarte von *B. henselae* wurden folgende Parameter zur Erstellung des Fusionsbildes verwendet: Filter-off; Fusion Type - Max. Intensity; Image Size - Common Region; Process Fused Image - Amplitude Rescale. Mit gleichen Parametern, jedoch mit Fusion Type - Union Type wurde ein Fusionsbild zur Analyse der ^{35}S -radioaktiven 2D-Gele geschaffen. Durch eine nun folgende Punktdetektion anhand dieses Fusionsbildes und durch anschließendes vektorgestütztes Übertragen des Punktrasters der detektierten Proteinpunkte auf die einzelnen 2D-Gele sind die Voraussetzungen für eine exakte Punktbearbeitung (Quantifizierung, Annotation) auf den zu untersuchenden einzelnen 2D-Gelen gegeben. Dabei erfolgte die automatische Punkterkennung anhand der Fusionsabbildung mit folgenden Parametern für die Proteomkarte von *B. henselae*: Local Background Region - 150; Average Spot Size - 30; Sensitivity - 10 %. Die automatische Punkterkennung für die Analyse der ^{35}S -radioaktiven 2D-Gele wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: Local Background Region - 80; Average Spot Size - 24; Sensitivity - 20 %. In beiden Fällen wurde der Algorithmus „Create Modelled Spots“ verwendet.

2.2.9.4 Punktbearbeitung mittels Delta-2D-Software

Aufgrund der Komplexität der 2D-Gele ist es dem Programm unmöglich, alle Punkte korrekt zu erkennen (z.B.: Erkennung zweier dichtliegender Punkte als Einzelpunkt). Deshalb musste mit Werkzeugen zur Punktbearbeitung (z.B.: Teilen, Vereinigen, Hinzufügen, Löschen der Punkte) manuell nachgearbeitet werden, um dann abschließend die komplette Maske der detektierten Proteinpunkte aufgrund des Vektorgerüsts passgenau auf die Einzelgele des Projektes zu übertragen.

2.2.9.5 Punktannotation mittels Delta-2D-Software

Zur Herstellung der Proteomkarte von *B. henselae* Marseille, einer mit der massenspektrometrischen Identifikation der Proteinpunkte versehenen Abbildung eines 2D-SDS-PA-Gels im pH-Bereich 3 - 10, wurden die Proteinextrakte zweier biologischer Replikate unabhängig voneinander mittels 2D-SDS-PAGE aufgetrennt.

Zwei Abbildungen der präparativen 2D-Gele wurden mittels Delta-2D übereinandergelegt, fusioniert und die Proteinpunkte detektiert (siehe 2.2.9.3/4). Anschließend wurde die komplette Maske der Punkte passgenau auf die einzelnen 2D-Gele übertragen. Die Proteinpunkte dieser zwei Abbildungen wurden mit dem abgekürzten Proteinnamen oder alternativ mit der GI-Nummer des Proteines entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomsequenz (NC_005956) versehen. Um eine sichere Bestimmung der analysierten Proteinpunkte zu gewährleisten, erfolgte die MS-Identifikation der Proteine von den zwei präparativen Gelen in Doppelbestimmung. Nur wenn die massenspektrometrische Identifikation übereinstimmte, wurde die Bezeichnung der Proteinpunkte auf das Fusionsbild der zwei präparativen 2D-Gele übertragen, was dann schließlich die Proteomkarte von *B. henselae* Marseille ergab. Der empirische *pI* und die MW aller Proteinpunkte wurde erhalten, indem folgende identifizierte Proteine als Markerproteine für den *pI* bzw. der MW fungierten [MW/*pI*]: SodB [23,1/5,77]; LysS [862,2/5,79]; Ppa [20,0/5,13]; HtrA1 [54,1/8,56]; HutB [32,5/9,50]; RpsF [15,8/8,86]; TrxA [11,9/4,90]; RecA [37,5/5,40]; RpsA [62,8/5,18]; ArgB [32,2/4,78]; GreA [17,5/4,94]; Ndk [15,5/5,45]; DnaK [68,2/4,93]; GroEL [57,6/5,10].

2.2.9.6 Punktquantifizierung mittels Delta-2D-Software

Die Analyse des Proteinmusters der 2D-Gele ³⁵S-radioaktiv markierter *B. henselae* mittels Delta-2D erfolgte in zwei Projekten: Gele im pH-Bereich 4 - 9 (Delta-2D Projekt I) und Gele im pH-Bereich 6 - 9 (Delta-2D Projekt II) in jeweils zwei Gruppen (Zuständen), „*B. henselae* ohne HUVEC-Kultur“ (Gruppe I) und „*B. henselae* in HUVEC-Kultur“ (Gruppe II).

Für jedes Projekt wurde als Referenzgel „*B. henselae* ohne HUVEC-Kultur“ definiert. Jedes Gel einer Gruppe wurde mit dem Referenzgel der Gruppe zur Deckung gebracht, dieses wiederum wurde mit dem Referenzgel des Projektes abgeglichen (Group Warping/ Exakt Warp Mode). Zur qualitativen und quantitativen Analyse der Proteinmuster beider Gruppen (Zustände) wurden die Proteinextrakte dreier biologischer Replikate mit mindestens jeweils zwei technischen Replikaten der ³⁵S-radioaktiv markierten *B. henselae* unabhängig voneinander mittels 2D-SDS-PAGE aufgetrennt.

Die insgesamt 12 Abbildungen der analytischen 2D-SDS-PA-Gele, zwei Gruppen (Zustände) mit jeweils 6 Abbildungen, wurden mittels Delta-2D übereinandergelegt, fusioniert und die Proteinpunkte detektiert (siehe 2.2.9.3/4). Anschließend wurde die komplette Maske der Punkte passgenau auf die einzelnen 2D-Gele übertragen und die Punkte wurden quantifiziert. Das errechnete, relative Volumen eines einzelnen Punktes [in Vol.-%] bezog sich auf das Gesamtvolumen aller detektierten Punkte eines 2D-Geles. Wenn das Gesamtvolumen der zu vergleichenden 2D-Gele gleichgesetzt wurde, konnten beispielsweise Unterschiede in der Expositionsdauer kompensiert werden. Dies ermöglichte eine hohe Vergleichbarkeit der 2D-Gele. Die absolute und die relative Quantität einer Proteinspezies in den jeweiligen Vergleichsgelen, also das absolute und das relative Volumen unter einem Proteinpunkt wurden der Quantifizierungstabelle entnommen. Neben den Zahlenwerten wie beispielsweise Durchschnitt, Standardabweichung der Punktvolumina ist auch eine Farbkodierung von rot (starker Proteinpunkt als Referenzgel) bis grün (schwacher Proteinpunkt) jedem Proteinpunkt zugewiesen und zudem konnten quantitative Unterschiede der Proteinpunkte auch als Säulendiagramm direkt dem Überlagerungsbild entnommen werden. Um die potentiell regulierten, im Punktvolumen differentiell auftretenden Proteinpunkte einzuengen, wurden die Filtereinstellungen des Programmes auf T-Test Filter negative 99 % und das Medianverhältnis der Gruppen außerhalb von 0,66 - 1,5 gesetzt.

Besonders hilfreich beim Analysieren der 2D-Gele aus zwei Gruppen (Zustände) ist, dass mittels Delta 2D-Software die Abbildungen in verschiedenen Farben (rot und grün) dargestellt und digital überlagert werden können. Durch die folglich Farbbaddition entsteht bei qualitativen als auch quantitativen Übereinstimmung der jeweiligen Proteinpunkte die Mischfarbe (gelb). Hingegen werden Proteinpunkte mit sowohl qualitativen als auch quantitativen Unterschieden zwischen den untersuchten Gelen farblich hervorgehoben (rot bzw. grün).

2.2.10 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen - Western-Blot

Die Proteine wurden mit einem Gelblot-Apparatur Trans-Blot Semi Dry Cell vom 2D-Gel auf eine Immobilon PVDF-Membran überführt. Zunächst wurde die PVDF-Membran 15 s in Methanol benetzt, anschließend 2 min in $H_2O_{\text{dest.}}$ gewässert und 10 min in Anodenpuffer II equilibriert. Das 2D-Gel wurde 15 min in Kathodenpuffer equilibriert. Auf die Anodenplatte der Blot-Aparatur (untere Platte) wurde luftblasenfrei in folgender Reihenfolge aufgelegt:

- 2xBlatt Whatman 1,5 mm Papier (18 x 23 cm) äquibriert in Anodenpuffer I
- 1xBlatt Whatman 1,5 mm Papier (18 x 23 cm) äquibriert in Anodenpuffer II
- 1x PVDF-Membran (18 x 23 cm) äquibriert in Anodenpuffer II
- 1x2D-Gel (18 x 23 cm) äquibriert in Kathodenpuffer (Rand wurde entfernt!)
- 3xBlatt Whatman 1,5 mm Papier (18 x 23 cm) äquibriert in Kathodenpuffer

Mit der Kathodenplatte wurde die Kammer geschlossen und der Proteintransfer vom 2D-Gel auf die PVDF-Membran bei $1,6 \text{ mA/cm}^2$ für zwei Stunden bei RT durchgeführt. Die Effizienz des Proteintransfers wurde durch reversible Proteinfärbung mit Ponceau Rouge S Lösung überprüft (siehe 2.2.13.1). Im Anschluss wurde die Membran für 10 s in Methanol überführt und dann 15 min bei RT getrocknet.

2.2.11 Immundetektion von Proteinen auf PVDF-Membranen

Die Detektion immunreaktiver Proteine mittels einer Antikörperreaktion ist eine spezifische und hochsensitive Methode (Nachweisgrenze $0,1 \text{ ng Protein}$ [321]). Nach Auftrennung von $200 \mu\text{g}$ *B. henselae*-Proteinextrakt mittels 2D-SDS-PAGE und Proteintransfer auf PVDF-Membranen (Western-Blot), wurden für die anschließende Detektion der immunreaktiven *B. henselae*-Proteine 33 positiv auf Antikörper gegen *B. henselae* getestete Seren von Patienten mit klinisch suspekten Symptomen wie lokaler Lymphadenopathie (IFA $\geq 1:200$) bzw. 5 negativ getestete Kontrollseren (IFA $<1:100$) von gesunden Blutspendern verwendet (siehe 2.2.12).

Alle Schritte der Immundetektion wurden in verschließbaren Röhren auf einem Rollenschüttler bei RT durchgeführt. Die einzelnen Schritte und die Zeitdauer der Inkubation sind in Tab. 8 angegeben. Die Farbreaktion nach Zugabe der DAB-Färbelösung wurde abgebrochen, sobald die Proteinpunkte vor klarem Hintergrund sichtbar wurden. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Western-Blots bei RT lichtgeschützt getrocknet, durch Einlesen mit einem Flachbettscanner GS-800 digitalisiert und dann in Folie eingeschweißt gelagert.

Tab. 8: Protokoll für die Immundetektion der *B. henselae*-Antigene mit DAB

Arbeitsschritt	Reagenz	Zeit
Blocken	100 ml Blockpuffer	60 min
Reaktion mit Primärantikörper	25 ml 1:200 Verdünnung des Serums in Blockpuffer	60 min
Waschen	100 ml Waschpuffer	3 x 10 min
Reaktion mit Sekundärantikörper	50 ml 1:10 ³ Verdünnung polyklonaler Kaninchen-anti-Mensch-IgG-HRP in Blockpuffer	60 min
Waschen	100 ml Waschpuffer	3 x 10 min
Entwickeln	50 ml DAB-Färbelösung	5 min
Stoppen	100 ml Stopplösung	15 min
Waschen	100 ml H ₂ O _{dest.}	30 min

2.2.12 Serologische Methoden zum Nachweis von *B. henselae*-Antikörpern in Patientenseren

Der Immunfluoreszenz-Test (IFT) nach CDC-Richtlinien [48] ist die diagnostische Standardmethode zum Nachweis von Antikörpern gegen *B. henselae* im Patientenserum [252, 252]. Dabei wird das Serum seriell mit D-PBS verdünnt und mit fixiertem *B. henselae*-Zellkultur-Antigen inkubiert. Spezifische anti-*B. henselae*-Antikörper als Primärantikörper binden an das fixierte Antigen. Anschließend erfolgt der indirekte Nachweis mittels FITC-konjugierter, polyklonaler Kaninchen-anti-Mensch-IgG Sekundärantikörper. Als Titer wird die höchste Serumverdünnung mit deutlicher Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop angegeben. Zur Präparation von Antigenen für den IFT wurde *B. henselae* in Gegenwart von Vero-Zellen (Nierenzellen der grünen Meerkatze) über 48 h angezüchtet. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Lagerung der Aliquots bei -20 °C. Zunächst wurden 3 µl der hergestellten *B. henselae*-Antigenlösung auf Objektträger aufgebracht, mit PFA/ 20 % Methanol fixiert und bei -20 °C gelagert.

Patientenseren wurden mit D-PBS 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 und 1:1600 verdünnt, auf die Antigen-beschichteten Objektträger aufgebracht und 1 h bei RT inkubiert. Die Objektträger wurden dreimal mit PBS gewaschen, nach Zugabe des FITC-konjugierten Sekundärantikörpers (1:100 Verdünnung in D-PBS) eine Stunde unter Lichtabschluss bei RT inkubiert und anschließend die DNA mit DAPI (1 µg/ ml, 10 min, 4 °C) gefärbt. Die Beurteilung der Titerstufen erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Seren wurden als positiv bewertet, wenn sie bei einer Verdünnung von $\geq 1:200$ im Immunfluoreszenz-Test reaktiv waren. Alle verwendeten Patientenseren wurden in der Diagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen getestet.

2.2.13 Färbung von Proteinen auf PVDF-Membranen

Alle Färbeschritte wurden in Edelstahlwannen durchgeführt. Von jeder zur Färbung benötigten Lösung wurden 0,5 l pro PVDF-Membran eingesetzt und bei niedriger Schüttelfrequenz inkubiert.

2.2.13.1 Färbung der Blotmembran mit Ponceau S

Die PVDF-Membran wurde unmittelbar nach der Beendigung des Protein-Transfers für 5 min in der Färbelösung inkubiert und durch mehrmaliges kurzes Waschen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ entfärbt bis sich der Hintergrund aufhellte und die roten Proteinpunkte deutlich sichtbar wurden.

2.2.13.2 Färbung der Blotmembran mit Amidoschwarz

Nachdem die 2D-Western-Blotmembran getrocknet und digitalisiert waren, wurden die PVDF-Membran für 10 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gewässert. Durch Inkubation der Membran in 50 mM NaOH für 10 min bei RT wurden die spezifisch gebundenen Antikörper sowie die unspezifischen gebundenen Proteine des Blockierungspuffers entfernt. Nach zweimaligem Waschen der Membran für 10 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ wurde die Membran für 48 h in Amidoschwarz-Färbelösung gefärbt und danach in Entfärbelösung entfärbt bis sich der Hintergrund aufhellte und die dunklen Proteinpunkte deutlich sichtbar wurden. Die Membran wurde luftgetrocknet, durch Einlesen mit einem Flachbettscanner GS-800 digitalisiert und dann in Folie eingeschweißt gelagert.

2.2.14 Identifizierung von Proteinen auf PVDF-Membranen

Zur Identifizierung der immunreaktiven Proteine auf den 2D-Western-Blotmembranen wurde zunächst das Punktmuster der digitalisierten, mit Amidoschwarz-gefärbten Abbildungen der 2D-Western-Blotmembranen (siehe 2.2.13.2) mittels der Delta-2D-Software zu dem Punktmuster der annotierten Proteomkarte zur Deckung gebracht (Exact Warp; siehe 2.2.9.4). Nachfolgend wurde das mittels der DAB-gekoppelten Immunreaktion detektierte Punktmuster der Abbildungen der 2D-Western-Blotmembranen mit dem der Amidoschwarz-gefärbten Abbildungen exakt überlagert (Identical Warp; siehe 2.2.9.4)

2.2.15 Identifizierung von Proteinen mittels MALDI-TOF-MS

Die Identifizierung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Hecker, Institut für Mikrobielle Physiologie und Molekularbiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald.

2.2.15.1 Isolierung und tryptischer Verdau von Proteinen aus 2D-SDS-PA-Gelen

Zur Isolierung der Proteinpunkte wurden die mit Colloidal-Coomassie-Blau gefärbten 2D-Gele (siehe 2.2.8.1) in einer Wanne mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ fixiert und einzelne Proteinpunkte mit dem Ettan Spot Picker mit 1,4 mm Stanzkopf-Durchmesser, einer computergestützten Punktstanze, aus den Gelen geschnitten. Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten überführt und mit 100 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ überschichtet. Vereinzelt wurden die Proteinpunkte mit eingekürzten 1 ml Pipettenspitzen ausgestochen, manuell in die 96-Lochplatten gegeben und 100 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ zugesetzt. Die Platten wurden bis zum tryptischen Proteinverdau bei 4 °C gelagert.

Bedingt durch die Spaltstellenspezifität des Trypsins (C-terminal von Lysin und Arginin) wurden bei der tryptischen Hydrolyse der Proteine aus den Gelstücken definierte Fragmente der Proteine erhalten. Diese Peptide sind in der Abfolge und Anzahl der Aminosäuren, also letztlich in der Masse verschieden und stellen den so genannten „peptide mass fingerprint“ (PMF) dar. Es wurden zwei identische Proteinpunkte hydrolysiert, d.h. von derselben Punktposition zweier unabhängig voneinander angefertigter 2D-Gele biologischer Replikate von *B. henselae* Marseille WT. Durch die durchgeführte massenspektrometrische Doppelbestimmung wurde eine sichere Identifizierung der Proteine gewährleistet (siehe 2.2.15.2/3).

Der tryptische Verdau von Proteinen mit der anschließenden Vorbereitung der MALDI-Proben, d.h. das Einbetten der Peptide innerhalb der Matrix auf den MALDI-Edelstahlplatten (MALDI-Targets) wurde automatisch mit der Ettan Spot Handling Workstation anhand des folgenden Protokolls durchgeführt: Die Gelstücke wurden zweimal mit 100 μl Waschlösung I für 30 min bei RT gewaschen, anschließend einmal mit 100 μl Waschlösung II für 10 min bei RT inkubiert und für 17 min bei 37 °C getrocknet. Danach wurden 10 μl der Trypsinlösung zugegeben und die Proteine durch Inkubation für 120 min bei 37 °C hydrolysiert. Zur Extraktion der Peptide aus den Gelstücken wurden 60 μl der Extraktionslösung zugegeben und für 30 min bei 40 °C inkubiert. Der Peptid-haltige Überstand wurde in eine neue 96-Loch-Mikrotiterplatte überführt und die Extraktion wurde durch erneute Zugabe von 40 μl Extraktionslösung wiederholt. Die vereinigten Überstände wurden für 220 min bei 40 °C eingedampft. Der getrocknete Rückstand wurde in 2,2 μl 0,5 % TFA in 50 % CH_3CN aufgenommen. Von dieser Lösung wurden 0,4 μl direkt auf die MALDI-Edelstahlplatten (MALDI-Targets) aufgebracht, 0,4 μl einer gesättigten α -Cyano-4-hydroxymizsäure-Matrixlösung zugegeben und anschließend mit der Probe gemischt. Die Probe wurde für 10 bis 15 min auf der Edelstahl-Platte eingetrocknet, bevor die MALDI-TOF-Messung begonnen wurde.

2.2.15.2 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF-MS-Analyse (*matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry*, Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie) wurde zur Molmassenbestimmung von Peptiden tryptisch hydrolysierter Proteine verwendet und diente der Erfassung des „peptide mass fingerprint“ (PMF).

Bei dieser Methode werden durch Absorption von Laserstrahlung im Hochvakuum die Moleküle der Matrix angeregt, schonend in die Gasphase überführt und teilweise ionisiert. Die absorbierte Laserenergie wird von den angeregten Matrixmolekülen auf die Peptide der Probe übertragen, was ein Herauslösen (Desorption) und eine Ionisierung der Peptide aus der Matrix zur Folge hat. In dieser Arbeit wurden die Peptide aus dem tryptischen Verdau mit α -Cyano-4-hydroxymizsäure als Matrixsubstanz gemischt, auf einer MALDI-Edelstahlplatte eingetrocknet und durch Laserpulsbeschuss wurden geladene Ionen $(M+H)^+$ freigesetzt. Die Massenanalyse der Ionen erfolgte in einem TOF-Analysator (*time of flight*, Flugzeit) anhand der Flugzeit der Ionen bis zum Detektor. Durch die konstante Beschleunigungsspannung ist die Flugzeit abhängig vom Masse/Ladungsverhältnis (m/z). Durchgeführt wurden die Messungen an dem für hohen Probendurchsatz abgestimmten Massenspektrometer Proteome-Analyzer 4700 der Firma Applied Biosystems (Applied Biosystems, Darmstadt, BRD).

Das Massenspektrometer Proteome-Analyzer 4700 hat automatisch die Proben gemessen, die Spektren kalibriert und die Messergebnisse mittels der 4700 Explorer™ Software V 2.0 analysiert. Die Massenspektren der Proteinfragmente der tryptischen Hydrolyse wurden in einem Massenbereich von 900 bis 3700 Da mit Schwerpunkt auf einer Masse von 2000 Da aufgenommen. Für ein Hauptspektrum wurden 25 Subspektren mit jeweils 100 Laserpulsbeschüssen pro Spektrum akkumuliert. Die interne Einpunktkalibrierung erfolgte automatisch über den Peak des autoproteolytisch entstehenden Peptids des Trypsins $(M+H)^+$ mit einer monoisotopischen Masse $m/z = 2211,104$, wenn ein Signal-/Hintergrundverhältnis $S/N \geq 10$ (Signal/Noise Ratio) erreicht wurde. Die Standardmassenabweichung betrug weniger als 0,15 Da. Für weniger als 1 % der Messungen musste die Kalibrierung manuell durchgeführt werden. Die Peaklisten der Messung wurden mit der „Peak to Mascot“ Funktion der 4700 Explorer™ Software erstellt. Dabei wurden folgende Parameter verwendet: Massenbereich (mass range) 900 - 3700 Da, Peakdichte (peak density) 50 Peaks pro 200 Da und Minimalfläche 100 (minimal area), maximal 200 Peaks pro Proteinpunkt. Die Peaklisten wurden für ein Signal-/Hintergrundverhältnis $S/N \geq 6$ (Signal/Noise Ratio) erstellt. Diese in den Peaklisten aufgeführten Peptidpeaks eines Spektrums bzw. die daraus abgeleiteten Peptidmassen des tryptischen Verdaus stellen den „Peptide Mass Fingerprint“ (PMF) des untersuchten Proteins dar und ermöglichten letztlich die Identifizierung des Proteins.

2.2.15.3 MALDI-TOF-TOF Massenspektrometrie

Die Peptide der drei stärksten Peaks im Spektrum der MALDI-TOF-Analyse wurden ausgewählt und in der MALDI-TOF-TOF Analyse nochmals fragmentiert. Das erhaltene Spektrum der fragmentierten Peptide lieferte Informationen zur Aminosäuresequenz des jeweiligen untersuchten Proteins.

Für ein Hauptspektrum wurden 20 Subspektren mit 125 Laserpulsbeschüssen pro Subspektrum akkumuliert. Die interne Einpunktkalibrierung erfolgte automatisch über die Peaks vom monoisotopischen Arginin $[(M+H)^+ m/z = 175,119]$ oder Lysin $[(M+H)^+ m/z = 147,107]$ bei einem erreichten Signal-/Hintergrundverhältnis $S/N \geq 5$ (Signal/ Noise Ratio).

Die Peaklisten der Messung wurden mit der "Peak to Mascot" Funktion der 4700 Explorer™ Software erstellt. Dabei wurden folgende Parameter verwendet: Massenbereich (mass range) 60 bis Vorgänger -20 Da (precursor-20 Da), Peakdichte (peak density) 5 Peaks pro 200 Da und Minimalfläche 100 (minimal area), maximal 20 Peaks pro Vorgänger (precursor). Die Peaklisten wurden für ein Signal-/Hintergrundverhältnis $S/N \geq 5$ (Signal/Noise Ratio) erstellt. Anhand der erhaltenen Peaklisten der MALDI-TOF- bzw. MALDI-TOF-TOF-Analyse wurde die von NCBI unterhaltene *B. henselae* Houston-1 Sequenzdatenbank [5] (NC_005956) mit der Mascot-Suchmaschine durchsucht [242], was letztlich die eindeutige Identifikation der Proteine ermöglichte.

2.2.15.4 Datenbankabfragen und Identifizierung der Proteine

Die Identifizierung der hydrolysierten Proteine erfolgte mit den erstellten Peaklisten aus der massenspektrometrischen Analyse. Zum einen wurden die Peaklisten der Spektren aus der MALDI-TOF-Analyse, also die daraus abgeleiteten Fragmentmassen des jeweiligen *B. henselae*-Proteins nach tryptischer Hydrolyse (PMF) mit potentiellen Proteinfragmenten nach „virtueller tryptischer Hydrolyse“ der Proteine der *B. henselae* Houston-1 NCBI-Datenbank (NC_005956) verglichen (statistische Signifikanz 4700 Explorer™ Software Protein Score C.I. % $\geq 99,0$).

Die PMF-basierte Bestimmung wurde zusätzlich abgesichert, indem die aus den MALDI-TOF-TOF-Spektren abgeleiteten Aminosäuresequenzen der fragmentierten Peptide des jeweiligen Proteins mit den Proteinsequenzen des identifizierten *B. henselae*-Proteins abgeglichen wurde (statistische Signifikanz 4700 Explorer™ Software Ion Score C.I. % $\geq 99,0$). Wenn die Bestimmung durch die MALDI-TOF-Analyse zweier gleicher Proteinpunkte signifikante und übereinstimmende Ergebnisse erbrachte, galt das Protein als identifiziert (Mascot Score $> 44/p < 0,05$) [242]. Dabei wurden für die Datenbanksuche mit der Mascot-Suchmaschine die in Tab. 9 angegebenen Parameter verwendet.

Tab. 9: Parameter für die Datenbanksuche mit der 4700 Explorer™ Software und der Mascot-Suchmaschine.

tolerierte Massenabweichung	35 ppm (Peptid-Toleranz)
	0,35 Da (MS/MS bei Sequenzabfrage)
variable Modifikationen	Oxidation des Methionins/ Carbamidomethylierung/Phosphorylierung von Aminosäuren
Anzahl ungenutzter Schnittstellen	Max. 2

2.2.16 Charakterisierung der Proteine durch *In-silico*-Analyse

Bestimmte Proteine sind in der von NCBI unterhaltenen *B. henselae* Houston-1 Datenbank [5] nur anhand eines detektierten ORF als „Hypothetisches Protein“, also als hypothetisch exprimiertes Protein gekennzeichnet und diesen konnte oftmals keine Funktion zugeordnet werden. Zuweilen wurden im Rahmen dieser massenspektrometrischen Untersuchung bestimmte, wenig charakterisierte Proteine z.B. hypothetische Proteine identifiziert. Um diese Proteine näher zu charakterisieren, wurden für diese Proteine die CD-Datenbank (*Conserved Domain Database*, CDD) [203, 204] und die COG-Datenbank (*Clusters of Orthologous Groups*, COGs) [316, 317] abgefragt. Zusätzlich wurde durch eine Suche in der Pfam-Domänendatenbank versucht, die Proteine anhand bestimmter funktioneller oder struktureller Domänen einzuordnen [17, 18, 88]. Das Programm Signal P wurde benutzt, um das Vorhandensein von Membranankern, Signalpeptiden sowie deren Spaltpositionen am N-Terminus des Proteins vorherzusagen [20, 228].

Für die in dieser Arbeit identifizierten hypothetischen Proteine wurde zudem eine BLAST-Suche ausgeführt [6, 277]. Um die Lokalisation eines Genproduktes vorherzusagen, wurde das Programm PSORTb v.2.0 mit dem bereitgestellten Lokalisationstabellen für *B. henselae* Houston-1 benutzt [97, 98]. Desweiteren wurde die Hydropathie der Proteine mittels des GRAVY-Wertes (*Grand average of hydropathy*) beurteilt. Dieser Wert wurde für alle in der *B. henselae* Houston-1 Datenbank aufgeführten Proteine nach etablierten Algorithmen [175] mit dem Programm Sequence Manipulation Suite [311] errechnet. Der CAI-Wert (*Codon Adaptation Index*) wurde für jedes Protein nach beschriebenen Algorithmen [38, 301] vom JCAT-Programm erhalten [110]. Das Molekulargewicht MW sowie der isoelektrische Punkt pI wurden für alle *B. henselae*-Proteine mit dem pI/MW-Berechnungswerkzeug mit den Standardeinstellungen für die pK-Werte der Aminosäuren berechnet.

Um die Funktion bestimmter Proteine im physiologischen Zusammenhang zu beurteilen, wurden für diese Proteine die KEGG-Datenbank [150-152] und die STRING-Datenbank [142, 329-331] abgefragt.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Methode der zweidimensionalen SDS-PA-Gelelektrophorese

Die Methode der Proteinauftrennung mittels der zweidimensionalen SDS-PA-Gelelektrophorese (2D-SDS-PAGE) ermöglicht die Auftrennung einzelner, intakter Proteine in komplexen, biologischen Proben entsprechend des isoelektrischen Punktes (pI), des Molekulargewichtes (MW) und der relativen Häufigkeit eines Proteins auf einem 2D-SDS-PA-Gel und liefert folglich Informationen über die qualitative und quantitative Zusammensetzung der untersuchten Proteinmischung. Das resultierende 2D-SDS-PA-Gel spiegelt bestimmte zelluläre Veränderungen auf Proteinebene direkt wider (z.B. Änderungen des Expressionsniveaus, Vorkommen von bestimmten Proteinisofomen). Jedoch benötigt die zweidimensionale SDS-PA-Gelelektrophorese aufgrund der Vielfältigkeit und der Verschiedenartigkeit des zu untersuchenden, biologischen Materials jeweils eine empirische Optimierung der Probenaufbereitung und der anschließenden Proteinauftrennung für jede zu analysierende, biologische Probe. Es ist demnach Voraussetzung, dass alle methodischen Parameter aufeinander abgestimmt sind, um schlussendlich den Informationsgehalt der hergestellten 2D-SDS-PA-Gele ausschöpfen zu können [108].

Während und nach der Lyse der Zellen müssen die Proteine denaturiert und reduziert werden, um die intra- und intermolekularen Interaktionen aufzulösen. Zudem müssen sie gleichzeitig unter Erhaltung der individuellen Ladungseigenschaften solubilisiert bleiben, damit idealerweise jeder einzelne Proteinpunkt auf dem 2D-Gel ein individuelles Protein bzw. Polypeptid darstellt. Neben den im 2D-Lyse- bzw. 2D-Rehydratisierungspuffer befindlichen Detergenzien (CHAPS) und chaotropen Agenzien (Harnstoff, Thioharnstoff) zur Denaturierung und Solubilisierung der Proteine ist der Zusatz eines geeigneten Reduktionsmittels zum Lösen der intra- und intermolekularen Disulfidbrücken ein kritischer Punkt der 2D-SDS-PAGE.

Das verwendete Reduktionsmittel spaltet die intra- und intermolekularen Cystinbrücken, ermöglicht so eine vollständige Proteindenaturierung und hält die freien Sulfhydrylgruppen des Cysteinylnrestes im reduzierten Zustand, um so eine Reoxidation zu verhindern. Eine derart zufällige Reoxidation führt zu beliebiger Proteinaggregation, die sich bei der 2D-SDS-PAGE aufgrund nicht reproduzierbarer elektrophoretischer Mobilität der Proteine durch streifenartige, verwischte Punkte auf dem 2D-Gel äußert. Derzeit werden für die 2D-SDS-PAGE verschiedene Reduktionsmittel eingesetzt, um die Disulfidbrücken der Proteine zu spalten und die Sulfhydrylreste in einem reduzierten Zustand zu halten, jedoch ist der Einsatz der vorrangig in der 2D-SDS-PAGE eingesetzten Reduktionsmittel durch eine Reihe von nachteiligen Eigenschaften beeinträchtigt.

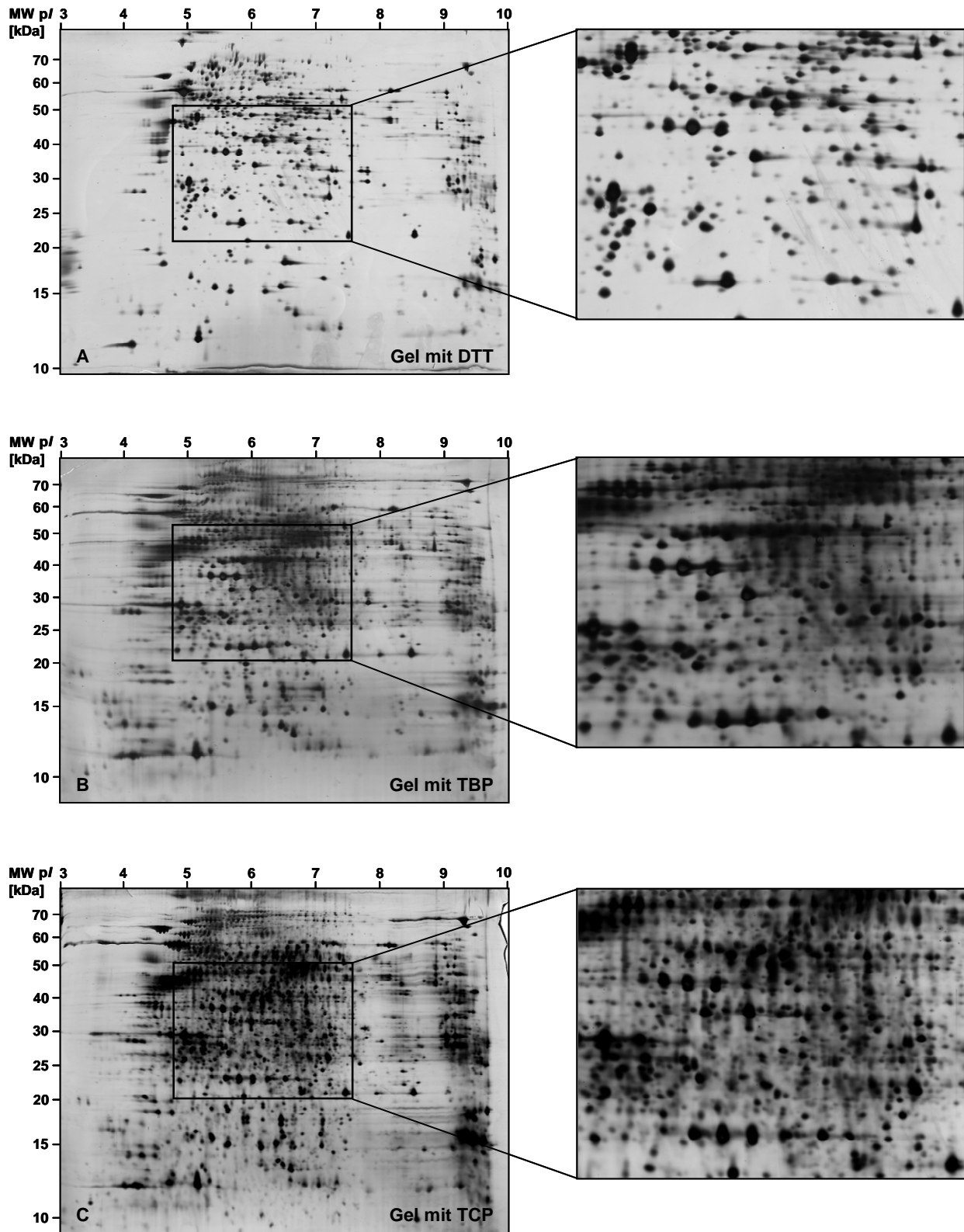


Abb. 3: Proteinauflösung der silbergefärbten 2D-Gele der extrahierten Proteine von *B. henselae* Marseille in Abhängigkeit vom verwendeten Reduktionsmittel. Die Trennung der Proteine erfolgte mittels 24 cm linearen IPG-Streifen 3 - 10/ 15 % SDS-PAGE. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives, unter Verwendung von 65 mM DTT (A), 5 mM TBP (B) und 10 mM TCP (C) hergestelltes 2D-SDS-PA-Gel der extrahierten *B. henselae*-Proteine mit einem Größenausschnitt im Bereich von pI 4,8 - 7,6 und MW 20 - 50 kDa. Wenn auch die Anzahl der unter Verwendung von TBP und TCP dargestellten Proteinpunkte auf den 2D-Gelen vergleichbar ist, so ermöglicht der Einsatz des gut wasserlöslichen TCP eine deutlich bessere Auftrennung der einzelnen Proteine bzw. Proteinspezies.

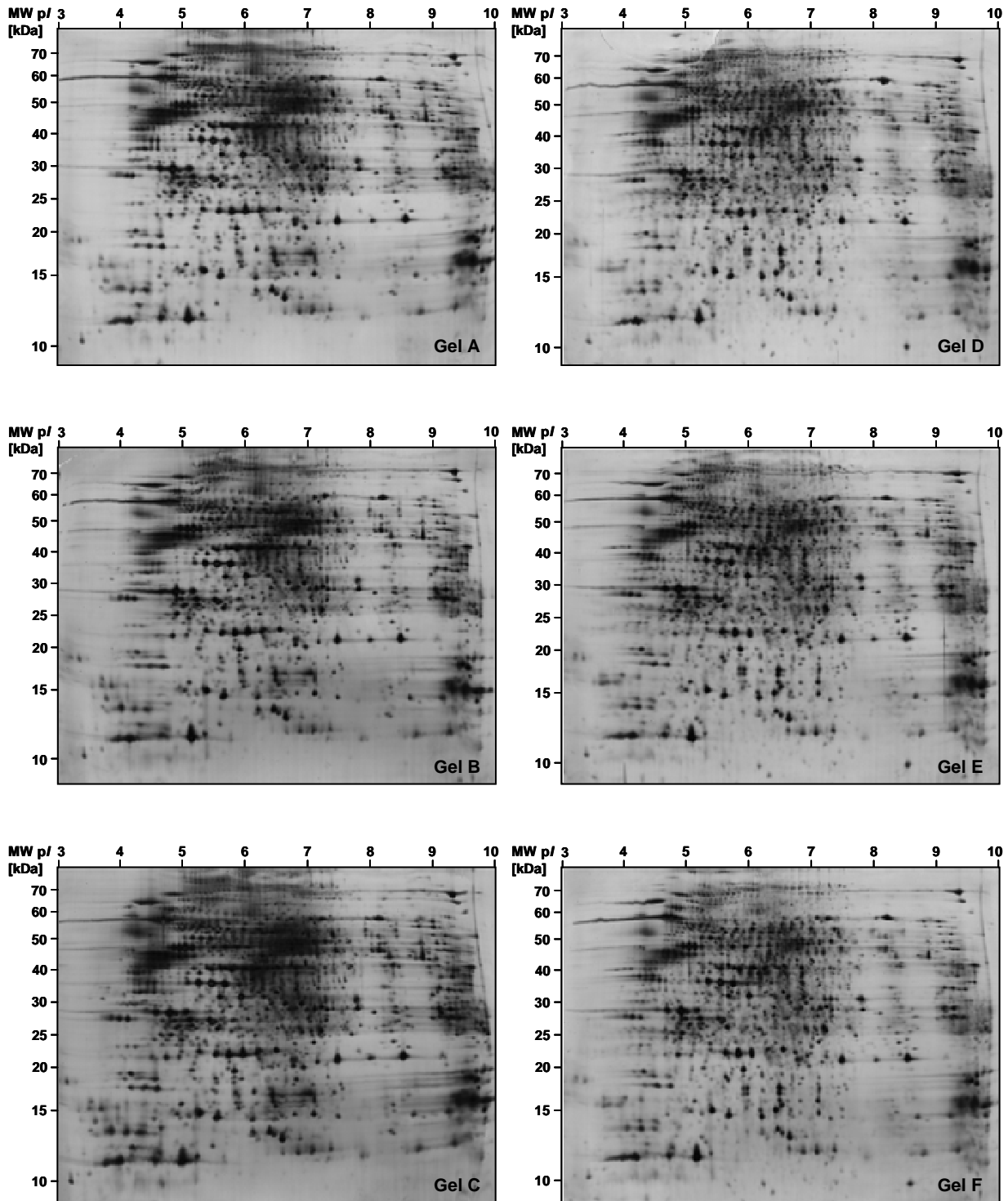


Abb. 4: Proteinauflösung der silbergefärbten 2D-Gele der extrahierten Proteine von *B. henselae* Marseille in Abhängigkeit vom verwendeten Reduktionsmittel. Die Trennung der Proteine erfolgte mittels 24 cm linearen IPG-Streifen 3 - 10/ 15 % SDS-PAGE. Die Abbildung zeigt eine Gegenüberstellung der unter Verwendung von 5 mM TBP (links, Gele A, B, C) und 10 mM TCP (rechts, Gele D, E, F) hergestellten 2D-SDS-PA-Gele. Der Einsatz des gut wasserlöslichen TCP ermöglicht eine deutlich höhere Reproduzierbarkeit des Punktmusters der auf den 2D-Gele dargestellten Proteinpunkte bezüglich der Punktqualität und Punktquantität.

Entweder sind diese durch geringe Löslichkeit in wässrigen Lösungen gekennzeichnet [z.B. TBP (Tributylphosphin)] oder sie führen eine Abwanderung im pH-Gradienten während der IEF aus [z.B. DTT (1,4-Dithiothreitol), DTE (1,4-Dithioerythritol) 2-Mercaptoethanol (2-ME), TCEP (Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin)]. Beide Eigenschaften können sich sehr negativ auf das Resultat der 2D-Gelelektrophorese auswirken. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Vergleich einiger bereits etablierter bzw. als geeignet erachteter Proteinreduktionsmittel durchgeführt. Das gebräuchliche DTT, das oftmals eingesetzte Tributylphosphin und das in diesem Zusammenhang nicht etablierte, jedoch aufgrund seiner physikochemischen Merkmale als geeignet erscheinende TCP [Tris-(2-cyanoethyl)-phosphin] wurden dazu auf ihre Verwendbarkeit bei der 2D-SDS-PAGE in diesem experimentellen Ansatz geprüft.

Das auf freien Thiolgruppen basierende Reduktionsmittel DTT sowie die auf einer vorhandenen Phosphingruppe basierenden Reduktionsmittel TBP und TCP wurden in den angegebenen Konzentrationen sowohl dem 2D-Lysepuffer als auch dem 2D-Rehydratisierungspuffer (siehe 2.1.5.3) zugesetzt und der *B. henselae*-Proteinextrakt gewonnen bzw. weiterverarbeitet (siehe 2.2.6.1). Die 2D-SDS-PAGE wurde jeweils unter Auftragung einer konstanten Proteinmenge unter identischen Bedingungen durchgeführt (siehe 2.2.7.1-3, 2.2.8.2). Die unter Verwendung von DTT aufbereiteten *B. henselae*-Proteinextrakte zeigten auf den angefertigten, silbergefärbten 2D-Gelen deutlich weniger und zudem schlecht aufgelöste Proteinpunkte als auf den 2D-Gelen der unter Verwendung von TBP bzw. TCP aufbereiteten *B. henselae*-Proteinextrakte (Abb. 3). Zudem war die Reproduzierbarkeit des Punktmusters auf den 2D-Gelen mit der DTT-behandelten Proteinprobe gering ausgeprägt gegenüber der erzielten Reproduzierbarkeit der 2D-Gele mit den TBP- bzw. TCP-behandelten *B. henselae*-Proteinextrakten.

Beim direkten Vergleich der 2D-Gele des *B. henselae*-Proteinextraktes, der mit dem schlecht wasserlöslichen und flüchtigen TBP aufbereitet wurde und des Proteinextraktes, der mit dem wesentlich besser wasserlöslichen TCP behandelt wurde, wird offenbar, dass die Verwendung von TCP eine nochmals verbesserte Auftrennung und Auflösung der Proteine ermöglicht (Abb. 3, 4). Somit erlaubt das gut wasserlösliche TCP, trotz einer ähnlichen Anzahl von dargestellten Proteinpunkten auf dem unter Verwendung von TBP erstellten 2D-Gel, eine deutlich höhere Reproduzierbarkeit des Punktmusters bezüglich der Punktqualität und Punktquantität.

Um diese Abhängigkeit der Qualität der 2D-Gele vom eingesetzten Reduktionsmittel näher zu untersuchen, wurde das jeweils verwendete Reduktionsmittel im IPG-Streifen mit einem pH-Gradienten von 7 - 11 ohne jegliche Proteinbeladung nach Beendigung der IEF mittels DTNB (Ellmanns Reagenz; 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure) nachgewiesen (siehe 2.2.7.2). Dabei erfolgte der Nachweis anhand der entstehenden Gelbfärbung bei der Umsetzung von DTNB zu 5-Thio-2-nitrobenzoat nach einer 3 min Inkubation (Abb. 5). Dabei konnte nur sehr wenig

verbliebenes TBP in dem IPG-Streifen mit TBP-haltigem Rehydratisierungspuffer nachgewiesen werden, was an der sehr schwachen Umsetzung des DTNB erkennbar ist. Ebenfalls ließ sich kein verbliebenes DTT in dem basischen, kathodischen Bereich des IPG-Streifens mit DTT-haltigem Rehydratisierungspuffer nachweisen. Eine starke, kontinuierliche Reaktion des Reduktionsmittels TCP mit DTNB erfolgte ausschließlich in dem IPG-Streifen mit TCP-haltigem Rehydratisierungspuffer.

Da offenbar die Reduktion der *B. henselae*-Proteinprobe mit TCP eine sehr gute qualitative und quantitative Reproduzierbarkeit des Punktmusters auf den 2D-SDS-PA-Gelen ermöglicht, wurde dieses Reduktionsmittel in allen folgenden Experimenten eingesetzt. Darüber hinaus ist es als gut wasserlösliches Pulver wesentlich besser zu handhaben als das leicht flüchtige, schlecht wasserlösliche, an der Luft bereits stark reaktive TBP, das stets unter Stickstoffatmosphäre zu verarbeiten ist.



Abb. 5: Probe auf Vorhandensein des jeweils verwendeten Reduktionsmittels im IPG-Streifen pH 7 - 11 ohne Proteinbeladung nach Beendigung der IEF (Tab. 5). Der Nachweis erfolgte anhand der Gelbfärbung nach 3 min Inkubation in 20 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0 mit 1 mM DTNB (Ellmanns Reagenz) - Verwendung von 65 mM DTT (A), 130 mM DTT (B), 5 mM TBP (C) und 5 mM TCP (D) bzw. 10 mM TCP (E). Eine deutliche und flächendeckende Reaktion mit DTNB ist ausschließlich bei Verwendung von TCP (D, E) zu verzeichnen.

3.2 *In-silico*-Untersuchung des *B. henselae*-Proteoms

Die *In-silico*-Proteomkarte von *B. henselae* Houston-1 mit dem ihr eigenen Verteilungsmuster zeigt Ähnlichkeiten zu anderen bereits bekannten, publizierten *In-silico*-Proteomkarten sowohl Gram-positiver als auch Gram-negativer Mikroorganismen wie *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis* und *Caulobacter crescentus* [12, 37, 81, 223]. Die Proteine befinden sich in zwei Verteilungszentren - ein Zentrum besteht vorwiegend aus Proteinen mit einem *pI* von 4,0 - 7,5 und das andere Zentrum umfasst die Proteine mit einem *pI* von 8,5 - 11,0 (Abb. 6).

Das Genom von *B. henselae* Houston-1 (NCBI-Zugangsnummer: NC_005956) kodiert für 1488 Proteine. Um eine theoretische Proteomkarte anhand der Genomdaten von *B. henselae* zu erstellen, wurde für alle Genprodukte der isoelektrische Punkt *pI* und das Molekulargewicht MW ausgerechnet und gegeneinander aufgetragen. Dabei wurde der Einfluss der Signalpeptide auf *pI* und MW vernachlässigt und eine potentielle Abspaltung der detektierten Signalpeptide außer

Betracht gelassen. Von den *B. henselae*-Proteinen besitzt kein Protein einen $pI \leq 3$, aber 107 Proteine, also 7,2 % des Proteoms, haben einen vorhergesagten $pI > 10$ und überschreiten deshalb den dargestellten pH-Bereich des erstellten 2D-Gels. Diese alkalischen Proteine repräsentieren zu einem großen Teil ribosomale Proteine, Transkriptionsfaktoren, DNA-Bindeproteine sowie hypothetische Proteine d.h. lediglich postulierte Proteine aufgrund eines detektierten ORFs im *B. henselae*-Genom. Das Molekulargewicht aller *B. henselae*-Proteine reicht von 5 - 326 kDa, nahezu 90 % der Proteine befinden sich im Bereich zwischen 10 und 100 kDa. Nur ein kleiner Anteil von 40 Proteinen, 2,7 % des Proteoms, besitzt ein berechnetes Molekulargewicht oberhalb von 100 kDa. Demgegenüber sind 116 Proteine, also 7,8 % des Proteoms, kleiner als 10 kDa. Deshalb erfasst die Proteomkarte mit dem gegebenen Trennbereich die Proteine von pI 3 - 10 und einem MW 10 - 100 kDa, d.h. theoretisch 84 % des gesamten *B. henselae*-Proteoms, genauer 1252 Proteine.

Um das Vorkommen der Proteine des *B. henselae*-Proteoms zu bewerten, wurde der CAI-Wert (*Codon Adaptation Index*) aller *B. henselae*-Proteine berechnet und die Häufigkeitsverteilung der CAI-Werte von allen Proteinen, von den erwarteten Proteinen im erfassten pI -MW-Bereich und von den in dieser Arbeit identifizierten Proteinen dargestellt (Abb. 7). Generell steht ein höherer CAI-Wert für ein potentiell höheres Expressionsniveau eines Genes. Die CAI-Werte aller *B. henselae*-Proteine reichen von 0,27 - 0,71.

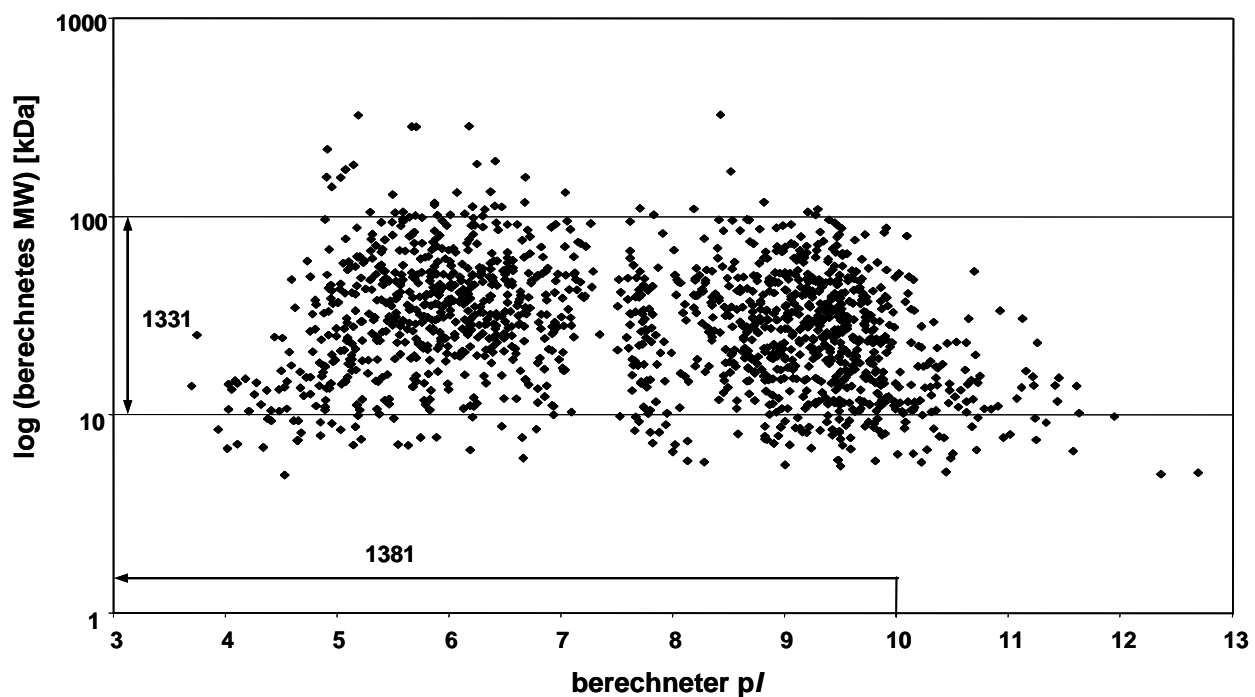


Abb. 6: *In-silico*-Proteomkarte von *B. henselae* Houston-1. Das berechnete Molekulargewicht MW aller Proteine der *B. henselae* NCBI Datenbank (Zugangsnummer: NC_005956) ist gegen den berechneten isoelektrischen Punkt pI aufgetragen. Der pI -MW-Bereich der hier durchgeführten Proteomanalyse von *B. henselae* (pI 3 - 10 und MW 10 - 100 kDa) umfasst eine theoretische Anzahl von 1252 Proteinen.

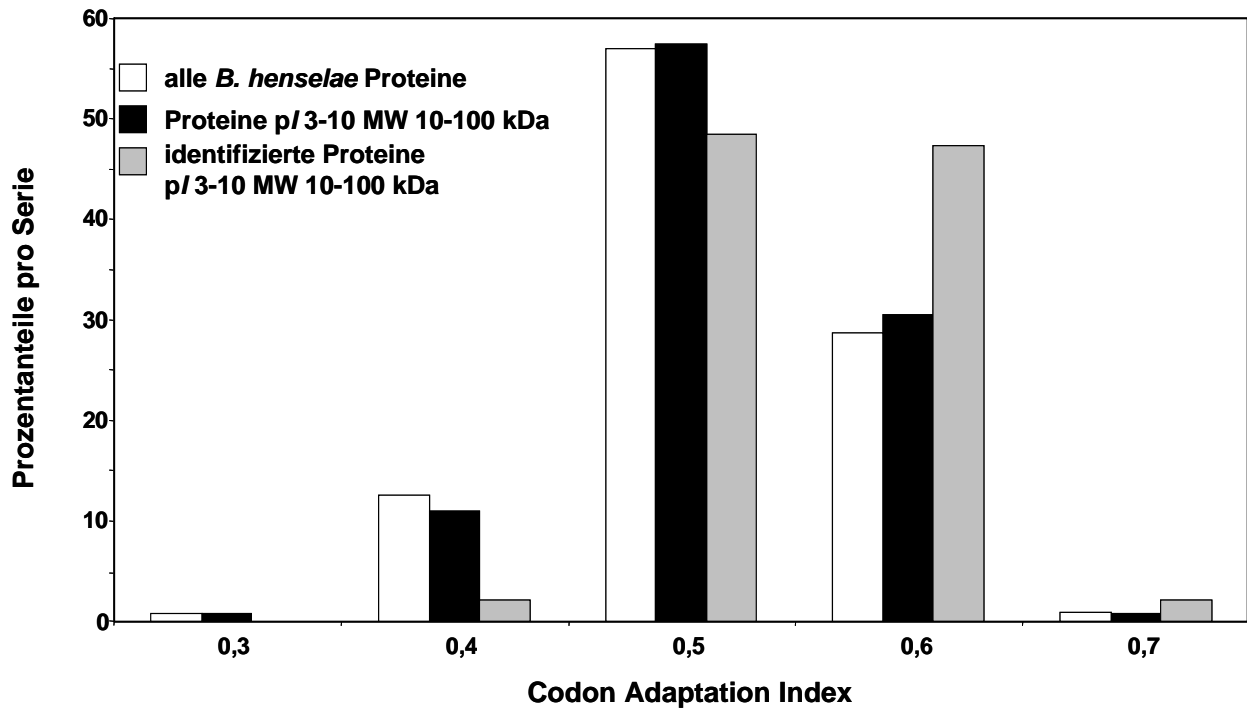


Abb. 7: Die Häufigkeitsverteilung der CAI-Werte (*Codon Adaptation Index*) im *B. henselae*-Proteom. Das Diagramm stellt die Prozentanteile der Proteine jeder Serie den CAI-Werten gegenüber und zeigt somit die Zusammensetzung jeder Serie auf. Die Anzahl der Proteine jeder Serie umfasst entweder alle 1488 *B. henselae*-Proteine der NCBI-Datenbank (Zugangsnummer NC_005956), alle 1252 Proteine im gezeigten Bereich p/ 3 - 10 und MW 10 - 100 kDa bzw. alle 191 in dieser Studie identifizierten Proteine.

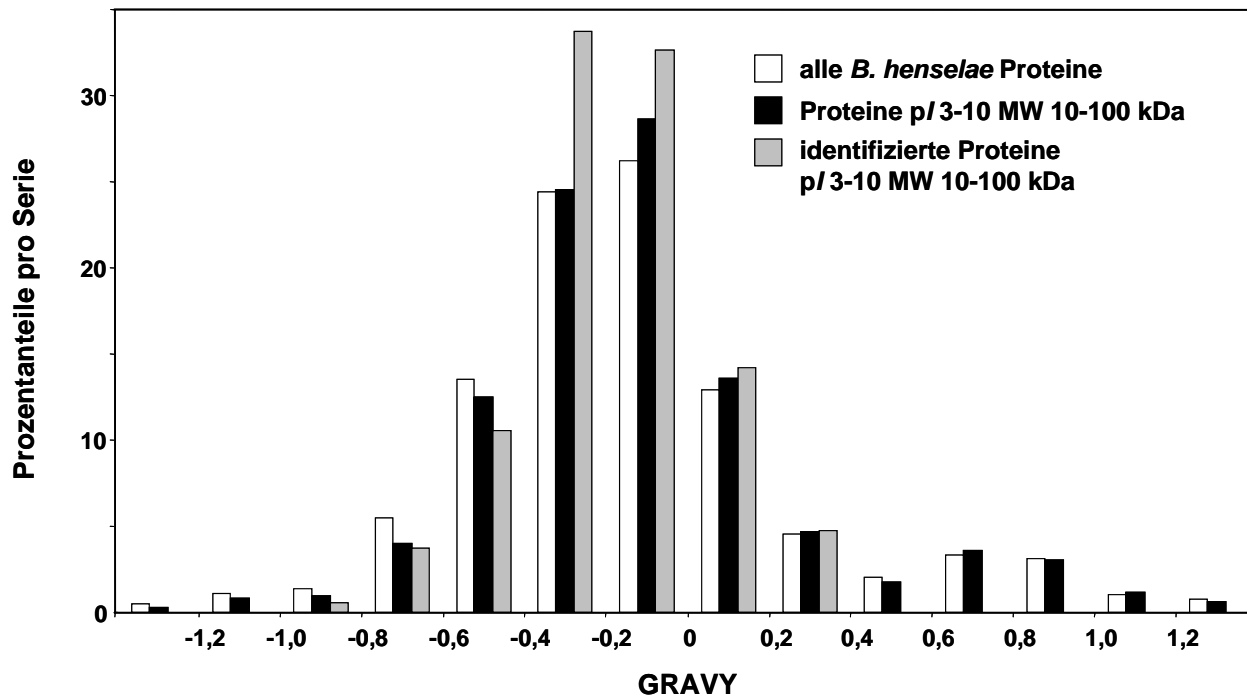


Abb. 8: Die Häufigkeitsverteilung der GRAVY-Werte (*Grand Average of Hydropathy*) im *B. henselae*-Proteom. Das Diagramm stellt die Prozentanteile der Proteine jeder Serie den GRAVY-Werten gegenüber und zeigt somit die Zusammensetzung jeder Serie auf. Die Anzahl der Proteine jeder Serie umfasst entweder alle 1488 *B. henselae*-Proteine der NCBI-Datenbank (Zugangsnummer NC_005956), alle 1252 Proteine im gezeigten Bereich p/ 3 - 10 und MW 10 - 100 kDa bzw. alle 191 in dieser Studie identifizierten Proteine.

Darüber hinaus wurde auch die Hydrophathie der Proteine bewertet. Dazu wurde der GRAVY-Wert (*Grand Average of Hydropathy*) aller *B. henselae*-Proteine berechnet und die Häufigkeitsverteilung der GRAVY-Werte von allen Proteinen, von den erwarteten Proteinen im erfassten pI-MW-Bereich und von den in dieser Arbeit identifizierten Proteinen dargestellt. Dabei besitzen die hydrophoben Proteine einen GRAVY-Wert ≥ 0 [175]. Die Proteine mit einem GRAVY-Wert $\geq 0,4$ können in dem hier beschriebenen 2D-SDS-PAGE-System nicht aufgetrennt werden. Schlussendlich können demzufolge theoretisch 76 % des *B. henselae*-Proteoms, genauer 1125 Proteine, mit diesem Standard-Gel-System im Bereich pI 3 - 10, MW 10 - 100 kDa dargestellt werden, jedoch wird eine gewisse Anzahl der Proteine vom gesamten Proteom lediglich unter bestimmten Wachstumsbedingungen oder in sehr geringer Häufigkeit exprimiert, was eine geringere Anzahl der tatsächlich auf dem 2D-SDS-PA-Gel aufgelösten Proteine zur Folge hat.

3.3 Untersuchung des *B. henselae*-Proteoms mittels 2D-SDS-PAGE

Die *B. henselae*-Suspension (siehe 2.2.2) wurde mit D-PBS gewaschen, in 1,25 x 2D-Lyse-Puffer resuspendiert und mit q.s. $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auf 1 x Lyse-Puffer verdünnt. Die Extraktion der *B. henselae*-Proteine erfolgte für 1 h bei RT, anschließend wurden unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation vom Proteinextrakt abgetrennt (siehe 2.2.6.1) und 300 μg *B. henselae*-Proteine mittels 24 cm linearen IPG-Streifen 3 - 10/ 15 % SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.2.7). Die resultierenden 2D-SDS-PA-Gele wurden mit Colloidal-Coomassie-Blau (siehe 2.2.8.1) gefärbt. Zur Erstellung der Proteomkarte von *B. henselae* Marseille wurden die Abbildungen zweier unabhängig voneinander gewonnener 2D-SDS-PA-Gele übereinandergelagert, zur Deckung gebracht und nach massenspektrometrischer Identifizierung der Proteinpunkte mit dem Computerprogramm Decodon Delta-2D annotiert (Abb. 9-12). Die hier erstellten 2D-SDS-PA-Gele biologischer Replikate von *B. henselae* Marseille besitzen eine sehr hohe Auflösung sowie eine sehr gute Reproduzierbarkeit des Punktmusters der angefärbten Proteine und geben mit mehr als 900 detektierten Proteinpunkten einen umfassenden Überblick über das *B. henselae*-Proteom.

Um die Zusammensetzung der in verschiedene Proteinpunkte aufgetrennten Proteine bzw. Proteinspezies von *B. henselae* zu untersuchen, wurden diese aus den gefärbten 2D-SDS-PA-Gelen ausgeschnitten, einer tryptischen Proteolyse unterzogen und mittels MALDI-TOF-MS-Analyse identifiziert (siehe 2.2.15). Nur wenn eine massenspektrometrische Identifizierung zweier identischer Proteinpunkte von den zwei 2D-Gelen übereinstimmende Ergebnisse erbrachte, galt das Protein als identifiziert. Aufgrund dieser stringenten Kriterien konnte eine eindeutige Proteinbezeichnung, also der abgekürzte Proteinname oder alternativ die GI-Nummer des kodierenden ORF, zu ungefähr ca. 50 % der Proteinpunkte zugewiesen werden. Diese erstellte

2D-Proteomkarte umfasst eine Anzahl von 431 identifizierten Proteinpunkten. Insgesamt konnten 191 verschiedene Proteine identifiziert werden.

Alle identifizierten Proteine der 2D-Proteomkarte mit der zugewiesenen, auf der Proteomkarte verwendeten Bezeichnung wie dem Proteinnamen bzw. ihrer GI-Nummer, der Proteinbeschreibung, der Zugangsnummer des Proteins (Accession Number), der Lokusnummer des Gens auf dem *B. henselae*-Genom (Locus Tag) sowie der Anzahl der nachgewiesenen Proteinpunkte (Isoformen) sind in Tab. 11 aufgeführt. Ebenso sind das theoretische und empirische Molekulargewicht, der theoretische und empirische isoelektrische Punkt, der berechnete CAI- und GRAVY-Wert, der COG-Buchstabencode zur Zuordnung zur funktionellen COG-Kategorie, die PSORTb-basierte Lokalisationsvorhersage und die SignalP-basierte Detektion eines N-terminalen Signalpeptides angegeben. Des Weiteren sind alle präsentierten Daten der Proteinidentifizierung der annotierten Proteine der 2D-Proteomkarte online unter <http://www.bartonella.coolix.com/> einschließlich aller Abbildungen der verwendeten 2D-SDS-PAGE-Gele zur MALDI-TOF-MS basierten Proteinidentifizierung der Proteinpunkte sowie detaillierte Informationen über alle MS-Messungen einsehbar z.B. MS-Identifikationstabelle I, II mit Punktnummer (Spot Number), Proteinbeschreibung (Protein Description), Zugangsnummer des Proteins (Accession Number), Rangstelle der Proteinbestimmung (Identification Rank), Bewertungsnote der Proteinbestimmung (Mascot Protein-Score), Sequenzabdeckung der Proteinbestimmung, Anzahl der gemessenen und identifizierten Peptide, Sequenz der identifizierten Peptide [siehe dazu jeweils Dateien „Protein Summary Report“ (Prot_Sum), „Hit Result“ (Hit_Result), „Peptide Summary Report“ (Pep_Sum); siehe auch Abb. 13, 14, 15].

Bestimmte Proteine erscheinen als mehrere Proteinpunkte und stellen vermutlich verschiedene Proteinspezies, sogenannte Isoformen eines Proteins dar. Lediglich 85 der 191 identifizierten Proteine wurden nur in einem einzigen Proteinpunkt gefunden (Tab. 11). Die vorhergesagten isoelektrischen Punkte der identifizierten Proteine reichen von einem pI 4,33 der ϕ -Untereinheit der RNA-Polymerase (RpoZ) bis zu einem pI 9,50 für das periplasmatische häminbindendes Protein (HutB). Das identifizierte Protein mit dem niedrigsten berechneten Molekulargewicht stellt das hypothetische Protein BH02650 (YP_033117.1/ GI 49475076) mit 9,35 kDa dar, das mit dem höchsten berechneten Molekulargewicht ist die Aconitathydratase mit 98,49 kDa. Dies bestätigt die Auftrennung im erwarteten pI - MW-Bereich des verwendeten 2D-SDS-PAGE-Systems.

Der CAI-Wert der detektierten Proteine umfasst Proteine mit einem CAI-Wert 0,395 wie die Deoxyuridin-5'-triphosphat-Nukleotidhydrolase (Dut) bis zu einem CAI-Wert 0,673 für die Nukleosiddiphosphat-Kinase (Ndk). Von den identifizierten Proteinen besitzen 35 einen GRAVY-Wert ≥ 0 , was eindeutig zeigt, dass auch deutlich hydrophobe Proteine mittels der hier verwendeten 2D-SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Dies wird auch durch die in dieser Arbeit

identifizierte ϵ -Kette der ATP Synthase mit einem GRAVY-Wert 0,319 verdeutlicht. Um die Häufigkeitsverteilung der CAI- bzw. der GRAVY-Werte der analysierten Proteine innerhalb des *B. henselae*-Proteoms vergleichbar darzustellen, wurden die jeweilige Anzahl der Proteine gegen die CAI- bzw. GRAVY-Werte in Form eines Säulendiagramms aufgetragen (Abb. 7, 8).

Entsprechend der COG-Klassifikation gehören die identifizierten Proteine der 2D-Proteomkarte in Abhängigkeit von der jeweiligen Funktion des Proteins verschiedenen funktionellen COG-Kategorien an (Tab. 10). Dabei stellen die in Energiegewinnung und Energieumwandlung involvierten Proteine die größte Gruppe (21 Proteine). Die nächstgrößeren Gruppen umfassen Proteine, die in posttranslationale Modifikation, Proteinumsatz, Proteinfaltung (19 Proteine), Translation (19 Proteine), Aminosäuretransport und Aminosäuremetabolismus (15 Proteine) sowie in den Transport anorganischer Ionen (7 Proteine) eingebunden sind. Eine Anzahl von 21 Proteinen wurde mehr als nur einer COG-Gruppe zugewiesen.

Mittels der PSORTb-Lokalisationsvorhersage wurden die annotierten Proteine der 2D-Proteomkarte als 3 OMPs (*outer membrane protein*, Protein der äußeren Membran), 8 IMPs (*inner membrane protein*, Protein der inneren Membran), 11 periplasmatische Proteine und 107 zytoplasmatische Proteine charakterisiert. Einer Anzahl von 62 Proteinen konnte entweder keine Lokalisation oder mehrere mögliche Lokalisationen zugewiesen werden, so dass dann keine Zuordnung erfolgte (Tab. 11).

3.4 Hypothetische *B. henselae*-Proteine

Für bestimmte detektierte offene Leserahmen (ORFs) im *B. henselae*-Genom kann keine Aussage über eine tatsächliche Expression gemacht werden und die potentiellen Genprodukte werden in der *B. henselae*-Datenbank als hypothetische Proteine geführt. Eine Anzahl von 16 dieser hypothetischen Proteine konnte auf der 2D-Proteomkarte von *B. henselae* Marseille durch MALDI-TOF-MS identifiziert und somit in ihrer Existenz bestätigt werden (Tab. 11). Von denen besitzen die meisten Proteine sequenzhomologe Äquivalente in anderen α -Proteobakterien (z.B. *Bartonella* spp., *Brucella* spp., *Sinorhizobium* spp., *Rhizobium* spp., *Agrobacterium tumefaciens*).

Abb. 9-12: Nächste Seiten - 2D-Proteomkarte des Proteoms von *B. henselae* Marseille. Die Abbildung besteht aus zwei überlagerten Abbildungen unabhängig voneinander erstellter 2D-SDS-Polyacrylamidgele der extrahierten Proteine von *B. henselae* Marseille. Die Trennung der Proteine erfolgte mittels 24 cm linearen IPG-Streifen 3 - 10/ 15 % SDS-PAGE und die Gele wurden mit Colloidal-Coomassie-Blau gefärbt. Die 2D-Proteomkarte zeigt einen Bereich von pI 3,6 - 9,7 und MW 10 - 100 kDa und wurde in vier Ausschnitte mit geringfügigem Überhang unterteilt. Die Proteinpunkte sind mit den Proteinnamen bzw. mit den GI-Nummern entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomdatenbank (NCBI, Zugangsnummer NC_005956) bezeichnet. Weiterführende Informationen sind in Tab.11 bzw. online unter <http://www.bartonella.coolix.com> gegeben.

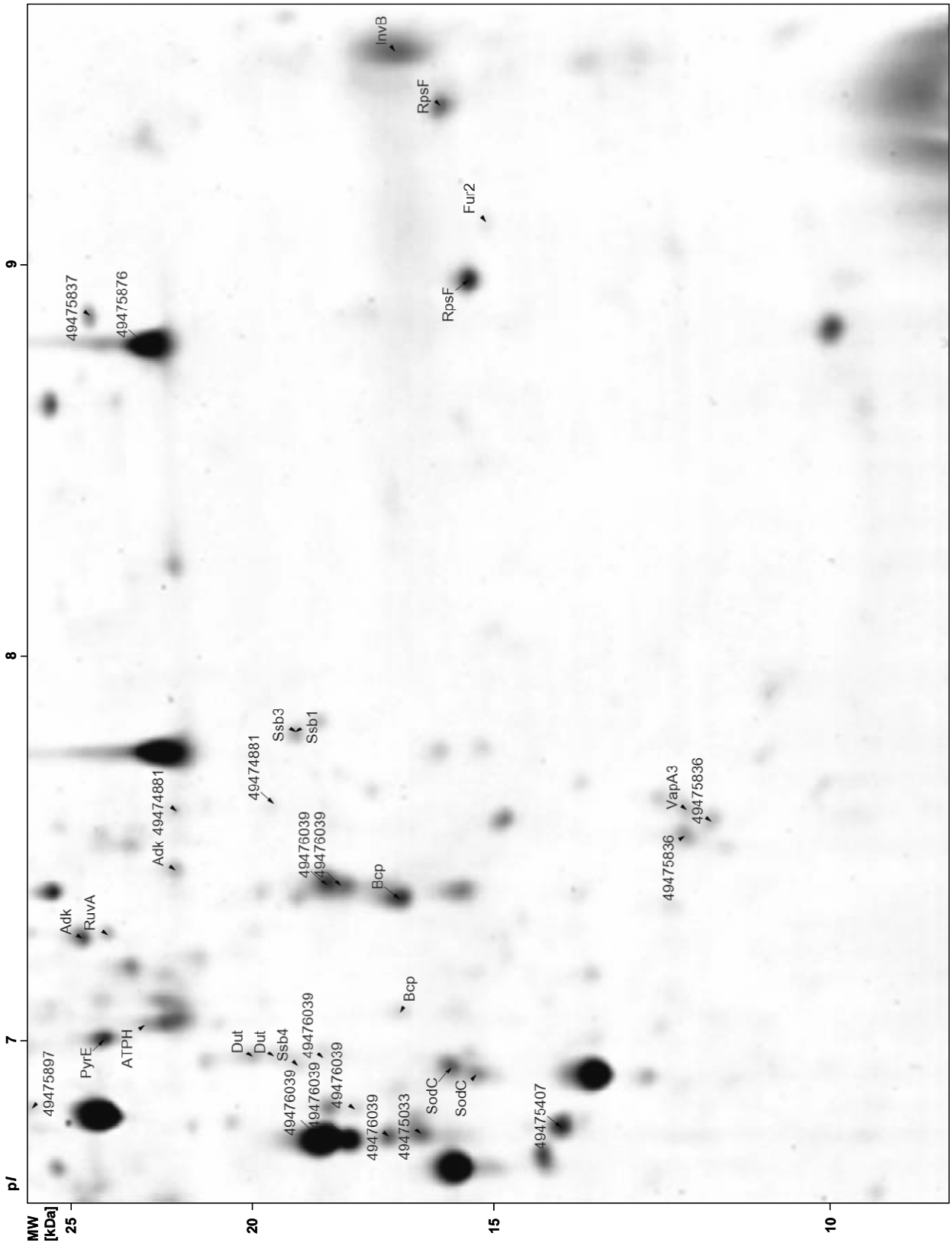


Abb. 12: Unterer rechter Ausschnitt niedrigem MW und alkalischem pI (pH-Bereich 6,7 - 9,7, MW-Bereich 9 - 25 kDa).

Tab. 10: Allgemein werden Proteine innerhalb der NCBI-Genomsequenzen in verschiedene Proteinfamilien wie Proteine der Erbinformationsverarbeitung, Proteine der zellulären Prozesse, Proteine des Stoffwechsels und wenig charakterisierte Proteine zugeordnet. Diese teilen sich in verschiedene COG-Kategorien (COGs, *Cluster of orthologous groups*), die hier mit der Anzahl der identifizierten Proteine angegeben sind (siehe Details zu COGs: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/coxik.cgi?gi=409>).

COGs-funktionelle Kategorie	COG-Kode	Anzahl der identifizierten Proteine
Translation	J	19
Transkription	K	6
Replikation, Rekombination und Reparatur	L	10
Zellzykluskontrolle	D	4
Abwehrmechanismus	V	0
Signaltransduktionsmechanismus	T	2
Zellwand-/Membranbiogenese	M	6
Zellfortbewegung	N	0
Zytoskelett	Z	0
Extrazelluläre Strukturen	W	0
Intrazellulärer Transport und Sekretion	U	2
Posttranslationale Modifikation, Proteinumsatz, Chaperone	O	19
Energiegewinnung und Energieumwandlung	C	21
Kohlenhydrat-Transport und Metabolismus	G	6
Aminosäuretransport und Metabolismus	E	15
Nukleotid-Transport und Metabolismus	F	8
Koenzym-Transport und Metabolismus	H	2
Lipid-Transport und Metabolismus	I	4
Transport und Metabolismus anorganischer Ionen	P	7
Biosynthese, Transport, Katabolismus der Sekundärmetabolite	Q	0
Generelle Funktionsvorhersage	R	14
Unbekannte Funktion	S	4
nicht in COGs		23
in mehreren COGs		20

Entsprechend der COG-Datenbank wurde das hypothetische Protein GI 49476299 (YP_034340.1) der Kategorie „Aminosäuretransport und Aminosäuremetabolismus“ und das Protein GI 49475613 (YP_033654.1) der Kategorie „Replikation, Rekombination and Reparatur“ zugeordnet. Fünf hypothetische Proteine wurden der Kategorie „Generelle Funktionsvorhersage“ zugewiesen. Für zwei der hypothetischen Proteine ist keine Funktion bekannt, für sieben weitere hypothetische Proteine wurden keine Angaben gemacht.

Um darüber hinaus detaillierte Informationen über die identifizierten hypothetischen Proteine zu gewinnen, wurde versucht, durch Datenbankabfragen diese näher zu charakterisieren [z.B. Lokalisation des Proteins mit PSORTb, Bestimmung konservierter Domänen durch Suche in der CDD (Conserved-Domain-Database) und der Pfam-Datenbank sowie der Bestimmung eines möglichen N-terminalen Signalpeptides durch das Programm SignalP].

Das Protein GI 49475030 (YP_033071) ist ein wahrscheinlich zytoplasmatisches *B. henselae*-Protein und zeigt strukturelle Ähnlichkeiten zu YxIS C, einem *Bacillus subtilis*-Protein unbekannter Funktion entsprechend CDD-Abfrage. Auch laut Pfam-Datenbank wird es zu einer Protein-Gruppe mit einer Domäne unbekannter Funktion DUF-150 zugeordnet (*Domain of unknown function*). Das Protein GI 49475613 (YP_033654) als wahrscheinlich zytoplasmatisches Protein besitzt eine zu der *E. coli* TatD-DNAse verwandte Domäne. Das Protein GI 49475643 (YP_033684) mit unklarer Lokalisation und das wahrscheinlich zytoplasmatische Protein GI 49475897 (YP_033938) sind entsprechend der CDD-Abfrage aufgrund struktureller Ähnlichkeiten der Metallo- β -Laktamase Superfamilie zugehörig. Bei dem wahrscheinlich zytoplasmatischen Protein GI 49475807 (YP_033848) handelt es sich um ein uncharakterisiertes, in Bakterien konserviertes Protein, das auch in anderen *Bartonella* spp. vorkommt.

In CDD wird das Protein GI 49476277 (YP_034318) als mögliches sekretiertes Protein unbekannter Funktion sowie als periplasmatische Komponente eines uncharakterisierten Typ ABC-Transportsystems angegeben, wobei das detektierte N-terminale Signalpeptid (PSORTb, SignalP) diese Lokalisationsvorhersage stützt. Dieses Protein besitzt 70 % bzw. 55 % Sequenzhomologien zu den periplasmatischen Substrat-bindenden Proteinen der ABC-Transporter von *Bartonella bacilliformis* KC583 bzw. *Brucella suis* 1330. Auch für das Protein GI 49476290 (YP_034331) wird ein N-terminales Signalpeptid postuliert. Entsprechend der CDD ist es ein periplasmatisches Protein, jedoch konnte die endültige Lokalisation des Proteins nicht abschließend mit PSORTb vorhergesagt werden. Das Protein GI 49476299 (YP_034340) besitzt nach der CDD Ähnlichkeiten zu der Saccharopin-Dehydrogenase (Lys 9) (Sequenzhomologie von 84 % zu Lys 9 von *B. bacilliformis* KC583). Eine PSORTb-Abfrage erbrachte keine eindeutige Lokalisationsvorhersage. Das Protein GI 49475993 (YP_034034) wird als GTPase, genauer als Homolog des Cobalamin-synthetisierenden Proteins P47K (CobW) durch die CDD klassifiziert. Das Protein GI 49475409 (YP_033450) wurde von PSORTb als zytoplasmatisches Protein vorhergesagt, obwohl ein Signalpeptid vom SignalP-Algorithmus erkannt wird. Die Pfam-Datenbank zeigt eine konservierte, uncharakterisierte Domäne (DUF-1849). Gleichmaßen ist für das potentiell zytoplasmatische Protein GI 49476171 (YP_034212) die Funktion nicht bekannt.

Für alle anderen aufgeführten Proteine konnte weder eine PSORTb-basierte Vorhersage der Lokalisation noch eine Aussage über die mögliche Funktion des Proteins erhalten werden. Auch die Proteine GI 49475076 (YP_033117), GI 49475836 (YP_033877) und GI 49475837 (YP_033878) besitzen sequenzhomologe Proteine in anderen α 2-Proteobakterien. Entsprechend der Pfam-Datenbank besitzt das letztere Protein eine Domäne mit unbekannter Funktion (DUF-1321). Das Protein GI 49475885 (YP_033926) besitzt ein Signalpeptid und wird anhand seiner konservierten DUF-1460 zu anderen, hypothetischen bakteriellen Proteinen zugeordnet. Sequenzhomologien

existieren zu einem Lipoprotein von *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (57 %) und *Yersinia pestis* CO92 (55 %). Für das Protein GI 49476068 (YP_034109) ist weder die potentielle Lokalisation noch die mögliche Funktion abzusehen.

Mascot Search Results

Search title : SampleSetID: 1161, AnalysisID: 2031, MalDIWellID: 136923, SpectrumID: 440673, Path=\2008_04\080417_HaraldK_5831-32
 Database : Bartonella 005956 (1488 sequences; 467408 residues)
 Timestamp : 17 Apr 2008 at 09:51:47 GMT

Top Score : 269 for gi|49474922|ref|YP_032963.1|, Protein-export protein SecB [Bartonella henselae str. Houston-1]

Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

Protein scores greater than 44 are significant ($p < 0.05$).

Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

Protein Summary Report

Index

Accession	Mass	Score	Description
1. gi 49474922 ref YP_032963.1 	17700	269	Protein-export protein SecB [Bartonella henselae str. Houston-1]
2. gi 49476004 ref YP_034045.1 	16649	35	hypothetical protein BH13190 [Bartonella henselae str. Houston-1]
3. gi 49475259 ref YP_033300.1 	79457	27	Protease II [Bartonella henselae str. Houston-1]
4. gi 49475390 ref YP_033431.1 	30300	25	tRNA /rRNA methyltransferase [Bartonella henselae str. Houston-1]
5. gi 49475290 ref YP_033331.1 	32526	22	Periplasmic hemin-binding protein [Bartonella henselae str. Houston-1]
6. gi 49476174 ref YP_034215.1 	23049	21	hypothetical protein BH15190 [Bartonella henselae str. Houston-1]
7. gi 49475508 ref YP_033549.1 	13403	20	Response regulator [Bartonella henselae str. Houston-1]
8. gi 49475947 ref YP_033988.1 	29426	20	Pyrraline-5-carboxylate reductase [Bartonella henselae str. Houston-1]
9. gi 49475135 ref YP_033176.1 	59177	19	Phage protein gp17 [Bartonella henselae str. Houston-1]
10. gi 49475385 ref YP_033426.1 	53190	19	Trigger factor [Bartonella henselae str. Houston-1]
11. gi 49474939 ref YP_032980.1 	16653	19	3-dehydroquinate dehydratase [Bartonella henselae str. Houston-1]
12. gi 49475117 ref YP_033158.1 	45007	18	hypothetical prophage protein [Bartonella henselae str. Houston-1]
13. gi 49475702 ref YP_033743.1 	18984	18	hypothetical genomic island protein [Bartonella henselae str. Houston-1]
14. gi 49475602 ref YP_033643.1 	31176	17	RNA methyltransferase [Bartonella henselae str. Houston-1]
15. gi 49474837 ref YP_032878.1 	108528	17	DNA polymerase I [Bartonella henselae str. Houston-1]
16. gi 49475386 ref YP_033427.1 	55499	17	Glutamyl-tRNA amidotransferase subunit b [Bartonella henselae str. Houston-1]
17. gi 49476193 ref YP_034234.1 	21293	17	hypothetical protein BH15380 [Bartonella henselae str. Houston-1]
18. gi 49475878 ref YP_033919.1 	76032	17	RNA polymerase sigma factor rpoD [Bartonella henselae str. Houston-1]

Results List

1. [gi|49474922|ref|YP_032963.1|](#) Mass: 17700 Score: 269 Expect: 1.9e-024 Queries matched: 7

Protein-export protein SecB [Bartonella henselae str. Houston-1]

Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Start	End	Miss	Ions	Peptide
1232.58	1231.57	1231.58	-0.01	24	-	34	0	103 K.DLSFENPSAPR.S
1232.58	1231.57	1231.58	-0.01	24	-	34	0	--- K.DLSFENPSAPR.S
2022.04	2021.03	2021.02	0.01	93	-	109	0	--- K.NIPQEHVMPVLFIECP.R.L
2038.02	2037.02	2037.02	-0.00	93	-	109	0	--- K.NIPQEHVMPVLFIECP.R.L + Oxidation (M)
2451.22	2450.21	2450.20	0.02	2	-	23	0	--- M.AESEINNNDEGPVFAVLTQYLK.D
2477.25	2476.25	2476.23	0.02	71	-	92	0	137 K.ASDDSETLFHVLIYGGVPHIK.N
2477.25	2476.25	2476.23	0.02	71	-	92	0	--- K.ASDDSETLFHVLIYGGVPHIK.N

No match to: 901.47, 905.49, 907.47, 913.43, 917.41, 927.53, 939.41, 945.53, 959.52, 987.54, 989.57, 990.57, 1003.59, 1013.61, 1105.56, 1160.59, 1162.57, 1171.62, 1187.58, 1246.60, 1246.60, 1254.56, 1304.69, 1320.59, 1338.66, 1402.64, 1408.67, 1464.79, 1838.91, 1852.91, 1857.87, 1873.88, 2023.04, 2039.02, 2057.01, 2063.05, 2063.65, 2064.62, 2069.00, 2071.00, 2078.64, 2080.03, 2112.03, 2127.02, 2128.01, 2128.01, 2141.03, 2142.03, 2143.02, 2144.02, 2414.13, 2449.22, 2452.21, 2459.24, 2465.23, 2466.23, 2473.25, 2491.26, 3665.84

Abb. 13: Detaillierte Informationen der Mascot-Datenbankabfrage der MALDI-TOF-MS basierten Proteinidentifizierung am Beispiel des Proteinexport-Proteins SecB (GI 49474922). Die hier gezeigte Datei „Protein Summary Report“ gibt übersichtlich die Proteinbeschreibung (Protein Description), die Zugangsnummer (Accession Number) und die Rangstelle der Proteinbestimmung (Identification Rank) der möglichen, identifizierten Proteine an und beurteilt anhand der Bewertungsnote (Mascot Protein-Score) die Proteinbestimmung. Darüber hinaus sind die Anzahl und die bestimmten Massen der entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomdatenbank (NCBI, Zugangsnummer NC_005956) mit der Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins übereinstimmenden Peptidfragmente der tryptischen Hydrolyse (PMF) angegeben. Die Anzahl und die bestimmten Massen der nicht mit dieser Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins übereinstimmenden, nachgewiesenen und gemessenen Peptidfragmente der tryptischen Hydrolyse (PMF) sind ebenfalls aufgeführt (siehe auch 2.2.15.2). Alle Daten der Proteinidentifizierung der auf der 2D-Proteomkarte annotierten Proteine sind online unter <http://www.bartonella.coolix.com/> mit den Abbildungen der zur Bestimmung der Proteinpunkte verwendeten 2D-SDS-PA-Gele und den detaillierten Informationen der MS-Messungen einsehbar. Zu den Proteinen der 2D-Proteomkarte wurden zusätzlich, unterschiedlich stark auf den 2D-SDS-PA-Gelen der ³⁵S-radioaktiven Markierungsexperimente auftretende Proteine von *B. henselae* Marseille identifiziert (Tab. 18, 19, 20).

Mascot Search Results

Protein View

Match to: [gi|49474922|ref|YP_032963.1|](#) Score: 269 Expect: 1.9e-024
Protein-export protein SecB [Bartonella henselae str. Houston-1]

Nominal mass (M_r): 17700; Calculated pI value: 4.59
 NCBI BLAST search of [gi|49474922|ref|YP_032963.1|](#) against nr

Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Sequence Coverage: **45%**

Matched peptides shown in Bold Red

1 MAESEINND GEPVFAVLQ YLKDLSEFNP SAPRSLRPRE KAPQIDININ
51 VNANPIGDDN YDVLVLSVK ASDDSETLFH VELYGGVFH IKNIPQEHVM
101 PLVFIECPRL LFPFARQIIS DATQNGGFPP LWIDPIDFAA LFQKRVAAEQ
151 KNSQTLSS

Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
2 - 23	2451.22	2450.21	2450.20	0.02	0	M.AESEINNDGEPVFAVLQYLYK.D
24 - 34	1232.58	1231.57	1231.58	-0.01	0	K.DLSFENPSAPR.S
24 - 34	1232.58	1231.57	1231.58	-0.01	0	K.DLSFENPSAPR.S
71 - 92	2477.25	2476.25	2476.23	0.02	0	K.ASDDSETLFHVELYGGVFHIK.N
71 - 92	2477.25	2476.25	2476.23	0.02	0	K.ASDDSETLFHVELYGGVFHIK.N
93 - 109	2022.04	2021.03	2021.02	0.01	0	K.NIPQEHVMPVLFVIECPRL
93 - 109	2038.02	2037.02	2037.02	-0.00	0	K.NIPQEHVMPVLFVIECPRL Oxidation (M)

Abb. 14: Detaillierte Informationen der Mascot-Datenbankabfrage der MALDI-TOF-MS basierten Proteinidentifizierung am Beispiel des Proteinexport-Proteins SecB (GI 49474922). Die hier gezeigte Datei „Hit Result“ gibt übersichtlich die Proteinbeschreibung (Protein Description), die Zugangsnummer (Accession Number) und die Sequenzabdeckung (Sequence Coverage) des mit der höchsten Bewertungsnote (Mascot Protein-Score) als zuverlässig identifiziert bewerteten Proteins an. Darüber hinaus sind die Anzahl und die bestimmten Massen der entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomdatenbank (NCBI, Zugangsnummer NC_005956) mit der Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins übereinstimmenden Peptidfragmente der tryptischen Hydrolyse (PMF) angegeben. Die Anzahl und die bestimmten Massen der nicht mit dieser Proteinsequenz des jeweiligen Proteins übereinstimmenden, nachgewiesenen und gemessenen Peptidfragmente der tryptischen Hydrolyse (PMF) sind ebenfalls aufgeführt (siehe auch 2.2.15.2).

Mascot Search Results

Search title : SampleSetID: 1161, AnalysisID: 2031, MaldiWellID: 136923, SpectrumID: 440673, Path=\2008_04\08\
 Database : Bartonella 005956 (1488 sequences; 467408 residues)
 Timestamp : 17 Apr 2008 at 09:51:47 GMT
 Significant hits: [gi|49474922|ref|YP_032963.1|](#) Protein-export protein SecB [Bartonella henselae str. Houston-1]

Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Individual ions scores > 12 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

1. [gi|49474922|ref|YP_032963.1|](#) Mass: 17700 Score: 240 Queries matched: 2
 Protein-export protein SecB [Bartonella henselae str. Houston-1]
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
20	1232.58	1231.57	1231.58	-0.01	0	103	5.2e-011	1	K.DLSFENPSAPR.S
66	2477.25	2476.25	2476.23	0.02	0	137	1.7e-014	1	K.ASDDSETLFHVELYGGVFHIK.N

2. [gi|49475113|ref|YP_033154.1|](#) Score: 0 Queries matched: 1
 Major tail sheath protein FI [Bartonella henselae str. Houston-1]
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
20	1232.58	1231.57	1231.62	-0.05	0	0	1.1	2	R.TADMINDAILR.G

Peptide matches not assigned to protein hits: (no details means no match)

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
1	901.47	900.47							
2	905.49	904.49							

Abb. 15: Detaillierte Informationen der Mascot-Datenbankabfrage der MALDI-TOF-TOF-MS basierten Proteinidentifizierung am Beispiel des Proteinexport-Proteins SecB (GI 49474922). Die hier gezeigte Datei „Peptide Summary Report“ gibt übersichtlich die Proteinbeschreibung (Protein Description), die Zugangsnummer (Accession Number), die bestimmten Massen der Fragmente und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz der nochmals fragmentierten Peptide der drei stärksten Peaks im Spektrum der MALDI-TOF-Analyse an. Die gewonnenen Aminosäuresequenzen der unabhängig von der tryptischen Hydrolyse nochmals fragmentierten Peptide stützen zusätzlich die MALDI-TOF-MS basierte Proteinidentifizierung des jeweiligen mit der höchsten Bewertungsnote (Mascot Protein-Score) als zuverlässig anhand des PMF identifiziert bewerteten Proteins (siehe auch 2.2.15.3).

Tab. 11: Identifizierte *B. henselae*-Proteine mit der zugewiesenen, verwendeten Proteinbezeichnung (Proteinname bzw. GI-Nummer) auf der 2D-Proteomkarte im gezeigten Bereich von *pI* 3,6 - 9,7 und MW 10 - 100 kDa (Abb. 9-12). Die annotierten Proteine sind mit der Zugangsnummer des Proteins (Accession Number), der Locusnummer des Gens auf dem *B. henselae*-Genom (Locus Tag), der Proteinbeschreibung und der Anzahl der nachgewiesenen Proteinpunkte (Isoformen) aufgeführt. Ebenso sind das theoretische und empirische Molekulargewicht, der theoretische und empirische isoelektrische Punkt, die SignalP-basierte Detektion eines N-terminalen Signalpeptides, der berechnete CAI- und GRAVY-Wert, der COG-Buchstabencode zur Zuordnung zur funktionellen Kategorie und die PSORTb-basierte Lokalisationsvorhersage angegeben.

Proteinbezeichnung ^{a)}	Zugangsnummer ^{b)}	Locusnummer ^{c)}	Proteinbeschreibung	Anzahl der Punkte	Empir. Best. MW [kDa]/ <i>pI</i> ^{d)}	Theoret. Best. MW [kDa]/ <i>pI</i>	SignalP Signal Peptid ^{e)}	SignalP-Wahrscheinlichkeit ^{f)}	PSORTb-Lokalisation ^{g)}	PSORTb-Wahrscheinlichkeit ^{h)}	COGs ⁱ⁾	CAI ^{j)}	GRAVY ^{k)}
49474881	YP_032922.1	BH00570	ABC-Transporter (Permease)	2	19.5/7.6 21.9/7.6	20.66 7.01	N	0.000	UNK	2.00	J	0.43	-0.135
49475001	YP_033042.1	BH01890	ABC-Transporter, periplasm. Bindungsprotein	1	36.1/9.2	33.88 8.84	J	1.000	CM	8.60	P	0.47	-0.053
49475012	YP_033053.1	BH02000	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase	6	38.7/5.5 37.7/5.8 37.4/6.0 37.9/5.9 38.0/5.6 37.7/6.2	35.57 5.81	J	1.000	UNK-ML	4.74	O	0.59	-0.442
49475030	YP_033071.1	BH02180	Hypothetisches Protein BH02180	1	27.4/6.5	24.83 6.54	N	0.000	CYT	8.96	S	0.53	-0.358
49475033	YP_033074.1	BH02210	Transkriptionaler Regulator	1	16.4/6.7	15.64 6.34	N	0.000	CYT	8.96	K	0.53	-0.475
49475055	YP_033096.1	BH02430	Periplasm. Phosphat-Bindungsprotein	5	37.9/7.6 38.0/7.1 39.2/7.1 39.6/7.6 37.5/7.1	37.58 6.92	J	0.884	UNK	2.00	P	0.57	0.000
49475061	YP_033102.1	BH02500	Aminopeptidase	3	48.8/6.5 48.7/6.7 48.7/6.4	45.25 5.96	N	0.000	UNK	2.00	E	0.58	-0.081
49475076	YP_033117.1	BH02650	Hypothetisches Protein BH02650	1	9.2/4.1	9.35 4.70	N	0.000	UNK	2.00		0.51	-0.596
49475081	YP_033122.1	BH02700	2'-Deoxycytidin-5'-Triphosphate Deaminase	1	44.3/6.4	40.64 5.88	N	0.000	CYT	8.96	F	0.51	-0.111
49475086	YP_033127.1	BH02760	ABC-Transporter, ATP-Bindungsprotein	1	27.0/7.3	25.55 6.53	N	0.000	CYT	9.12	P	0.49	-0.004
49475244	YP_033285.1	BH04470	Protease	1	50.2/6.0	47.55 5.63	N	0.000	PP	9.44	R	0.47	-0.154
49475249	YP_033290.1	BH04520	Phosphatase	2	25.9/5.7 26.0/5.5	25.58 5.36	N	0.000	CYT	8.96	R	0.56	0.000
49475273	YP_033314.1	BH04780	Zwei-Komponenten Response-Regulator	1	32.8/5.8	26.07 5.46	N	0.000	CYT	9.97	TK	0.58	-0.303
49475287	YP_033328.1	BH04920	Phagen-verwandtes Protein	1	39.2/5.1	36.14 5.01	N	0.000	UNK	2.00	S	0.48	-0.524
49475407	YP_033448.1	BH06190	Hit-ähnli. Protein (Zellzyklus-Regulation)	1	13.8/6.7	15.78 6.51	N	0.000	UNK	2.00	FGR	0.52	-0.185
49475409	YP_033450.1	BH06210	Hypothetisches Protein BH06210	3	35.4/5.9 35.5/5.7 35.7/6.2	31.25 5.82	J	0.994	CYT	8.96		0.52	-0.310

49475425	YP_033466.1	BH06370	ABC-Transporter, periplasm. Aminosäure-Bindungsprotein	7	29.7/5.3 28.1/5.5 30.1/5.8 28.3/5.8 30.1/6.1 27.6/5.7 28.8/5.5	28.16	5.54	J	0.999	PP	10.00	ET	0.47	-0.166
49475572	YP_033613.1	BH08070	Außenmembranprotein (OMP)	2	30.6/9.4 30.6/9.2	32.57	9.08	J	0.998	CYT	8.96	O	0.50	-0.287
49475613	YP_033654.1	BH08490	Hypothetisches Protein BH08490	1	29.4/6.6	29.24	6.10	N	0.000	CYT	8.96	L	0.63	-0.223
49475626	YP_033667.1	BH08630	ATP-abhängiger Transporter	2	29.2/6.2 29.1/5.8	27.84	5.61	N	0.000	CM	8.02	O	0.62	-0.071
49475643	YP_033684.1	BH08800	Hypothetisches Protein BH08800	1	57.4/7.2	61.31	6.56	N	0.000	UNK	2.00	R	0.59	-0.087
49475807	YP_033848.1	BH10640	Hypothetisches Protein BH10640	1	24.6/4.7	20.70	4.83	N	0.000	CYT	8.96	S	0.53	-0.531
49475836	YP_033877.1	BH11020	Hypothetisches Protein BH11020	2	11.9/7.5 11.5/7.5	11.52	6.84	N	0.000	UNK	2.00		0.58	-0.582
49475837	YP_033878.1	BH11040	Hypothetisches Protein BH11040	1	22.9/8.8	20.45	7.93	N	0.000	UNK	2.00		0.52	-0.372
49475844	YP_033885.1	BH11110	Aminopeptidase-P-Protein	3	61.5/6.4 61.5/6.6 61.6/6.5 57.6/5.7	68.30	5.98	N	0.000	UNK	2.00	E	0.50	-0.355
49475867	YP_033908.1	BH11380	ABC-Transporter, ATP- Bindungsprotein	1	22.9/8.8	60.95	5.36	N	0.000	UNK-ML	5.76	R	0.54	-0.405
49475876	YP_033917.1	BH11510	Außenmembranprotein (OMP)	1	30.5/6.6	26.74	9.16	J	1.000	PP	9.76	S	0.49	-0.294
49475885	YP_033926.1	BH11610	Hypothetisches Protein BH11610	1	26.1/6.8	31.82	6.92	N	0.036	UNK	2.00		0.47	-0.292
49475897	YP_033938.1	BH11740	Hypothetisches Protein BH11740	1	42.5/6.8	24.42	6.09	N	0.000	CYT	8.96	R	0.49	-0.239
49475915	YP_033956.1	BH11940	Regulationsprotein	1	31.2/7.5 30.1/7.3 30.2/7.5	38.00	6.15	N	0.000	CYT	9.97	R	0.50	-0.176
49475930	YP_033971.1	BH12140	ABC-Transporter, ATP- Bindungsprotein	3	56.8/9.3 58.5/9.3 58.2/9.1	29.31	7.77	N	0.000	CYT	9.12	EP	0.55	-0.173
49475934	YP_033975.1	BH12180	ABC-Transporter, periplasm. Oligopeptid- Bindungsprotein	3	56.0/7.0	61.30	8.84	J	0.998	CM	8.02	E	0.56	-0.276
49475938	YP_033979.1	BH12230	ABC-Transporter, periplasm. Oligopeptid- Bindungsprotein	1	46.2/9.1	61.15	7.64	J	1.000	PP	9.44	E	0.57	-0.297
49475961	YP_034002.1	BH12500	Omp43-Vorläuferprotein	1	47.2/6.2	44.20	8.52	J	1.000	OM	9.93		0.46	-0.254
49475993	YP_034034.1	BH12980	Hypothetisches Protein BH12980	1	18.4/6.9 18.4/6.7 17.8/6.7 17.0/6.7 18.4/6.2 18.3/7.4 18.0/6.1 18.4/6.1 17.7/6.8 17.9/7.4 17.8/6.2	38.75	5.72	N	0.000	CYT	8.96	R	0.52	-0.292
49476039	YP_034080.1	BH13580	Exprimiertes Protein	11	32.6/5.5 32.6/4.9	19.68	6.14	N	0.000	UNK	2.00	O	0.53	-0.388
49476068	YP_034109.1	BH14040	Hypothetisches Protein BH14040	2		29.41	5.27	N	0.000	UNK	2.00		0.56	-0.765

49476171	YP_034212.1	BH15140	Hypothetisches Protein BH15140	1	9.9/5.2	9.91	5.23	N	0.000	CYT	8.96		0.51	-0.692
49476239	YP_034280.1	BH15840	SapC-verwandtes Protein	7	33.6/7.1 33.8/6.9 33.0/7.2 34.2/7.1 34.2/6.6 33.2/6.9 34.4/6.9 30.2/6.0	31.19	6.51	N	0.000	UNK	2.00		0.56	-0.467
49476266	YP_034307.1	BH16140	Zwei-Komponenten Response-Regulator	1	30.2/6.0	26.31	5.48	N	0.000	CYT	9.97	TK	0.52	-0.431
49476277	YP_034318.1	BH16250	Hypothetisches Protein BH16250	2	37.6/9.5 37.2/9.6	34.37	9.36	J	1.000	UNK	2.50	R	0.56	0.204
49476290	YP_034331.1	BH16400	Hypothetisches Protein BH16400	1	14.8/4.8	14.68	5.41	J	1.000	UNK	2.50	R	0.50	-0.163
49476299	YP_034340.1	BH16490	Hypothetisches Protein BH16490	1	47.0/7.5	45.84	6.77	J	0.802	UNK	2.00	E	0.53	-0.192
ATPA	YP_034230.1	BH15340	ATP-Synthase (α -Kette)	3	54.6/6.0 56.6/6.3 54.6/6.5	55.48	5.91	N	0.000	UNK	2.00	C	0.52	-0.061
ATPC	YP_034227.1	BH15310	ATP-Synthase (ϵ -Kette)	1	11.9/5.6	14.81	5.39	N	0.003	CYT	8.96		0.51	0.319
ATPD	YP_034228.1	BH15320	ATP-Synthase (β -Kette)	3	55.6/5.4 55.6/5.6 55.2/5.5	56.56	5.44	N	0.000	CYT	8.96	C	0.54	-0.082
ATPH	YP_034231.1	BH15350	ATP-Synthase (δ -Kette)	1	22.8/7.0	21.97	6.43	N	0.004	CYT	8.96	C	0.50	0.124
AccA	YP_034326.1	BH16340	Acetyl-CoA-Carboxylase (Carboxyltransferase (α -Untereinheit))	2	35.6/6.5 35.2/6.8	34.93	6.28	N	0.000	UNK	2.00	I	0.57	-0.292
AccC	YP_033611.1	BH08050	Biotin-Carboxylase	1	51.9/6.4	49.40	5.88	N	0.000	CYT	8.96	I	0.55	-0.102
AccD	YP_032903.1	BH00340	Acetyl-CoA-Carboxylase (Carboxyltransferase β -Kette)	1	37.7/9.3	33.88	8.49	N	0.000	UNK	2.00	I	0.50	-0.089
AcnA	YP_032975.1	BH01160	Aconitat-Hydratase	4	67.8/7.2 67.6/6.9 67.6/7.1 68.0/6.8	98.49	6.22	N	0.000	CYT	9.26	C	0.57	-0.212
Adk	YP_033814.1	BH10300	Adenylat-Kinase	2	24.6/7.2 22.0/7.4	21.47	6.63	N	0.000	CYT	9.97	F	0.55	-0.193
AhcY	YP_032900.1	BH00310	Adenosylhomocysteinase	1	52.2/5.9	51.00	5.72	N	0.000	CYT	8.96	H	0.53	-0.194
AldA	YP_033224.1	BH03830	Aldehyd-Dehydrogenase	2	53.5/6.0 53.5/6.2	51.97	5.87	N	0.000	CYT	9.26	C	0.49	-0.191
AmiB	YP_033675.1	BH08710	N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase	2	46.6/8.9 46.1/8.2	46.21	8.94	J	0.912	CYT	8.96	M	0.53	-0.182
ArgB	YP_032932.1	BH00690	Acetylglutamat-Kinase	3	33.1/4.5 33.2/4.6 33.2/4.7	32.24	4.78	N	0.000	CYT	8.96	E	0.57	0.179
AroC	YP_033270.1	BH04320	Chorismat-Synthase	1	44.2/9.3	39.47	8.22	N	0.000	UNK	2.00		0.55	-0.139
Asd	YP_034026.1	BH12890	Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase	2	42.5/6.8 39.5/6.8	37.05	6.20	N	0.000	UNK	2.00	E	0.47	-0.036
BatR	YP_032927.1	BH00620	Transkriptionsregulator	1	30.2/7.2	27.40	6.54	N	0.000	CYT	9.26	TK	0.51	-0.331
Bcp	YP_033672.1	BH08680	Bacterioferritin-Komigrationsprotein	2	16.8/7.3 16.8/7.0	18.22	6.84	N	0.000	UNK	2.00	O	0.52	-0.269
CgtA	YP_033011.1	BH01560	GTP-Bindungsprotein	1	50.0/9.3	37.27	8.70	N	0.000	CYT	8.96	R	0.56	-0.313

ClpB	YP_034116.1	BH14110	ATP-abhängige Clp-Protease, (ATP-Bindungseinheit ClpB)	4	66.3/6.0 66.3/5.9 66.5/5.8 66.2/6.0	96.00	5.63	N	0.000	CYT	9.97	O	0.47	-0.369
ClpP	YP_033421.1	BH05880	ATP-abhängige Clp-Protease (Proteolytische Untereinheit)	3	25.0/5.6 24.0/5.6 25.1/5.9	23.54	5.43	N	0.000	CM	8.47	OU	0.62	-0.253
ClpX	YP_033422.1	BH05890	ATP-abhängige Clp-Protease (ATP-Bindungseinheit clpX)	2	47.4/5.9 47.4/5.7	46.77	5.57	N	0.000	CYT	8.96	O	0.57	-0.150
CtpA	YP_033018.1	BH01630	Carboxyterminale Protease CtpA	2	49.2/9.4 49.2/9.5	47.02	8.91	J	1.000	UNK	2.00	M	0.54	-0.200
CtrA	YP_033965.1	BH12050	Zellzyklus-Transkriptionsregulator Ctra	2	28.0/6.3 28.0/6.4	26.28	5.90	N	0.000	CYT	9.97	TK	0.48	-0.058
DapA	YP_033336.1	BH05000	Dihydrodipicolinat-Synthase	3	38.2/7.0 36.8/7.0 37.0/7.3	31.46	6.66	N	0.002	UNK	2.00	EM	0.54	0.040
DapB	YP_033998.1	BH12440	Dihydrodipicolinat-Reduktase	2	31.3/7.3 31.4/7.0	28.67	6.67	N	0.000	UNK	2.00	E	0.50	-0.083
Dgt	YP_033783.1	BH09970	Deoxyguanosin-Triphosphat-Triphosphohydrolase	1	50.4/7.0	46.23	6.22	N	0.000	CYT	8.96	F	0.46	-0.563
DhA	YP_033409.1	BH05750	Pyruvat-Dehydrogenase E1-Komponente, α -Untereinheit	5	42.1/6.7 41.7/6.5 41.9/6.7 41.7/6.2 35.1/5.5	38.01	6.04	N	0.000	CM	9.46	C	0.58	-0.354
DnaB	YP_033363.1	BH05270	Replikative DNA-Helikase	1	55.7/5.5	55.30	5.42	N	0.000	CYT	8.96	L	0.49	-0.328
DnaK	YP_032930.1	BH00650	Hitzeschockprotein-70 DnaK	7	60.8/4.8 66.9/4.8 61.3/4.7 65.5/4.7 65.4/4.8 61.0/4.8 61.1/4.9	68.22	4.93	N	0.000	CYT	9.97	O	0.56	-0.397
DnaX	YP_033085.1	BH02320	DNA-Polymerase III (τ -Untereinheit)	1	64.0/6.0	72.65	5.73	N	0.000	CYT	8.96	L	0.51	-0.312
Dut	YP_034169.1	BH14690	Deoxyuridine-5'-Triphosphat-Nukleotidhydrolase	2	20.0/6.9 19.5/6.9	19.65	6.15	N	0.000	CYT	8.96		0.40	-0.291
Efp	YP_034200.1	BH15020	Elongationsfaktor p	3	26.1/5.2 26.6/5.4 26.0/5.0	21.40	5.21	N	0.000	CYT	9.26	J	0.58	-0.299
EtfA	YP_033985.1	BH12300	Elektronentransfer- Flavoprotein (α -Untereinheit)	1	35.2/6.0	32.44	5.57	N	0.000	UNK	2.00	C	0.46	0.138
EtfB	YP_033984.1	BH12290	Elektronentransfer- Flavoprotein (β -Untereinheit)	1	30.0/6.8	27.11	5.87	N	0.000	CYT	8.96	C	0.44	-0.064
FabB	YP_032987.1	BH01280	3-Oxoacyl-(Acyl-Trägerprotein) Synthase	1	49.3/7.1	43.48	6.19	N	0.029	CYT	9.97	IQ	0.53	-0.134
FabF2	YP_033556.1	BH07440	3-Oxoacyl-(Acyl- Trägerprotein) Synthase	1	49.8/5.8	45.21	5.45	N	0.001	CYT	9.26	IQ	0.55	-0.092
FabF3	YP_033557.1	BH07450	3-Oxoacyl-(Acyl- Trägerprotein) Synthase	1	45.9/8.0	42.34	7.18	N	0.001	CYT	9.26	IQ	0.55	-0.062
FabG	YP_033370.1	BH05350	3-Oxoacyl-(Acyl- Trägerprotein) Reduktase	1	28.0/9.4	26.40	8.41	N	0.029	CYT	9.26	IQR	0.54	0.084

FabI2	YP_033269.1	BH04310	Enoyl-(Acylträgerprotein) Reduktase	3	32.0/7.4 32.1/7.4 32.0/7.0	29.35	6.54	N	0.003	CYT	9.26	I	0.56	0.025
FbaB	YP_034204.1	BH15060	Fruktosebisphosphat-Aldolase	4	37.5/6.3 40.6/7.1 41.0/6.8 42.5/6.8	37.19	6.35	N	0.006	CYT	8.96	G	0.55	-0.038
Frr	YP_033454.1	BH06250	Ribosom-Recyclingfaktor	3	24.1/6.5 24.1/6.5 23.9/6.5	20.65	6.18	N	0.000	CYT	9.97		0.60	-0.358
FtsE	YP_034238.1	BH15420	Zellteilungsprotein ftsE	1	26.8/7.9	24.57	7.15	N	0.000	CM	7.88	D	0.51	0.020
FtsY	YP_034352.1	BH16620	Zellteilungsprotein ftsY	2	51.3/9.3 51.4/9.4	45.76	8.33	N	0.000	UNK-ML	6.29	U	0.50	-0.345
FtsZ	YP_033890.1	BH11180	Zellteilungsprotein ftsZ	6	61.4/5.4 60.6/5.5 60.4/5.4 60.4/5.4 60.7/5.5 57.6/5.6	62.31	5.25	N	0.000	UNK-ML	6.29	D	0.60	-0.256
Fur2	YP_033051.1	BH01980	Eisen-Response-Regulator	1	15.2/9.1	16.14	8.09	N	0.000	CYT	9.97	P	0.54	-0.706
FusA	YP_033838.1	BH10540	Elongationsfaktor g (EF-g)	5	64.5/5.1 64.5/5.2 64.7/5.3 65.0/5.1 64.7/5.3	76.28	5.12	N	0.000	CYT	9.97	J	0.63	-0.233
Gap	YP_034206.1	BH15080	Glyceraldehyde-3-phosphat-Dehydrogenase	3	40.2/6.8 40.2/7.0 39.5/6.8	36.15	6.04	N	0.000	CYT	9.97	G	0.52	0.069
GatA	YP_033630.1	BH08240	Glutamyl-tRNA-Amido-transferase Untereinheit A	1	54.3/7.2	53.35	6.57	N	0.000	UNK	2.00		0.56	-0.079
GatB	YP_033427.1	BH05950	Glutamyl-tRNA-Amido-transferase Untereinheit B	2	53.7/5.3 53.2/5.1	55.50	5.17	N	0.000	CYT	8.96	J	0.60	-0.356
GlnA2	YP_033801.1	BH10160	Glutamin-Synthetase I	3	53.6/5.7 53.7/5.8 57.6/5.6	52.64	5.47	N	0.000	CYT	9.97		0.52	-0.315
GloB	YP_034354.1	BH16640	Hydroxyacylglutathion-Hydrolase	1	32.4/6.9	29.06	6.21	N	0.000	UNK	2.00	R	0.51	-0.439
GlpX	YP_033788.1	BH10020	Glycerol-induziertes Protein	3	42.4/5.9 41.9/5.9 42.8/5.7	35.14	5.53	N	0.000	CYT	8.96		0.58	-0.078
GltA	YP_033467.1	BH06380	Citrat-Synthase	2	50.4/7.0 49.9/7.4	48.77	6.43	N	0.000	CYT	9.97	C	0.55	-0.186
GltL	YP_033845.1	BH10610	Glutamat /Aspartat-Transport ATP-Bindungsprotein	4	28.0/7.1 27.5/7.4 27.5/7.5 28.1/7.4	27.79	6.71	N	0.000	CYT	9.12	E	0.52	-0.105
GltX	YP_033468.1	BH06390	Glutamyl-tRNA-Synthetase	3	53.2/7.3 52.5/7.5 53.4/7.5	54.46	6.61	N	0.015	CYT	9.97	J	0.50	-0.347
GltX	YP_033475.1	BH06460	Glutamyl-tRNA-Synthetase	1	53.2/7.5	52.81	6.52	N	0.002	CYT	9.97	J	0.59	-0.377

GlyA	YP_033566.1	BH07540	Serin-Hydroxymethyltransferase	4	49.3/7.3 48.5/7.0 48.8/7.2 48.9/6.9	47.75	6.55	N	0.000	CYT	9.97	E	0.61	-0.154
GreA	YP_033934.1	BH11700	Transkriptionselongationsfaktor GreA	2	20.0/4.8 20.3/4.7	17.49	4.94	N	0.000	CYT	8.96	K	0.59	-0.593
GroEL	YP_034075.1	BH13530	Chaperonin-Protein GroEL	7	54.5/5.2 54.8/5.0 56.7/5.3 57.0/5.4 55.5/5.2 55.3/4.9 54.3/5.1	57.59	5.10	N	0.000	CYT	9.97	O	0.54	-0.041
GroES	YP_034076.1	BH13540	Chaperonin-Protein GroES	3	11.6/5.5 11.6/5.4 11.5/5.0	10.69	5.39	N	0.000	CYT	9.97	O	0.48	-0.301
GrpE	YP_032921.1	BH00560	Hsp-70-Kofaktor GrpE	3	29.9/4.4 29.7/4.5 29.6/4.6	23.91	4.86	N	0.000	CYT	9.97	O	0.48	-0.534
GshB	YP_033095.1	BH02420	Glutathion-Synthetase	3	37.8/6.8 37.4/6.6 37.1/6.4	35.34	5.88	N	0.000	UNK	2.00	HJ	0.57	-0.136
GuaB	YP_033034.1	BH01800	Inosin-5'-Monophosphat-Dehydrogenase	5	54.2/7.1 54.8/6.6 54.1/6.9 54.1/6.7 53.2/6.9	52.78	6.29	N	0.000	UNK	2.00	FR	0.60	0.015
HbpD	YP_033317.1	BH04810	Häminbindendes Protein d	1	33.2/9.4	30.25	9.06	J	1.000	OM	9.45	M	0.60	-0.158
HslU	YP_033061.1	BH02080	ATP-abh. Protease HslU (ATP-bindende Untereinheit)	2	53.7/5.4 53.7/5.3	48.27	5.35	N	0.000	CYT	8.96	O	0.55	-0.222
HslV	YP_033060.1	BH02070	ATP-abh. Protease HslV	1	20.4/6.4	20.89	6.17	N	0.000	CYT	9.26	O	0.54	0.023
HtrA1	YP_033313.1	BH04770	Serine-Protease	6	58.2/8.2 57.7/7.6 57.8/8.4 57.5/7.4 57.6/7.5 57.6/7.4	54.08	8.56	J	0.995	PP	9.44	O	0.57	-0.210
HtrA2	YP_033809.1	BH10250	Serin-Protease	2	54.3/9.4 54.3/9.3	50.53	9.02	J	0.750	PP	9.44	O	0.59	0.026
HtrA3	YP_033869.1	BH10940	Serin-Protease	1	52.7/5.9	54.86	6.31	J	1.000	UNK-ML	5.22	O	0.57	-0.150
HutB	YP_033331.1	BH04950	Periplasmatisches häminbindendes Protein	3	30.9/9.5 30.8/9.3 30.7/9.6	32.53	9.50	J	1.000	UNK	2.50	P	0.52	0.237
IbpA2	YP_033551.1	BH07300	Kleines Hitzeschockprotein	2	19.3/5.6 19.3/5.9	19.07	5.56	N	0.000	CYT	8.96	O	0.56	-0.707
IcdA	YP_033790.1	BH10050	NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase	1	47.8/7.7	45.93	8.10	N	0.000	UNK	2.00	C	0.52	-0.373
IlvE	YP_033787.1	BH10010	Aminotransferase für kettenverzweigte Aminosäuren	2	43.0/9.6 43.2/9.5	41.31	8.63	N	0.000	UNK	2.00	EH	0.58	-0.311
InvB	YP_033020.1	BH01650	Invasionsassoziiertes Protein B	1	17.0/9.5	19.98	9.30	J	1.000	CM	9.50		0.58	0.318

KdtB	YP_033796.1	BH10110	Phosphopantethein-Adenyltransferase	1	20.6/5.9	19.22	5.69	N	0.000	CYT	8.96	H	0.56	0.277
LivJ	YP_033635.1	BH08290	ABC-Transporter für kettenverzweigte Amminosäuren, periplasm. Amminosäure-bindungsprotein	4	41.8/6.3 41.7/6.0 42.0/6.6 41.9/5.7	41.16	6.18	J	1.000	PP	9.76	E	0.51	-0.104
LpxD	YP_033458.1	BH06290	UDP-3-o-[3-Hydroxymyristoyl] Glucosamin-N-Acyltransferase	1	41.2/4.2	36.81	6.66	N	0.000	CYT	8.96	M	0.56	0.136
LysS	YP_032894.1	BH00240	Lysyl-tRNA-Synthetase	3	58.0/6.2 57.9/6.0 57.6/5.9	62.24	5.79	N	0.000	UNK	2.00	J	0.55	-0.357
MaeB	YP_032962.1	BH01010	NADP-abhäng. Malatenzyme	1	65.9/6.4	84.55	5.87	N	0.000	CYT	8.96	C	0.56	-0.108
Mdh	YP_034347.1	BH16570	Malat-Dehydrogenase	4	41.7/6.1 40.0/6.1 42.0/5.8 41.7/6.5	33.64	5.75	J	0.865	CYT	9.26	C	0.58	0.311
MetM	YP_033789.1	BH10030	Homoserin-Dehydrogenase	2	51.0/7.1 51.0/6.9	46.47	6.60	N	0.000	CYT	8.96	E	0.56	0.152
MrcA2	YP_033674.1	BH08700	Penicillinbindungsprotein 1a	1	66.2/7.4	91.08	7.29	J	0.840	UNK-ML	6.29	M	0.55	-0.232
Mrp	YP_033992.1	BH12380	Mrp-Protein	1	43.7/7.2	39.99	6.56	N	0.000	UNK	2.00	D	0.52	0.033
MutL	YP_033121.1	BH02690	DNA-Mismatch-Reparaturprotein MutL	1	63.8/6.8	66.88	6.21	N	0.000	UNK	2.00	L	0.49	-0.137
Ndk	YP_033388.1	BH05530	Nukleosiddiphosphat-Kinase	2	15.8/5.3 15.7/5.6	15.48	5.45	N	0.000	CYT	9.26		0.67	-0.249
NtrX	YP_033419.1	BH05850	Stickstoffregulationsprotein	3	54.8/5.7 54.6/5.9 54.6/5.8	50.54	5.62	N	0.000	CYT	9.97	T	0.53	-0.206
NusG	YP_033434.1	BH06050	Transkriptionsantiterminationsprotein	1	19.6/5.8	20.15	5.61	N	0.000	CYT	8.96	K	0.65	-0.335
Omp89	YP_033457.1	BH06280	Außenmembranprotein (OMP)	4	67.1/6.5 67.1/6.3 66.5/6.3 68.9/9.5	88.93	9.01	J	0.926	OM	10.00	M	0.54	-0.255
OppD	YP_033972.1	BH12150	Oligopeptidtransport-ATP-Bindungsprotein	1	37.5/7.1	32.19	6.46	N	0.000	UNK-ML	5.76	EP	0.55	0.024
ParA1	YP_034046.1	BH13200	ParA-Protein	1	28.8/6.0	22.26	5.81	N	0.003	UNK	2.00	D	0.52	0.222
PdhB	YP_033410.1	BH05760	Pyruvat-Dehydrogenase E1-Komponente (β-Untereinheit)	4	51.9/4.6 52.0/5.1 51.8/4.7 51.6/4.8	49.27	4.81	N	0.000	CYT	8.96	C	0.61	0.006
PdhC	YP_033411.1	BH05770	Dihydrolipoamid-Acetyltransferase (E2)	2	53.1/7.7 54.3/7.2	47.75	7.16	N	0.000	CYT	9.26	C	0.57	-0.112
PdhD2	YP_034342.1	BH16520	Dihydrolipoamid-Dehydrogenase	9	51.9/6.4 51.1/6.6 53.1/6.8 52.8/6.7 53.4/6.4 51.0/6.7 53.1/6.5 53.4/6.6 51.8/6.7	49.39	6.05	N	0.008	CYT	9.97	C	0.61	0.134

PdxJ	YP_033865.1	BH10900	Pyridoxalphosphat-Biosyntheteseprotein Pdxj	1	27.7/7.3	27.08	6.45	N	0.000	UNK	2.00		0.57	-0.141
PepA	YP_033057.1	BH02040	Leucyl-Aminopeptidase	1	48.5/7.0	50.22	6.31	N	0.001	UNK	2.00	E	0.50	-0.106
Pgl	YP_033232.1	BH03920	6-Phosphogluconolactonase	1	31.4/7.0	28.32	6.36	N	0.008	UNK	2.00	G	0.58	0.037
PmbA	YP_033115.1	BH02630	PmbA-Protein, Reifung des antibiotischen Mccb17	2	49.6/6.7 48.7/6.7	46.96	5.87	N	0.000	CYT	9.26	R	0.54	-0.079
PnbA	YP_033442.1	BH06130	Nitroreductase	1	27.6/9.5	26.21	8.78	N	0.000	UNK	2.00	C	0.54	-0.290
Pnp	YP_033063.1	BH02100	Polyribonukleotid-Nukleotidyltransferase	6	65.6/5.4 65.6/5.6 65.7/5.6 68.4/5.6 66.0/5.7 68.6/5.6	80.60	5.36	N	0.000	CYT	9.97	J	0.51	-0.225
Ppa	YP_033023.1	BH01690	Anorganische Pyrophosphatase	3	23.1/5.0 23.0/5.1 23.4/5.3	20.02	5.13	N	0.000	CYT	9.97	C	0.58	-0.370
PpiB1	YP_033794.1	BH10090	Peptidyl-prolyl cis-trans-Isomerase b	3	18.5/4.8 18.5/4.7 18.5/5.0	18.85	5.03	N	0.000	CYT	9.26	O	0.67	-0.314
PrfA	YP_033050.1	BH01970	Peptidketten-Release-Faktor 1	1	45.9/5.8	40.43	5.53	N	0.000	CYT	9.97	J	0.55	-0.402
ProB	YP_033012.1	BH01570	Glutamat-5-Kinase	1	43.0/8.7	40.82	8.38	N	0.000	CYT	9.26	E	0.56	0.029
PrsA	YP_033947.1	BH11830	Ribosephosphat-Pyrophosphokinase	2	36.2/7.8 37.2/7.8	33.86	7.10	N	0.000	CYT	8.96	FE	0.45	0.014
PurB	YP_033760.1	BH09690	Adenylosuccinat-Lyase	3	51.3/7.2 47.7/7.1 50.6/7.1	49.27	6.40	N	0.000	CYT	9.97	F	0.52	-0.175
PurH	YP_034290.1	BH15970	Bifunktionales Purinbiosynthese-protein	4	56.2/7.1 56.0/7.0 56.5/6.9 56.3/7.3	57.56	6.41	N	0.000	CYT	8.96		0.56	0.053
PurL	YP_033765.1	BH09740	Phosphoribosylformylglycin-Amidinsynthase II	3	64.7/5.7 64.6/5.6 63.5/5.6	79.74	5.54	N	0.000	UNK	2.00	F	0.54	-0.124
PyrC2	YP_033625.1	BH08190	Dihydroorotase	1	49.4/5.7	46.84	5.51	N	0.000	UNK	2.00	F	0.49	-0.062
PyrE	YP_033341.1	BH05050	Orotatphosphoribosyltransferase	1	23.9/7.0	20.86	6.53	N	0.000	CYT	8.96	F	0.57	0.103
RecA	YP_033807.1	BH10230	RecA-Protein	1	43.1/5.6	37.52	5.40	N	0.000	CYT	8.96	L	0.60	-0.054
Rho	YP_034360.1	BH16700	Transkriptionsterminationsfaktor Rho	2	50.7/5.8 50.4/5.7	47.37	5.47	N	0.000	CYT	8.96	K	0.66	-0.206
Rnd1	YP_033105.1	BH02530	Ribonuklease d	1	25.7/6.5	23.31	5.97	N	0.000	CYT	8.96	J	0.57	-0.210
RpiA	YP_033470.1	BH06410	Ribose-5-phosphat-Isomerase	2	27.9/5.3 28.4/5.3	25.15	4.97	N	0.000	CYT	8.96	G	0.56	0.249
RplI	YP_033364.1	BH05290	50S ribosomales Protein L9	2	26.4/5.2 26.3/5.1	22.90	5.17	N	0.000	CYT	9.97	J	0.52	-0.478
RplL	YP_033438.1	BH06090	50S ribosomales Protein L7/L12	3	11.3/4.4 11.3/4.5 11.3/4.3	12.71	4.81	N	0.000	CYT	8.96	J	0.67	0.095
RplY	YP_033949.1	BH11850	50S ribosomales Protein L25	3	28.8/5.5 29.0/5.1 28.9/5.3	22.74	5.18	N	0.000	UNK	2.00	J	0.40	0.175

RpoA	YP_033811.1	BH10270	DNA-abhängige RNA-Polymerase (α -Kette)	10	43.0/4.7 41.0/4.8 42.3/4.8 42.8/4.8 42.1/4.7 40.9/4.7 40.2/4.7 42.9/4.9 41.0/4.7 43.0/4.7	37.65	4.85	N	0.000	CYT	9.97	K	0.59	-0.236
RpoZ	YP_033339.1	BH05030	DNA-abhängige RNA-Polymerase (ω -Untereinheit)	2	19.3/3.7 19.2/3.8	14.50	4.33	N	0.000	CYT	8.96	K	0.55	-0.436
RpsA	YP_032956.1	BH00930	30S ribosomales Protein S1	5	59.9/5.3 59.4/5.2 60.3/5.1 60.2/5.0 59.3/5.2	62.78	5.18	N	0.000	CYT	8.96	J	0.53	-0.354
RpsB	YP_033451.1	BH06220	30S ribosomales Protein S2	2	32.1/7.5 33.9/7.5	28.35	6.66	N	0.000	UNK	2.00		0.58	-0.238
RpsF	YP_033367.1	BH05320	30S ribosomales Protein S6	2	16.1/9.4 15.5/8.9	15.84	8.86	N	0.000	CYT	9.97	J	0.57	-0.699
RuvA	YP_034188.1	BH14900	Holliday junction DNA-Helikase RuvA	1	23.9/7.2	22.08	6.60	N	0.000	CYT	8.96	L	0.51	0.313
SdhA	YP_034274.1	BH15780	Succinat-Dehydrogenase, Flavoprotein-Untereinheit	2	60.8/6.3 61.4/6.4	66.93	6.04	N	0.000	UNK-ML	5.41	C	0.52	-0.236
SerC	YP_033219.1	BH03780	Phosphoserin-Aminotransferase	4	46.3/5.1 46.0/5.1 45.6/4.9 56.3/5.2	43.17	4.97	N	0.000	CYT	8.96	HE	0.57	-0.080
SerS	YP_033395.1	BH05610	Seryl-tRNA-Synthetase	1	50.1/6.1	48.00	5.74	N	0.000	CYT	10.00	J	0.54	-0.335
SodB	YP_033301.1	BH04630	Superoxid-Dismutase	6	23.6/6.3 23.6/5.8 23.1/5.9 23.8/6.2 23.4/6.1 23.9/6.5	23.10	5.77	N	0.000	UNK	2.00	P	0.59	-0.485
SodC	YP_033661.1	BH08570	Superoxid-Dismutase [Cu-Zn] Vorläufer	3	15.7/6.9 36.3/6.6 15.3/6.9	18.85	5.87	J	0.990	PP	10.00		0.54	-0.079
Ssb1	YP_033197.1	BH03540	Einzelstrang-Bindungsprotein (ssb)	1	19.0/7.8	16.79	7.07	N	0.000	UNK	2.00	L	0.51	-0.655
Ssb3	YP_033744.1	BH09470	Einzelstrang-Bindungsprotein (ssb)	1	19.0/7.8	16.73	7.07	N	0.000	UNK	2.00	L	0.51	-0.578
Ssb4	YP_033798.1	BH10130	Einzelstrang-Bindungsprotein (ssb)	6	19.0/6.9 21.0/5.5 20.8/6.1 20.2/6.1 22.0/5.5 22.1/6.1	19.30	5.75	N	0.000	UNK	2.00	L	0.57	-0.828

SucB	YP_034343.1	BH16530	Dihydrolipoamide-Succinyltransferase	5	47.9/6.2 48.7/6.4 48.0/6.0 49.3/5.6 48.2/5.8	43.61	5.99	N	0.000	CYT	9.26	C	0.57	-0.071
SucC	YP_034346.1	BH16560	Succinyl-CoA-Synthetase (β-Kette)	4	45.0/5.1 45.0/5.2 26.5/6.3 45.0/5.3	42.79	5.07	N	0.000	CYT	8.96	C	0.59	-0.035
SucD	YP_034345.1	BH16550	Succinyl-CoA synthetase (α-Kette)	3	40.5/7.1 42.0/7.1 42.1/6.7	30.97	6.47	N	0.000	UNK	2.00	C	0.61	0.001
Tig	YP_033426.1	BH05940	Trigger factor	2	55.3/5.3 55.5/5.4	53.19	5.14	N	0.000	CYT	8.96	O	0.57	-0.539
TldD	YP_033276.1	BH04380	TldD-Protein	1	50.7/7.3	50.76	6.33	N	0.000	CYT	9.26	R	0.54	-0.296
TolB	YP_034182.1	BH14840	TolB-Protein	1	47.1/7.0	50.11	7.08	J	1.000	PP	9.76	U	0.50	-0.328
TrpS	YP_034071.1	BH13470	Tryptophanyl-tRNA-Synthetase	2	42.4/8.0 42.8/8.6	39.86	7.75	N	0.000	CYT	9.26	J	0.50	-0.202
TrxA	YP_032896.1	BH00260	Thioredoxin	1	10.0/4.8	11.86	4.90	N	0.000	CYT	9.26	OC	0.61	-0.049
Tsf	YP_033452.1	BH06230	Elongationsfaktor Ts (EF-Ts)	7	37.8/4.8 35.2/4.8 37.9/4.9 37.1/4.8 37.3/4.9 38.4/4.7 37.5/5.0	32.35	4.93	N	0.001	CYT	9.26		0.56	0.015
Tuf	YP_033432.1	BH06020	Elongationsfaktor Tu (EF-Tu)	9	47.7/5.7	42.84	5.30	N	0.000	CYT	9.97	J	0.58	-0.166
	YP_033837.1	BH10530	Elongationsfaktor Tu (EF-Tu)		47.7/5.5 47.0/5.2 46.8/5.4 46.7/5.3 49.7/5.1 47.4/5.1 48.6/5.5 45.6/5.5	42.84	5.30	N	0.000	CYT	9.97	J	0.58	-0.166
TypA	YP_033024.1	BH01700	GTP-Bindungsprotein TypA	4	63.1/5.3 63.3/5.5 63.3/5.2 63.1/5.4	67.18	5.30	N	0.000	CYT	9.26	T	0.50	-0.294
TyrC	YP_034314.1	BH16210	Prephenat-Dehydrogenase / Cyclohexadienyl-Dehydrogenase	1	39.9/6.0	33.68	5.69	N	0.029	UNK	2.00	E	0.62	0.074
UgpB	YP_033041.1	BH01870	Glycerol-3-Phosphat-Bindungsprotein (periplasm. Proteinvorläufer Pecursor ugpB)	1	44.0/7.7	48.82	8.49	J	0.999	PP	9.76	G	0.54	-0.293
UgpC	YP_033038.1	BH01840	Zucker-ABC-Transporter, ATP-Bindungsprotein	1	44.0/7.7	39.59	7.19	N		UNK-ML	6.29	G	0.52	-0.335
VapA3	YP_033506.1	BH06820	Virulenz-assoziiertes Protein A	1	11.9/7.5	11.05	6.97	N	0.000	UNK	2.00	R	0.56	-0.152
XthA1	YP_033841.1	BH10570	Exodeoxyribonuklease III	1	31.6/7.3	30.11	6.18	N	0.000	CYT	9.97	L	0.47	-0.553
YbeJ	YP_033842.1	BH10580	Aminosäure-ABC-Transporter Bindungsprotein	1	31.7/8.0	33.79	8.60	J	0.997	PP	9.76	ET	0.46	-0.296
YfeA	YP_032949.1	BH00860	Eisentransportprotein YfeA	2	32.2/6.3 32.1/6.6	33.71	6.01	N	0.244	CM	8.02	P	0.57	-0.124

Anmerkungen zu Tabelle 11:

- a) Identifizierte Proteine auf der 2D-Proteomkarte und auf den 2D-Immunoblots sind entweder mit dem Proteinnamen oder alternativ mit der GI-Nummer entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomsequenz bezeichnet.
- b) Die Zugangsnummern der Proteine sind entsprechend der NCBI *B. henselae* Houston-1 Genomsequenz (NC_005956) angegeben. Für Details siehe NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/key.html#accessions>.
- c) Die Lokusnummern des Gens sind entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomsequenz (NC_005956) angegeben.
- d) Empirische MW- und pI-Werte wurden mittels der Decodon Delta-2D 3.3 Software bestimmt.
- e) Die Zuweisung eines Signalpeptides zu den Proteinen erfolgte mittels SignalP-HMM (Hidden Markov Model); N - kein Signalpeptid / J - Signalpeptid.
- f) Die Wahrscheinlichkeit der Signalpeptidvorhersage von SignalP (0 bis 1).
- g) Die Zuweisung der zellulären Lokalisation zu den Proteinen erfolgte mittels PSORTb. Die Abkürzungen geben die Lokalisation wieder:
(CYT: Zytosol, CM: zytosolische Membran, PP: periplasmatischer Raum, OM: Außenmembran, UNK: unbekannte Lokalisation, UNK-ML: unbekannte Lokalisation mit potentiell multiplen Lokalisationsmöglichkeiten.
- h) Die Wahrscheinlichkeit der Lokalisationsvorhersage von PSORTb (0 bis 10).
- i) COG-Kategorie der Proteine (*Cluster of orthologous groups*). Weitere Details sowie alle *B. henselae*-Proteine nach COG-Kategorie katalogisiert.
Siehe NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/coxik.cgi?gi=409>.
- j) Bewertung der Expressionshäufigkeit der Proteine anhand des CAI-Wertes (*Codon adaptation index*).
- k) Bewertung der Hydrophathie der Proteine anhand des GRAVY-Wertes (*Grand average of hydropathy*).

3.5 Untersuchung der Immunreaktivität des *B. henselae*-Proteoms mit Patientenseren

Im nächsten Schritt wurde die Immunreaktivität von Patientenseren gegenüber dem *B. henselae*-Proteom untersucht. Um die immunreaktiven *B. henselae*-Proteine zu detektieren, wurde 200 µg Proteinextrakt von *B. henselae* mittels 2D-SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Proteintransfer auf PVDF-Membranen übertragen (Western-Blot) (siehe 2.2.7, 2.2.10). Es wurden 33 positiv auf Antikörper gegen *B. henselae* getestete Seren von Patienten mit klinisch suspekten Symptomen wie lokaler Lymphadenopathie (IFT \geq 1:200) bzw. 5 negativ getestete Kontrollseren (IFT $<$ 1:100) von gesunden Blutspendern für die anschließende Immundetektion verwendet. Die Blotmembranen wurden abschließend mit einem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Anti-human IgG-Antikörper sowie DAB als Substrat entwickelt (Abb. 16, 17). Nach Einlesen mittels Flachbettscanner wurden im nächsten Schritt die gleichen Membranen mit Amidoschwarz gefärbt, um nun die gesamten, transferierten Proteine und nicht ausschließlich die immunreaktiven Proteine sichtbar zu machen (Abb. 18, 19) (siehe 2.2.10-2.2.14).

Sowohl die Proteinpunkte der mit Amidoschwarz gefärbten als auch die der korrespondierenden mit DAB entwickelten 2D-Western-Blotmembranen wurden zu der zuvor erstellten 2D-Proteomkarte von *B. henselae* (Abb. 9-12) mittels der Decodon Delta-2D Software exakt zur Deckung gebracht. Nun konnte den immunreaktiven Proteinpunkten der entsprechende Proteinpunkt der Proteomkarte zugeordnet werden, was dann folglich die Identifizierung und die Bezeichnung der Proteine erlaubte. Jedes der identifizierten Proteine wurde auf den Abbildungen mit dem abgekürzten Namen bzw. der GI-Nummer bezeichnet, die nicht-identifizierten, jedoch häufig reagierenden Proteine wurden mit einem Buchstabenkürzel versehen (Abb. 16-19).

Alle immunogenen, seroreaktiven Proteine und ihre Häufigkeit der Reaktivität mit den untersuchten Seren sind in Tab. 13, 14 dargestellt. Zudem gibt darüber hinaus Tab. 15 neben dem empirischen MW und dem empirischen *pI* der immunreaktiven Proteinpunkte auch die Intensität der Immunreaktion der seroreaktiven Proteine gegenüber des jeweils verwendeten Serums an. Insgesamt umfasst diese Zusammenstellung der immunreaktiven Proteine 71 identifizierte und 8 nicht identifizierte Proteine. Bemerkenswert ist, dass keines der *B. henselae*-Proteine eine Immunreaktivität mit allen der untersuchten Patientenseren zeigte. Folglich wurde ein Schwellenwert von 20 % Seroreaktivität definiert, um die lediglich wiederholt seroreaktiven Proteine von den vorrangig und häufigen seroreaktiven, immunodominanten und somit potentiellen Seromarker-Proteinen zu unterscheiden. Dieser eingeführte Schwellenwert von 20 % Seroreaktivität verdeutlicht, dass sich mindestens 7 der 33 untersuchten Patientenseren immunreaktiv gegenüber einem bestimmten Protein verhalten.

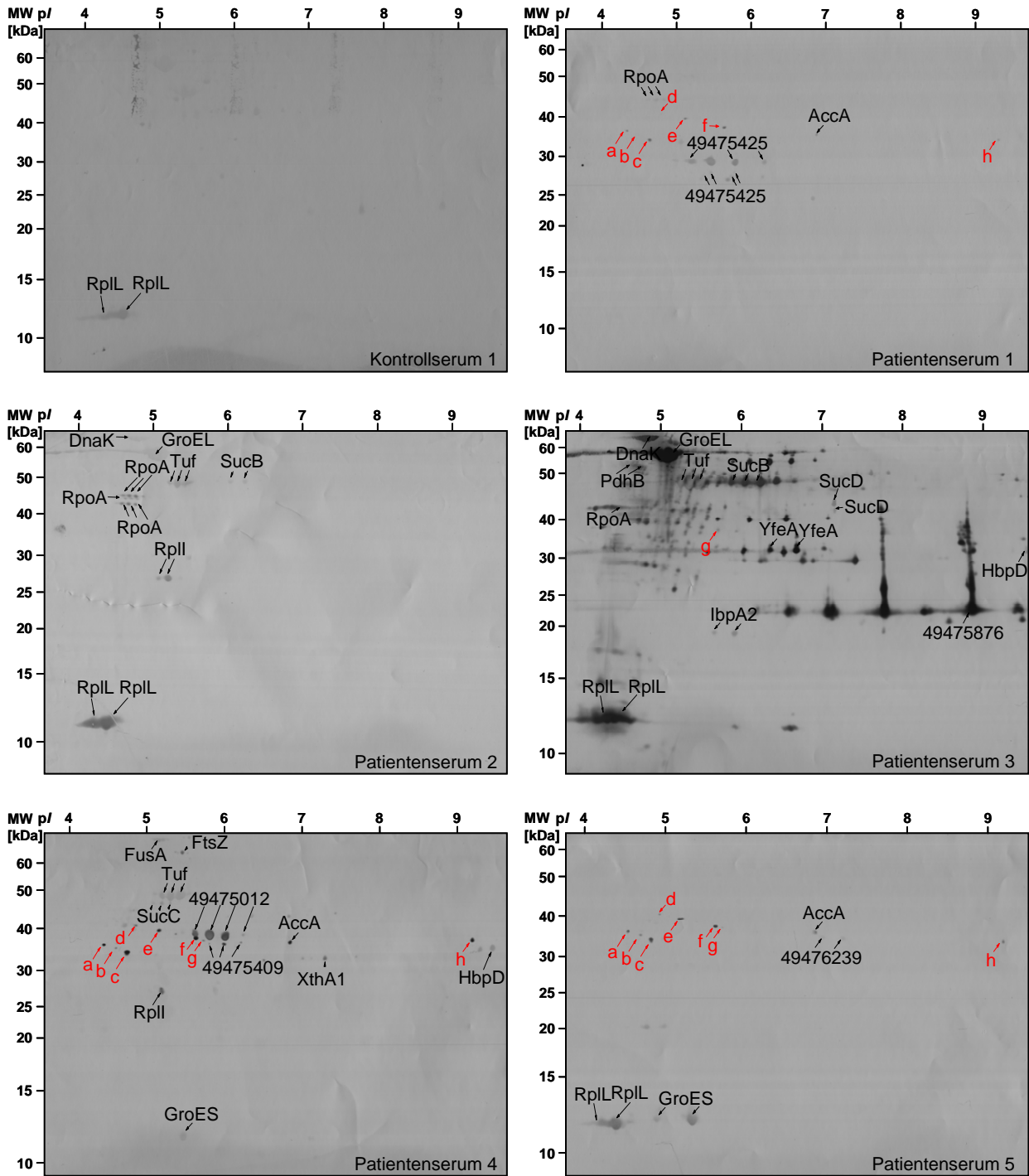


Abb. 16: 2D-Immunoblots der extrahierten Proteine von *B. henselae* Marseille nach Untersuchung der Patientenserum mit serologisch bestätigter *B. henselae*-Infektion bzw. der Kontrollserum gesunder Blutspender. Die Proteinextrakte von *B. henselae* wurden mittels 24 cm linearen IPG-Streifen 3 - 10/ 15 % SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine durch Proteintransfer auf PVDF-Membranen übertragen (Western-Blot) und mit 33 Patientenserum (IFT \geq 1:200) und mit 5 Kontrollserum (IFT $<$ 1:100; Kontrollserum 2 - 5; siehe Abb. 17) untersucht. Immunreaktive Proteine wurden mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-Mensch-IgG Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Antikörper mit DAB als Substrat visualisiert (siehe Tab. 12-15). Die Blotmembranen wurden mit Amidoschwarz gegengefärbt, um die nicht-immunreaktiven Proteine zu detektieren (siehe Abb. 18, 19) und um die gefärbten Blotmembranen zu der 2D-Proteomkarte von *B. henselae* mittels Decodon Delta-2D Software exakt abzugleichen. Die identifizierten, seroreaktiven Proteine sind mit den Proteinennamen bzw. mit den GI-Nummern entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomdatenbank (NCBI, Zugangsnummer NC_005956) bezeichnet, nicht-identifizierte, aber häufig reagierende Proteine sind mit roten Pfeilen und Buchstabenkürzeln hervorgehoben.

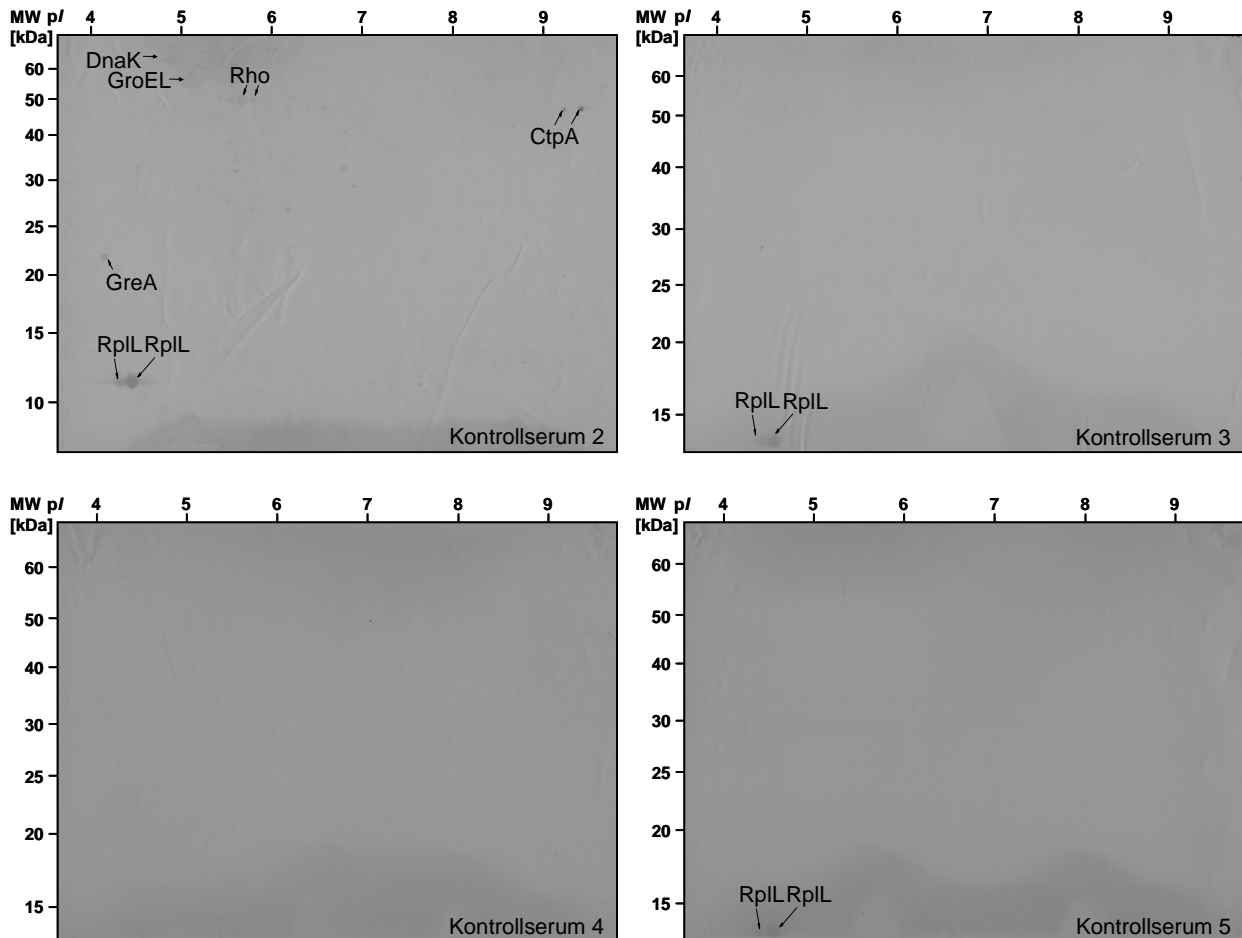


Abb. 17: 2D-Immunoblots der extrahierten Proteine von *B. henselae* Marseille nach Untersuchung der Kontrollseren gesunder Blutspender. Die Proteinextrakte von *B. henselae* wurden mittels 24 cm linearen IPG-Streifen 3 - 10/ 15 % SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine durch Proteintransfer auf PVDF-Membranen übertragen (Western-Blot) und mit 33 Patientenseren (IFT \geq 1:200) und 5 Kontrollseren (IFT < 1:100; Kontrollserum 1; siehe Abb. 16) untersucht. Immunreaktive Proteine wurden mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-Mensch-IgG Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Antikörper mit DAB als Substrat visualisiert (siehe Tab. 12-15). Die Blotmembranen wurden mit Amidoschwarz gegengefärbt, um die nicht-immunreaktiven Proteine zu detektieren (siehe Abb. 18, 19) und um die gefärbten Blotmembranen zu der 2D-Proteomkarte von *B. henselae* mittels Decodon Delta-2D Software exakt abzugleichen. Die identifizierten, seroreaktiven Proteine sind mit den Proteinennamen bzw. mit den GI-Nummern entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomdatenbank (NCBI, Zugangsnummer NC_005956) bezeichnet.

Dieser definierte Schwellenwert wurde von 20 seroreaktiven Proteinen erreicht und beinhaltet auch vier Proteine, die bislang nicht identifiziert werden konnten (Tab. 13-15). Das Protein RplL, also die L7/L12-Untereinheit der 50S-Ribosomen, zeigte sich reaktiv mit drei der negativen Kontrollseren und wurde demzufolge im weiteren Verlauf der Untersuchung nicht als potentielles immundominantes Seromarker-Protein berücksichtigt. Ebenso besaßen auch einige andere Proteine, wenn auch sehr schwach, eine Seroreaktivität mit einem der negativen Kontrollseren (Abb. 17). Deshalb wurden auch die Proteine Carboxy-terminal prozessierende Protease CtpA (CtpA), Hitzeschockprotein-70 DnaK (DnaK), Hsp-70 Kofaktor GrpE (GreA), das Chaperonin-Protein GroEL (GroEL) sowie der Transkriptionsterminierende Faktor Rho (Rho) als potentieller Seromarker für eine *B. henselae*-Infektion ausgeschlossen. Demzufolge waren insgesamt vier nicht-

identifizierte Proteine und 11 identifizierte Proteine ausschließlich mit den hier untersuchten Patientenseren vorrangig seroreaktiv und können demnach als immundominante, potentielle Seromarker-Proteine betrachtet werden (Tab. 12).

Die am häufigsten von den Patientenseren erkannten Proteine sind die Dihydroliipoamid-Succinyltransferase (SucB), das Protein GI 49475876 (YP_033917) und der Elongationsfaktor-Tu (EF-Tu), welche mindestens 55 % Seroreaktivität zeigten. Neben den am intensivsten reagierenden Proteinen SucB und dem Protein GI 49475876 erwiesen sich auch das Chaperonin-Protein GroEL (GroEL), der Elongationsfaktor-Ts (EF-Ts) und die Parvulin-ähnliche Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase (GI 49475012/ YP_033053) als sehr stark seroreaktive Proteine. Obwohl die Proteine Acetyl-CoA Carboxylase (AccA), Polyribonukleotid-Nukleotidyltransferase (Pnp), Superoxid-Dismutase (SodB) und Elongationsfaktor-Tu (EF-Tu) sehr häufig reagierten, fällt die eigentliche Intensität der Seroreaktivität mit den hier untersuchten Patientenseren vergleichsweise gering aus.

Tab. 12: Immundominante und seroreaktive *B. henselae*-Proteine mit absoluter Nummer und Prozentanteilen der Seroreaktivität mit den Patientenseren bzw. den Kontrollseren der gesunden Blutspender. Alle aufgeführten Proteine erreichten den Schwellenwert von 20 % Seroreaktivität mit den untersuchten Patientenseren und zeigten keine Reaktivität mit den Kontrollseren.

Protein- bezeichnung ^{a)}	Proteinbeschreibung	Reaktivität mit Patientenseren (n=33)		Reaktivität mit Kontrollseren (n=5)	
		abs. Nummer	%	abs. Nummer	%
49475012	Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase	8	24	0	0
49475876	Außenmembranprotein (OMP)	18	55	0	0
AccA	Acetyl-CoA-Carboxylase (Carboxyltransferase α -Untereinheit)	10	30	0	0
GroES	Chaperonin-Protein GroES	12	36	0	0
LysS	Lysyl-tRNA-Synthetase	7	21	0	0
Pnp	Polyribonukleotid-Nukleotidyltransferase	7	21	0	0
SodB	Superoxid-Dismutase	9	27	0	0
SucB	Dihydroliipoamide-Succinyltransferase	21	64	0	0
SucC	Succinyl-CoA-Synthetase (β -Kette)	7	21	0	0
Tsf	Elongationsfaktor Ts (EF-Ts)	9	27	0	0
Tuf	Elongationsfaktor Tu (EF-Tu)	18	55	0	0
a	- nicht identifiziert -	10	30	0	0
b	- nicht identifiziert -	8	24	0	0
c	- nicht identifiziert -	11	33	0	0
f	- nicht identifiziert -	10	30	0	0

a) Identifizierte Proteine auf der 2D-Proteomkarte und auf den 2D-Immunoblots sind entweder mit dem Proteinnamen oder alternativ mit der GI-Nummer entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomsequenz bezeichnet. Unidentifizierte Proteine auf den 2D-Immunoblots sind mit einem Buchstabenkürzel statt dem Proteinnamen bzw. der GI-Nummer gekennzeichnet.

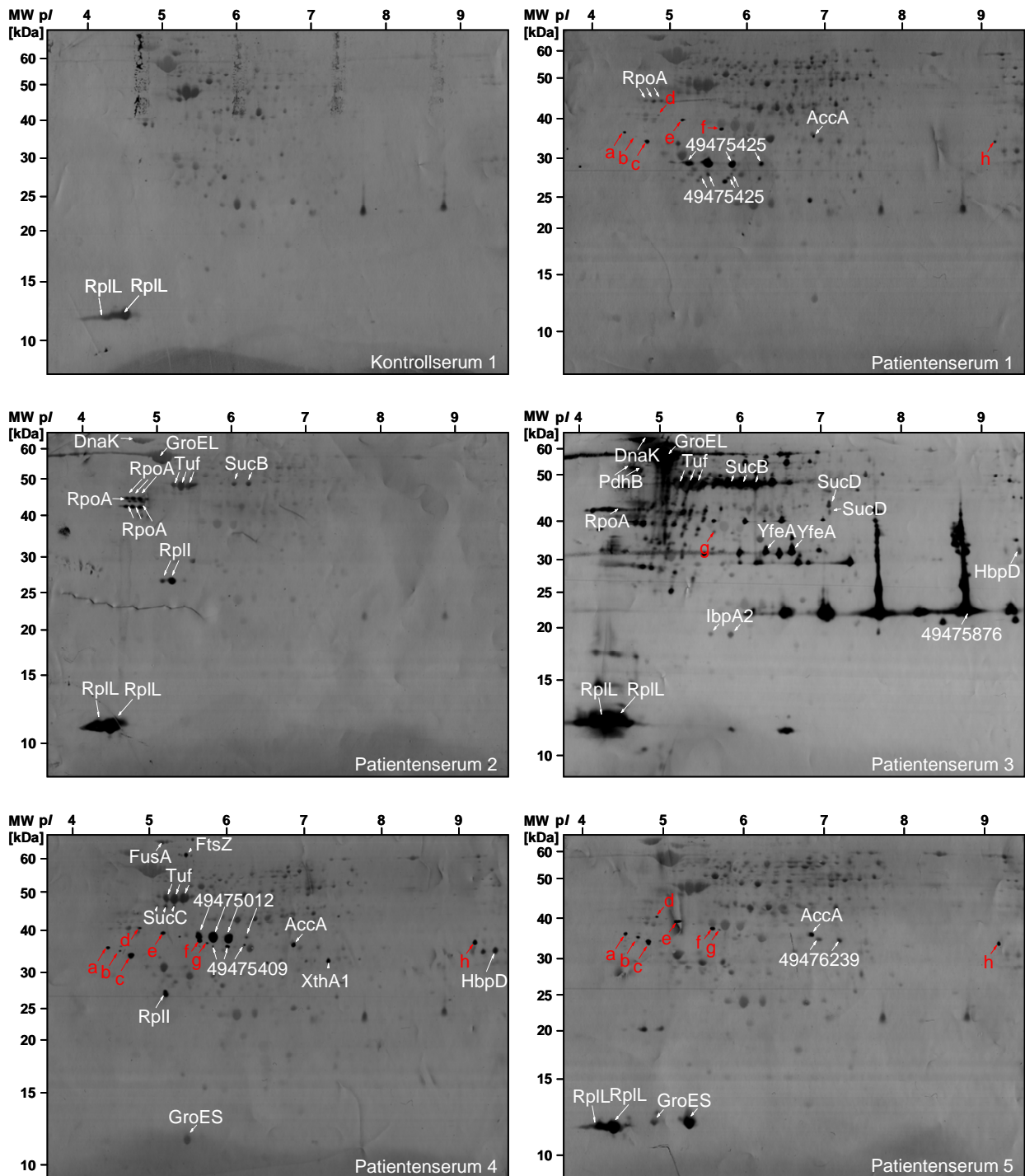


Abb. 18: Amidoschwarz-Gegenfärbung der in Abb.16 gezeigten 2D-Immunoblots nach Untersuchung der Patientenseren mit serologisch bestätigter *B. henselae*-Infektion (IFT \geq 1:200) bzw. der Kontrollseren gesunder Blutspender (IFT < 1:100; Kontrollserum 2 - 5; Abb. 17, 19). Die Blotmembranen wurden mit Amidoschwarz gegengefärbt, um die nicht-immunreaktiven *B. henselae*-Proteine zu detektieren und die gefärbten Blotmembranen zu der 2D-Proteomkarte von *B. henselae* mittels Decodon Delta-2D Software exakt abzugleichen. Die identifizierten, seroreaktiven Proteine sind mit den Proteinennamen bzw. mit den GI-Nummern entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomdatenbank (NCBI, Zugangsnummer NC_005956) bezeichnet, nicht-identifizierte, aber häufig reagierende Proteine sind mit roten Pfeilen und Buchstabenkürzeln hervorgehoben.

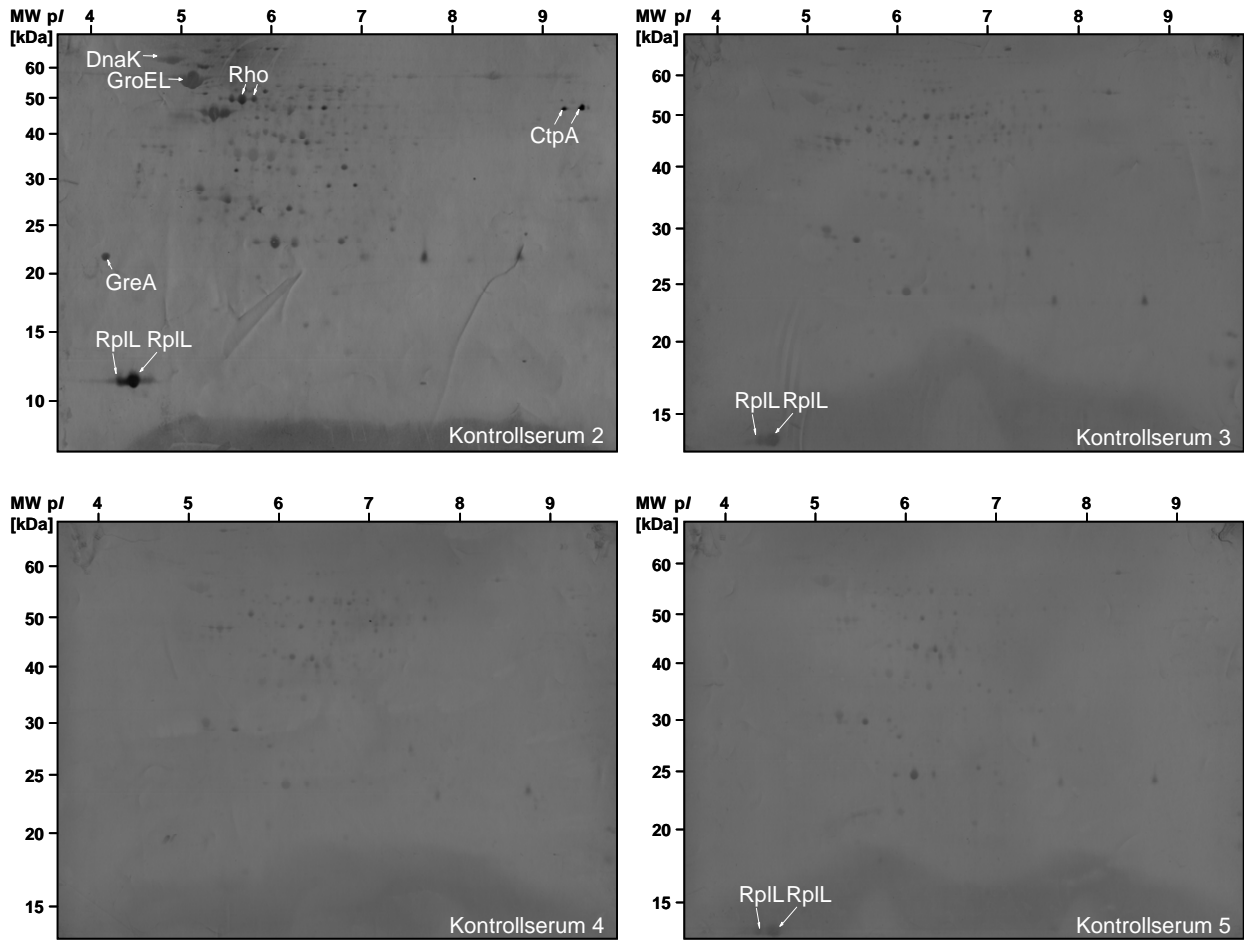


Abb. 19: Amidoschwarz-Gegenfärbung der in Abb. 17 gezeigten 2D-Immunoblots nach Untersuchung der Kontrollseren gesunder Blutspender (IFT < 1:100). Die Blotmembranen wurden mit Amidoschwarz gegengefärbt, um die nicht-immunreaktiven *B. henselae*-Proteine zu detektieren und die gefärbten Blotmembranen zu der 2D-Proteomkarte von *B. henselae* mittels Decodon Delta-2D Software exakt abzugleichen. Die identifizierten, seroreaktiven Proteine sind mit den Proteinennamen bzw. mit den GI-Nummern entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomdatenbank (NCBI, Zugangsnummer NC_005956) bezeichnet.

Tab. 13: Identifizierte immunogene und seroreaktive *B. henselae*-Proteine mit absoluter Nummer und Prozentanteilen der Seroreaktivität mit den Patientenseren bzw. den Kontrollseren der gesunden Blutspender.

Protein- bezeichnung ^{a)}	Proteinbeschreibung	Reaktivität mit Patientenseren (n=33)		Reaktivität mit Kontrollseren (n=5)	
		abs. Nummer	%	abs. Nummer	%
49475001	ABC-Transporter, periplasm. Bindungsprotein	1	3	0	0
49475012	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase	8	24	0	0
49475061	Aminopeptidase	4	12	0	0
49475409	Hypothetisches Protein BH06210	1	3	0	0
49475425	ABC-Transporter, periplasm. Aminosäure-Bindungsprotein	3	9	0	0
49475876	Außenmembranprotein (OMP)	18	55	0	0
49476068	Hypothetisches Protein BH14040	1	3	0	0
49476239	SapC-verwandtes Protein	1	3	0	0
49476277	Hypothetisches Protein BH16250	1	3	0	0
AccA	Acetyl-CoA-Carboxylase (Carboxyltransferase α -Untereinheit)	10	30	0	0
AccD	Acetyl-CoA-Carboxylase (Carboxyltransferase β -Kette)	1	3	0	0
Adk	Adenylat-Kinase	1	3	0	0
AhcY	Adenosylhomocysteinase	2	6	0	0
AldA	Aldehyd-Dehydrogenase	4	12	0	0
ATPA	ATP-Synthase (α -Kette)	5	15	0	0
ATPD	ATP-Synthase (β -Kette)	1	3	0	0
ATPH	ATP-Synthase (δ -Kette)	2	6	0	0
ArgB	Acetylglutamat-Kinase	1	3	0	0
ClpB	ATP-abhängige Clp-Protease, (ATP-Bindungseinheit ClpB)	3	9	0	0
CtpA	Carboxyterminale Protease CtpA	13	39	1	20
CtrA	Zellzyklus-Transkriptionsregulator Ctra	2	6	0	0
DhA	Pyruvat-Dehydrogenase E1-Komponente, α -Untereinheit	2	6	0	0
DnaB	Replikative DNA-Helikase	2	6	0	0
DnaK	Hitzeschockprotein-70 DnaK	15	45	1	20
EtfA	Elektronentransfer- Flavoprotein (α -Untereinheit)	2	6	0	0
FabI2	Enoyl-(Acylträgerprotein)-Reduktase	1	3	0	0
FbaB	Fruktosebisphosphat-Aldolase	3	9	0	0
FtsY	Zellteilungsprotein ftsY	5	15	0	0
FtsZ	Zellteilungsprotein ftsZ	1	3	0	0
FusA	Elongationsfaktor g (EF-g)	5	15	0	0
GatB	Glutamyl-tRNA-Amido-transferase Untereinheit B	4	12	0	0
GlyA	Serin-Hydroxymethyltransferase	4	12	0	0
GreA	Transkriptionselongationsfaktor GreA	3	9	1	20
GshB	Glutathion-Synthetase	1	3	0	0
GroEL	Chaperonin-Protein GroEL	19	58	1	20
GroES	Chaperonin-Protein GroES	12	36	0	0
GrpE	Hsp-70-Kofaktor GrpE	3	9	0	0
HbpD	Häminbinde-Protein d	6	18	0	0
HslU	ATP-abh. Protease HslU	3	9	0	0
HtrA1	Serine-Protease	5	15	0	0
HtrA3	Serin-Protease	6	18	0	0
HutB	Periplasmatisches Häminbinde-Protein	1	3	0	0
IbpA2	Kleines Hitzeschockprotein	4	12	0	0
LivJ	ABC-Transporter, periplasm. Aminosäure-Bindungsprotein	6	18	0	0
LysS	Lysyl-tRNA-Synthetase	7	21	0	0
Mdh	Malat-Dehydrogenase	5	15	0	0

Mrp	Mrp-Protein (mrp - Multiple Resistenz und pH-Adaptation)	4	12	0	0
MutL	DNA-Mismatch-Reparatur- protein MutL	2	6	0	0
NtrX	Stickstoffregulationsprotein	5	15	0	0
PpiB1	Peptidyl-prolyl cis-trans-Isomerase b	2	6	0	0
PdhB	Pyruvat-Dehydrogenase E1-Komponente (β -Untereinheit)	2	6	0	0
PdhD2	Dihydrolipoamid-Dehydrogenase	4	12	0	0
Pnp	Polyribonukleotid-Nukleotidyltransferase	7	21	0	0
PrfA	Peptidketten-Release-Faktor 1	1	3	0	0
PyrE	Orotatphosphoribosyltransferase	2	6	0	0
Rho	Transkriptionsterminationsfaktor Rho	11	33	1	20
RplI	50S ribosomales Protein L9	4	12	0	0
RplL	50S ribosomales Protein L7/L12	24	73	4	80
RpoA	DNA-abhängige RNA-Polymerase (α -Kette)	5	15	0	0
RpsA	30S ribosomales Protein S1	2	6	0	0
RuvA	Holliday junction DNA-Helikase RuvA	2	6	0	0
SdhA	Succinat-Dehydrogenase, Flavoprotein-Untereinheit	1	3	0	0
SerC	Phosphoserin-Aminotransferase	1	3	0	0
SodB	Superoxid-Dismutase	9	27	0	0
SucB	Dihydrolipoamide-Succinyltransferase	21	64	0	0
SucC	Succinyl-CoA-Synthetase (β -Kette)	7	21	0	0
SucD	Succinyl-CoA-Synthetase (α -Kette)	1	3	0	0
Tsf	Elongationsfaktor Ts (EF-Ts)	9	27	0	0
Tuf	Elongationsfaktor Tu (EF-Tu)	18	55	0	0
XthA1	Exodeoxyribonuklease III	1	3	0	0
YfeA	Eisentransportprotein YfeA	3	9	0	0

a) Identifizierte Proteine auf der 2D-Proteomkarte und auf den 2D-Immunoblots sind entweder mit dem Proteinnamen oder alternativ mit der GI-Nummer entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomsequenz bezeichnet.

Tab. 14: Unidentifizierte immunogene und seroreaktive *B. henselae*-Proteine mit empirisch bestimmten MW- und pI-Werten, absoluter Nummer und Prozentanteilen der Seroreaktivität mit den Patientenseren bzw. den Kontrollseren der gesunden Blutspender.

Protein- bezeichnung ^{a)}	Proteinbeschreibung	Empir. best. MW [kDa]/ pI ^{b)}	Reaktivität mit Patientenseren (n=33)		Reaktivität mit Kontrollseren (n=5)	
			abs. Nummer	%	abs. Nummer	%
a	- nicht identifiziert -	35,7/4,5	10	30	0	0
b	- nicht identifiziert -	35,0/4,6	8	24	0	0
c	- nicht identifiziert -	34,1/4,7	11	33	0	0
d	- nicht identifiziert -	39,8/4,9	3	9	0	0
e	- nicht identifiziert -	38,8/5,2	6	18	0	0
f	- nicht identifiziert -	36,7/5,6	10	30	0	0
g	- nicht identifiziert -	36,7/5,7	3	9	0	0
h	- nicht identifiziert -	34,6/9,2	6	18	0	0

a) Unidentifizierte Proteine auf den 2D-Immunoblots sind mit einem Buchstabenkürzel statt dem Proteinnamen oder der GI-Nummer bezeichnet.

b) Empirische MW- und pI-Werte wurden mittels der Decodon Delta-2D 3.3 Software bestimmt.

Tab. 15: Nächste Seite. Immunogene und seroreaktive *B. henselae*-Proteine mit empirisch bestimmten MW- und pI-Werten, absoluter Nummer und Prozentanteilen der Seroreaktivität mit den Patientenseren bzw. den Kontrollseren der gesunden Blutspender. Zusätzlich sind die Intensitäten der Immunreaktivität der untersuchten Seren gegen jedes seroreaktive Protein aufgeführt: +++ starke Reaktivität, ++ mittlere Reaktivität, + schwache Reaktivität, – keine Reaktivität.

Protein-bezeichnung ^{a)}	Proteinbeschreibung	Empir. best. MW [kDa]/ pI ^{b)}
49475001	ABC-Transporter, periplasmatisches Protein	36,1/9,2
49475012	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase	37,7/5,8-37,4/6,0-38,0/5,6-37,7/6,2
49475061	Aminopeptidase	48,8/6,5-48,7/6,7-48,7/6,4
49475409	Hypothetisches Protein BH06210	35,4/5,9-35,5/5,7-35,7/6,2
49475425	ABC-Transporter, periplasmatisches Aminosäure-binde	29,7/5,3-28,1/5,5-30,1/5,8-28,3/5,8-30,1/6,1-27,6/5,7-28,8/5,5
49475876	Außenmembranprotein (OMP)	22,9/8,8
49476068	Hypothetisches Protein BH14040	32,6/5,5-32,6/4,9
49476239	sapC-verwandtes Protein	34,2/7,1-34,4/6,9
49476277	Hypothetisches Protein BH16250	37,6/9,5-37,2/9,6
AccA	Acetyl-CoA Carboxylase, Carboxyltransferase α -Untereinheit	35,2/6,8
AccD	Acetyl-Coenzym A Carboxylase, Carboxyltransferase β -	37,7/9,3
Adk	Adenylatkinase	24,6/7,2-22,0/7,4
AhcY	Adenosylhomocysteinase	52,2/5,9
AldA	Aldehyd-Dehydrogenase	53,5/6,0-53,5/6,2
ATPA	ATP-Synthase α -Kette	54,6/6,0-56,6/6,3-54,6/6,5
ATPD	ATP-Synthase β -Kette	55,6/5,4-55,6/5,6-55,2/5,5
ATPH	ATP-Synthase δ -Kette	22,8/7,0
ArgB	Acetylglutamatkinase	33,1/4,5-33,2/4,6-33,2/4,7
ClpB	ATP-abhängige Clp-Protease, ATP-binde Untereinheit clpB	66,3/6,0-66,3/5,9-66,5/5,8-66,2/6,0
CtpA	Carboxy-terminale Protease ctpA	49,2/9,4-49,2/9,5
CtrA	Zellzyklus-transcriptionaler Regulator ctrA	28,0/6,3-28,0/6,4
DhA	Pyruvatdehydrogenase E1-Komponente, α -Untereinheit	42,1/6,7-41,7/6,5-41,9/6,7-41,7/6,2-35,1/5,5
DnaB	Replikative DNA-Helicase	55,7/5,5
DnaK	Hitzeschock-Protein 70 DnaK	60,8/4,8-61,3/4,7-61,0/4,8-61,1/4,9
EtfA	Elektronentransfer-Flavoprotein α -Untereinheit	35,2/6,0
FabI2	Enoyl-(acyl-carrier-protein)-Reduktase	32,0/7,4-32,1/7,4-32,0/7,0
FbaB	Fruktosebisphosphat-Aldolase	37,5/6,3-40,6/7,1-41,0/6,8-42,5/6,8
FtsY	Zellteilungspolypeptid ftsY	51,3/9,3-51,4/9,4
FtsZ	Zellteilungspolypeptid ftsZ	60,6/5,5-60,7/5,5
FusA	Elongationsfaktor g (EF-g)	64,5/5,1-64,5/5,2-64,7/5,3
GatB	Glutamyl-tRNA Amidotransferase Untereinheit B	53,7/5,3-53,2/5,1
GlyA	Serinhydroxymethyl-Transferase	49,3/7,3-48,5/7,0-48,8/7,2-48,9/6,9
GreA	Hsp-70 Kofaktor grpE	29,9/4,4-29,7/4,5-29,6/4,6
GshB	Glutathion-Synthetase	37,8/6,8-37,4/6,6-37,1/6,4
GroEL	Chaperonin-Protein groEL	54,5/5,2-54,8/5,0-56,7/5,3-57,0/5,4-55,5/5,2-55,3/4,9-54,3/5,1
GroES	Chaperonin-Protein groES	11,6/5,4-11,5/5,0
GrpE	Hsp-70 Kofaktor grpE	29,9/4,4-29,7/4,5-29,6/4,6
HbpD	Häm-bindep-Protein d	33,2/9,4
HslU	ATP-abh. Protease HslU	53,7/5,4-53,7/5,3
HtrA1	Serinprotease	58,2/8,2-57,7/7,6-57,8/8,4-57,5/7,4-57,6/7,5-57,6/7,4
HtrA3	Serinprotease	52,7/5,9
HutB	Periplasmatisches Häm-bindep-Protein	30,9/9,5-30,8/9,3-30,7/9,6
IbpA2	Hitzeschock-Protein	19,3/5,6-19,3/5,9
LivJ	"Branched chain" Aminosäure ABC Transporter	41,8/6,3-41,7/6,0-42,0/6,6-41,9/5,7
LysS	Lysyl-tRNA Synthetase	58,0/6,2-57,9/6,0-57,6/5,9
Mdh	Malat Dehydrogenase	41,7/6,1-40,0/6,1-42,0/5,8-41,7/6,5
Mrp	mrp-Protein (mrp - Multiple Resistenz und pH-Adaptation)	43,7/7,2
MutL	DNA-Mismatch Reparaturprotein mutL	63,8/6,8
NtrX	Stickstoffregulationsprotein	54,8/5,7-54,6/5,9-54,6/5,8
PpiB1	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase b	18,5/4,8-18,5/4,7-18,5/5,0
PdhB	Pyruvat Dehydrogenase E1-Komponente β -Untereinheit	51,9/4,6-51,8/4,7-51,6/4,8
PdhD2	Dihydrolipoamid-Dehydrogenase	51,9/6,4-51,1/6,6-53,1/6,8-52,8/6,7-53,4/6,4-51,0/6,7-53,1/6,5-53,4/6,6-51,8/6,7
Pnp	Polyribonukleotid-Nukleotidyltransferase	65,6/5,4-65,6/5,6-65,7/5,6-68,4/5,6-66,0/5,7-68,6/5,6
PrfA	Peptidketten-Freisetzungsfaktor 1	45,9/5,8
PyrE	Orotat-Phosphoribosyltransferase	23,9/7,0
Rho	Transcriptionsterminationsfaktor rho	50,7/5,8-50,4/5,7
RplI	50S ribosomales Protein L9	26,4/5,2-26,3/5,1
RplL	50S ribosomales Protein L7 /L12	11,3/4,4-11,3/4,5-11,3/4,3
RpoA	DNA-abhängige RNA-Polymerase α -Kette	43,0/4,7-41,0/4,8-42,3/4,8-42,8/4,8-42,1/4,7-40,9/4,7-42,9/4,9-41,0/4,7-43,0/4,7
RpsA	30S ribosomal protein S1	59,9/5,3-59,4/5,2-60,3/5,1-60,2/5,0-59,3/5,2
RuvA	30S ribosomal protein S1	59,9/5,3-59,4/5,2-60,3/5,1-60,2/5,0-59,3/5,2
SdhA	Succinat-Dehydrogenase, Flavoprotein-Untereinheit	60,8/6,3-61,4/6,4
SerC	Phosphoserin-Aminotransferase	46,3/5,1-46,0/5,1-45,6/4,9-56,3/5,2
SodB	Superoxid-Dismutase	23,6/6,3-23,6/5,8-23,1/5,9-23,8/6,2-23,4/6,1-23,9/6,5
SucB	Dihydrolipoamid-Succinyltransferase	47,9/6,2-48,0/6,0-48,2/5,8
SucC	Succinyl-CoA Synthetase β -Kette	45,0/5,1-45,0/5,2-45,0/5,3
SucD	Succinyl-CoA Synthetase α -Kette	40,5/7,1-42,0/7,1
Tsf	Elongationsfaktor Ts (EF-Ts)	37,8/4,8-35,2/4,8-37,9/4,9-37,1/4,8-37,3/4,9-38,4/4,7-37,5/5,0
Tuf	Elongationsfaktor Tu (EF-Tu)	47,0/5,2-46,8/5,4-47,4/5,1-46,7/5,3
XthA1	Exodeoxyribonuklease III	31,6/7,3
YfeA	Eisentransportprotein yfeA	32,2/6,3-32,1/6,6
a	- nicht identifiziert -	35,7/4,5
b	- nicht identifiziert -	35,0/4,6
c	- nicht identifiziert -	34,1/4,7
d	- nicht identifiziert -	39,8/4,9
e	- nicht identifiziert -	38,8/5,2
f	- nicht identifiziert -	36,7/5,6
g	- nicht identifiziert -	36,7/5,7
h	- nicht identifiziert -	34,6/9,2

a) Identifizierte Proteine auf der 2D-Proteomkarte und auf den 2D-Immunoblots sind entweder mit dem Proteinnamen oder alternativ mit der GI-Nummer entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomsequenz bezeichnet. Unidentifizierte Proteine auf den 2D-Immunoblots sind mit einem Buchstabenkürzel statt dem Proteinnamen bzw. der GI-Nummer gekennzeichnet.

b) Empirische MW- und pI-Werte wurden mittels der Decodon Delta-2D 3.3 Software bestimmt.

Protein- bezeichnung ^{a)}	Reaktionsintensität mit Patientenserum																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
49475001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49475012	-	-	-	++	-	-	++	-	-	+	-	++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
49475061	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
49475409	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49475425	++	-	-	-	-	-	+	-	-	++	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
49475876	-	-	++	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	+	-	++	+	+	+	-	++	+++
49476068	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
49476239	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49476277	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
AccA	++	-	-	++	++	-	++	-	++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
AccD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Adk	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AhcY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AldA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	+	-
ATPA	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	++	-	-	+	-
ATPD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ATPH	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ArgB	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ClpB	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
CtpA	-	-	-	-	-	-	-	++	+	++	-	-	-	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++
CtrA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DhA	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
DnaB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
DnaK	-	+	++	-	-	+	+	+	+	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-	++	+	+
EtfA	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FabI2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FbaB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
FtsY	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-
FtsZ	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FusA	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-
GatB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	+	+	-	-
GlyA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
GreA	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GshB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GroEL	-	+	++	-	-	-	++	+	-	+	++	-	++	-	++	-	-	++	+	-	-	+	-
GroES	-	-	-	+	++	-	-	-	+	-	++	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
GrpE	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
HbpD	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
HslU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	+	+	-	-
HtrA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
HtrA3	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
HutB	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IbpA2	-	-	++	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LivJ	-	-	-	-	-	+	-	++	-	-	-	-	-	-	++	-	-	+	++	-	-	-	-
LysS	-	-	-	-	-	++	-	++	-	++	-	++	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
Mdh	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
Mrp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
MutL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NtrX	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
PpiB1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
PdhB	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PdhD2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Pnp	-	-	-	-	-	++	-	++	-	++	-	-	-	-	+	-	++	-	-	-	-	-	-
PrfA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PyrE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Rho	-	-	-	-	-	++	-	-	-	++	-	++	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+++
RpII	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
RpIL	-	++	++	-	++	-	-	+	-	-	++	-	++	++	+	++	++	+	++	+	++	-	++
RpoA	+	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
RpsA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
RuvA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-
SdhA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SerC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
SodB	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
SucB	-	+	++	-	-	-	+	++	+	-	++	-	-	-	+	-	++	+	++	+	+	++	++
SucC	-	-	-	+	-	-	++	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	++	-
SucD	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tsf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	+++
Tuf	-	++	++	+	-	+	++	+	+	+	++	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
XthA1	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
YfeA	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
a	-	-	-	++	++	-	-	-	++	-	-	++	-	-	+	-	+	-	++	-	++	-	+
b	+	-	-	++	++	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
c	++	-	-	++	++	-	-	-	++	-	-	+	-	+	++	-	-	-	++	+	+	-	+++
d	+	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
e	++	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
f	++	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	++	++	+
g	-	-	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
h	+	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

a) Identifizierte Proteine auf der 2D-Proteomkarte und auf den 2D-Immunoblots sind entweder mit dem Proteinnamen oder alternativ mit der GI-Nummer entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomsequenz bezeichnet. Unidentifizierte Proteine auf den 2D-Immunoblots sind mit einem Buchstabenkürzel statt dem Proteinnamen bzw. der GI-Nummer gekennzeichnet.

Protein- bezeichnung ^{a)}	Reaktionsintensität mit Patientenserum					Reaktionsintensität mit Kontrollserum					Reaktivität mit Patientenserum (n=5)		Reaktivität mit Kontrollserum (n=33)						
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	1	2	3	4	5	abs. Nummer	%	abs. Nummer	%
49475001	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	0	0
49475012	-	-	-	-	-	++	++	-	-	++	-	-	-	-	-	8	24	0	0
49475061	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	4	12	0	0
49475409	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	0	0
49475425	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	9	0	0
49475876	++	+	+	-	++	++	++	-	++	+	-	-	-	-	-	18	55	0	0
49476068	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	0	0
49476239	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	0	0
49476277	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	0	0
AccA	-	-	+	-	++	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	10	30	0	0
AccD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	0	0
Adk	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	0	0
AhcY	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	2	6	0	0
AldA	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	4	12	0	0
ATPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	15	0	0
ATPD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1	3	0	0
ATPH	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	6	0	0
ArgB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	0	0
ClpB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	9	0	0
CtpA	-	+	++	++	-	+	-	-	-	-	++	-	-	-	-	13	39	1	20
CtrA	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	2	6	0	0
DhA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	6	0	0
DnaB	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	6	0	0
DnaK	-	-	-	+	++	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	15	45	1	20
EtfA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	6	0	0
FabI2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	0	0
FbaB	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	9	0	0
FtsY	-	++	++	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	5	15	0	0
FtsZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	0	0
FusA	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	5	15	0	0
GatB	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	12	0	0
GlyA	++	-	-	++	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	4	12	0	0
GreA	++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	3	9	1	20
GshB	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	0	0
GroEL	+	++	+	++	+	+	+	++	-	-	+	-	-	-	-	19	58	1	20
GroES	-	-	-	++	-	++	+	-	+	++	-	-	-	-	-	12	36	0	0
GrpE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	9	0	0
HbpD	-	+	+	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	6	18	0	0
HslU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	9	0	0
HtrA1	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	15	0	0
HtrA3	-	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-	6	18	0	0
HutB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	0	0
IbpA2	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	4	12	0	0
LivJ	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	6	18	0	0
LysS	-	-	-	++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	7	21	0	0
Mdh	-	-	+	++	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	5	15	0	0
Mrp	++	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	4	12	0	0
MutL	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	6	0	0
NtrX	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	15	0	0
PpiB1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	6	0	0
PdhB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	6	0	0
PdhD2	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	4	12	0	0
Pnp	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	7	21	0	0
PrfA	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	0	0
PyrE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	6	0	0
Rho	-	++	++	-	++	++	+	-	-	-	+	-	-	-	-	11	33	1	20
RplI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	4	12	0	0
RplL	+	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-	+	-	24	73	4	80
RpoA	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	15	0	0
RpsA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	6	0	0
RuvA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	6	0	0
SdhA	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	0	0
SerC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	0	0
SodB	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	9	27	0	0
SucB	+	++	++	++	-	++	+	-	++	-	-	-	-	-	-	21	64	0	0
SucC	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	7	21	0	0
SucD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	0	0
Tsf	-	-	++	++	-	-	++	++	++	++	-	-	-	-	-	9	27	0	0
Tuf	-	+	-	+	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	18	55	0	0
XthA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	0	0
YfeA	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	9	0	0
a	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	30	0	0
b	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	24	0	0
c	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	33	0	0
d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	9	0	0
e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	18	0	0
f	-	+	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	30	0	0
g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	9	0	0
h	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	18	0	0

a) Identifizierte Proteine auf der 2D-Proteomkarte und auf den 2D-Immunoblots sind entweder mit dem Proteinnamen oder alternativ mit der GI-Nummer entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomsequenz bezeichnet. Unidentifizierte Proteine auf den 2D-Immunoblots sind mit einem Buchstabenkürzel statt dem Proteinnamen bzw. der GI-Nummer gekennzeichnet.

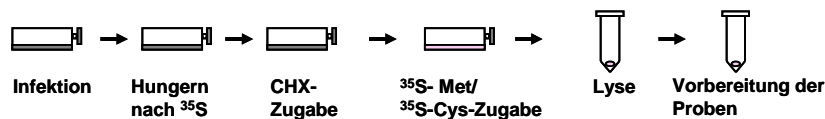
3.6 Untersuchung des im Infektionsverlauf mit Endothelzellen ³⁵S-radioaktiv markierten *B. henselae*-Proteoms mittels 2D-SDS-PAGE

Da Proteine direkt und unmittelbar an der Ausführung der meisten Funktionen der Zelle beteiligt sind, korreliert der aktuelle, physiologische Zustand einer Zelle zu einem definierten Zeitpunkt und unter definierten Bedingungen mit der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Proteine (z.B. Veränderung der Proteinexpression eines Proteins bzw. einer Gruppe von Proteinen) als Folge eines bestimmten Stimulus. Eine besondere Stärke der 2D-SDS-PAGE ist die Erfassung eben dieser qualitativen bzw. quantitativen Veränderung der Proteinzusammensetzung, auch Proteom-Signatur genannt, welche umfangreiche Einblicke in die Synthese- bzw. Degradationsrate und in die ko- bzw. posttranslationale Modifizierung in bestimmter Weise regulierter Proteine ermöglicht und folglich die Charakterisierung des zellulären, physiologischen Zustand erlaubt [108, 325].

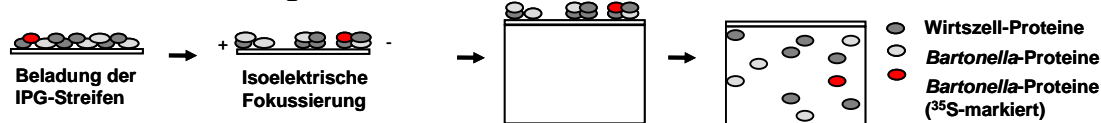
Um die Zusammensetzung des *B. henselae*-Proteoms im Infektionsverlauf mit Endothelzellen zu charakterisieren, wurden neu synthetisierte bakterielle *B. henselae*-Proteine in Kultur und ohne Kultur mit HUVECs ³⁵S-radioaktiv markiert und anschließend mittels 2D-SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.2.4-2.2.9). Die *B. henselae* ohne und in HUVEC-Zellkultur wurden in Cystein- und Methionin-freiem Kulturmedium auf die Proteinmarkierung vorbereitet, mit Cycloheximid die eukaryotische Proteinbiosynthese inhibiert, L-³⁵S-Cystein/ L-³⁵S-Methionin-Lösung zugegeben und nach Einbau der ³⁵S-radioaktiven Aminosäuren in das *B. henselae*-Proteom die Lyse der Bakterien und die Extraktion der ³⁵S-radioaktiven *B. henselae*-Proteine durchgeführt (siehe 2.2.5). Es wurden 30 µg (10⁶ cpm) ³⁵S-radioaktiver *B. henselae*-Proteinextrakt mittels 24 cm linearen IPG-Streifen 4 - 7 bzw. 6 - 9/ 15 % SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.2.7) und die resultierenden 2D-SDS-PAGE-Gele mit Silbernitratlösung (siehe 2.2.8.2) gefärbt. Die in verschiedene Proteinpunkte aufgetrennten ³⁵S-radioaktiven Proteine bzw. Proteinspezies von *B. henselae* wurden durch Exposition der getrockneten 2D-Gele auf Imaging Plates erfasst (siehe 2.2.8) und anschließend qualitativ und quantitativ mittels der Decodon Delta-2D 3.3 Software ausgewertet (siehe 2.2.9) (Abb. 20).

Die Analyse der Zusammensetzung des *B. henselae*-Proteoms mittels 2D-SDS-PAGE radioaktiv markierter Proteine bzw. Proteinspezies erfolgte in zwei Projekten mit der Decodon Delta-2D 3.3 Software: 2D-Gele im pH-Bereich 4 - 9/ MW 10 - 100 kDa (Delta-2D Projekt I) bzw. 2D-Gele im pH-Bereich 6 - 9/ MW 10 - 100 kDa (Delta-2D Projekt II) in jeweils zwei Gruppen (Zuständen), „*B. henselae* ohne HUVEC-Kultur“ (Gruppe I) und „*B. henselae* in HUVEC-Kultur“ (Gruppe II).

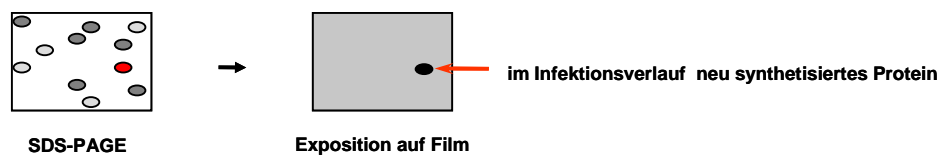
A. Infektion der HUVECs und Probenaufarbeitung



B. Proteintrennung mittels 2D-SDS-PAGE



C. Detektion des Proteinpunktes



D. Identifizierung des Proteinpunktes mittels MALDI-TOF-MS/MS



Abb. 20: Arbeitsschema für die ^{35}S -radioaktiven Markierungsexperimente von *B. henselae* Marseille ohne Kultur und in Kultur mit HUVECs. A) Es wurden *B. henselae* ohne und in HUVEC-Zellkultur in Cystein-, Methionin-freiem Kulturmedium auf die Proteinmarkierung vorbereitet, mit Cycloheximid die eukaryotische Proteinbiosynthese inhibiert, L- ^{35}S -Cystein/L- ^{35}S -Methionin-Lösung zugegeben und nach Einbau der ^{35}S -radioaktiven Aminosäuren in das *B. henselae*-Proteom die Lyse der Bakterien und die Extraktion der ^{35}S -radioaktiven *B. henselae*-Proteine durchgeführt (siehe 2.2.5). B) Die Trennung des ^{35}S -radioaktiven *B. henselae*-Proteinextraktes erfolgte mittels 24 cm linearen IPG-Streifen 4 - 7 bzw. 6 - 9/15 % SDS-PAGE (siehe 2.2.6). C) Die Proteinpunkte der ^{35}S -radioaktiven *B. henselae*-Proteine wurden durch Exposition der 2D-Gele auf Imaging Plates erfasst (siehe 2.2.8) und mittels Decodon Delta-2D 3.3 Software ausgewertet (siehe 2.2.9) D) Alle besonders signifikant, unterschiedlich intensiv auftretenden ^{35}S -radioaktiven *B. henselae*-Proteinpunkte werden als korrespondierende Proteinpunkte den entsprechenden Colloidal-Coomassie-Blau gefärbten 2D-SDS-PA-Gelen für eine MALDI-TOF-MS basierte Proteinidentifizierung entnommen (siehe 2.2.15).

Für jedes Projekt wurde als Referenzzustand das Punktmuster der Proteine bzw. Proteinspezies eines 2D-SDS-PA-Gels „*B. henselae* ohne HUVEC-Kultur“ definiert und letztlich jedes 2D-Gel eines Projektes mit dem 2D-Referenzgel abgeglichen. Zur qualitativen und quantitativen Analyse der Zusammensetzung des *B. henselae*-Proteoms beider Gruppen (*B. henselae* $-/+$ HUVECs) wurde ^{35}S -radioaktiver *B. henselae*-Proteinextrakt dreier biologischer Replikate mit mindestens jeweils zwei technischen Replikaten unabhängig voneinander mittels 2D-SDS-PAGE aufgetrennt. Die insgesamt 12 Abbildungen der analytischen 2D-SDS-PA-Gele radioaktiv markierter *B. henselae*-Proteine zweier Gruppen (*B. henselae* $-/+$ HUVECs) mit jeweils 6 Abbildungen wurden mittels Delta-2D übereinandergelegt und die Proteinpunkte detektiert und quantifiziert (siehe 2.2.9.3/4). Die daraus resultierende Überlagerungsdarstellung zeigt eindrucksvoll die Veränderungen des *B. henselae*-Proteoms, wenn den Proteinpunkten der jeweils sechs 2D-Gele von „*B. henselae* ohne HUVEC-Kultur“ eine grüne Farbgebung (Abb. 22, 25) und den Proteinpunkten der jeweils sechs 2D-Gele von „*B. henselae* in HUVEC-Kultur“ eine rote Farbgebung (Abb. 23, 26)

verliehen wird (Abb. 21, 24). Folglich entsteht bei einer qualitativen und quantitativen Übereinstimmung der entsprechenden, in Proteinpunkte aufgetrennten ^{35}S -radioaktiven Proteine bzw. Proteinspezies von *B. henselae* durch Farbaddition die Mischfarbe (gelb). Hingegen werden bei qualitativen als auch quantitativen Unterschieden zwischen den zwei Vergleichszuständen (*B. henselae* -/+ HUVECs) die Proteinpunkte farblich hervorgehoben (rot bzw. grün).

Das aus der Punktquantifizierung abgeleitete, errechnete, relative Volumen eines einzelnen Punktes in [Vol.-%] bezieht sich auf das Gesamtvolumen aller detektierten Punkte des jeweiligen, einzelnen 2D-Geles. Neben den Zahlenwerten wie Durchschnittswert in [Vol.-%], Medianwert in [Vol.-%] und Standardabweichung in [Vol.-%] der Punktvolumina der zwei Gruppen (*B. henselae* -/+HUVECs) konnten quantitative Unterschiede der Proteinpunkte als Säulendiagramm direkt dem Überlagerungsbild entnommen werden (Tab. 16, 17, 21, 22). Jeweils eine Anzahl von 40 im Punktvolumen zwischen den zwei zu vergleichenden Zuständen (*B. henselae* -/+ HUVECs) signifikant, differentiell intensiv auftretenden Proteinpunkten wurde für jedes der Delta-2D Projekte durch Anwendung bestimmter Filtereinstellungen mittels der Decodon Delta-2D 3.3 Software herausgelesen. Diese im Punktvolumen mindestens 1,5-fach unterschiedlich stark auftretenden Proteine stellen somit *B. henselae*-Proteine dar, die während des Infektionsverlaufes mit Endothelzellen möglicherweise als bakterielle Pathogenitätsfaktoren fungieren (Abb. 21, 24; Tab. 16, 17, 19, 22). Alle diese signifikant, unterschiedlich intensiv auftretenden *B. henselae*-Proteinpunkte sind mit einer zugewiesenen, verwendeten Proteinmarkierung und - falls identifiziert - mit der Proteinbezeichnung (Proteinname bzw. GI-Nummer) entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomdatenbank (NCBI, Zugangsnummer NC_005956) in den Überlagerungsdarstellungen der 2D-SDS-PA-Gele im Bereich von pI 4 - 7 bzw. 6 - 7 und MW 10 - 100 kDa der ^{35}S -radioaktiven Markierungsexperimente bezeichnet (Abb. 21, 24). Derart interessante, differentiell auftretende *B. henselae*-Proteinpunkte der ^{35}S -radioaktiven Markierungsexperimente wurden als korrespondierende Proteinpunkte entsprechenden, nicht-radioaktiven 2D-SDS-PA-Gelen für eine massenspektrometrische Proteinidentifizierung entnommen (siehe 2.2.15). Dazu wurden 400 μg bzw. 450 μg der extrahierten *B. henselae*-Proteine mittels 24 cm linearen IPG-Streifen 4 - 7 bzw. 6 - 9/ 15 % SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.2.7) und die resultierenden 2D-SDS-PA-Gele mit Colloidal-Coomassie-Blau gefärbt (siehe 2.2.8.1) (Abb. 27, 28). Diese in verschiedene Proteinpunkte aufgetrennten Proteine bzw. Proteinspezies von *B. henselae* wurden aus den 2D-SDS-PA-Gelen ausgeschnitten, einer tryptischen Proteolyse unterzogen und mittels MALDI-TOF-MS-Analyse identifiziert.

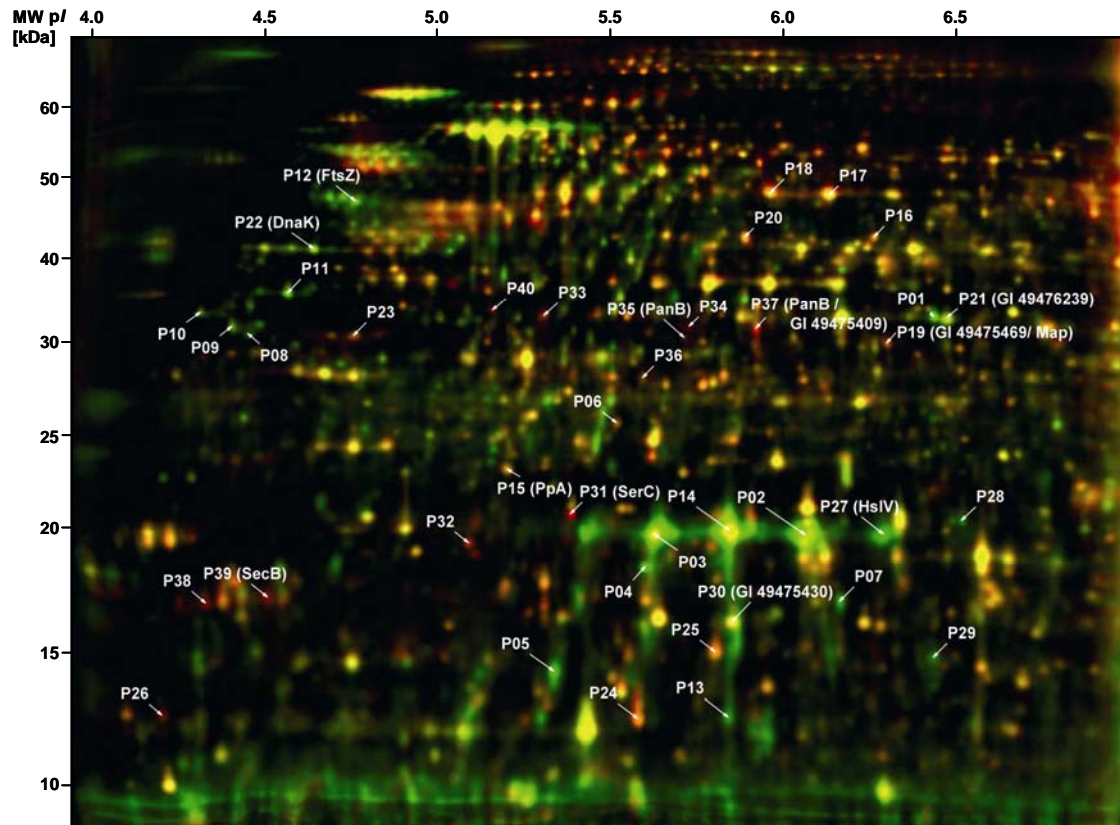


Abb. 21: Überlagerungsdarstellung von 2D-SDS-PA-Gelen im Bereich von pI 4 - 7 und MW 10 - 100 kDa der ^{35}S -radioaktiven Markierungsexperimente von *B. henselae* Marseille ohne Kultur - grüne Farbgebung - und in Kultur mit HUVECs - rote Farbgebung. Die Überlagerungsdarstellung besteht aus 12 überlagerten Abbildungen von 2D-SDS-PA-Gelen mit jeweils sechs 2D-Gelen von *B. henselae* ohne Kultur (grüne Farbgebung der Proteinpunkte) und in Kultur mit HUVECs (rote Farbgebung der Proteinpunkte) (Abb. 22, 23). Dabei repräsentieren die sechs 2D-Gele einer Gruppe drei unabhängig voneinander hergestellte biologische Replikate mit jeweils zwei technischen Replikaten der mittels 2D-SDS-PAGE aufgetrennten ^{35}S -radioaktiv markierten *B. henselae*-Proteine. Die Trennung der extrahierten ^{35}S -radioaktiv markierten *B. henselae*-Proteine erfolgte mittels 24 cm linearen IPG-Streifen 4 - 7/ 15 % SDS-PAGE, die Proteinpunkte wurden durch Exposition der Gele auf Imaging Plates erfasst und mittels Decodon Delta-2D 3.3 Software ausgewertet. Alle besonders signifikant und unterschiedlich intensiv auftretenden *B. henselae*-Proteinpunkte sind mit einer zugewiesenen, verwendeten Proteinmarkierung und - falls identifiziert - mit der Proteinbezeichnung (Proteinname bzw. GI-Nummer) entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomdatenbank (NCBI, Zugangsnummer NC_005956) bezeichnet.

Abb. 22, 23: Nächste Seiten - Überlagerungsdarstellung von sechs in Abb. 21 mit grüner Farbgebung (Abb. 22) bzw. roter Farbgebung (Abb. 23) der Proteinpunkte wiedergegebenen 2D-SDS-PA-Gelen im Bereich von pI 4 - 7 und MW 10 - 100 kDa der ^{35}S -radioaktiven Markierungsexperimente von *B. henselae* Marseille ohne Kultur (Abb. 22) bzw. in Kultur mit HUVECs (Abb. 23). Dabei repräsentieren die sechs 2D-Gele drei unabhängig voneinander hergestellte biologische Replikate mit jeweils zwei technischen Replikaten der mittels 2D-SDS-PAGE aufgetrennten ^{35}S -radioaktiv markierten *B. henselae*-Proteine. Die Trennung der extrahierten ^{35}S -radioaktiv markierten *B. henselae*-Proteine erfolgte mittels 24 cm linearen IPG-Streifen 4 - 7/ 15 % SDS-PAGE (Abb. 22, 23) und die Proteinpunkte wurden durch Exposition der Gele auf Imaging Plates erfasst. Alle besonders signifikant und unterschiedlich intensiv auftretenden *B. henselae*-Proteinpunkte sind mit einer zugewiesenen, verwendeten Proteinmarkierung bezeichnet und wurden den präparativen, Colloidal-Coomassie-Blau gefärbten 2D-SDS-PA-Gelen (Abb. 27) für eine MALDI-TOF-MS-basierte Proteinidentifizierung entnommen.

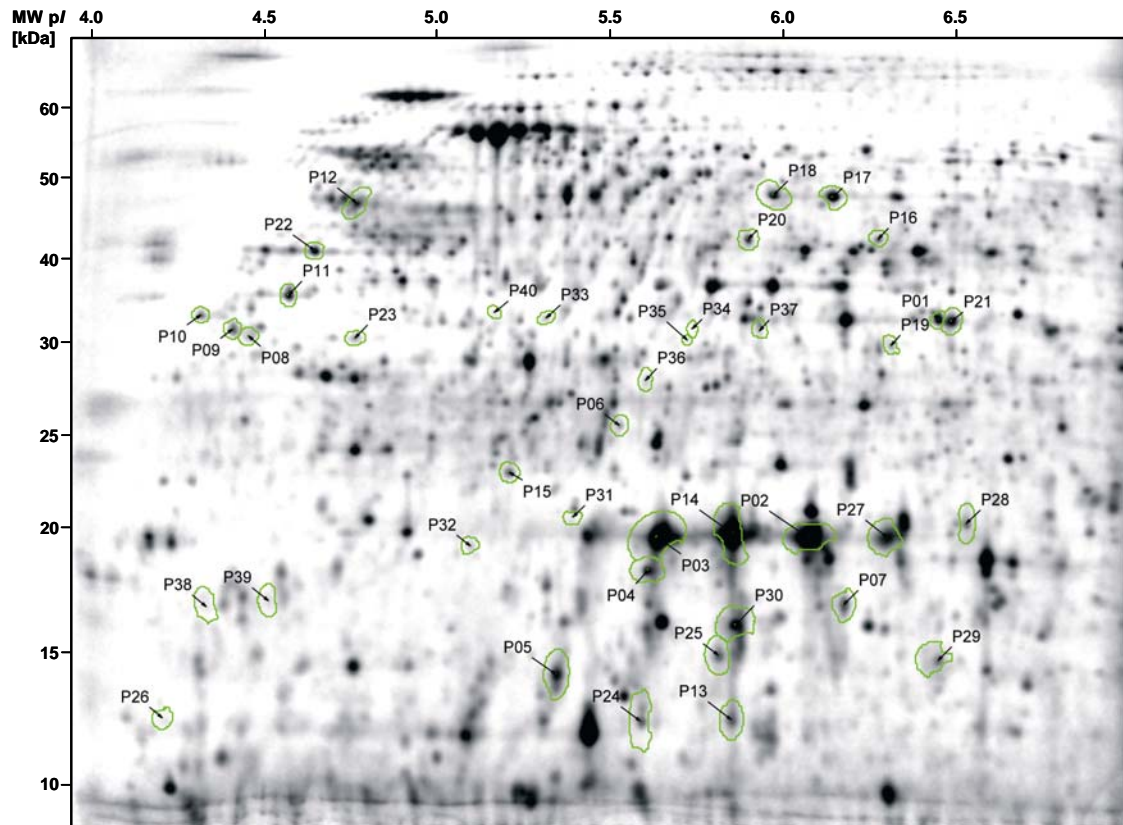


Abb. 22: Überlagerungsdarstellung von sechs in Abb. 21 mit grüner Farbgebung der Proteinpunkte wiedergegebenen 2D-SDS-PA-Gelen im Bereich von pI 4 - 7 und MW 10 - 100 kDa der ^{35}S -radioaktiven Markierungsexperimente von *B. henselae* Marseille ohne Kultur mit HUVECs.

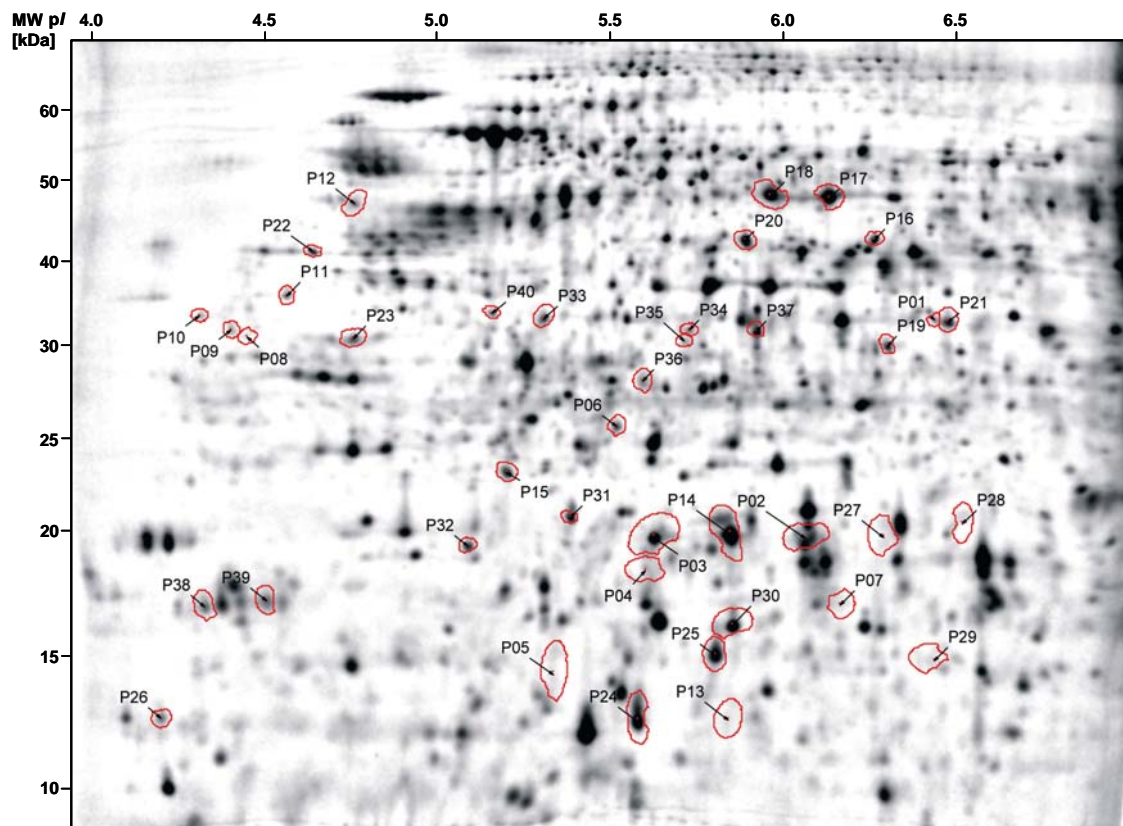
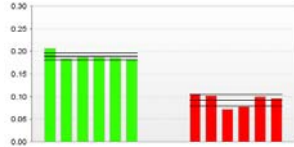
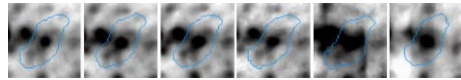
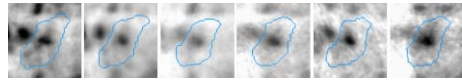
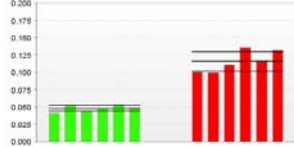
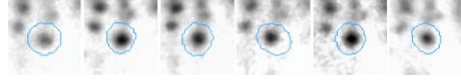
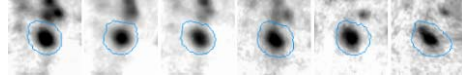
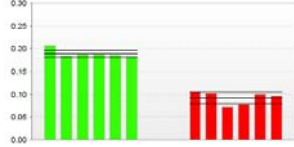
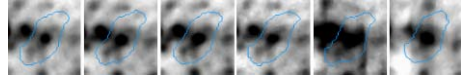
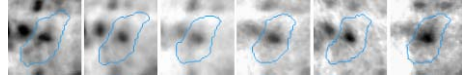
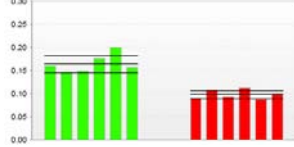
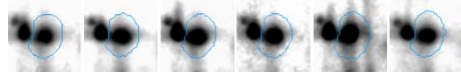
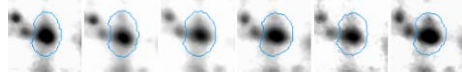
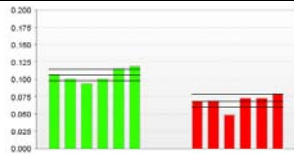
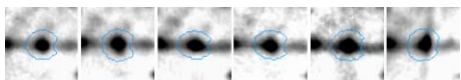
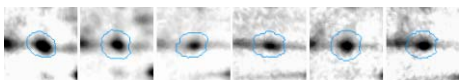
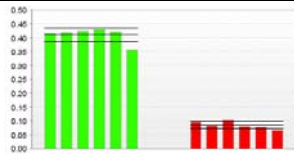
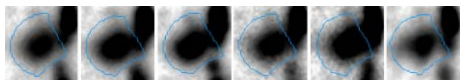
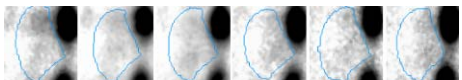
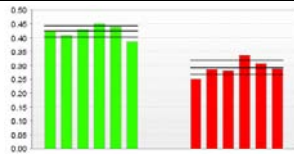
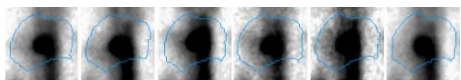
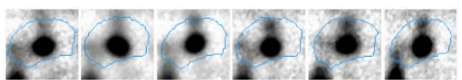
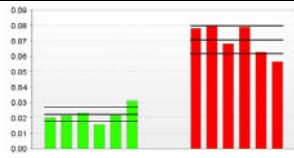
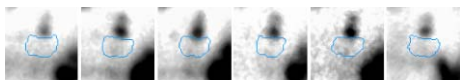
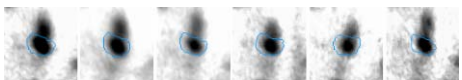

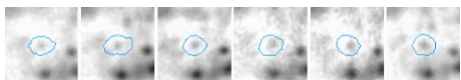
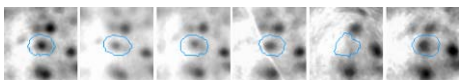
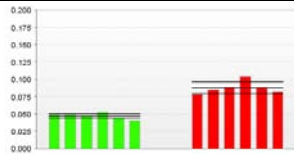
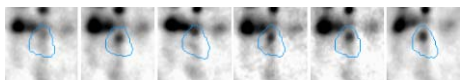
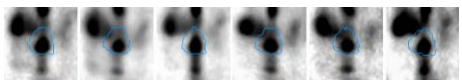
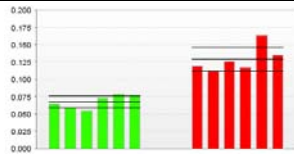
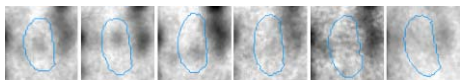
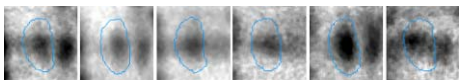


Abb. 23: Überlagerungsdarstellung von sechs in Abb. 21 mit roter Farbgebung der Proteinpunkte wiedergegebenen 2D-SDS-PA-Gelen im Bereich von pI 4 - 7 und MW 10 - 100 kDa der ^{35}S -radioaktiven Markierungsexperimente von *B. henselae* Marseille in Kultur mit HUVECs.

Tab. 16: Quantitative Informationen zu den identifizierten, besonders signifikant und unterschiedlich stark auf den 2D-SDS-PA-Gelen im Bereich von pI 4 - 7 und MW 10 - 100 kDa (Abb. 21, 22, 23) auftretenden *B. henselae*-Proteinpunkten der ^{35}S -radioaktiven Markierungsexperimente von *B. henselae* Marseille ohne Kultur - grüne Farbgebung - und in Kultur mit HUVECs. Dabei repräsentieren die sechs 2D-Gele einer Gruppe drei unabhängig voneinander hergestellte biologische Replikate mit jeweils zwei technischen Replikaten der mittels 2D-SDS-PAGE aufgetrennten ^{35}S -radioaktiven *B. henselae*-Proteine. Die quantitative Erfassung der Punktvolumina aller Proteinpunkte auf den 2D-Gelen erfolgte mittels der Decodon Delta-2D 3.3 Software und die ermittelten Punktvolumina beziehen sich auf das Gesamtvolumen der Punkte des jeweiligen 2D-SDS-PA-Geles.

P12: FtsZ	<i>B. henselae</i> – HUVECs (Gruppe 1)	<i>B. henselae</i> + HUVECs (Gruppe 2)
		
	Volumenverhältnis <i>B.h.</i> – HUVECs/ <i>B.h.</i> + HUVECs: 2.04604 T-Test: 0.001	
Durschnitt [Vol.-%]:	0.18751	0.09164
Medianwert [Vol.-%]:	0.18526	0.09756
Standardabweichung [Vol.-%]:	4.24220	0.48870
P15: PpA	<i>B. henselae</i> – HUVECs (Gruppe 1)	<i>B. henselae</i> + HUVECs (Gruppe 2)
		
	Volumenverhältnis <i>B.h.</i> – HUVECs/ <i>B.h.</i> + HUVECs: 0.41306 T-Test: 0.001	
Durschnitt [Vol.-%]:	0.04779	0.11570
Medianwert [Vol.-%]:	0.04839	0.11326
Standardabweichung [Vol.-%]:	8.81680	12.1444
P19: GI 49475469/ Map	<i>B. henselae</i> – HUVECs (Gruppe 1)	<i>B. henselae</i> + HUVECs (Gruppe 2)
		
	Volumenverhältnis <i>B.h.</i> – HUVECs/ <i>B.h.</i> + HUVECs: 0.54294 T-Test: 0.001	
Durschnitt [Vol.-%]:	0.03729	0.06867
Medianwert [Vol.-%]:	0.03927	0.06772
Standardabweichung [Vol.-%]:	16.82572	7.85768
P21: GI 49476239	<i>B. henselae</i> – HUVECs (Gruppe 1)	<i>B. henselae</i> + HUVECs (Gruppe 2)
		
	Volumenverhältnis <i>B.h.</i> – HUVECs/ <i>B.h.</i> + HUVECs: 1.68677 T-Test: 0.003	
Durschnitt [Vol.-%]:	0.16355	0.09696
Medianwert [Vol.-%]:	0.15736	0.09474
Standardabweichung [Vol.-%]:	11.35799	9.24325

P22: DnaK	<i>B. henselae</i> – HUVECs (Gruppe 1)	<i>B. henselae</i> + HUVECs (Gruppe 2)
		
	Volumenverhältnis <i>B.h.</i> – HUVECs/ <i>B.h.</i> + HUVECs: 1.54648 T-Test: 0.007	
Durschnitt [Vol.-%]:	0.10621	0.06868
Medianwert [Vol.-%]:	0.10402	0.07113
Standardabweichung [Vol.-%]:	8.22302	13.81169
P27: HslV	<i>B. henselae</i> – HUVECs (Gruppe 1)	<i>B. henselae</i> + HUVECs (Gruppe 2)
		
	Volumenverhältnis <i>B.h.</i> – HUVECs/ <i>B.h.</i> + HUVECs: 4.86429 T-Test: 0.001	
Durschnitt [Vol.-%]:	0.41029	0.08435
Medianwert [Vol.-%]:	0.41840	0.08082
Standardabweichung [Vol.-%]:	5.96134	14.85752
P30: GI 49475430	<i>B. henselae</i> – HUVECs (Gruppe 1)	<i>B. henselae</i> + HUVECs (Gruppe 2)
		
	Volumenverhältnis <i>B.h.</i> – HUVECs/ <i>B.h.</i> + HUVECs: 1.44394 T-Test: 0.001	
Durschnitt [Vol.-%]:	0.42215	0.29236
Medianwert [Vol.-%]:	0.42628	0.28825
Standardabweichung [Vol.-%]:	4.98411	8.92511
P31: SerC	<i>B. henselae</i> – HUVECs (Gruppe 1)	<i>B. henselae</i> + HUVECs (Gruppe 2)
		
	Volumenverhältnis <i>B.h.</i> – HUVECs/ <i>B.h.</i> + HUVECs: 0.31423 T-Test: 0.001	
Durschnitt [Vol.-%]:	0.02219	0.07061
Medianwert [Vol.-%]:	0.02177	0.07303
Standardabweichung [Vol.-%]:	20.95947	12.85931
P35: PanB	<i>B. henselae</i> – HUVECs (Gruppe 1)	<i>B. henselae</i> + HUVECs (Gruppe 2)
		
	Volumenverhältnis <i>B.h.</i> – HUVECs/ <i>B.h.</i> + HUVECs: 0.29588 T-Test: 0.005	
Durschnitt [Vol.-%]:	0.00789	0.02666
Medianwert [Vol.-%]:	0.00760	0.03043
Standardabweichung [Vol.-%]:	22.02514	29.02518

P37: PanB / GI 49475409	<i>B. henselae</i> – HUVECs (Gruppe 1)	<i>B. henselae</i> + HUVECs (Gruppe 2)
		
	Volumenverhältnis <i>B.h.</i> – HUVECs/ <i>B.h.</i> + HUVECs: 0.53434 T-Test: 0.001	
Durschnitt [Vol.-%]:	0.04675	0.08749
Medianwert [Vol.-%]:	0.04784	0.08576
Standardabweichung [Vol.-%]:	7.74053	9.41399
P39: SecB	<i>B. henselae</i> – HUVECs (Gruppe 1)	<i>B. henselae</i> + HUVECs (Gruppe 2)
		
	Volumenverhältnis <i>B.h.</i> – HUVECs/ <i>B.h.</i> + HUVECs: 0.52401 T-Test: 0.004	
Durschnitt [Vol.-%]:	0.06712	0.12809
Medianwert [Vol.-%]:	0.06830	0.12186
Standardabweichung [Vol.-%]:	13.41239	13.36335

Alle bei der Untersuchung des ^{35}S -radioaktiv markierten *B. henselae*-Proteoms zusätzlich zu der 2D-Proteomkarte von *B. henselae*, also nicht in Tab. 11 erfassten identifizierten Proteine sind in Tab. 18 mit der verwendeten Bezeichnung wie dem Proteinnamen bzw. ihrer GI-Nummer, der Proteinbeschreibung, der Zugangsnummer des Proteins (Accession Number), der Locusnummer des Gens auf dem *B. henselae*-Genom (Locus Tag) sowie der Anzahl der nachgewiesenen Proteinpunkte (Isoformen) aufgeführt. Ebenso sind das theoretische und empirische Molekulargewicht, der theoretische und empirische isoelektrische Punkt, der berechnete CAI- und GRAVY-Wert, der COG-Buchstabencode zur Zuordnung zur funktionellen Kategorie, die PSORTb-basierte Lokalisationsvorhersage und die SignalP-basierte Detektion eines N-terminalen Signalpeptides angegeben.

Nur wenn eine massenspektrometrische Identifizierung zweier identischer Proteinpunkte von zwei unabhängig voneinander erstellten 2D-Gelen übereinstimmende Ergebnisse erbrachte, galt das Protein als identifiziert (Tab. 19, 20). Aufgrund dieser stringenten Kriterien konnte eine eindeutige Proteinbezeichnung, also der abgekürzte Proteinnamen oder alternativ die GI-Nummer des kodierenden ORF nur zu einer Anzahl von 15 im Punktvolumen unterschiedlich intensiv auftretenden Proteinen zugewiesen werden (Abb. 21, 24, Tab. 18, 19, 20).

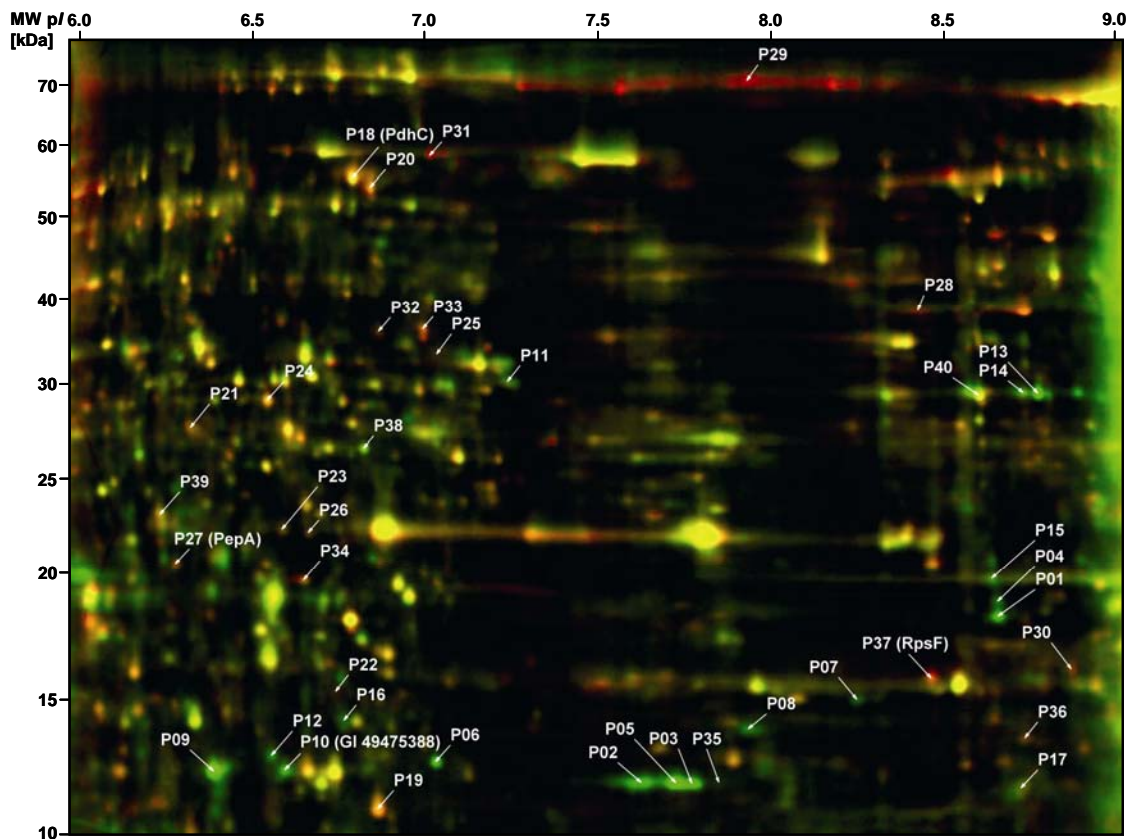


Abb. 24: Überlagerungsdarstellung von 2D-SDS-PA-Gelen im Bereich von pI 6 - 9 und MW 10 - 100 kDa der ^{35}S -radioaktiven Markierungsexperimente von *B. henselae* Marseille ohne Kultur - grüne Farbgebung - und in Kultur mit HUVECs - rote Farbgebung. Die Überlagerungsdarstellung besteht aus 12 überlagerten Abbildungen von 2D-SDS-PA-Gelen mit jeweils sechs 2D-Gelen von *B. henselae* ohne Kultur (grüne Farbgebung der Proteinpunkte) und in Kultur mit HUVECs (rote Farbgebung der Proteinpunkte) (Abb. 25, 26). Dabei repräsentieren die sechs 2D-Gele einer Gruppe drei unabhängig voneinander hergestellte biologische Replikate mit jeweils zwei technischen Replikaten der mittels 2D-SDS-PAGE aufgetrennten ^{35}S -radioaktiven *B. henselae*-Proteine. Die Trennung der extrahierten ^{35}S -radioaktiv markierten *B. henselae*-Proteine erfolgte mittels 24 cm linearen IPG-Streifen 6 - 9/ 15 % SDS-PAGE, die Proteinpunkte wurden durch Exposition der Gele auf Imaging Plates erfasst und mittels Decodon Delta-2D 3.3 Software ausgewertet. Alle besonders signifikant und unterschiedlich intensiv auftretenden *B. henselae*-Proteinpunkte sind mit einer zugewiesenen, verwendeten Proteinmarkierung und - falls identifiziert - mit der Proteinbezeichnung (Proteinname bzw. GI-Nummer) entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomdatenbank (NCBI, Zugangsnummer NC_005956) bezeichnet.

Abb. 25, 26: Nächste Seiten - Überlagerungsdarstellung von sechs in Abb. 24 mit grüner Farbgebung (Abb. 25) bzw. roter Farbgebung (Abb. 26) der Proteinpunkte wiedergegebenen 2D-SDS-PA-Gelen im Bereich von pI 6 - 9 und MW 10 - 100 kDa der ^{35}S -radioaktiven Markierungsexperimente von *B. henselae* Marseille ohne Kultur (Abb. 25) bzw. in Kultur mit HUVECs (Abb. 26). Dabei repräsentieren die sechs 2D-Gele drei unabhängig voneinander hergestellte biologische Replikate mit jeweils zwei technischen Replikaten der mittels 2D-SDS-PAGE aufgetrennten ^{35}S -radioaktiven *B. henselae*-Proteine. Die Trennung des ^{35}S -radioaktiven *B. henselae*-Proteinextraktes erfolgte mittels 24 cm linearen IPG-Streifen 6 - 9/ 15 % SDS-PAGE (Abb. 25, 26) und die Proteinpunkte wurden durch Exposition der Gele auf Imaging Plates erfasst. Alle besonders signifikant und unterschiedlich intensiv auftretenden *B. henselae*-Proteinpunkte sind mit einer zugewiesenen, verwendeten Proteinmarkierung bezeichnet und wurden den präparativen, Colloidal-Coomassie-Blau gefärbten 2D-SDS-PA-Gelen (Abb. 28) für eine MALDI-TOF-MS-basierte Proteinidentifizierung entnommen.

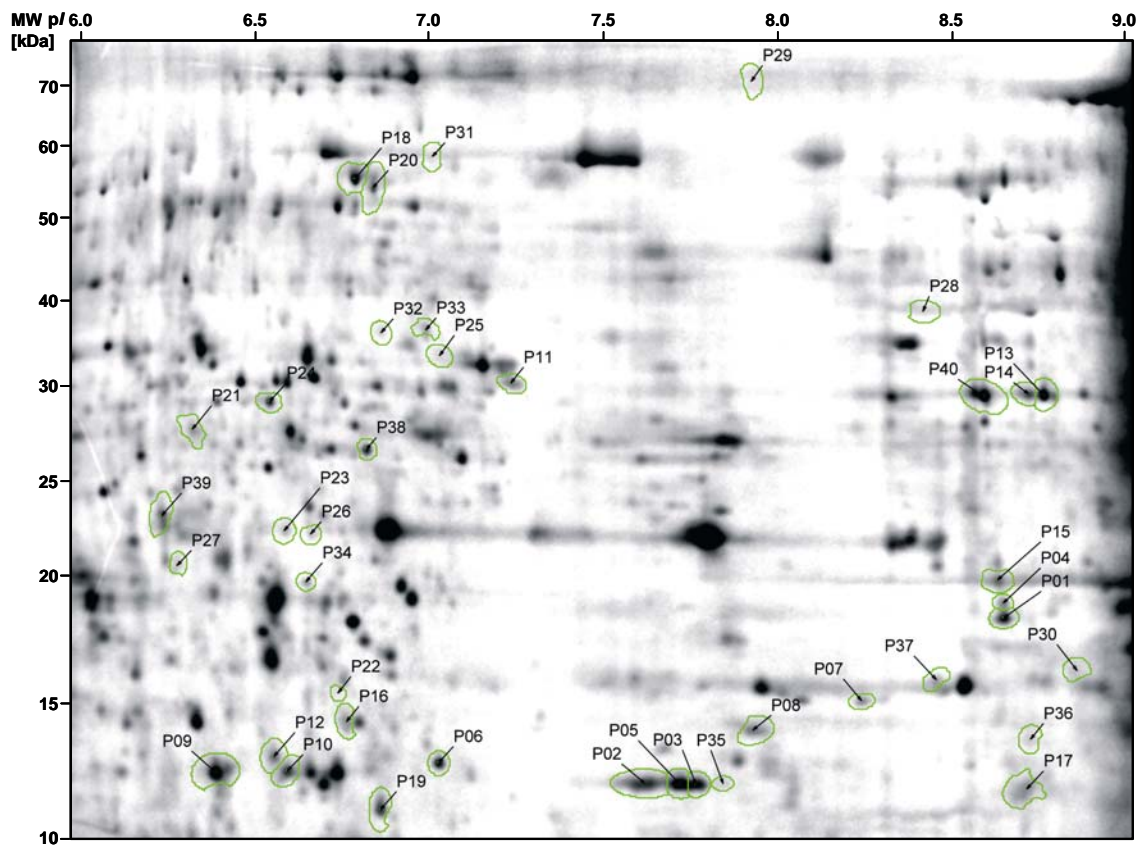


Abb. 25: Überlagerungsdarstellung von sechs in Abb. 24 mit grüner Farbgebung der Proteinpunkte wiedergegebenen 2D-SDS-PA-Gelen im Bereich von pI 6 - 9 und MW 10 - 100 kDa der ^{35}S -radioaktiven Markierungsexperimente von *B. henselae* Marseille ohne Kultur mit HUVECs.

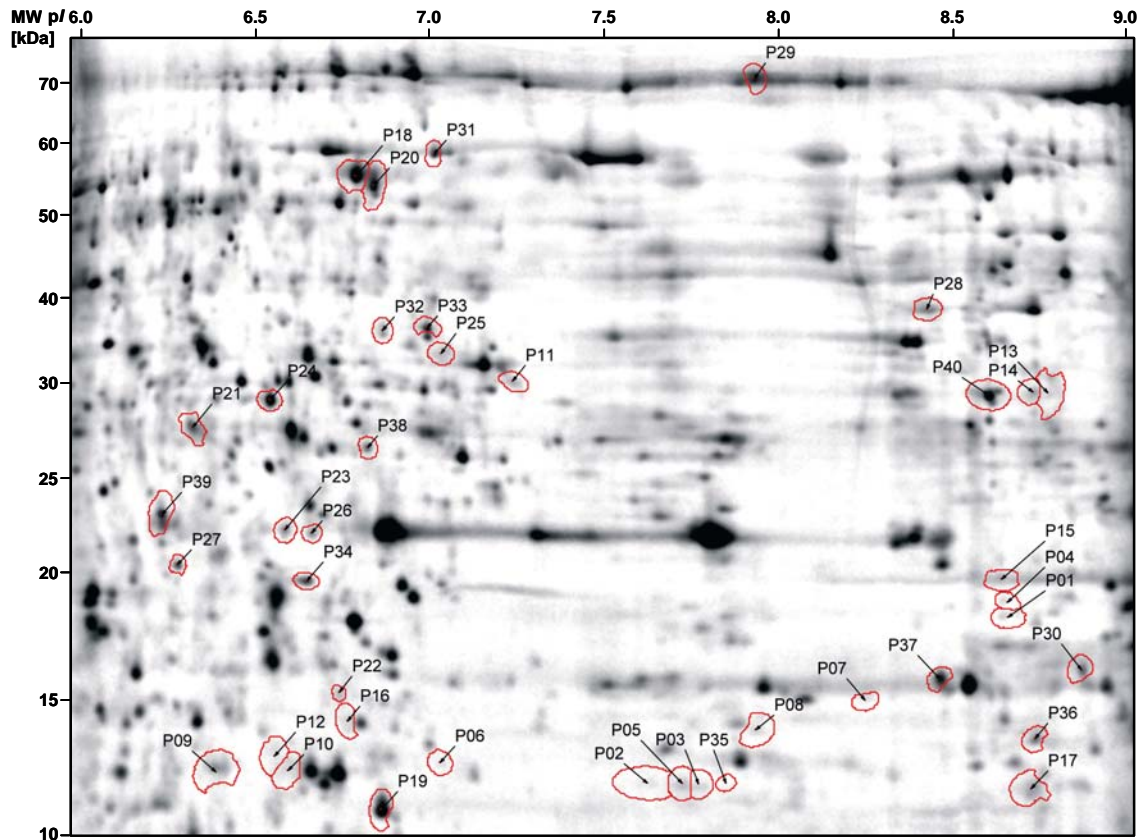
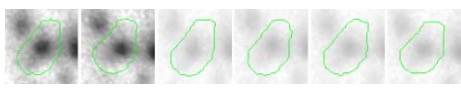
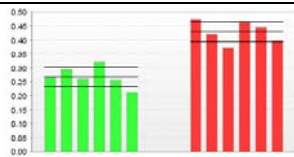
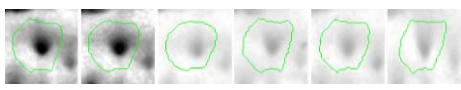
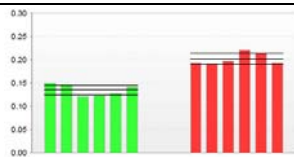


Abb. 26: Überlagerungsdarstellung von sechs in Abb. 24 mit roter Farbgebung der Proteinpunkte wiedergegebenen 2D-SDS-PA-Gelen im Bereich von pI 6 - 9 und MW 10 - 100 kDa der ^{35}S -radioaktiven Markierungsexperimente von *B. henselae* Marseille in Kultur mit HUVECs.

Tab. 17: Quantitative Informationen zu den identifizierten, besonders signifikant und unterschiedlich stark auf den 2D-SDS-PA-Gelen im Bereich von pI 6 - 9 und MW 10 - 100 kDa (Abb. 25, 26, 27) auftretenden *B. henselae*-Proteinpunkten der ^{35}S -radioaktiven Markierungsexperimente von *B. henselae* Marseille ohne Kultur - grüne Farbgebung - und in Kultur mit HUVECs. Dabei repräsentieren die sechs 2D-Gele einer Gruppe drei unabhängig voneinander hergestellte biologische Replikate mit jeweils zwei technischen Replikaten der mittels 2D-SDS-PAGE aufgetrennten ^{35}S -radioaktiven *B. henselae*-Proteine. Die quantitative Erfassung der Punktvolumina aller Proteinpunkte auf den 2D-Gelen erfolgte mittels der Decodon Delta-2D 3.3 Software und die ermittelten Punktvolumina beziehen sich auf das Gesamtvolumen der Punkte des jeweiligen 2D-SDS-PA-Geles.

P10: GI 49475388	<i>B. henselae</i> – HUVECs (Gruppe 1)	<i>B. henselae</i> + HUVECs (Gruppe 2)
		
	Volumenverhältnis <i>B.h.</i> – HUVECs/ <i>B.h.</i> + HUVECs: 2.06041 T-Test: 0.001	
Durschnitt [Vol.-%]:	0.23459	0.11386
Medianwert [Vol.-%]:	0.24012	0.11302
Standardabweichung [Vol.-%]:	4.27892	4.32155
P18: PdhC	<i>B. henselae</i> – HUVECs (Gruppe 1)	<i>B. henselae</i> + HUVECs (Gruppe 2)
		
	Volumenverhältnis <i>B.h.</i> – HUVECs/ <i>B.h.</i> + HUVECs: 0.62450 T-Test: 0.003	
Durschnitt [Vol.-%]:	0.26799	0.42912
Medianwert [Vol.-%]:	0.26245	0.43269
Standardabweichung [Vol.-%]:	12.85817	8.36780
P27: PepA	<i>B. henselae</i> – HUVECs (Gruppe 1)	<i>B. henselae</i> + HUVECs (Gruppe 2)
		
	Volumenverhältnis <i>B.h.</i> – HUVECs/ <i>B.h.</i> + HUVECs: 0.51550 T-Test: 0.001	
Durschnitt [Vol.-%]:	0.03865	0.07497
Medianwert [Vol.-%]:	0.03793	0.07541
Standardabweichung [Vol.-%]:	22.10562	7.51363
P37: RpsF	<i>B. henselae</i> – HUVECs (Gruppe 1)	<i>B. henselae</i> + HUVECs (Gruppe 2)
		
	Volumenverhältnis <i>B.h.</i> – HUVECs/ <i>B.h.</i> + HUVECs: 0.66504 T-Test: 0.001	
Durschnitt [Vol.-%]:	0.13390	0.20134
Medianwert [Vol.-%]:	0.13336	0.19490
Standardabweichung [Vol.-%]:	8.28995	5.78534

Dabei enthielten auf den 2D-SDS-PA-Gelen im Bereich von pI 4 - 7 und MW 10 - 100 kDa nachweislich zwei dieser Proteinpunkte jeweils zwei verschiedene Proteine, z.B. Proteinpunkt P19 (GI 49475469/ Map), Proteinpunkt P37 (PanB/ GI 49475409). Insgesamt konnten 16 verschiedene, im Infektionsverlauf von *B. henselae* potentiell regulierte Proteine identifiziert werden (Tab. 16, 17). Diese Proteine stehen somit im Zusammenhang mit der physiologischen und pathogenetischen Adaptation von *B. henselae* während des Infektionsverlaufs mit Endothelzellen (HUVECs) und stellen möglicherweise *B. henselae*-Pathogenitätsfaktoren dar. Zusammenfassend weisen folgende Proteine ein verstärktes Punktvolumen auf den 2D-SDS-PA-Gelen des ³⁵S-radioaktiv markierten *B. henselae*-Proteoms im Infektionsverlauf mit HUVECs auf:

- PpA (YP_033023) Anorganische Pyrophosphatase (P15; Abb. 21)
- SerC (YP_033219) Phosphoserin-Aminotransferase (P31; Abb. 21)
- PanB (YP_033349) 3-Methyl-2-Oxobutanoat-Hydroxymethyltransferase (P35,P37; Abb. 21)
- GI 49475409 (YP_033450) Hypothetisches Protein BH06210 (P37; Abb. 21)
- SecB (YP_032963) Proteinexport-Protein SecB (P39; Abb. 21)
- PdhC (YP_033411) Dihydrolipoamid-Acyltransferase/ 2-Oxosäure-Dehydrogenase - E2-Komponente (P18; Abb. 24)
- PepA (YP_033057) Leucyl-Aminopeptidase (P27; Abb. 24)
- RpsF (YP_033367) 30S ribosomales Protein S6 (P37; Abb. 24)

Folgende Proteine weisen ein vermindertes Punktvolumen auf den 2D-SDS-PA-Gelen des ³⁵S-radioaktiv markierten *B. henselae*-Proteoms im Infektionsverlauf mit HUVECs auf:

- FtsZ (YP_033890) Zellteilungsprotein ftsZ (P12; Abb. 21)
- GI 49475469 (YP_033510) Phagen-verwandtes Protein (P19; Abb. 21)
- Map (YP_033641) Methionin-Aminopeptidase (P19; Abb. 21)
- GI 49476239 (YP_034280) SapC-verwandtes Protein (P21; Abb. 21)
- DnaK (YP_032930) Hitzeschockprotein-70 DnaK (P22; Abb. 21)
- HslV (YP_033060) ATP-abhängige Protease-Untereinheit HslV (P27; Abb. 21)
- GI 49475430 (YP_033471) Hypothetisches Protein BH06420 (P30; Abb. 21)
- GI 49475388 (YP_033429) Hypothetisches Protein BH05970 (P10; Abb. 24)

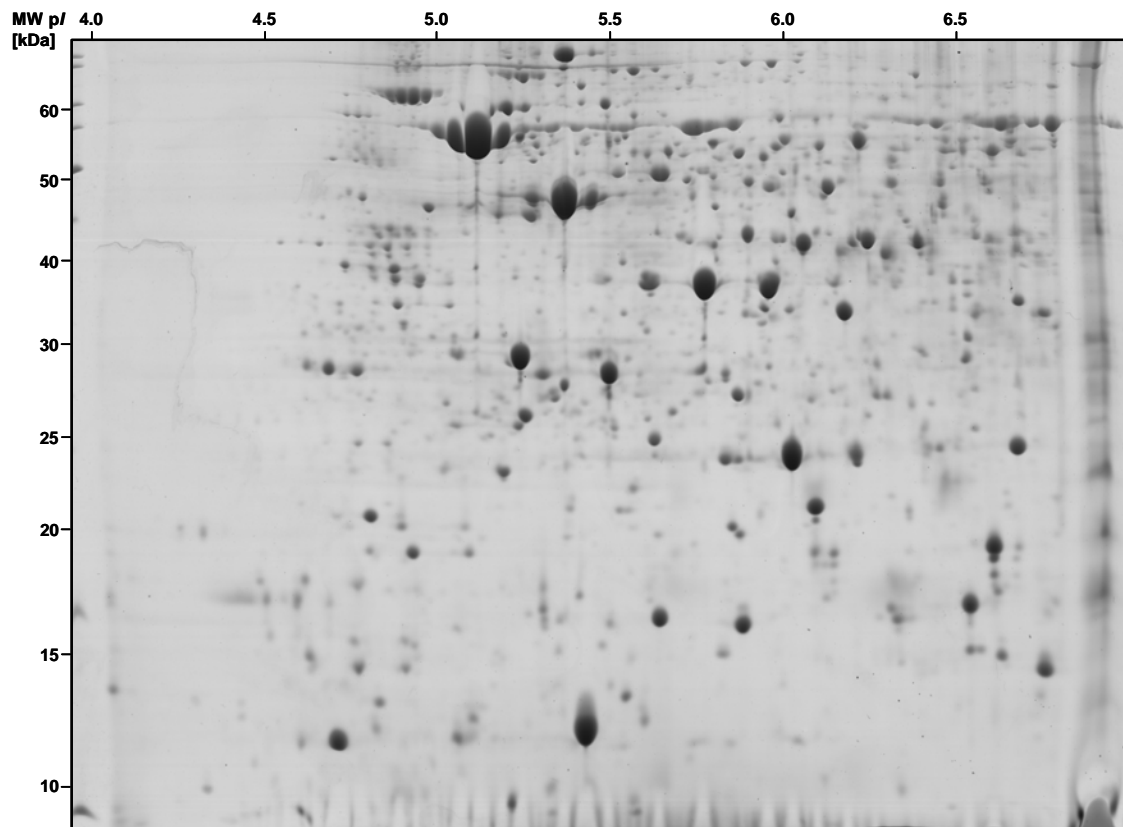


Abb. 27: Repräsentatives, präparatives, Colloidal-Coomassie-Blau gefärbtes 2D-SDS-PA-Gel der extrahierten Proteine von *B. henselae* Marseille. Die Trennung der Proteine erfolgte mittels 24 cm linearen IPG-Streifen 4 - 7/ 15 % SDS-PAGE.

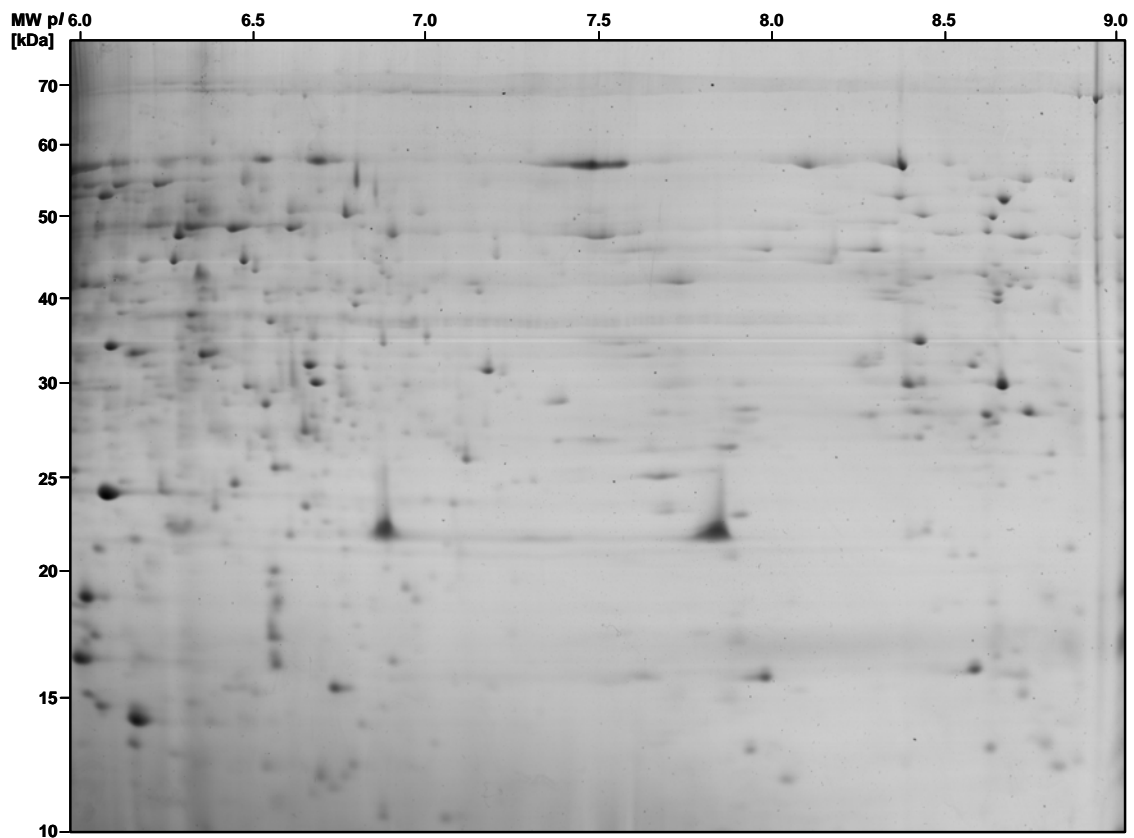


Abb. 28: Repräsentatives, präparatives, Colloidal-Coomassie-Blau gefärbtes 2D-SDS-PA-Gel der extrahierten Proteine von *B. henselae* Marseille. Die Trennung der Proteine erfolgte mittels 24 cm linearen IPG-Streifen 6 - 9/ 15 % SDS-PAGE.

Tab. 18: Zu den Proteinen der 2D-Proteomkarte zusätzlich identifizierte *B. henselae*-Proteine mit der zugewiesenen, verwendeten Proteinbezeichnung (Proteinname bzw. GI-Nummer) auf den Überlagerungsdarstellungen der 2D-SDS-PA-Gele der ³⁵S-radioaktiven Markierungsexperimente im Bereich von pI 4 - 7 bzw. 6 - 9 und MW 10 - 100 kDa (siehe Abb. 21, 24). Die annotierten, nicht in Tab. 11 erfassten Proteine sind mit der Zugangsnummer des Proteins (Accession Number), der Lokusnummer des Gens auf dem *B. henselae*-Genom (Locus Tag), der Proteinbeschreibung und der Anzahl der nachgewiesenen Proteinpunkte (Isoformen) aufgeführt. Ebenso sind das theoretische und empirische Molekulargewicht, der theoretische und empirische isoelektrische Punkt, die SignalP-basierte Detektion eines N-terminalen Signalpeptides, der berechnete CAI- und GRAVY-Wert, der COG-Buchstabencode zur Zuordnung zur funktionellen Kategorie und die PSORTb-basierte Lokalisationsvorhersage angegeben.

Protein-bezeichnung ^{a)}	Zugangs-nummer ^{b)}	Lokus-nummer ^{c)}	Proteinbeschreibung	Anzahl der Punkte	Empir. Best. MW [kDa]/pI ^{d)}	Theoret. Best. MW [kDa]/pI	SignalP Signal Peptid ^{e)}	SignalP-Wahrscheinlichkeit ^{f)}	PSORTb-Lokalisation ^{g)}	PSORTb-Wahrscheinlichkeit ^{h)}	COGs ⁱ⁾	CAI ^{j)}	GRAVY ^{k)}
49475388	YP_033429.1	BH05970	Hypothetisches Protein BH05970	1	13.2/6.6	15.84 7.66	J	0.664	UNK	2.00	S	0.6	0.046
49475430	YP_033471.1	BH06420	Hypothetisches Protein BH06420	1	17.2/5.3	20.62 6.43	J	0.940	UNK	2.00	S	0.6	-0.166
49475469	YP_033510.1	BH06860	Phagen-verwandtes Protein	1	30.0/6.3	29.12 5.80	N	0.000	UNK	2.00	D	0.4	-0.557
Map	YP_033641.1	BH08350	Methionin-Aminopeptidase	1	30.0/6.3	30.79 5.99	N	0.000	UNK	2.00	J	0.5	-0.202
PanB	YP_033349.1	BH05130	3-Methyl-2-Oxobutanoat-Hydroxymethyltransferase	2	30.1/5.7	29.96 5.89	N	0.000	UNK	2.00	H	0.6	-0.015
PepA	YP_033057.1	BH02040	Leucyl-Aminopeptidase	1	21.2/6.3	50.22 6.31	N	0.001	UNK	2.00	E	0.5	-0.106
SecB	YP_032963.1	BH01020	Proteinexport-Protein SecB	1	16.8/4.5	17.70 4.59	N	0.000	UNK	2.00	U	0.5	-0.224

- a) Identifizierte Proteine auf der 2D-Proteomkarte und auf den 2D-Immunoblots sind entweder mit dem Proteinnamen oder alternativ mit der GI-Nummer entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomsequenz bezeichnet.
- b) Die Zugangsnummern der Proteine sind entsprechend der NCBI *B. henselae* Houston-1 Genomsequenz (NC_005956) angegeben. Für Details siehe NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/key.html#accessions>.
- c) Die Lokusnummern des Gens sind entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomsequenz (NC_005956) angegeben.
- d) Empirische MW- und pI-Werte wurden mittels der Decodon Delta-2D 3.3 Software bestimmt.
- e) Die Zuweisung eines Signalpeptides zu den Proteinen erfolgte mittels SignalP-HMM (Hidden Markov Model); N - kein Signalpeptid / J - Signalpeptid.
- f) Die Wahrscheinlichkeit der Signalpeptidvorhersage von SignalP (0 bis 1).
- g) Die Zuweisung der zellulären Lokalisation zu den Proteinen erfolgte mittels PSORTb. Die Abkürzungen geben die Lokalisation wieder: (CYT: Zytosol, CM: zytosolische Membran, PP: periplasmatischer Raum, OM: Außenmembran, UNK: unbekannte Lokalisation, UNK-ML: unbekannte Lokalisation mit potentiell multiplen Lokalisationsmöglichkeiten).
- h) Die Wahrscheinlichkeit der Lokalisationsvorhersage von PSORTb (0 bis 10).
- i) COG-Kategorie der Proteine (*Cluster of orthologous groups*). Weitere Details sowie alle *B. henselae*-Proteine nach COG-Kategorie katalogisiert. Siehe NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/coxik.cgi?gi=409>.
- j) Bewertung der Expressionshäufigkeit der Proteine anhand des CAI-Wertes (*Codon adaptation index*).
- k) Bewertung der Hydropathie der Proteine anhand des GRAVY-Wertes (*Grand average of hydropathy*).

Tab. 19: Zu den Proteinen der 2D-Proteomkarte zusätzlich identifizierte *B. henselae*-Proteine mit der zugewiesenen, verwendeten Proteinmarkierung und Proteinbezeichnung (Proteinname bzw. GI-Nummer) auf den Überlagerungsdarstellungen der 2D-SDS-PA-Gele der ³⁵S-radioaktiven Markierungsexperimente im Bereich von pI 4 - 7 und MW 10 - 100 kDa (Abb. 17). Die annotierten Proteine sind mit der Zugangsnummer des Proteins (Accession Number), der Lokusnummer des Gens auf dem *B. henselae*-Genom (Locus Tag), der Proteinbeschreibung, dem theoretischen Molekulargewicht und dem theoretischen isoelektrischen Punkt aufgeführt. Darüber hinaus sind detaillierte Informationen der als Zweifachbestimmung durchgeführten MALDI-TOF-MS basierten Proteinidentifizierung wie Rangstelle der Proteinbestimmung (Identification Rank), Bewertungsnote der Proteinbestimmung (Mascot Score), Sequenzabdeckung der Proteinbestimmung sowie Anzahl der gemessenen und identifizierten Peptide angegeben.

Protein- markierung ^{a)}	Protein- bezeichnung ^{a)}	Rang ^{b)}	Zugangs- nummer ^{c)}	Lokus- nummer ^{d)}	Proteinbeschreibung	Theoret. best. MW [kDa]/pI	Mascot- Score ^{e)}	Sequenz- abdeckung ^{f)}	Anzahl der Peptide ^{g)}	Mascot- Score ^{e)}	Sequenz- abdeckung ^{f)}	Anzahl der Peptide ^{h)}
P12	FtsZ	1	YP_033890.1	BH11180	Zellteilungsprotein ftsZ	62.314 5.25	604	34 %	18	606	32 %	17
P15	Ppa	1	YP_033023.1	BH01690	Anorganische Pyrophosphatase	20.015 5.13	161	35 %	8	129	35 %	7
P19	49475469	1	YP_033510.1	BH06860	Phagen-verwandtes Protein	29.123 5.80	314	49 %	11	322	54 %	11
	Map	2	YP_033641.1	BH08350	Methionin-Aminopeptidase	30.787 5.99	139	26 %	7	132	27 %	7
P21	49476239		YP_034280.1	BH15840	SapC-verwandtes Protein	31.189 6.51	48	25 %	8	49	25 %	8
P22	DnaK	1	YP_032930.1	BH00650	Hitzeschockprotein-70 DnaK	68.219 4.93	407	22 %	11	291	24 %	12
P27	HslV	1	YP_033060.1	BH02070	ATP-abh. Protease-Untereinheit HslV	20.894 6.17	253	38 %	8	291	53 %	7
P30	49475430	1	YP_033471.1	BH06420	Hypothetisches Protein BH06420	20.617 6.43	276	35 %	6	410	33 %	6
P31	SerC	1	YP_033219.1	BH03780	Phosphoserin-Aminotransferase	43.170 4.97	202	9 %	6	239	13 %	7
P35	PanB	1	YP_033349.1	BH05130	3-Methyl-2-Oxobutanoat- Hydroxymethyltransferase	29.956 5.89	206	46 %	10	229	46 %	10
P37	PanB	1	YP_033349.1	BH05130	3-Methyl-2-Oxobutanoat- Hydroxymethyltransferase	29.956 5.89	275	47 %	13	251	47 %	13
	49475409	2	YP_033450.1	BH06210	Hypothetisches Protein BH06210	31.253 5.82	130	30 %	6	87	15 %	3
P39	SecB	1	YP_032963.1	BH01020	Proteinexport-Protein SecB	17.700 4.59	120	45 %	4	269	45 %	4

- a) Identifizierte Proteine auf der 2D-Proteomkarte und auf den 2D-Immunoblots sind entweder mit dem Proteinnamen oder alternativ mit der GI-Nummer entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomsequenz bezeichnet.
- b) Der Rang kennzeichnet die Rangstelle der Proteinbestimmung (Identification Rank). Für Details siehe Matrix Science: <http://www.matrixscience.com>.
- c) Die Zugangsnummern der Proteine sind entsprechend der NCBI *B. henselae* Houston-1 Genomsequenz (NC_005956) angegeben. Für Details siehe NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/key.html#accessions>.
- d) Die Lokusnummern des Gens sind entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomsequenz (NC_005956) angegeben.
- e) Der Mascot-Score verweist auf die Qualität der Proteinidentifizierung (Mascot Score > 44 / p<0,05). Für Details siehe Matrix Science: <http://www.matrixscience.com>.
- f) Die Sequenzabdeckung und die Anzahl der identifizierten Peptide spiegeln ebenfalls die Qualität der Proteinidentifizierung wider. Für Details siehe Matrix Science: <http://www.matrixscience.com>.

Tab. 20: Zu den Proteinen der 2D-Proteomkarte zusätzlich identifizierte *B. henselae*-Proteine mit der zugewiesenen, verwendeten Proteinmarkierung und Proteinbezeichnung (Proteinname bzw. GI-Nummer) auf den Überlagerungsdarstellungen der 2D-SDS-PA-Gele der ³⁵S-radioaktiven Markierungsexperimente im Bereich von pI 6 - 9 und MW 10 - 100 kDa (Abb. 18). Die annotierten Proteine sind mit der Zugangsnummer des Proteins (Accession Number), der Lokusnummer des Gens auf dem *B. henselae*-Genom (Locus Tag), der Proteinbeschreibung, dem theoretischen Molekulargewicht und dem theoretischen isoelektrischen Punkt aufgeführt. Darüber hinaus sind detaillierte Informationen der als Zweifachbestimmung durchgeführten MALDI-TOF-MS basierten Proteinidentifizierung wie Rangstelle der Proteinbestimmung (Identification Rank), Bewertungsnote der Proteinbestimmung (Mascot Score), Sequenzabdeckung der Proteinbestimmung sowie Anzahl der gemessenen und identifizierten Peptide angegeben.

Protein- markierung ^{a)}	Protein- bezeichnung ^{a)}	Rang ^{b)}	Zugangs- nummer ^{c)}	Lokus- nummer ^{d)}	Proteinbeschreibung	Theoret. best. MW [kDa]/pI	Mascot- Score ^{e)}	Sequenz- abdeckung ^{f)}	Anzahl der Peptide ^{g)}	Mascot- Score ^{e)}	Sequenz- abdeckung ^{f)}	Anzahl der Peptide ^{h)}
P10	49475388	1	YP_033429.1	BH05970	Hypothetisches Protein BH05970	15.836 7.66	101	15 %	2	199	26 %	3
P18	PdhC	1	YP_033411.1	BH05770	Dihydrolipoamid-Acetyltransferase	47.755 7.16	120	25 %	10	127	27 %	11
P27	PepA	1	YP_033057.1	BH02040	Leucyl-Aminopeptidase	50.216 6.31	161	18 %	8	184	11 %	4
P37	RpsF	1	YP_033367.1	BH05320	30S ribosomales Protein s6	15.838 8.86	223	68 %	10	253	69 %	12

- a) Identifizierte Proteine auf der 2D-Proteomkarte und auf den 2D-Immunoblots sind entweder mit dem Proteinnamen oder alternativ mit der GI-Nummer entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomsequenz bezeichnet.
- b) Der Rang kennzeichnet die Rangstelle der Proteinbestimmung (Identification Rank). Für Details siehe Matrix Science: <http://www.matrixscience.com>.
- c) Die Zugangsnummern der Proteine sind entsprechend der NCBI *B. henselae* Houston-1 Genomsequenz (NC_005956) angegeben. Für Details siehe NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/key.html#accessions>.
- d) Die Lokusnummern des Gens sind entsprechend der *B. henselae* Houston-1 Genomsequenz (NC_005956) angegeben.
- e) Der Mascot-Score verweist auf die Qualität der Proteinidentifizierung (Mascot Score > 44 / p<0,05). Für Details siehe Matrix Science: <http://www.matrixscience.com>.
- f) Die Sequenzabdeckung und die Anzahl der identifizierten Peptide spiegeln ebenfalls die Qualität der Proteinidentifizierung wider. Für Details siehe Matrix Science: <http://www.matrixscience.com>.

Tab. 21: Quantitative Informationen zu besonders signifikant und unterschiedlich stark auf den 2D-SDS-PA-Gelen im Bereich von *pI* 4 - 7 und MW 10 - 100 kDa (Abb. 21, 22, 23) auftretenden *B. henselae*-Proteinpunkten der ³⁵S-radioaktiven Markierungsexperimente von *B. henselae* Marseille ohne Kultur und in Kultur mit HUVECs. Die quantitative Erfassung und statistische Auswertung der Punktvolumina aller Proteinpunkte auf den 2D-Gelen der drei biologischen Replikate mit jeweils zwei technischen Replikaten erfolgte mittels der Decodon Delta-2D 3.3 Software und die ermittelten Punktvolumina beziehen sich auf das Gesamtvolumen der Punkte des jeweiligen 2D-SDS-PA-Geles. Der Regulationsfaktor der Medianwerte der Punktvolumina der aufgeführten, differentiellen Proteinpunkte beträgt mindestens 1,5 bzw. 0,66 zwischen den zwei Vergleichsgruppen.

Proteinbezeichnung Gel pH 4-7	Durchschnitt % Volumen Gruppe 1	Median % Volumen Gruppe 1	Standardabw. % Volumen Gruppe 1	Durchschnitt % Volumen Gruppe 2	Median % Volumen Gruppe 2	Standardabw.% Volumen Gruppe 2	Median % Volumen Gruppe 1/ Median % Volumen Gruppe 2	T-Test Median % Volumen Gruppe 1/ Median % Volumen Gruppe 2
P01 ---	0.09971	0.10212	5.77501	0.02553	0.02487	17.47126	3.90640	0.001
P02 ---	0.89540	0.90053	5.66082	0.35622	0.35568	9.45162	2.51357	0.001
P03 ---	1.18164	1.18108	6.75821	0.45790	0.47071	7.74433	2.58051	0.001
P04 ---	0.24234	0.24379	5.68033	0.12910	0.13165	8.18778	1.87709	0.001
P05 ---	0.36750	0.36961	6.26679	0.12944	0.13486	13.31464	2.83913	0.001
P06 ---	0.03075	0.03166	8.63122	0.06439	0.06278	5.63463	0.47750	0.001
P07 ---	0.14660	0.14839	6.04090	0.06625	0.07009	10.29009	2.21303	0.001
P08 ---	0.07010	0.06956	7.00049	0.02306	0.02239	22.0477	3.03961	0.001
P09 ---	0.10065	0.09946	7.27718	0.04421	0.04397	14.86219	2.27645	0.001
P10 ---	0.07920	0.08037	7.59060	0.03117	0.02872	19.71785	2.54091	0.001
P11 ---	0.12383	0.11886	8.10198	0.04616	0.04778	21.23964	2.68255	0.001
P12 FtsZ	0.18751	0.18526	4.24220	0.09164	0.09756	14.14205	2.04604	0.001
P13 ---	0.20756	0.20865	5.02141	0.10295	0.10302	16.42749	2.01609	0.001
P14 ---	1.16839	1.16009	3.08522	0.70117	0.69430	12.51531	1.66633	0.001
P15 PpA	0.04779	0.04839	8.81680	0.11570	0.11326	12.1444	0.41306	0.001
P16 ---	0.04746	0.04595	8.57119	0.07953	0.07827	7.99209	0.59679	0.001
P17 ---	0.17781	0.18101	9.89792	0.29574	0.29346	8.40464	0.60125	0.001
P18 ---	0.17725	0.17634	8.96757	0.28826	0.29224	8.35218	0.61488	0.001
P19 49475469/ Map	0.03729	0.03927	16.82572	0.06867	0.06772	7.85768	0.54294	0.001
P20 ---	0.07760	0.07813	8.24403	0.14826	0.14859	14.06608	0.52340	0.003
P21 49476239	0.16355	0.15736	11.35799	0.09696	0.09474	9.24325	1.68677	0.003
P22 DnaK	0.10621	0.10402	8.22302	0.06868	0.07113	13.81169	1.54648	0.007
P23 ---	0.05655	0.05706	6.72925	0.08375	0.08435	9.53722	0.67525	0.004
P24 ---	0.20820	0.20687	10.92576	0.39356	0.38615	9.68793	0.52901	0.001
P25 ---	0.18701	0.18784	13.48655	0.28581	0.28963	8.87014	0.65431	0.010
P26 ---	0.04080	0.04164	13.08650	0.09047	0.08899	6.60354	0.45094	0.001
P27 HslV	0.41029	0.41840	5.96134	0.08435	0.08082	14.85752	4.86429	0.001

P28	---	0.10686	0.10241	12.73218	0.04172	0.03996	20.0459	2.56148	0.001
P29	---	0.18226	0.18373	6.36947	0.07876	0.07781	14.5908	2.31433	0.001
P30	49475430	0.42215	0.42628	4.98411	0.29236	0.28825	8.92511	1.44394	0.001
P31	SerC	0.02219	0.02177	20.95947	0.07061	0.07303	12.85931	0.31423	0.001
P32	---	0.03114	0.02929	15.21067	0.06456	0.06717	14.66425	0.48238	0.003
P33	---	0.02860	0.02982	33.31110	0.07244	0.07386	11.66406	0.39482	0.002
P34	---	0.00910	0.00995	32.33531	0.04467	0.04852	20.23302	0.20368	0.001
P35	PanB	0.00789	0.00760	22.02514	0.02666	0.03043	29.02518	0.29588	0.005
P36	---	0.02442	0.02538	24.12149	0.08276	0.08441	6.36863	0.29511	0.001
P37	PanB/ 49475409	0.04675	0.04784	7.74053	0.08749	0.08576	9.41399	0.53434	0.001
P38	---	0.07431	0.07285	9.06059	0.12804	0.12554	9.08626	0.58041	0.001
P39	SecB	0.06712	0.06830	13.41239	0.12809	0.12186	13.36335	0.52401	0.004
P40	---	0.01566	0.01339	30.23672	0.04482	0.04526	26.06584	0.34926	0.042

Tab. 22: Quantitative Informationen zu besonders signifikant und unterschiedlich stark auf den 2D-SDS-PA-Gelen im Bereich von *pI* 6 - 9 und MW 10 - 100 kDa (Abb. 24, 25, 26) auftretenden *B. henselae*-Proteinpunkten der ³⁵S-radioaktiven Markierungsexperimente von *B. henselae* Marseille ohne Kultur und in Kultur mit HUVECs. Die quantitative Erfassung und statistische Auswertung der Punktvolumina aller Proteinpunkte auf den 2D-Gelen der drei biologischen Replikate mit jeweils zwei technischen Replikaten erfolgte mittels der Decodon Delta-2D 3.3 Software. Die ermittelten Punktvolumina beziehen sich auf das Gesamtvolumen der Punkte des jeweiligen 2D-SDS-PA-Geles. Der Regulationsfaktor der Medianwerte der Punktvolumina der aufgeführten, differentiellen Proteinpunkte beträgt mindestens 1,5 bzw. 0,66 zwischen den zwei Vergleichsgruppen.

Proteinbezeichnung Gel pH 6-9	Durchschnitt % Volumen Gruppe 1	Median % Volumen Gruppe 1	Standardabw. % Volumen Gruppe 1	Durchschnitt % Volumen Gruppe 2	Median % Volumen Gruppe 2	Standardabw.% Volumen Gruppe 2	Median % Volumen Gruppe 1/ Median % Volumen Gruppe 2	T-Test Median % Volumen Gruppe 1/ Median % Volumen Gruppe 2	
P01	---	0.21395	0.21311	4.06222	0.04171	0.03892	11.39547	5.12926	0.001
P02	---	0.58735	0.58116	5.66569	0.14014	0.14774	19.67753	4.19111	0.001
P03	---	0.25135	0.24629	9.13289	0.07118	0.07070	11.16077	3.53095	0.001
P04	---	0.08691	0.08818	5.62400	0.02621	0.02573	13.12358	3.31587	0.001
P05	---	0.32780	0.34034	10.17384	0.10528	0.10123	13.59788	3.11342	0.001
P06	---	0.14616	0.14429	6.31903	0.04957	0.04912	18.01130	2.94872	0.001
P07	---	0.08863	0.08895	13.30396	0.03260	0.03367	15.69969	2.71894	0.001
P08	---	0.19142	0.19949	10.42291	0.07286	0.07188	12.42327	2.62736	0.001
P09	---	0.51402	0.55313	22.89258	0.23656	0.24493	8.97020	2.17287	0.041
P10	49475388	0.23459	0.24012	4.27892	0.11386	0.11302	4.32155	2.06041	0.001
P11	---	0.14330	0.14031	6.13763	0.07011	0.06861	9.96866	2.04386	0.001
P12	---	0.16670	0.16459	9.84534	0.08269	0.08065	9.27975	2.01601	0.001
P13	---	0.27891	0.28149	3.34088	0.14419	0.14763	11.77062	1.93431	0.001
P14	---	0.16991	0.17595	8.07759	0.08837	0.08888	9.91506	1.92278	0.001
P15	---	0.21001	0.20544	7.68800	0.11684	0.11770	8.60586	1.79737	0.001
P16	---	0.12557	0.12822	6.94157	0.07718	0.07436	14.09779	1.62697	0.002
P17	---	0.31120	0.30837	4.44305	0.19164	0.18512	9.56694	1.62385	0.001
P18	PdhC	0.26799	0.26245	12.85817	0.42912	0.43269	8.36780	0.62450	0.003
P19	---	0.20093	0.19640	8.99745	0.32625	0.32643	5.02171	0.61588	0.001
P20	---	0.21301	0.20752	13.58189	0.34935	0.34785	7.33619	0.60973	0.001
P21	---	0.10522	0.10449	17.76200	0.17369	0.17490	9.03406	0.60576	0.009
P22	---	0.02257	0.02310	11.14670	0.03729	0.03796	7.36671	0.60543	0.001
P23	---	0.04071	0.03939	14.63310	0.06897	0.06755	11.27727	0.59024	0.007
P24	---	0.11197	0.11031	10.51421	0.19028	0.18413	6.61180	0.58845	0.001
P25	---	0.05487	0.05691	16.76117	0.10165	0.10253	7.17182	0.53980	0.001
P26	---	0.03011	0.02731	21.43408	0.05725	0.05674	3.10559	0.52594	0.001
P27	PepA	0.03865	0.03793	22.10562	0.07497	0.07541	7.51363	0.51550	0.001

P28	---	0.07948	0.07794	13.19125	0.15794	0.15754	8.96898	0.50327	0.001
P29	---	0.12687	0.12369	22.85600	0.25430	0.25338	12.48211	0.49890	0.006
P30	---	0.08319	0.08117	19.80555	0.16687	0.17583	9.54577	0.49853	0.001
P31	---	0.05121	0.04376	29.94704	0.10590	0.10153	13.97504	0.48356	0.019
P32	---	0.02860	0.02904	11.89240	0.06257	0.06223	13.4764	0.45699	0.001
P33	---	0.05701	0.05505	12.47697	0.12535	0.12683	5.52974	0.45483	0.001
P34	---	0.03863	0.03855	5.72299	0.09923	0.09814	5.00362	0.38929	0.001
P35	---	0.04484	0.04481	6.23285	0.01574	0.01699	25.06650	2.84787	0.001
P36	---	0.07938	0.07688	11.65510	0.12390	0.12502	6.73842	0.64066	0.001
P37	RpsF	0.13390	0.13336	8.28995	0.20134	0.19490	5.78534	0.66504	0.001
P38	---	0.10319	0.10119	9.24299	0.06585	0.06598	10.73161	1.56708	0.004
P39	---	0.17864	0.18628	14.70346	0.28165	0.28440	7.93959	0.63427	0.006
P40	---	0.51218	0.51332	5.49012	0.34486	0.33638	7.64801	1.48516	0.001

4 Diskussion

4.1 Etablierung der Methode der zweidimensionalen SDS-PA-Gelelektrophorese

Die zweidimensionale SDS-PA-Gelelektrophorese (2D-SDS-PAGE) erlaubt (i) die Auftrennung einzelner, intakter Proteine entsprechend des isoelektrischen Punktes (pI), des Molekulargewichtes (MW) und der relativen Häufigkeit eines Proteins in komplexen, biologischen Proben auf einem 2D-SDS-PA-Gel, liefert (ii) Informationen über die qualitative und quantitative Zusammensetzung der untersuchten Proteinmischung (z.B. Änderungen des Expressionsniveaus, Vorkommen von bestimmten Proteinisofomen) und ermöglicht somit (iii) Einblicke in zelluläre Veränderungen auf Proteinebene. Um eine exakte Proteinauftrennung mit hoher Reproduzierbarkeit des Proteinpunktmusters auf dem 2D-SDS-PA-Gel zu gewährleisten, müssen die Proteine während der Probenaufbereitung komplett denaturiert, reduziert und gleichzeitig unter Erhaltung der individuellen Ladungseigenschaften solubilisiert werden. Die Verschiedenartigkeit des zu analysierenden, biologischen Probenmaterials und die Zielstellung der Untersuchung bedingen jedoch zwangsläufig eine individuelle, empirische Optimierung der Probenaufbereitung und der anschließenden Proteinauftrennung [108].

Dabei haben sowohl das verwendete Zellaufschlussverfahren als auch die Zusammensetzung der 2D-Probenpuffer (2D-Lyse-bzw. 2D-Rehydratisierungspuffer) einen entscheidenden Einfluss auf die komplette Solubilisierung, Disaggregation und Denaturierung der Proteine [108]. Im Rahmen dieses experimentellen Ansatzes, insbesondere bei der Auftrennung ^{35}S -radioaktiv markierter *B. henselae*-Proteine, war die zu untersuchende Probenmenge äußerst begrenzt. Diese limitierte Verfügbarkeit des biologischen Probenmaterials gestaltete die Analyse des *B. henselae*-Proteoms problematisch. Beispielsweise konnten wegen der geringen Menge an verfügbarem Probenmaterial oder wegen der Gefahr radioaktiver Kontaminationen von Geräten bestimmte Techniken der Probenaufbereitung gleich zu Anbeginn der Arbeiten ausgeschlossen werden [z.B. Zellaufschluss mit French Pressure Cell bzw. Ultraschall; Anreicherung des Probenmaterials bzw. Reinigung von störenden Begleitsubstanzen (Lipide, Murein, Nukleinsäuren, Salzen) durch Proteinpräzipitation]. In zahlreichen, hier nicht gezeigten Vorversuchen hat sich schließlich ein Zellaufschluss durch Detergenz-Lyse der *B. henselae*-Zellen mittels des genannten 2D-Lysepuffers und eine weitere Probenaufbereitung der *B. henselae*-Proteine unter Verwendung des beschriebenen 2D-Rehydratisierungspuffer als geeignet erwiesen (siehe 2.1.5.3).

Der Zusatz eines geeigneten Reduktionsmittels zum Spalten der intra- und intermolekularen Disulfidbrücken ist neben den im Probenpuffer befindlichen chaotropen Agenzien (Harnstoff, Thioharnstoff) und Detergenzien (CHAPS) unabdingbar, um eine vollständige Denaturierung und Solubilisierung der Proteine herbeizuführen. Derzeit werden für die 2D-SDS-PAGE verschiedene

Reduktionsmittel eingesetzt, um die Disulfidbrücken der Proteine zu spalten und die Sulfhydrylreste in einem reduzierten Zustand zu halten. Grundsätzlich kann dabei die Reduktion dieser Cystinbrücken entweder in der Gegenwart eines hohen Überschusses von Alkanthiolen (Mercaptanen), z.B. 2-ME, DTE, DTT in einer reversiblen Reaktion (Gleichgewichtsreaktion) oder in der Gegenwart von Trialkylphosphinen, z.B. TBP, TCEP in einer irreversiblen Reaktion erfolgen [247, 271, 322].

Bei der 2D-SDS-PAGE findet das thiolbasierte Proteinreduktionsmittel 2-ME aufgrund der geringen Effizienz des Reaktionsablaufes kaum noch Verwendung. Die üblicherweise eingesetzten thiolbasierten Proteinreduktionsmittel sind DTT und DTE [247]. Da diese mit einem intramolekularen, zyklischen Disulfid (1,4-Dithian) als oxidiertes Reaktionsprodukt eine thermodynamisch stabile Ringverbindung ausbilden, begünstigen sie den Reaktionsablauf und verschieben deshalb das Gleichgewicht der reversiblen Reaktion zugunsten der Produkte (Abb. 29) [99, 172, 271]. Obwohl DTT und DTE wesentlich effizienter Disulfidbrücken reduzieren, müssen auch diese Reagenzien in einem 20-fachen molaren Überschuss eingesetzt werden, um eine nahezu 100%ige Reduktion eines Proteins zu erreichen [271]. Daher werden DTT und DTE bei der 2D-SDS-PAGE üblicherweise in hohen Konzentrationen von 65 - 100 mM verwendet [108].

Alternativ zu den thiolbasierten Reduktionsmitteln werden auch phosphinbasierte Reduktionsmittel, also Trialkylphosphinderivate, z.B. TBP, TCEP zur Reduktion der Proteindisulfidbrücken verwendet. Diese reduzieren quantitativ und spezifisch die Disulfidbrücken der Proteine in einem stöchiometrischen, schnellen und irreversiblen Reaktionsablauf [35, 115, 271] und können demnach erfolgreich thiolbasierte Reduktionsmittel ersetzen (Abb. 29). Schon bei niedrigen Konzentrationen (TBP: 5 - 20%iger molarer Überschuss) erwiesen sich diese als ausgesprochen wirksame Reduktionsmittel [123, 247, 271]. Das ungeladene TBP hat den zusätzlichen Vorteil, dass es während der IEF keiner Wanderung unterliegt [123]. Jedoch besitzt auch dieses Reduktionsmittel einige nachteilige Eigenschaften. Insbesondere störend bei der Handhabung von TBP sind die schlechte Löslichkeit im wässrigen Milieu, die hohe Flüchtigkeit, die hohe Instabilität bei Sauerstoffpräsenz (Autoxidation) und der reizende, stechende Geruch dieses sehr toxischen Reduktionsmittels [35, 116, 123, 271].

Daher findet das nichtflüchtige, wasserlösliche und geruchlose TCEP als weiteres, alternatives Reduktionsmittel zunehmend Verwendung [35, 58, 99, 116]. Im Einzelfall wurde es bereits bei der 2D-SDS-PAGE eingesetzt [323], ist jedoch aufgrund seiner Ladungseigenschaften für die 2D-SDS-PAGE nur bedingt geeignet [49, 322].

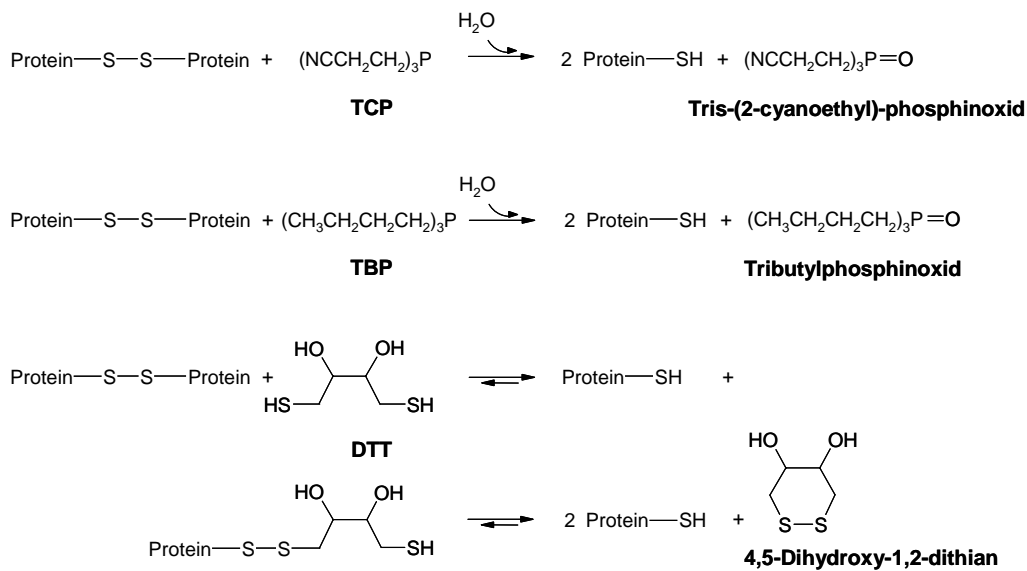


Abb. 29: Reaktionsschema der thiolbasierten und phosphinbasierten Proteinreduktionsmittel. Es ist zu beachten, dass die thiolbasierten Reduktionsmittel [z.B. DTT (Cleland's Reagenz, Dithiothreitol bzw. 1,4-Dimercapto-2,3-butandiol), DTE (Dithioerythritol)] einen reversiblen Reaktionsablauf besitzen und demzufolge ein hoher Überschuss des Reduktants eingesetzt werden muss. Es ist in diesem Zusammenhang auch offensichtlich, dass ein Mangel eines solchen Überschusses auch möglicherweise zu einer Quervernetzung der Proteine führen kann. Im Gegensatz dazu führen die phosphinbasierten Reduktionsmittel [z.B. TCP [Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin], TBP (Tributylphosphin)] zu einem irreversiblen Reaktionablauf der Cystinreduktion.

Einige der üblicherweise bei der 2D-SDS-PAGE verwendeten Proteinreduktionsmittel wurden auf ihre Verwendbarkeit in diesem experimentellen Ansatz geprüft. Dazu wurde das gebräuchliche thiolbasierte Reduktionsmittel DTT als Vertreter der Alkanthiol-Reduktionsmittel, das häufig verwendete phosphinbasierte Reduktionsmittel TBP als Vertreter der Trialkylphosphin-Reduktionsmittel sowie das in diesem Zusammenhang nicht etablierte, jedoch aufgrund seiner physikochemischen Merkmale als geeignet erscheinende phosphinbasierte Reduktionsmittel TCP [Tris-(2-cyanoethyl)-phosphin] den 2D-Probenpuffern (2D-Lyse-bzw. 2D-Rehydratisierungspuffer) zugesetzt. Anschließend wurden die *B. henselae*-Proteinextrakte unter identischen Bedingungen mittels 2D-SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.2.7.1-3, 2.2.8.2). Dabei zeigten die unter Verwendung von DTT angefertigten, silbergefärbten 2D-Gele deutlich weniger, schlecht aufgelöste Proteinpunkte mit geringer Reproduzierbarkeit als vergleichsweise die unter Verwendung von TBP bzw. TCP hergestellten 2D-Gele der aufbereiteten *B. henselae*-Proteinextrakte (Abb. 3).

Bei beiden dieser thiolbasierten Reduktionsmittel DTT und DTE handelt es sich um schwache Säuren, was sich als nachteilige Eigenschaft bei der Verwendung in der 2D-SDS-PAGE erwiesen hat [108] (DTT Thiolgruppen-pK-Werte = 8,3; 9,5/ DTE Thiolgruppen-pK-Werte = 9,0; 9,9 [143]). Im alkalischen pH-Bereich liegen DTT und DTE in der reaktiven, deprotonierten und nukleophilen Thiolat-Form vor und entfalten dann vorrangig die reduzierende Wirkung auf organische Disulfide, hingegen besitzen die thiolbasierten Reduktionsmittel eine niedrige Reaktivität mit organischen Disulfiden im sauren Milieu [58, 99, 116, 143]. Jedoch genau in diesem ionisierten Zustand, also

als anionisches Thiolat, wandern DTT bzw. DTE aus dem alkalischen pH-Bereich des IPG-Streifens im Verlauf der IEF ab [129]. Deshalb konnte nach Beendigung der IEF kein verbliebenes DTT in dem basischen, kathodischen Bereich des IPG-Streifen mit DTT-haltigem Rehydratisierungspuffer nachgewiesen werden (Abb. 5). Dieses Abwandern des DTT führt zu einer Verknappung des Reduktionsmittels im basischen pH-Bereich des IPG-Streifens, was eine beliebige Reoxidation der Disulfidbrücken nach sich zieht [49, 129]. Eine derart zufällige Reoxidation der intra- und intermolekularen Cystinbrücken resultiert in einer unkontrollierten Proteinaggregation, teilweiser Proteinpräzipitation, und äußert sich dann letztlich bei der 2D-SDS-PAGE durch die beobachtete, nicht reproduzierbare elektrophoretische Mobilität der Proteine (z.B. schlechte Auflösung der Proteinpunkte, verwischte Proteinstreifen im alkalischen Bereich des 2D-SDS-PA-Gels) [105, 123, 129, 240]. Zudem lassen sich mit diesen thiolbasierten Reduktionsmitteln einige Proteine (z.B. Wollkeratin mit hohem Cysteingehalt) nicht reduzieren [123, 247].

Die unter Verwendung von TCP angefertigten, silbergefärbten 2D-Gele zeigten eine nochmals verbesserte Auftrennung und Auflösung der Proteine mit einer deutlich höheren Reproduzierbarkeit des Punktmusters als die unter Verwendung von TBP hergestellten 2D-Gele der aufbereiteten *B. henselae*-Proteinextrakte (Abb. 3, 4). Über die ganze Länge des verwendeten IPG-Streifens mit TBP-haltigem Rehydratisierungspuffer konnte nach Beendigung der IEF kaum noch verbliebenes TBP nachgewiesen werden (Abb. 5). Im Gegensatz zu den IPG-Streifen mit DTT- bzw. TBP-haltigem Rehydratisierungspuffer war eine starke, kontinuierliche Reaktion des Reduktionsmittels mit DTNB ausschließlich in dem IPG-Streifen mit TCP-haltigem Rehydratisierungspuffer zu verzeichnen (Abb. 5). Das erklärt auch die verminderte Auftrennung und Auflösung der Proteinpunkte auf den 2D-SDS-PA-Gelen, die unter Verwendung sowohl des thiolbasierten Reduktionsmittels DTT als auch des phosphinbasierten Reduktionsmittels TBP erstellt wurden (Abb. 3, 4). Diese Ergebnisse bestätigen eindrucksvoll das beobachtete Abwandern des thiolbasierten Reduktionsmittels DTT aus dem alkalischen pH-Bereich des IPG-Streifens im Verlauf der IEF [49, 129] und die beobachtete Instabilität des phosphinbasierten Reduktionsmittels TBP [49, 270, 322].

In verschiedenen Untersuchungen steigerte TBP erfolgreich die Solubilisierung der Proteine während der IEF und hatte einen positiven Einfluss auf die Proteinauflösung in den hergestellten 2D-SDS-PA-Gelen verschiedener Proben [123, 221-223]. Im Gegensatz dazu wirkte sich die Verwendung von TBP als Reduktionsmittel, wie hier in dieser Untersuchung gezeigt werden konnte, auch in weiteren Untersuchungen negativ auf die Qualität der 2D-SDS-PA-Gele aus [49, 270, 322]. TBP erwies sich bei Zugabe von 20 - 50 % (v/v) n-Propanol als löslich in wässriger Lösung [271], folglich liegt es ansonsten in wässrigen Lösungen lediglich als Suspension vor und erscheint vollkommen ungeeignet für biochemische Anwendungen [35, 116, 172]. Zudem besitzt

dieses Reduktionsmittel eine geringe Halbwertszeit im 2D-Probenpuffer (< 2 h) und schützt demnach keineswegs vor einer Reoxidation der Disulfidbrücken [49].

Die physikochemischen Eigenschaften des TCEP (Carboxylgruppen-pK-Werte = 4.7, 5.9, 6.6/ Phosphingruppen-pK-Werte = 7.6 [58]) lassen dieses ansonsten nützliche biochemische, phosphinbasierte Reduktionsmittel für die 2D-SDS-PAGE ungeeignet erscheinen. Es liegt im alkalischen Bereich des IPG-Streifens als anionisches Reduktionsmittel, also als dreiwertiges Carboxylat, vor [49] und unterliegt folglich einer entsprechend schnellen anodischen Abwanderung während der IEF, was sich ebenso negativ wie die Abwanderung des DTT auf die Qualität der 2D-Gele auswirkt [49, 322]. Insofern überrascht es nicht, wenn beim alleinigen Einsatz von TCEP eine unbefriedigende Qualität der 2D-Gele erzielt wurde [322].

Da diese phosphinbasierten Reduktionsmittel die Proteindisulfidbrücken quantitativ und spezifisch in einem stöchiometrischen, schnellen und irreversiblen Reaktionsablauf reduzieren können [35, 115, 271], wurde in dieser Untersuchung erstmalig mit dem TCP ein Trialkylphosphin-Derivat des TCEP auf die Verwendbarkeit über den gesamten pH-Bereich der 2D-SDS-PAGE untersucht. Das TCEP x HCl ist eine wasserlösliche, nicht flüchtige, geruchlose, kristalline, in sauerstoffhaltiger Atmosphäre stabile Substanz. [35, 99, 115]. Gleiche Eigenschaften teilt das TCP, besitzt aber als chemische Vorläufersubstanz der TCEP-Synthese die Nitrilgruppen anstatt der im basischen Milieu geladenen Carboxylgruppen des TCEP (Carboxylgruppen-pK = 4.7, 5.9, 6.6). Damit hat es zwar einen Ladungsschwerpunkt, aber genau dieser Umstand ermöglichte eine gute Löslichkeit im wässrigen Milieu (10 mM TCP). Im Gegensatz zum TCEP wird dieses Molekül weitaus schwieriger ionisiert, es ist anzumerken, dass die Hybridisierung und Struktur der Nitrilgruppe mit denen der Alkine zu vergleichen ist (sp-Hybridorbitale). Das freie Elektronenpaar am Stickstoff macht die Nitrilfunktion leicht basisch und der Stickstoff kann ein Proton addieren - jedoch wird ein Nitril im Vergleich zu einem Immin oder Amin weitaus weniger leicht protoniert. Die elektronenziehende Kraft eines Atoms nimmt von der sp³-Hybridisierung über die sp²-Hybridisierung bis zur sp-Hybridisierung zu und demzufolge reagiert eine protonierte Nitrilgruppe viel saurer als beispielsweise ein Ammonium-Ion [243].

Zusammenfassend ist hervorzuheben, dass die bisher in der 2D-SDS-PAGE verwendeten Proteinreduktionsmittel verschiedene nachteilige Eigenschaften besitzen. Bestimmte Proteinreduktionsmittel sind schwache Säuren (z.B. DTT, DTE, TCEP), die im alkalischen Bereich des IPG-Streifens als anionische Proteinreduktionsmittel vorliegen und folglich während der IEF zur Anode abwandern [129]. Andere Proteinreduktionsmittel hingegen (z.B. TBP) besitzen eine geringe Stabilität und eine geringe Löslichkeit im wässrigen Milieu [35, 49, 270]. Diese beiden negativen Effekte verursachen eine unvermeidliche Reoxidation der Disulfidbrücken und resultieren schließlich in einer schlechten, wenig reproduzierbaren Proteinauftrennung auf dem

2D-SDS-PA-Gel. Das in dieser Arbeit erstmalig auf die Verwendbarkeit bei der 2D-SDS-PAGE untersuchte Proteinreduktionsmittel TCP vereint eine Reihe vorteilhafter Eigenschaften, ohne die nachteiligen Eigenschaften anderer Proteinreduktionsmittel zu teilen. Es zeigt es eine gute Löslichkeit im wässrigen Milieu ohne geladene funktionelle Gruppen zu besitzen, erlaubt zudem einen vollständigen, irreversiblen und stöchiometrischen Reaktionsablauf mit den Disulfidbrücken und kann demnach in sehr niedrigen Konzentrationen eingesetzt werden (5 - 10 mM). Es ist folglich eher als TBP, TCP und auch eher als als DTT, DTE für den Einsatz bei der 2D-SDS-PAGE geeignet.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die negativen Effekte der bislang in der 2D-SDS-PAGE verwendeten Proteinreduktionsmittel wie (i) starke Migration im IPG-Streifen während der IEF, (ii) unvollständige Reduktion der Disulfidbrücken während der Probenaufarbeitung, (iii) schlechte Löslichkeit im wässrigen Milieu durch die Einführung dieses phosphinbasierten Proteinreduktionsmittels TCP überwunden wurden. In den hier gezeigten Experimenten ermöglichte die Reduktion der *B. henselae*-Proteinprobe mit TCP eine sehr gute qualitative und quantitative Reproduzierbarkeit des Punktmusters auf allen 2D-SDS-PA-Gelen. Zudem ist TCP als gut wasserlösliches Pulver wesentlich besser zu handhaben als das leicht flüchtige, an der Luft bereits stark reaktive TBP, welches stets unter Stickstoffatmosphäre zu pipettieren ist.

4.2 Untersuchung des *B. henselae*-Proteoms mittels 2D-SDS-PAGE

Bislang ist nur sehr wenig über das Proteom des humanpathogenen Bakteriums *B. henselae* bekannt. Seitdem die Genomsequenz von *B. henselae* im Jahre 2004 veröffentlicht wurde [5], sind die Rahmenbedingungen für die massenspektrometrische Identifizierung der *B. henselae*-Proteine, und folglich auch für weiterführende Untersuchungen des *B. henselae*-Proteoms, bereitgestellt. In dieser Arbeit wurde erstmalig eine umfassende 2D-Proteomkarte vom gesamten *B. henselae*-Proteom erstellt, welche darauf aufbauend die gezielte Untersuchung der humoralen Immunantwort von Patienten mit diagnostisch evidenter *B. henselae*-Infektion erlaubt.

Derzeit sind lediglich zwei Studien bekannt, die sich mit dem Proteom von *B. henselae* auseinandersetzen. Eine Publikation berichtet über einige beobachtete Unterschiede in dem Verteilungsmuster der Proteinpunkte auf den 2D-SDS-PA-Gelen bei einem direkten Vergleich des Proteoms zweier *B. henselae*-Stämme (Marseille, Houston-1), jedoch blieb eine Identifizierung und somit Charakterisierung der unterschiedlich auftretenden Proteinpunkte aus [358]. Die andere Untersuchung wurde mit der Zielsetzung durchgeführt, ausschließlich Proteine der äußeren Membran von *B. henselae* zu identifizieren, um mögliche Pathogenitätsfaktoren für die Wechselwirkung des Bakteriums mit der Wirtszelle zu finden [257]. Im Gegensatz dazu zielt die in

dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung darauf ab, möglichst das gesamte immunogene Proteom von *B. henselae* zu analysieren.

Biologische Replikate des *B. henselae*-Proteinextraktes ganzer Bakterienzellen wurden unabhängig voneinander als technische Replikate auf 2D-SDS-PA-Gelen aufgetrennt. Auf jedem der resultierenden 2D-SDS-PA-Gele ließen sich mehr als 900 Proteinpunkte detektieren und ausschneiden. Diese Proteinpunkte wurden mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Insgesamt wurden 431 Proteinpunkte identifiziert und nachfolgend annotiert, die 191 verschiedene Proteine repräsentieren. Diese Menge an Proteinen stellt ungefähr 12,8 % des gesamten *B. henselae*-Proteoms dar (Abb. 9-12, Tab. 11).

Alle Proteine der *In-silico*-Proteomkarte von *B. henselae* befinden sich in zwei Verteilungszentren - einem Zentrum im neutralen Bereich (pI 4,0 - 7,5) und einem im alkalischen Bereich (pI 8,5 - 11,0). Tatsächlich stimmt das detektierte Verteilungsmuster der Proteinpunkte auf der 2D-Proteomkarte von *B. henselae* (Abb. 9-12) mit dem der *in silico* erstellten 2D-Proteomkarte überein (Abb. 6), und die Mehrheit der Proteine auf der 2D-Proteomkarte von *B. henselae* befindet sich im neutralen Bereich (pH 4,0 - 7,5) sowie im alkalischen Bereich des 2D-Gels ($pH \geq 9,0$). Diese charakteristische, bimodale Verteilung der pI -Werte der aufgetrennten *B. henselae*-Proteine erlaubt interessante Einblicke in den physiologischen Zustand von *B. henselae*, z.B. ein Abschätzen des intrazellulären, physiologischen pH -Wertes von *B. henselae*. Dieser korreliert mit dem pI -Wert der geringsten Verteilungsdichte der in Proteinpunkte aufgetrennten Proteine der 2D-Proteomkarte und beträgt demnach für *B. henselae* pH -Wert $8,2 \pm 0,2$ [325].

Entsprechend der *In-silico*-Daten kann angenommen werden, dass ungefähr 7,2 % des *B. henselae*-Proteoms, genauer 107 Proteine, den hier gegebenen Trennbereich von pH 3 - 10 des verwendeten 2D-SDS-PAGE-Systems überschreiten und demnach nicht aufgetrennt werden können. Entsprechend der *B. henselae*-Genomsequenz (NC_005956) repräsentieren diese Proteine weitestgehend ribosomale Proteine, Transkriptionsfaktoren, DNA-Bindeproteine sowie hypothetische Proteine. Letztlich dürfte jedoch in Wirklichkeit die Menge der im alkalischen Bereich zu erwartenden, auftrennbaren Proteine aufgrund bekannter technischer Einschränkungen der 2D-SDS-PAGE, z.B. Auflösung der Proteine mit geringem zellulären Vorkommen oder Proteine mit hydrophoben Charakter wesentlich geringer ausfallen [346]. Um auch die übrigen alkalischen Proteine in die Proteomuntersuchung mit einzuschließen, kann diese zukünftig um zusätzliche 2D-Gele mit alkalischem Trennbereich erweitert werden. Derartige Proteomuntersuchungen wurden mit IPG-Streifen für den alkalischen Trennbereich im pH 9 - 12 bereits für *Lactococcus lactis* durchgeführt und es konnten hauptsächlich ribosomale Proteine, hypothetische Proteine und Proteine mit unbekannter Funktion nachgewiesen werden [81].

Entsprechend der Genomsequenz von *B. henselae* kodieren alle offenen Leserahmen (ORFs) insgesamt eine Anzahl von 1488 exprimierten Proteinen [5]. Ungefähr 76 % des *B. henselae*-Proteoms, genauer eine Anzahl von 1125 Proteinen, können theoretisch mit dem hier verwendeten 2D-SDS-PAGE-System im gegebenen Trennbereich pI 3 - 10, MW 10 - 100 kDa dargestellt werden, wenn die Proteine mit einem GRAVY-Wert $\leq 0,4$ einbezogen werden.

Sehr große Proteine entgehen oftmals der isoelektrischen Fokussierung (IEF) beim Beladen der IPG-Streifen mit der im 2D-Rehydratisierungspuffer aufgenommenen Proteinprobe aufgrund der auftretenden Größenausschlusseffekte der Gelmatrix [108]. Daher sind beispielsweise das trimere Autotransporter-Adhäsın *Bartonella*-Adhäsın A (Monomer 329 kDa) [262], das einen bedeutenden Pathogenitätsfaktor von *B. henselae* darstellt, sowie das bislang uncharakterisierte filamentöse Hämagglutinin FhaB1 (280 kDa) aufgrund ihrer enormen Größe nicht mittels 2D-SDS-PAGE aufzutrennen.

In diesem Zusammenhang muss auch betont werden, dass lediglich ein Anteil eines bakteriellen Genoms unter einem bestimmten physiologischen Zustand exprimiert wird [37, 258]. Es wurde gezeigt, dass die Expression verschiedener *B. henselae*-Proteine, z.B. VirB-Proteine des VirB/VirD4-Typ IV-Sekretionssystems und die Proteine TrwI-F des Trw-Typ IV-Sekretionssystems von der Wechselwirkung mit Endothelzellen abhängt [283, 299]. Die Proteine des VirB/VirD4-TIVSS von *B. henselae* bilden einen nadelartigen Pilus und einen kanalartigen Porenkomplex und ermöglichen *B. henselae*, nach Kontakt mit der Wirtszelle bestimmte bakterielle, zytoplasmatische Effektorproteine BepA-G (*Bartonella-translocated effector proteins*) in die Wirtszellen zu translozieren, um so schließlich deren Zellfunktionen im Infektionsverlauf gezielt zu beeinflussen [57, 69, 73, 289]. Die beobachtete Induktion des *virB*-Operons während der Infektion der Endothelzellen deutet darauf hin, dass möglicherweise auch noch weitere an der *B. henselae*-Pathogenese beteiligte Proteine, z.B. BepA-G ähnlich wie die VirB-Proteine lediglich im Infektionsverlauf exprimiert werden. Dieser Sachverhalt verdeutlicht, dass die Anzahl der auf 2D-Gelen nachweisbaren *B. henselae*-Proteine der auf Columbia-Blutagarplatten kultivierten Bakterien eingeschränkt ist und demnach die tatsächliche Anzahl der dargestellten Proteine erwartungsgemäß viel geringer ausfällt als theoretische Erwägungen zunächst nahelegen.

Zudem sind technische Einschränkungen der 2D-SDS-PAGE für eine niedrigere Anzahl an dargestellten *B. henselae*-Proteinen verantwortlich. Ein Maß, um das zelluläre Vorkommen eines bestimmten Proteins abzuschätzen, ist der CAI-Wert, der die Korrelation des Gehaltes einer bestimmten zellulären tRNA, die organismustypische tendenzielle Kodonverwendung synonymen Kodone innerhalb eines Gens und somit folglich das daraus abgeleitete Expressionsniveau des jeweiligen Proteins widerspiegelt [132, 173, 301]. Insofern ist es nicht verwunderlich, dass von allen identifizierten Proteinen vorrangig die Proteine mit einem $CAI \geq 0,5$ die Protein-

zusammensetzung der 2D-Proteomkarte dominieren (siehe Abb. 7). Diese Beobachtung stimmt mit bisherigen Untersuchungen überein, die die Zugänglichkeit von Proteinen mit geringer zellulärer Häufigkeit mittels 2D-SDS-PAGE überprüften [239, 346]. Neben der Verwendung von IPG-Streifen mit steilem pH-Gradienten, folglich vergrößerter relativer Trenndistanz der IEF, machen Proteine mit solch einem geringen Vorkommen eine Anreicherung mit Prefraktionierungstechniken erforderlich, z.B. präparative IEF, sequentielle Extraktion oder subzelluläre Fraktionierung, um ausreichend deutlich auf einem 2D-Gel dargestellt zu werden [108, 239].

Zusätzlich ist die Auftrennung von hydrophoben Proteinen mittels 2D-SDS-PAGE problematisch und folglich sind auch diese Proteine auf dem 2D-Gel unterrepräsentiert [275, 346]. Das wird auch offenbar, wenn die Hydropatie aller identifizierter Proteine anhand der GRAVY-Werte betrachtet wird [175]. Auch in dieser Untersuchung sind die hydrophilen, bzw. nur schwach hydrophoben Proteine mit einem GRAVY-Wert $< 0,4$ vorrangig auf dem 2D-Gel aufgetrennt (Abb. 8). Wie einige Untersuchungen nahelegen, besteht auch hier die Notwendigkeit, für die physikochemischen Eigenschaften der hydrophoben Proteine besonders zugeschnittene Aufarbeitungsmethoden anzuwenden, z.B. sequentielle Extraktion oder subzelluläre Fraktionierung [220, 222, 224, 239]. Deshalb sind auf der hier erstellten 2D-Proteomkarte vorrangig die zellulär häufigen und hydrophileren Proteine nachgewiesen worden. Doch da das Subproteom der äußeren Membran von *B. henselae* bereits intensiv untersucht wurde [257] und das Subproteom der bakteriellen zytoplasmatischen Membran mit den außerordentlich hydrophoben, α -helikalen, integralen Membranproteinen den gängigen 2D-SDS-PAGE Techniken nahezu unzugänglich ist [224, 275], erwies sich der hier angewandte experimentelle Ansatz mit den immanenten technischen Restriktionen für diese umfangreiche Untersuchung des *B. henselae*-Proteoms als ein vernünftiger Kompromiss.

Die Zusammensetzung und die Größe der Fragmente eines Proteins nach der tryptischen Hydrolyse sind sehr charakteristisch für ein bestimmtes Protein, so dass diese Informationen oftmals eine Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie ermöglichen. Die massenspektrometrische Identifizierung der Proteine anhand dieses sogenannten Fingerabdruckes der Peptidmassen des jeweiligen Proteins (*peptide mass fingerprint*, PMF) basiert auf der Verfügbarkeit aller Proteinsequenzen von *B. henselae*. Deshalb vereinfacht die Verfügbarkeit der *B. henselae*-Genomsequenz [5] die Identifizierung der Proteine mittels Massenspektrometrie und schafft optimale Voraussetzungen für umfassende Proteomstudien. Von bestimmten ORFs kann jedoch bei der alleinigen Genomanalyse weder die tatsächliche Expression eines kodierten Proteins vorausgesagt noch eine mögliche Funktion zugeordnet werden. Innerhalb der Genomsequenz wird dann auf diese ORFs als hypothetische Proteine verwiesen. Im Gegenzug ermöglicht die Proteomanalyse die Bestätigung dieser hypothetischen Proteine als exprimierte ORFs. Auf der

2D-Proteomkarte von *B. henselae* Marseille wurden 16 Proteine identifiziert, deren ORFs in der *B. henselae*-Genomsequenz als hypothetisches Protein vermerkt sind. Eine ausgedehnte Datenbanksuche zeigte, dass einige dieser Proteine mögliche Hydrolasen, ABC-Transporter oder Dehydrogenasen darstellen. Anderen Proteinen wurde keine bestimmte Funktion zugewiesen und deren Charakterisierung sollte Gegenstand weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen sein.

Eine Anzahl von 106 Proteinen wurde als mehrere Proteinpunkte auf der 2D-Proteomkarte aufgelöst, vorwiegend als zwei oder drei Punkte, aber auch bis zu elf Proteinpunkte eines Proteins (GI 49476039/ YP_034080) waren nachweisbar. Diese Abweichungen in *pI* und MW eines bestimmten Proteins könnten chemische Änderungen oder ko- bzw. posttranslationale Modifizierungen widerspiegeln, wie beispielsweise Glykosylierung und Phosphorylierung mit potentiellen biologischen Auswirkungen in Analogie zum Ag43-Autoporter-Protein von *E. coli*, das im glykosylierten Zustand ein verstärktes Bindevormögen an humane Zelllinien zeigt [302]. Der genaue Grund für die *pI*- bzw. MW-Varianz muss jedoch individuell für jeden Proteinpunkt aufgeklärt werden. Alle auf der Proteomkarte von *B. henselae* identifizierten Proteinpunkte mit den empirisch bestimmten *pI*- und MW-Werten sind in Tab. 11 aufgeführt. Darüber hinaus sind auch die Punktvolumina jedes bezeichneten Proteinpunktes als Prozentanteil des Gesamtvolumens aller Proteinpunkte mit den supplementären Informationen online unter <http://www.bartonella.coolix.com/> angegeben.

Abschließend kann festgehalten werden, dass in dieser vorliegenden Arbeit erstmalig eine 2D-Proteomkarte vom gesamten *B. henselae*-Proteom erstellt wurde. Diese umfasst eine Anzahl von 431 verschiedenen, identifizierten Proteinpunkten, die insgesamt 191 Proteine repräsentieren. Es konnten auch 16 hypothetische Proteine in ihrer Existenz bestätigt werden und die funktionelle Analyse sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

4.3 Untersuchung der Immunreaktivität des *B. henselae*-Proteoms mit Patientenseren

Das Vorhandensein einer 2D-Proteomkarte ist eine Voraussetzung, um die gegen *B. henselae* gerichtete humorale Immunantwort zu untersuchen. Das derzeit am meisten verbreitete, angewendete serologische Testverfahren für die Labordiagnose von *B. henselae*-Infektionen ist der Immunfluoreszenztest (IFT). Die Seren werden als "positiv" bewertet, wenn diese in einer Verdünnung von größer als 1:200 reagieren, Seren mit keiner nachweisbaren Reaktion in einer Verdünnung von 1:50 werden als "negativ" eingestuft und Seren mit einem Antikörper-Titer von 1:50 - 100 befinden sich im serologischen Grenzbereichs entsprechend der verwendeten Richtlinien [48]. Bedauerlicherweise leidet der *B. henselae*-IFT unter einer sehr starken Kreuzreaktivität mit einer Vielzahl anderer intrazellulärer, pathogener Bakterien wie *B. quintana*, *Coxiella burnetii* [176]

und *Chlamydia pneumoniae* [208], was dann letztlich zu einem falsch-positiven Ergebnis führt. Demzufolge kann die Charakterisierung der immundominanten *B. henselae*-Proteine sehr spezifische Zielproteine für eine verbesserte Serodiagnostik einer *B. henselae*-Infektion aufzeigen.

Es ist bekannt, dass die Hitzeschockproteine bei bakteriellen Infektionen ein hauptsächliches Ziel der humanen Immunantwort darstellen [113, 355]. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass sich z.B. das Chaperonin-Protein GroEL, das Chaperonin-Protein GroES, das Hitzeschockprotein-70 DnaK, Hitzeschockprotein-70 Kofaktor GreA und das Kleine Hitzeschockprotein IpbA2 bei der Untersuchung der 2D-Immunoblots mit den Patientenseren als reaktiv erwiesen (Tab. 13, 14, 15). Das Chaperonin GroEL von *Bartonella* spp., welches Hämin-bindende Eigenschaften besitzt [359] und als mitogenes Effektorprotein bei HUVECs fungiert [217], konnte in einer Untersuchung als Bestandteil der äußeren Membran von *B. henselae* nachgewiesen werden [113]. Auch in einer anderen Untersuchung, in der die humorale Immunantwort anhand von Patientenseren mit serologisch bestätigter *B. quintana*-Infektion mittels 2D-Immunoproteomics analysiert wurde, erwiesen sich GroEL, DnaK und IpbA2 als immunreaktive Proteine [26]. In beiden Fällen mussten bestimmte Proteine, z.B. GroEL, als potentielle Seromarker-Proteine einer *Bartonella* spp. Infektion ausgegrenzt werden, da diese nicht ausschließlich mit Patientenseren reagierten. In den hier gezeigten Ergebnissen reagierten vorrangig die Chaperonine DnaK, GreA und GroEL, wenn auch schwach, mit einem Kontrollserum. Aus der Proteinklasse der Chaperonine erreicht hier lediglich das Chaperonin-Protein GroES den eingeführten Schwellenwert von 20 % Seroreaktivität und könnte demnach als mögliches immundominantes Markerprotein angesehen werden. Jedoch werden die Chaperonin-Proteine GroEL, GroES, DnaK und IpbA2 auch bei anderen bakteriellen Infektionen vorrangig vom Wirtsimmunsystem erkannt und somit können sie keineswegs einen *B. henselae*-spezifischen Seromarker darstellen [32, 64, 146].

Ebenso unspezifisch wie diese seroreaktiven Chaperonin-Proteine verhielt sich auch das ribosomale Protein RpIL, also die L7/L12-Untereinheit der 50S-Ribosomen. Dies erwies sich bereits reaktiv mit drei der negativen Kontrollseren und wurde demzufolge im weiteren Verlauf der Untersuchung nicht als potentielles immundominantes Seromarker-Protein berücksichtigt. Auch in Untersuchungen der *H. pylori*-positiv getesteten Patientenseren mittels 2D-Immunoproteomics reagierte dieses Protein sowohl mit Patienten- als auch mit Kontrollseren, was nahelegt, dass bestimmte hochkonservierte Proteine ein vorrangiges Zielantigen bei bakteriellen Infektionen darstellen können [146].

Neben diesen vorrangig immunogenen, aber eher unspezifischen seroreaktiven Proteinen stellten sich der Elongationsfaktor-Tu (EF-Tu) sowie der intensiv reagierende Elongationsfaktor-Ts (EF-Ts) als immundominante Proteine heraus. Auch die Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase

(GI 49475012/ YP_033053) sowie das intensiv und häufig reagierende, zytoplasmatische Protein Dihydrolipoamid-Succinyltransferase (SucB) erwiesen sich als immundominant. Bemerkenswerterweise stellen sich alle diese drei Proteine (EF-Tu, SucB, Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase) bei *B. quintana* infizierten Patienten ebenfalls als immunreaktive Proteine heraus [26], was die in dieser Arbeit erbrachten Resultate bestätigt. Zudem zeigten schon frühere Untersuchungen mit Seren von Patienten mit *B. henselae*-Infektion, dass es sich bei SucB um ein immunreaktives Protein handelt [192].

Bei einem Vergleich anderer serologischer Untersuchungen von Patienten mit bakteriellen Infektionen mittels 2D-Immunoproteomics wird offenbar, dass neben der Proteinklasse der Chaperonine auch weitere hochkonservierte Proteine, wie beispielsweise EF-Tu, ein verbreitetes, gebräuchliches Ziel der Wirtsimmunantwort darstellen, so dass ein Antikörperprofil gegen eben diese Proteine nicht ausschließlich auf eine *B. henselae*-Infektion zurückzuführen sein muss [26, 32, 146]. Auch serologisch positiv geprüfte Patientenserum mit einem Antikörperprofil gegen andere Bakterien (z.B. *Brucella melitensis*, *Coxiella burnetii*) zeigten Immunreaktivität gegenüber dem immundominanten Antigen SucB [192]. Daher erscheint SucB letztlich doch für eine *Bartonella*-spezifische Serodiagnostik ungeeignet.

Solche hochkonservierten bakteriellen Proteine werden vermutlich bei jeder bakteriellen Infektion von den antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems - also dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten - angezeigt und so wird eine spezifische Immunantwort gegenüber diesen Proteinen dauerhaft aufrecht erhalten, was dann zu einer schnellen Erkennung und wirkungsvollen Beseitigung von eingedrungenen bakteriellen Erregern führt. Daher stellen sich diese verbreiteten bakteriellen Proteine wie Chaperonin-Proteine, z.B. GroEL, GroES, DnaK, GreA und IpbA2, ribosomale Proteine, z.B. RpIL und Transkriptionsfaktoren, z.B. EF-Tu, EF-Ts sowie konservierte Stoffwechselproteine, z.B. SucB in dieser Untersuchung des immunogenen *B. henselae*-Proteoms im Verlauf einer *B. henselae*-Infektion zwar als immundominante, aber auch als wenig spezifische Proteine dar. In diesem Zusammenhang sind auch solche verbreiteten, bakteriellen Proteine wie die Acetyl-CoA-Carboxylase (AccA), Lysyl-tRNA-Synthetase (LysS), Superoxide-Dismutase (SodB), Polyribonukleotid-Nukleotidyltransferase (Pnp) und die Succinyl-CoA-Synthetase (SucC) dementsprechend vorsichtig als potentielle *Bartonella*-spezifische Seromarker-Proteine zu bewerten.

Bei der Untersuchung der Seren von Patienten mit serologisch nachgewiesener *B. quintana*-Infektion zeigten sich die Hämin-Bindungsproteine, z.B. HbpE, als immundominante Proteine, was nahelegt, dass die Hämin-Bindungsproteine möglicherweise vielversprechende spezifische Seromarker-Proteine für die Labordiagnose einer *B. quintana*-Infektion darstellen könnten [26]. Obwohl sich das OMP HbpD (Hemin binding protein D) in dieser Arbeit seroreaktiv

verhielt, erreichte keines der Hbps den etablierten Schwellenwert, um als immundominantes Protein für eine Seromarker-Funktion in Frage zu kommen.

Sehr interessante und vielversprechende Proteine für eine bessere Serodiagnostik einer *B. henselae*-Infektion sind stattdessen das Protein GI 49475876 (YP_033917.1) und die PpiC-Typ Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase GI 49475012 (YP_033053.1), die beide eine intensive und häufige Seroreaktivität ausschließlich mit den untersuchten Patientenseren zeigten. Das Protein GI 49475876 ist identisch mit dem *B. henselae* P26-Protein, einem häufigen immundominanten Antigen bei experimentell mit *B. henselae* infizierten Katzen [343].

Sequenzhomologe Proteine dieser beiden Proteine sind auch in anderen α -Proteobakterien, insbesondere in nahe verwandten Bakterien wie *Rhizobium* spp. und *Brucella* spp., zu finden. Die meisten dieser α -Proteobakterien sind, mit Ausnahme der Brucellen, lediglich apathogene, bodenbewohnende Bakterien [343], was die Bedeutung dieser beiden genannten Proteine als Seromarker für eine *B. henselae*-Serodiagnostik unterstreicht, da dann letztlich nur falsch-positive Resultate bei einer vorliegenden Brucellose denkbar wären. Dieses zu *B. henselae*-Protein GI 49475876 sequenzhomologe, periplasmatische *Brucella* spp.-Protein, auch als CP28, Bp26 oder Omp28 bezeichnet, wurde auch als immundominantes Antigen in verschiedenen Säugetier-Wirten charakterisiert [59, 189, 269, 294]. Bei einer weiteren Untersuchung, die die humorale Immunantwort anhand der Patientenseren mit bestätigter *B. abortus*-Infektion mittels 2D-Immunoproteomics analysierte, scheint keine der Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerasen von *Brucella abortus* 2308 (NC_007624) immunogene Eigenschaften zu besitzen [63]. Demnach könnten die zwei *B. henselae*-Proteine, die PpiC-Typ Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase und möglicherweise das Protein GI 49475876 eine Immunantwort auslösen, die vorrangig auf eine *Bartonella* spp.-Infektion zurückzuführen ist. Es ist aber in folgenden Untersuchungen abzuklären, ob die Seren der Patienten mit *Brucella* spp.-Infektionen bzw. mit *Bartonella* spp.-Infektionen kreuzreaktiv mit dem *B. henselae*-Protein GI 49475876 (P26-Protein) und dem *Brucella* spp.-Protein (CP28, Bp26, Omp28) reagieren.

Es ist an dieser Stelle hervorzuheben, dass auch die üblichen und verbreiteten bakteriellen Proteine wie AccA, Pnp, SodB, trotz der relativ geringen Intensität der beobachteten Seroreaktivität, sowie die intensiver reagierenden Proteine LysS, Pnp und SucC, eine vielversprechende Zusammenstellung an möglichen Seromarker-Proteinen einer *B. henselae*-Infektion darstellen könnten, wenn es zukünftig gelingt, die denkbare Seroreaktivität zu sequenzhomologen Proteinen anderer verwandter, pathogener Bakterien auszuschließen. Dieser Fragestellung sollte in weiteren Untersuchungen über die gegen *Bartonella* spp. gerichtete Immunantwort nachgegangen werden. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass die nicht-identifizierten Proteine a, b, c und f eine sehr starke Seroreaktivität ausschließlich gegenüber der

Patientenseren zeigen, was nahelegt, dass diese Proteine nach erfolgter Identifizierung sehr interessante, zusätzliche Seromarker-Proteine für eine Verbesserung der Serodiagnostik einer *B. henselae*-Infektion darstellen.

Darüber hinaus stellt BadA mit seinem hohen Molekulargewicht von ca. 340 kDa ein hochspezifisches, immundominantes Zielprotein der humoralen Immunantwort gegen *B. henselae* dar [332], das in dieser Untersuchung mittels 2D-Immunoproteomics aufgrund der erwähnten technischen Einschränkungen der 2D-SDS-PAGE nicht erfasst werden konnte.

Es ist offenbar bei einer *B. henselae*-Infektion kein ausgeprägtes, deutlich abgrenzbares Antikörperprofil gegenüber eines einzelnen bestimmten *B. henselae*-Antigens festzustellen, welches bei Seroreaktivität untersuchter Patientenseren dann zwangsläufig eine vorliegende *B. henselae*-Infektion anzeigen würde. Diese Beobachtung steht im Einklang mit früheren Untersuchungen, die zeigten, dass sich die spezifischen Antikörperprofile gegenüber *Bartonella* spp. von Patient zu Patient unterscheiden [26, 193, 213]. Als mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte sich die Hypothese bewahrheiten, dass der variable Genpool einer *B. henselae*-Population eine antigene Variation dieses Bakteriums verursacht und folglich zu einer hochgradig variablen spezifischen Immunantwort eines Wirtes beiträgt [190]. Diese sogenannte Phasenvariation, die zu der antigenen Variation führt, wurde für *B. henselae* anhand des Typ IV-Pilus bereits *in vitro* demonstriert [19, 174]. Dieser Typ IV-Pilus konnte später als der trimäre Autotransporter *Bartonella*-Adhäsion A (BadA) identifiziert werden [262]. Zudem ist bei einer humanen und feline *B. henselae*-Infektion das Entstehen genetischer Varianten innerhalb nachfolgender Generationen eines *B. henselae*-Inokulums *in vivo* sehr wahrscheinlich, da sich die primären *B. henselae*-Isolate aus dem eigentlichen Fehlwirt Mensch und dem natürlichen Reservoirwirt Katze trotz nachweislich einheitlichen genetischen Ursprunges aus verschiedenen genetischen Varianten zusammensetzen. Dieses Entstehen der genetischen Varianten von *B. henselae* war *in vitro* nicht zu beobachten [23].

Dies deutet darauf hin, dass auch aufgrund dieses pathogenetischen Verhaltens eine persistierende Infektion mit *B. henselae* ermöglicht wird, die anhaltende Bakteriämien im natürlichen Reservoirwirt hervorruft [72]. Zudem könnte es darüber hinaus die beobachtete Verschiebung der feline, humoralen, spezifischen Immunantwort während des Infektionsverlaufs mit *B. henselae* erklären [93]. Demzufolge können sowohl der Zeitpunkt nach der Infektion als auch die genetische Variante von *B. henselae* gemeinsam die spezifische Immunantwort bestimmen. Da sich das Antikörperprofil humaner anti-*B. henselae*-Seren im Verlauf einer *B. henselae*-Infektion derart veränderlich zeigen kann, lässt sich eine vorliegende *B. henselae*-Infektion anhand der Seroreaktivität gegenüber nur eines typischen *B. henselae*-Antigens nicht zuverlässig diagnostisch erfassen. Erst eine sinnvolle Kombination ausgewählter immundominanter *B. henselae*-Antigene

dürfte eine zuverlässige Serodiagnostik einer *B. henselae*-Infektion gewährleisten. Anhand dieser hier erbrachten Ergebnisse scheint eine Kombination des Proteins GI 49475876, der PpiC-Typ Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase GI 49475012, des stark antigenen BadA sowie der bislang noch nicht identifizierten Proteine a, b, c und f einen sinnvollen Ansatz zur Entwicklung eines spezifischen, sensitiven serodiagnostischen Testverfahrens für eine *B. henselae*-Infektion darzustellen, um anhand dieser immunogenen und stark seroreaktiven Zielproteine humane anti-*B. henselae*-Seren auch eindeutig als solche zu identifizieren.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die 2D-Immunoblot-Analyse der IFT-positiven Seren von Patienten mit *B. henselae*-Infektion insgesamt 11 identifizierte und 4 bislang noch nicht identifizierte, immundominante Proteine aufzeigte, die alle eine Seroreaktivität mit mindestens 20 % der untersuchten Patientenseren aufwiesen. Davon sollten die zwei spezifischen, immundominanten und stark seroreaktiven Proteine GI 49475876 und die Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase GI 49475012 neben BadA in der *B. henselae*-Serodiagnostik zukünftig Anwendung finden.

4.4 Untersuchung des im Infektionsverlauf mit Endothelzellen ³⁵S-radioaktiv markierten *B. henselae*-Proteoms mittels 2D-SDS-PAGE

Die Besiedlung der vaskulären Endothelzellen mit *B. henselae* stellt vermutlich den ersten Schritt bei der Ausbildung der vaskuloproliferativen Läsionen wie BA und PH dar [10, 226, 286] und histologische Untersuchungen belegen die adhären oder bereits invadierten *B. henselae* in der Gegenwart der proliferierenden, kapillarbildenden Endothelzellen [70, 201]. Daher sind diese Wechselwirkungen zwischen dem pathogenen Bakterium *B. henselae* und den vaskulären Endothelzellen von besonderem wissenschaftlichen Interesse.

Der aktuelle Zustand einer Zelle (z.B. Phase im Zellzyklus, Reaktion auf Stress) zu einem definierten Zeitpunkt ist sehr genau durch die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Proteine gekennzeichnet, da Proteine direkt und unmittelbar an den meisten Funktionen der Zelle beteiligt sind [324, 325]. Die Gesamtheit aller aus einem Genom resultierenden RNA-Transkripte wird als Transkriptom [326], und die Gesamtheit aller aus einem Genom resultierenden Proteine als Proteom [340] bezeichnet. Im Gegensatz zum relativ statischen Genom verhalten sich sowohl Transkriptom als auch Proteom mit Änderungen des zellulären Zustandes infolge eines externen oder internen Stimulus sehr dynamisch. Folglich ermöglicht die qualitative und quantitative Erfassung sowohl des Transkriptoms als auch des Proteoms detaillierte Einblicke in die zellulären Prozesse.

Beide Versuchsansätze besitzen verschiedene methodisch bedingte Vor- und Nachteile. Ein besonderer, zwangsläufig systemimmanenter Nachteil bei der Charakterisierung der zellulären Prozesse anhand der Zusammensetzung der mRNA-Transkripte mittels Microarray-Experimenten liegt darin begründet, dass die Regulation des Transkriptom lediglich einen Aspekt der biologischen Regulation beleuchtet [292]. Auch bei sehr gut annotierten bakteriellen Genomsequenzen ist nicht bekannt, welche Auswirkungen letztlich die Organisation der polycistronischen mRNA, die 5'- und 3'-UTRs (nicht-translatierte mRNA-Region, *untranslated regions*) und das Vorhandensein der sRNA (kleine-nicht-kodierende RNA, *small, non-coding RNA* - auch ncRNA) auf die eigentliche Translation des mRNA-Transkriptes, also auf die Proteinbiosynthese, hat [256]. Auch kann die Stabilität der mRNA-Transkripte und somit der Einfluss auf die Proteinbiosynthese nicht abgeschätzt werden [24]. Es gilt derzeit als erwiesen, dass der Abbau der mRNA-Transkripte [21], die Struktur der 5'-UTRs [27, 66] und das Vorkommen der sRNAs [109, 205, 229, 334] entscheidend die Genexpression beeinflussen und somit die Proteinbiosynthese regulieren. Zudem mehren sich die Hinweise, dass vor allem pathogene Bakterien durch die schnelle, posttranskriptionale Regulation der mRNA-Transkripte die Expression der virulenten Gene steuern [144, 268, 320]. Dennoch stellen Microarray-Experimente unbestritten eine aussagekräftige Methode zur Untersuchung der bakteriellen Genexpression dar. Trotz großer Schwierigkeiten bei der mRNA-Isolation intrazellulärer, pathogener Bakterien konnten kürzlich interessante Ergebnisse, z.B. Überlebensstrategien intrazellulärer *Mycobacterium tuberculosis*-Bakterien aus Makrophagen erbracht werden [126, 141, 285].

Letztlich wird die bakterielle Genexpression nicht nur durch die Regulation der transkriptionalen Mechanismen, sondern auch über die mRNA-Transkripte durch diese posttranskriptionalen Prozesse kontrolliert. Da die Proteine wiederum auch einer Regulation durch ko- und posttranslationale Modifikationen sowie durch gezielte Proteindegradation unterliegen, ist für das Verständnis zellulärer Prozesse eine direkte Untersuchung der Gesamtheit aller Proteine unabdingbar. Ein besonderer Vorteil bei der Charakterisierung der zellulären Prozesse anhand der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Proteine mittels 2D-SDS-PAGE liegt in der Fähigkeit, tausende verschiedene intakte Proteine bzw. Proteinspezies einer komplexen Proteinmischung nach isoelektrischem Punkt (pI), Molekulargewicht (MW), Löslichkeit und relativer Häufigkeit gleichzeitig aufzutrennen. Somit spiegeln sich z.B. Änderungen der Expression eines Proteins (Veränderung der Syntheserate oder Abbaurate) und die Einführungen von Proteinmodifikationen (Proteinisofomen) anhand der Intensität der Proteinpunkte auf dem hergestellten 2D-SDS-PA-Gel wider. Diese Erkenntnisse erlauben schließlich eine genaue Charakterisierung des momentanen zellulären Zustandes [108, 225].

Daher wurden die Wechselwirkungen von *B. henselae* mit den vaskulären Endothelzellen, den eigentlichen Zielzellen einer *Bartonella* spp.-Infektion, in dieser Arbeit mittels 2D-SDS-PAGE anhand des *B. henselae*-Proteoms im Infektionsverlauf mit Endothelzellen untersucht. Dazu wurden *B. henselae* in Gegenwart von Endothelzellen (HUVECs) kultiviert, die im Infektionsverlauf neu synthetisierten bakteriellen Proteine ³⁵S-radioaktiv markiert und anschließend mittels 2D-SDS-PAGE aufgetrennt. Die zwischen den zwei Vergleichszuständen (*B. henselae* –/+ HUVECs) unterschiedlich stark auftretenden *B. henselae*-Proteine stellen dabei offenbar für die Infektion der HUVECs wichtige Proteine dar, die möglicherweise als *B. henselae*-Pathogenitätsfaktoren fungieren. Insgesamt konnten 16 dieser Proteine anschließend mittels MALDI-TOF-MS identifiziert werden.

Es gestaltet sich jedoch schwierig, ohne zusätzliche Untersuchungen für einige der *B. henselae*-Proteine das verstärkte oder verminderte Vorkommen im Infektionsverlauf zu erklären und zu bewerten. Deshalb wurde versucht, durch Datenbankabfragen zusätzliche Informationen über die identifizierten Proteine zu gewinnen [z.B. Bestimmung konservierter Domänen durch Suche in der CDD (Conserved-Domain-Database) bzw. der Pfam-Datenbank, Bestimmung eines möglichen N-terminalen Signalpeptides durch das Programm SignalP]. Um bestimmte Proteine im physiologischen Zusammenhang zu beurteilen, wurde für diese Proteine die KEGG-Datenbank [150-152] und die STRING-Datenbank [142, 329-331] abgefragt. Die mögliche Bedeutung dieser Proteine als potentielle Pathogenitätsfaktoren kann zukünftig jedoch nur durch gezielte Experimente endgültig aufgeklärt werden.

Das in Prokaryoten für die Zellteilung essentielle, tubulinähnliche Zellteilungsprotein FtsZ (P12; Abb. 21) erscheint im *B. henselae*-Infektionsverlauf deutlich weniger synthetisiert zu werden. Dieses Protein gehört zur COG-Kategorie „Zellzykluskontrolle und Zellteilung“ und polymerisiert in einem GTP-getriebenen Prozess zu einer tubulinähnlichen, ringförmigen Struktur an der Stelle der bakteriellen Zellteilung, ermöglicht dort die Bildung der neuen Zellhülle, um schließlich zwei Tochterzellen auszubilden. Die Gene *ftsZ*, *ddlB*, *ftsQ*, and *ftsA* sind in einem Operon organisiert (5'*ddlB-ftsQ-ftsA-ftsZ* 3') und kodieren für homologe Proteine der an der Zellwandsynthese beteiligten D-Alanin-D-Alanin-Ligase (DdlB) sowie für zwei weitere, an der Zellteilung beteiligte Proteine FtsQ und FtsA [89].

Die homooligomere, anorganische Pyrophosphatase PpA (P15; Abb. 21) scheint im *B. henselae*-Infektionsverlauf mit HUVECs verstärkt vorhanden zu sein, was auf einen zunehmenden Energiestoffwechsel hindeutet, da dieses Protein zur funktionellen COG-Kategorie „Energieproduktion und Energieumwandlung“ gehört und das bei vielen ATP-abhängigen, biosynthetischen Reaktionen freigesetzte anorganische Pyrophosphat (PPi) zu ortho-Phosphat (Pi) hydrolysiert (CDD/ KEGG-Datenbank).

Das Phagen-verwandte Protein GI 49475469 (YP_033510) und die Methionin-Aminopeptidase Map kolokalisieren leider in einem einzigen Proteinpunkt, daher ist es nicht möglich zu schlussfolgern, welches der beiden Proteine im *B. henselae*-Infektionsverlauf mit HUVECs weniger stark synthetisiert wurde (P19; Abb. 21). Die Methionin-Aminopeptidase (Methionyl-Aminopeptidase) gehört zur COG-Kategorie „Translation“ und katalysiert die Freisetzung N-terminaler Aminosäuren, vorrangig Methionin, von Proteinen und Peptiden. Das Phagen-verwandte Protein GI 49475469 (YP_033510) gehört keiner funktionellen COG-Kategorie an. Entsprechend der CDD kann es wie andere SSAPs (*DNA-single-strand annealing proteins*, SSAPs) (RecT, Red- β , ERF, Rad52) in RecA-abhängigen und RecA-unabhängigen DNA-Rekombinationsereignissen mitwirken. Auf dem *B. henselae*-Chromosom kommt es in der Nachbarschaft von einer Exonuklease (BH06850) und einer Integrase/ Rekombinase (BH06830) vor (STRING-Datenbank).

Das keiner funktionellen COG-Kategorie zugehörige Protein GI 49476239 (P21; Abb. 21) ist im *B. henselae*-Infektionsverlauf weniger vorhanden. Entsprechend der CDD handelt es sich dabei um ein SapC-verwandtes Protein, welches z.B. bei *Campylobacter fetus* als an Lipopolysaccharid gebundenes Oberflächenprotein (*surface layer protein*, SLP) Serumresistenz vermittelt [319]. In dieser Funktion wäre auch ein vermindertes Vorkommen dieses Proteins im intrazellulären Bereich verständlich, da *B. henselae* in Gegenwart der HUVECs als fakultativ, intrazelluläres Bakterium keinem humoralen Immunsystem (Komplementsystem) ausgesetzt ist.

Das Hitzeschockprotein-70 DnaK ist im *B. henselae*-Infektionsverlauf mit HUVECs offenbar weniger stark vorhanden (P22; Abb. 21). Es gehört der funktionellen COG-Kategorie „Posttranslationale Modifikation, Proteinumsatz, Chaperonine“ an. DnaK unterstützt in Interaktion mit den Ko-chaperonin-Proteinen DnaJ and GrpE die ATP-abhängige Faltung entstehender Polypeptidketten sowie die Rückfaltung fehlgefalteter Polypeptidketten [36, 95, 145]. Zudem spielen diese Proteine, DnaK, GrpE und DnaJ eine wichtige Rolle in der Regulation der Hitzeschockantwort [287]. Die bakterielle, stark konservierte Hitzeschockantwort hilft pathogenen Bakterien, sich an den vielfältigen Umweltstress in der Wirtsumgebung anzupassen [113] - jedoch als fakultativ, intrazelluläres Bakterium sollte dieser im Infektionsverlauf mit Endothelzellen reduziert auftreten. Dies könnte auch die verminderte Expression dieser Hitzeschockproteine erklären.

Die Protease HslV ist im *B. henselae*-Infektionsverlauf kaum noch vorhanden (P27; Abb. 21). Sie gehört der funktionellen COG-Kategorie „Posttranslationale Modifikation, Proteinumsatz, Chaperonine“ an. In *E. coli* bildet die Protease HslV zusammen mit der ATPase HslU einen aus zwei Komponenten bestehenden, dem eukaryotischen Proteasom ähnelnden, proteolytischen, ATP-abhängigen HslVU-Enzymkomplex. Dieser HslVU-Komplex stellt eine proteolytisch aktive

Kammer (HslV-Dodecamer) dar, die aus zwei ringförmigen HslV-Hexameren und zwei flankierenden, ringförmigen HslU-Hexameren/ HslU-Heptameren besteht (CDD) [265, 266].

Das hypothetische Protein GI 49475430 (YP_033471) ist im *B. henselae*-Infektionsverlauf offenbar weniger stark vorhanden (P30; Abb. 21). Es wird der funktionellen COG-Kategorie „Unbekannte Funktion“ zugeordnet und besitzt eine soweit uncharakterisierte, konservierte Proteindomäne DUF-2059 (*Domain of unknown function*) (Pfam-Datenbank). Für dieses Protein wurde ein N-terminales Signalpeptid (SignalP) postuliert, dennoch konnte die endültige Lokalisation des Proteins nicht abschließend vorhergesagt werden (PSORTb). Für dieses Protein existieren sequenzhomologe Proteine in anderen α -Proteobakterien (z.B. *Bartonella* spp., *Brucella* spp., *Sinorhizobium* spp., *Rhizobium* spp., *Agrobacterium tumefaciens*).

Das Protein Phosphoserin-Aminotransferase SerC ist im *B. henselae*-Infektionsverlauf offenbar deutlich verstärkt vorhanden (P31; Abb. 21). Es wird sowohl der funktionellen COG-Kategorie „Aminosäuretransport und Metabolismus“ als auch der COG-Kategorie „Koenzymtransport und Metabolismus“ zugeordnet. Dieses Pyridoxalphosphat-abhängige Enzym katalysiert dabei (i) beim Metabolismus von Serin die reversible Reaktion von 3-Phosphonooxypyruvat (3-Phosphohydroxypyruvat) und L-Glutamat zu 3-Phospho-L-serin und 2-Oxoglutarat sowie (ii) beim Metabolismus von Pyridoxin (Vitamin B6) die reversible Reaktion von 2-Oxo-3-hydroxy-4-phosphonooxybutanoat (2-Oxo-3-hydroxy-4-phosphohydroxybutyrat) und L-Glutamat zu 4-Phosphonooxy-L-threonin [4-(Phosphohydroxy)-L-threonin] und 2-Oxoglutarat (KEGG-Datenbank).

Jedoch fehlt offenbar *B. henselae* (i) für den kompletten, weiteren Stoffwechselweg von Serin-Derivaten die 3-Phospho-D-glycerat-Dehydrogenase zur Bildung von 3-Phospho-D-glycerat und die Phosphoserin-Phosphatase zur Bildung von L-Serin, zudem katalysiert die L-Serin-Dehydratase SdaA die reversible Reaktion von L-Serin zu Pyruvat. *B. henselae* besitzt (ii) für den kompletten, weiteren Stoffwechselweg zum Pyridoxin die notwendige 4-Phosphonooxy-L-threonin-Dehydrogenase PdxA [4-(Phosphohydroxy)-L-threonin-Dehydrogenase]. Diese katalysiert die irreversible NAD^+ -abhängige Reaktion von 4-Phosphonooxy-L-threonin [4-(Phosphohydroxy)-L-threonin] zu 2-Amino-3-oxo-4-phosphonooxybutanoat, welches spontan unter Bildung von 2-Oxo-3-aminopropylphosphat (3-Amino-2-oxopropylphosphate) decarboxyliert. Weiterhin besitzt *B. henselae* die Pyridoxin-5-phosphat-Synthase PdxJ, die die Reaktion von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat und 2-Oxo-3-aminopropylphosphat (3-Amino-2-oxopropylphosphat) unter Entstehung von Pyridoxin-5'-phosphat und Freisetzung von ortho-Phosphat katalysiert.

Es ist derzeit noch nicht bekannt, welcher Stoffwechselweg bei *B. henselae* zur Bildung von 4-Phosphonooxy-L-threonin führt. Jedenfalls scheint 4-Phosphonooxy-L-threonin bei *B. henselae* nicht von der im Pentosephosphatstoffwechsel vorliegenden D-Erythrose-4-phosphat über die

synthetischen Intermediate D-Erythronat-4-phosphat (4-Phospho-D-erythronat) und 2-Oxo-3-hydroxy-4-phosphonooxybutanoat synthetisiert zu werden, da die notwendigen konvertierenden Enzyme D-Erythrose-4-phosphat-Dehydrogenase sowie D-Erythronat-4-phosphat-Dehydrogenase im *B. henselae*-Genom nicht genetisch determiniert sind. Allerdings besitzt *B. henselae* die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase, die die Kondensationsreaktion von Pyruvat und D-Glyceraldehyd-3-phosphat unter Bildung von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat, einem weiteren wichtigen Baustein auf dem Sytheseweg zum Pyridoxin-5'-phosphat, katalysiert. Das lässt darauf schließen, dass mit dem Vorhandensein nahezu aller an der Pyridoxin-5'-phosphat-Synthese beteiligten Enzyme auf dem *B. henselae*-Genom auch die Phosphoserin-Aminotransferase SerC vorrangig an der Transaminierungsreaktion unter Bildung von 4-Phosphonooxy-L-threonin [4-(Phospho-hydroxy)-L-threonin], einen wichtigen Reaktionsschritt bei dem Stoffwechselweg zum Pyridoxin, beteiligt ist. Diese Bedeutung dieses Stoffwechselweges zum Pyridoxin-5'-phosphat für *B. henselae* erscheint nachvollziehbar, da das *B. henselae*-Genom nur sehr wenige Komponenten des Phosphotransferasesystems (PTS) aufweist, z.B. FruB, ManX, PtxN, PtsH, PTS IIA. Jedoch fehlen die für einen PTS-Glucosetransport notwendigen Bestandteile PtsG und Crr als auch bestimmte Schlüsselenzyme des glykolytischen Stoffwechsels (Hexokinase, Phosphofruktokinase) [5]. Vielmehr kodiert das *B. henselae*-Genom für diverse ABC-Transporter [z.B. ABC-Transporter für Glutamat/ Aspartat (GltI, GltJ, GltK, GltL), ABC-Transporter für Aminosäuren mit verzweigten Ketten (LivK, LivH, LivM, LivG, LivF)] und diverse MFS-Transporter (MFS, *Major Facilitator Superfamily*) [z.B. 2-Oxoglutarat-Permease (α -Ketoglutarat-Permease KgtP1, KgtP1, KgtP1)].

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass *B. henselae* bestimmte Aminosäuren, vorrangig Glutamat - aber auch Histidin, Asparagin, Glycin, Serin - keineswegs aber Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle katabolisiert [52]. Das ist besonders für ein pathogenes Bakterium bemerkenswert, da Glucose eine verbreitete, katabolisierbare Energie- und Kohlenstoffquelle insbesondere im Gewebe und Blut eines Wirtes darstellt [52]. Dabei werden diese Aminosäuren zu Intermediaten des Zitratzyklus deaminiert, katabolisiert und entstehende Redoxäquivalente (NADH, FADH) mittels der Elektronentransportkette unter ATP-Bildung und Sauerstoffverbrauch oxidiert [52]. So resultiert eine *B. henselae*-Infektion in einem gesteigerten zellulären Sauerstoffverbrauch [157].

Zudem legen bisherige Untersuchungen nahe, dass der Infektionsverlauf der Endothelzellen mit *B. henselae* mit einer gesteigerten metabolischen Aktivität bei *B. henselae* einhergeht [158]. Da mit zunehmender metabolischer Aktivität, insbesondere mit einem zunehmenden Aminosäurekatabolismus als Kohlenstoff- und Energiequelle, diese Transaminierungsreaktionen der Aminosäuren unter Beteiligung der Pyridoxin-5'-phosphat-abhängige Aminotransferasen verstärkt ablaufen, stellt *B. henselae* möglicherweise durch ein verstärktes Vorkommen der

Phosphoserin-Aminotransferase SerC und einer gesteigerten Syntheserate des Pyridoxin-5'-phosphat eine ausreichende Menge dieses Kofaktors für alle Pyridoxin-5'-phosphat-abhängigen Enzymreaktionen, z.B. Transaminierung, Racemisierung, Decarboxylierung bereit.

Damit *B. henselae* tatsächlich Aminosäuren über den Zitratzyklus katabolisieren kann, müssen diese pathogenen Bakterien (i) die Enzyme für einen kompletten Zitratzyklus besitzen, (ii) die Enzyme für die Umwandlung der Aminosäuren in Intermediate des Zitratzyklus enthalten sowie (iii) über eine Bezugsquelle für Acetyl-CoA und eines C₄- bzw. C₅-Intermediates des Zitratzyklus zur Maximierung des Reduktionspotentials und der ATP-Produktion verfügen [52]. Es sind bei *B. henselae* alle Enzyme- bzw. Enzymkomplexe des Zitratzyklus genetisch determiniert [5] und es konnten bereits alle notwendigen enzymatischen Aktivitäten des Zitratzyklus nachgewiesen werden [52]. Zudem produziert *B. henselae* CO₂, konsumiert O₂ und scheint die nötigen Enzyme zu besitzen, um Histidin und L-Glutamat zu 2-Oxoglutarat, einem C₅-Intermediat des Zitratzyklus, umzusetzen [52]. An dieser Transaminierungsreaktion vom L-Glutamat zu 2-Oxoglutarat könnte z.B. die im *B. henselae*-Genom kodierte L-Aspartat-2-Oxoglutarat-Aminotransferase AatA beteiligt sein. Beim Wachstum von *B. henselae* werden zudem Glycin und Serin verbraucht [52]. Diese werden wahrscheinlich mittels der genetisch determinierten Serinhydroxymethyltransferase GlyA und der L-Serindehydratase SdaA zu Pyruvat umgewandelt und stellen eine mögliche Bezugsquelle für Acetyl-CoA dar.

Das Protein 3-Methyl-2-oxobutanoat-Hydroxymethyltransferase PanB [Ketopantoat-hydroxymethyltransferase (KPHMT)] ist im *B. henselae*-Infektionsverlauf offenbar deutlich verstärkt exprimiert (P35; Abb. 21) und wird der funktionellen COG-Kategorie „Koenzymtransport und Metabolismus“ zugeordnet. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion von 5,10-Methylen-tetrahydrofolat und 3-Methyl-2-oxobutanoat zu Tetrahydrofolat und 2-Dehydropantoat und leitet die Biosynthese des Pantothenat (Vitamin B₅), einer Vorstufe des Coenzym A, ein (CDD). Das *B. henselae*-Genom kodiert zudem auch für die Pantothenatsynthetase PanC (Pantoat-β-alanin-Ligase, Pantoat-aktivierendes Enzym) und weitere im Pantothenat- bzw. Coenzym A-Stoffwechsel beteiligte Enzyme wie Pantothenat-Kinase CoaA, bifunktionale Phosphopantothenoylcystein-Decarboxylase/ Phosphopantothenat-Synthase, Phosphopantethein-Adenyltransferase CoaD, Dephospho-CoA-Kinase CoaE und 4'-Phosphopantetheinyl-Transferase AcpS (STRING-Datenbank).

Da eine *B. henselae*-Infektion der Endothelzellen in einer gesteigerten metabolischen Aktivität bei *B. henselae* resultiert [158], werden insbesondere die Reaktionen des Zitratzyklus als Energiequelle verstärkt ablaufen. Daher stellt *B. henselae* möglicherweise durch ein verstärktes Vorkommen der 3-Methyl-2-oxobutanoat-Hydroxymethyltransferase PanB und einer gesteigerten Syntheserate des 2-Dehydropantoat eine ausreichende Menge dieses Kofaktors Coenzym A für alle

beteiligten Enzyme der CoA-abhängigen, oxidativen Decarboxylierungsreaktionen bereit [z.B. die Reaktion des Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO₂ durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplex (Pyruvat-Dehydrogenase E1-Komponente α -/ β -Untereinheit Pyruvat-Decarboxylase PdhA/ PdhB, Pyruvat-Dehydrogenase E2-Komponente Dihydrolipoamid-Acetyltransferase PdhC, Pyruvat-Dehydrogenase E3-Komponente Dihydrolipoamid-Dehydrogenase PdhD1/ PdhD2) sowie die Reaktion des 2-Oxoglutarat zu Succinyl-CoA und CO₂ durch den 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Multienzymkomplex (2-Oxoglutarat-Dehydrogenase E1-Komponente 2-Oxoglutarat-Decarboxylase Kgd, 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase E2-Komponente Dihydrolipoamid-Succinyltransferase SucB, 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase E3-Komponente Dihydrolipoamid-Dehydrogenase PdhD1/ PdhD2)].

Die 3-Methyl-2-oxobutanoat-Hydroxymethyltransferase PanB und das hypothetische Protein GI 49475409 (YP_033450) befinden sich leider zusammen in einem Proteinpunkt (P37; Abb. 21). Da aber die 3-Methyl-2-oxobutanoat-Hydroxymethyltransferase im *B. henselae*-Metabolismus während des Infektionsverlaufes mit HUVECs eine wichtige Funktion im Energiestoffwechsel besitzt, ist die verstärkte Intensität des Proteinpunktes wahrscheinlich auf die bereits beschriebene Zunahme dieses Enzyms 3-Methyl-2-oxobutanoat-Hydroxymethyltransferase PanB zurückzuführen. Über das hypothetische Protein GI 49475409 ist wenig bekannt und es wurde von PSORTb als zytoplasmatisches Protein vorhergesagt, obwohl ein Signalpeptid vom SignalP-Algorithmus erkannt wird. Die Pfam-Datenbank zeigt eine konservierte, uncharakterisierte Domäne DUF-1849.

Auch das Proteinexport-Protein SecB ist im *B. henselae*-Infektionsverlauf offenbar deutlich verstärkt vorhanden (P39; Abb. 21). Es wird der funktionellen COG-Kategorie „Intrazellulärer Transport und Sekretion“ zugeordnet und stellt ein für den Export-spezifisches Chaperonin-Protein dar. Das homotetramere Protein SecB ist eine zytoplasmatische Komponente des membrangebundenen Mehrkomponenten-Enzymsystems Sec-Protein-Translokase, die an der Translokation entstehender Polypeptide über die zytoplasmatische Membran beteiligt ist (CDD). Dabei bindet das Chaperonin-Protein SecB selektiv Präproteine und liefert diese in einem Translokations-kompetenten Zustand der membrangebundenen ATPase SecA zu, die dann die eigentliche Translokationsreaktion antreibt [36, 119, 160]. Das *B. henselae*-Genom kodiert für alle notwendigen Komponenten des Sec-abhängigen Protein-Exportsystems (SecA, SecB, SecD - SecG, SecY, YajC, YidC, Signalpeptidase I/II), so dass von einem voll funktionsfähigen Translokationssystem ausgegangen werden kann. Möglicherweise erfordert eine *B. henselae*-Infektion der Endothelzellen eine vermehrte Sekretion diverser *B. henselae*-Proteine, um ein erfolgreiches Interagieren von *B. henselae* mit dem intrazellulären Milieu zu ermöglichen. Denkbar wäre eine vermehrte Sekretion, z.B. periplasmatischer Bindeproteine (*periplasmic binding proteins*,

PBPs) der bakteriellen, periplasmatischen Transportsysteme [z.B. periplasmatische Aminosäure-Bindeproteine eines ABC-Transporters für Aminosäuren mit verzweigten Ketten (GI 49475594/ YP_033635)]. Solche PBPs existieren für verschiedenste Substrate wie Aminosäuren, Peptide, Zucker, Vitamine, anorganische Ionen. Durch eine vermehrte Sekretion dieser bakteriellen, periplasmatischen Transportsysteme würde *B. henselae* auch seinen hohen Stoffwechsel im intrazellulären Milieu abdecken können, was dann wiederum auch eine verstärkte Expression des Proteinexport-Proteins SecB erklären würde.

Das hypothetische Protein GI 49475388 (YP_033429) ist im *B. henselae*-Infektionsverlauf offenbar deutlich weniger exprimiert (P10; Abb. 24). Es wird der funktionellen COG-Kategorie „Unbekannte Funktion“ zugeordnet und besitzt eine soweit uncharakterisierte, konservierte Proteindomäne DUF-2155 (Pfam-Datenbank), die auch für andere hypothetische, prokaryotische Proteine nachgewiesen wurde. Für dieses Protein wurde ein N-terminales Signalpeptid postuliert (SignalP), dennoch konnte die endültige Lokalisation des Proteins nicht abschließend vorhergesagt werden (PSORTb). Es existieren sequenzhomologe Proteine in anderen α -Proteobakterien (z.B. *Bartonella* spp., *Brucella* spp., *Sinorhizobium* spp., *Rhizobium* spp., *Agrobacterium tumefaciens*).

Das Protein Dihydrolipoamid-Acyltransferase PdhC ist im *B. henselae*-Infektionsverlauf offenbar verstärkt exprimiert (P18; Abb. 24). Es wird der funktionellen COG-Kategorie „Energieproduktion und Energieumwandlung“ zugeordnet und ist allgemein als Dihydrolipoamid-Acyltransferase PdhC im *B. henselae*-Genom als E2-Komponente eines Dehydrogenase-Multienzymkomplexes für 2-Oxosäuren mit verzweigten Ketten annotiert [5], der 2-Oxosäuren zu Acyl-CoA und CO₂ umsetzt [336]. Alle soweit untersuchten 2-Oxosäure-Dehydrogenase-Multienzymkomplexe bestehen aus den E1-, E2- und E3-Komponenten (z.B. Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplex, 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase-Multienzymkomplex), wobei die E1-Komponente α -/ β -Untereinheit und die E2-Komponente eine gewisse Substratspezifität besitzen, hingegen ist die E3-Komponente zwischen den verschiedenen Enzymkomplexen austauschbar [336]. Als Dihydrolipoamid-Acetyltransferase stellt PdhC zugleich die E2-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplexes dar, der die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO₂ katalysiert. Der Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplex besteht aus der E1-Komponente α -/ β -Untereinheit Pyruvat-Decarboxylase PdhA/ PdhB, der E2-Komponente Dihydrolipoamid-Acetyltransferase PdhC sowie der E3-Komponente Dihydrolipoamid-Dehydrogenase PdhD1/ PdhD2. Da eine *B. henselae*-Infektion der Endothelzellen offenbar mit einer gesteigerten metabolischen Aktivität bei *B. henselae* einhergeht [158], werden bestimmte Schlüsselreaktionen des Stoffwechsels (z.B. die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA) verstärkt ablaufen. Insofern ist auch ein vermehrtes Vorhandensein der E2-Komponente PdhC als Dihydrolipoamid-Acetyltransferase bzw. als

Dihydrolipoamid-Acyltransferase nachvollziehbar. Zudem wurde gezeigt, dass die Dihydrolipoamid-Acyltransferase essentiell für eine *Mycobacterium tuberculosis*-Infektion ist [303].

Das Protein Leucyl-Aminopeptidase PepA ist im *B. henselae*-Infektionsverlauf deutlich verstärkt vorhanden (P27; Abb. 24). Es gehört zu der funktionellen COG-Kategorie „Aminosäuretransport und Metabolismus“. Das Zn^{2+} -abhängige homohexamere Enzym PepA katalysiert die Abspaltung vorrangig von Leucin, aber auch weiterer Aminosäuren vom N-terminalen Ende eines Proteins (CDD). Bei der bakteriellen Replikation können unerwünschte Rekombinationsereignisse auch zu Chromosomen-Dimeren führen, die mittels bakterieller XerD/C-Rekombinasen aufgelöst werden müssen [185], und auch das *B. henselae*-Genom kodiert für die Integrase/ Rekombinase XerD und für die Tyrosin-Rekombinase XerC. Neben zwei verwandten Rekombinasen ist auch PepA bei der Xer-vermittelten Rekombination an der Xer-spezifischen Rekombinationsstelle (*dif*) an der Trennung der bakteriellen Chromosomen-Dimere in die jeweiligen Monomere beteiligt, ohne dass die eigentliche Aminopeptidase-Aktivität für die Xer-vermittelte Rekombination notwendig ist [212].

Das 30S-ribosomale Protein S6 (RpsF) ist im *B. henselae*-Infektionsverlauf mit HUVECs offenbar deutlich verstärkt exprimiert (P37; Abb. 24). Als ribosomales Protein gehört es der funktionellen COG-Kategorie „Translation“ an. Es bindet laut CDD zusammen mit dem 30S-ribosomalen Protein S18 (RpsR) an den Komplex aus 30S-ribosomale Protein S15 (RpsO) und der 16S-rRNA. Bei heterotrophen Bakterien verhält sich die zelluläre Konzentration der Ribosomen zur Geschwindigkeit der Proteinbiosynthese und zur Aktivität des Stoffwechsels proportional [75, 230]. Die Synthesegeschwindigkeit der Ribosomen hängt von der rRNA-Synthese ab [179, 230] und somit korreliert der zelluläre rRNA-Gehalt direkt mit der metabolischen Aktivität [75]. In Gegenwart der Endothelzellen synthetisiert *B. henselae* vermehrt rRNA und zeigt demnach eine gesteigerte Stoffwechselaktivität [158]. In diesem Zusammenhang ist auch ein verstärktes Auftreten der ribosomalen Proteine wie des 30S-ribosomalen Proteins S6 (RpsF) zu erwarten, um die am Stoffwechsel beteiligten Enzyme bereitzustellen und belegt damit die gesteigerte Stoffwechselleistung von *B. henselae* in Gegenwart der Endothelzellen auch auf Proteinebene.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass neben dem 30S-ribosomalen Protein S6 auch andere Proteine wie die Anorganische Pyrophosphatase PpA (P15; Abb. 21), die Phosphoserin-Aminotransferase SerC (P31; Abb. 21), die 3-Methyl-2-oxobutanoat-Hydroxymethyltransferase PanB (P35,P37; Abb. 21), das Proteinexport-Protein SecB (P39; Abb. 21), die Dihydrolipoamid-Acyltransferase/ 2-Oxosäure-Dehydrogenase - E2-Komponente PdhC (P18; Abb. 24), Leucyl-Aminopeptidase PepA (P27; Abb. 24) durch verstärkte Expression in der Gegenwart von HUVECs auf eine gesteigerte Stoffwechselaktivität von *B. henselae* schließen lassen. Auch bei einigen der im

Infektionsverlauf mit HUVECs vermindert exprimierte Proteine wie der ATP-abhängigen Protease-Untereinheit HslV (P27; Abb. 21), dem Hitzeschockprotein-70 DnaK (P22; Abb. 21) und dem SapC-verwandten Protein GI 49476239 (P21; Abb. 21) ist das geringere Vorkommen nachvollziehbar. Da im intrazellulären Milieu von optimalen Bedingungen für *B. henselae* ausgegangen werden kann, scheint eine Stressantwort des Bakteriums unwahrscheinlich zu sein. Somit ist eine Chaperonin-abhängige Rückfaltung fehlgefalteter Proteine durch das Hitzeschockprotein-70 DnaK eine weniger benötigte zelluläre Funktion von *B. henselae*. Die gesteigerte rRNA-Synthese von *B. henselae* in Gegenwart der Endothelzellen [158] reflektiert eine verstärkte bakterielle Proteinbiosynthese, und ein proteasomaler Proteinabbau durch die ATP-abhängige Protease-Untereinheit HslV ist eine zugleich reduzierbare, zelluläre Funktion. Auch ist das potentielle Vermitteln von Serumresistenz durch ein SapC-verwandtes Protein entbehrlich im intrazellulären Milieu. In zukünftigen experimentellen Ansätzen sollte die Funktion der im Infektionsverlauf mit HUVECs regulierten hypothetischen Proteine aufgeklärt werden. Den im Infektionsverlauf mit HUVECs stärker auftretenden hypothetischen Proteinen GI 49475430 (P30; Abb. 21) und GI 49475388 (P10; Abb. 24) könnte eine Funktion bei der Pathogenese von *B. henselae* zukommen - ebenso interessant erscheint das verminderte Vorkommen des hypothetischen Proteins GI 49475409 (P37; Abb. 21).

Durch diese Untersuchung des im Infektionsverlauf mit Endothelzellen ³⁵S-radioaktiv markierten *B. henselae*-Proteoms mittels 2D-SDS-PAGE konnten neue Einblicke in das Verhalten von *B. henselae* in Gegenwart der HUVECs gewonnen werden. Insbesondere sind die metabolischen Besonderheiten dieses Bakteriums im Zusammenhang mit früheren Beobachtungen bemerkenswert, da die Ergebnisse nahelegen, dass *B. henselae* auch während einer Infektion der Endothelzellen vorrangig bestimmte Aminosäuren wie Glutamat - aber auch Histidin, Asparagin, Glycin und Serin als Kohlenstoff- und Energiequelle katabolisiert [52]. Dabei werden diese Aminosäuren zu Intermediaten des Zitratzyklus deaminiert, katabolisiert und entstehende Redoxäquivalente (NADH, FADH) mittels der Elektronentransportkette unter ATP-Bildung und Sauerstoffverbrauch oxidiert, was in einem gesteigerten zellulären Sauerstoffverbrauch resultiert [52].

Neben dem indirekten serologischen Erregernachweis, z.B. IFT, welcher auf dem Nachweis von gegen *Bartonella* spp. gerichteten Antikörpern im Patientenserum basiert [48], kann der Nachweis des Erregers auch direkt entweder durch die Anzucht [308] oder durch den DNA-Nachweis mittels PCR (z.B. über die Amplifikation der 16S rRNA-Gene) erfolgen [8, 80, 210]. Bisher machte die technisch aufwändige kulturelle Anzucht von *Bartonella* spp. Wachstumsbedingungen mit längeren Inkubationsphasen (21 d - 45 d) erforderlich [177, 308], so dass die Erregeranzucht für *Bartonella* spp.-Infektionen bisher nicht als effektive und reproduzierbare diagnostische Methode galt [177, 211]. Kürzlich konnte jedoch diese Inkubationsphase für eine *Bartonella* spp.-Kultur

durch eine veränderte Zusammensetzung des Kulturmediums deutlich verkürzt werden (7 - 10 d) [198, 263]. Sollte das Wachstum von *Bartonella* spp. in Kultur z.B. durch Zugabe diverser Aminosäuren z.B. L-Glutamat weiterhin verbessert werden, dann ist bei einer entsprechend kurzen Anzuchtphase ein direkter Erregernachweis anhand der Kultivierung von *Bartonella* spp. aus dem Patientenisolat neben dem indirekten serologischen Nachweis ein wertvolles, zusätzliches, diagnostisches Instrument.

5 Zusammenfassung

Das humanpathogene Bakterium *B. henselae* verursacht bei immunkompetenten Patienten in der Regel die sogenannte „Katzenkratzkrankheit“ und kann bei immunsupprimierten Patienten vaskuloproliferative Krankheitsbilder (Bazilläre Angiomatose, Peliosis hepatis) hervorrufen. Da über die grundlegenden pathogenetischen Mechanismen zur Ausbildung der vaskuloproliferativen Läsionen noch immer wenig bekannt ist und die Erfassung des *B. henselae*-Proteoms detaillierte Einblicke in die Infektionsbiologie des Erregers ermöglicht, sollte in dieser Arbeit das *B. henselae*-Proteom im Infektionsverlauf mit Endothelzellen, den eigentlichen Zielzellen einer *B. henselae*-Infektion, charakterisiert werden.

Zunächst wurde ein 2D-SDS-PAGE-System etabliert, das die reproduzierbare Auftrennung extrahierter *B. henselae*-Proteine ermöglicht. Dabei stellte sich heraus, dass die bislang verwendeten thiolbasierten (z.B. DTT) und phosho-basierten Proteinreduktionsmittel (z.B. TBP) den technischen Ansprüchen der 2D-SDS-PAGE aufgrund verschiedener nachteiliger Eigenschaften (z.B. geringe Löslichkeit, schlechte Ladungseigenschaften) nicht gerecht werden. Stattdessen erwies sich das erstmals auf die Verwendbarkeit im gesamten pH-Bereich der 2D-SDS-PAGE untersuchte phosho-basierte Reduktionsmittel TCP [Tris-(2-cyanoethyl)-phosphin] als ein ausgesprochen geeignetes Proteinreduktionsmittel, durch dessen Einsatz eine qualitativ und quantitativ reproduzierbare Auftrennung komplexer analytischer und präparativer Mengen der *B. henselae*-Proteine auf allen erstellten 2D-SDS-PA-Gelen erzielt wurde.

Mit diesem 2D-SDS-PAGE-System wurde erstmalig eine umfassende 2D-Proteomkarte vom gesamten *B. henselae*-Proteom erstellt. Mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurde eine Anzahl von 431 Proteinpunkten identifiziert, die insgesamt 191 verschiedene Proteine repräsentieren - darunter befinden sich auch 16 hypothetische Proteine. Neben Einblicken in die Zusammensetzung des *B. henselae*-Proteoms erlaubte diese hergestellte *B. henselae*-Proteomkarte darüber hinaus mit 2D-Immunoblot-Verfahren unter Verwendung von 33 anti-*B. henselae*-Antikörper enthaltenden Patientenseren und 5 negativen Kontrollseren den Nachweis zahlreicher, *in vivo* exprimierter, seroreaktiver *B. henselae*-Antigene.

Vom gesamten immunogenen *B. henselae*-Proteom zeigten 11 identifizierte und 4 bislang noch nicht identifizierte Proteine eine Seroreaktivität mit mindestens 20 % der untersuchten Patientenseren. Von diesen immundominanten *B. henselae*-Proteinen erwiesen sich zwei Proteine (Protein GI 49475876, Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase GI 49475012) als *B. henselae*-spezifische Antigene und somit als vielversprechende, serodiagnostische Markerproteine einer *B. henselae*-Infektion.

Offensichtlich wird bei einer *B. henselae*-Infektion kein charakteristisches, abgrenzbares Antikörperprofil gegenüber eines einzelnen bestimmten *B. henselae*-Antigens entwickelt. Daher dürfte erst eine Zusammenstellung typischer *B. henselae*-Seromarker ein zuverlässiges diagnostisches Erfassen einer *B. henselae*-Infektion erlauben. Da derzeit verwendete Immunfluoreszenztests (IFTs) zur serologischen Diagnostik einer *B. henselae*-Infektion unter Kreuzreaktivitäten gegenüber weiteren humanpathogenen Bakterien leiden, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Kombination von drei immundominanten *B. henselae*-Proteinen (Protein GI 49475876, Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase GI 49475012, *Bartonella*-Adhäsın A) vorgeschlagen, um zukünftig eine verbesserte *B. henselae*-Serodiagnostik zu gewährleisten.

Weiterhin wurden *in vitro* die Wechselwirkungen zwischen *B. henselae* und den vaskulären Endothelzellen (HUVECs) mittels ³⁵S-radioaktiver Markierung bakterieller Proteine und 2D-SDS-PAGE untersucht. Die während der Infektion mit HUVECs regulierten *B. henselae*-Proteine erschienen als unterschiedlich stark auftretende ³⁵S-radioaktive Proteinpunkte auf den 2D-SDS-PAGE-Gelen zwischen den zwei Vergleichszuständen (*B. henselae* -/+ HUVECs). Insgesamt konnten 16 dieser regulierten *B. henselae*-Proteine mittels MALDI-TOF-MS identifiziert werden - darunter befinden sich auch drei weitere hypothetische, bislang nicht charakterisierte Proteine. Die im Infektionsverlauf mit HUVECs verstärkt synthetisierte Phosphoserin-Aminotransferase SerC weist beispielsweise darauf hin, dass *B. henselae* intrazellulär verstärkt u.a. Aminosäuren als Energiequelle katabolisiert.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit (i) durch die Verwendung des Reduktionsmittel TCP ein gut wasserlösliches und ungeladenes, potentes Proteinreduktionsmittel für die 2D-SDS-PAGE erschlossen, das die Herstellung äußerst reproduzierbarer 2D-SDS-PAGE-Gele ermöglicht. Darauf aufbauend wurde (ii) erstmalig eine umfassende 2D-Proteomkarte des gesamten Proteoms von *B. henselae* mit 431 annotierten Proteinpunkten, die 191 Proteine repräsentieren, erstellt. Durch 2D-Immunoblot-Verfahren wurde eine Kombination von drei immundominanten, *B. henselae*-spezifischen Antigenen als Seromarker-Proteine für eine zuverlässigere *B. henselae*-Serodiagnostik gefunden. Zudem wurden (iii) 16 im Infektionsverlauf mit HUVECs als reguliert nachgewiesene *B. henselae*-Proteine identifiziert, die zukünftig neue detaillierte Einsichten in die Infektionsbiologie von *B. henselae* eröffnen sollten.

6 Literatur

1. Adal, K. A., Cockerell, C. J., Petri-WA, Jr, Cat scratch disease, bacillary angiomatosis, and other infections due to *Rochalimaea*. *N. Engl. J. Med.* 1994, 330, 1509-1515.
2. Aebersold, R., Mann, M., Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003, 422, 198-207.
3. Agan, B. K., Dolan, M. J., Laboratory diagnosis of *Bartonella* infections. *Clin. Lab. Med.* 2002, 22, 937-962.
4. Aggarwal, B. B., Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* 2004, 6, 203-208.
5. Alsmark, C. M., Frank, A. C., Karlberg, E. O., Legault, B. A. et al., The louse-borne human pathogen *Bartonella quintana* is a genomic derivative of the zoonotic agent *Bartonella henselae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2004, 101, 9716-9721.
6. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J. et al., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 3389-3402.
7. Amano, Y., Rumbea, J., Knobloch, J., Olson, J. et al., Bartonellosis in Ecuador: serosurvey and current status of cutaneous verrucous disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997, 57, 174-179.
8. Anderson, B., Goldsmith, C., Johnson, A., Padmalayam, I. et al., Bacteriophage-like particle of *Rochalimaea henselae*. *Molecular Microbiology* 1994, 13, 67-73.
9. Anderson, B., Lu, E., Jones, D., Regnery, R., Characterization of a 17-kilodalton antigen of *Bartonella henselae* reactive with sera from patients with cat scratch disease. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 2358-2365.
10. Anderson, B. E., Neuman, M. A., *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997, 10, 203-219.
11. Arias-Stella, J., Lieberman, P. H., Erlandson, R. A., Arias-Stella, J., Jr., Histology, immunohistochemistry, and ultrastructure of the verruga in Carrion's disease. *Am. J. Surg. Pathol.* 1986, 10, 595-610.
12. Bae, S. H., Harris, A. G., Hains, P. G., Chen, H. et al., Strategies for the enrichment and identification of basic proteins in proteome projects. *Proteomics* 2003, 3, 569-579.
13. Bais, C., Santomaso, B., Coso, O., Arvanitakis, L. et al., G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. *Nature* 1998, 391, 86-89.
14. Barton, A. L., Descripción de elementos endo-globulares hallados en las enfermos de fiebre verrucosa. *La Crónica Médica de Lima* 1909, 26, 7-10.
15. Bass, J. W., Vincent, J. M., Person, D. A., The expanding spectrum of *Bartonella* infections: I. Bartonellosis and trench fever. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1997, 16, 2-10.
16. Bass, J. W., Vincent, J. M., Person, D. A., The expanding spectrum of *Bartonella* infections: II. Cat-scratch disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1997, 16, 163-179.
17. Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R. et al., The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 2002, 30, 276-280.
18. Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D. et al., The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 2004, 32, 138-141.

19. Batterman, H. J., Peek, J. A., Loutit, J. S., Falkow, S. et al., *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. *Infect. Immun.* 1995, *63*, 4553-4556.
20. Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von, Heijne G., Brunak, S., Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 2004, *340*, 783-795.
21. Bensinger, W. I., Berenson, R. J., Andrews, R. G., Kalamasz, D. F. et al., Positive selection of hematopoietic progenitors from marrow and peripheral blood for transplantation. *J. Clin. Apheresis.* 1990, *5*, 74-76.
22. Benson, L. A., Kar, S., McLaughlin, G., Ihler, G. M., Entry of *Bartonella bacilliformis* into erythrocytes. *Infect. Immun.* 1986, *54*, 347-353.
23. Berghoff, J., Viezens, J., Guptill, L., Fabbi, M. et al., *Bartonella henselae* exists as a mosaic of different genetic variants in the infected host. *Microbiology* 2007, *153*, 2045-2051.
24. Bernstein, J. A., Khodursky, A. B., Lin, P. H., Lin-Chao, S. et al., Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2002, *99*, 9697-9702.
25. Birtles, R. J., Harrison, T. G., Saunders, N. A., Molyneux, D. H., Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995, *45*, 1-8.
26. Boonjakuakul, J. K., Gerns, H. L., Chen, Y. T., Hicks, L. D. et al., Proteomic and immunoblot analysis of *Bartonella quintana* total membrane proteins identifies antigens recognized by serum from infected patients. *Infect. Immun.* 2007, *75*:2548-2561
27. Brantl, S., Bacterial gene regulation: from transcription attenuation to riboswitches and ribozymes. *Trends Microbiol.* 2004, *12*, 473-475.
28. Brenner, D. J., O'Connor, S. P., Winkler, H. H., Steigerwalt, A. G., 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.* 1993, *43*, 777-786.
29. Brenner, S. A., Rooney, J. A., Manzewitsch, P., Regnery, R. L., Isolation of *Bartonella (Rochalimaea) henselae*: effects of methods of blood collection and handling. *J. Clin. Microbiol.* 1997, *35*, 544-547.
30. Brouqui, P., LaScola, B., Roux, V., Raoult, D., Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients. *N. Engl. J. Med.* 1999, *340*, 184-189.
31. Brouqui, P., Raoult, D., *Bartonella quintana* invades and multiplies within endothelial cells in vitro and in vivo and forms intracellular blebs. *Res. Microbiol.* 1996, *147*, 719-731.
32. Bunk, S., Susnea, I., Rupp, J., Summersgill, J. T. et al., Immunoproteomic identification and serological responses to novel *Chlamydia pneumoniae* antigens that are associated with persistent *C. pneumoniae* infections. *J. Immunol.* 2008, *180*, 5490-5498.
33. Burgess, A. W., Anderson, B. E., Outer membrane proteins of *Bartonella henselae* and their interaction with human endothelial cells. *Microb. Pathog.* 1998, *25*, 157-164.

34. Burgess, A. W., Paquet, J. Y., Letesson, J. J., Anderson, B. E., Isolation, sequencing and expression of *Bartonella henselae* omp43 and predicted membrane topology of the deduced protein. *Microb. Pathog.* 2000, 29, 73-80.
35. Burns, J. A., Butler J.C., Moran J., Whitesides G.M., Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-carboxyethyl)phosphine. *Journal of Organic Chemistry* 1997, 56, 2648-2650.
36. Butland, G., Peregrin-Alvarez, J. M., Li, J., Yang, W. et al., Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature* 2005, 433, 531-537.
37. Büttner, K., Bernhardt, J., Scharf, C., Schmid, R. et al., A comprehensive two-dimensional map of cytosolic proteins of *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis* 2001, 22, 2908-2935.
38. Carbone, A., Zinovyev, A., Kepes, F., Codon adaptation index as a measure of dominating codon bias. *Bioinformatics.* 2003, 19, 2005-2015.
39. Carithers, H. A., Cat-scratch disease. An overview based on a study of 1200 patients. *Am. J. Dis. Child* 1985, 139, 1124-1133.
40. Carmeliet, P., Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005, 438, 932-936.
41. Carmeliet, P., Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 2000, 6, 389-395.
42. Carmeliet, P., Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 2003, 9, 653-660.
43. Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S. et al., Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996, 380, 435-439.
44. Carmeliet, P., Jain, R. K., Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000, 407, 249-257.
45. Caron, K. M., Smithies, O., Extreme hydrops fetalis and cardiovascular abnormalities in mice lacking a functional Adrenomedullin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2001, 98, 615-619.
46. Carroll, J. A., Coleman, S. A., Smitherman, L. S., Minnick, M. F., Hemin-binding surface protein from *Bartonella quintana*. *Infect.Immun.* 2000, 68, 6750-6757.
47. Cascales, E., Christie, P. J., The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 2003, 1, 137-149.
48. Centers of Disease Control and Prevention (CDC), Serodiagnosis of Emerging Infectious Diseases: *Bartonella* and *Ehrlichia* Infections (course manual). 1999
49. Chan, L. L., Lo, S. C., Hodgkiss, I. J., Proteomic study of a model causative agent of harmful red tide, *Prorocentrum triestinum* I: Optimization of sample preparation methodologies for analyzing with two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 2002, 2, 1169-1186.
50. Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M. S., Lee, F. et al., Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994, 266, 1865-1869.
51. Chatterjee, M., Chatterjee, D., Developmental changes in the neuronal protein composition: a study by high resolution 2D-gel electrophoresis. *Mol. Cell Biochem.* 2005, 272, 201-207.
52. Chenoweth, M. R., Somerville, G. A., Krause, D. C., O'Reilly, K. L. et al., Growth characteristics of *Bartonella henselae* in a novel liquid medium: primary isolation, growth-phase-dependent phage induction, and metabolic studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, 656-663.

53. Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merio, D. J., Sciaky, D. et al., Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 1977, 11, 263-271.
54. Chomel, B. B., Cat-scratch disease. *Rev. Sci. Tech.* 2000, 19, 136-150.
55. Chomel, B. B., Kasten, R. W., Floyd-Hawkins, K., Chi, B. et al., Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 1952-1956.
56. Chomel, B. B., Kasten, R. W., Sykes, J. E., Boulouis, H. J. et al., Clinical impact of persistent *Bartonella* bacteremia in humans and animals. *Annals* 2003, 990, 267-278.
57. Christie, P. J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S. et al., Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 2005, 59, 451-485.
58. Cline, D. J., Redding, S. E., Brohawn, S. G., Psathas, J. N. et al., New water-soluble phosphines as reductants of peptide and protein disulfide bonds: reactivity and membrane permeability. *Biochemistry* 2004, 43, 15195-15203.
59. Cloeckaert, A., Baucheron, S., Vizcaino, N., Zygmunt, M. S., Use of recombinant BP26 protein in serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001, 8, 772-775.
60. Cockerell, C. J., Bergstresser, P. R., Myrie-Williams, C., Tierno, P. M., Bacillary epithelioid angiomatosis occurring in an immunocompetent individual. *Arch. Dermatol.* 1990, 126, 787-790.
61. Cockerell, C. J., Whitlow, M. A., Webster, G. F., Friedman-Kien, A. E., Epithelioid angiomatosis: a distinct vascular disorder in patients with the acquired immunodeficiency syndrome or AIDS-related complex. *Lancet* 1987, 2, 654-656.
62. Conley, T., Slater, L., Hamilton, K., *Rochalimaea* species stimulate human endothelial cell proliferation and migration in vitro. *J. Lab. Clin. Med.* 1994, 124, 521-528.
63. Connolly, D. T., Heuvelman, D. M., Nelson, R., Olander, J. V. et al., Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 1989, 84, 1470-1478.
64. Connolly, J. P., Comerci, D., Alefantis, T. G., Walz, A. et al., Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development. *Proteomics* 2006, 6, 3767-3780.
65. Cooper, M. D., Hollingdale, M. R., Vinson, J. W., Costa, J., A passive hemagglutination test for diagnosis of trench fever due to *Rochalimaea quintana*. *J. Infect. Dis.* 1976, 134, 605-609.
66. Coppins, R. L., Hall, K. B., Groisman, E. A., The intricate world of riboswitches. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007, 10, 176-181.
67. Dabo, S. M., Confer, A. W., Anderson, B. E., Gupta, S., *Bartonella henselae* Pap31, an extracellular matrix adhesin, binds the fibronectin repeat III13 module. *Infect. Immun.* 2006, 74, 2513-2521.
68. Debré, R., Lamy, M., Jammet, M. L., Costil, L. et al., La maladie des griffes du chat. *Bull. Mem. Soc. Med. Hop.* 1950, 66, 76-79.
69. Dehio, C., Molecular and cellular basis of *Bartonella* pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 2004, 58, 365-390.

70. Dehio, C., Interactions of *Bartonella henselae* with vascular endothelial cells. *Curr. Opin. Microbiol* 1999, 2, 78-82.
71. Dehio, C., *Bartonella* interactions with endothelial cells and erythrocytes. *Trends Microbiol.* 2001, 9, 279-285.
72. Dehio, C., *Bartonella* interactions with endothelial cells and erythrocytes. *Trends Microbiol.* 2001, 9, 279-285.
73. Dehio, C., *Bartonella*-host-cell interactions and vascular tumour formation. *Nat. Rev. Microbiol* 2005, 3, 621-631.
74. Dehio, C., Meyer, M., Berger, J., Schwarz, H. et al., Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. *J. Cell Sci.* 1997, 110, 2141-2154.
75. DeLong, E. F., Wickham, G. S., Pace, N. R., Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 1989, 243, 1360-1363.
76. Derrick, S. C., Ihler, G. M., Deformin, a substance found in *Bartonella bacilliformis* culture supernatants, is a small, hydrophobic molecule with an affinity for albumin. *Blood Cells Mol. Dis.* 2001, 27, 1013-1019.
77. Dramsi, S., Cossart, P., Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1998, 14, 137-166.
78. Drancourt, M., Birtles, R., Chaumentin, G., Vandenesch, F. et al., New serotype of *Bartonella henselae* in endocarditis and cat-scratch disease. *Lancet* 1996, 347, 441-443.
79. Drancourt, M., Mainardi, J. L., Brouqui, P., Vandenesch, F. et al., *Bartonella (Rochalimaea)* quintana endocarditis in three homeless men. *N. Engl. J. Med.* 1995, 332, 419-423.
80. Drancourt, M., Raoult, D., Proposed tests for the routine identification of *Rochalimaea* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1993, 12, 710-713.
81. Drews, O., Reil, G., Parlar, H., Görg, A., Setting up standards and a reference map for the alkaline proteome of the Gram-positive bacterium *Lactococcus lactis*. *Proteomics* 2004, 4, 1293-1304.
82. Dvorak, H. F., Nagy, J. A., Feng, D., Brown, L. F. et al., Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1999, 237, 97-132.
83. Eidlitz-Markus, T., Zeharia, A., Images in clinical medicine. Cat scratch disease lymphadenopathy. *N. Engl. J. Med.* 2006, 354, e17.
84. Elman, G. L., A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch. Biochem. Biophys.* 1958, 74, 443-450.
85. Ellman, G. L., Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959, 82, 70-77.
86. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. et al., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989, 246, 64-71.
87. Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1999, 237, 1-30.

88. Finn, R. D., Mistry, J., Schuster-Bockler, B., Griffiths-Jones, S. et al., Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res.* 2006, *34*, 247-251.
89. Fiskus, W., Padmalayam, I., Kelly, T., Guibao, C. et al., Identification and characterization of the DdlB, FtsQ and FtsA genes upstream of FtsZ in *Bartonella bacilliformis* and *Bartonella henselae*. *DNA Cell Biol.* 2003, *22*, 743-752.
90. Flore, O., Rafii, S., Ely, S., O'Leary, J. J. et al., Transformation of primary human endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Nature* 1998, *394*, 588-592.
91. Folkman, J., What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab. Invest.* 1984, *51*, 601-604.
92. Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C., Williams, G., Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J. Exp. Med.* 1971, *133*, 275-288.
93. Freeland, R. L., Scholl, D. T., Rohde, K. R., Shelton, L. J. et al., Identification of *Bartonella*-specific immunodominant antigens recognized by the feline humoral immune system. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999, *6*, 558-566.
94. Fuhrmann, O., Arvand, M., Gohler, A., Schmid, M. et al., *Bartonella henselae* induces NF-kappaB-dependent upregulation of adhesion molecules in cultured human endothelial cells: possible role of outer membrane proteins as pathogenic factors. *Infect. Immun.* 2001, *69*, 5088-5097.
95. Gamer, J., Multhaup, G., Tomoyasu, T., McCarty, J. S. et al., A cycle of binding and release of the DnaK, DnaJ and GrpE chaperones regulates activity of the *Escherichia coli* heat shock transcription factor sigma32. *EMBO J.* 1996, *15*, 607-617.
96. Garcia, F. U., Wojta, J., Broadley, K. N., Davidson, J. M. et al., *Bartonella bacilliformis* stimulates endothelial cells in vitro and is angiogenic in vivo. *Am. J. Pathol.* 1990, *136*, 1125-1135.
97. Gardy, J. L., Laird, M. R., Chen, F., Rey, S. et al., PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics.* 2005, *21*, 617-623.
98. Gardy, J. L., Spencer, C., Wang, K., Ester, M. et al., PSORT-B: Improving protein subcellular localization prediction for Gram-negative bacteria. *Nucleic Acids Res.* 2003, *31*, 3613-3617.
99. Getz, E. B., Xiao, M., Chakrabarty, T., Cooke, R. et al., A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. *Anal. Biochem.* 1999, *273*, 73-80.
100. Ghosh, S., Karin, M., Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002, *109*, 81-96.
101. Ghosh, S., May, M. J., Kopp, E. B., NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 1998, *16*, 225-260.
102. Gilmore, R. D., Jr., Bellville, T. M., Sviat, S. L., Frace, M., The *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* immunodominant surface antigen BrpA gene, encoding a 382-kilodalton protein composed of repetitive sequences, is a member of a multigene family conserved among *Bartonella* species. *Infect. Immun.* 2005, *73*, 3128-3136.
103. Golden, S. E., Hepatosplenic cat-scratch disease associated with elevated anti-*Rochalimaea* antibody titers. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1993, *12*, 868-871.

104. Görg, A., Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients: current state. *Biochem. Soc. Trans.* 1993, *21*, 130-132.
105. Görg, A., Boguth, G., Obermaier, C., Posch, A. et al., Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis* 1995, *16*, 1079-1086.
106. Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A. et al., The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000, *21*, 1037-1053.
107. Görg, A., Postel, W., Günther, S., The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1988, *9*, 531-546.
108. Görg, A., Weiss, W., Dunn, M. J., Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004, *4*, 3665-3685.
109. Gottesman, S., Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet.* 2005, *21*, 399-404.
110. Grote, A., Hiller, K., Scheer, M., Munch, R. et al., JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. *Nucleic Acids Res.* 2005, *33*, 526-531.
111. Gygi, S. P., Aebersold, R., Mass spectrometry and proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2000, *4*, 489-494.
112. Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F. et al., Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* 1999, *17*, 994-999.
113. Haake, D. A., Summers, T. A., McCoy, A. M., Schwartzman, W., Heat shock response and groEL sequence of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana*. *Microbiology* 1997, *143*, 2807-2815.
114. Haig, D. M., McInnes, C. J., Immunity and counter-immunity during infection with the parapoxvirus orf virus. *Virus Res.* 2002, *88*, 3-16.
115. Han, J., Clark, C., Han, G., Chu, T. C. et al., Preparation of 2-nitro-5-thiobenzoic acid using immobilized Tris(2-carboxyethyl)phosphine. *Anal. Biochem.* 1999, *268*, 404-407.
116. Han, J. C., Han, G. Y., A procedure for quantitative determination of tris(2-carboxyethyl)phosphine, an odorless reducing agent more stable and effective than dithiothreitol. *Anal. Biochem.* 1994, *220*, 5-10.
117. Hanahan, D., Folkman, J., Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996, *86*, 353-364.
118. Hanash, S., Brichory, F., Beer, D., A proteomic approach to the identification of lung cancer markers. *Dis. Markers* 2001, *17*, 295-300.
119. Hartl, F. U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J. P. et al., The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. *Cell* 1990, *63*, 269-279.
120. Havlasova, J., Hernychova, L., Halada, P., Pellantova, V. et al., Mapping of immunoreactive antigens of *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Proteomics* 2002, *2*, 857-867.
121. Heckman, C. A., Mehew, J. W., Boxer, L. M., NF-kappaB activates Bcl-2 expression in t(14;18) lymphoma cells. *Oncogene* 2002, *21*, 3898-3908.

122. Hendrix, L. R., Contact-dependent hemolytic activity distinct from deforming activity of *Bartonella bacilliformis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000, *182*, 119-124.
123. Herbert, B. R., Molloy, M. P., Gooley, A. A., Walsh, B. J. et al., Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. *Electrophoresis* 1998, *19*, 845-851.
124. Heukeshoven, J., Dernick, R., Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 1985, *6*, 103-112.
125. Hillenkamp, F., Karas, M., Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol.* 1990, *193*, 280-295.
126. Hinton, J. C., Hautefort, I., Eriksson, S., Thompson, A. et al., Benefits and pitfalls of using microarrays to monitor bacterial gene expression during infection. *Curr. Opin. Microbiol.* 2004, *7*, 277-282.
127. Hoicyk, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M., Lupas, A. et al., Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J.* 2000, *19*, 5989-5999.
128. Hood, J. D., Cheresh, D. A., Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Cancer* 2002, *2*, 91-100.
129. Hoving, S., Gerrits, B., Voshol, H., Muller, D. et al., Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients. *Proteomics* 2002, *2*, 127-134.
130. Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., Bunn, H. F., Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1998, *95*, 7987-7992.
131. Ihler, G. M., *Bartonella bacilliformis*: dangerous pathogen slowly emerging from deep background. *FEMS Microbiol. Lett.* 1996, *144*, 1-11.
132. Ikemura, T., Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol. Biol. Evol.* 1985, *2*, 13-34.
133. Imafuku, Y., Omenn, G. S., Hanash, S., Proteomics approaches to identify tumor antigen directed autoantibodies as cancer biomarkers. *Dis. Markers* 2004, *20*, 149-153.
134. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W. et al., HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001, *292*, 464-468.
135. Iwaki-Egawa, S., Ihler, G. M., Comparison of the abilities of proteins from *Bartonella bacilliformis* and *Bartonella henselae* to deform red cell membranes and to bind to red cell ghost proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997, *157*, 207-217.
136. Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I. et al., Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001, *292*, 468-472.
137. Jackson, L. A., Perkins, B. A., Wenger, J. D., Cat scratch disease in the United States: an analysis of three national databases. *Am. J. Public Health* 1993, *83*, 1707-1711.

138. Jackson, L. A., Spach, D. H., Kippen, D. A., Sugg, N. K. et al., Seroprevalence to *Bartonella quintana* among patients at a community clinic in downtown Seattle. *J. Infect. Dis.* 1996, *173*, 1023-1026.
139. Jacomo, V., Kelly, P. J., Raoult, D., Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002, *9*, 8-18.
140. Jain, R. K., Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.* 2003, *9*, 685-693.
141. Jansen, A., Yu, J., Differential gene expression of pathogens inside infected hosts. *Curr. Opin. Microbiol.* 2006, *9*, 138-142.
142. Jensen, L. J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S. et al., STRING 8-a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res.* 2009, *37*, 412-416.
143. Jocelyn, P. C., Chemical reduction of disulfides. *Methods Enzymol.* 1987, *143*, 246-256.
144. Johansson, J., Cossart, P., RNA-mediated control of virulence gene expression in bacterial pathogens. *Trends Microbiol.* 2003, *11*, 280-285.
145. Johnson, C., Chandrasekhar, G. N., Georgopoulos, C., *Escherichia coli* DnaK and GrpE heat shock proteins interact both in vivo and in vitro. *Journal of Bacteriology* 1989, *171*, 1590-1596.
146. Jungblut, P. R., Bumann, D., Immunoproteome of *Helicobacter pylori*. *Methods Enzymol.* 2002, *358*, 307-316.
147. Jungblut, P. R., Grabher, G., Stoffler, G., Comprehensive detection of immunorelevant *Borrelia garinii* antigens by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 1999, *20*, 3611-3622.
148. Kallio, P. J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P. et al., Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J.* 1998, *17*, 6573-6586.
149. Kallio, P. J., Wilson, W. J., O'Brien, S., Makino, Y. et al., Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 1999, *274*, 6519-6525.
150. Kanehisa, M., Araki, M., Goto, S., Hattori, M. et al., KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res.* 2008, *36*, 480-484.
151. Kanehisa, M., Goto, S., KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000, *28*, 27-30.
152. Kanehisa, M., Goto, S., Hattori, M., Oki-Kinoshita, K. F. et al., From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Res.* 2006, *34*, 354-357.
153. Karas, M., Hillenkamp, F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. *Anal. Chem.* 1988, *60*, 2299-2301.
154. Karin, M., Ben-Neriah, Y., Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 2000, *18*, 621-663.
155. Karkkainen, M. J., Haiko, P., Sainio, K., Partanen, J. et al., Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat. Immunol.* 2004, *5*, 74-80.

156. Kempf, V. A., Hitziger, N., Riess, T., Autenrieth, I. B., Do plant and human pathogens have a common pathogenicity strategy? *Trends Microbiol.* 2002, *10*, 269-275.
157. Kempf, V. A., Lebedziejewski, M., Alitalo, K., Walzlein, J. H. et al., Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections. *Circulation* 2005, *111*, 1054-1062.
158. Kempf, V. A., Schaller, M., Behrendt, S., Volkmann, B. et al., Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. *Cell. Microbiol* 2000, *2*, 431-441.
159. Kempf, V. A., Volkmann, B., Schaller, M., Sander, C. A. et al., Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. *Cell. Microbiol.* 2001, *3*, 623-632.
160. Kim, J., Kendall, D. A., Sec-dependent protein export and the involvement of the molecular chaperone SecB. *Cell Stress.Chaperones.* 2000, *5*, 267-275.
161. Kirby, J. E., Nekorchuk, D. M., *Bartonella*-associated endothelial proliferation depends on inhibition of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2002, *99*, 4656-4661.
162. Kitamura, K., Kangawa, K., Kawamoto, M., Ichiki, Y. et al., Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993, *192*, 553-560.
163. Klose, J., Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 1975, *26*, 231-243.
164. Koch, A. E., Polverini, P. J., Kunkel, S. L., Harlow, L. A. et al., Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992, *258*, 1798-1801.
165. Koehler, J. E., Glaser, C. A., Tappero, J. W., *Rochalimaea henselae* infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir. *JAMA* 1994, *271*, 531-535.
166. Koehler, J. E., LeBoit, P. E., Egbert, B. M., Berger, T. G., Cutaneous vascular lesions and disseminated cat-scratch disease in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *Ann. Intern. Med.* 1988, *109*, 449-455.
167. Koehler, J. E., Quinn, F. D., Berger, T. G., LeBoit, P. E. et al., Isolation of *Rochalimaea* species from cutaneous and osseous lesions of bacillary angiomatosis. *N. Engl. J. Med.* 1992, *327*, 1625-1631.
168. Koehler, J. E., Sanchez, M. A., Garrido, C. S., Whitfeld, M. J. et al., Molecular epidemiology of *Bartonella* infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. *N. Engl. J. Med.* 1997, *337*, 1876-1883.
169. Koehler, J. E., Tappero, J. W., Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* 1993, *17*, 612-624.
170. Kordick, D. L., Breitschwerdt, E. B., Intraerythrocytic presence of *Bartonella henselae*. *J. Clin. Microbiol.* 1995, *33*, 1655-1656.
171. Kordick, D. L., Wilson, K. H., Sexton, D. J., Hadfield, T. L. et al., Prolonged *Bartonella* bacteremia in cats associated with cat-scratch disease patients. *J. Clin. Microbiol.* 1995, *33*, 3245-3251.

172. Krezel, A., Latajka, R., Bujacz, G. D., Bal, W., Coordination properties of tris(2-carboxyethyl)phosphine, a newly introduced thiol reductant, and its oxide. *Inorg. Chem.* 2003, 42, 1994-2003.
173. Kurland, C. G., Codon bias and gene expression. *FEBS Lett.* 1991, 285, 165-169.
174. Kyme, P., Dillon, B., Iredell, J., Phase variation in *Bartonella henselae*. *Microbiology* 2003, 149, 621-629.
175. Kyte, J., Doolittle, R. F., A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 1982, 157, 105-132.
176. La Scola B., Raoult, D., Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii*. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 2270-2274.
177. La Scola B., Raoult, D., Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from human samples: a 5-year experience (1993 to 1998). *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37, 1899-1905.
178. Lamas, C. C., Eykyn, S. J., Blood culture negative endocarditis: analysis of 63 cases presenting over 25 years. *Heart* 2003, 89, 258-262.
179. Lamond, A. I., Travers, A. A., Stringent control of bacterial transcription. *Cell* 1985, 41, 6-8.
180. Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A. et al., FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* 2002, 16, 1466-1471.
181. LeBoit, P. E., Berger, T. G., Egbert, B. M., Beckstead, J. H. et al., Bacillary angiomatosis. The histopathology and differential diagnosis of a pseudoneoplastic infection in patients with human immunodeficiency virus disease. *Am. J. Surg. Pathol.* 1989, 13, 909-920.
182. Lee, H. H., Dadgostar, H., Cheng, Q., Shu, J. et al., NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1999, 96, 9136-9141.
183. Lee, I. N., Chen, C. H., Sheu, J. C., Lee, H. S. et al., Identification of human hepatocellular carcinoma-related biomarkers by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *J. Proteome. Res.* 2005, 4, 2062-2069.
184. Lei, Y., Haider, H. K., Shujia, J., Sim, E. S., Therapeutic angiogenesis. Devising new strategies based on past experiences. *Basic Res. Cardiol.* 2004, 99, 121-132.
185. Lesterlin, C., Barre, F. X., Cornet, F., Genetic recombination and the cell cycle: what we have learned from chromosome dimers. *Mol. Microbiol.* 2004, 54, 1151-1160.
186. Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V. et al., Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989, 246, 1306-1309.
187. Li, Q., Verma, I. M., NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2002, 2, 725-734.
188. Liao, J. B., Viruses and human cancer. *Yale J. Biol. Med.* 2006, 79, 115-122.
189. Lindler, L. E., Hadfield, T. L., Tall, B. D., Snellings, N. J. et al., Cloning of a *Brucella melitensis* group 3 antigen gene encoding Omp28, a protein recognized by the humoral immune response during human brucellosis. *Infect. Immun.* 1996, 64, 2490-2499.

190. Lindroos, H., Vinnere, O., Mira, A., Repsilber, D. et al., Genome rearrangements, deletions, and amplifications in the natural population of *Bartonella henselae*. *Journal of Bacteriology* 2006, *188*, 7426-7439.
191. Linke, D., Riess, T., Autenrieth, I. B., Lupas, A. et al., Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *Trends Microbiol.* 2006, *14*, 264-270.
192. Litwin, C. M., Johnson, J. M., Martins, T. B., The *Bartonella henselae* sucB gene encodes a dihydrolipoamide succinyltransferase protein reactive with sera from patients with cat-scratch disease. *J. Med. Microbiol.* 2004, *53*, 1221-1227.
193. Litwin, C. M., Martins, T. B., Hill, H. R., Immunologic response to *Bartonella henselae* as determined by enzyme immunoassay and Western blot analysis. *Am. J. Clin. Pathol.* 1997, *108*, 202-209.
194. Liu, H., Lin, D., Yates, J. R., III, Multidimensional separations for protein/peptide analysis in the post-genomic era. *Biotechniques* 2002, *32*, 898-902.
195. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, *193*, 265-275.
196. Lyttle, D. J., Fraser, K. M., Fleming, S. B., Mercer, A. A. et al., Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J. Virol.* 1994, *68*, 84-92.
197. Maeno, N., Oda, H., Yoshiie, K., Wahid, M. R. et al., Live *Bartonella henselae* enhances endothelial cell proliferation without direct contact. *Microb. Pathog.* 1999, *27*, 419-427.
198. Maggi, R. G., Duncan, A. W., Breitschwerdt, E. B., Novel chemically modified liquid medium that will support the growth of seven bartonella species. *J. Clin. Microbiol* 2005, *43*, 2651-2655.
199. Maguina, C., Garcia, P. J., Gotuzzo, E., Cordero, L. et al., Bartonellosis (Carrion's disease) in the modern era. *Clin. Infect. Dis.* 2001, *33*, 772-779.
200. Mahon, P. C., Hirota, K., Semenza, G. L., FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.* 2001, *15*, 2675-2686.
201. Manders, S. M., Bacillary angiomatosis. *Clin. Dermatol.* 1996, *14*, 295-299.
202. Mändle, T., Einsele, H., Schaller, M., Neumann, D. et al., Infection of human CD34+ progenitor cells with *Bartonella henselae* results in intraerythrocytic presence of *B. henselae*. *Blood* 2005, *106*, 1215-1222.
203. Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Cherukuri, P. F., Weese-Scott, C. et al., CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res.* 2005, *33*, 192-196.
204. Marchler-Bauer, A., Bryant, S. H., CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* 2004, *32*, 327-331.
205. Masse, E., Vanderpool, C. K., Gottesman, S., Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 2005, *187*, 6962-6971.
206. Mateen, F. J., Newstead, J. C., McClean, K. L., Bacillary angiomatosis in an HIV-positive man with multiple risk factors: A clinical and epidemiological puzzle. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2005, *16*, 249-252.

207. Matera, G., Liberto, M. C., Quirino, A., Barreca, G. S. et al., *Bartonella quintana* lipopolysaccharide effects on leukocytes, CXC chemokines and apoptosis: a study on the human whole blood and a rat model. *Int. Immunopharmacol.* 2003, 3, 853-864.
208. Maurin, M., Eb, F., Etienne, J., Raoult, D., Serological cross-reactions between *Bartonella* and *Chlamydia* species: implications for diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 2283-2287.
209. Maurin, M., Raoult, D., *Bartonella (Rochalimaea) quintana* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996, 9, 273-292.
210. Maurin, M., Roux, V., Stein, A., Ferrier, F. et al., Isolation and characterization by immunofluorescence, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, western blot, restriction fragment length polymorphism-PCR, 16S rRNA gene sequencing, and pulsed-field gel electrophoresis of *Rochalimaea quintana* from a patient with bacillary angiomatosis. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32, 1166-1171.
211. McCool, T. L., Hoey, J. G., Montileone, F., Goldenberg, H. B. et al., Discovery and analysis of *Bartonella henselae* antigens for use in clinical serologic assays. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2007, 60:17-23.
212. McCulloch, R., Burke, M. E., Sherratt, D. J., Peptidase activity of *Escherichia coli* aminopeptidase A is not required for its role in Xer site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* 1994, 12, 241-251.
213. McGill, S. L., Regnery, R. L., Karem, K. L., Characterization of human immunoglobulin (Ig) isotype and IgG subclass response to *Bartonella henselae* infection. *Infect. Immun.* 1998, 66, 5915-5920.
214. Mehock, J. R., Greene, C. E., Gherardini, F. C., Hahn, T. W. et al., *Bartonella henselae* invasion of feline erythrocytes in vitro. *Infect. Immun.* 1998, 66, 3462-3466.
215. Meyer, M., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J. et al., A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 1999, 18, 363-374.
216. Minnick, M. F., Anderson, B. E., *Bartonella* interactions with host cells. *Subcell. Biochem.* 2000, 33, 97-123.
217. Minnick, M. F., Smitherman, L. S., Samuels, D. S., Mitogenic effect of *Bartonella bacilliformis* on human vascular endothelial cells and involvement of GroEL. *Infect. Immun.* 2003, 71, 6933-6942.
218. Mitchell, S. J., Minnick, M. F., Characterization of a two-gene locus from *Bartonella bacilliformis* associated with the ability to invade human erythrocytes. *Infect. Immun.* 1995, 63, 1552-1562.
219. Mitchell, S. J., Minnick, M. F., Cloning, functional expression, and complementation analysis of an inorganic pyrophosphatase from *Bartonella bacilliformis*. *Can. J. Microbiol.* 1997, 43, 734-743.
220. Molloy, M. P., Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Anal. Biochem.* 2000, 280, 1-10.
221. Molloy, M. P., Herbert, B. R., Slade, M. B., Rabilloud, T. et al., Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur. J. Biochem.* 2000, 267, 2871-2881.

222. Molloy, M. P., Herbert, B. R., Walsh, B. J., Tyler, M. I. et al., Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1998, 19, 837-844.
223. Molloy, M. P., Phadke, N. D., Chen, H., Tyldesley, R. et al., Profiling the alkaline membrane proteome of *Caulobacter crescentus* with two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2002, 2, 899-910.
224. Molloy, M. P., Phadke, N. D., Maddock, J. R., Andrews, P. C., Two-dimensional electrophoresis and peptide mass fingerprinting of bacterial outer membrane proteins. *Electrophoresis* 2001, 22, 1686-1696.
225. Molloy, M. P., Witzmann, F. A., Proteomics: technologies and applications. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 2002, 1, 23-39.
226. Monteil, R. A., Michiels, J. F., Hofman, P., Saint, Paul MC et al., Histological and ultrastructural study of one case of oral bacillary angiomatosis in HIV disease and review of the literature. *Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.* 1994, 30B, 65-71.
227. Neuhoff, V., Stamm, R., Eibl, H., Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* 1985, 6, 427-448.
228. Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von, Heijne G., Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 1997, 10, 1-6.
229. Nogueira, T., Springer, M., Post-transcriptional control by global regulators of gene expression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2000, 3, 154-158.
230. Nomura, M., Gourse, R., Baughman, G., Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. *Annu. Rev. Biochem.* 1984, 53, 75-117.
231. O'Connor, S. P., Dorsch, M., Steigerwalt, A. G., Brenner, D. J. et al., 16S rRNA sequences of *Bartonella bacilliformis* and cat scratch disease bacillus reveal phylogenetic relationships with the alpha-2 subgroup of the class Proteobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 1991, 29, 2144-2150.
232. O'Farrell, P. H., High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 1975, 250, 4007-4021.
233. Ogawa, S., Oku, A., Sawano, A., Yamaguchi, S. et al., A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 31273-31282.
234. Ong, S. E., Foster, L. J., Mann, M., Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. *Methods* 2003, 29, 124-130.
235. Padmalayam, I., Karem, K., Baumstark, B., Massung, R., The gene encoding the 17-kDa antigen of *Bartonella henselae* is located within a cluster of genes homologous to the virB virulence operon. *DNA Cell. Biol.* 2000, 19, 377-382.
236. Pahl, H. L., Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999, 18, 6853-6866.
237. Palmari, J., Teyssere, N., Dussert, C., Raoult, D., Image cytometry and topographical analysis of proliferation of endothelial cells in vitro during *Bartonella (Rochalimaea)* infection. *Anal. Cell Pathol.* 1996, 11, 13-30.

238. Patterson, S. D., Latter, G. I., Evaluation of storage phosphor imaging for quantitative analysis of 2-D gels using the Quest II system. *Biotechniques* 1993, 15, 1076-1083.
239. Pedersen, S. K., Harry, J. L., Sebastian, L., Baker, J. et al., Unseen proteome: mining below the tip of the iceberg to find low abundance and membrane proteins. *J. Proteome. Res.* 2003, 2, 303-311.
240. Pennington, K., McGregor, E., Beasley, C. L., Everall, I. et al., Optimization of the first dimension for separation by two-dimensional gel electrophoresis of basic proteins from human brain tissue. *Proteomics* 2004, 4, 27-30.
241. Pennington, S. R., Wilkins, M. R., Hochstrasser, D. F., Dunn, M. J., Proteome analysis: from protein characterization to biological function. *Trends Cell. Biol.* 1997, 7, 168-173.
242. Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., Cottrell, J. S., Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999, 20, 3551-3567.
243. Peter K., Vollhardt C., Organische Chemie. 1990, 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH. 841-844.
244. Peterson, G. L., Determination of total protein. *Methods Enzymol.* 1983, 91, 95-119.
245. Popa, C., Abdollahi-Roodsaz, S., Joosten, L. A., Takahashi, N. et al., *Bartonella quintana* lipopolysaccharide is a natural antagonist of Toll-like receptor 4. *Infect. Immun.* 2007, 75, 4831-4837.
246. Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med* 2003, 9, 677-684.
247. Rabilloud, T., Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis* 1996, 17, 813-829.
248. Rabilloud, T., Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 1998, 19, 758-760.
249. Rabilloud, T., Valette, C., Lawrence, J. J., Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis* 1994, 15, 1552-1558.
250. Raoult, D., Dutour, O., Houhamdi, L., Jankauskas, R. et al., Evidence for louse-transmitted diseases in soldiers of Napoleon's Grand Army in Vilnius. *J. Infect. Dis.* 2006, 193, 112-120.
251. Regnery, R. L., Anderson, B. E., Clarridge, J. E., Rodriguez, Barradas MC et al., Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *J. Clin. Microbiol.* 1992, 30, 265-274.
252. Regnery, R. L., Olson, J. G., Perkins, B. A., Bibb, W., Serological response to "*Rochalimaea henselae*" antigen in suspected cat-scratch disease. *Lancet* 1992, 339, 1443-1445.
253. Relman, D. A., Falkow, S., LeBoit, P. E., Perkocha, L. A. et al., The organism causing bacillary angiomatosis, peliosis hepatis, and fever and bacteremia in immunocompromised patients. *N. Engl. J. Med.* 1991, 324, 1514.
254. Relman, D. A., Loutit, J. S., Schmidt, T. M., Falkow, S. et al., The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N. Engl. J. Med.* 1990, 323, 1573-1580.

255. Resto-Ruiz, S. I., Schmiederer, M., Sweger, D., Newton, C. et al., Induction of a potential paracrine angiogenic loop between human THP-1 macrophages and human microvascular endothelial cells during *Bartonella henselae* infection. *Infect. Immun.* 2002, 70, 4564-4570.
256. Rhodius, V. A., LaRossa, R. A., Uses and pitfalls of microarrays for studying transcriptional regulation. *Curr. Opin. Microbiol.* 2003, 6, 114-119.
257. Rhomberg, T. A., Karlberg, O., Mini, T., Zimny-Arndt, U. et al., Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of the bacterial pathogen *Bartonella henselae*. *Proteomics* 2004, 4, 3021-3033.
258. Richmond, C. S., Glasner, J. D., Mau, R., Jin, H. et al., Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 1999, 27, 3821-3835.
259. Ricketts, W., Clinical manifestations of Carrion's disease. *Arch. Intern. Med.* 1949, 84, 751-781.
260. Ricort, J. M., Binoux, M., Insulin-like growth factor binding protein-3 stimulates phosphatidylinositol 3-kinase in MCF-7 breast carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 314, 1044-1049.
261. Ridder, G. J., Boedeker, C. C., Technau-Ihling, K., Grunow, R. et al., Role of cat-scratch disease in lymphadenopathy in the head and neck. *Clin. Infect. Dis.* 2002, 35, 643-649.
262. Riess, T., Andersson, S. G., Lupas, A., Schaller, M. et al., *Bartonella* adhesin A mediates a proangiogenic host cell response. *J. Exp. Med.* 2004, 200, 1267-1278.
263. Riess, T., Dietrich, F., Schmidt, K. V., Kaiser, P. O. et al., Analysis of a novel insect-cell culture medium-based growth medium for *Bartonella* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, 74, 5224-5227.
264. Risau, W., Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997, 386, 671-674.
265. Rohrwild, M., Coux, O., Huang, H. C., Moerschell, R. P. et al., HslV-HslU: A novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1996, 93, 5808-5813.
266. Rohrwild, M., Pfeifer, G., Santarius, U., Müller, S. A. et al., The ATP-dependent HslVU protease from *Escherichia coli* is a four-ring structure resembling the proteasome. *Nat. Struct. Biol.* 1997, 4, 133-139.
267. Rolain, J. M., La, Scola B., Liang, Z., Davoust, B. et al., Immunofluorescent detection of intraerythrocytic *Bartonella henselae* in naturally infected cats. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 2978-2980.
268. Romby, P., Vandenesch, F., Wagner, E. G., The role of RNAs in the regulation of virulence-gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* 2006, 9, 229-236.
269. Rossetti, O. L., Arese, A. I., Boschioli, M. L., Cravero, S. L., Cloning of *Brucella abortus* gene and characterization of expressed 26-kilodalton periplasmic protein: potential use for diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 165-169.
270. Ruan, Y., Wan, M., An optimized procedure for solubilization, reduction, and transfer of human breast cancer membrane-enriched fraction by 2-DE. *Electrophoresis* 2007, 28, 3333-3340.
271. Ruegg, U. T., Rudinger, J., Reductive cleavage of cystine disulfides with tributylphosphine. *Methods Enzymol.* 1977, 47, 111-116.

272. Saenz, H. L., Engel, P., Stoeckli, M. C., Lanz, C. et al., Genomic analysis of *Bartonella* identifies type IV secretion systems as host adaptability factors. *Nat. Genet.* 2007, 39, 1469-1476.
273. Sander, A., Bühler, C., Pelz, K., von Cramm, E. et al., Detection and identification of two *Bartonella henselae* variants in domestic cats in Germany. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 584-587.
274. Sander, A., Zagrosek, A., Brecht, W., Schiltz, E. et al., Characterization of *Bartonella clarridgeiae* flagellin (FlaA) and detection of anti-flagellin antibodies in patients with lymphadenopathy. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 2943-2948.
275. Santoni, V., Molloy, M., Rabilloud, T., Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* 2000, 21, 1054-1070.
276. Scadden, D. T., AIDS-related malignancies. *Annu. Rev. Med.* 2003, 54, 285-303.
277. Schaffer, A. A., Aravind, L., Madden, T. L., Shavirin, S. et al., Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29, 2994-3005.
278. Scherer, D. C., Buron-Connors, I., Minnick, M. F., Characterization of *Bartonella bacilliformis* flagella and effect of anti-flagellin antibodies on invasion of human erythrocytes. *Infect. Immun.* 1993, 61, 4962-4971.
279. Schmid, M. C., Bisoffi, M., Wetterwald, A., Gautschi, E. et al., Insulin-like growth factor binding protein-3 is overexpressed in endothelial cells of mouse breast tumor vessels. *Int. J. Cancer* 2003, 103, 577-586.
280. Schmid, M. C., Scheidegger, F., Dehio, M., Balmelle-Devaux, N. et al., A translocated bacterial protein protects vascular endothelial cells from apoptosis. *PLoS. Pathog.* 2006, 2, 115e.
281. Schmid, M. C., Schulein, R., Dehio, M., Denecker, G. et al., The VirB type IV secretion system of *Bartonella henselae* mediates invasion, proinflammatory activation and antiapoptotic protection of endothelial cells. *Mol. Microbiol.* 2004, 52, 81-92.
282. Schmiederer, M., Anderson, B., Cloning, sequencing, and expression of three *Bartonella henselae* genes homologous to the *Agrobacterium tumefaciens* VirB region. *DNA Cell. Biol.* 2000, 19, 141-147.
283. Schmiederer, M., Arcenas, R., Widen, R., Valkov, N. et al., Intracellular induction of the *Bartonella henselae* virB operon by human endothelial cells. *Infect. Immun.* 2001, 69, 6495-6502.
284. Schmitz, M. L., Bacher, S., Kracht, M., I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations. *Trends Biochem. Sci.* 2001, 26, 186-190.
285. Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M. I., Liu, Y. et al., Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *J. Exp. Med.* 2003, 198, 693-704.
286. Schneider, T., Ullrich, R., Schmitt-Graff, A., Bergs, C. et al., Bacillary angiomatosis in a German patient with AIDS. *Clin. Investig.* 1993, 72, 50-54.
287. Schröder, H., Langer, T., Hartl, F. U., Bukau, B., DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J.* 1993, 12, 4137-4144.

288. Schulein, R., Dehio, C., The VirB/VirD4 type IV secretion system of *Bartonella* is essential for establishing intraerythrocytic infection. *Molecular Microbiology* 2002, 46, 1053-1067.
289. Schulein, R., Guye, P., Rhomberg, T. A., Schmid, M. C. et al., A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of *Bartonella henselae* into human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2005, 102, 856-861.
290. Schulein, R., Seubert, A., Gille, C., Lanz, C. et al., Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes. A unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *J. Exp. Med.* 2001, 193, 1077-1086.
291. Schulte, B., Linke, D., Klumpp, S., Schaller, M. et al., *Bartonella quintana* variably expressed outer membrane proteins mediate vascular endothelial growth factor secretion but not host cell adherence. *Infect. Immun.* 2006, 74, 5003-5013.
292. Schulze, A., Downward, J., Navigating gene expression using microarrays--a technology review. *Nat. Cell. Biol.* 2001, 3, 190-195.
293. Schwartzman, W. A., Infections due to *Rochalimaea*: the expanding clinical spectrum. *Clin. Infect. Dis.* 1992, 15, 893-900.
294. Seco-Mediavilla, P., Verger, J. M., Grayon, M., Cloeckert, A. et al., Epitope mapping of the *Brucella melitensis* BP26 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003, 10, 647-651.
295. Semenza, G. L., HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* 2000, 14, 1983-1991.
296. Semenza, G. L., Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1998, 8, 588-594.
297. Semenza, G. L., HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* 2001, 107, 1-3.
298. Sen, R., Baltimore, D., Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986, 47, 921-928.
299. Seubert, A., Hiestand, R., de la, Cruz F., Dehio, C., A bacterial conjugation machinery recruited for pathogenesis. *Molecular Microbiology* 2003, 49, 1253-1266.
300. Seubert, A., Schulein, R., Dehio, C., Bacterial persistence within erythrocytes: a unique pathogenic strategy of *Bartonella* spp. *Int. J. Med. Microbiol.* 2002, 291, 555-560.
301. Sharp, P. M., Li, W. H., The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15, 1281-1295.
302. Sherlock, O., Dobrindt, U., Jensen, J. B., Munk, Vejborg R. et al., Glycosylation of the self-recognizing *Escherichia coli* Ag43 autotransporter protein. *J. Bacteriol.* 2006, 188, 1798-1807.
303. Shi, S., Ehrt, S., Dihydrolipoamide acyltransferase is critical for *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Infect. Immun.* 2006, 74, 56-63.
304. Slater, L. N., Welch, D. F., Min, K. W., *Rochalimaea henselae* causes bacillary angiomatosis and peliosis hepatis. *Arch. Intern. Med.* 1992, 152, 602-606.
305. Smith, L., Welham, K. J., Watson, M. B., Drew, P. J. et al., The proteomic analysis of cisplatin resistance in breast cancer cells. *Oncol. Res.* 2007, 16, 497-506.

306. Sodhi, A., Montaner, S., Patel, V., Zohar, M. et al., The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1alpha. *Cancer Res.* 2000, *60*, 4873-4880.
307. Spach, D. H., Kanter, A. S., Dougherty, M. J., Larson, A. M. et al., *Bartonella (Rochalimaea) quintana* bacteremia in inner-city patients with chronic alcoholism. *N. Engl. J. Med.* 1995, *332*, 424-428.
308. Spach, D. H., Koehler, J. E., *Bartonella*-associated infections. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 1998, *12*, 137-155.
309. Stein, A., Raoult, D., Return of trench fever. *Lancet* 1995, *345*, 450-451.
310. Stoll, D. R., Li, X., Wang, X., Carr, P. W. et al., Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2007, *1168*, 3-43.
311. Stothard, P., The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 2000, *28*, 1102-1104.
312. Sung, F. L., Pang, R. T., Ma, B. B., Lee, M. M. et al., Pharmacoproteomics study of cetuximab in nasopharyngeal carcinoma. *J. Proteome. Res.* 2006, *5*, 3260-3267.
313. Sutter, C. H., Laughner, E., Semenza, G. L., Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2000, *97*, 4748-4753.
314. Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S. et al., Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1988, *2*, 151-153.
315. Tappero, J. W., Mohle-Boetani, J., Koehler, J. E., Swaminathan, B. et al., The epidemiology of bacillary angiomatosis and bacillary peliosis. *JAMA* 1993, *269*, 770-775.
316. Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A., Koonin, E. V., The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* 2000, *28*, 33-36.
317. Tatusov, R. L., Koonin, E. V., Lipman, D. J., A genomic perspective on protein families. *Science* 1997, *278*, 631-637.
318. Thompson, A., Schafer, J., Kuhn, K., Kienle, S. et al., Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal. Chem.* 2003, *75*, 1895-1904.
319. Thompson, S. A., Shedd, O. L., Ray, K. C., Beins, M. H. et al., *Campylobacter fetus* surface layer proteins are transported by a type I secretion system. *Journal of Bacteriology* 1998, *180*, 6450-6458.
320. Toledo-Arana, A., Repoila, F., Cossart, P., Small noncoding RNAs controlling pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007, *10*, 182-188.
321. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 1992, *24*, 145-149.
322. Valcu, C. M., Schlink, K., Reduction of proteins during sample preparation and two-dimensional gel electrophoresis of woody plant samples. *Proteomics* 2006, *6*, 1599-1605.

323. Valcu, C. M., Schlink, K., Efficient extraction of proteins from woody plant samples for two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 2006, 6, 4166-4175.
324. VanBogelen, R. A., Greis, K. D., Blumenthal, R. M., Tani, T. H. et al., Mapping regulatory networks in microbial cells. *Trends Microbiol.* 1999, 7, 320-328.
325. VanBogelen, R. A., Schiller, E. E., Thomas, J. D., Neidhardt, F. C., Diagnosis of cellular states of microbial organisms using proteomics. *Electrophoresis* 1999, 20, 2149-2159.
326. Velculescu, V. E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J. et al., Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* 1997, 88, 243-251.
327. Verma, A., Davis, G. E., Ihler, G. M., Infection of human endothelial cells with *Bartonella bacilliformis* is dependent on Rho and results in activation of Rho. *Infect. Immun.* 2000, 68, 5960-5969.
328. Vitale, A. M., Calvert, M. E., Mallavarapu, M., Yurttas, P. et al., Proteomic profiling of murine oocyte maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 2007, 74, 608-616.
329. von Mering, C., Huynen, M., Jaeggi, D., Schmidt, S. et al., STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Res.* 2003, 31, 258-261.
330. von Mering, C., Jensen, L. J., Kuhn, M., Chaffron, S. et al., STRING 7-recent developments in the integration and prediction of protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35, 358-362.
331. von Mering, C., Jensen, L. J., Snel, B., Hooper, S. D. et al., STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Res.* 2005, 33, 433-437.
332. Wagner, C. L., Riess, T., Linke, D., Eberhardt, C. et al., Use of *Bartonella* adhesin A (BadA) immunoblotting in the serodiagnosis of *Bartonella henselae* infections. *Int. J. Med. Microbiol.* 2008, 298, 579-590.
333. Wagner, E., Luche, S., Penna, L., Chevallet, M. et al., A method for detection of overoxidation of cysteines: peroxiredoxins are oxidized in vivo at the active-site cysteine during oxidative stress. *Biochem. J.* 2002, 366, 777-785.
334. Wagner, E. G., Altuvia, S., Romby, P., Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements. *Adv. Genet.* 2002, 46, 361-398.
335. Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V. et al., NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998, 281, 1680-1683.
336. Wang, G. F., Kuriki, T., Roy, K. L., Kaneda, T., The primary structure of branched-chain alpha-oxo acid dehydrogenase from *Bacillus subtilis* and its similarity to other alpha-oxo acid dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* 1993, 213, 1091-1099.
337. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., Semenza, G. L., Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1995, 92, 5510-5514.
338. Washburn, M. P., Koller, A., Oshiro, G., Ulaszek, R. R. et al., Protein pathway and complex clustering of correlated mRNA and protein expression analyses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2003, 100, 3107-3112.
339. Washburn, M. P., Wolters, D., Yates, J. R., III, Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* 2001, 19, 242-247.

340. Wasinger, V. C., Cordwell, S. J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J. X. et al., Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995, *16*, 1090-1094.
341. Weindel, K., Marme, D., Weich, H. A., AIDS-associated Kaposi's sarcoma cells in culture express vascular endothelial growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992, *183*, 1167-1174.
342. Welch, D. F., Pickett, D. A., Slater, L. N., Steigerwalt, A. G. et al., *Rochalimaea henselae* sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis. *J. Clin. Microbiol.* 1992, *30*, 275-280.
343. Werner, J. A., Feng, S., Kasten, R. W., Hodzic, E. et al., Cloning, characterization, and expression of *Bartonella henselae* p26. *Clin. Vaccine Immunol.* 2006, *13*, 830-836.
344. Westbrook, J. A., Yan, J. X., Wait, R., Dunn, M. J., A combined radiolabelling and silver staining technique for improved visualisation, localisation, and identification of proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2001, *1*, 370-376.
345. Whetstone, P. A., Butlin, N. G., Corneillie, T. M., Meares, C. F., Element-coded affinity tags for peptides and proteins. *Bioconjug. Chem.* 2004, *15*, 3-6.
346. Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Sanchez, J. C., Bairoch, A. et al., Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number. *Electrophoresis* 1998, *19*, 1501-1505.
347. Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K. et al., From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology* 1996, *14*, 61-65.
348. Windsor, J. J., Cat-scratch disease: epidemiology, aetiology and treatment. *Br. J. Biomed. Sci.* 2001, *58*, 101-110.
349. Wolters, D. A., Washburn, M. P., Yates, J. R., III, An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal. Chem.* 2001, *73*, 5683-5690.
350. Wu, Z., Zhang, W., Lu, C., Immunoproteomic assay of surface proteins of *Streptococcus suis* serotype 9. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008, *53*, 52-59.
351. Xia, Q., Wang, H. X., Wang, J., Zhang, J. Y. et al., Proteomic analysis of interleukin 6-induced differentiation in mouse myeloid leukemia cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2005, *37*, 1197-1207.
352. Xu, Y. H., Lu, Z. Y., Ihler, G. M., Purification of deformin, an extracellular protein synthesized by *Bartonella bacilliformis* which causes deformation of erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1995, *1234*, 173-183.
353. Yang, Y. X., Hu, H. D., Zhang, D. Z., Ren, H., Identification of proteins responsible for the development of adriamycin resistance in human gastric cancer cells using comparative proteomics analysis. *J. Biochem. Mol. Biol.* 2007, *40*, 853-860.
354. Yoshida, S., Ono, M., Shono, T., Izumi, H. et al., Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 1997, *17*, 4015-4023.
355. Young, D. B., Chaperonins and the immune response. *Semin. Cell. Biol.* 1990, *1*, 27-35.

-
356. Zähringer, U., Lindner, B., Knirel, Y. A., Van Den Akker, W. M. et al., Structure and biological activity of the short-chain lipopolysaccharide from *Bartonella henselae* ATCC 49882T. *J. Biol. Chem.* 2004, *279*, 21046-21054.
357. Zhang, P., Chomel, B. B., Schau, M. K., Goo, J. S. et al., A family of variably expressed outer-membrane proteins (Vomp) mediates adhesion and autoaggregation in *Bartonella quintana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2004, *101*, 13630-13635.
358. Zhao, S. Q., Cai, Y. F., Zhu, Z. Y., Comparative proteomic analysis of *B. henselae* Houston and *B. henselae* Marseille by two-dimensional gel electrophoresis. *Biomed. Environ. Sci.* 2005, *18*, 341-344.
359. Zimmermann, R., Kempf, V. A., Schiltz, E., Oberle, K. et al., Hemin binding, functional expression, and complementation analysis of Pap 31 from *Bartonella henselae*. *J. Bacteriol.* 2003, *185*, 1739-1744.
360. Zingarelli, B., Nuclear factor-kappaB. *Crit. Care Med.* 2005, *33*, 414-416.

7 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. Volkhard Kempf und am Interfakultären Institut für Biochemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Duszenko.

Herrn Prof. Dr. Volkhard Kempf danke ich herzlich für die hervorragende Betreuung, die Unterstützung des Forschungsprojektes, die ständige Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion sowie für die zügige und sorgfältige Durchsicht der vorliegenden Arbeit. Bei Herrn Prof. Dr. Ingo Autenrieth bedanke ich mich für die Überlassung der interessanten Themenstellung, die vielen fruchtbaren, wissenschaftlichen Diskussionen und die sehr guten Arbeitsbedingungen am Institut.

Bei Herrn Prof. Dr. Michael Duszenko bedanke ich mich sehr herzlich für das Vertreten der Doktorarbeit an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen, aber ganz besonders für sein reges Interesse, für seine vielen hilfreichen Anregungen und die wertvollen Diskussionen, die mir beim Erstellen der Arbeit sehr geholfen haben.

Ein ganz besonderer Dank gebührt Dr. Harald Kusch, Dr. Susanne Engelmann, Dr. Dirk Albrecht und Prof. Dr. Michael Hecker für die fachlich kompetente, umfangreiche Hilfe, die unermüdliche, hervorragende Unterstützung und den großen persönlichen Einsatz bei den massenspektrometrischen Untersuchungen. Dadurch haben sie sehr viel zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke Diana Neumann für die enthusiastische experimentelle Unterstützung und Udo Weizenmann, Peter Kühnel und Helmut Rausch für die ausdauernde organisatorische Hilfestellung beim Umbau und der Einrichtung „meines“ HNO-Labors.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Moni und Wolfgang Schütz für die freundschaftlichen Ratschläge, die aufmunternden Worte und das schnelle und kritische Korrekturlesen meiner Doktorarbeit bedanken. Auch bedanke ich mich herzlich bei Klaus und Anette Eisele für die hilfreiche, nette Unterstützung und den motivierenden Zuspruch beim Erstellen dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „*Bartonella henselae*“, besonders Christiane Beerlage, Fiona O'Rourke, Nadine Werth und Patrick Kaiser, sowie der gesamten Arbeitsgruppe „*Trypanosoma brucei*“ für die angenehme Zusammenarbeit und das ausgesprochen freundschaftliche Arbeitsklima.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene für die gute Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft bedanken. Danke auch allen, mit denen ich nette Kaffeepausen verbracht oder Fußball gespielt habe, kurzum, mit denen ich auch außerhalb des Instituts viel unternommen habe - Oli Bechtold, Kerstin Fink, Peer Gaentzsch, Jule Geissel, Patrick Weißgerber, Timo Birkenstock, Tanja Grandl, Thomas Hierl und Juliane Klenk.

Ich danke Martina Müller, Moni und Wolfgang Schütz ganz herzlich für die netten Abende beim Federballspiel und Nadine Göhring sowie Carolin Wiedig für die gemeinsame Vorbereitung auf den alljährlichen 100 km-Staffellauf. Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meinen Freunden Yolaine Cavignac, Gianluca Matteoli, Kamil Gorszewski sowie Cristina Rossi und Andreas Boss für die sehr schöne gemeinsame Zeit in Tübingen bedanken. Auch danke ich ebenso herzlich Joo-Hee Wälzlein, Hannes Kiesewetter sowie Nils Agster und Holger Wetschek.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Freundin Karin für ihre Geduld und Nachsicht sowie meiner Schwester Grit und meinen Eltern, die mich während meiner Promotion immerzu liebevoll unterstützt haben.

8 Anhang

Meine akademischen Lehrer:

PD Dr. O. Asperger, Prof. W. Babel, Prof. Dr. A. Beck-Sickinger, Dr. F. Bordusa, Prof. Dr. D. Briel, Dr. R. Dörre, Prof. Dr. K. Eger, PD Dr. M. Grunow, Prof. Dr. M. Gütschow, Dr. Haferburg, Prof. Dr. U. Hahn, Prof. Dr. S. Hauschildt, Prof. Dr. H.-J. Hofmann, Dr. M. Höfliger, Prof. Dr. H.-D. Jakubke, Dr. H.-H. Förster, Prof. Dr. H.-P. Kleber, PD. Dr. S. Leistner, PD Dr. T. Maskow, Dr. T. Maier, Prof. Dr. K. Nieber, PD Dr. H. Pischel, Prof. Dr. W. Reißer, Prof. Dr. H. Sass, Prof. Dr. K. Schildberger, Prof. Dr. M. Schlegel, Prof. Dr. D. Schlee, PD. Dr. P. Tauchert, Dr. T. Täubner, Dr. D. Wissmann