Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

Molekulare Analyse der Riboflavinsynthesegene von *Bartonella henselae* und Aufbau einer speziesspezifischen PCR unter Verwendung des *rib*C Gens

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Albert-Ludwigs-Universität

Freiburg im Breisgau

Vorgelegt 2004

von Silke Hinkelmann

geboren in Ludwigshafen am Rhein

Dekan	Prof. Dr. med. Josef Zentner
1.Gutachter	PD Dr. med. Anna Sander
2. Gutachter	Prof. Dr. med. Georg Bauer
Jahr der Promotion	2004

Ergebnisse dieser Arbeit konnten in folgenden Veröffentlichungen verwendet werden:

1. **Hinkelmann S, Sander A, Kist M, Bereswill S** (1999) “Differentiaton of *Bartonella* species by using DNA sequence information of genes involved in riboflavin synthesis“ Posterpräsentation im Rahmen der 1st International Conference on *Bartonella* as Emerging Pathogens 5.-7. März 1999 in Tübingen
2. **Bereswill S, Hinkelmann S, Kist M, Sander A** (1999) “Molecular analysis of riboflavin synthesis genes in *Bartonella henselae* and use of the *rib*C gene for differentiation of Bartonella species by PCR“ J Clin Microbiol 37:3159-3166

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 7

1.1 Klassifikation 7

1.2 Entdeckungsgeschichte der Familie der *Bartonellaceae* 8

1.3 Krankheitsbilder der humanpathogenen *Bartonellenarten* 8

1.3.1 Bartonella bacilliformis 8

1.3.2 Bartonella quintana 9

1.3.3 Bartonella henselae 9

1.3.4 Bartonella clarridgeiae 10

1.3.5 Bartonella grahamii, B. elizabethae und B. vinsonii subsp. arupensis 11

1.4 Diagnose der *Bartonellosen* 11

1.5 Therapie 12

1.6 Epidemiologie der *Bartonella*-Arten 12

1.7 Entwicklung neuer Therapiealternativen 13

1.8 Riboflavinsynthese 14

1.9 Ziele der Arbeit 15

2 Material und Methoden 16

2.1 Klonierungsvektoren 16

2.2 Liste der Nährmedien 16

2.3 Liste der Puffer und Lösungen 17

2.4 Liste der *E. coli*-Mutanten 19

2.5 Liste der verwendeten *Bartonella*-Isolate 19

2.6 Oligonukleotide 20

2.7 Chemikalienliste 22

2.8 Geräteliste 23

2.9 Verwendete Software 23

2.10 Isolierung der bakteriellen DNA 23

2.10.1 Präparation der Gesamt-DNA aus kultivierten Bakterien 23

2.10.2 Präparation der bakteriellen Gesamt-DNA aus Blut und Gewebeproben 24

2.10.3 Präparation von Plasmiden aus 100 ml Ansätzen (Midiprep) 24

2.10.4 Präparation von Plasmiden aus 5 ml Ansätzen (Miniprep) 24

2.11 Herstellung kompetenter Zellen 25

2.12 Transformation 25

2.13 Restriktion 25

2.14 Ligation 26

2.15 Erstellen einer Genbank 26

2.16 Polymerasekettenreaktion 27

2.16.1 Aufreinigung von PCR-Produkten 28

2.17 Gelelektrophorese 28

2.18 Sequenzierung 29

3 Ergebnisse 31

3.1 Herstellung einer Genbank von *Bartonella henselae* 31

3.2 Isolierung der Riboflavinsynthesegene von *B. henselae* 33

3.3 Restriktionsanalyse des *rib*C komplementierenden Plasmids 35

3.4 Sequenzierung des Plasmids pBH-RibC 37

3.5 Sequenzhomologien innerhalb der Familie der *Bartonellaceae*. Vergleich mit *B. bacilliformis*, *B. clarridgeiae* und *B. quintana*. 42

3.6 Aufbau einer speziesspezifischen PCR 44

3.7 Sequenzvergleich der verschiedenen *B. h.*- Subspezies 46

3.8 Anwendung der speziesspezifischen Primer auf die *B. h.*-Subspezies...48

4 Diskussion 50

4.1 Riboflavingene als Ziel molekularbiologischer Untersuchungen 50

4.2 Genetische Untersuchungen bei *Bartonella* Spezies.....51

4.3 Entdeckung des *rib*C Gens bei *Bartonella henselae*.....51

4.4 Homologievergleich mit Riboflavinsynthesegenen anderer Bakterien ...52

4.5 Sequenzvergleich des *rib*C Genabschnitts mit dem homologen Abschnitt der Spezies *B. bacilliformis*, *B. clarridgeiae* und *B. quintana* 54

4.6 Speziesspezifische Diagnostik auf der Basis der Riboflavinsynthesegene55

4.7 Vergleich des *rib*C-Genabschnitts der verschiedenen Bartonellenstämme zur Einteilung in Subspezies 55

4.8 Ausblick: Einsatz des hier etablierten PCR-gestützten Diagnosesystems für den Nachweis von Bartonellen in klinischem Probenmaterial 56

5 Zusammenfassung.....58

6 Literaturverzeichnis 59

7 Lebenslauf 70

8 Danksagung.....72

1 Einleitung

Infektionskrankheiten stellen seit jeher eine Bedrohung dar. Mit der Erforschung der verursachenden Mikroorganismen wurden sie therapierbar oder vermeidbar.
Auch heute noch werden im Zusammenhang mit bekannten oder neu auftretenden Erkrankungen bisher unbekannte Erreger entdeckt und für die Forschung interessant.
Dies gilt insbesondere für die Familie der *Bartonellaceae*, deren einzelne Arten erst in jüngerer Zeit als Krankheitserreger entdeckt und mikrobiologisch klassifiziert wurden.
Speziell die humanpathogenen Vertreter der Gattung *Bartonella* erwecken das Interesse der Wissenschaft, und die Grundlagenforschung in diesem Gebiet bildet eine vielversprechende Basis für neue Diagnose- und Therapiemöglichkeiten.

1.1 Klassifikation

In der Familie der *Bartonellaceae* fasst man eine Gruppe gram-negativer, aerober, schwer anzüchtbarer Stäbchenbakterien zusammen, die zur alpha-2-Subgruppe der Proteobakterien gehören (Wong *et al* 1995). Zurzeit beinhaltet die Gattung *Bartonella* 18 Spezies, wovon sieben humanpathogenes Potential besitzen.

Tab. 1: Die Familie der *Bartonellaceae*.

Humanpathogene Spezies	Nicht humanpathogene Spezies
B. bacilliformis	*B. vinsonii*
B. quintana	*B. doshiae*
B. henselae	*B. peromyscii*
B. elizabethae	*B. taylorii*
B. clarridgeiae	*B. talpae*
B. grahamii	*B. tribocorum*
B. vinsonii subsp. *aruspensis*	*B. alsatica*
	B. koehlerae
	B. vinsonii subsp. *berkhoffii*
	B. schoenbuchii
	B. birtlesii

1.2 Entdeckungsgeschichte der Familie der *Bartonellaceae*

Der älteste bekannte Vertreter der Familie ist *Bartonella bacilliformis*. Dieser Erreger wurde 1909 erstmals von Alberto Barton entdeckt und blieb über 60 Jahre lang der einzige Vertreter der Gattung (Birtles und Raoult 1998). In der Geschichte der *Bartonellen* gab es immer wieder Umbenennungen und neue Zuordnungen. Im Jahre 1993 wurde, dem Vorschlag Brenner *et al* (Brenner *et al* 1993) folgend die Gattung *Rochalimaea* mit der Gattung *Bartonella* zur Familie der *Bartonellaceae* zusammengefasst. Die vier früheren *Rochalimaea* Arten wurden nun in *B. quintana*, *B. henselae*, *B. elizabethae* und *B. vinsonii* umbenannt. Auf Anregung von Birtles (Birtles *et al* 1995) wurde 1995 die Familie der *Grahamellen* mit der Familie der *Bartonellen* zusammengefasst und zwei frühere *Grahamella* Spezies in *B. talpae* und *B. peromyscii* umbenannt. Gleichzeitig stellten Birtles *et al* die drei neuen *Bartonella* Spezies *B. doshiae*, *B. grahamii* und *B. taylorii* vor. Im Jahre 1996 kam mit der Beschreibung von *B. clarridgeiae* (Lawson und Collins 1996) ein weiterer Vertreter zur Familie der *Bartonellaceae* hinzu. Es folgte 1998 die Beschreibung von *B. tribocorum* (Heller *et al* 1998) und 1999 kamen *B. alsatica* (Heller *et al* 1999), *B. koehlerae* (Droz *et al* 1999) und *B. vinsonii* subsp. *aruspensis* (Welch *et al* 1999) hinzu. *B. birtlesii* wurde 2000 isoliert (Bermond *et al* 2000), 2001 stellten Dehio und Mitarbeiter mit *B. schoenbuchii* einen weiteren Vertreter der Gruppe vor (Dehio *et al* 2001).

1.3 Krankheitsbilder der humanpathogenen *Bartonellenarten*

1.3.1 *Bartonella bacilliformis*

B. bacilliformis ist der Erreger der Carrion-Krankheit, einer Erkrankung, die in den südamerikanischen Andenregionen endemisch vorkommt. Die Krankheit zeigt einen biphasischen Verlauf. Die akute Form wird auch als Oroya-Fieber bezeichnet und geht mit hohem Fieber, schwerer Anämie, Hepatosplenomegalie, generalisierter Lymphadenopathie, Blässe, Tachykardie bis hin zum Kreislaufkollaps einher. Unbehandelt verläuft sie in 40-85% der Fälle tödlich (Garcia *et al* 1991, Birtles und Raoult 1998). Die Sekundärform wird auch als Verruga peruana bezeichnet. Hier kommt es zur Ausbildung von warzenähnlichen, vaskulären (angioproliferativen) Läsionen der Haut, die auch Schleimhäute und innere Organe betreffen können. In

den meisten Fällen verschwinden die Veränderungen nach 1-2 Monaten spontan ohne Therapie (Bass *et al* 1997). Überträger der Erkrankung ist die Sandfliege *Lutzomya verrucarum*, welche in den Endemiegebieten in den südamerikanischen Anden vorkommt.

1.3.2 *Bartonella quintana*

B. quintana wird durch Kleiderläuse von Mensch zu Mensch übertragen und verursacht das Fünftagefieber, auch als Schützengrabenfieber bezeichnet, da es erstmals während des ersten Weltkrieges bei Soldaten entdeckt wurde. Es handelt sich um eine Erkrankung, die nach einer Inkubationszeit von ca. drei Wochen mit starken Kopfschmerzen, Fieber, Muskel- und Gelenkschmerzen auftritt. Das Fieber rezidiviert ca. alle fünf Tage. Nach einem erneuten Auftreten der Krankheit während des zweiten Weltkrieges ist das Fünftagefieber weitgehend verschwunden (Birtles und Raoult 1998). In den letzten Jahren sind Erkrankungen durch *B. quintana* insbesondere bei Obdachlosen und Alkoholikern oder immunsupprimierten Patienten wie z.B. AIDS-Kranken erneut aufgetreten. In diesen Fällen manifestierte sich die Infektion mit *B. quintana* häufig in Form einer Bazillären Angiomatose, einer Endokarditis oder eines unspezifischen Fiebers. Bei der Bazillären Angiomatose handelt es sich um Gefäßproliferationen, die am häufigsten an der Haut auftreten, aber auch Schleimhäute und innere Organe befallen können (Cockerell *et al* 1990, Adal *et al* 1994). Auch diese Form der Erkrankung findet sich häufiger bei immunsupprimierten Personen (Schmidt *et al* 1996).

1.3.3 *Bartonella henselae*

Als Erreger der Katzenkratzkrankheit (KKK) gewinnt *B. henselae* in letzter Zeit immer größere Bedeutung. Hauptsächlich junge Katzen sind Reservoir für die Bakterien. Die Übertragung erfolgt entweder direkt über Kratzwunden oder Bisse, oder indirekt über Katzenflöhe (Fournier und Raoult 1998, Chomel *et al* 1996). Die KKK ist die häufigste Manifestation von *B. henselae*- Erkrankungen beim immunkompetenten Patienten. Sie stellt sich als gutartige selbstlimitierende Erkrankung dar, die sich meist als Lymphknotenschwellung zeigt, welche proximal von Katzenbissen oder Kratzern auftritt. Die Schwellung ist zudem meist gerötet, schmerzhaft und persistiert für mehrere Wochen. Diese Lymphadenopathie ist mit 80% die häufigste

Manifestationsform der KKK. In bis zu 30% der Krankheitsfälle kommt es außerdem zu leichtem Fieber, Übelkeit und Unwohlsein. Als atypische KKK bezeichnete klinische Manifestationen stellen z. B. Parinaud`s Okuloglanduläres Syndrom, Hepatosplenomegalie, Leber- und Milzabszesse, Beteiligung des Zentralnervensystems, außerdem Lungen-, Augen-, Muskel- und Skelettbeteiligung dar. Obwohl die KKK im Normalfall beim Immunkompetenten als selbstlimitierende gutartige Erkrankung verläuft, kann *B. henselae* bei immunsupprimierten wie z. B. HIV-infizierten, lebensbedrohliche generalisierte Infektionen hervorrufen (Fournier und Raoult 1998). Eine weitere Manifestationsform ist auch hier, wie schon bei *B. quintana* beschrieben, die Bazilläre Angiomatose. Diese Form der Erkrankung findet man ebenfalls meist bei HIV-infizierten oder anderen immunsupprimierten Patienten (Welch *et al* 1992, Arvand *et al* 1998).

1.3.4 Bartonella clarridgeiae

B. clarridgeiae wurde erstmals 1995 von Clarridge *et al* (Clarridge *et al* 1995) isoliert und 1996 von Lawson (Lawson *et al* 1996) charakterisiert und beschrieben. Das Reservoir ist wie bei *B. henselae* die Katze. Der erste Fall einer durch *B. clarridgeiae* verursachten Katzenkratzkrankheit wurde 1997 (Kordick *et al* 1997) beobachtet. Es handelte sich hierbei um einen Tierarzt, der nach einem Katzenbiss an Kopfschmerzen, Fieber und Lymphknotenschwellung erkrankte. Die serologische Untersuchung erbrachte den Nachweis von Antikörpern gegen *B. clarridgeiae* und negative Resultate gegen andere humanpathogene Bartonellenarten. Im Jahre 1998 beschrieb Margileth (Margileth *et al* 1998) einen weiteren Fall einer Katzenkratzkrankheit, welche mit positivem Antikörpernachweis für *B. clarridgeiae* einherging. Der immunkompetente Patient litt über 3 Monate an einer schweren konsumierenden Erkrankung (Fieber, Kopfschmerzen, Gewichtsverlust) bis sich letztlich ein massiver Brustwandabszess entwickelte. Antikörpertests für *B. henselae* blieben negativ und erst die nach Rekonvaleszenz durchgeführte Antikörpersuche gegen *B. clarridgeiae* zeigte in zwei Proben positive Ergebnisse. Ebenso konnten bei einer seiner Katzen Antikörper gegen *B. clarridgeiae* festgestellt werden.

1.3.5 Bartonella grahamii, B. elizabethae und B. vinsonii subsp. arupensis

B. grahamii wurde erst vor kurzem mit Hilfe von PCR in der Augenflüssigkeit einer Patientin mit Neuroretinitis diagnostiziert (Kerkhoff *et al* 1999). Bisher ist dies der einzige bekannte Fall einer humanen Infektion mit *B. grahamii*.
B. elizabethae wurde bisher nur ein einziges Mal aus dem Blut eines Patienten mit Endokarditis isoliert (Daly *et al* 1993). 1998 wurde ein weiterer Fall einer Infektion mit *B. elizabethae* beschrieben (O´Halloran *et al* 1998). Der Patient erkrankte nach einem Waschbärbiss an einer Neuroretinitis. Diagnostisch wurde ein Antikörpertiteranstieg gegen *B. elizabethae* festgestellt.
Bartonella vinsonii subsp. *arupensis* wurde 1999 aus der Blutkultur eines Rinderzüchters mit Fieber isoliert (Welch *et al* 1999).

1.4 Diagnose der *Bartonellosen*

Zur Diagnostik einer Erkrankung durch *B. bacilliformis* eignen sich nach Giemsa gefärbte Blutausstriche, in denen während der anämischen Phase infizierte Erythrozyten gefunden werden können. Außerdem können Bakterien auf bluthaltigen Medien angezüchtet werden. Die Kulturen werden bei 28-32 °C mit 5% CO_2 bebrütet. Serologische Methoden oder PCR werden in der Routinediagnostik von *B. bacilliformis* bisher nicht verwendet (Birtles und Raoult 1998). Beim klinischen Verdacht einer KKK verursacht durch *B. henselae* werden als diagnostisches Mittel der Wahl serologische Methoden wie der Immunfluoreszenztest, Elisa oder Westernblot angewendet (Bergmans *et al* 1997, Sander *et al* 1998). Histologisch gelingt der Nachweis aus Biopsiematerial oder Abszessdrainagematerial häufig mittels Warthin-Starry-Silberfärbung (Tierno 1998). Des Weiteren findet die Amplifikation von DNA mittels PCR zunehmend Anwendung. Hierbei stehen verschiedene Primerpaare zur Verfügung die eine Diagnostik aus Biopsiematerial und auch aus Patientenblut möglich machen (Anderson *et al* 1994, Goldenberger *et al* 1997, Sander *et al* 1999). Die Kultur von *B. henselae* aus Biopsiematerial ist ein sehr unzuverlässiges und langwieriges Verfahren und daher für die Diagnostik bislang von untergeordneter Bedeutung (Tierno 1998). *B. quintana* Infektionen lassen sich ebenfalls mit serologischen Methoden, der PCR und auch mittels Kultur diagnostizieren (Birtles und Raoult 1998). Zu Diagnostik und Therapie der

B. clarridgeiae, B. elizabethae und *B. grahamii*-Infektionen gibt es bisher aufgrund der geringen gefundenen Fallzahlen erst wenige Untersuchungen.

1.5 Therapie

Zur Therapie des durch *B. bacilliformis* verursachten Oroya-Fiebers wird hauptsächlich Chloramphenicol verwendet, welches auch gegen häufig auftretende Sekundärinfektionen mit Salmonella wirksam ist. Zur Bekämpfung der Verruga peruana können Rifampicin und Streptomycin verwendet werden (Birtles und Raoult 1998). Für die Therapie von *B. quintana*-Infektionen gibt es noch relativ wenige Studien. Nicht wirksam in der Therapie der BA scheinen Nafcillin, Dicloxacillin, Cephalexin A, wogegen Aminoglykoside, Trimethoprim-Sulfamethoxazol und Doxicyclin meist erfolgreich eingesetzt werden können (Maurin und Raoult 1996).
Zur Behandlung der Endokarditis und Bakteriämie gibt es bisher wenige aussagekräftige Untersuchungen. Die hier dargestellten Therapien der *B. henselae*-Infektionen sollen sich auf BA und KKK beschränken. Für die kutane BA zeigte besonders ein Therapieprotokoll mit Erythromycin (250-500 mg, 4xtgl.) Wirkung (Relman *et al* 1991, Slater *et al* 1990, Welch *et al* 1992, Perkocha *et al* 1990, Cockerell *et al* 1990). Mittel der Wahl für die Therapie der KKK sind Makrolide, z. B. Azithromycin (Bass *et al* 1997, Chia *et al* 1998).

1.6 Epidemiologie der *Bartonella*-Arten

Die Typisierung verschiedener *B. henselae*-Subspezies ist epidemiologisch von großer Bedeutung. So bietet sie die Möglichkeit Ausbreitung bestimmter Subgruppen zu verfolgen, Korrelationen zwischen Krankheitsbild und verursachendem Stamm zu erkennen und nicht zuletzt auch mögliche Übertragungswege genauer zu analysieren. Insgesamt erscheinen die Stämme von *B. henselae* sehr heterogen (Sander 1998). Mit Hilfe verschiedener Genotypisierungsmethoden konnten die *Bartonellen* genauer analysiert werden. So wurden sechs verschiedene Restriktionsmuster bei zehn *B. henselae* Isolaten durch PCR-basierte RFLP-Analyse gefunden (Matar *et al* 1993).
Mit Hilfe einer Kombination aus REP-PCR und ERIC-PCR gelang es fünf verschiedene „fingerprint profiles“ unter 17 *B. henselae* Isolaten zu differenzieren (Rodriguez-Barradas *et al* 1995). Bergmans *et al* (Bergmans *et al* 1996)

sequenzierten Teile des 16S rRNA-Gens und fanden hierbei zwei unterschiedliche Genotypen. Die auch in dieser Arbeit verwendeten 17 *B. henselae* Stämme aus Katzenblutisolaten wurden mit verschiedenen Typisierungsmethoden untersucht, und es fanden sich hierbei drei verschiedene Untergruppen, wobei der Referenzstamm Houston-1 in eine vierte Gruppe eingeordnet werden konnte (Sander *et al* 1998).

1.7 Entwicklung neuer Therapiealternativen

Bakterienzellen unterscheiden sich hinsichtlich Aufbau und Funktion in mehrfacher Weise von menschlichen und tierischen Zellen. Diese Unterschiede eröffnen prinzipiell die Möglichkeit, durch Pharmaka Bakterien in ihrer Vermehrung oder Lebensfähigkeit zu stören, ohne die Zellen des infizierten Organismus in gleicher Weise zu schädigen (Estler 1995). So erklärt sich die selektiv auf Bakterien schädigende Wirkung der Penicilline, durch die Hemmung der Biosynthese des Strukturpolymers Peptidoglycan (Murein) in der Bakterien-Zellwand, welches die Lyse und damit den Zelltod des Bakteriums zur Folge hat. Da Zellwände aus Murein nur bei Bakterien, nicht aber bei Wirbeltieren vorkommen, ist die Wirkung beschränkt auf das schädigende Bakterium.

Als weiteres Beispiel selektiv auf den schädigenden Organismus wirkender Substanzen lässt sich die Gruppe der Sulfonamide anführen. Ihre Wirkung beruht auf der Tatsache, dass Bakterien Folsäure selbst produzieren, während Wirbeltiere dieses Vitamin mit der Nahrung aufnehmen müssen. Sulfonamide hemmen den ersten Schritt der Folsäurebildung bei Bakterien. Folsäure ist hier notwendig zur DNA- und RNA-Synthese, ohne sie wird die Bakterienvermehrung gehemmt.

Die beiden vorangehenden Beispiele geben einen Hinweis darauf, wie Synthesewege, die nur im Bakterium und nicht in seinem Wirt vorkommen, Ziel therapeutischer Interventionen werden können. Ein weiterer Syntheseweg, welcher in Bakterien zu finden ist, ist der des Riboflavins. Der Mensch ist nicht in der Lage Riboflavin zu synthetisieren und nimmt diese Substanz mit der Nahrung auf. Bakterien synthetisieren die Substanz und sind ohne sie in Wachstum und Vermehrung gehemmt. Dieser Unterschied macht diesen Syntheseweg für weitere Forschungen interessant.

1.8 Riboflavinsynthese

Riboflavin ist ein Vitamin, das zum B_2 -Komplex gezählt wird. Es dient im Stoffwechsel als Baustein der prosthetischen Gruppen Flavin-Mononukleotid (FMN) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD). FMN und FAD sind kovalent gebundene Bestandteile verschiedener Oxidoreduktasen und dienen der Wasserstoffübertragung (Koolmann und Röhm 1994). Riboflavin kann von Bakterien, Pilzen und Pflanzen aus Guanosin-Triphosphat (GTP) synthetisiert werden. Wirbeltiere, darunter auch der Mensch, sind dazu nicht in der Lage und daher darauf angewiesen, das Molekül als Vitamin mit der Nahrung aufzunehmen. Da die für die Syntheseenzyme kodierenden Gene in den Mikroorganismen, nicht aber im Menschen vorkommen, bieten sie einen interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer diagnostischer Verfahren, die für den spezifischen Nachweis bakterieller Krankheitserreger geeignet sind (Bereswill *et al* 1999).

Bei *Escherichia coli* kodieren sechs Gene für die Riboflavinsynthese, die als *rib*A bis *rib*E bezeichnet werden (Abb.1). Die Riboflavinsynthese nimmt ihren Ausgang von Guanosin-Triphosphat (GTP), das zunächst mit Hilfe von GTP-Cyclohydrolase II (*rib*A) weiterverarbeitet wird. Die folgenden beiden Schritte werden von Pyrimidindeaminase- und Pyrimidinreduktase (*rib*D) katalysiert. Durch Dephosphorylierung mittels einer unspezifischen Phosphatase entsteht dann das Zwischenprodukt 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione. Dieses reagiert gemeinsam mit L-3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat, welches aus Ribulose-5-phoshat hervorgeht, katalysiert von 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphatsynthase (*rib*B). 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazinesynthase (*rib*E) katalysiert die Kondensation beider Zwischenprodukte, und im folgenden Schritt entsteht durch die Riboflavinsynthase (*rib*C) das Endprodukt Riboflavin. Aus dieser Reaktion geht außerdem 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione hervor, das in die Synthese an früherer Stelle wieder eingeht.

Bisher wurden bei einigen Mikroorganismen zu Riboflavinsynthesegenen homologe Abschnitte gefunden, so z.B. bei *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Fuller *et al* 1995), *Azospirillum brasilense* (van Bastelaere *et al* 1995), *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al* 1995), *Helicobacter pylori* (Bereswill *et al* 1998), *Photobacterium spp.* (Lee *et al* 1994), *Pichia guilliermondii* (Liauta-Teglivets *et al* 1995),

Saccharomyces cerevisiae (Skala *et al* 1994) und bei der Pflanze *Arabidopsis thaliana* (Kobayashi *et al* 1995).

Fehler! Es ist nicht möglich, durch die Bearbeitung von Feldfunktionen Objekte zu erstellen.

Abb. 1: Biosyntheseweg des Riboflavins bei *Escherichia coli*. Links rot gedruckt: Bezeichnung der kodierenden Gene, rechts kursiv gedruckt: die Syntheseschritte katalysierenden Enzyme (nach Bacher *et al* 1996).

1.9 Ziele der Arbeit

Der kulturelle Nachweis von *Bartonella*-Spezies aus klinischen Proben ist aufgrund der speziellen Anzuchtbedingungen und des langsamen Wachstums nach wie vor langwierig und unzuverlässig. Zur Verbesserung der Diagnostik wäre es daher von Vorteil das Vorhandensein auch weniger Bakterien direkt aus klinischem Probenmaterial nachzuweisen. Als Methode bot sich hier die PCR an für deren Zielbereich eine DNA-Region aus *Bartonella*-Arten isoliert werden sollte, die weder im Wirt noch in anderen humanpathogenen Organismen vorhanden ist.

Hiervon ausgehend lassen sich die Ziele der Arbeit wie folgt zusammenfassen:

1. Erstellung einer Genbank aus *Bartonella henselae*-DNA.
2. Isolierung von Riboflavinsynthese-Genen aus *B. henselae* durch Transformation der Genbank in Riboflavinsynthesemutanten von *E. coli* und Suche nach funktionell komplementierenden Klonen.
3. Sequenzierung der entsprechenden Gene und Suche ähnlicher Sequenzabschnitte bei anderen humanpathogenen *Bartonella*-Spezies.
4. Nutzung der DNA-Sequenzen zum Aufbau einer speziesspezifischen PCR.

2 Material und Methoden

2.1 Klonierungsvektoren

Für die Erstellung der Genbank wurde das Plasmid pZErO-2 der Firma Invitrogen verwendet (Abb. 2).

Fehler! Es ist nicht möglich, durch die Bearbeitung von Feldfunktionen Objekte zu erstellen.

Abb. 2: Schematische Darstellung des Klonierungsvektors pZErO-2. Hervorgehoben sind die Restriktionsschnittstellen für die Enzyme HindIII, EcoRI und PstI über die die DNA-Abschnitte in den Vektor kloniert wurden. Gene sind mit grauen Pfeilen markiert. Kan: Kanamycinresistenzgen; *ccd*B: letales Gen; P*lac*: Promotorregion des *lac*Z-Gens; *lac*Zα: *lac*Z-Gen; *col*EI/*ori*f1: Replikationsursprung; RP/FP: Anheftstelle für Primer. Vektor aus dem Zero Cloning Kit der Firma Invitrogen.

Das Plasmid enthält eine multiple Klonierungsstelle mit verschiedenen Enzymschnittstellen. Diese liegt inmitten eines aus *lac*Zα und *ccd*B Gen fusionierten Bereiches, dem außerdem der Promotor P*lac* vorgelagert ist. Das Gen *ccd*B codiert für ein Protein, das die Bakterien abtötet. Dies ermöglicht ein direktes Selektionsverfahren, da nur Bakterien, die Plasmide enthalten, in denen *ccd*B durch inserierte *Bartonella*-DNA inaktiviert wurde, überleben.
Ferner enthält der Vektor ein Kanamycinresistenzgen (Kan), welches eine Selektion von plasmidtragenden *E. coli*-Bakterien auf kanamycinhaltigen Nährmedien nach Transformation ermöglicht. *E. coli* welche kein Plasmid erhalten haben können auf kanamycinhaltigem Nährmedium nicht wachsen, da sie kein Resistenzgen besitzen. Der Replikationsursprung *col*EI ermöglicht die Replikation in *E. coli* und ist Voraussetzung für die Vermehrung des Plasmides.

2.2 Liste der Nährmedien

LB-Flüssigmedium:	10 g NaCl, 10 g Tryptone, 5 g Hefeextrakt, ad 1 l Aqua dest.
LB-Agarplatten:	10 g NaCl, 10 g Tryptone, 5 g Hefeextrakt, 16 g Agar-Agar ad 1 l Aqua dest.

Die Medien wurden bei 1 bar, 121 °C 15 min autoklaviert. Die Antibiotikazugabe erfolgte nachdem die Nährmedien auf 50 °C abgekühlt waren.
Für den sog. Riboflavinagar wurden bereits vor dem Autoklavieren 400 mg Riboflavin/Liter LB-Medium zugegeben.

2.3 Liste der Puffer und Lösungen

Antibiotika-Stammlösungen:

Kanamycin-Stammlösung: 20 µg Kanamycin, ad 1 ml aqua dest.

Ligasepuffer (10x) Böhringer, Mannheim, : 300 mM Tris/HCl (pH 7,5), 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT (Dithiothreitol),

Lösungen für Agarosegelelektrophorese:

Elektrophoresepuffer TBE: 108 g Tris, 55 g Borsäure, 40 ml EDTA 0,5 M (pH=8,0), ad 1 l Aqua dest.

EtBr-Stammlösung: 10 mg EtBr/1 ml Aqua dest.

EtBr-Gelbad: 100 µl EtBr-Stammlösung ad 1 l Aqua dest.

Proben-Auftragspuffer(10x): 200 mM Tris-Acetat (pH=8.0), 5 mM EDTA, 50% Glycerin (v/v), 0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylen-Zyanol, 0,1% Orange G

Marker-DNA (1 kb) Gibco BRL: 200 µl Proben-Auftragspuffer (10x), 400 µl DNA-Marker (0,25 µg/µl), 1400 µl dH_2O, (Fragmentgrößen in Bp: 75, 134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506, 517, 1061, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, 7126, 8144, 9126, 10180, 11198, 12216)

.

Puffer für die PCR:

Puffer I (2fach konz.): 16 mM $(NH4)_2SO_4$, 67 mM Tris-HCl, (pH=8,8), 1,5 mM $MgCl_2$,10 mM 2-Mercaptoethanol, 160 µg/µl BSA, 5 % DMSO, je 0,2 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP

Puffer II (5fach konz.) (Pharmacia, Freiburg): 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris/HCl, (pH=9,0)

Puffer für die Plasmid-Präparation (Qiagen):

Puffer P1: 50 mM Tris/HCl, (pH=8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A

Puffer P2: 200 mM NaOH, 1% SDS

Puffer P3: 3 M Kalium-Acetat (pH=5,5)

QBT: 750 mM NaCl, 50 mM MOPS (pH 7), 15% Isopropanol, 0,15% Triton X-100

QC: 1 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7), 15% Isopropanol

QF: 1,23 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7), 15% Isopropanol

2.4 Liste der *E. coli*-Mutanten

Tab. 2: Übersicht über die verwendeten *E. coli*-Mutanten

***E. coli*-Stamm**	**Genotyp**	**Quelle**
RR28	*thi leu pro lac gal ara xyl endA recA hsd* (r-,m-) *phe*S12 *sup*E44	Richter *et al* 1993
Rib2	RR28 mit einer Punktmutation in *ribD*	A. Bacher
BSV23	*thi*, *hsd* (r-, m-)*ribC::Tn5* Km	A. Bacher
TOP10	F- *mcrA*Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *deo*R *rec*A1 *ara*D139 Δ(*ara-leu*) 7697 *gal*U *gal*K *rps*L *end*A1 *nup*G	Invitrogen

2.5 Liste der verwendeten *Bartonella*-Isolate

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

Stamm			**Eigenschaften**	**Herkunft**
B. henselae	BK3	I	Katzenblutisolat	Sander *et al* 1998
	BK8	I	Katzenblutisolat	Sander *et al* 1998
	BK75II	I	Katzenblutisolat	Sander *et al* 1998
	BK77	I	Katzenblutisolat	Sander *et al* 1998
	BK78	I	Katzenblutisolat	Sander *et al* 1998
	BK79	I	Katzenblutisolat	Sander *et al* 1998
	BK26II	II	Katzenblutisolat	Sander *et al* 1998
	BK36	II	Katzenblutisolat	Sander *et al* 1998
	BK38	II	Katzenblutisolat	Sander *et al* 1998
	BK75	II	Katzenblutisolat	Sander *et al* 1998
	K4	II	Katzenblutisolat	Sander *et al* 1998
	K7	III	Katzenblutisolat	Sander *et al* 1998

Stamm		Eigenschaften	Herkunft
B. henselae	BK3 I	Katzenblutisolat	Sander *et al* 1998
	Houston I IV	isoliert von HIV-Patient	Regnery *et al* 1992
	8015	Katzenblutisolat	Marston *et al* 1999
	8016	Katzenblutisolat	Marston *et al* 1999
	8017	Katzenblutisolat	Marston *et al* 1999
	8018	Katzenblutisolat	Marston *et al* 1999
B. clarridgeiae	#73	Katzenblutisolat	Heller *et al* 1997
	13762	Katzenblutisolat	Marston *et al* 1999
	8051	Katzenblutisolat	Marston *et al* 1999
B. quintana	Cip 103739		Cip
	München 1	isoliert von HIV-Patient	Schmidt *et al* 1996
B .bacilliformis	ATCC 35685		ATCC

2.6 Oligonukleotide

Tab. 4: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Primerbezeichnung	Oligonukleotidsequenz	Quelle
FP	GAC GGC CAG TGA ATG TG	Invitrogen, pZErO-Vektor-Kit
PBB 5	CGA GCA AAC TGA TCA AC	diese Arbeit
PBB10	TCG AAT GCA CAC ACA TAC A	diese Arbeit
PBB15	TGT GAT GCC ACT CTT TC	diese Arbeit
PBB16	ATT GTA ACG GAT ATC GG	diese Arbeit
PBB17	CTT GAA ATG ACG ACG TG	diese Arbeit
PBB-R1	AAG GGC GCT AAC TGT TC	diese Arbeit
PBB-R2	GAC GCA ATA TCA AAT CC	diese Arbeit
PBC 5	TAC ATA ACG AGC CAA TT	diese Arbeit
PBC 6	TAC CAG GAC TTG AAA TG	diese Arbeit
PBC10	GGC GGT ATC AAA TTA TT	diese Arbeit

PBC15	TAG CTT TAG AAC AAT ATG GT	diese Arbeit
PBC15-2	CAC AGG GAT CAT AAC CG	diese Arbeit
PBC17	CAA TTG GCT CGT TAT GT	diese Arbeit
PBC19	TTG CAT CAA GAG GGA AT	diese Arbeit
PBC5-2	TGC CCA CAC CAT TAT CT	diese Arbeit
PBH 1	AAG CAA GCA CTT CAA GG	diese Arbeit
PBH 2	TGA CTG CTG TTG TTC ATC AG	diese Arbeit
PBH 3	CCA AGT GCT ACA TAA CCA TC	diese Arbeit
PBH 4	CGG GTT GTT ATT GCT CTT AC	diese Arbeit
PBH 5	CTT GTC TCC AGG TTG TC	diese Arbeit
PBH 6	TCC ACA ATT AAA TTG CC	diese Arbeit
PBH 7	TGA ACA CGC AAT TGA TG	diese Arbeit
PBH 9	GGG CTA TTA AAG AAT TT	diese Arbeit
PBH10	ATT CCG CGT TGA TAA AG	diese Arbeit
PBH11	AAG GCA AAT ATT CTC CC	diese Arbeit
PBH12	CTT TCG TGC GAT TAT TG	diese Arbeit
PBH13	CAC TTC AAC TCC AAC CC	diese Arbeit
PBH14	GCT CTG ATG CTT TTC GC	diese Arbeit
PBH15	TTA TGC ACC CGT TAT TT	diese Arbeit
PBH16	CAA TGG ACG AAA GGA AC	diese Arbeit
PBH17	TTG ATC AAC TTG CCC GT	diese Arbeit
PBH18	CCA GGT GCA ATA GCT TT	diese Arbeit
PBH19	TTT ATT CCG CCT TGC CC	diese Arbeit
PBH20	AAG CAA GGT ACA AGC CC	diese Arbeit
PBH21	GTC ACC AGC AGT AAG CC	diese Arbeit
PBH22	TCT GTA ACC GAC GCG AA	diese Arbeit
PBH23	ACT TCC TAA ACG GCG CA	diese Arbeit
PBH24	AAA TGT ACG AAT CGC CG	diese Arbeit
PBH25	AAC GCT CCA TTG ATC CA	diese Arbeit
PBH26	CGG ATG CAA CAT CAC AA	diese Arbeit
PBH27	CAG ATC CGA CTC GCT TT	diese Arbeit
PBH-L1	GAT ATC GGT TGT GTT GAA GA	diese Arbeit
PBH-R1	AAT AAA AGG TAT AAA ACG CT	diese Arbeit
PBQ-R1	AAA GGG CGT GAA TTT TG	diese Arbeit
RP	CAT GAT TAC GCC AAG C	Invitrogen, pZErO-Vektor-Kit

Für die Sequenzierungsreaktion wurden Primer in der Konzentration 3,2 pmol/µl, für die PCR in der Konzentration 25 pmol/µl verwendet.

2.7 Chemikalienliste

Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose	Peg Lab, Erlangen
Amberlite	Merck, Darmstadt
APS	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
BSA	Böhringer, Mannheim
$CaCl_2$	Merck, Darmstadt
dNTPs	Pharmacia, Freiburg
EDTA	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe
Enzyme: *EcoRI*	Boehringer, Mannheim
EcoRV	Boehringer, Mannheim
PstI	Boehringer, Mannheim
HindIII	Boehringer, Mannheim
Taq-Polymerase	Amersham
Pwo-Polymerase	Peq Lab, Erlangen
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Glycerin	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe
Harnstoff	Life Technologies, Paisley, Scotland
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Steinheim
Marker	Böhringer, Mannheim
Natriumacetat	J.T. Baker, Deventer, Holland
Plasmid pZErO-2	Invitrogen
Riboflavin	Sigma, Steinheim
SDS	Merck, Darmstadt
Sequenasemix	Amersham, Pharmacia, Biotech
TEMED	Merck, Darmstadt
Tris	Sigma, Steinheim
Tryptone	Difco, Detroit, USA
Yeastextract	Difco, Detroit, USA

2.8 Geräteliste

pH-Meter	WTW
Pipetten	Finnpipette Labsystems
Sequencer	373A DNA Sequencer, Applied Biosystems
Thermomixer	Thermomixer 5436, Eppendorf
Thermocycler	Techne Progene
Waagen	Scaltec/Sartorius 1608 MP
Wasserbad	Julabo
Vakuumzentrifuge	Hetovac VR-1
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5402
	Heraeus Sepatech Varifuge 30R

2.9 Verwendete Software

Align Plus	3.0	Science & Education Systems
Clone Manager	3.1	Science & Education Systems
Primer-Designer	1.02	Science & Education Systems
Power Point	7.0	Microsoft
Photo Suite	4.0	MGI
Word für Windows	6.0	Microsoft

2.10 Isolierung der bakteriellen DNA

2.10.1 Präparation der Gesamt-DNA aus kultivierten Bakterien

3,5 ml Puffer 1 wurde mit 1 ml Bakterienzellsuspension und 0,5 ml SDS 10% zusammengegeben und abgewartet bis eine Lyse eingetreten war. Danach Zugabe von 5 ml Phenol und Zentrifugation bei 5000 Umdrehungen und 30 °C für 30 Minuten. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, mit 5 ml Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) gemischt und erneut bei 5000 U/min für 30 Minuten zentrifugiert. Danach wurde wiederum der Überstand abgenommen und die darin enthaltene DNA mit 3 Volumen absolutem Ethanol und 1/20 Volumen 3 molarem Natriumacetat gemischt und bei 15000 U und 4 °C in 90 Minuten gefällt. Das Pellet wurde mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und anschließend in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Pellet wurde zum Abschluss mit 500 µl Aqua bidest resuspendiert.

2.10.2 Präparation der bakteriellen Gesamt-DNA aus Blut und Gewebeproben

Für die Isolation von DNA aus Blut und Gewebeproben wurde der entsprechende Kit der Firma Qiagen verwendet. 200 µl der Probe wurden durch Hinzufügen von Proteinase K, Puffer AL und Ethanol lysiert. Die so entstandene DNA-Zelllysat-Mixtur wurde in die QIAmp-Säule pipettiert und bei 6000 g 1 min zentrifugiert, um die DNA an die Säulenmembran zu binden. Es folgten weitere Waschschritte bevor die DNA mittels 200 µl Puffer AE eluiert wurde.

2.10.3 Präparation von Plasmiden aus 100 ml Ansätzen (Midiprep)

Für die Plasmidpräparation wurde der Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet. Dieses Verfahren beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse, welchem sich eine Bindung der Plasmid-DNA an die Qiagen Anionen-Austausch-Säulen anschließt. Mittels einer mittleren Salzwäsche werden Bestandteile wie RNA, Proteine usw. entfernt. Die Plasmid-DNA wird mit Hilfe eines hoch konzentrierten Salzpuffers eluiert und mittels einer Isopropanolfällung entsalzt und konzentriert.

Hierzu wurden die Bakterien in 100 ml Flüssigkulturen unter Zugabe der benötigten Zusätze (Antibiotika, Riboflavin) kultiviert, abzentrifugiert und durch Zugabe der Puffer P1 und P2 lysiert. Durch die Zugabe von Puffer P3 wurde die Präzipitation der Plasmid-DNA erreicht, welche durch einen Zentrifugationsschritt bei 15000 g, bei 4 °C über 30 min an die Qiagen Anionen-Austausch-Säulen gebunden wurde. Unter Verwendung der Puffer QBT, QC und QF wurde die DNA gewaschen, eluiert und mit 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert. Nach 30 minütigem Zentrifugieren bei 15000 g und 4 °C schloss sich ein weiterer Waschschritt mit 70%igem Ethanol an. Nach dem Trocknen in der Vakuumzentrifuge wurden die Pellets in 100 µl Aqua dest. resuspendiert.

2.10.4 Präparation von Plasmiden aus 5 ml Ansätzen (Miniprep)

Für diese Präparation wurde ebenfalls ein Kit der Firma Qiagen verwendet. Auch hier geht die Präparation von einer alkalischen Lyse aus, der sich eine Anlagerung der Plasmid-DNA an die Silikon-Gel Membran in Gegenwart hoher Salzkonzentration anschließt. Es folgen ein Waschschritt und schließlich die Lösung der Plasmid-DNA von der Membran mit Hilfe eines niedrig konzentrierten Salzpuffers oder ddH_2O.

Zunächst wurden die Bakterien in 500 µl Flüssigkulturen unter Zugabe der notwendigen Zusatzstoffe kultiviert, abzentrifugiert und unter Zugabe der Puffer P1, P2 lysiert. Durch Hinzufügen von Puffer N3 wurden chromosomale DNA und Proteine denaturiert. Die denaturierten Bestandteile wurden abzentrifugiert, der Überstand in die QIAPrep-Säulen pipettiert und durch Zentrifugieren wurde die Plasmid-DNA an die Silikon-Gel Membran gebunden. Angeschlossen wurden Waschschritte mit den Puffern PB und PE. Abschließend wurde die Plasmid-DNA mit 100 µl Aqua dest. eluiert.

2.11 Herstellung kompetenter Zellen

Um für die DNA-Aufnahme kompetente Zellen zu erhalten wurde zunächst ein 3-Ösen-Ausstrich des bei -70 °C gelagerten Stammes auf dem entsprechenden Nährmedium durchgeführt. Eine der hieraus hervorgegangenen Einzelkolonien wurde in 100 ml LB-Flüssigmedium angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln (zur Sauerstoffzufuhr) bis zu einer OD=0,5 bei 600 nm vermehrt. Der Überstand wurde in 10 Minuten bei 5000 U/min und 4 °C abzentrifugiert und das Zellpellet in 40 ml sterilem $CaCl_2$ (100 mM) resuspendiert. Über Nacht wurde die Suspension bei 4 °C gelagert und am nächsten Morgen unter den vorher erwähnten Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml $CaCl_2$ (100 mM) mit 10% Glycerin aufgenommen und in Portionen zu 50 µl bei -70 °C gelagert.

2.12 Transformation

Für die Transformation wurden die calciumkompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. 5 µl des jeweiligen Plasmids wurden zugegeben und die Mischung 30 min auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte eine Erwärmung von 1-2 min bei 42 °C, der sich 5 minütiges Kühlen auf Eis anschloss. Nach Zugabe von 350 µl LB wurde die Mischung 2-3 h bei 37 °C geschüttelt und danach in Portionen von 100 µl auf entsprechende Nährmedien plattiert.

2.13 Restriktion

Für den Verdau der bakteriellen DNA oder Plasmid-DNA wurde folgender Ansatz verwendet:

3 µl Puffer, 5 µl DNA oder Plasmid, 1 µl des entsprechenden Restriktionsenzyms, 21 µl dH2O

Der Restriktionsansatz wurde 1 h bei 37 °C gelagert und anschließend die Fragmente mit der Gelelektrophorese aufgetrennt.
Das Agarosegel wurde im Anschluss 5 min im Ethidiumbromidbad gefärbt, 10 min in Aqua dest. entfärbt. Danach wurden die Banden im UV-Licht sichtbar gemacht und das Gel fotografiert.

2.14 Ligation

Für die Ligation wurde folgender Ansatz verwendet:

5 µl Plasmid, 2 µl Ligase-Puffer (10x), 2 µl DNA-Ligase, x µl DNA,
ad 20 µl dH_2O

Da die Menge der DNA variierte, wurde die Menge an dH_2O entsprechend angepasst. Der gesamte Ansatz betrug in jedem Fall 20 µl.
Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 4°C gekühlt und konnte dann weiterverarbeitet werden.

2.15 Erstellen einer Genbank

Zunächst wurde wie unter 2.13 dargestellt *Bartonella henselae*-DNA mit den Enzymen EcoRI, PstI und EcoRI/PstI geschnitten und so die DNA-Fragmente für die Genbank geschaffen. Außerdem wurden drei weitere Ansätze angelegt in denen jeweils 1 µl Vektor pZErO-2 und in jeweils einem Ansatz 1 µl EcoRI oder PstI oder 1 µl EcoRI und 1 µl PstI enthalten waren. Die Restriktion erfolgte 30 Minuten bei 37 °C. Die 20 µl Ansätze wurden mit 80 µl Aqua bidest ergänzt und 15 min auf 65 °C erhitzt, um die enthaltenen Enzyme zu denaturieren. Danach wurden je 400 µl abs. Ethanol zugegeben und die enthaltene DNA während eines Zentrifugationsschrittes bei 14000 U und 4 °C in 30 min gefällt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 10 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Plasmidansätze wurden in 100 µl ddH_2O, die DNA-Ansätze in 30 µl ddH_2O resuspendiert. Anschließend wurden je 15 µl der DNA-Lösung in 2 µl Vektor wie oben beschrieben ligiert. Die so erhaltenen Vektoren wurden in Top 10 Calciumzellen transformiert und je 100 µl auf LB-Agar mit Kanamycin plattiert. Die Kulturen wurden drei Tage bei 37 °C bebrütet

und anschließend mit LB-Flüssigmedium von der Platte abgeschwemmt. Für eine Midiplasmidpräparation wurden je 100 µl der Plasmidmischungen in 100 ml LB-Flüssigmedium mit Kanamycin über Nacht bei 37 °C angezüchtet. Die Plasmide wurden mit Hilfe des Qiagen Midiprep Kits nach Angaben des Herstellers isoliert und im Anschluss zur Kontrolle der Inserts wiederum mit den jeweils zur Restriktion verwendeten Enzymen verdaut.

2.16 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase-chain-reaction, PCR) dient der Amplifikation von DNA-Abschnitten, die zwischen zwei spezifisch an die DNA bindenden Oligonukleotidprimern liegen. Hierzu sind drei Zyklen nötig, die sich durch verschiedene Temperaturen unterscheiden, die in dieser Arbeit 30 Mal wiederholt wurden. Im ersten Teilschritt, der Denaturierungsphase wurden die beiden DNA-Stränge durch hohe Temperaturen voneinander getrennt, so dass die DNA für den nächsten Schritt einzelsträngig vorlag. Im zweiten Schritt, der Annealingphase hybridisierten die spezifischen Primer an die DNA. Anschließend in der Elongationsphase wurde ausgehend von den angelagerten Primern durch Polymerase ein komplementärer Strang synthetisiert. Nach jedem Zyklus lag für den nächsten Zyklus eine wesentlich größere Menge von DNA-Vorlagen vor, so dass die Anzahl des gewünschten PCR-Produktes exponentiell anstieg.

Wir verwendeten einen 50 µl Ansatz der sich wie folgt zusammensetzte:

Ansatz 1:

25 µl PCR-Puffer 1 (2x), 21 µl aqua bidest, 1 µl Primer 1, 1 µl Primer 2, 0,2 µl Taq-Polymerase (1U) + 0,8 µl aqua bidest, 1 µl DNA

Ansatz 2:

5 µl PCR-Puffer 2 (10x), 33 µl aqua bidest, 4 µl dNTP-Mischung, 4 µl BSA, 1 µl Primer 1, 1 µl Primer 2, 0,2 µl Taq-Polymerase (1U) + 0,8 µl aqua bidest, 1 µl DNA

Die im Einzelnen verwendeten Reaktionsbedingungen sind im Ergebnisteil am jeweiligen Beispiel genau beschrieben.

Nach der PCR wurden je 20 µl des Ansatzes mit 2 µl des Auftragspuffers gemischt und auf einem Agarosegel über 1 h bei 150 V gelelektrophoretisch getrennt. Es folgte die 5 minütige Färbung in einem 10 pg/ml konzentrierten Ethidiumbromidbad

und anschließende Entfärbung für 10 min in Aqua dest. Darauf wurden die Banden im UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

2.16.1 Aufreinigung von PCR-Produkten

Nach gelelektrophoretischer Analyse der amplifizierten DNA (siehe 2.13) konnte aus dem PCR-Ansatz die DNA aufgereinigt werden, wenn eindeutig ein einziges PCR-Produkt entstanden war, um sie für weitere Ligationen oder Sequenzierung zu verwenden. Hierzu wurde ein kommerziell erhältlicher Kit von Amersham Pharmacia Biotech benutzt. Es wurde zunächst die entsprechende Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Unter Zugabe eines Puffers zur Denaturierung von Proteinen wurde die Masse bei 60°C inkubiert um die Agarose aufzulösen. Danach wurde die Flüssigkeit in die GMX-Säulen gegeben, in welchen sich während des folgenden Zentrifugationsschrittes die DNA an die Glasfieber-Matrix binden konnte. Nach einem Waschschritt konnte die DNA mit 50 µl eines speziellen Puffers oder Aqua dest. eluiert werden.

2.17 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung und Analyse verschieden großer DNA-Fragmente die z.B. durch PCR oder Restriktion entstanden sind. Jede 20 µl Probe wurde mit 2 µl Auftragspuffer gemischt, als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet. Die Proben wurden je nach erwarteter Fragmentgröße auf 0,8% bis 2% Agarosegel aufgetragen und bei 150 V 1-1,2 h aufgetrennt.

Als Marker wurde ein 1KB-Marker(12 µl) der Firma Gibco BRL verwendet, gemischt wie unter 2.2 aufgeführt und in Portionen von 12 µl eingesetzt. Der Marker trennt sich auf 2%igem Agarosegel in folgende Fragmente: 12216bp, 11198bp, 10180bp, 9162bp, 8144bp, 7126bp, 6108bp, 5090bp, 4072bp, 3054bp, 2036bp, 1636bp, 1018bp, 517/506bp, 396bp, 344bp, 298bp, 220/201bp, 154/134bp und macht damit einen Größenvergleich der DNA-Fragmente möglich.

2.18 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten wurde mit Hilfe des Thermosequenase Kits (Amersham LIFE SCIENCE) nach der Kettenabbruchmethode (Sanger 1977) durchgeführt.
Die Reaktion wurde mit einem Primer durchgeführt, welcher sich zunächst spezifisch an einen der durch Hitze denaturierten DNA-Stränge anlagerte. Vom 3'Ende des angelagerten Primers erfolgte die Bildung eines komplementären Stranges mit Hilfe einer DNA-Polymerase in Gegenwart von dNTPs. Die Kette wird unterbrochen durch den Einbau eines ddNTPs, welches eine Verlängerung aufgrund fehlender Phosphodiesterbindungen verhindert. Von den vier möglichen ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTPT) war jedes mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Durch die statistisch verteilten Kettenabbrüche entstanden viele verschieden große Fragmente, welche jeweils durch das letzte Nukleotid eindeutig markiert waren. Auftrennung über ein Polyacrylamidgel ermöglichte die Zuordnung der fluoreszierenden Nukleotide zu bestimmten Positionen in der Sequenz. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des 373A DNA sequencers.

Ansatz für das Cycle Sequencing:

11 µl Aqua bidest, 5 µl Sequenasemix, 3 µl Plasmid oder aufgereinigtes PCR-Produkt, 1 µl Primer

Temperaturprotokoll für das Cycle Sequencing:

	40 °C	120 s	1x
	93 °C	180 s	1x
Denaturierung	96 °C	10 s	
Annealing	58 °C	5 s	36x
Elongation	60 °C	240 s	

Fällung der Sequenzierungsprodukte:
Um die Sequenzierungsprodukte von Pufferkomponenten und Enzymen zu reinigen wurden die Proben zunächst jeweils mit 50 µl abs. Ethanol und 3 µl 3 M Natriumacetat gemischt und bei 14000 U/min und 4 °C 30 min zentrifugiert. Der

Überstand wurde verworfen und das Pellet 30 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Jede Probe wurde danach in 3,8 µl Ladepuffer (im Kit enthalten) aufgenommen und konnte bis zum Auftrag auch längere Zeit bei -20 °C gelagert werden.

Das Polyacrylamidgel zur Auftrennung der Sequenzierungsprodukte wurde aus folgenden Substanzen angesetzt:

30 g Harnstoff, 1 Prise Amberlite, 21 ml Aqua bidest, 10 ml Acrylamid 29:1

Dieser Ansatz wurde in 30 min bei 50 °C gelöst. Anschließend wurde das Amberlite abfiltriert und 6 ml TBE 10fach konzentriert zugegeben.
350 µl APS und 15 µl TEMED starteten die Polymerisation und sollten erst kurz vor dem Gießen zugegeben werden.
Die Polymerisation dauerte je nach Raumtemperatur zwischen 1 und 2 h. Das oben vorbereitete Gel erforderte einen Sequenzierungslauf von 15 h bei 27 Watt.
Die Computerauswertung ergab Rohsequenzen von bis zu 600 bp, die jedoch nochmals manuell nachkorrigiert werden mussten. Die korrigierten Sequenzen konnten dann für Alignments, Homologievergleiche oder Datenbankanalysen verwendet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung einer Genbank von *Bartonella henselae*

Eine Genbank dient dazu die komplexe bakterielle Gesamt-DNA in kleinere Abschnitte zu unterteilen und auf Vektoren (z. B. Plasmide) zu übertragen. Dieses Verfahren ermöglicht es kleine DNA-Abschnitte auf ihre kodierten Funktionen zu überprüfen, indem sie auf den Plasmiden in definierte Mutanten transformiert werden, deren fehlende Funktion sie möglicherweise komplementieren. In dieser Arbeit wurde die oben beschriebene Technik verwendet, um das Genom von *B. henselae* näher zu untersuchen. Durch Aufspaltung in kleinere DNA-Abschnitte und Übertragung dieser auf Vektoren, sollten möglichst viele verschiedene DNA-Fragmente auf Vektoren entstehen, die dann beim Übertragen eines entsprechenden Genes in die definierte Mutante zur Komplementierung dieser Mutation führen und somit Aufschluss über das Vorhandensein spezieller Stoffwechselwege geben. Zunächst wurde wie unter 2.13 dargestellt *Bartonella henselae*-DNA mit EcoRI, PstI und EcoRI/PstI geschnitten. In gleicher Weise wurde mit den Plasmiden verfahren. Im Anschluss folgte ein Ligationsschritt. Nach der Ligation und Transformation in *E. coli* entstanden folgende Plasmid-basierte Genbanken:

pZErO-2E	mit einem Set an Inserts aus EcoRI geschnittener *B. henselae*-DNA
pZErO-2P	mit einem Set an Inserts aus PstI geschnittener *B. henselae*-DNA
pZErO-2E/P	mit Inserts die auf beiden Seiten EcoRI, auf beiden Seiten PstI oder auf einer Seite EcoRI und auf der anderen mit PstI geschnitten wurden.

Im Anschluss wurden die Plasmid-Populationen aus *E. coli* isoliert und zur Kontrolle erneut eine Restriktion durchgeführt, wobei jeweils die Enzyme verwendet wurden, mit welchen zuvor das Plasmid geschnitten worden war. Die Ergebnisse sind in Abb. 3 am Beispiel einer nach gleichem Verfahren erstellten Genbank mit dem Plasmid pZErO-1(2808 bp) dargestellt. Die Spur 1 zeigt das Plasmid pZErO-1E

geschnitten mit dem Enzym EcoRI. Es ist eine breite Bande knapp unterhalb der 3 kb Marke zu erkennen, welche die Vektor-DNA repräsentiert. Die anderen Banden von sehr unterschiedlicher Größe zeigen die Fragmente der *B. henselae*-DNA. Die Große Vielfalt der Fragmente lässt auf eine repräsentative Aufspaltung des Gesamtchromosoms schließen. Die verbleibenden Spuren zeigen für die beiden anderen Plasmide ähnliche Ergebnisse.

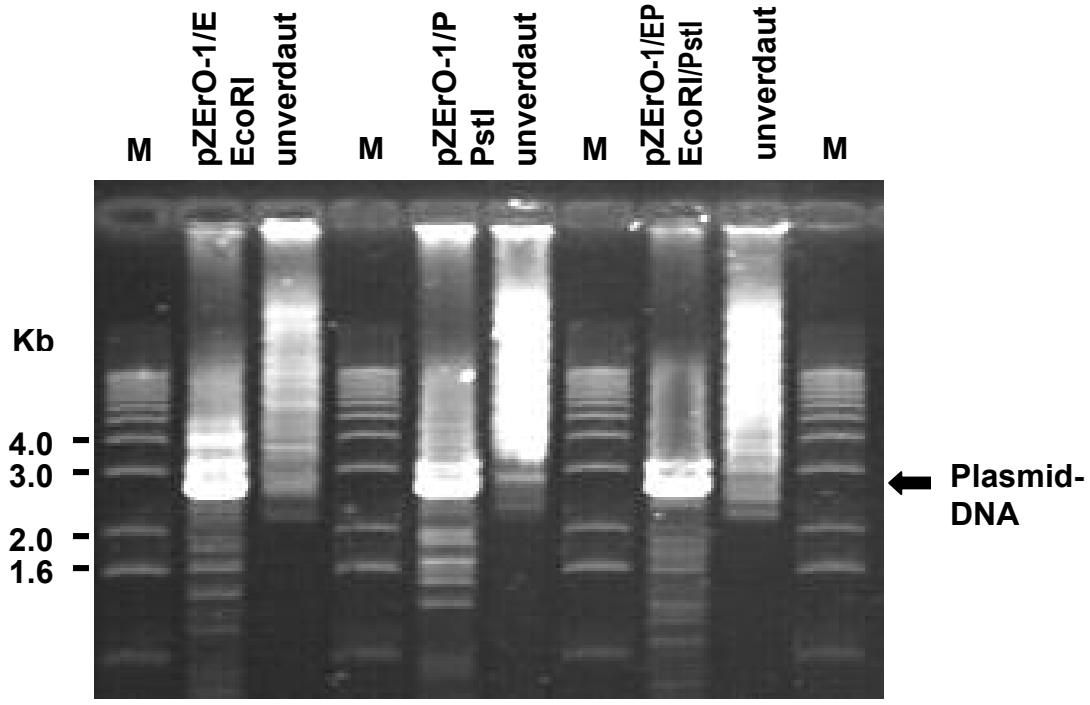


Abb. 3: Restriktionsanalyse der Genbankplasmide am Beispiel der mit Vektor pZErO-1 (Vektorgröße: 2808 bps) erstellten Genbank. M: Spur des 1kb-Markers; pZErO-1/E nach Restriktion mit EcoRI, Kontrolle pZErO-1/E ohne Restriktionsenzym; pZErO-1/P nach Restriktion mit PstI und Kontrolle ohne Restriktionsenzym; pZErO-1/EP nach Restriktion mit EcoRI und PstI und Kontrolle ohne Enzyme. Durch den Pfeil rechts markiert die Plasmid-DNA bei 2800 bp, welche in allen Restriktionsansätzen vorhanden ist. Die restlichen Fragmente ober- und unterhalb der Plasmid-DNA-Bande stellen die geschnittene *B. henselae*-DNA dar, wobei die große Vielfalt der Fragmente auf eine repräsentative Aufspaltung des Gesamtchromosoms hindeutet.

3.2 Isolierung der Riboflavinsynthesegene von *B. henselae*

Um das Genom von *Bartonella henselae* funktionell zu untersuchen, erfolgte die Transformation der Genbank in verschiedene *E. coli*-Mutanten. Hier fanden zunächst *E. coli*-Stämme Verwendung, die in Genen der Riboflavinsynthese definierte Mutationen aufwiesen. Die *E. coli*-Mutante Rib2 enthält eine Punktmutation im Gen *ribD*, so dass in diesem Stamm das Enzym Pyrimidindeaminase nicht synthetisiert wird. Demzufolge kann der zweite Schritt der Riboflavinbiosynthese nicht stattfinden. In der *E. coli*-Mutante BSV23 liegt die Mutation im *ribC*-Gen, dem Genabschnitt für das Enzym Riboflavinsynthase. Hier kann der letzte Schritt der Riboflavinbiosynthese nicht katalysiert werden (in Tab.2, 2.4 sind die Mutanten, ihre speziellen Eigenschaften und ihre Herkunft im Einzelnen aufgeführt, Abb.1 zeigt die Position der verschiedenen Enzyme im Riboflavinsyntheseweg).

Die beschriebenen Mutanten können auf Medien ohne Riboflavinzusatz nicht wachsen. Mit den erstellten Genbanken transformierte *E. coli*-Mutanten, die auf riboflavinfreien Medien wachsen können, müssen demzufolge Riboflavinsynthesegene von *B. henselae* auf einem Plasmid erhalten haben, die die bestehende Mutation komplementieren.

Um solche Klone zu isolieren wurde von dem 500 µl enthaltenden Transformationsansatz 400 µl zu je 100 µl auf Selektivmedien ausgestrichen, 100 µl wurden als Kontrolle auf das entsprechende die Mutation komplementierende Medium plus Kanamycin zur Selektion auf den transformierten Vektor plattiert. Die Kulturen wurden für 2-4 Tage bei 37 °C bebrütet.

Bei einer Temperatur von 37 °C zeigte der Transformationsansatz mit BSV23 nach 2 Tagen eindeutige Einzelkolonien auf LB-Medium. Dies ließ darauf schließen, dass jede einzelne Kolonie ein Plasmid mit *B. henselae*-DNA beinhaltet, welche die *E. coli* Mutante zur Riboflavinsynthese befähigt (Abb. 4).

Bei Klon BSV23 liegt die Mutation im *rib*C-Gen, demnach war zu erwarten, dass Plasmide, welche die Riboflavinsynthese dieser Mutante ermöglichen, DNA mit dem bei *B. henselae* vorkommenden Riboflavingen enthielten. Das bei diesem Selektionsschritt isolierte Plasmid wird im Weiteren als pBH-RibC bezeichnet werden. Aus dem Wachstum der Mutante kann man des weiteren schließen, dass das entsprechende *B. henselae*-Gen in *E. coli* exprimiert werden kann, und wir

konnten nun davon ausgehen, dass auch in *B. henselae* Riboflavinsynthesegene vorhanden sind.

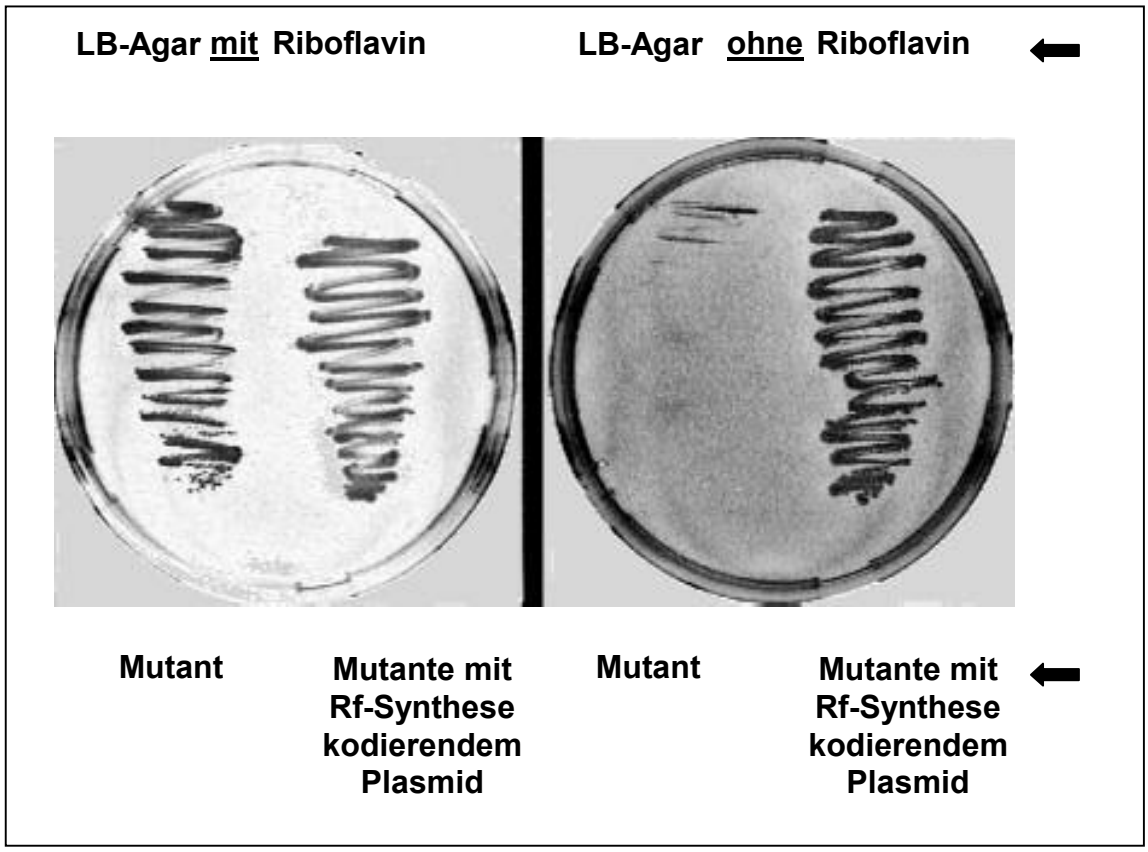


Abb. 4: Wachstum der Riboflavinsynthesemutanten. Mit Pfeilen ganz rechts markiert: Selektion der Mutante mit Riboflavinsynthesegen kodierendem Plasmid auf LB-Agar ohne Riboflavinzusatz. Die Mutante ohne Plasmid kann hier nicht wachsen, selbe Platte linke Seite. Die linke Platte ist die Kontrolle auf Riboflavin enthaltendem Nährmedium.

Um zu überprüfen, ob die Komplementation der *rib*C-Mutante (Klon BSV23) auf das mit dem Vektor übertragene Stück *Bartonella henselae*-DNA zurückzuführen war und nicht etwa auf eine Rückmutation innerhalb des Mutantengenoms, wurde im nächsten Schritt das enthaltene Plasmid isoliert.

Für andere als die hier aufgeführten *E. coli* Mutanten erwies sich dieses Screeningverfahren als ungeeignet. Die Genbank wurde außerdem in Mutanten bezüglich des Eisenstoffwechsels und des Häminaufnahmesystems transformiert, es konnten hierbei jedoch keine stabilen Klone gefunden werden.

3.3 Restriktionsanalyse des *rib*C komplementierenden Plasmids

Um die in das Plasmid inserierte *B. henselae*-DNA näher zu charakterisieren wurden zunächst Reinkulturen der entsprechenden *E. coli*-Klone angefertigt. Nach ca. zwei Tagen wurde von diesem Ausstrich jeweils eine Einzelkolonie gewählt und hieraus eine 100 ml Flüssigkultur angeimpft. Die Plasmidpräparation erfolgte aus dieser über Nacht bei 37 °C gewachsenen 100 ml Flüssigkultur. Das Ergebnis der anschließend durchgeführten Restriktionsanalyse mit den Enzymen EcoRI, PstI, EcoRV und HindIII ist in Abb. 5 dargestellt. In Spur 1 ist die Auftrennung nach Restriktion mit EcoRI zu sehen. Man erkennt ein einzelnes DNA-Fragment, dessen Größe sich nicht genau bestimmen lässt, welches aber deutlich oberhalb der 4 kb Bande liegt. Da nur ein Fragment entstanden ist, gibt es nur eine Schnittstelle für EcoRI in der einklonierten DNA. Das Plasmid wurde aufgeschnitten und liegt nun als lineares Fragment in voller Länge vor. Die Restriktion mit PstI (Spur 2) ergab eine Bande bei ca. 3300 bp, welche der Vektorbande von pZErO-2 entsprach. Die zweite Bande von ca. 2500bp entspricht der inserierten *Bartonella*-DNA. Innerhalb dieses Abschnittes liegt keine weitere Schnittstelle für PstI. Die Restriktion mit den beiden Enzymen EcoRI und PstI zeigte auf den ersten Blick das gleiche Bild wie die alleinige Restriktion mit PstI (Spur 3). EcoRI hatte jedoch wie zuvor gezeigt eine Schnittstelle innerhalb des Plasmides. Diese lag innerhalb der multiplen Klonierungsstelle nur ca. 10 bp von der PstI-Schnittstelle entfernt, so dass ein zusätzliches Fragment von ca. 10 bp entsteht, welches aufgrund der geringen Größe auf dem Gel nicht sichtbar wird. In der Restriktion mit HindIII und EcoRV finden sich vier Fragmente (Spur 4). Auch hier die Vektorbande von ca. 3300 bp. Dies war darauf zurückzuführen, dass sich innerhalb der multiplen Klonierungsstelle auf der einen Seite der PstI-Schnittstelle eine Schnittstelle für HindIII, auf der anderen Seite eine Schnittstelle für EcoRV befindet. Die zusätzlichen drei Fragmente zeigen, dass innerhalb der inserierten *Bartonella*-DNA noch zwei weitere Schnittstellen für HindIII und/oder EcoRV befinden.

Die einklonierte DNA enthält demnach eine Schnittstelle für EcoRI, diese liegt innerhalb der multiplen Klonierungsstelle, weitere EcoRI-Schnittstellen sind nicht vorhanden. Das Fragment enthält zu beiden Seiten eine PstI-Schnittstelle. Innerhalb des Fragmentes gibt es vier weitere Schnittstellen für EcoRV und HindIII.

Parallel zur Auswertung der Restriktionsanalyse erfolgte die Retransformation des Plasmides in die Mutante BSV23 (*rib*C). Unter den zuvor genannten Bedingungen konnte auch dieses Mal Wachstum beobachtet werden. Die Stabilität des durch pBH-RibC vermittelten Phänotyps wurde hiermit bestätigt.

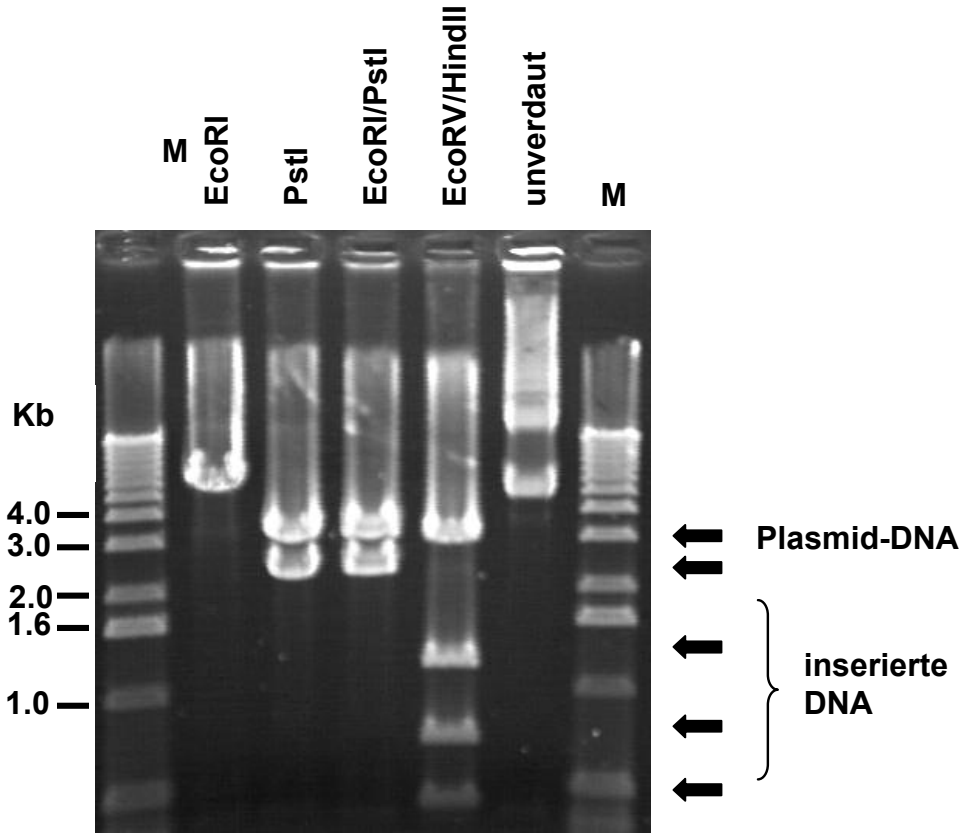


Abb. 5: Restriktionsanalyse des *rib*C komplementierenden Plasmides. Links neben dem Bild: Größenzuordnung des 1kb-Markers. Oberhalb: zur Restriktion verwendete Enzyme. In der Restriktion mit den Enzymen PstI, EcoRI/PstI und EcoRV/HindIII entsteht jeweils ein Fragment von ca. 3300bp welches der Vektorbande (pZErO-2) entspricht. Wird das Plasmid alleine mit EcoRI verdaut entstehen keine Einzelfragmente das Plasmid wird einmal geschnitten und liegt linear vor (Spur 1). Restriktion mit PstI ergibt die Vektor-DNA und ein weiteres Fragment, die inserierte *Bartonella*-DNA (Spur 2). Restriktion mit EcoRI und PstI zeigt das gleiche Bild wie alleinige Restriktion mit PstI (Spur 3). Mit EcoRV und HindIII ergibt sich wiederum die Vektorbande, sowie kleine Einzelfragmente, die geschnittene inserierte *Bartonella*-DNA (Spur 5).

3.4 Sequenzierung des Plasmids pBH-RibC

Um das über Genbankerstellung und Transformation in die *rib*C-Mutante BSV23 erhaltene Fragment der *Bartonella*-DNA, auf welchem wir das Gen für das Enzym Riboflavinsynthase vermuteten, zu entschlüsseln und mit anderen Genbankdaten vergleichen zu können, schlossen wir die Sequenzierung des erhaltenen Genabschnittes an. Die Sequenzierung der inserierten DNA erfolgte auf beiden Strängen gegenläufig. Begonnen wurde mit den Primern FP und RP. Von den jeweils neuen Sequenzen ausgehend wurden die weiteren Primersequenzen abgeleitet und für die nächsten Sequenzierungen verwendet. Die Sequenzierung ergab eine Größe von 2448 Basenpaaren (Abb. 6). Die Suche nach offenen Leserahmen (engl.: open reading frames; ORF) ergab zunächst 3 Leserahmen verschiedener Größe (Abb. 6). Der erste reichte mit einer Länge von 1116 bp in die inserierte DNA hinein. Diesem schloss sich ein weiterer ORF, beginnend mit einem ATG Startcodon und einer Länge von 621 bp an und wurde von einem dritten ORF gefolgt, der ebenfalls mit einem ATG Startcodon beginnend eine Länge von 468 bp aufwies. Translation der Nukleotidsequenzen in die jeweiligen Aminosäure-sequenzen ergab drei putative Proteine folgender Längen:

Protein1: 371 Aminosäuren
Protein2: 206 Aminosäuren
Protein3: 155 Aminosäuren

Um die vermuteten Proteine näher zu analysieren erfolgte eine Homologiesuche über die SWISSPROT Datenbank, welche folgende Ergebnisse brachte:

Protein 1 zeigte signifikante Homologien zum Enzym Pyrimidine Deaminase/Pyrimidine Reductase, einem Enzym, welches Schritt zwei und drei der Riboflavinbiosynthese katalysiert und dessen Genabschnitt als *rib*D bezeichnet wird. Jedoch fehlen für dieses Protein einige Aminosäuren zu Beginn, so dass wir nicht das komplette Gen hierfür gefunden haben. Die fehlende Anfangssequenz erklärt auch, warum in der Mutante bezüglich des *rib*D- Genabschnittes (Rib2) durch unser Plasmid keine Komplementation erreicht werden konnte. Das Gen kann ohne Startsequenz nicht exprimiert werden. Für Protein 2 zeigten sich Homologien zum

Enzym Riboflavinsynthase, dem Katalysator des letzten Schrittes der Synthese zu Riboflavin. Der korrespondierende Abschnitt auf dem Genom heißt *rib*C oder auch *Ris*A (Riboflavinsynthase-Alpha-chain). Protein 3 stellte sich als Homolog zu 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazine Synthase heraus, welches einen Schritt vor der Riboflavinsynthase wirkt und durch *rib*E auf dem Genom kodiert wird. Eine Mutation die dieses Gen betrifft ist für das Bakterium letal, eine Mutante existiert daher nicht.

Aus der DNA-Sequenz wurde eine physikalische Karte erstellt, in der die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt sind (Abb. 6). Protein 1 entspricht hier *rib*D, Protein2 *rib*C und Protein3 *rib*E. Die zur Sequenzierung verwendeten Primer wurden mit Pfeilen markiert, die sich aus der Sequenz ergebenden weiteren Enzymschnittstellen für EcoRV und HindIII wurden eingezeichnet (vergleiche Restriktionsanalyse von pBH-RibC unter 3.3).

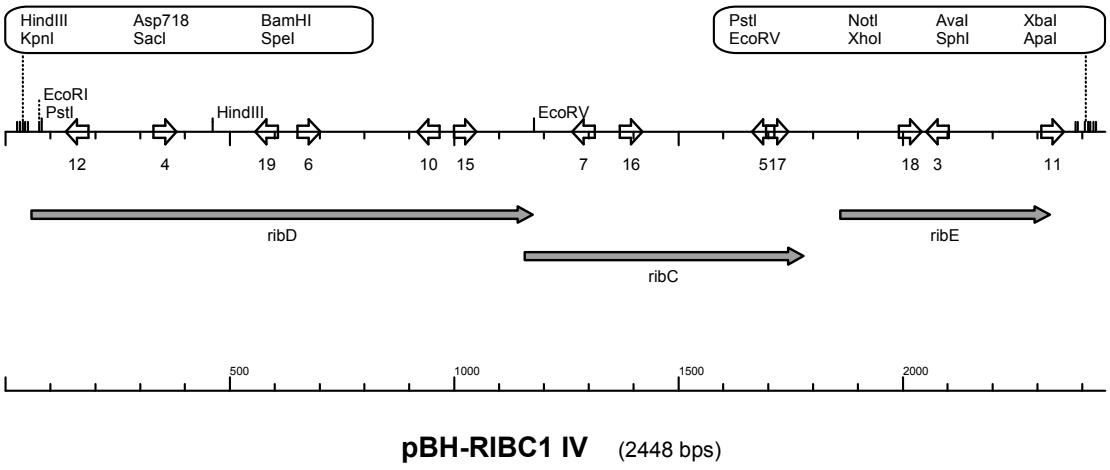


Abb. 6: Schematische Darstellung des Inserts des Plasmides pBH-RibC. Zu beiden Seiten die Schnittstellen der multiplen Klonierungsstelle. Mit großen grauen Pfeilen unterhalb eingezeichnet sind die durch Homologievergleich identifizieren Gene *rib*D, *rib*C und *rib*E. Mit kleinen Pfeilen sind die zur Sequenzierung verwendeten Primer eingezeichnet.

Exemplarisch für *rib*C bzw. das von diesem Gen kodierte Protein Riboflavinsynthase wurde eine detaillierte Datenbankrecherche angeschlossen. Hierbei wurden die

Riboflavinsynthase-Segmente von *Photobacterium phosphoreum*, *Bacillus subtilis*, *Photobacterium leiognathie*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Hefe* und *Escherichia coli* verglichen (Abb. 7). Die Anzahl der identischen Aminosäuren lag zwischen 33% und 39%, ähnliche Aminosäuren fanden sich sogar in 50-55%. Diese großen Homologien zu den z. T. nicht verwandten Spezies ließen nun sehr stark darauf schließen, dass es sich bei den drei kodierenden Regionen auf dem Insert des Plasmides pBH-RibC tatsächlich um die Gene *rib*D, *rib*C und *rib*E handelt, die Bezeichnungen werden daher auch weiterhin beibehalten. Abb. 7 zeigt den Vergleich o. g. Spezies auf Aminosäurenebene. Die Sternchen markieren die Übereinstimmung einer Aminosäure bei *B. henselae* mit mindestens drei weiteren Spezies.

```
Bh  MFTGIV---TDIGCVEDIQ------SLKQGMRFNISTRYS---IEN-LE-IGA------SIACSGVCLTI
HI  MFTGIV---QGTAPIHSIK------EKANFRTQVVKLLPE---MRKDLE-IGA------SIANNGVCLTV
PP  MFTGII---EAVGNISAIT------S--KGSDFEVSVNCDTLDLAD-VK-IGD------SIATNGICLTV
YE  MFTGIV---ECMGTVLENNPYDDSESGGQGVSITIGNAGS---ILT-DCHVGD------SIAVNGVCLTV
EC  MFTGIVQGTAKLVSIDEKP------NFRTHV--VELPDHM---LDG-LE-TGA------SVAHNGCCLTV
PL  MFTGII---ESIGNIGAII------RHNEDLSIVVNTNNLD--ISD-VN-IGD------SIATNGVCLTV
MT  MFTGIV---EERGEVTGRE------AL------VDAARLT---IRG-PM-VTADAGHGDSIAVNGVCLTV
BS  MFTGII---EETGTIESM--------KKAGHAMALTIKCSKI-LED-VH-LGD------SIAVNGICLTV
BA  MFTGIV---EETGTIQAIK------KTGLSMALTIAASKV---TSD-VR-LGD------SIAVNGICLT-
AP  MFTGII---EEVGKI--AQ------IHKQGEFAVVTINATKV-LQD-VH-LGD------TIAVNGVCLTV
    ******      *    *           *             *      ***      ***  *****

Bh  VERGSKQQAKINWF--AV--EAWEEALRLTNLTQWTKGTFINLERSLRLGDEMGGHLVSGHIDGLAEIID
HI  --------TEINGD--LVSFDLMQETLKITNLGTVKVGDYVNIERAMQMGTEIGGHLLSGHIYCTAKISD
PP  VKLTA--NSYVADL--SI------ETLSRTAFNYYKVGQAVNLEKAMLPTTRFGGHIVSGHVDAVAEVIE
YE  TE------FNNDSF--KV--GISPETIKRSNVASWIQGTQVNLERAVSQDVRFGGHYVQGHVDTVANIVS
EC  TE------INGNHV--SF--DLMKETLRITNLGDLKVGDWVNVERAAKFSDEIGGHLMSGHIMTTAEV--
PL  --------SKLLPSGYTA--DLSLETYKRTAFHSYRIGQEVNLEKAMLPTTRLGGHLVSGHVDGVGEVIE
MT  VDVLPDGQ-----F--TA--DVMAETLNRSNLGELRPGSRVNLERAAALGSRLGGHIVQGHVDATGEIVA
BS  TD-FTKNQ-----F--TV--DVMPETVKATSLNDLTKGSKVNLERAMAANGRFGGHFVSGHVDGTAEITR
BA  VTGFSDNQ-----F--TV--DVMPETVKATSLNGLSKGSKVNLERAMSANGRFGGHFVSGHVDGTAEITR
AP  TSFSS------NQF--TA--DVMSETLKRTSLGELKSNSPVNLERAMAANGRFGGHIVSGHIDGTGEIAE
    *      *   * *   *      * *  ***     *   ****        ***************

Bh  QKSEGDAVRFFLQVPKRF-----IPF--IVNKGSIALNGTSLTVNCVEEHI----FDVLIIRHTLEMTTW
HI  IIASENNRQIWFELPSAD-----VMKY-ILTKGFVAVDGISLTIGEVRDTQ----FCVNLIPETLQRTLM
PP  CRTSGRAIDIWIRVPSQI-----EKY--LSEKGSVTVDGVSLTVNAVTGNE----FKLTIVPHTVVETTI
YE  RRPEGNSIIFGFQL-RDQ-----EYFKYIVEKGFICIDGTSLTIIKVDPLSQGGAFYISMIKHTQDNVIM
EC  --AKILTSENNRQIWFKVQDSQLMKY--ILYKGFIGIDGISLTVGEVTPTR----FCVHLIPETLERTTL
PL  FKRNGRAINIWVAVPVQL-----KKY--LSEKGSVTIDGISLTINAVYQNV----IKLTIVPHTLAETNL
MT  RCPSEHWEVVRIEMPASV-----ARY--VVEKGSITVDGISLTVSGLGAEQRDW-FEVSLIPTTRELTTL
BS  IEEKSNAVYYDLKMDPSL-----TKT--LVLKGSITVDGVSLTIFGLTEDT----VTISLIPHTISETIF
BA  IEKKSNAVYYDLKLSPEL-----TKT--LVLKGSITVDGVSSTIFGLSDES----VTVSVIPHTISETIF
AP  ITPAHNSTWYRIKTSPKL-----MRY--IIEKGSITIDGISLTVVDTDDES----FRVSIIPHTIKETNL
          *       *            ** ****   * ****  *        * *  ****   **

Bh  RQAKIGDLVNLEID---------------- QLARY-------VAK-------------L----------
HI  GRRKVGDIVNIEID---------------- PQTQA-------IVD-------------T----------
PP  ADFKVGNKVNIEVD---------------- VLARY-------IER-------------L----------
YE  PLKKIGDEVNIEVDLTGKIIEKQILLTLEN QISKKDSTLNTMISN-------------I----------
EC  GKKKLGARVNIEID---------------- PQTQA-------V-V-------------D----------
PL  VNINIDKKVNVEID---------------- MMARY-------LEK-------------L----------
MT  GSAAVGTRVNLEVD---------------- VVAKY-------VER-------------L----------
BS  SEKTIGSKVNIECD---------------- MIGKY-------MYRFLHKANENKTQQTI----------
BA  RTKAVGSIVNIECD---------------- MIGKY-------LYR-------------FLHKTEQTKSN
AP  GSKKIGSIVNLEND---------------- IVGKY-------IEQ-------------F----------
       ***  ** ***                   * *                       *
```

```
Bh  -----SGFRI--K-----------D---------------------E---------------
HI  -----VENYLQSK-----------N---------------------F---------------
PP  -----LLVDK--P-----------EDKQSKISMDLLERNGFL----L---------------
YE  -----IEEKV--R-----------NYLN------------------K---------------
EC  -----TVERV--LAARENAMNQPGTE---------------------A---------------
PL  ---------I--K-----------VDRYESEKTSNVSMDLERYGFIS---------------
MT  ---------M--R-----------SA--------------------G---------------
BS  -----TKAFL--S-----------ENG-------------------F---------------
BA  QTITEAFFSE--N-----------G---------------------F---------------
AP  -----LLKKP--A-----------D---------------------EPKSNLSLDFLKQAGF
```

Abb. 7: Vergleichende Analyse des Riboflavinsynthaseproteins *Rib*C von *B. henselae*. Alignment mit Rioflavinsynthaseproteinen der Spezies *H. influenzae* (HI), *P. phosphoreum* (PP), *Hefe* (YE), *E. coli* (EC), *P. leiognathie* (PL), *M. tuberculosa* (MT), *B. subtilis* (BS), *B. amyloliquefaciens* (BA), *A. pleuropneumoniae* (AP). Mit Sternchen gekennzeichnet sind Aminosäuren die außer bei *B. henselae* bei mindestens drei anderen Arten identisch vorkommen.

3.5 Sequenzhomologien innerhalb der Familie der *Bartonellaceae*. Vergleich mit *B. bacilliformis*, *B. clarridgeiae* und *B. quintana*.

Im nächsten Schritt wurden die Sequenzen des *rib*C-Gens der Spezies *B. bacilliformis*, *B. clarridgeiae* und *B. quintana* ermittelt, um durch Vergleich mit *rib*C von *B. henselae* artspezifische Primer für die PCR-Diagnostik ableiten zu können. Hierzu wurde zunächst mit den Primern PBH3 und PBH4 (die ersten auf Basis des Plasmidinserts abgeleiteten) ein spezifisches PCR-Produkt aus DNA aller Spezies hergestellt. Auf diesem DNA-Abschnitt wurde nun bei jeder der drei Spezies die Sequenzierung mit allen in Abb. 6 aufgeführten Primern durchgeführt. Anschließend wurden für die Sequenzabschnitte, die mit den *B.h.*-Primern nicht sequenziert werden konnten neue Primer von den schon gelesenen Sequenzabschnitten abgeleitet. Das angeschlossene Alignment der vier Sequenzen auf DNA-Ebene ist in Abb. 8 dargestellt. Auf DNA-Ebene ergaben sich folgende Homologien:

B. henselae : *B. quintana*	87%
B. henselae : *B. clarridgeiae*	77%
B. henselae : *B. bacilliformis*	78%

Der Große Prozentsatz an Homologie macht deutlich, dass das *rib*C-Gen innerhalb der Gattung der *Bartonellaceae* stark konserviert ist. *B. quintana* scheint demnach die zu *B. henselae* am nächsten verwandte Spezies zu sein.

Abb.8: Alignment des *rib*C Genes der Spezies *B. henselae* (Bh), *B. bacilliformis* (Bb), *B. clarridgeiae* (Bc) und *B. quintana* (Bq). Eingezeichnet sind die Start- und Stopcodons von *rib*C und die einzelnen Primer für eine speziesspezifische PCR.

3.6 Aufbau einer speziesspezifischen PCR

Ausgehend von der Sequenzierung im Bereich des *rib*C-Gens der vier Spezies wurde eine speziesspezifische PCR aufgebaut. Es wurde pro Ansatz 1µl DNA verwendet, als PCR-Puffer verwendeten wir PCR-Puffer1 und PCR-Puffer2, die beide in gleichem Maße arbeiteten. Abgeleitet von der Sequenz des *rib*C-Gens wurden Primerpaare entworfen, die selektiv von der jeweiligen Spezies ein PCR-Produkt amplifizieren sollten. Eine spezifische PCR erhielten wir für *B. bacilliformis* mit dem Primerpaar PBH-L1/PBB-R1 bei einer Annealing-Temperatur von 62 °C, für *B. clarridgeiae* mit den Primern PBC5/PBC15 bei 50 °C, für *B. henselae* mit den Primer BBH-L1/PBH-R1 bei einer Annealingtemperatur von 55 °C und für *B. quintana* mit dem Primerpaar PBH-L1/PBQ-R1 bei einer Annealingtemperatur von 60 °C (Tab. 5).

Tab. 5: PCR-Bedingungen für speziesspezifische PCR

	Primerpaar	Annealingtemperatur
B. bacilliformis	PBH-L1/PBB-R1	62 °C
B. clarridgeiae	PBC5/PBC15	50 °C
B. henselae	PBH-L1/PBH-R1	55 °C
B. quintana	PBH-L1/PBQ-R1	60 °C

Die Größe des Amplifikats betrug 389 bp bei *B. bacilliformis*, 895 bp bei *B. clarridgeiae*, 394 bp bei *B. henselae* und 391 bp bei *B. quintana*. Abb. 9 zeigt das Ergebnis der PCR unter den oben genannten Bedingungen. In Spur 1 wurde jeweils *B. bacilliformis*-DNA verwendet, in Spur 2 *B. clarridgeiae*-DNA, in Spur 3 *B. henselae*-DNA und in Spur 4 DNA von *B. quintana*. Es ist eindeutig zu erkennen, dass mit den verwendeten Primerpaaren nur von der entsprechenden DNA ein positives PCR-Produkt generiert wird. Die PCR ist unter den definierten Bedingungen speziesspezifisch (Abb. 9, Tab. 6).

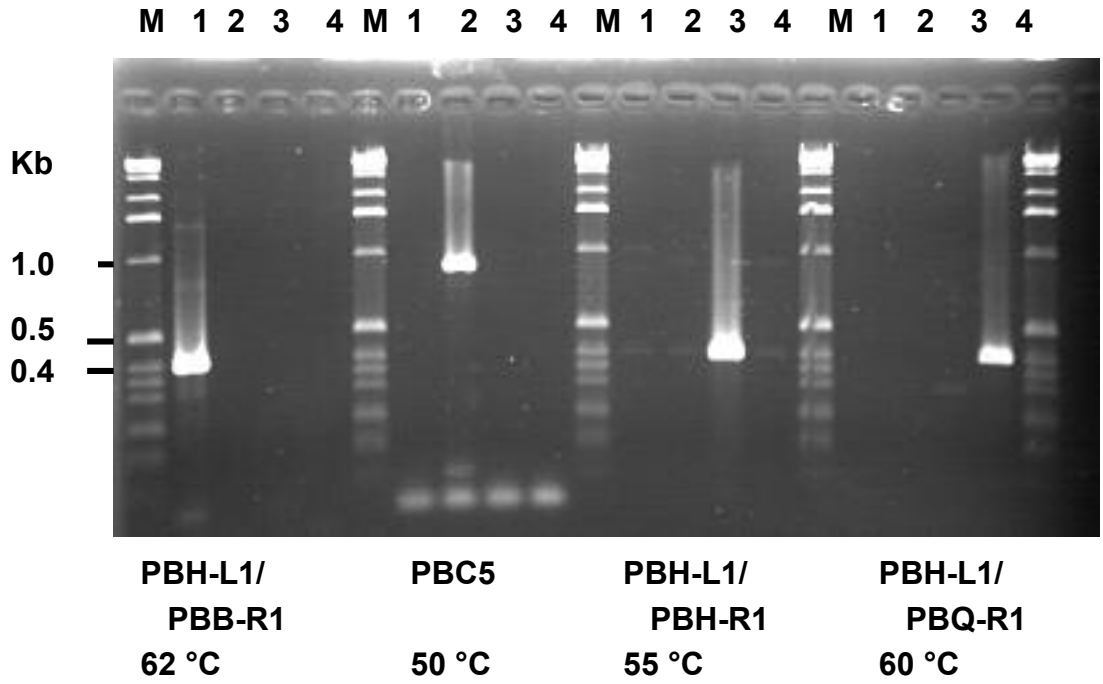


Abb. 9: Speziesspezifische Differenzierung mittels PCR. Die spezifischen Primerpaare wurden ausgehend von der *rib*C-Region entworfen. Unter definierten Bedingungen (Tab. 5) wurde mit den von der *rib*C-Region abgeleiteten Primern von *B. bacilliformis* (PBH-L1/PBB-R1), *B. clarridgeiae* (PBC5/PBC15), *B. henselae* (PBH-L1/PBH-R1) und *B. quintana* (PBH-L1/PBQ-R1) die PCR durchgeführt. M: 1kb-Marker, 1: *B. bacilliformis*-DNA, 2: *B. clarridgeiae*-DNA, 3: *B. henselae*-DNA, 4: *B. quintana*-DNA. Unterhalb: verwendete Primerpaare und Annealingtemperaturen.

Tab. 6: Verwendete Primerpaare und Ergebnisse abhängig von der verwendeten DNA.

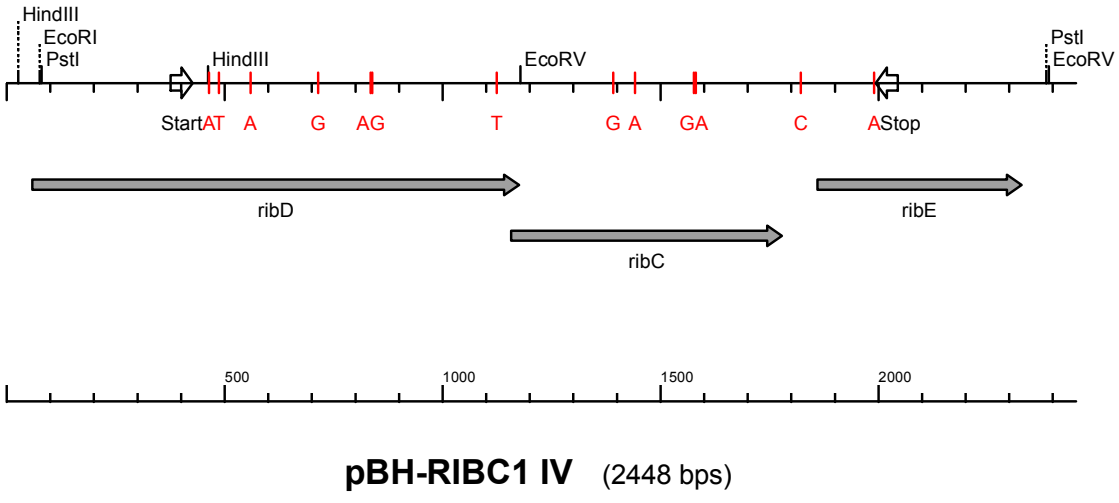
	B. bacilliformis	*B. clarridgeiae*	*B. henselae*	*B. quintana*
PBH-L1/ PBB-R1	+	-	-	-
PBC5/ PBC15	-	+	-	-
PBH-L1/ PBH-R1	-	-	+	-
PBH-L1/ PBQ-R1	-	-	-	+

3.7 Sequenzvergleich der verschiedenen *B. h.*- Subspezies

Dem Sequenzvergleich der verschiedenen Bartonellenspezies schlossen wir eine Sequenzanalyse der bisher bekannten *B. henselae* Subspezies an. Über einen Bereich von 1600 bp sequenzierten wir mit den oben erwähnten Primern, die wir auch für die Sequenzierung des *B. henselae* Stammes Houston1 verwendeten, den kompletten Bereich des *rib*C Gens und Teile der Gene für *rib*D und *rib*E. Aus der mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese eingeführten Gruppen I-IV (Sander *et al* 1998) arbeiteten wir mit folgenden Stämmen:

Gruppe I:	BK3, BK8, BK75II, BK77, BK78, BK79
Gruppe II:	BK26II, BK36, BK38, BK75, K4
Gruppe III:	K7
Gruppe IV:	HoustonI

Auf dem 1600 bp umfassenden Abschnitt der DNA zeigten sich einige Unterschiede. Die Subspezies der Gruppe I unterschieden sich in insgesamt 13 Basen von den anderen Subspezies, welche ansonsten übereinstimmten. Abb. 10 zeigt schematisch die Sequenzunterschiede in Gruppe I und deren Lage innerhalb des sequenzierten Bereiches. Tab. 7 listet die ausgetauschten Basen und deren Position auf.



pBH-RIBC1 IV (2448 bps)

Abb. 10: Schematische Darstellung der Sequenzunterschiede der Gruppe I. Start und Stop markieren Anfang bzw. Ende des Gesamtalignments. Rot dargestellt: die in Gruppe I ausgetauschten Basen.

Um eine einheitliche Bezeichnung zu schaffen, wird in dieser Arbeit bei Angabe bestimmter Basenpositionen **immer** von der entsprechenden Position auf dem Ausgangsstrang, dem 2448 bp-Insert von *B*. *henselae*, Stamm HoustonI (Gruppe IV nach PFGE), ausgegangen. In der Gruppe I zeigten sich, im Vergleich zu *B. h.*-HoustonI, folgende Unterschiede:

Tab. 7: Auflistung der in Gruppe I ausgetauschten Basen und deren Lokalisation

Bp-Position	ursprüngliche Base	neue Base	Bemerkung
464	G	A	Verlust der HindIII Schnittstelle
487	C	T	
559	G	A	
714	A	G	
834	G	A	
838	A	G	
1123	A	T	
1390	A	G	
1440	G	A	
1574	A	G	
1579	G	A	
1820	T	C	
1987	G	A	

3.8 Anwendung der speziesspezifischen Primer auf die *B. h.*-Subspezies

Bisher waren die speziesspezifischen Primer nur für jeweils einen Vertreter der Spezies angewendet worden. Für die einzelnen Spezies sind bereits verschiedene Subspezies isoliert worden. Um eine Methode zur Diagnostik *Bartonella* vermittelter Krankheiten zu etablieren, ist es wichtig, dass hier auch die einzelnen Subspezies erfasst werden, bzw. dass keine falsch positiven Ergebnisse erscheinen.

Um dies zu beweisen wurde die PCR-Analyse unter den definierten Bedingungen mit DNA von 17 Subspezies von *B. henselae* durchgeführt.

Abb. 11 zeigt, dass ein PCR-Produkt von 394 bp bei allen Subspezies von *B. henselae* generiert wird. Hingegen sind die Kontrollen mit den restlichen Primerpaaren negativ. Es wird deutlich, dass das etablierte PCR-Verfahren auch für die hier getesteten Subspezies eindeutig spezifisch ist.

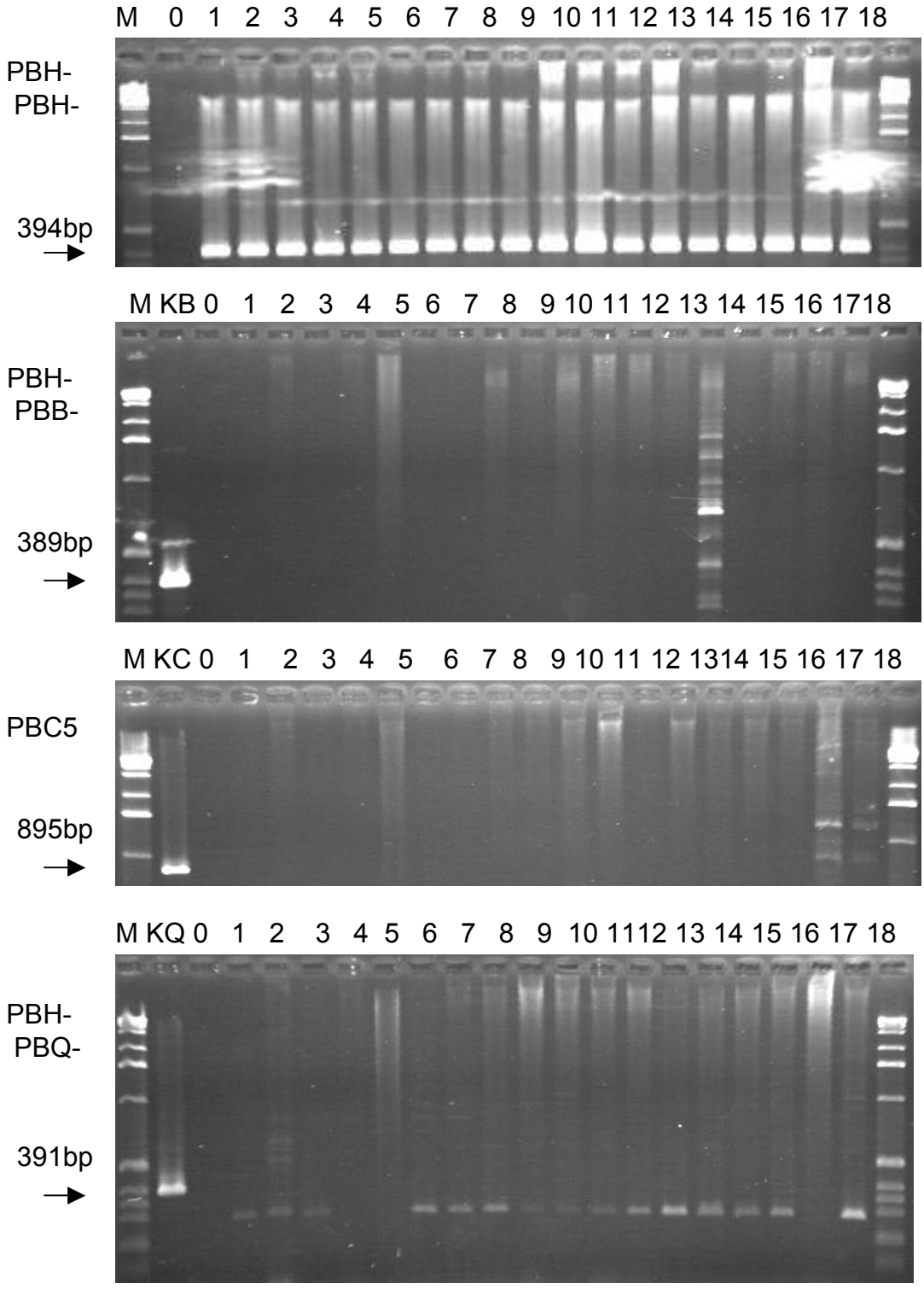


Abb. 11: Identifizierung der *B. henselae*-Stämme mittels der speziesspezifischen Primer. 0: Kontrolle ohne DNA, Spuren 1-18: DNA der *B. henselae*-Stämme Houston 1, -/BK3, -/BK8, -/BK75II, -/BK77, -/BK78, -/BK79, -/BK26II, -/BK36, -/BK36II, -BK38, -/BK74, -/BK75, -/K2, -/K4, -/K5, -/K6, -/K7. KB: Kontrolle für *B. bacilliformis*-DNA, KC: Kontrolle für *B. clarridgeiae*-DNA, KQ: Kontrolle für *B. quintana*-DNA. Links die verwendeten Primerpaare.

4 Diskussion

4.1 Riboflavingene als Ziel molekularbiologischer Untersuchungen

In dieser Arbeit konnte, ausgehend von der Transformation einer auf *B. henselae*-DNA basierenden Genbank in Riboflavinmangel-Mutanten von *E. coli*, das *rib*C-Gen von *B. henselae* isoliert werden. Nach Sequenzierung des 2307bp großen Abschnittes ergaben Datenbankvergleiche deutliche Homologien zu *rib*C von *E. coli*. Außerdem zeigte sich, dass zu beiden Seiten des *rib*C kodierenden Abschnittes weitere kodierende Gene liegen, welche Homologien zu den Riboflavinsynthesegenen *rib*D und *rib*E aufzeigten. Auf Basis der Sequenzinformation gelang es einen entsprechenden Genabschnitt aus den Spezies *B. bacilliformis*, *B. clarridgeiae* und *B. quintana* zu amplifizieren. Im nächsten Schritt wurde eine PCR-Diagnostik etabliert, die zwischen den genannten Spezies zuverlässig unterscheiden kann. Das *rib*C Gen wurde außerdem aus allen im Labor vorhandenen Bartonellastämmen amplifiziert und für die Überprüfung bisher bestehenden Subspezieseinteilungen herangezogen.

Die Riboflavinsynthesegene waren bereits häufiger Ziel molekularbiologischer Untersuchungen. Gründe für das Interesse an dieser Gruppe von Genen sind vielfältig. Zum einen kodieren sie für einen Syntheseweg, der bei Säugetieren nicht vorkommt und sind daher für die Diagnostik von Mikroorganismen in menschlichen Proben geeignet. Zum anderen scheinen sie evolutionär in fast allen Bakterien vorhanden zu sein, was sie ebenso für evolutionäre Überlegungen interessant macht. Außerdem ist an eine mögliche Nutzung des Syntheseweges zur Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten zu denken. Da die Synthese von Riboflavin für die meisten Bakterien lebensnotwendig zu sein scheint, und Riboflavin von außen nicht in ausreichender Menge aufgenommen werden kann, würde die Unterbrechung des Syntheseweges zu einem Mangel an Riboflavin führen, welcher für das Bakterium letal wäre. Andererseits bestünde der Vorteil, dass kein Eingriff in den menschlichen Organismus stattfinden würde, da dieser Riboflavin nicht selbst synthetisiert, sondern von außen zuführt. Medizinische Therapeutika, die ähnlich dem Prinzip der

Sulfonamide (Folsäureantagonisten) funktionieren, wären theoretisch denkbar (Bacher *et al* 1996).

4.2 Genetische Untersuchungen bei *Bartonella* Spezies

Genetische Untersuchungen bei *Bartonella*-Spezies sind nicht erst in jüngerer Zeit von Interesse. Mit dem Ziel der Entwicklung spezifischer und zuverlässiger diagnostischer Methoden werden bereits seit längerem Genanalysen durchgeführt.
Auf der Grundlage der Gensequenz des 16S rRNA Gens, einer der ersten erforschten Genregionen, wurden bereits PCR-Tests (Relman *et al* 1990) etabliert. Nachteilig bei Verwendung dieses Genabschnittes zeigte sich jedoch, dass es sich um eine bei *Bartonella*-Species sehr stark konservierte Region mit Homologien von mehr als 97% handelt (Brenner *et al* 1993). Bei Homologien dieser Größenordnung ist zuverlässige Speziesdifferenzierung nicht mehr möglich. Untersuchungen des Citratsynthase-Gens, *glt*A (Norman *et al* 1995), führten zur Entwicklung eines PCR-RFLP zur Diagnose von *B. henselae*. Birtles und Raoult (1996) verwendeten ebenfalls die beschriebene Citratsynthase-Gen-Sequenz für phylogenetische Untersuchungen. Im Jahre 1997 entschlüsselten Haake und Mitarbeiter die für Hitzeschockproteine codierende Genregion *gro*EL. Kelly *et al* (1998) gelang die Isolierung der für das *fts*Z-Protein codierenden Genregion, und eine erste Verwendung zur speziesspezifischen Unterscheidung konnte gezeigt werden. Zum Zeitpunkt der hier durchgeführten Untersuchung war noch kein PCR-Test zur direkten Diagnose aus klinischen Proben etabliert. Diesbezüglich entwickelten Wayne *et al* 2000 eine PCR auf der Basis der 16S-23SrRNA intergenic spacer Region zur direkten Diagnose aus klinischen Proben. Es wurden alle bisher als humanpathogen aufgetretenen Spezies untersucht und differenziert.

4.3 Entdeckung des *rib*C Gens bei *Bartonella henselae*

Die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Voraussetzungen bestärkten uns in dem Gedanken nach weiteren Genabschnitten zu suchen, um Verwandschaftsbeziehungen innerhalb der Gruppe der *Bartonellaceae* und auch zu anderen Genus zu erkennen, und darauf basierend auch neue diagnostische Methoden zu entwickeln. Wie in Teil 3 beschrieben, wurden hierzu *E. coli* –Mutanten

verwendet. Bei Transformation der Genbank in die BSV 23 Mutanten konnte die Mutation komplementiert und Wachstum auf normalem LB-Medium erreicht werden.
Wie empfindlich diese Methode ist, zeigte sich bei Transformation des definierten Plasmides pBH-RibC. Obwohl nach Genbankdatenvergleichen auf diesem Plasmid der Hauptteil des *rib*D vorhanden ist, konnte bei Transformation in die entsprechende Mutante Rib2 kein Wachstum auf riboflavinfreiem Medium erreicht werden. Zusätzlich wurden weitere in dieser Arbeit nicht näher beschriebene Mutanten bezüglich des Eisenstoffwechsels und der Häminaufnahmesysteme untersucht (Hantke *et al* 1987), welche erfolgreich zur Detektion entsprechender Gene z.B. bei H. pylori verwendet wurden (Bereswill *et al* 1998 u. 1999). Hier konnten keine stabilen, die Mutation komplementierenden Klone gefunden werden. Mögliche Gründe hierfür könnten sein, dass innerhalb der gesuchten Gene Schnittstellen der in der vorliegenden Arbeit zur Genbank verwendeten Restriktionsenzyme liegen, und somit die entsprechenden Gene nicht als Ganzes auf unseren Plasmiden vorhanden sind. Außerdem ist es möglich, dass bei *Bartonellen* entsprechende Vorgänge über andere Mechanismen kodiert sind und diesbezüglich keine Homologien zu z.B Mechanismen in *E. coli* bestehen.

4.4 Homologievergleich mit Riboflavinsynthesegenen anderer Bakterien

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch bei den untersuchten humanpathogenen Bartonellaspezies Gene für die Riboflavinsynthese vorhanden sind. Im Falle des *rib*C Gens konnte auch eine eindeutige Komplementation der *rib*C defizienten Mutante auf Medium ohne Riboflavinzugabe nachgewiesen werden.
Auffällig ist jedoch, dass sich die Anordnung der Gene, wie sie hier im Falle der *Bartonellen* gefunden wurde, von der Anordnung bei anderen bisher untersuchten Bakterienarten unterscheidet. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Cluster in der Reihenfolge *rib*D (nur unvollständig kloniert), *rib*C und *rib*E gefunden. Bei *B. subtilis* findet man zwar auch eine Anordnung als Cluster, die Reihenfolge der Gene unterscheidet sich jedoch von der der *Bartonellen* (Perumov *et al* 1986). Ebenso im Cluster angeordnet sind die Riboflavingene bei *Actinobacillus* Spezies (Fuller *et al* 1995) und *Photobacterium* Spezies (Lee *et al* 1994).

Die Riboflavinsynthese bei *E. coli* wurde bereits unter 1.7 ausführlich dargestellt. Die hier dargestellten Gene sind im Gegensatz zu den oben beschriebenen über das Bakteriengenom verteilt (Bacher *et al* 1996, Eberhardt *et al* 1996).

Ebenso verteilt und nicht als Gruppe angeordnet finden sich Riboflavinsynthesegene bei den beiden weiteren zu Homologievergleichen herangezogenen Spezies *Helicobacter pylori* (Bereswill *et al* 1998) und *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al* 1995). Die sehr unterschiedliche Anordnung der Riboflavinsynthesegene in verschiedenen Bakterienarten war für die weiteren Untersuchungen von Vorteil. Da sich die bisher untersuchten Spezies alle in Anordnung und Verteilung der Gene der Riboflavinsynthese deutlich unterschieden, konnte erwartet werden, dass ein auf Basis des *rib*C Genes von *Bartonella* generiertes PCR-Produkt nicht in gleicher Größe bei einer anderen Bakterienart amplifiziert werden kann.

4.5 Sequenzvergleich des *rib*C Genabschnitts mit dem homologen Abschnitt der Spezies *B. bacilliformis*, *B. clarridgeiae* und *B. quintana*

Ausgehend von der Entdeckung und kompletten Sequenzierung des *rib*C Gens bei *B. henselae* wurden die verwendeten Primer PBH3 und PBH4 zur Amplifikation des gleichen Genomabschnittes bei den anderen als humanpathogen beschriebenen Bartonellenspezies herangezogen. Es konnte bei den drei Spezies *B. bacilliformis*, *B. clarridgeiae* und *B. quintana* ein 1,6 kb großer Abschnitt amplifiziert und anschließend sequenziert werden. Basierend auf den Sequenzinformationen eines mit 1600 bp repräsentativ großen DNA-Stückes wurde nun die Homologie der Bartonellaspezies verglichen. Auf DNA-Ebene erbrachte der Vergleich für *B. henselae: B. quintana* 87%, *B. henselae*: *B. clarridgeiae* 77% und *B. henselae*: *B. bacilliformis* 78%. Demnach ist *B. quintana* die zu *B. henselae* am nächsten verwandte Spezies. Birtles u. Raoult (1996) untersuchten die Sequenz des Citratsynthase genes *glt*A. Neben einigen nichthumanpathogenen Bartonellaspezies verglichen sie auch die Homologien auf DNA-Ebene zwischen *B. henselae*, *B. bacilliformis* und *B. quintana*. Die hierbei festgestellten Ergebnisse: *B. henselae*: *B. quintana* 91.0%, *B. henselae*: *B. bacilliformis* 86,4% bestätigen die in dieser Arbeit vorgefundenen Ergebnisse und beschreiben gleichzeitig eine stärker konservierte Genregion. Kelly *et al* (1998) entschlüsselten den Genabschnitt des Zellteilungsproteins *fts*Z und schlossen für den Sequenzabschnitt umfassend ca. 1770 bp einen Homologievergleich an. Auch hier erhielten sie ähnliche Ergebnisse: *B. henselae*: *B. quintana* 91%, *B. henselae: B. bacilliformis* 83%. In aktuellen phylogenetischen Untersuchungen, welche alle 18 bekannten *Bartonella* Spezies einbeziehen, konnten Zeaiter und Mitarbeiter (Zeaiter *et al* 2002) bei Vergleichen der *gro*EL und 16SrDNA-Region mit parsimony, neighbour-joining und maximum-likelyhood Methoden die nahe Verwandtschaft zwischen *B. henselae* und *B. quintana* bestätigen.

4.6 Speziesspezifische Diagnostik auf der Basis der Riboflavinsynthesegene

Die Diagnostik *Bartonella*-assoziierter Erkrankungen bereitet auch heute noch einige Schwierigkeiten. Für die Routinediagnostik werden häufig serologische Tests verwendet, die jedoch besonders beim Immunsupprimierten nicht immer erfolgreich ansprechen. Eine PCR zum direkten Erregernachweis aus Biopsiematerial würde die Diagnostik in solchen Fällen verbessern. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die von uns verwendeten Primerpaare in der Lage waren spezifisch die jeweilige Spezies *B. bacilliformis*, *B. clarridgeiae*, *B. henselae* oder *B. quintana* zu erkennen und für die jeweils anderen Proben negative Ergebnisse erbrachten.
Ähnliche Untersuchungen finden sich wie schon erwähnt auch bei Norman *et al*, die 1995 auf der Basis des *glt*A Genes Primer entwarfen, die spezifisch für *B. henselae* waren. Ebenso unterschieden Kelly *et al* 1998 mittels PCR auf Basis des *fts*Z-Genes die Spezies *B. henselae*, *B. quintana* und *B. bacilliformis*.
Jedoch findet bei keiner dieser Untersuchungen *B. clarridgeiae* Beachtung, welche in jüngerer Zeit auch als Erreger der KKK nachgewiesen werden konnte (Kordick *et al*, 1997). Wie zu Beginn beschrieben gibt es bei der Anordnung der Riboflavinsynthesegene in verschiedenen Bakterienarten große Unterschiede. Diese Differenz ist von großem Vorteil, wenn es darum geht, die Primerpaare zu diagnostischen Zwecken zu verwenden. Kreuzreaktionen mit anderen humanpathogenen Keimen erscheinen bei Verwendung dieser Primerpaare extrem unwahrscheinlich, da hierzu PCR-Produkte gleicher Größe aus Bakterien mit völlig anderer Anordnung der Riboflavingene entstehen müssten.

4.7 Vergleich des *rib*C-Genabschnitts der verschiedenen Bartonellenstämme zur Einteilung in Subspezies

In vorausgegangenen Untersuchungen zeigte sich, dass es innerhalb der jeweiligen Bartonellaspezies Untergruppen gibt, welche sich durch einige Merkmale unterscheiden. Sander *et al* (1998) untersuchten 17 *B. henselae* Isolate aus Katzenblut und fanden darunter drei verschiedene Subspezies, welche sich wiederum vom Referenzstamm Houston-I unterschieden. Damit erweiterten sie eine vorangegangene Einteilung nach Bergmans (Bergmans *et al* 1996), die bisher nur

zwei Untergruppen, basierend auf 16S rRNA Gen Untersuchungen, beschrieben hatten. Die Bergmans Gruppe 2 teilte sich hierdurch auf in die beiden neuen Untergruppen I und II.
In der vorliegenden Arbeit wurde von allen vorhandenen Stämmen ein Segment der Größe 1600 bp mit den Primern PBH3 und PBH4 amplifiziert, welches dem bei *B. henselae* isolierten und sequenzierten *rib*C-Genabschnittes entsprach. Nach Sequenzierung dieser Region wurden die Nukleotidsequenzen miteinander verglichen und dabei festgestellt, dass sich die Sequenz der Gruppe I nach Sander in 13 Nukleotiden von den Sequenzen der anderen Gruppen unterscheidet (Tab. 7).

Die Ergebnisse zeigen, dass die entsprechende Genregion innerhalb einer Spezies, speziell der Spezies *B. henselae*, stark konserviert ist. Ebenso konnte aber gezeigt werden, dass für die Subspezies der Gruppe I nach Sander eindeutige Unterscheidungsmerkmale vorhanden sind, welche auch eine Differenzierung möglich machen. Aufgrund dieser geringen Unterschiede bleibt die Region für phylogenetische Untersuchungen interessant.

4.8 Ausblick: Einsatz des hier etablierten PCR-gestützten Diagnosesystems für den Nachweis von Bartonellen in klinischem Probenmaterial

In der vorliegenden Arbeit konnten auf Basis der Sequenzen des *rib*C-Genes der Bartonellen Primer abgeleitet werden, welche eine Unterscheidung von *B. bacilliformis*, *B. clarridgeiae*, *B. henselae* und *B. quintana*–DNA mittels speziesspezifischer PCR ermöglichte. Die Unterscheidung wurde auf DNA–Ebene ausgehend von vorhandenen DNA-Isolaten durchgeführt. Die Einsatzfähigkeit der PCR für diagnostische Zwecke für den Nachweis von *Bartonella*-Bakterien aus Patientenmaterial gelang Annette von Bodmann 2000 (unveröffentlichte Daten). Ausgehend von den in der vorliegenden Arbeit entwickelten Primerpaaren wurde eine nested-PCR zur Diagnose von *B. henselae*, *B. clarridgeiae* und *B. quintana* entwickelt, welche mit stabilem Erfolg auch weiterhin in der Diagnostik aus Patientenmaterial Verwendung findet. Außerdem gelang es Johnson *et al* (2003) ein einziges Primerpaar aus dem Sequenzbereich des *rib*C-Genes abzuleiten, welches

ein Amplicon zwischen 585 und 588 bp der Spezies *B. henselae*, *B. quintana*, *B. bacilliformis*, *B. clarridgeiae*, *B. elizabethae* und *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* generierte. Zur Differenzierung der verursachenden Spezies wurde eine Restriktionsanalyse mit den Enzymen *Taq*I und *Ear*I angeschlossen, welche für jede Spezies charakteristische Muster erbrachte. Zeaiter und Mitarbeiter (Zeaiter *et al* 2003) entwickelten eine diagnostische PCR aus Patientenserum auf der Basis der Sequenzinformation des *rib*C-Genes. Sie untersuchten Serumproben von Patienten mit bekannter *Bartonellen*-Endocarditis. Hierzu verwendeten sie eine in einem Schritt durchgeführte LightCycler nested -PCR mit zwei von *rib*C abgeleiteten Primerpaaren. Im Anschluss wurden die so amplifizierten PCR-Produkte sequenziert und nach Abgleichen mit den bekannten Sequenzen von *B. henselae* und *B. quintana* der verursachenden Spezies zugeordnet. Die Autoren fanden eine Sensitivität dieser Methode von 58,1% und empfehlen die Weiterentwicklung zur präoperativen diagnostischen Anwendung bei Endokarditis oder zur Screeninguntersuchung bei Fieber unbekannter Herkunft.

5 Zusammenfassung

Die Familie der *Bartonellaceae* beinhaltet 18 Spezies, von denen bisher sieben im Zusammenhang mit Erkrankungen beim Menschen beschrieben wurden. *Bartonellen* gelten als Erreger der KKK, der BA und von Endokarditiden. Die Diagnostik stützt sich primär auf serologische Untersuchungen, welche im Falle immunsuprimierter Patienten nicht immer zuverlässig sind. Um die Diagnostik zu ergänzen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine PCR-Methode entwickelt. Ziel der durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen waren die Gene der Riboflavinbiosynthese. Der Biosyntheseweg für Riboflavin (Vitamin B_2) existiert bei Pflanzen und Bakterien, nicht aber bei Wirbeltieren. Da die Riboflavinsynthesegene innerhalb einer Bakterienspezies stark konserviert sind und beim Menschen nicht vorkommen, sollten sie sich gut zur Identifizierung bakterieller DNA aus menschlichen Proben und zur Differenzierung pathogener Bakterien eignen. Durch Transformation einer aus *B. henselae*–DNA erstellten Genbank, welche die *rib*C-Mutation einer *E. coli* Mutante komplementieren konnte, gelang die Isolierung eines die Gene *rib*D, *rib*C und *rib*E enthaltenden DNA-Fragmentes. Die anschließend durchgeführten Sequenzanalysen der *rib*C-Region in verschiedenen *B. henselae* Stämmen ergaben eine hohe genetische Konservierung innerhalb der Spezies. Mit Hilfe von Primern, welche aus der Sequenz des *rib*C-Genes von *B. henselae* abgeleitet wurden, konnte die entsprechende Region von *B. bacilliformis*, *B. clarridgeiae* und *B. quintana* amplifiziert werden. Sequenzanalysen bestätigten die große Ähnlichkeit der Region und die gleiche Reihenfolge der Anordnung der Gene. Die Riboflavinsynthesegene sind demzufolge innerhalb der Gruppe der *Bartonellaceae* stark konserviert, mit *B. quintana* besteht auf DNA-Ebene eine Homologie von 87%. Auf der Basis des *rib*C-Genabschnittes konnten in den Regionen, die sich in der DNA-Sequenz unterschieden, von allen vier Spezies Primer abgeleitet werden, mit denen eine speziesspezifische PCR zur Unterscheidung von *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. quintana* und *B. bacilliformis* etabliert werden konnte.

6 Literaturverzeichnis

Adal KA, Cockerell CJ, Petri WA (1994) Cat scratch disease, bacillary angiomatosis, and other infections due to *Rochalimaea*. N Eng J Med 330: 1509-1515

Anderson B, Sims K, Regnery R, Robinson L, Schmidt MJ, Goral S, Hager C, Edwards K (1994) Detection of *Rochalimaea henselae* DNA in specimens from cat scratch disease patients by PCR. J Clin Microbiol 32:942-948

Arvand M, Wendt C, Regnath T, Ullrich R, Hahn H (1998) Characterization of *Bartonella henselae* isolated from bacillary angiomatosis lesions in a human immunodeficiency virus-infected patient in Germany. Clin Infect Dis 26: 1296-1299

Bacher A, Eberhardt S, Richter G (1996) Biosynthesis of riboflavin, p.657-664. In: FC Neidhardt, R. Curtiss III, JL Ingraham, ECC Lin, KB Low, B Magasanik, WS Reznikoff, M Riley, M Schaechter, and HE Umbarger (ed), *Escherichia coli* and Salmonella: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington D.C.

Bass JW, Freitas BC, Freitas AD, Sisler CL, Chan DS, Vincent JM, Person DA, Claybaugh JR, Wittler RR, Weisse ME, Regnery RL, Slater LN (1998) Prospective randomized double blind placebo-controlled evaluation of azithromycin for treatment of cat-scratch disease. Pediatr. Infect. Dis. J. 17: 447-452

Bass JW, Vincent JM, Person DA (1997) The expanding spectrum of *Bartonella* infections: I. Bartonellosis and trench fever. Pediatr. Infect. Dis. J. 16: 2-10

Bereswill S, Fassbinder F, Völzing C, Covacci A, Haas R, Kist M (1998) Hemolytic properties and riboflavin synthesis of *Helicobacter pylori*: cloning and functional characterization of the ribA gene encoding GTP-cyclohydrolase II that confers hemolytic activity to *Escherichia coli*. Med Microbiol Immunol 186:177-187

Bereswill S, Hinkelmann S, Kist M, Sander A (1999) Molecular analysis of riboflavin synthesis genes in *Bartonella henselae* and use of the ribC gene for differentiation of *Bartonella* species by PCR. Journal of Clinical Microbiology 37: 3159-3166

Bereswill S, Lichte F, Greiner S, Waidner B, Fassbinder F, Kist M (1999) The ferric uptake regulator (Fur) homologue of *Helicobacter pylori*: functional analysis of the coding gene and controlled production of the recombinant protein in *Escherichia coli*. Med Microbiol Immunol 188:31-4

Bereswill S, Lichte F, Vey T, Fassbinder F, Kist M (1998) Cloning and characterization of the fur gene from *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiol Lett 159:193-200

Bergmans AMC, Peeters MF, Schellekens JFP, Vos MC, Sabbe LJM, Ossewaarde JM, Verbakel H, Hooft HJ, Schouls LM (1997) Pitfalls and fallacies of cat scratch disease serology: Evaluation of *Bartonella henselae*-based indirect fluorescene assay and enzyme-linked immunoassay. J Clin Microbiol 35:1931-1937

Bergmans AMC, Schellekens JFP, vanEmbden JDA, Schouls LM (1996) Predominance of two *Bartonella henselae* variants among cat-scratch disease patients in The Netherlands. J Clin Microbiol 34:254-260

Bermond D, Heller R, Barrat F, Delacour G, Dehio C, Alliot A, Monteil H, Chomel B, Boulouis HHJ, Piemont Y (2000) *Bartonella birtlesii* sp. Nov., isolated from small mammals (Apodemus spp.). Int J Syst Evol Microbiol 6:1973-1979

Birtles RJ, Harrison TG, Saunders NA, Molyneux DH (1995) Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov.. International Journal of Systematic Bacteriology 45:1-8

Birtles RJ, Raoult D (1996) Comparison of partial synthase gene (gltA) sequences for phylogenetic analysis of *Bartonella* species. International Journal of Systematic Bacteriology 46:891-897

Birtles RJ, Raoult D (1998) The genera *Afipia* and *Bartonella*. Schmidt A (ed): *Bartonella* and *Afipia* species emphasizing *Bartonella henselae*. Contrib Microbiol. Basel. Karger, 1998,1: 1-31

Breitschwerdt EB, Atkins CE, Brown TT, Kordick DL, Snyder PS (1999) *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii* and related members of the alpha subdivision of the proteobacteria in dogs with cardiac arrhythmias, endocarditis, or myocarditis. J Clin Microbiol 37:3618-3626

Breitschwerdt EB, Kordick DL, Malarkey DE, Keene B, Hadfield TL, Wilson K (1995) Endocarditis in a dog due to infection with a novel *Bartonella subspecies*. J Clin Microbiol 33:154-160

Brenner DJ, O'Connor SP, Winkler HH, Steigerwalt AG (1993) Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales*. International Journal of Systematic Bacteriology 43:777-786

Chia JKS, Nakata MM, Lami JLM, Park SS, Ding JC (1998) Azithromycin for the treatment of cat-scratch disease. Clinical Infectious Diseases. 26: 193-194

Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, Chi B, Yamamoto K, Roberts.Wilson J, Gurfield AN, Abbott RC, Pedersen NC, Koehler JE (1996) Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. J Clin Microbiol 34:1952-1956

ClarridgeIII JE, Raich TJ, Pirwana D, Simon B, Tsai L, Rodriguez-Barradas MC, Regnery R, Zollo A, Jones DC, Rambo C (1995) Strategy to detect and identify *Bartonella* species in routine clinical laboratory yields *Bartonella henselae* from human immunodeficiency virus positive patient and unique *Bartonella* strain from his cat. J Clin Microbiol 33:2107-2113

Cockerell CJ, LeBoit PE (1990) Bacillary angiomatosis: A newly characterized, pseudoneoplastic, infectious, cutaneous vascular disorder. J Am Acad Dermatol 22:501-512

Daly JS, Worthington MG, Brenner DJ, Moss CW, Hollis DG, Weyant RS, Steigerwalt AG, Weaver RE, Daneshvar MI, O'Connor SP (1993) *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. isolated from a patient with endocarditis. J Clin Microbiol 31:872-881

Dehio C, Lanz C, Pohl R, Behrens P, Bermond D, Piémont Y, Pelz K, Sander A (2001) *Bartonella schoenbuchii* sp. Nov., isolated from the blood of wild roe deer. Int J Syst Evol Microbiol 51:1557-1565

Droz S, Chi B, Horn E, Steigerwalt AG, Whitney AM, Brenner DJ (1999) *Bartonella koehlerae* sp. nov., isolated from cats. J Clin Microbiol 37: 1117-1122

Eberhardt S, Richter G, Gimbel W, Werner T, Bacher A (1996) Cloning, sequencing, mapping and hyperexpression of the ribC gene coding for riboflavin synthase of *Escherichia coli*. Eur J Biochem 242: 712-719

Estler CJ Hrsg.(1995) Pharmaka zur Behandlung und Verhütung von Infektionen in: Estler CJ (Hrsg.): Pharmakologie und Toxikologie 4. Auflage 1995 Schattauer Verlag

Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM, et al (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. Science 269:496-512

Fournier P-E, Raoult D (1998) Cat-scratch disease and an overview of other *Bartonella henselae*-related infections. In: Schmidt A (ed.) Bartonella and Afipia Species Emphasizing Bartonella henselae. Contributions to Microbiology Vol.1. Karger, Basel, pp. 32-62

Fuller TE, Mulks MH (1995) Characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* riboflavin biosynthesis genes. Journal of Bacteriology 177:7265-7270

Garcia-Caceres U, Garcia FU (1991) Bartonellosis. An immunodepressiv disease and the life of Daniel Alcides Carrión. Am J Clin Pathol 95(Suppl.1):58-66

Goldenberger D, Schmidheini T, Altwegg M (1997) Detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* by simple and rapid procedure using broad-range PCR amplification and direct single-strand sequencing of part of the 16S rRNA gene. Clin Microbiol Infect 3:240-245

Haake DA, Summers TA, McCoy AM, Schwartzman W (1997) Heat shock response and groEL sequence of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana.* Microbiology 143:2807-2815

Hantke K (1987) Ferrous iron transport mutants in *Escherichia coli* K-12.FEMS Microbiol Lett 44:53-57

Heller R, Artois M, Xemar V, DeBriel D, Gehin H, Jaulhac B, Monteil H, Piemont Y (1997) Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats. J. Clin. Microbiol. 35: 1327-1331

Heller R, Kubina M, Mariet P, Riegel P, Delacour G, Dehio C, Lamarque F, Boulouis HJ, Monteil H, Chomel B, Piemont Y (1999) *Bartonella alsatica* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rabbits. Int J Syst Bacteriol 1: 283-288

Heller R, Riegel P, Hansmann Y, Delacour G, Bemond D, Dehio C, Lamarque F, Monteil H, Chomel B, Piemont Y (1998) *Bartonella tribocorum* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rats. International Journal of Systematic Bacteriology 48:1333-1339

Houpikian P, Raoult D (2001) 16S/23S rRNA intergenic spacer regions for phylogenetic analysis, identification, and subtyping of *Bartonella* Species. J Clin Microbiol 39:2768-2778

Jensen WA, Fall MZ, Rooney J, Kordick DL, Breitschwerdt EB (2000) Rapid identification and differentiation of *Bartonella* species using a single-step PCR assay. J. Clin. Microbiol 38:1717-1722

Joblet C, Roux V, Drancourt M, Gouvernet J, Raoult D (1995) Identification of *Bartonella* (*Rochalimaea*) Species among fastidious gram-negative bacteria on the basis of the partial sequence of the citrate-synthase gene. J Clin Microbiol 33:1879-1883

Johnson G, Ayers M, McClure SCC, Richardson SE, Tellier R (2003) Detection and Identification of *Bartonella* Species pathogenic for humans by PCR amplification targeting the riboflavin synthase gene (*rib*C). J Clin Microbiol 41:1069-1072

Kelly TM, Padmalayam I, Baumstark BR (1998) Use of the cell division protein FtsZ as a means of differentiating among *Bartonella* species. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 5:766-772

Kerkhoff FT, Bergmans AMC, van der Zee A, Rothova A (1999) Demonstration of *Bartonella grahamii* DNA in ocular fluids of a patient with neuroretinitis. J Clin Microbiol 37: 4034-4038

Kobayashi M, Sugiyama M, Yamamoto K (1995) Isolation of cDNAs encoding GTP-cyclohydrolase II from *Arabidopsis thaliana*. Gene 160: 303-304

Kordick DL, Hilyard EJ, Hadfield TL, Wilson KH, Steigerwalt AG, Brenner DJ, Breitschwerdt EB (1997) *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenoathy (Cat Scratch Disease). J. Clin. Microbiol. 35: 1813-1818

Lawson PA, Collins MD (1996) Description of *Bartonella clarridgeiae* sp. nov. isolated from the cat of a patient with *Bartonella henselae* septicemia. Med Microbiol Lett, 5: 64-73

Lee CY, O'Kane DJ, Meighen EA (1994) Riboflavin synthesis genes are linked with the lux operon of *Photobacterium phosphoreum*. Journal of Bacteriology 176:2100-2104

Liauta-Teglivets O, Hasslacher M, Boretskii IR, Kohlwein SD, Shavlovskii GM (1995) Molecular cloning of the GTP-cyclohydrolase structural gene RIB1 of *Pichia guilliermondii* in riboflavin biosynthesis. Yeast 11:945-952

Lucey D, Dolan MJ, Moss CW, Garcia M, Hollis DG, Weigner S (1992) Relapsing illness due to *Rochalimaea henselae* in immunocompetent hosts: Implication for therapy and new epidemiological associations. Clin Infect Dis 14: 683-688

Mainardi J-L, Figliolini C, Goldstein FW, Blanche P, Baret-Rigoulet M, Galezowski N, Fournier P-E, Raoult D (1998) Cat scratch disease due to *Bartonella henselae* serotype Marseille (Swiss Cat) in a Seronegative Patient. J. Clin. Microbiol. 36: 2800

Margileth M, Baehren DF (1998) Chest-wall abscess due to cat-scratch disease (CSD) in an adult with antibodies to *Bartonella clarridgeae*: Case report and review of the thoracopulmonary manifestations of CSD. Clin infect Dis 27:353-357

Marston EL, Finkel B, Regnery RL, Winoto IL, Graham RR, Wignal S, Simanjuntak G, Olson JG (1999) Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in an urban indonesian cat population. Clin Diagn Lab Immunol 6:41-44

Matar GM, Swaminathan B, Hunter SB, Slater LN, Welch DF (1993) Polymerase chain reaction-based restricton fragment length polymorphism analysis of a fragment of the ribosomal operon from *Rochalimaea* species for subtyping. J Clin Microbiol 31:1730-1734

Maurin M, Raoult D (1996) *Bartonella* (*Rochalimaea*) *quintana* infections. Clin Microbiol Reviews 9:273-292

Norman AF, Regnery R, Jameson P, Greene C, Krause DC (1995) Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. J Clin Microbiol 33:1797-1803

Padmalayam I, Anderson B, Kron M, Kelly T, Baumstark B (1997) The 75-kilodalton antigen of *Bartonella bacilliformis* is a structural homolog of the cell division protein FtsZ. J Bact 179:4545-4552

O'Halloran HS, Draud K, Minix M, Rivard AK, Pearson PA (1998) Leber' s neuroretinitis in a patient with serologic evidence of *Bartonella elizabethae*. Retina 18:276-278

Perkocha LA, Geaghan SM, Yen BTS, Nishimumra SL, Chan SP, Garcia-Kennedy R, Honda G, Stoloff AC, Klein HZ, Goldmann RL, Van Meter S, Ferrell LD, LeBoit PE (1990) Clinical and pathological features of bacillary peliosis hepatis in association with human immunodeficieny virus infection. N Engl J Med 323: 1581-1586

Perumov DA, Glazunov EA, Gorinchuk GF (1986) Riboflavin operon in *Bacillus subtilis* XVII. Studies of regulaory functions of biochemical intermediates and their derivatives. Genetika 22:748-754

Regnery RL, Anderson BE, Clarridge III JE, Rodriguez-Barradas MC, Jones DC, Carr JH (1992) Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., Isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. J Clin Microbiol 30:265-274

Relman DA, Loutit JS, Schmidt TM, Falkow S, Tompkins LS (1990) The agent of bacillary angiomatosis. The new England Journal of Medicine 323:1573-1580

Richter G, Fischer M, Krieger J Clin Microbiol, Eberhardt S, Lüttgen H, Gerstenschläger I, Bacher A (1997) Biosynthesis of riboflavin: characterization of the bifunctional deaminase-reductase of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 179:2022-2028

Richter G, Ritz H, Katzenmeier G, Volk R, Kohnle A, Lottspeich F, Allendorf D Bacher A (1993) Biosynthesis of riboflavin: cloning, sequencing, mapping, and expression of the gene coding for GTP-cyclohydrolase II in *Escherichia coli*. J Bacteriol 175: 4045-4051

Rodriguez-Barradas MC, Bandres JC, Hamill RJ, Trial J, ClarridgeIII JE, Baughn RE, Rossen RD (1995) In vitro evaluation of the role of humoral immunity against *Bartonella henselae*. Inf Immu 63:2367-2370

Rodriguez-Barradas MC, Hamill RJ, Houston ED, Georghiou PR, Clarridge JE, Regnery RL, Koehler JE (1995) Genomic fingerprinting of *Bartonella* species by repetitive element PCR for distinguishing species and isolates. J Clin Microbiol 33:1089-1093

Roux V, Eykyn SJ, Wyllie S, Raoult D (2000) *Bartonella vinsonii* subsp. berkhoffii as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in a human. J Clin Microbiol 38:1698-1700

Roux V, Raoult D (1995) Inter- and intraspecies identification of *Bartonella* (*Rochalimaea*) species. J Clin Microbiol 33:1573-1579

Sander A (1998) Microbiological diagnosis of *Bartonella* species and *Afipia felis*. In: Schmidt A (ed.) Bartonella and Afipia Species Emphasizing Bartonella henselae. Contributions to Microbiology Vol.1. Karger, Basel, pp. 89-112

Sander A, Posselt M, Böhm N, Ruess M, Altwegg M (1999) Detection of *Bartonella henselae* DNA by two different PCR assays and determination of the genotypes of strains involved in histologically defined cat scratch disease. J Clin Microbiol 37:993-997

Sander A, Posselt M, Oberle K, Bredt W (1998) Seroprevalence of antibodies to *Bartonella henselae* in patients with cat scratch disease and in healthy controls: evaluation and comparison of two commercial serological tests. Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology. 5: 486-490

Sander A, Ruess M, Bereswill S, Schuppler M, Steinbrueckner B (1998) Comparison of different DNA fingerprinting techniques for molecular typing of *Bartonella henselae* isolates. Journal of Clinical Microbiology. Vol.36, No.10: 2973-2981

Sanger F, Miklen S, Coulson AR (1977) DNA-sequencing with chain-terminating inhibitor. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467

Schmidt HU, Kaliebe T, Poppinger J, Bühler C, Sander A (1996) Isolation of *Bartonella quintana* from an HIV-positive patient with bacillary angiomatosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 15:736-741

Skala J, Van Dyck L, Purnelle B, Goffeau A (1994) The sequence of an 8.8 kb segment on the left arm of chromosome II from *Saccharomyces cerevisiae* reveals four new open reading frames including homologs of animal DNA polymerase alpha-primases and bacterial GTP cyclohydrolase II. Yeast 10:S13-S24

Slater LN, Welch DF, Hensel D, Coody DW (1990) A newly recognized fastidious gram-negative pathogen as a cause of fewer and bacteremia. N Engl J Med 323: 1587-1593

Tierno PM, Jr (1998) Diagnostics of human infections caused by *Bartonella henselae.* Schmidt A (ed): Bartonella and Afipia species emphasizing Bartonella henselae. Contrib Microbiol. Basel, Karger, 1:113-129

van Bastelaere E, Keijers V, Vanderleyden J (1995) Cloning and sequencing of the *Azospirillum brasilense* gene encoding GTP cyclohydrolase II. Gene 160:141-142

Welch DF, Carroll KC, Hofmeister EK, Persing DH, Robison DA, Steigerwalt AG, Brenner DJ (1999) Isolation of a new suspecies, *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis*, from a cattle rancher: identity with isolates found in conjunction with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* among naturally infected mice. J Clin Microbiol 37:2598-2601

Welch DF, Pickett DA, Slater LN, Steigerwalt AG, Brenner DJ (1992) *Rochalimaea henselae* sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis. J Clin Microbiol 30:275:280

Wong MT, Thornton DC, Kennedy RC, Dolan MJ (1995) A chemically defined liquid medium that supports primary isolation of *Rochalimaea* (*Bartonella*) *henselae* from blood and tissue specimens. J Clin Microbiol 33:742-744

Zeaiter Z, Fournier PE, Greub G, Raoult D (2003) Diagnosis of *Bartonella* endocarditis by a real-time nested PCR assay using serum. J Clin Microbiol 41:919-925

Zeaiter Z, Fournier PE, Ogata H, Raoult D (2002) Phylogenetic classification of *Bartonella* species by comparing *groEL* sequences. Int J Syst Evol Microbiol 52:165-171

Zeaiter Z, Fournier PE, Raoult D (2002) Genomic variation of *Bartonella henselae* strains detected in lymph nodes of patients with cat scratch disease. J Clin Microbiol 40:1023-1030

Zeaiter Z, Liang Z, Raoult D (2002) Genetic classification and differentiation of *Bartonella* species based on comparison of partial *fts*Z gene sequences. J Clin Microbiol 40:3641-3647

7 Lebenslauf

von Silke Hinkelmann

15.11.1971	Geburt in Ludwigshafen am Rhein

Schulbildung

1978-1982	Besuch der Grundschule Domholzschule in Limburgerhof
1982-1991	Besuch des Geschwister-Scholl-Gymnasiums in Ludwigshafen
1991	Abschluß mit dem Abitur

Freiwilliges soziales Jahr

1991-1992	Freiwilliges soziales Jahr im mobilen sozialen Dienst der Arbeiterwohlfahrt Singen

Hochschulbildung

1992	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
1994	Ärztliche Vorprüfung
1996	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 1998	Beginn des experimentellen Teils der Doktorarbeit am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Freiburg
1999	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2000-2001	Praktisches Jahr am Klinikum Konstanz Wahlfach: Gynäkologie
Mai 2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen und Praktika

1994	4-wöchige Famulatur auf der geburtshilflichen Station des District Hospital Hohoe, Ghana, Westafrika
1996	3-wöchige Famulatur am Universitätsklinikum Freiburg, Abteilung Gastroenterologie
1997	5-wöchige Famulatur am Universitätsklinikum Freiburg, Abteilung Hämatologie

1997	4-wöchige Famulatur am Kreiskrankenhaus Emmendingen, Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe
1998 u. 1999	7 Wochen Famulatur in allgemeinmedizinischer Praxis

Auslandsaufenthalte

Im Anschluß an eine 4-wöchige Famulatur im District Hospital Hohoe (Ghana) zwei Reisesemester durch West-, Ost- und südliches Afrika

Beruflicher Werdegang

15.08.2001-15.02.2003

Ärztin im Praktikum in der chirurgischen Abteilung der Helios Klinik Müllheim unter Leitung von Prof. Waldmann.

Seit 01.05.2003

Assistenzärztin in der chirurgischen Abteilung der Helios Klinik Titisee-Neustadt

8 Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Frau PD Dr. med. Anna Sander und PD Dr. rer. nat. Stefan Bereswill für die freundliche Überlassung des Themas und die engagierte und kompetente Betreuung. Herrn Professor Dr. Kist danke ich dafür, dass ich auch in seiner Arbeitsgruppe immer willkommen war. Weiter möchte ich mich bedanken bei den biologischen Doktoranden Frank Fassbinder, Verena Gimmel und Frank Stähler, bei den technischen Assistentinnen Tanja Tambuze und Karin Oberle, die alle für jegliche Art von Problemen stets ein offenes Ohr hatten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Verena gilt mein spezieller Dank für die aufmerksame Durchsicht des Manuskripts!

Für die große Hilfe und Geduld bei Sequenzierungsarbeiten bedanke ich mich bei Henriette Ries.

Darüberhinaus gilt mein Dank allen, die mit mir gemeinsam im Labor gearbeitet haben und dazu beitrugen, dass die Atmosphäre stets gut gelaunt und produktiv war, und die Arbeit wirklich Spaß gemacht hat.

Und Alf und Martin vielen Dank, die durch beständiges erinnern an das Vorhandensein einer begonnenen Dissertation deren Fertigstellung vorantrieben…