

Identifizierung und funktionelle Analyse von
Pathogenitätsfaktoren in *Bartonella bacilliformis*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Alexander A. Dichter
aus Langen

Frankfurt am Main 2023

D30

vom Fachbereich Biowissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Sven Klimpel
Gutachter: Prof. Dr. Volker Müller
Prof. Dr. med. Volkhard A. J. Kempf

Datum der Disputation: 07.12.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abbildungsverzeichnis.....	vi
Tabellenverzeichnis.....	vii
Abkürzungsverzeichnis.....	viii
Zusammenfassung.....	xi
1. Einleitung.....	1
1.1. Phylogenie des Genus <i>Bartonella</i>	1
1.2. Erkrankungen durch <i>Bartonella</i> spp. im Menschen.....	3
1.3. Immunantwort des Wirtes nach einer <i>B. bacilliformis</i> Infektion.....	6
1.4. Allgemeine Infektionsstrategie und Lebenszyklus von <i>Bartonella</i> spp.....	7
1.4.1. Inokulation und Übertragung durch Vektoren.....	8
1.4.2. Immunevasion durch Kolonisierung der primären Nische.....	9
1.4.3. Infektion von Erythrozyten.....	9
1.4.4. Infektion von kernhaltigen Wirtszellen.....	12
1.5. Pathogenität von <i>B. bacilliformis</i>	14
1.5.1. Bestätigte Pathogenitätsfaktoren.....	14
1.5.2. Nicht bestätigte Pathogenitätsfaktoren.....	17
1.6. Bestätigte und vermutete Vektoren von <i>B. bacilliformis</i>	19
1.7. <i>B. bacilliformis</i> Tierinfektionsmodelle.....	20
2. Zielsetzung.....	22
3. Material und Methoden.....	23
3.1. Mikroorganismen.....	23
3.2. Eukaryotische Zellen.....	25
3.3. Vektoren und Plasmide.....	25
3.4. Oligonukleotide.....	25
3.5. Kultivierung von Mikroorganismen.....	30
3.5.1. Allgemeine Bedingungen für die Kultivierung von Bakterien.....	30
3.5.2. Bestimmung der Zelldichte.....	31
3.5.3. Kryokonservierung von Bakterienstämmen.....	32

3.6.	Zellkultur	32
3.6.1.	Kultivierung von humanen Zellen.....	32
3.6.2.	Gewinnung von humanen und murinen Erythrozyten.....	32
3.6.3.	Ermittlung der Lebendzellzahl von humanen und murinen Zellen	32
3.6.4.	Infektion von HeLa-229-Zellen.....	33
3.6.5.	Infektion von Erythrozyten.....	33
3.7.	Molekularbiologische Standardmethoden zur Analyse und Modifizierung von DNA	33
3.7.1.	Isolierung von Plasmid-DNA	33
3.7.2.	Isolierung von chromosomaler DNA	33
3.7.3.	Konzentrationsbestimmung von DNA	34
3.7.4.	Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion	34
3.7.5.	Reinigung von PCR-Produkten	35
3.7.6.	Analyse von DNA mittels der Agarose-Gelelektrophorese.....	35
3.7.7.	Gelextraktion	35
3.7.8.	Restriktionsverdau von DNA	35
3.7.9.	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	35
3.7.10.	Ligation von DNA-Fragmenten	35
3.7.11.	Assemblierung von DNA-Fragmenten mittels NEBuilder® HiFi DNA Assembly	36
3.7.12.	Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	36
3.7.13.	Transformation von <i>B. bacilliformis</i>	36
3.8.	Proteinbiochemische Methoden	37
3.8.1.	Heterologe Produktion von Proteinen in <i>E. coli</i>	37
3.8.2.	Reinigung rekombinanter Proteine mittels His-Tag Affinitätschromatographie.....	37
3.8.3.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
3.9.	Immunologische Methoden	38
3.9.1.	Antikörper und Serum	38
3.9.2.	Western Blot.....	40
3.9.3.	Entwicklung eines Anti- <i>B. bacilliformis</i> IgG-Immunfluoreszenztest	40
3.10.	DNA-Sequenzierung	41
3.10.1.	Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmid DNA.....	41

3.10.2.	Genomsequenzierung	41
3.11.	Sequenzanalyse und Vergleich von <i>B. bacilliformis</i> Genomen.....	42
3.12.	Identifizierung immundominanter <i>B. bacilliformis</i> Proteine für die Entwicklung serodiagnostischer Tests	43
3.12.1.	Reverse Vakzinologie.....	43
3.12.2.	Herstellung von rekombinanten <i>B. bacilliformis</i> Expressionsbibliotheken.....	43
3.12.3.	Immunologisches <i>screening</i> von <i>B. bacilliformis</i> Expressionsbibliotheken und Identifizierung der inserierten DNA-Fragmente.....	44
3.12.4.	Klonierung, Produktion und Western Blot Analyse von immundominanten <i>B. bacilliformis</i> Proteinen	45
3.12.5.	Entwicklung eines rekombinanten anti- <i>B. bacilliformis</i> Lineblots	46
3.12.6.	Entwicklung eines rekombinanten anti- <i>B. bacilliformis</i> IgG-ELISAs	46
3.13.	Identifizierung der an der Hämolyse beteiligten Pathogenitätsfaktoren.....	46
3.13.1.	Transposonmutagenese.....	46
3.13.2.	Hämolyse <i>screening</i>	47
3.13.3.	Amplifizierung der Transposon-Insertionsstelle im Genom von <i>B. bacilliformis</i>	47
3.13.4.	Identifizierung von Hämolyse vermittelnde Pathogenitätsfaktoren	48
3.13.5.	Deletion und Komplementation von <i>porA</i> und der α/β -Hydrolase.....	48
3.13.6.	<i>In silico</i> Charakterisierung von PorA und der α/β -Hydrolase	49
3.13.7.	Hämolyse-Test mit humanen und murinen Erythrozyten.....	50
3.14.	Statistik.....	50
3.15.	Verwendete Chemikalien, Enzyme, Kits und Software	51
4.	Ergebnisse.....	55
4.1.	Genomanalyse von verschiedenen <i>B. bacilliformis</i> Stämmen und Isolaten.....	55
4.2.	Identifizierung immundominanter <i>B. bacilliformis</i> -Proteine	57
4.2.1.	Reverse Vakzinologie.....	57
4.2.2.	Evaluierung der Carrión-Krankheit Patientenseren.....	59
4.2.3.	Analyse und <i>screening</i> der heterologen <i>B. bacilliformis</i> Expressionsbibliotheken.....	61
4.2.4.	Systematische Analyse von <i>B. bacilliformis</i> Zielproteinen.....	62
4.2.5.	Serologische Evaluierung immunreaktiver <i>B. bacilliformis</i> -Proteine mittels Lineblots	64

4.2.6.	Serodiagnostische Bewertung immunreaktiver <i>B. bacilliformis</i> -Proteine mittels ELISA	66
4.2.7.	Homologie-Analyse der im ELISA eingesetzten rekombinanten Proteine	68
4.3.	Untersuchung der durch <i>B. bacilliformis</i> vermittelten Hämolyse und Identifizierung der daran beteiligten Pathogenitätsfaktoren	69
4.3.1.	Etablierung eines <i>B. bacilliformis in vitro</i> Hämolyse-Tests	69
4.3.2.	Identifizierung von Hämolyse vermittelnden Pathogenitätsfaktoren durch Transposon-Mutagenese	70
4.3.3.	<i>In silico</i> -Charakterisierung von Porin-A und der α/β -Hydrolase	71
4.3.4.	Vorhersage der Proteinstrukturen von Porin-A und der α/β -Hydrolase	74
4.3.5.	Generierung von Hämolyse-defizienten Mutanten mittels markerloser zielgerichteter Mutagenese	79
4.3.6.	Infektion muriner Erythrozyten mit <i>B. bacilliformis</i> als Grundlage für die Entwicklung eines murinen <i>in vivo B. bacilliformis</i> Hämolysemodells.	81
5.	Diskussion	82
5.1.	Gesamt-Genom-Sequenzierung von <i>B. bacilliformis</i> Stämmen als Voraussetzung zur Identifizierung immundominanter Proteine und Pathogenitätsfaktoren	82
5.2.	Entwicklung neuer serologischer Tests für Diagnose von <i>B. bacilliformis</i> -Infektionen	85
5.2.1.	Reverse-Vakzinologie	85
5.2.2.	Immunreaktive Proteine von <i>B. bacilliformis</i>	88
5.2.3.	Analyse einer Carrión-Krankheit Serumbank	89
5.2.4.	Entwicklung eines Lineblot und ELISA-Tests	89
5.2.5.	Ausblick: Seroepidemiologische Feldstudien zur Evaluierung der ELISA-Tests	90
5.3.	Molekulare Analyse der durch <i>B. bacilliformis</i> verursachten Hämolyse	91
5.3.1.	<i>B. bacilliformis</i> weist eine einzigartige Kontakt-abhängige Hämolyse auf	91
5.3.2.	Identifizierung von Hämolyse-assoziierten Pathogenitätsfaktoren mittels Transposon-Mutagenese	92
5.3.3.	<i>In silico</i> -Analyse von Porin-A und der α/β -Hydrolase	93
5.3.4.	Bakterielle Hämolyse-Mechanismen	97
5.3.5.	Infektionsstrategien interzellulärer Erreger: Die mögliche Rolle von Porin-A und der α/β -Hydrolase im Infektionsprozess von Erythrozyten	98

5.3.6.	Etablierung eines <i>B. bacilliformis</i> Tiermodells zur Untersuchung der Hämolyse	100
5.3.7.	Ausblick: Entwicklung eines murinen <i>in vivo</i> <i>B. bacilliformis</i> Hämolysemodells	102
6.	Literaturverzeichnis	103
	Anhang	122
	Danksagung	128
	Eidesstattliche Versicherung	129
	Publikationsliste	130
	Konferenzteilnahmen und Auszeichnungen	131
	Lebenslauf	132

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum und Virulenzfaktoren der <i>Eubartonella</i>	2
Abbildung 2: Parasitismus von Erythrozyten durch <i>B. bacilliformis</i>	4
Abbildung 3: Klinische Manifestation der <i>Verruga peruana</i> bei Patienten mit einer <i>B. bacilliformis</i> Infektion.	5
Abbildung 4: Schematische Darstellung der allgemeinen Infektionsstrategie von Bartonellen.	8
Abbildung 5: <i>B. bacilliformis</i> Adhäsion-A (BbadA) auf der Zelloberfläche von <i>B. bacilliformis</i>	14
Abbildung 6: Flagellen von <i>B. bacilliformis</i>	15
Abbildung 7: Infektion menschlicher Erythrozyten mit <i>B. bacilliformis</i>	18
Abbildung 8: Adulte Sandmücken der Spezies <i>Lutzomyia verrucarum</i>	20
Abbildung 9: Genomvergleich von <i>B. bacilliformis</i> KC583 und KC584.	56
Abbildung 10: Evaluierung der Reaktivität von Patientenseren mit <i>B. bacilliformis</i>	60
Abbildung 11: Analyse der <i>B. bacilliformis</i> Expressionsbibliotheken.....	62
Abbildung 12: Systematische Analyse von <i>B. bacilliformis</i> Zielproteinen.....	63
Abbildung 13: Line blot-Analysen seroreaktiver <i>B. bacilliformis</i> -Proteine.....	65
Abbildung 14: Analyse von Patienten- und Kontrollseren mit <i>B. bacilliformis</i> -ELISAs..	67
Abbildung 15: <i>In vitro</i> Hämolyse-Test.....	69
Abbildung 16: Analyse der Hämolyse von <i>B. bacilliformis</i> Tn5 Transposonmutanten.....	70
Abbildung 17: Qualitätsanalyse der Porin-A Strukturvorhersage.....	75
Abbildung 18: Bänderdarstellung der vorhergesagten Proteinstruktur von Porin-A.	76
Abbildung 19: Qualitätsanalyse der Strukturvorhersage für die α/β -Hydrolase.	76
Abbildung 20: Bänderdarstellung der vorhergesagten Proteinstruktur der α/β -Hydrolase.	77
Abbildung 21: Domänenarchitektur und Strukturanalyse der α/β -Hydrolase.....	78
Abbildung 22: Generierte <i>B. bacilliformis</i> -Mutanten.....	79
Abbildung 23: Funktionsanalyse der Hämolyse-defizienten <i>B. bacilliformis</i> -Mutanten.	80
Abbildung 24: Hämolyse von murinen Erythrozyten durch <i>B. bacilliformis</i>	81
Abbildung 25: Dreidimensionale Strukturen verschiedener bakterieller Porine.....	94
Abbildung 26: Schematische Darstellung und Bändermodelle der Dienelacton-Hydrolase sowie der <i>B. bacilliformis</i> α/β -Hydrolase.	96
Abbildung 27: Struktur der heptameren Transmembran-Pore des <i>S. aureus</i> α -Hämolysins.....	97
Abbildung 28: Hypothetische Infektionsstrategie von <i>B. bacilliformis</i> in humanen Erythrozyten.....	99
Abbildung 29: Analyse der inserierten DNA-Fragmente der heterologen <i>B. bacilliformis</i> KC583 Expressionsbibliotheken.....	126
Abbildung 30: Analyse der konservierten Domänen des vermuteten Hämolysin-A aus <i>B. bacilliformis</i>	127
Abbildung 31: Analyse der konservierten Domänen des vermuteten Hämolysin Sekretionsprotein-D aus <i>B. bacilliformis</i>	127

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Mikroorganismen.....	23
Tabelle 2: Verwendete eukaryotische Zelllinien.....	25
Tabelle 3: Verwendete Plasmide.....	25
Tabelle 4: Verwendete Starteroligonukleotide für die Erstellung und Sequenzierung rekombinanter Plasmide sowie genomischer Deletionen.....	26
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Nährmedien für die Kultivierung von Bakterien.....	31
Tabelle 6: Standard-PCR-Reaktionsansätze.....	34
Tabelle 7: PCR-Standardprogramm.....	34
Tabelle 8: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele.....	38
Tabelle 9: Verwendete Humanseren, Kaninchenseren und Antikörper.....	38
Tabelle 10: Medien zur Induktion der Proteinproduktion nach der Methode von Studier.....	45
Tabelle 11: <i>Single-Primer-PCR</i> Reaktionsansätze.....	48
Tabelle 12: <i>Single Primer-PCR</i> Programm.....	48
Tabelle 13: Verwendete Chemikalien.....	51
Tabelle 14: Verwendete Enzyme.....	53
Tabelle 15: Verwendete Kits.....	53
Tabelle 16: Verwendete Software.....	54
Tabelle 17: Potenziell immundominante Antigenkandidaten von <i>B. bacilliformis</i>	58
Tabelle 18: Gepaarte Sequenzalignments von ausgewählten <i>B. bacilliformis</i> Proteinen.....	68
Tabelle 19: Multiples Sequenz-Alignment von Porin-A Sequenzen aus 17 verschiedenen <i>B. bacilliformis</i> Stämmen bzw. Isolaten.....	72
Tabelle 20: Gepaartes Sequenz-Alignment von α/β -Hydrolase Sequenzen aus 17 verschiedenen <i>B. bacilliformis</i> Stämmen bzw. Isolaten.....	72
Tabelle 21: Liste der errechneten physikalischen und chemischen Parameter.....	73
Tabelle 22: Vorhersage der subzellulären Lokalisierung und der Signalsequenzen von Porin-A und der α/β -Hydrolase.....	73
Tabelle 23: Protein-Klassifizierung durch Motiv- und Domänen-Analyse.....	74
Tabelle 24: Genomvergleich zwischen den <i>B. bacilliformis</i> Stämmen bzw. Isolaten KC583, KC584 und FDARAGOS_174 mit der Referenzsequenz NC_008783.1.....	122
Tabelle 25: BLASTP Analyse zur Überprüfung des Vorhandenseins von α -Hämolyisin Homologen in <i>B. bacilliformis</i>	124
Tabelle 26: BLASTP Analyse zur Überprüfung des Vorhandenseins von HlyA Homologen in <i>B. bacilliformis</i>	125

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
Å	Ångström
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AUC	Fläche unter der Kurve
BadA	<i>Bartonella</i> Adhäsın-A
BafA	<i>Bartonella angiogenic factor</i> A
BaLi-Medium	<i>Bartonella</i> Liquid Medium
BAM	β -barrel assembly machinery
Bbad	<i>Bartonella bacilliformis</i> Adhäsın
BepA	<i>Bartonella-translocated effector</i> Protein-A
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CBA	Columbia-Blutagar
CCS	zirkuläre Konsensus-Sequenzierung
cIAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis</i> Protein
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CtpA	Carboxy-terminale Protease-A
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fwd	<i>forward</i>
g	Gramm
Gb	Giga-Basenpaare
h	Stunde
<i>hbp</i>	Hämin bindendes Protein
HIF	Hypoxie-induzierbarer-Faktor
HRP	Meerrettichperoxidase
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i>
Ial	<i>invasion-associated locus</i>
IFT	Immunfluoreszenztest
IgG	Immunglobulin-G
IL-10	Interleukin-10
IL-6	Interleukin-6
Immunglobulin M	Immunglobulin-M
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan ^R	Kanamycin Resistenzgen
Kb	Kilobasenpaare
KBE	koloniebildenden Einheiten

kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LLO	Listeriolysin-O
m	Meter
M	Molar
mA	Milliampere
Mb	Mega-Basenpaare
mF	Millifarad
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOI	Multiplizität der Infektion
ms	Millisekunden
MSA	multiple Sequenzalignment
n.s.	nicht signifikant
NadA	<i>Neisseria</i> Adhäsion-A
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NGS	<i>next generation sequencing</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
Nr.	Nummer
NTD	<i>neglected tropical disease</i>
N-term.	N-terminal
OD	optische Dichte
OMP	<i>outer membrane protein</i>
ori	<i>origin of replication</i>
PBP	porenbildendes Protein
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pg	Pikogramm
pI	isoelektrischer Punkt
pLDDT	<i>predicted local distance difference test</i>
pmol	Pikomol
rev	<i>reverse</i>
ROC	<i>receiver operating characteristic</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSV	respiratorisches Synzytial-Virus
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SBS	<i>sequencing-by-synthesis</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
seq.	<i>sequencing</i>
SMRT	<i>single molecule real-time</i>
SNPs	<i>single nucleotide polymorphisms</i>
sog.	sogenannt
spp.	Spezies
SRA	<i>Sequence Read Archive</i>
T4SS	Typ IV Sekretionssystem
TAA	trimäres Autotransporter-Adhäsion
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR5	<i>Toll-like</i> Rezeptor-5

T _m	Schmelztemperatur
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
t-PA	<i>tissue plasminogen activator</i>
TS	Trypton-Soja
u	Einheit
UPCH	Universidad Peruana Cayetano Heredia
V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	Volumenprozent
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR2	<i>vascular endothelial growth factor</i> Rezeptor-2
VLE	<i>very low endotoxin</i>
w/v	Gewichtsprozent
WGS	<i>whole genome sequencing</i>
YadA	<i>Yersinia</i> Adhäsion-A
z. B.	zum Beispiel
ZMW	<i>zero-mode waveguide</i>

Zusammenfassung

Die Carrión-Krankheit ist eine durch Vektoren übertragene vernachlässigte Tropenkrankheit (*neglected tropical disease*), die in den südamerikanischen Andentälern auf einer Höhe von 600 - 3.200 m über dem Meeresspiegel vor allem in Peru, aber auch in Ecuador und Kolumbien endemisch ist. Der Erreger dieser Infektionskrankheit ist *Bartonella bacilliformis*, ein strikt humanpathogenes, Gram-negatives, fakultativ intrazelluläres Stäbchen der Klasse der Alphaproteobakterien. In der akuten Krankheitsphase, die als "Oroya-Fieber" bezeichnet wird, infizieren die Erreger Erythrozyten und verursachen eine schwere akute hämolytische Anämie, hohes Fieber sowie eine ausgeprägte Immunsuppression. Für diese Phase wurden Sterblichkeitsraten von bis zu 88% beschrieben. Dem Oroya-Fieber folgt meist eine chronische Infektion der vaskulären Endothelzellen, bei der durch vaskulo-endotheliale Proliferationen noduläre, Hämangiom-ähnliche, kutane Gefäßläsionen, die als "*Verruga peruana*" bezeichnet werden, entstehen. Diese beiden Phasen treten in der Regel nacheinander, manchmal aber auch unabhängig voneinander auf. Die Übertragung auf dem Menschen erfolgt durch den Biss infizierter Sandmücken (*Lutzomyia* spp.), die in den hochgelegenen Regionen der Anden vorkommen. Klimatische Veränderungen führen jedoch zur Expansion des Vektors auf angrenzende Regionen und begünstigen damit die Ausbreitung von *B. bacilliformis*-Infektionen.

In der Erforschung der Carrión-Krankheit besteht ein erheblicher Wissensmangel zu zahlreichen Aspekten (z. B. Epidemiologie, Infektionsbiologie, Diagnostik, Therapie), wodurch die Entwicklung von potenziellen Diagnostika, Therapeutika oder Vakzinen verhindert wird. Auch wenn frühere Studien zum Ziel hatten, immundominante Proteine für die Entwicklung serodiagnostischer Verfahren und Impfstoffe zu identifizieren, ist bislang kein validierter serologischer Test bzw. ein Impfstoff verfügbar. Daher sollte im ersten Teil dieser Arbeit ein serologischer Test zum Nachweis von anti-*B. bacilliformis*-Antikörpern entwickelt werden. Hierzu wurde ein Ansatz aus reverser Vakzinologie in Kombination mit einer Analyse heterologer genomischer Expressionsbibliotheken verfolgt, um geeignete immundominante Proteine zu identifizieren. Insgesamt wurden 21 potenziell immundominante Proteine identifiziert, rekombinant produziert, und auf ihre Reaktivität mit *B. bacilliformis* Patientenserum mittels Immunoblotting analysiert. Von den 21 Antigenkandidaten erwiesen sich 14 als immunreaktiv, die anschließend in einer Line blot-Analyse mit 26 Serumproben von peruanischen *B. bacilliformis* Patienten und 96 Serumproben von gesunden deutschen Blutspendern ohne Reisevorgeschichte in Südamerika auf ihren potenziellen Nutzen für serologische Test untersucht wurden. Drei Antigene (Porin-B, Autotransporter-E und hypothetisches Protein-B) erwiesen sich für die Entwicklung eines diagnostischen ELISA als geeignet und wurden in zwei verschiedenen Antigenkombinationen (ELISA 1: Porin-B, Autotransporter-E, ELISA 2: Porin-B, Autotransporter-E, hypothetisches Protein-B) verwendet. Um die Leistungsfähigkeit des *B. bacilliformis* ELISA zu bewerten, wurde eine *Receiver-Operating-Characteristic*-Analyse durchgeführt. Für die Kombination aus Porin-B und Autotransporter-E lag die Sensitivität des Tests

bei 80,8% und die Spezifität bei 94,8%, wohingegen die Kombination aus Porin-B, Autotransporter-E und dem hypothetischem Protein-B in einer Sensitivität von 76,9% und einer Spezifität von 93,8% resultierte. Dieser neu entwickelte ELISA könnte ein nützliches serodiagnostisches Instrument für künftige epidemiologische Studien über *B. bacilliformis* in endemischen Gebieten darstellen. Darüber hinaus könnten die hier identifizierten immundominanten Antigene eine erste Grundlage für die zukünftige Entwicklung von Impfstoffen für die Prävention Carrión-Krankheit bilden.

Erythrozyten-Invasion und Hämolyse sind wahrscheinlich die wichtigsten Schritte in der Pathogenese der Carrión-Krankheit und verantwortlich für die hohe Sterblichkeitsrate beim Menschen. Genaue mechanistische Kenntnis dieses Prozesses sind entscheidend für die Entwicklung therapeutischer Arzneimittel. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten die in der Hämolyse involvierten Pathogenitätsfaktoren von *B. bacilliformis* identifiziert werden. Hierzu wurde eine Tn5-Transposonmutagenese in den beiden *B. bacilliformis* Stämmen KC583 und KC584 durchgeführt. Ein *screening* nach Hämolyse-defizienten Mutanten führte zur Identifizierung von zwei Pathogenitätsfaktoren: einem Porin (Porin-A) und einer α/β -Hydrolase. Ihre vermutete Funktion im Prozess der Hämolyse wurde durch eine zielgerichtete markerlose Deletion sowie durch genetische Komplementationen *in vitro* funktionell bestätigt. Dabei zeigte sich, dass Porin-A und die α/β -Hydrolase jeweils essenzielle Faktoren für die Hämolyse darstellen. Durch eine *in silico*-Charakterisierung konnte konservierte biologische Funktionen identifiziert sowie die dreidimensionale Struktur der Proteine vorhergesagt werden. Diese Versuche bilden eine experimentelle Basis, um die Rolle von Porin-A und der α/β -Hydrolase näher untersuchen zu können und um potenzielle (Porin-A und α/β -Hydrolase) Inhibitoren mit anti-hämolytischer und damit therapeutische Wirkung testen zu können.

1. Einleitung

Als Bartonellose werden bakterielle Infektionskrankheiten bezeichnet, die durch Vertreter des Genus *Bartonella* verursacht werden. Sie zählen neben z. B. Malaria, Dengue-Fieber und Schistosomiasis zu den vernachlässigten Tropenkrankheiten (*neglected tropical disease*, NTD), einer Gruppe armutsbedingter tropischer Infektionskrankheiten, die v. a. in Entwicklungsregionen Afrikas, Asiens und Amerikas verbreitet sind [1]. Bartonellen weisen einen fakultativ intrazellulären Lebensstil auf und sind Erreger von Säugetieren. Die meisten *Bartonella* Spezies zeichnen sich durch eine ungewöhnliche Infektionsstrategie aus. Durch die Invasion von Wirtserythrozyten und anschließender intrazellulärer Persistenz können die Erreger zum einen dem Wirtsimmunsystem entweichen und zum anderen von blutsaugenden Arthropoden für einen erneuten Infektionszyklus wieder aufgenommen werden. Die Erreger verursachen typischerweise eine weitgehend asymptomatische Bakteriämie, ohne dabei ihren Wirt ernsthaft zu schaden und führen selten zu schweren Erkrankungen. Die meisten *Bartonella* Spezies nutzen Tiere als Reservoir-Wirte (z. B. *B. tribocorum*, *B. bovis*), aber es sind auch mehrere humanpathogene Spezies bekannt, darunter sowohl zoonotische Erreger wie z. B. *B. henselae* (Katzen-Kratz-Krankheit), als auch Spezies, die den Menschen als Reservoir-Wirt infizieren wie z. B. *B. bacilliformis* (Carrión-Krankheit) oder *B. quintana* (Schützengraben-Fieber).

1.1. Phylogenie des Genus *Bartonella*

Beim Genus *Bartonella* handelt es sich um Gram-negative fakultativ intrazelluläre Stäbchen der Klasse der Alphaproteobakterien. Das Genus umfasst insgesamt 45 Spezies [2] und wird in die drei Kladen *Bartonella apis*, *Bartonella tamiae* und *Eubartonella* unterteilt [3]. Die phylogenetisch älteste *Bartonella* Spezies ist *B. apis*, ein symbiotisches Darmbakterium der Honigbiene und der einzige nicht-pathogene Vertreter des Genus. *B. tamiae* weist bereits einen intrazellulären Lebensstil auf, grenzt sich jedoch von den *Eubartonella* ab, da viele ursprüngliche Merkmale im Genom zu finden sind (z. B. Gene zur Biosynthese von Kofaktoren wie Häm, Vitamin B6 und Vitamin B12) und die meisten Pathogenitätsfaktoren der *Eubartonella* fehlen (z. B. *trw* und *virB* Typ IV Sekretionssysteme [T4SS]). Daraus wurde geschlossen, dass *B. tamiae* den evolutionären Übergang von einem Darm-Symbiont zu einem intrazellulären Erreger darstellt [2]. Die Klade der *Eubartonella* wird nochmals in vier Abstammungslinien (L1-L4) unterteilt (Abbildung 1). L1 ist die ursprüngliche Abstammungslinie der *Eubartonella* und beinhaltet die Spezies *B. bacilliformis* und *B. ancashensis*, zwei humanpathogene Erreger, die ausschließlich den Menschen als Reservoir nutzen [4,5]. Abstammungslinie L2 umfasst auf Wiederkäuer spezialisierte Spezies (bspw. *B. schoenbuchensis*), wohingegen Spezies aus den Linien L3 und L4 eine Vielzahl an verschiedenen Reservoir-Wirten aufweisen. Eines der wichtigsten phylogenetischen Merkmale der *Eubartonella* stellen die T4SS wie z. B. *VirB/VirD4*, *Vbh/TraG* oder *Trw* dar. Diese spielen eine zentrale Rolle bei der Invasion von Wirtszellen und sind bei allen Vertretern der *Eubartonella*, mit Ausnahme von *B. bacilliformis*, zu finden. Phylogenetische Studien belegen, dass es sich bei der Abstammungslinie L1 um die älteste

Spezies der *Eubartonellae* handelt und dass der Erwerb des T4SS ein jüngerer Ereignis in der Stammesgeschichte der *Eubartonellea* ist. Obwohl *B. ancashensis* zur Abstammungslinie L1 zählt, weist diese Spezies ein VirB/D4 T4SS auf, dass unabhängig von den Homologen in den moderneren Abstammungslinien L3 und L4 erworben wurde [6,7]. Die Flagellierung der Bakterien stellt einen der ursprünglichsten Virulenzfaktoren dar und wurde in Linie L4 durch das Trw T4SS ersetzt. Innerhalb der *Bartonella* spp. herrscht eine hohe genetische Dynamik, die sich vor allem in der Größe der Genome widerspiegelt. Diese reichen von einer stark reduzierten Genomgröße mit 1,45 Mb bei *B. bacilliformis* [8] bis hin zu größeren Genomen mit 2,64 Mb bei *B. tribocorum* [9]. Komprimierte Genome wie bei *B. bacilliformis* verdeutlichen, wie stark Bartonellen an ihren Lebensstil, Vektor und Wirtsorganismus adaptiert sind.

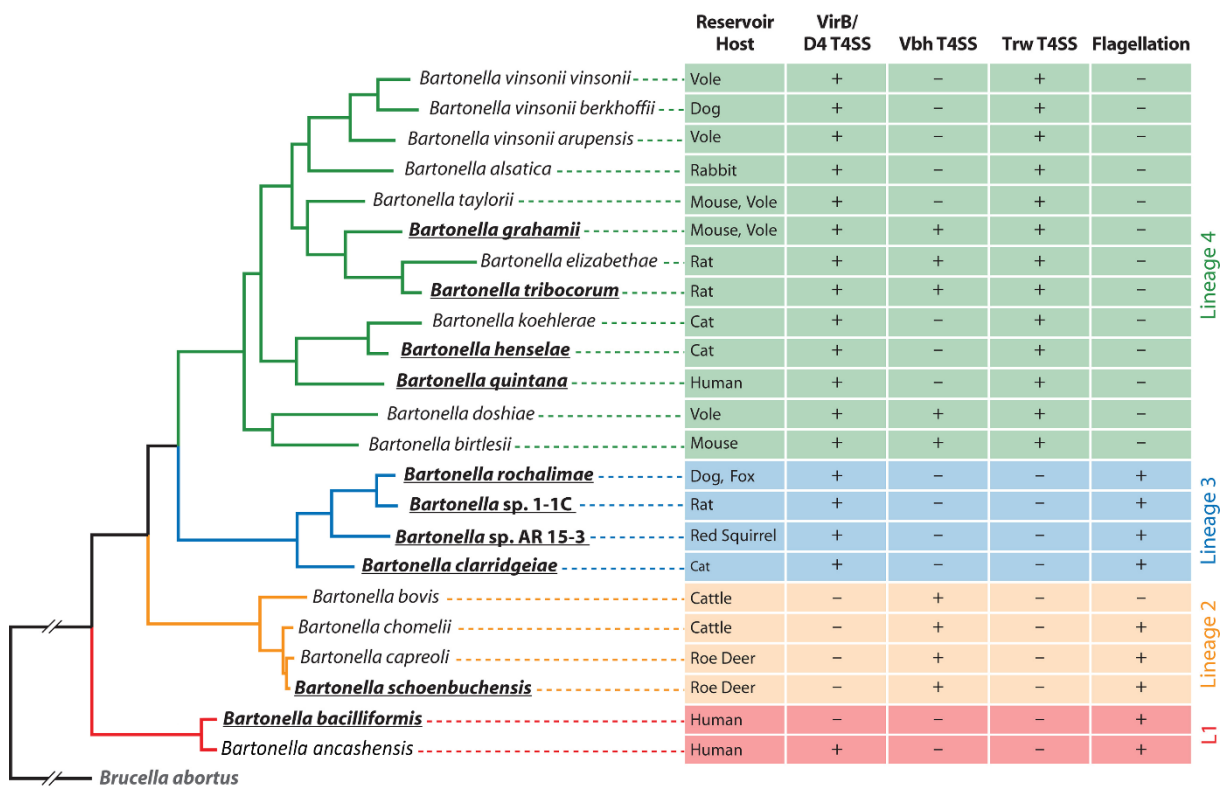


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum und Virulenzfaktoren der *Eubartonellea*. Der phylogenetische Stammbaum basiert auf der Analyse von zehn sequenzierten *Bartonella* spp. (fett und unterstrichen) sowie *Brucella abortus*. Weitere Arten wurden anhand von Sequenzen für bestimmte *housekeeping*-Gene mit einbezogen. Die Aufteilung der *Eubartonellea* erfolgt in die ursprüngliche Linie L1 und in die modernen Linien L2, L3 und L4. Alle Spezies der *Eubartonellae*, mit Ausnahme von *B. bacilliformis*, weisen T4SS auf. Die Flagellierung der Bakterien ist einer der ursprünglichen Virulenzfaktoren des Genus und wurde in der Abstammungslinie L4 offenbar durch das Trw T4SS ersetzt. Übernommen von [3] und verändert nach [7].

1.2. Erkrankungen durch *Bartonella* spp. im Menschen

Bislang sind 16 humanpathogenen *Bartonella* spp. bekannt von denen *B. bacilliformis*, *B. quintana* und *B. henselae* die klinisch relevantesten Vertreter darstellen und für den Großteil aller *Bartonella*-Infektionen weltweit verantwortlich sind [10]. Bartonellose können eine Vielzahl an unterschiedlichen Krankheitsbildern aufweisen, darunter beispielsweise Bakteriämie, hämolytische Anämie, Fieber, vaskuläre Läsionen der Haut und inneren Organe, Lymphadenopathie, Endokarditis und weiteren Organinfektionen wie z. B. Infektionen des Nervensystems.

B. henselae ist die am weitesten verbreitete zoonotische *Bartonella*-Art und kommt in der Regel in asymptomatische Katzen, dem natürlichen Reservoir-Wirt, vor [11]. Durch einen Biss oder Kratzer infizierter Katzen können die Erreger auch auf den Menschen übertragen werden und verschiedene klinische Manifestationen wie die Katzenkratzkrankheit auslösen [12]. Typische klinische Symptome sind Hautläsionen an der Eintrittsstelle des Erregers sowie Entzündungen der Lymphknoten, die sich aber in den meisten Fällen innerhalb von 14 Tagen zurückbilden.

B. quintana ist der Erreger des Schützengrabenfiebers (auch bekannt als Wolhynischen Fieber). Die Erkrankung ist durch Fieberschübe gekennzeichnet, die bis zu drei Tage andauern und mit Kopfschmerzen sowie Schwindel einhergehen. Das Fieber kann alle vier bis sechs Tage wiederkehren, wobei jeder nachfolgende Schub in der Regel weniger schwerwiegend ist [13,14]. Bei Patienten mit schwerer Immunschwäche wie z. B. HIV-Patienten können Infektionen mit *B. quintana* und *B. henselae* auch zu einer bazillären Angiomatose oder Peliosis hepatis (beides infektionsbedingte Vaskuloproliferationen) führen [15].

B. bacilliformis ist der Erreger der Carrión-Krankheit, eine vernachlässigte Tropenkrankheit, die auf die südamerikanischen Anden, einschließlich Peru, Ecuador und Kolumbien, beschränkt ist und in den Andentälern in einer Höhe von 600 - 3.200 m über dem Meeresspiegel endemisch ist [16]. Vereinzelt wurde sie auch in den Küstengebieten von Guayas und Manabi in Ecuador beschrieben [17,18]. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt über infizierte Sandmücken der Gattung *Lutzomyia*, die den einzigen bekannten Vektor für *B. bacilliformis* darstellt [19]. Der Krankheitsverlauf ist in der Regel biphasisch und durchläuft eine akute und eine chronische Phase die unabhängig voneinander auftreten können [20].

Die akute Krankheitsphase das sog. Oroya-Fieber ist durch eine intraerythrozytäre Anämie gekennzeichnet (Abbildung 2) und verursacht eine Vielzahl klinischer Symptome, darunter Fieber, hämolytische Anämie, Blässe, Myalgie, Kopfschmerzen, Anorexie, Tachykardie und Hepatomegalie [21] mit einem immungeschwächten Zustand, der Sekundärinfektionen wie Myokarditis mit *Toxoplasma gondii* oder Bakteriämie mit *Staphylococcus aureus* oder *Salmonella enterica* begünstigt

[22]. In der frühen Phase der Infektion breitet sich *B. bacilliformis* im Blutkreislaufsystem aus, dringt in Erythrozyten ein und führt zu einer schweren hämolytischen Anämie mit Sterblichkeitsraten von bis zu 88% bei unzureichender Antibiotika-Therapie. Auch mit adäquater Behandlung werden noch Sterblichkeitsraten von etwa 10% berichtet [23].

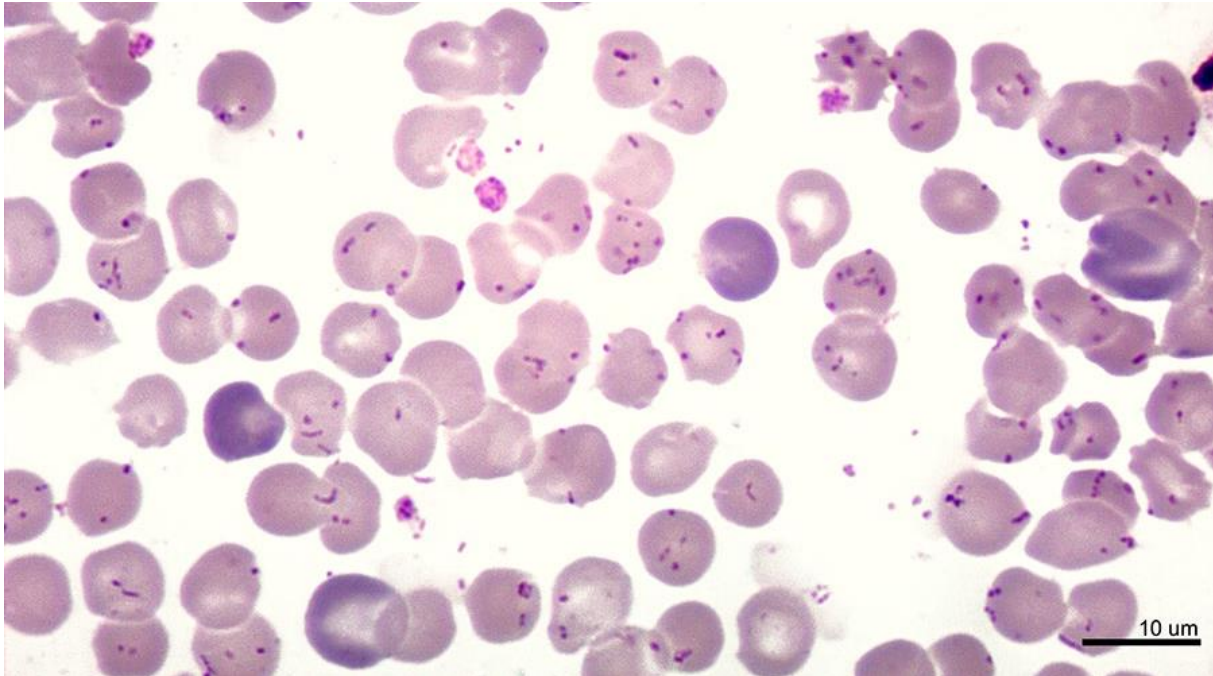


Abbildung 2: Parasitismus von Erythrozyten durch *B. bacilliformis*. Der Giemsa-gefärbte Blutausschlag eines Patienten mit Oroya-Fieber, zeigt eine Infektion von nahezu allen Erythrozyten mit extra- und intrazellulär Bakterien. Maßstab: 10 µm. Entnommen aus [16].

Im Anschluss an das Oroya-Fieber tritt meist eine chronische Phase die sog. *Verruga peruana* (spanisch „peruanische Warze“) auf, die sich durch blutgefüllte, knotige, hämangiomartige Läsionen in der Haut auszeichnet (Abbildung 3). Bislang gibt es nur wenige Erkenntnisse über die vaskuläre Endothelzellproliferation, die durch eine chronische *B. bacilliformis* Infektion ausgelöst wird, es ist aber bekannt, dass *B. bacilliformis* die Vaskuloproliferation und Angiogenese von Wirtszellen reprogrammieren kann. Die Läsionen der *Verruga peruana* wurden bereits im 16. Jahrhundert von spanischen Eroberern beschrieben und treten meist an Kopf sowie an den Extremitäten auf, wo sie über Wochen bis Monate persistieren [21,23].



Abbildung 3: Klinische Manifestation der *Verruga peruana* bei Patienten mit einer *B. bacilliformis* Infektion. Links: Kleinkind mit zahlreichen blutenden *Verruga peruana*-Läsionen an den Beinen; Huaraz, Ancash, 1993. Rechts: Arm eines 17-jährigen Mädchens mit mehreren *Verrugas* im Bereich des linken Ellenbogens; eine Läsion am Ellbogen hat die darüber liegende Epidermis durchbrochen und kann später zu Blutungen führen; Huari, Ancash, 2002. Entnommen aus [16].

Die Diagnose des Oroya-Fiebers sowie der *Verruga peruana* erfolgt in der Regel basierend auf klinischer Symptomatik und der Detektion von Bakterien im Blut mittels Giemsa-Färbung intraerythrozytärer Bakterien in Blutaustriechen oder durch mikrobiologische Blutkulturen. Die Giemsa-Färbung weist eine Sensitivität von 36% und eine Spezifität von 96% auf [24] und findet aufgrund der Einfachheit in der Durchführung sowie aus Kostengründen am häufigsten Anwendung. Eine Alternative dazu stellt die mikrobiologische Kultivierung von *B. bacilliformis* in Blutkulturen dar. Aufgrund des langsamen und anspruchsvollen Wachstums von *B. bacilliformis in vitro* kann es jedoch bis zu sechs Wochen dauern, bevor hierdurch eine Diagnose gestellt werden kann. Des Weiteren existieren auch diverse PCR-basierte Diagnoseverfahren, die die Detektion der Erreger direkt aus dem Blut ermöglichen. Zwar weisen PCR-Diagnostika meist sehr hohe Sensitivitäten und Spezifitäten auf, sind jedoch teuer in der Durchführung und benötigen eine gute fachliche Expertise bei der Durchführung und Auswertung [21,25].

Eine Infektion mit *B. bacilliformis* kann von schweren bis hin zu asymptomatischen Erkrankungsverläufen reichen, die teilweise mit einer chronischen Bakteriämie einhergehen [20]. Die genauen Faktoren, die die Schwere des klinischen Verlaufs beeinflussen, sind unbekannt. Es wird angenommen, dass das Zusammenspiel der Virulenz unterschiedlicher *B. bacilliformis* Stämme, das Inokulum sowie die körperliche Verfassung und individuelle Veranlagung des Wirts den Verlauf der Infektion bestimmt [21]. Es gibt Hinweise über die mögliche Existenz weniger virulenter *B. bacilliformis* Stämme, die für milde oder asymptomatische Infektionen verantwortlich sind und dadurch zu einer Untererfassung der Carrión'schen Krankheit führen [17].

1.3. Immunantwort des Wirtes nach einer *B. bacilliformis* Infektion

Über die Immunität und Immunantwort einer *B. bacilliformis* Infektion, liegen aktuell nur wenige Informationen vor. Es gibt jedoch Evidenz dafür, dass humorale und zelluläre Immunreaktionen an der Carrión-Krankheit beteiligt sind und dass eine Infektion zum Erwerb einer lebenslang nachweisbaren humoralen Immunität führt, die zumindest einen teilweisen immunologischen Schutz gegen *B. bacilliformis* verleiht [26]. Dies steht in Übereinstimmung mit Tierversuchen, bei denen Rhesusaffen und Schimpansen, die von einer Infektion mit *B. bacilliformis* genesen waren, gegen wiederholte Infektion eine Immunität aufwiesen [27].

In weiteren Tierversuchen wurden die Auswirkungen von Immunsereen auf den Verlauf von *B. bacilliformis*-Infektionen untersucht [28]. Dafür wurden naive Rhesusaffen mit *B. bacilliformis* infiziert und mit Rekonvaleszentenserum von zuvor infizierten Versuchstieren behandelt. Bei gleichzeitiger Verabreichung von Rekonvaleszentenserum und den Erregern wurde in den meisten Fällen eine Blutstrominfektion verhindert und die Ausbildung von *Verruga peruana* verzögert. Eine Injektion von Rekonvaleszentenserum bei bereits infizierten Versuchstieren führte zwar zu einer Eliminierung der Erreger aus dem Blut und zu negativen Blutkulturen, zeigte aber keinen Effekt auf die Ausbildung der Hautläsionen.

In endemischen Regionen kann die Seroprävalenz von anti-*B. bacilliformis*-IgG Antikörpern beim Menschen zwischen 25 - 65% betragen [29–31]. Aktuelle Schätzungen zufolge beträgt die Zahl der asymptomatischen *B. bacilliformis*-Träger 52% in endemischen Gebieten und circa 37% nach einem Ausbruch in Gebieten, in denen die Krankheit vorher noch nicht beschrieben worden war [30]. Da Ausbrüche meist unvorhergesehen sind und neben dem Menschen kein weiterer Reservoir-Wirt bekannt ist, wird davon ausgegangen, dass asymptomatischen Personen das Hauptreservoir für *B. bacilliformis* darstellen.

In der Vergangenheit wurden mehrere Versuche unternommen, um mögliche Serum-Biomarker zum Nachweis der Carrión-Krankheit zu identifizieren. Für die Entwicklung serologischer Tests wurde Immunglobulin-M (IgM) als Marker für eine kürzlich erfolgte Infektion und Immunglobulin-G (IgG) als Marker für eine vergangene Exposition und Erwerb einer Immunität vorgeschlagen [26]. Jedoch existierte bislang kein validierter serodiagnostischer Test.

Erhöhte anti-*B. bacilliformis* IgM Antikörperkonzentrationen korrelieren mit niedrigen Eotaxin-, Interleukin-6- (IL-6) und VEGF-Spiegeln sowie mit hohen Interleukin-10 (IL-10) Spiegeln, was auf eine Immunsuppression in der akuten Phase des Oroya-Fiebers hinweist [26]. IL-10 ist ein antiinflammatorisches und immunsuppressives Zytokin, das eine entscheidende Rolle bei der Begrenzung der Immunreaktion gegen Krankheitserreger spielt, um Schädigungen am Wirt zu

verhindern [32]. Es wird spekuliert, dass *B. bacilliformis*, ähnlich zu anderen Krankheitserregern, in der Lage ist die immunsuppressiven Eigenschaften von IL-10 als Teil der Infektionsstrategie zu nutzen, um eine Immunantwort des Wirts zu unterdrücken [33]. Hinweise dafür liefern Fallberichte von zwei schwangeren Patientinnen mit schweren Bartonellosen, bei denen eine starke Abnahme der zellulär vermittelten Immunantwort sowie erhöhte IL-10-Spiegel nachgewiesen wurden [34].

Die durch *B. bacilliformis* verursachte Immunsuppression kann bis hin zur chronischen Phase anhalten [26]. Sie resultiert in einer Reduktion der Anzahl von TH1-Zellen und proinflammatorischer Zytokine, was wiederum persistierende Infektionen mit niedriger Bakteriämie erlauben könnte. Darüber hinaus konnten für die pro-angiogenen Zytokine VEGF und Eotaxin eine positive Korrelation mit dem IgG-Spiegel seropositiver Patienten, die an einer *B. bacilliformis* Infektion erkrankt waren, nachgewiesen werden. Daher wird angenommen, dass *B. bacilliformis* in das Endothel und in die umliegende Epidermis ausweicht, um einer verstärkten IgG-Immunantwort zu entfliehen. Durch die Produktion von VEGF, Eotaxin und anderen angiogenen Chemokinen könnten die Bakterien schließlich eine angiogenetische Vorgänge induzieren, die letztlich zur Ausprägung der *Verruga peruana* führen [26].

1.4. Allgemeine Infektionsstrategie und Lebenszyklus von *Bartonella* spp.

Das Genus *Bartonella* weist eine komplexe und bislang nicht völlig verstandene Infektionsstrategie auf, die verallgemeinert in folgende Schritte zusammengefasst werden kann: (I) Inokulation der Erreger durch blutsaugende Arthropoden, (II) Besiedlung einer primären Nische zur Erlangung der Infektionskompetenz, (III) Infektion von Wirtserythrozyten, (IV) intrazelluläre Persistenz und (V) Wiederaufnahme durch blutsaugende Arthropoden (Abbildung 4). Während des Infektionsverlaufes kommt es in der Regel zu einem Ausbleiben einer adäquaten Wirts-Immunantwort, verursacht durch Immunevasion und Immunmodulation. Es wird angenommen, dass diese Infektionsstrategie (mit wenigen Ausnahmen z. B. *B. apis* innerhalb des Genus konserviert ist.

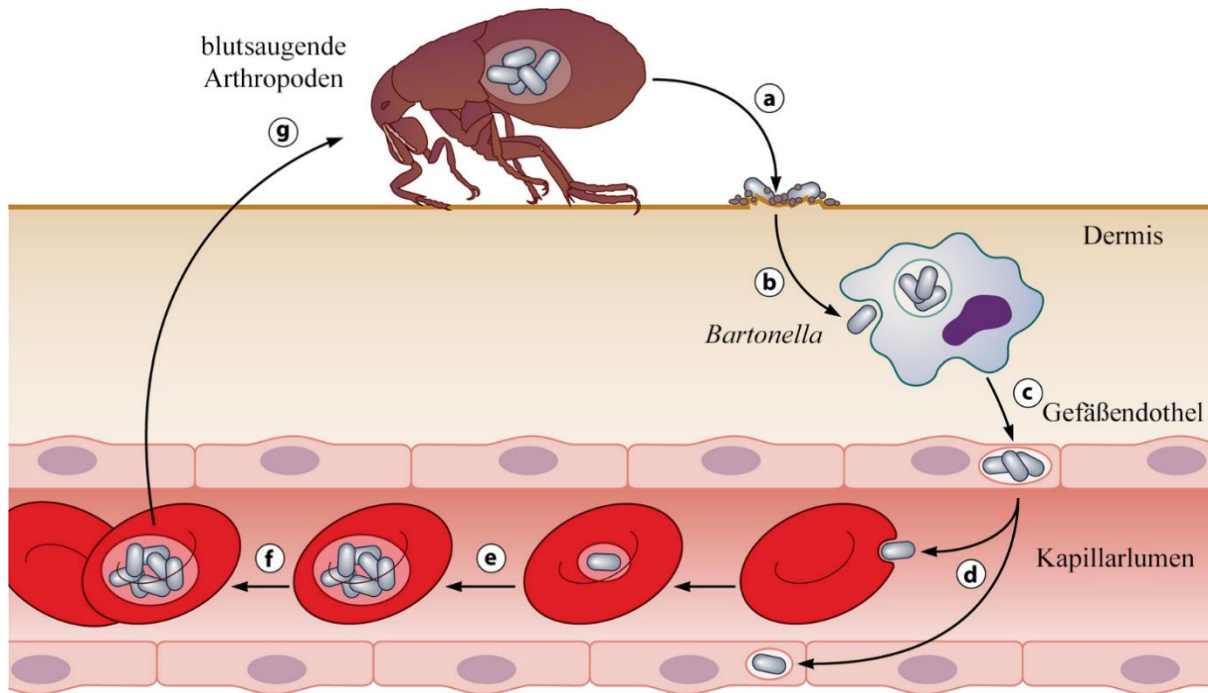


Abbildung 4: Schematische Darstellung der allgemeinen Infektionsstrategie von Bartonellen. (a) Die Erreger werden durch einen blutsaugenden Arthropodenvektor (z. B. Laus, Sandmücke) auf den Reservoir-Wirt übertragen. (b) Im Wirtsorganismus kolonisieren die Bakterien die primäre Nische. Dabei dringen die Bakterien wahrscheinlich in migrierende Zellen ein, die den Transport zum Gefäßendothel ermöglichen. (c) Dort persistieren die Bakterien intrazellulär, wodurch sie dem Wirtsimmunsystem ausweichen und die nötige Infektionskompetenz für die bevorstehende Erythrozyten Infektion ausbilden können. (d) Die Erreger gelangen in den Blutkreislauf und infizieren Erythrozyten oder erneut die primäre Nische. (e) Die Bakterien replizieren sich im Inneren der Erythrozyten und (f) persistieren in der intraerythrozytären Nische bis zur (g) erneuten Aufnahme und weiteren Übertragung durch einen blutsaugenden Arthropoden. Entnommen und verändert nach [3].

1.4.1. Inokulation und Übertragung durch Vektoren

Eine *Bartonella*-Infektion beginnt typischerweise mit der Übertragung der Erreger auf den Säugetier-Wirt durch infizierte blutsaugende Arthropoden (Abbildung 4 a). Die Inokulation kann durch eine direkte Transmission der Bakterien in den Blutkreislauf oder durch das Einreiben von Vektor-Fäkalien in die Haut erfolgen. Die meisten *Bartonella* spp. weisen eine hohe Wirts- und Vektorspezifität auf und können nur wenige nahverwandte Wirte als Reservoir nutzen. Da die Vektoren eine essenzielle Rolle in der Infektionsbiologie von *Bartonella* spielen wird angenommen, dass die Wirtsspezifität stark durch die Vektorökologie (z. B. Wirtspräferenz, Lebensraum) beeinflusst wurde. Allerdings lässt sich die Wirtsspezifität der Bartonellen nicht allein durch die Vektorökologie erklären. Beispielsweise weist *B. henselae* eine Wirtsspezifität für Katzen auf und wird über den Katzenfloh *Ctenocephalides felis* übertragen. Auch Hunde, die im selben Haushalt leben, werden von *C. felis* befallen, jedoch wurde bislang keine Bakteriämie mit *B. henselae* in Hunden nachgewiesen [35]. Die hohe Vektorspezifität der Bartonellen lässt sich gut am Beispiel von *B. bacilliformis* veranschaulichen. Das Vorkommen der Carrion-Krankheit beschränkt sich geographisch fast ausschließlich auf die südamerikanischen Anden, die das Verbreitungsgebiet des Vektors (*Lutzomyia* spp.) darstellen [36,37].

1.4.2. Immunevasion durch Kolonisierung der primären Nische

Genauere infektionsbiologische Kenntnisse über die Vorgänge nach der Inokulation bis hin zur Infektion der Erythrozyten sind nicht verfügbar. Eine Übertragung der Bakterien direkt in den Blutkreislauf führt nicht zu einer unmittelbaren Infektion der Erythrozyten was vermuten lässt, dass die Bakterien zum Zeitpunkt der Inokulation noch nicht die nötige Kompetenz für eine Infektion aufweisen. Es wird daher angenommen, dass die Bakterien zuerst eine unbekannte primäre Nische kolonisieren, um dem Wirtsimmunsystem zu entweichen bis durch Anpassungsvorgänge die nötige Infektionskompetenz ausgebildet wurde (Abbildung 4 b-c). Allerdings wird die Existenz einer primären Nische kontrovers diskutiert, da diese bislang für keine *Bartonella* spp. identifiziert wurde. Mögliche Kandidaten könnten Endothelzellen sein, da diese neben Erythrozyten wichtige Zielzellen für diverse *Bartonella* spp. sind (z. B. *B. bacilliformis*, *B. quintana* oder *B. henselae*). Darüber hinaus werden auch andere Zelltypen wie z. B. CD34 positive hämatopoetische Vorläuferzellen [38] oder Zellen mit migratorischen Eigenschaften wie Lymphozyten oder mononukleäre Phagozyten [39], die den Transport durch den Wirtsorganismus erlauben, in Betracht gezogen. Ein weiterer Hinweis für die Existenz einer primären Nische sind die regelmäßigen Rückfälle der Blutkreislaufinfektionen wie beispielsweise bei *B. quintana* [13], die selbst nach Antibiotikatherapie oder vollständiger Beseitigung der Bakteriämie aus dem Blutkreislauf durch das Immunsystem wiederkehren [40,41].

1.4.3. Infektion von Erythrozyten

Nach der erfolgreichen Kolonisierung der primären Nische werden die infektiionskompetenten Bakterien in das kardiovaskuläre System entlassen (Abbildung 4 d). Dort infizieren die Bakterien Wirts-Erythrozyten, die eine geeignete Nische für die Proliferation, Persistenz und Wiederaufnahme durch den Vektor bietet (Abbildung 4 e-g) [3]. Der intrazelluläre Lebensstil in Säugetier-Erythrozyten stellt eine seltene Infektionsstrategie dar und wurde bisher nur bei wenigen Erregern wie *Bartonella* spp., *Anaplasma marginale* [42], *Mycoplasma suis*, *Mycoplasma gallisepticum* [43,44], *Plasmodium* spp. [45], *Babesia* spp. und *Theileria* spp. [46] beschrieben. Die Infektionsbiologie von Bartonellen und Erythrozyten wurde bereits in verschiedenen natürlichen und experimentellen Tiermodellen wie z. B. in der Maus (*B. birtlesii*) [47], der Ratte (*B. tribocorum*) [48] und der Katze (*B. henselae*) [49] untersucht und die daraus gewonnenen Ergebnisse weisen auf eine für *Bartonella* universale Infektionsstrategie hin [3]. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der Erythrozyteninfektion durch *Bartonella* spp. näher erläutert.

1.4.3.1. Adhärenz an Erythrozyten

Für intrazelluläre Erreger ist die Herstellung des Zell-Zell-Kontaktes und die Bindung an Wirtszellen ein zentraler Schritt in der Etablierung einer Infektion. *Bartonella* spp. haben ein Repertoire an unterschiedlichen Pathogenitätsfaktoren die Adhärenz vermitteln bzw. in der Herstellung des Zellkontaktes beteiligt sind [50].

Vertreter der Linie L1, L2 und L3 der *Eubartonellea* weisen Flagellen auf, die nicht nur zur Fortbewegung dienen, sondern auch als wichtiger Virulenzfaktor bei der Bindung an Wirtszellen beteiligt sind. Versuche, bei denen die Flagellum-Expression experimentell unterbunden wurde, zeigten eine Abnahme in der Bindung an Erythrozyten sowie beim Eindringen in Erythrozyten [51,52]. *Bartonella* spp. aus der Abstammungslinie L4 besitzen ein weiteres T4SS (ein sog. Trw System), welches sich evolutionär entwickelt hat, um Flagellen zu ersetzen [50]. Hierbei ist die Expression einer der beiden Faktoren jeweils exklusiv, sodass sich *Bartonellen* phylogenetisch in Flagellum- oder Trw-exprimierende Spezies einteilen lassen [53]. Beim Trw-System handelt es sich um einen Multiproteinkomplex mit einer Pilus-Struktur [54], der einen Schlüsselfaktor für die wirtsspezifische Adhärenz an Erythrozyten darstellt und damit die Wirtsspezifität determiniert. Das *trw* Operon besteht aus mehreren Genen (z. B. *trwJ*, *trwL*), welche für die Pilus-Strukturen kodieren und die die Länge der Pili definieren (*trwH*, *trwI*). Unterschiedliche Duplikationen bestimmter *trw*-Gene resultierten in einer hohen Variabilität der Außenmembranregionen des Trw-Systems zwischen einzelnen *Bartonella* Spezies [55,56]. Versuche mit *B. birtlesii* zeigten, dass die Trw-Proteine TrwJ1 und TrwJ2 von *B. birtlesii* mit dem Bande-3-Protein von Erythrozyten interagieren und das TrwL auch an der Bindung der Zelloberfläche von Erythrozyten beteiligt sein könnte [54].

Weitere Faktoren, die die Wirtsspezifität von *Bartonella* definieren könnten, sind momentan unbekannt. Hinweise, dass es weitere Determinanten geben muss, liefern Spezies wie *B. bacilliformis*, die kein Trw-System besitzen, aber auch eine Wirtsspezifität (Menschen) aufweisen. Es gibt Hinweise auf Proteine der Erythrozyten-Membran, die mit *B. bacilliformis* interagieren können, wie z. B. Bande-3-Protein, α - und β -Spektrin und Glykophorin-A und -B [57]. Dabei könnte es sich vor allem bei Glykophorin-B um eine Determinante für die Wirtsspezifität für *B. bacilliformis* handeln, da sich dieses Membranprotein nur in Primaten entwickelt hat [58]. All diese Membranproteine spielen ebenfalls eine Rolle im Infektionsverlauf mit *Plasmodium falciparum*, einem Erythrozyten-Parasit und Erreger der Malaria [59,60].

1.4.3.2. Deformation von Erythrozyten

Der zweite Schritt in der Infektion von Erythrozyten ist die Deformation der Zelloberfläche (siehe Kapitel 1.5.2.1) und Schaffung eines Eintrittspunktes für die Bakterien. Erythrozyten sind nach vollendeter Reifung nicht phagozytotisch und weisen nur ein begrenztes Potenzial zur Endozytose auf. Um in Erythrozyten zu invadieren, müssen sich *Bartonella* spp. durch einen aktiven Prozess Eintritt verschaffen [61]. Mit *B. bacilliformis* oder *B. henselae* infizierte Erythrozyten weisen tiefe Invaginationen und Furchen auf, in denen sich häufig adhärenente Bakterien befinden. Es wird angenommen, dass die Bakterien die Invaginationen als Eintrittspunkt für die Invasion nutzen. Allerdings wurde bislang kein Mechanismus oder Virulenzfaktor identifiziert, der eine *Bartonella* induzierte Erythrozyten-Deformation erklären würde. Eine mögliche Erklärung könnten trimere Autotransporter-Adhäsine (TAAs) wie BadA aus *B. henselae* liefern. BadA ist ein ca. 240 nm langes TAA an der Zelloberfläche, das maßgeblich in der Adhärenz an Endothelzellen beteiligt ist und von dem im Genom von *B. bacilliformis* drei Homologe vorhanden sind [62]. Bei *B. bacilliformis* könnten TAAs an der Bindung der Erythrozytenmembran beteiligt sein und die verformbare Zelloberfläche so „verkleben“, dass es zu den zuvor beschriebenen Deformationen kommt.

1.4.3.3. Erythrozyten-Invasion

Infektionsexperimente im *B. tribocorum* Ratteninfektionsmodell zeigten, dass nach Adhäsion an Wirtserythrozyten die Bakterien innerhalb von 48 Stunden in die Erythrozyten eindringen [63]. Der zugrundeliegende Mechanismus ist bislang kaum verstanden, jedoch wurden einige Faktoren, die in diesem Prozess eine Rolle spielen identifiziert: Die *invasion-associated locus* Proteine-A und -B (IalA und IalB) fungieren als wichtige Pathogenitätsfaktoren für die Invasion von Erythrozyten. IalA ist eine Nukleosidpolyphosphat-Hydrolase mit einer bislang nicht genau identifizierten Rolle im Invasionsprozess. Es wird aber angenommen, dass IalA den Stress-induzierten Dinukleotid-Spiegel in den Bakterien während der Invasion reduziert [64]. IalB ist ein hochkonserviertes Membranprotein in Bartonellen, das durch einen bislang nicht aufgeklärten Mechanismus den Bakterien die Fähigkeit verleiht, in Erythrozyten einzudringen [65,66].

Mögliche Rezeptoren auf der Erythrozytenmembran, die im Invasionsprozess involviert sind, könnten die Membranproteine Bande-3-Protein und Glykophorin-B darstellen, die ebenfalls als Interaktionspartner im Prozess der bakteriellen Adhärenz agieren [3]. Bande-3-Protein ist Bestandteil eines Komplexes, der die Erythrozytenmembran mit dem Spektrin-Aktin Netzwerk verknüpft und für die Aufrechterhaltung der Form und Stabilität von Erythrozyten notwendig ist [67,68]. Wie für *Plasmodium* bekannt, könnte eine lokale Destabilisierung dieses Netzwerks die Oberflächenintegrität schwächen und einen Erregereintritt in die Zelle ermöglichen [69,70]. Für *B. bacilliformis* wird darüber hinaus diskutiert, ob Flagellen durch ihre mechanische Krafteinwirkung ebenfalls eine aktive Rolle in der Invasion spielen [71].

1.4.3.4. Intrazelluläre Persistenz

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass *B. bacilliformis* nach erfolgreicher Erythrozyten-Invasion intrazellulär in einer Vakuole vorliegt [52]. Die Vakuolen entstehen vermutlich während des Invasionsprozesses durch die Abknospung der Invaginationen in der Erythrozytenmembran. Daneben wurden auch freie *B. bacilliformis* Zellen im Lumen infizierter Erythrozyten beobachtet, was vermuten lässt, dass die Bakterien sich aus den Vakuolen befreien können. Im Gegensatz zu *B. bacilliformis* wurden keine freien Bakterien im *B. tribocorum* Ratten-Infektionsmodell beobachtet. *B. tribocorum* repliziert sich innerhalb membrangebundener Vakuolen in bis zu acht „Tochterzellen“, die ihre verbleibende Lebensspanne im Wirt innerhalb der Erythrozyten persistieren [48]. Auch die Anzahl intrazellulärer Bakterien pro Blutkörperchen variiert von Spezies zu Spezies mit bspw. fünf Zellen für *B. quintana*, vier Zellen für *B. bacilliformis* und einer Zelle für *B. henselae* [72–74].

Interessanterweise infizieren *Bartonella* spp. der Linie L4 Wirtserythrozyten mit einer geringen Infektionsrate. *B. quintana* und *B. tribocorum* infizieren circa 1% aller Wirtserythrozyten [48,74] und *B. henselae* bis zu 5% [72,75]. Im Gegensatz dazu weisen *Bartonella* spp. der Linien L1-L3 deutlich höhere Infektionsraten auf. *B. bacilliformis* infiziert durchschnittlich 60% der Wirtserythrozyten des Menschen, jedoch wurden auch Fälle mit Infektionsraten von bis zu 100% beschrieben [22]. Solche Infektionsraten resultieren in einer schweren hämolytischen Anämie mit verheerenden, oftmals tödlichen Folgen für die Patienten. Die Gründe für die hohe Letalität sind noch nicht vollständig geklärt. Zum einen könnten Hämolysine die direkte Lyse der Erythrozyten bewirken [76], zum anderen gibt es auch Hinweise darauf, dass Wirtsreaktionen (wie z. B. die sog. „Hämophagozytose“ von deformierten Erythrozyten in Leber und Milz) eine wesentliche Rolle an der Depletion von Erythrozyten haben [77]. Infektionsexperimente mit Erythrozyten zeigten zwar, dass *B. bacilliformis* eine kontakt-abhängige Hämolyse aufweist [76] aber bislang konnte kein Hämolysin-Gen identifiziert werden.

1.4.4. Infektion von kernhaltigen Wirtszellen

Neben Erythrozyten können *Bartonella* spp. auch eine Vielzahl an kernhaltigen Zellen befallen. Klinische Manifestationen solcher Infektionen sind beispielsweise Endokarditis (Infektion von kardialen Endothelzellen durch *B. quintana*) oder vaskuloproliferative Erkrankungen (*Verruga peruana* durch die Infektion von Gefäßendothelzellen mit *B. bacilliformis*) [13,21]. *In vitro* können *Bartonella* spp. darüber hinaus viele andere Zellen, wie Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) [78], Epithelzellen (HEp-2) [79], Fibroblasten [78] oder Immunzellen (Monozyten und Makrophagen) [80,81] infizieren. Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass die *in vivo* Präferenz für die Infektion von Endothelzellen eher auf dem Verbreitungsweg (Blutbahn) als auf einem Zelltropismus beruhen könnte [78]. All diese Zelltypen können jedoch auch sekundäre

Zielzellen für weitere Infektionen darstellen, die durch ein Zusammenspiel verschiedener Pathogenitätsfaktoren wie z. B. durch TAAs und T4SS erfolgreich infiziert werden können.

1.4.4.1. Infektion von Endothelzellen

Elektronenmikroskopisch wurde belegt, dass *B. bacilliformis* schon eine Stunde nach Infektion in Endothelzellen eindringt und nach zwölf Stunden große vakuolenartige Inklusionen bildet [82]. *B. bacilliformis* stimuliert sein Eindringen in Endothelzellen durch Aktivierung von Rho, Rac und Cdc42 GTPasen der Rho-Familie, was zu morphologischen Veränderungen der infizierten Endothelzellen führt [83–85]. Diese kleinen GTP-bindenden Proteine sind wichtige Regulatoren für die Organisation des Aktinzytoskeletts und ihre Aktivierung führt zur Bildung von Filopodien und Lamellopodien, die das Eindringen der Bakterien in die Wirtszellen vermitteln [83].

Klinisch resultiert eine Infektion mit *B. bacilliformis* oftmals in der Ausprägung der *Verruga peruana*, die durch kutane vaskuläre Eruptionen, ähnlich zur bazillären Angiomatose, gekennzeichnet ist. Von allen humanpathogenen Bakterien ist nur das Genus der *Bartonella* in der Lage, angioproliferative Krankheitsbilder auszulösen [62]. Die vaskuläre Endothelproliferation, die durch *Bartonella*-Infektionen hervorgerufen wird, ist noch nicht vollständig verstanden, und wurde am besten bei *B. henselae* untersucht. Die allgemeine Strategie von *B. henselae* zur Etablierung einer pathologischen Angiogenese besteht aus einer direkten und indirekten Stimulierung der Endothelzellenproliferation und aus der Hemmung der Apoptose aller am Prozess der Angiogenese beteiligter Wirtszellen [81,86]. Dabei erfolgt die Stimulierung der Endothelzellenproliferation und Angiogenese mechanistisch über die Aktivierung angiogener Faktoren (Hypoxie-induzierbarer-Faktor [HIF]-1) und durch die nachfolgende Sekretion angiogenetisch wirksamer Zytokine (z. B. vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, VEGF). Die Induktion der VEGF-Produktion kann einerseits direkt in Endothelzellen, aber in wesentlich stärkerem Umfang auch in anderen infizierten Wirtszellen wie Makrophagen erfolgen und maßgeblich zur Stimulierung der Proliferation von Endothelzellen im Sinne eines parakrinen *loops* beitragen [87,88]. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurden in *B. henselae* und *B. quintana* Autotransporter-Proteine (BafA) mit mitogenen Eigenschaften identifiziert, die ebenfalls die Angiogenese von Endothelzellen fördern. BafA wirkt als VEGF-Analog und kann mit dem VEGF Rezeptor-2 (VEGFR2) interagieren, wodurch die nachgeschalteten Signalwege aktiviert werden [89]. Die Hemmung der Apoptose erfolgt auf zellulärer Seite durch die Aktivierung von NF- κ B und Induktion der Apoptose Inhibitor-Proteine cIAP-1 und -2 und ermöglicht den infizierten Zellen durch ein verlängertes Überleben kontinuierlich VEGF zu produzieren. Darüber hinaus vermittelt BepA, ein Effektorprotein des T4SS die endotheliale Apoptoseinhibition und dürfte darüber indirekt zur Gefäßproliferation beitragen, indem es das Überleben der Zellen fördert. [86].

Für *B. bacilliformis* liegen nur wenige Informationen für den Prozess Endothelzellproliferation und Angiogenese vor. Bei *B. bacilliformis* wurde kürzlich ein BafA Homolog identifiziert, das wie bei *B. henselae* die VEGFR2-Signaltransduktion stimulieren kann und bei dem spekuliert wird, dass es im Prozess der Internalisierung in Endothelzellen eine Rolle spielt [90]. Des Weiteren ist bekannt, dass *B. bacilliformis* die Freisetzung des Gewebespezifischen-Plasminogenaktivator (t-PA) aus Endothelzellen aktiviert, ein Faktor der in angiogenen Prozessen beteiligt ist [82]. Auch führt eine *B. bacilliformis* Infektion zu einer starken Induktion von Angiopoietin-2 in Endothelzellen [91]. Übereinstimmend wurden durch *in situ* Hybridisierungen klinischer *Verruga peruana* Proben hohe Expressionsniveaus von Angiopoietin-2 und VEGFR im Endothel nachgewiesen [91]. Ein weiterer wichtiger bakterieller proangiogenetischer Faktor scheint das Chaperon GroEL zu sein, da dieses für Endothelzellen mitogen wirkt, der genaue Mechanismus ist gegenwärtig nicht geklärt [92].

1.5. Pathogenität von *B. bacilliformis*

Die exakten Mechanismen, die in den Teilprozessen der Infektionsstrategie von Bartonellen involviert sind, sind bislang nicht im Detail verstanden. Im Folgenden wird der aktuelle Wissensstand der bislang bestätigten und vermuteten Pathogenitätsfaktoren von *B. bacilliformis* zusammengetragen.

1.5.1. Bestätigte Pathogenitätsfaktoren

1.5.1.1. Adhäsine (BbadA-C)

Trimäre Autotransporter-Adhäsine (TAA) kommen in vielen Gram-negativen Bakterien vor und spielen eine essenzielle Rolle in der Infektionsstrategie verschiedener Erreger wie z. B. *Yersinia* Adhäsine-A (YadA) aus *Y. enterocolitica* [93] oder *Neisseria* Adhäsine-A (NadA) aus *N. meningitidis* [94]. TAAs sind in den Genomen von allen *Bartonella* spp. zu finden und das am besten charakterisierte TAA ist das *Bartonella* Adhäsine-A (BadA) aus *B. henselae* [95,96].

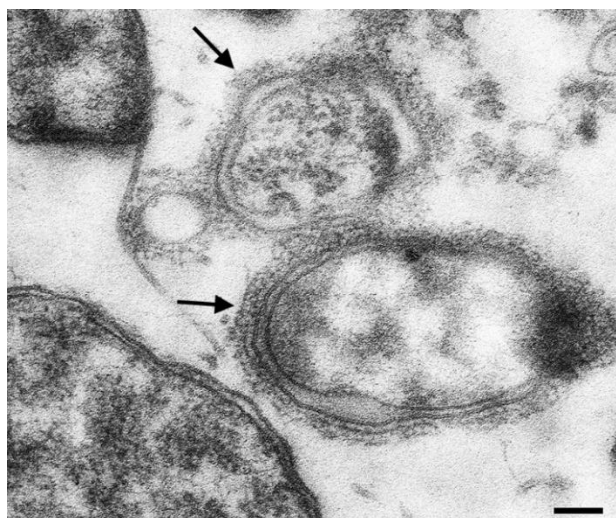


Abbildung 5: *B. bacilliformis* Adhäsine-A (BbadA) auf der Zelloberfläche von *B. bacilliformis*. Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt die vermutete BbadA-Expression (Pfeile) auf der bakteriellen Oberfläche. Maßstab: 100 nm. Entnommen aus [16].

BadA ist ein ca. 240 nm langes immundominantes TAA, das während der Infektion unterschiedliche Funktionen wie Autoaggregation, Adhärenz an Wirtszellen und Matrixproteinen, Inhibierung von Phagozytose und pro-angiogene Reprogrammierung von Wirtszellen vermittelt [97]. Im Genom von *B. bacilliformis* konnten drei Homologe zu *badA* identifiziert werden [62], die hier als BbadA-C bezeichnet werden (NCBI Zugangsnummern WP_005766217.1, WP_005766221.1, WP_005767360.1) und auf der Oberfläche von *B. bacilliformis* sichtbar sind (Abbildung 5). Bioinformatische Analysen lassen anhand der abgeleiteten TAA-Sequenz eine Domänenstruktur ähnlich zu anderen TAAs aus dem Genus *Bartonella* vermuten. Die genaue Rolle der *B. bacilliformis* TAAs im Infektionsprozess ist Gegenstand aktueller Forschung und bislang nicht aufgeklärt.

1.5.1.2. Flagellin

B. bacilliformis exprimiert typischerweise 2 - 16 unipolare Flagellen (Abbildung 6), durch die die Zellen ihre Motilität erlangen. Flagellen bestehen im Grunde aus einem Motorkomplex und einem 3-10 μm langen Filament, das aus den 42 kDa großen Flagellin-Untereinheiten aufgebaut ist (NCBI Zugangsnummer WP_011807398) [3]. Die Adhärenz von Bakterien an Erythrozyten korreliert mit der Motilität der Bakterien. Es ist jedoch nicht bekannt, ob Flagellen direkt an der Erythrozyten-Adhäsion beteiligt sind oder ob die bakterielle Motilität die Wahrscheinlichkeit erhöht, auf Erythrozyten zu treffen. Mutanten, denen die Expression von Flagellin fehlt oder bei denen die Flagellen durch anti-Flagellin Antikörper gebunden werden, zeigen eine verringerte Adhärenz an Erythrozyten [52] sowie eine Reduktion in der Anzahl an intraerythrozytären Bakterien [51,98].

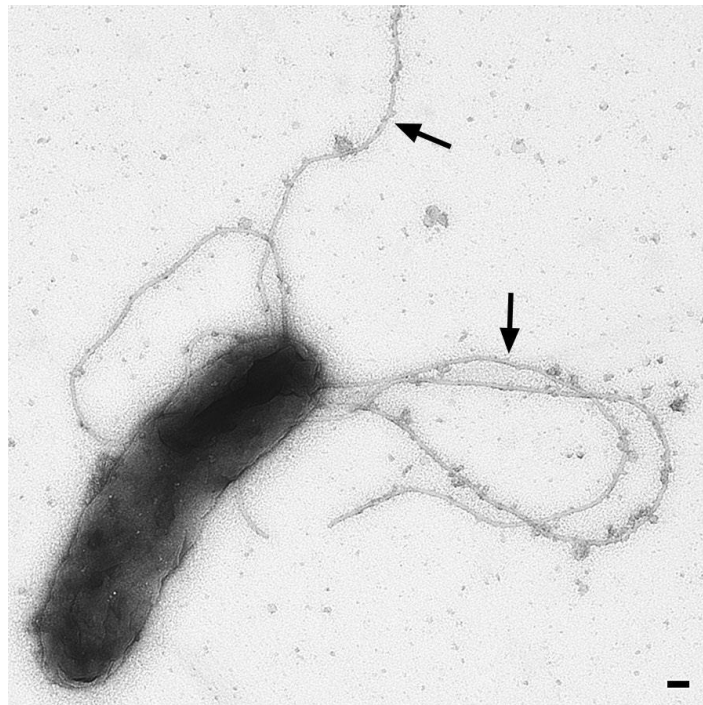


Abbildung 6: Flagellen von *B. bacilliformis*. Die elektronenmikroskopische Aufnahme von *B. bacilliformis* KC584 (ATCC 35686) zeigt vier unipolare Flagellen (Pfeile). Maßstab: 100 nm. Entnommen aus [16].

Im Gegensatz zu anderen flagellierten Bakterien (z. B. *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Legionella pneumophila*) wird das Flagellin von *B. bacilliformis* aufgrund eines Aminosäureaustauschs in der N-terminalen D1-Domäne nicht vom Toll-like Rezeptor-5 (TLR5) erkannt, wodurch eine NF- κ B-gesteuerte inflammatorische Wirtszellaktivierung vermieden wird [99].

1.5.1.3. GroEL

GroEL Hitzeschockproteine sind eine Gruppe von konservierten und weit verbreiteten Chaperonen, die in fast allen Prokaryoten zu finden sind. GroEL vermittelt Proteinfaltung und spielt eine essenzielle Rolle in der Bewältigung von Stressbedingungen wie hohe Temperaturen oder Nährstoffmangel [100]. Die Gensequenz von *groEL* wird darüber hinaus als Marker für phylogenetische Verwandtschaftsanalysen des Genus *Bartonella* herangezogen [101]. In *B. bacilliformis* ist GroEL (NCBI Zugangsnummer WP_005767840.1) in der inneren und äußeren Bakterienmembran lokalisiert [92] und ein immundominantes Protein beim Menschen [30]. Durch *in vitro* Experimente wurde belegt, dass GroEL auch sekretiert wird und an der Ausbildung eines angiogenen Phänotyps in Endothelzellen beteiligt ist [92]. Darüber hinaus wurden für GroEL mitogene sowie anti-apoptotische Eigenschaften nachgewiesen, was eine Rolle in der Regulation des Wachstums von Endothelzellen vermuten lässt. Das *groESL*-Operon wird als Antwort auf thermalen Stress hochreguliert und führt zu einer vierfachen Induktion der *groEL*-Expression bei einem Temperaturwechsel von 30°C auf 37°C, was der Temperaturverschiebung bei der Übertragung von der Sandmücke auf den Menschen entspricht [102].

1.5.1.4. Hämin-bindende Proteine (Hbp)

Das Genom von *B. bacilliformis* kodiert für drei Hämin-bindende Proteine (*hbp*-Gene) [103], die homolog zu Pap31 von *B. henselae* sind [104] (NCBI-Zugangsnummer ABA60112.1, KZN22406.1, KZM38396.1, EKS45023.1, ABM44681.1). Pap31 aus *B. henselae* weist allerdings auch Eigenschaften von Adhäsinen auf und kann neben Hämin auch das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin binden [105]. Für *B. bacilliformis* liegen bislang keine funktionellen Daten zu den Hbps vor, jedoch deuten serologische Experimente darauf hin, dass diese Proteine eine Reaktivität mit unklarer Spezifität gegenüber IgM- und IgG-Antikörper aus Patientenseren haben. Pap31 aus *B. bacilliformis* scheint ein immundominantes Protein zu sein [103] und wurde daher als Kandidat für mögliche Impfstoffentwicklungsstrategien vorgeschlagen [106]. In Übereinstimmung damit wiesen Nachtaffen (*Aotus nancymae*) nach einer Infektion mit *B. bacilliformis* einen vierfachen Anstieg des anti-Pap31 (anti-Hbp) IgM-Levels auf [107].

1.5.1.5. *Invasion-associated locus* Proteine-A und -B

Die *invasion-associated locus* Proteine-A und -B (IalA, IalB; NCBI Zugangsnummern P35640.1 und P35641.1) spielen eine wichtige Rolle bei der Invasion von Erythrozyten. Funktionelle Analysen zeigen, dass die heterologe Expression dieser Gene (*ialA* und *ialB*) in *E. coli* zu einer starken Zunahme in der Invasion in menschliche Erythrozyten führt [65]. Homologe Proteine wurden auch in anderen invasiven Bakterien gefunden wie z. B. Ail aus *Yersinia enterocolitica*, das die Invasion in Epithelzellen vermittelt [108]. Die genaue biologische Funktion des 20 kDa großen IalA, das wohl eine (Di)Nukleosidpolyphosphatase darstellt, ist nicht bestätigt aber es wird angenommen, dass IalA den Gehalt an stressinduzierten Nukleotiden und deren Derivaten während der Invasion reguliert. Die Carboxy-terminale Protease (CtpA), die stromaufwärts des IalA-Gens kodiert wird, könnte fehlgefaltete Proteine abbauen, die unter Stressbedingungen entstanden sind [109,110].

Das *ialB*-Gen, das für ein 19 kDa großes Membranprotein kodiert, ist bei anderen humanpathogenen *Bartonella* spp. hoch konserviert und *ialB*-defiziente *B. bacilliformis* Mutanten zeigen eine verminderte Invasion in menschliche Erythrozyten *in vitro* [111]. Weitere Versuche in anderen *Bartonella* spp. zeigten, dass die Deletion von *ialB* in *B. birtlesii* und *B. tribocorum* *in vivo* ebenfalls in einer signifikanten Reduktion der Erythrozyteninvasion resultiert. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Invasion von Maus-Erythrozyten durch *B. birtlesii* mittels polyklonale Anti-IalB-Antikörpern gehemmt werden kann [112]. Die stärkste Expression von *ialB* wurden bei 20°C und saurem pH-Wert festgestellt, die niedrigsten Werte bei 37°C und basischem pH-Wert. Dies deutet darauf hin, dass bei chronischen Infektionen (*Verruga peruana*) eine weitere Invasion von *B. bacilliformis* in Erythrozyten vermieden wird [113].

1.5.2. Nicht bestätigte Pathogenitätsfaktoren

1.5.2.1. Deformin

Eine Infektion mit *B. bacilliformis* führt zu morphologischen Veränderungen der Erythrozyten, die in tiefen Invaginationen resultieren (Abbildung 7). Es wurde diskutiert, dass die Deformation der Erythrozyten durch einen extrazellulären Faktor, der als Deformin bezeichnet wurde und möglicherweise von *B. bacilliformis* sezerniert wird, ausgelöst wird [98]. Dieser Effekt war auch nachweisbar, wenn Erythrozyten unbekanntem Verbindungen ausgesetzt wurden, die aus dem Kulturüberstand von *B. bacilliformis* filtriert wurden. Allerdings wurde die Existenz eines „Deformins“ bis heute nicht bestätigt. Ursprünglich wurde Deformin als 65 bzw. 130 kDa großes Protein beschrieben, das hitzeempfindlich ist, da die Erhitzung der Kulturüberstände eine Deformation der Erythrozyten verhinderte. Im Widerspruch dazu zeigten nachfolgende Arbeiten aber, dass es sich bei Deformin wohlmöglich um ein 1,4 kDa großes, wasser-lösliches, amphiphiles Molekül handelt, das sich im Kulturüberstand befindet und resistent gegen Hitze, einigen Proteasen und alpha-Amylasen ist [114]. Neuere Erkenntnisse lassen jedoch vermuten, dass es sich bei der Deformation um einen Prozess handelt, bei dem mehrere Proteine mit einer Größe von ca. 36 kDa

involviert sind, die entweder für die Sekretion des 1,4 kDa Deformin-Moleküls benötigt werden oder selbst Membran deformierende Eigenschaften aufweisen [115]. Bis heute gibt es keinen Konsens bezüglich des Gewichts des hypothetischen Moleküls. Darüber hinaus konnte für Deformin keine direkte Rolle in der Modifizierung von Phospholipiden nachgewiesen werden, wodurch eine biochemische Aktivität von Deformin mit Membrankomponenten der Erythrozytenmembran eher unwahrscheinlich ist [3].

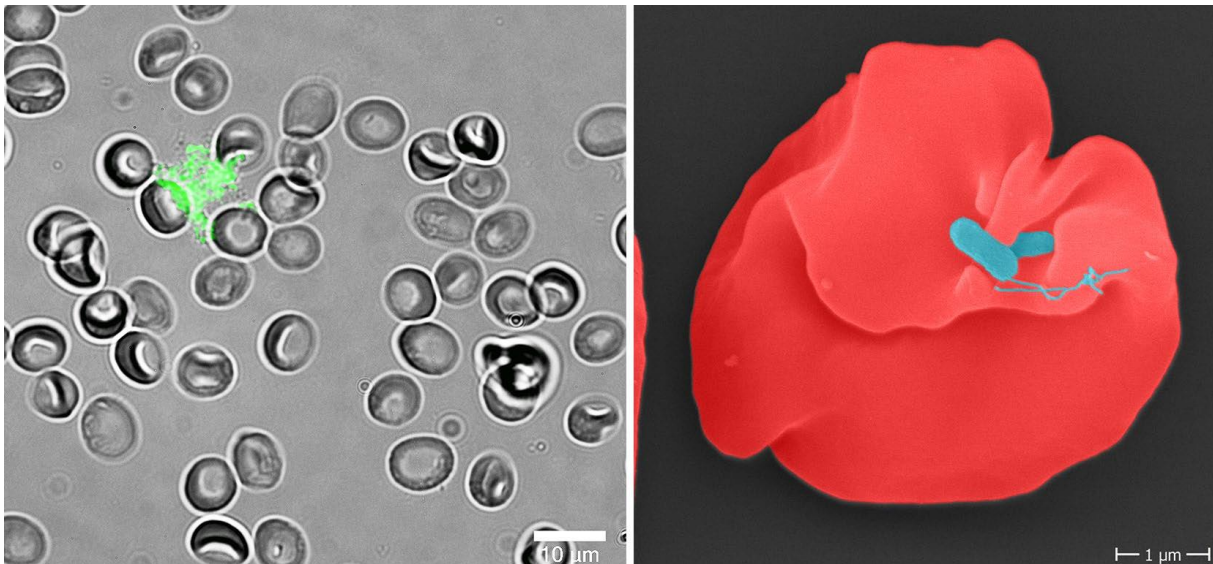


Abbildung 7: Infektion menschlicher Erythrozyten mit *B. bacilliformis*. **Links:** Fluoreszenzmikroskopie von Erythrozyten, die mit GFP-exprimierenden *B. bacilliformis* infiziert wurden (6 h nach Infektion). Maßstab: 10 µm. Einige Erythrozyten weisen Verformungen an der Zelloberfläche auf. **Rechts:** Rasterelektronenmikroskopie eines menschlichen Erythrozyten, mit adhärennten *B. bacilliformis* Zellen (24 h nach Infektion). Maßstab: 1 µm. Der Erythrozyt weist starke Deformationen in der Zelloberfläche auf, die auf *B. bacilliformis* zurückzuführen sind. Entnommen aus [16]

1.5.2.2. Hämolsine

Die akute Phase einer Infektion mit *B. bacilliformis* ist durch eine schwere hämolytische Anämie gekennzeichnet, die bei unbehandelten Patienten zur hohen Sterblichkeitsrate beiträgt [3]. Bislang konnte die Frage, ob *B. bacilliformis* Erythrozyten während der Infektion aktiv lysiert, nicht geklärt werden, jedoch zeigten erste *in vitro* Untersuchungen, dass die hämolytische Aktivität von *B. bacilliformis* kontaktabhängig ist und ein Protein involviert sein muss, dass die Fragilität von Erythrozyten erhöht. Allerdings scheiterten vorangegangene Arbeiten in der genauen Identifizierung eines Hämolsins [76]. In den Genomsequenzen von *B. bacilliformis* sind zwar die Hämolsine-A und -D unter verschiedene Zugangsnummern angegeben (NCBI Zugangsnummern KZN22078.1, KZM38023.1, EKS44973.1, KZN22169.1, KZN21496.1, KZM38155.1, KZM37455.1, ABM44735.1), allerdings sind diese nicht durch funktionelle Daten belegt. Widersprüchlich dazu sind Ergebnisse anderer Studien, in denen kein Verlust der Membranintegrität von infizierten Erythrozyten festgestellt wurde [52].

1.5.2.3. Nicht identifizierte äußere Membranproteine

In Untersuchungen zur Adhärenz von *B. bacilliformis* wurden äußere Membranproteine (OMPs) auf ihre Fähigkeit hin untersucht, direkt an Aktin binden zu können. Dabei wurden sechs Proteine mit molekularen Massen von 100, 92, 84, 46, 37 bzw. 12 kDa detektiert, die an Aktin binden [116]. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in ihrer Aussagekraft allerdings eingeschränkt, da die Bindungsversuche mit denaturierten Proteinen durchgeführt wurden und keine weiteren funktionellen Analysen erfolgten. Allerdings könnten diese und weitere unbekannte Proteine eine Rolle bei der bakteriellen Bindung an Bestandteile des Zytoskeletts der Erythrozyten (z. B. Spektrin, Bande-3-Protein und die Glykophorine-A und -B) spielen [57].

1.6. Bestätigte und vermutete Vektoren von *B. bacilliformis*

Der Lebenszyklus innerhalb der jeweiligen arthropodischen Vektoren ist für viele *Bartonella* spp. besser untersucht als für *B. bacilliformis*. Anhand verschiedener Vektor-Studien ist bekannt, dass *Bartonella* spp. im Mitteldarm von Arthropoden vorkommen und beispielsweise mit dem Kot auf die Haut der Wirte übertragen werden (z. B. *B. quintana*). Aufgrund von Erosion der Haut, bspw. durch die Blutmahlzeit der Arthropoden oder durch Kratzen, gelangen die Bakterien über die dermale Infektionsnische in ihren jeweiligen Wirt [117,118]. Im Falle von *B. bacilliformis* ist nicht bekannt, ob eine dermale Inokulation erfolgt, da Sandmücke der Gattung *Lutzomyia* die Bakterien direkt in den Blutstrom des Wirts übertragen könnten. Da es bisher kein praktikables Kleintierinfektionsmodell gibt, können die genauen Mechanismen, die der Pathobiologie dieses frühen Infektionsereignisses zugrunde liegen, nicht im Detail analysiert werden.

Sandmücken der Gattung *Lutzomyia* (Abbildung 8) gelten als einzige Überträger von *B. bacilliformis*. Der erste Nachweis für die Übertragung von *B. bacilliformis* erfolgte 1913 von Charles Townsend [119] und wurde 1929, durch Hideyo Noguchi, in Tierversuchen bestätigt. Noguchi analysierte, welche Insekten für die Übertragung der Krankheit verantwortlich sind, indem er Fledermausfliegen, Bettwanzen, Büffelmücken, Flöhen, Bremsen, Läuse, Milben, Mücken, Stechmücken, Schafszecken, Zecken und drei Arten von Sandmücken (*L. verrucarum*, *L. peruensis* und *L. noguchii*) an Rhesusaffen testete. Die einzigen Vektoren, die zu einer Infektionsübertragung auf Rhesusaffen führten, waren *L. verrucarum* und *L. noguchii* [120]. Darüber hinaus werden in der Literatur noch die folgenden *Lutzomyia*-Arten als Vektoren für *B. bacilliformis* vorgeschlagen: *L. ayacuchensis* [18], *L. columbiana* [121], *L. gomezi* [121], *L. maranonensis* [122], *L. panamensis* [121], *L. peruensis* [123], *L. pescei* [21], *L. robusta* [124] und *L. serrana* [18]. Das Vorhandensein von *B. bacilliformis*-DNA in diesen Insekten wurde jedoch nur für *L. verrucarum* [125], *L. peruensis* [126], *L. robusta* [127] und *L. maranonensis* [122] beschrieben.



Abbildung 8: Adulte Sandmücken der Spezies *Lutzomyia verrucarum*. Links: Männchen. Rechts: Weibchen nach Blutmahlzeit. Die Länge der Sandmücken beträgt jeweils zwischen 2 und 3 mm. Bild entnommen aus [16].

Es besteht eine eindeutige Korrelation zwischen der Verbreitung der Carrión-Krankheit und dem Vorhandensein der Vektoren in den endemischen Gebieten. Die häufigsten Sandmückenarten in Nord-, Süd- und Zentralperu sind *L. verrucarum* und *L. peruensis*. Diese Sandmückenarten sind in den südamerikanischen Bergtälern der Anden zwischen 1.100 und 3.200 m Höhe über dem Meeresspiegel vorherrschend [36,37]. Das epidemiologische Auftreten der Carrión-Krankheit in anderen Gebieten lässt jedoch die Existenz weiterer Vektoren vermuten.

1.7. *B. bacilliformis* Tierinfektionsmodelle

Tier-Infektionsmodelle sind entscheidend für das Verständnis der bakteriellen Infektionsbiologie. Viele *Bartonella* spp. haben verschiedene spezifische Tierreservoirs (z. B. Katzen, Rehe, Füchse, Nagetiere, Rinder) [35]. Für *B. bacilliformis* wurden in der Vergangenheit mehrere tierische und pflanzliche Reservoir-Kandidaten diskutiert, jedoch bleibt der Mensch der bislang einzig bekannte Reservoir-Wirt. Neben dem Menschen sind nur Primaten wie Rhesusaffen [128], Nachtaffen [107], Schimpansen und Orang-Utans [129] anfällig für Infektionen mit *B. bacilliformis*, wobei sich Ausprägung des Krankheitsverlaufs vom Menschen unterscheidet. Aus Tierversuchen in den 1920er Jahren ist bekannt, dass *B. bacilliformis* ein langanhaltendes, unregelmäßig wiederkehrendes Fieber in Rhesusaffen auslösen kann. Der Erreger persistierte intraerythrozytär über einen langen Zeitraum (58 Tage) im peripheren Blut der Versuchstiere [128]. Der klinische Verlauf einer *B. bacilliformis* Infektion konnte, ähnlich zu menschlichen Fällen des Oroya-Fiebers, reproduziert werden, jedoch zeigten alle getesteten Affen eine schwächer ausgeprägte Anämie verglichen zum Menschen. Die infizierten Rhesusaffen entwickelten je nach Individuum unterschiedliche Krankheitsbilder, die von milden bis schweren Symptomen reichten [128]. Darüber hinaus verursachten passagierete *B. bacilliformis* Isolate, die zuvor aus erkrankten Affen isoliert wurden, bei einer erneuten Injektion in Affen meist schwerere Krankheitsverläufe. Die Auslösung von *Verruga peruana*-ähnlichen Läsionen wurde ebenfalls beobachtet. Nach einem Zeitraum von zwei bis fünf Monaten trat eine vollständige

Rekonvaleszenz der infizierten Tiere ein [130]. Die Variation des Infektionsverlaufs deutet darauf hin, dass die Schwere der Symptome der Carrión-Krankheit in erster Linie auf die Virulenz des jeweiligen *B. bacilliformis*-Stammes zurückzuführen ist und in zweiter Linie von der individuellen Veranlagung und Anfälligkeit des Wirtes abhängt [27].

2. Zielsetzung

In der Erforschung der vernachlässigten Tropenerkrankung „Carrión´sche Krankheit“ besteht ein erheblicher Wissensmangel zu zahlreichen Aspekten (z. B. Epidemiologie, Diagnostik, Infektionsbiologie, Therapie), der die Entwicklung von potenziellen Diagnostika, Therapeutika oder Vakzinen verhindert. Auch wenn frühere Studien zum Ziel hatten, serodiagnostische Verfahren zu entwickeln, ist bislang weder ein validierter serologischer Test, [30] noch ein Impfstoff verfügbar [106]. Die Infektion und Hämolyse von Wirts-Erythrozyten sind wahrscheinlich die wichtigsten Schritte in der Pathogenese der Carrión-Krankheit und verantwortlich für die hohe Sterblichkeitsrate beim Menschen. Mechanistische Kenntnis dieser Prozesse sind entscheidend für die Entwicklung therapeutischer Arzneimittel, allerdings sind beteiligte Pathogenitätsfaktoren wie z. B. Hämolyse unbekannt.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte ein serologischer Test zum Nachweis von anti-*B. bacilliformis*-Antikörpern entwickelt werden. Hierzu sollten unter Zuhilfenahme von reverser Vakzinologie und Expressionsbibliotheken geeignete Proteine identifiziert und heterolog produziert werden, um diese in einem Lineblot und einem enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA), unter Einsatz von Patientenseren, auf ihre Tauglichkeit als Serodiagnostikum zu untersuchen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten die an der Hämolyse involvierten Pathogenitätsfaktoren von *B. bacilliformis* identifiziert und funktionell analysiert werden. Hierzu sollte eine markerlose Deletionsstrategie etabliert werden, um die unter Einsatz von Transposon-Bibliotheken identifizierten Gene zu deletieren und nachfolgend zu komplementieren. Die entsprechenden Mutanten sollten *in vitro* funktionell in Bezug auf Hämolyse untersucht werden, dazu sollten entsprechende Hämolyse-Modelle etabliert werden.

Die erzielten Ergebnisse sollten einerseits eine verbesserte Serodiagnostik bei *B. bacilliformis* erlauben und andererseits zur Aufklärung der an der Hämolyse beteiligten Faktoren von *B. bacilliformis* beitragen, um später möglicherweise neue therapeutische Ansatzpunkte durch Inhibition der Hämolyse sog. „anti-Virulenz-Strategien“ finden zu können.

3. Material und Methoden

3.1. Mikroorganismen

Die verwendeten Mikroorganismen und die zugehörigen Genotypen sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Mikroorganismen.

Organismus	Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Bartonella bacilliformis</i>	KC583	Wildtyp	ATCC® 35685™, Mansassas, VA, USA
<i>B. bacilliformis</i>	KC584	Wildtyp	ATCC® 35686™, Mansassas, VA, USA
<i>B. bacilliformis</i>	KC583	<i>porA</i> ::Tn5 Kan ^R	diese Arbeit
<i>B. bacilliformis</i>	KC583	<i>hyd</i> ::Tn5 Kan ^R	diese Arbeit
<i>B. bacilliformis</i>	KC583	<i>porA</i> ::Tn5 Kan ^R	diese Arbeit
<i>B. bacilliformis</i>	KC583	<i>porA</i> ::Tn5 Kan ^R	diese Arbeit
<i>B. bacilliformis</i>	KC583	<i>hyd</i> ::Tn5 Kan ^R	diese Arbeit
<i>B. bacilliformis</i>	KC584	<i>porA</i> ::Tn5 Kan ^R	diese Arbeit
<i>B. bacilliformis</i>	KC583	$\Delta porA$	diese Arbeit
<i>B. bacilliformis</i>	KC583	$\Delta porA$ / pBBR1MCS-2- <i>porA</i> Kan ^R	diese Arbeit
<i>B. bacilliformis</i>	KC583	Δhyd	diese Arbeit
<i>B. bacilliformis</i>	KC583	Δhyd / pBBR1MCS-2- <i>hyd</i> Kan ^R	diese Arbeit
<i>B. bacilliformis</i>	KC583	$\Delta porA \Delta hyd$	diese Arbeit
<i>B. bacilliformis</i>	KC583	$\Delta porA \Delta hyd$ / pBBR1MCS-2- <i>porA</i> Kan ^R	diese Arbeit
<i>B. bacilliformis</i>	KC583	$\Delta porA \Delta hyd$ / pBBR1MCS-2- <i>hyd</i> Kan ^R	diese Arbeit
<i>B. bacilliformis</i>	KC583	$\Delta porA \Delta hyd$ / pBBR1MCS-2- <i>porA-hyd</i> Kan ^R	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i>	NEB 5-alpha	<i>fhuA2 a(argF-lacZ)U169 phoA glnV44</i> <i>a80a(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1</i> <i>thi-1 hsdR17</i>	NEB, Ipswich, MA, USA
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm]</i> <i>$\Delta hsdS \lambda$ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B</i> <i>int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>	NEB, Ipswich, MA, USA
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a genomische <i>B. bacilliformis</i> Expressionsbibliothek, Kan ^R	diese Arbeit
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28b genomische <i>B. bacilliformis</i> Expressionsbibliothek, Kan ^R	diese Arbeit

Weiterführung Tabelle 1

<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28c genomische <i>B. bacilliformis</i> Expressionsbibliothek, Kan ^R	diese Arbeit
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a- <i>AprI/Inh</i> Kan ^R	diese Arbeit / [131]
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a- <i>bbadC</i> Kan ^R	diese Arbeit / [131]
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a-hypothetisches-Protein-A Kan ^R	diese Arbeit / [131]
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a- <i>porA</i> Kan ^R	diese Arbeit
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a-TonB-abhängiger-Rezeptor Kan ^R	diese Arbeit / [131]
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a- <i>lptD</i> Kan ^R	diese Arbeit / [131]
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a-Autotransporter-A Kan ^R	diese Arbeit / [131]
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a- <i>lysM</i> Kan ^R	diese Arbeit / [131]
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a-DUF1561 Kan ^R	diese Arbeit / [131]
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a- <i>bbadA</i> Kan ^R	diese Arbeit
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a-Flagellin Kan ^R	diese Arbeit
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a-Autotransporter-B Kan ^R	diese Arbeit / [131]
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a- <i>flgE</i> Kan ^R	diese Arbeit / [131]
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a- hypothetisches-Protein-B Kan ^R	diese Arbeit / [131]
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a-Autotransporter-C Kan ^R	diese Arbeit / [131]
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a-Autotransporter-D Kan ^R	diese Arbeit / [131]
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a-FlgH Kan ^R	diese Arbeit / [131]
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a- <i>porB</i> Kan ^R	diese Arbeit / [131]
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a- <i>pap31</i> Kan ^R	diese Arbeit / [131]
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a- <i>porC</i> Kan ^R	diese Arbeit / [131]
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a-Autotransporter-E Kan ^R	diese Arbeit / [131]
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3)	pET28a- <i>bbadB</i> Kan ^R	diese Arbeit

3.2. Eukaryotische Zellen

Die für diese Arbeit verwendeten humanen und murinen Zellen sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete eukaryotische Zelllinien.

Zellen	Zelltyp	Referenz
HeLa-229	immortalisierte Zelllinie, humane zervikale Epithelzellen eines Zervixkarzinoms	ATCC® CCL-2.1
humane Erythrozyten	primäre Zellen	Blutspender: Alexander Dichter
murine Erythrozyten	primäre Zellen	C57BL/6-Maus, Blutentnahme aus Schwanzvene

3.3. Vektoren und Plasmide

In Tabelle 3 sind die verwendeten Klonierungsvektoren und rekombinanten Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Plasmide.

Plasmide	Eigenschaften	Referenz
pBBR1MCS-2 (#85168)	Leerer Vektor, oriV, Kan ^R	Addgene, Watertown, MA, USA
pET28a, pET28b pET28c	T7 Promoter, N-term. T7 tag, lacI, Kan ^R	Merck, Darmstadt, Deutschland
pBIISK_sacB/kanR	sacB, Kan ^R	[132]

3.4. Oligonukleotide

Die Sequenzen und Funktionen der verwendeten Starteroligonukleotide sind in Tabelle 4 in 5'-3'-Richtung aufgeführt. Die komplementären Basen sind fett geschrieben und die BamHI Schnittstellen sind unterstrichen. Die Synthese der Starteroligonukleotide erfolgte durch Metabion (Steinkirchen, Deutschland).

Tabelle 4: Verwendete Starteroligonukleotide für die Erstellung und Sequenzierung rekombinanter Plasmide sowie genomischer Deletionen.

Starteroligonukleotide für die Erzeugung und Verifizierung von pET28a Expressionsplasmide		
Bezeichnung	Sequenz	Funktion
pet28a_fwd	TTCGGATCCGCGACCC	Linearisierung von pET28a
pet28a_rev	TTCGAGCTCCGTCGAC	Linearisierung von pET28a
RV1_fwd	GGTGGACAGCAAATGGGTTCGCGGATCCG AAACATGCTCAAAAATTTTCATC	Amplifizierung von BARBAKC583_00020 (<i>aprI/inh</i>) für die Insertion in pET28a.
RV1_rev	GCGGCCGCAAGCTTGTGCGACGGAGCTCGA ACTAACGGGTTAAAATAGCTG	
RV2_fwd	GGTGGACAGCAAATGGGTTCGCGGATCCG AAAAGGAAATTC AACCTCAGAGAG	Amplifizierung von BARBAKC583_00274 (<i>bbadC</i>) für die Insertion in pET28a.
RV2_rev	GCGGCCGCAAGCTTGTGCGACGGAGCTCGA ATTAATTCAGCGTAACTGACT	
RV3_fwd	GGTGGACAGCAAATGGGTTCGCGGATCCG AAAAACATATCTACAGTATTTTCATG	Amplifizierung von BARBAKC583_00298 (hypothetisches Protein-A) für die Insertion in pET28a.
RV3_rev	GCGGCCGCAAGCTTGTGCGACGGAGCTCGA ATTAATTTTTCGCGTTAAGAGAAAAAT	
RV4_fwd	GCGGCCGCAAGCTTGTGCGACGGAGCTCGA ATTA AAAATGAACGCTGAAGGC	Amplifizierung von BARBAKC583_00404 (<i>porA</i>) für die Insertion in pET28a.
RV4_rev	GGTGGACAGCAAATGGGTTCGCGGATCCG AAAATATTA AACCTTGCTTTTATGC	
RV5_fwd	GGTGGACAGCAAATGGGTTCGCGGATCCG AACAAAATAAAGTGAAAAATATC	Amplifizierung von BARBAKC583_00413 (TonB-abhängiger Rezeptor) (BARBAKC583_00020) für die Insertion in pET28a.
RV5_rev	GCGGCCGCAAGCTTGTGCGACGGAGCTCGA ACTAAAATTTTGTACGAATGAC	
RV6_fwd	GGTGGACAGCAAATGGGTTCGCGGATCCG AAAGTCAAAAAATAATTTTAAAAAAATT AA	Amplifizierung von BARBAKC583_00458 (<i>lptD</i>) für die Insertion in pET28a
RV6_rev	GCGGCCGCAAGCTTGTGCGACGGAGCTCGA ATTATAAATTGAGTTTTATTTTTTGAC	
RV7_fwd	GGTGGACAGCAAATGGGTTCGCGGATCCG AAAAAAATGAATATAGATTGGTTTTTTG GT	Amplifizierung von BARBAKC583_00466 (Autotransporter-A) für die Insertion in pET28a
RV7_rev	GCGGCCGCAAGCTTGTGCGACGGAGCTCGA ACTAAAACTATAACGCAAACCAATTA	
RV8_fwd	GGTGGACAGCAAATGGGTTCGCGGATCCG AATATTTGAAAACCTTGAATGAC	Amplifizierung von BARBAKC583_00473 (<i>lysM</i>) für die Insertion in pET28a
RV8_rev	GCGGCCGCAAGCTTGTGCGACGGAGCTCGA ATCAGTTCTCTAAATACTGAG	
RV9_fwd	GGTGGACAGCAAATGGGTTCGCGGATCCG AAAAATGAAACTGTTTTTCTTCTTCC	Amplifizierung von BARBAKC583_00801 (DUF1561) für die Insertion in pET28a
RV9_rev	GCGGCCGCAAGCTTGTGCGACGGAGCTCGA ATTATCGTGGGGAACACCTG	
RV10_fwd	TGTCGACGGAGCTCGAATCTTAATTCAG TGTAATACTTACTCCCG	Amplifizierung von BARBAKC583_00820 (<i>bbadA</i>) für die Insertion in pET28a
RV10_rev	AGCAAATGGGTTCGCGGATCCAAAAAATT GTATCTAATACCAGAGGAG	
RV11_fwd	TGTCGACGGAGCTCGAATCTTAATTACG GAACAAACCTAAAATATTC	Amplifizierung von BARBAKC583_00937 (Flagellin) für die Insertion in pET28a

Weiterführung Tabelle 4

RV11_rev	AGCAAATGGGTCGCGGATCCGGTTCTAG TATATTAATAATAGATCTG	Amplifizierung von BARBAKC583_00937 (Flagellin) für die Insertion in pET28a
RV12_fwd	GGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCG AAAAGGATACTGCAGAAGGG	Amplifizierung von BARBAKC583_00999 (Autotransporter-B) für die Insertion in pET28a
RV12_rev	GCGGCCGCAAGCTTGTGACGGAGCTCGA ACTAGAAGCGGTAGCGTAG	
RV13_fwd	GGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCG AAGGTATTTATGGGATGATGC	Amplifizierung von BARBAKC583_01013 (<i>flgE</i>) für die Insertion in pET28a
RV13_rev	GCGGCCGCAAGCTTGTGACGGAGCTCGA ACTACCGCTTCAAATTAAC	
RV14_fwd	GGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCG AATATAAGAAATATCTTTTGTCTAG	Amplifizierung von BARBAKC583_01021 (hypothetisches Protein-B) für die Insertion in pET28a
RV14_rev	GCGGCCGCAAGCTTGTGACGGAGCTCGA ATCAGTGATACCAGTGGAG	
RV15_fwd	GGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCG AAAACATCAAAACGCGTCTTAG	Amplifizierung von BARBAKC583_01022 (Autotransporter-C) für die Insertion in pET28a
RV15_rev	GCGGCCGCAAGCTTGTGACGGAGCTCGA ATTAGAAGCGAAATCGTATTCC	
RV16_fwd	GGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCG AAAATAAAAAAGCTCTTTTATTGTGC	Amplifizierung von BARBAKC583_01023 (Autotransporter-D) für die Insertion in pET28a
RV16_rev	GCGGCCGCAAGCTTGTGACGGAGCTCGA ATTAGAAACGGTAGCGCATTC	
RV17_fwd	GGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCG AAAAATACAAGGATAAACAAATATTCTCG	Amplifizierung von BARBAKC583_01028 (<i>flgH</i>) für die Insertion in pET28a
RV17_rev	GCGGCCGCAAGCTTGTGACGGAGCTCGA ATTA AAAAGGCGAAATTTGATTTAATAA C	
RV18_fwd	GGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCG AAAAAATGAGATATCTGAGTGTC	Amplifizierung von BARBAKC583_01101 (<i>porB</i>) für die Insertion in pET28a
RV18_rev	GCGGCCGCAAGCTTGTGACGGAGCTCGA ATTAGAACTTATATGCAACACC	
RV19_fwd	GGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCG AAAATATAAAATGTTTAGTGACAGCG	Amplifizierung von BARBAKC583_01102 (<i>pap31</i>) für die Insertion in pET28a
RV19_rev	GCGGCCGCAAGCTTGTGACGGAGCTCGA ATCAGAATTTGTAAGCAACACC	
RV20_fwd	GGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCG AAAATAAAAAAATGTTTATTGTGC	Amplifizierung von BARBAKC583_01103 (Porin- C) für die Insertion in pET28a
RV20_rev	GCGGCCGCAAGCTTGTGACGGAGCTCGA ATTA AAAATTTGTAAGCTACACC	
bbadB_fwd	TGTGACGGAGCTCGAATTCATTTAG TGTAAGGCTTAGC	Amplifizierung von BARBAKC583_00276 (<i>bbadB</i>) für die Insertion in pET28a
bbadB_rev	AGCAAATGGGTCGCGGATCCAAAAAAA TTCAACAACAAAGGG	
EXPLIB1_fwd	GGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCG AATTA AAAAAGAATATCTTATTATGTAC	Amplifizierung von BARBAKC583_01024 (Autotransporter-E) für die Insertion in pET28a
EXPLIB1_rev	GCGGCCGCAAGCTTGTGACGGAGCTCGA ATTAGAAACGATAGCGTATTCC	
pET28_seq_fw	GGGAATTGTGAGCGGATAAC	Sequenzierung der MCS von pET28
pET28_seq_rev	CTCAAGACCCGTTTAGAGG	Sequenzierung der MCS von pET28

Weiterführung Tabelle 4

AD50	GGGTATTTATAGTATCCGCTTCG	Sequenzierung von pET28_BARBAKC583_00458 (<i>lpiD</i>)
AD51	CTGGTGGAGAGTTGAGTG	Sequenzierung von pET28_BARBAKC583_00466 (Autotransporter-A)
AD52	CTTCCTCCATCTCTACAACG	Sequenzierung von pET28_BARBAKC583_00801 (DUF1561)
AD53	GATCACCAGCATCAACCTG	Sequenzierung von pET28_BARBAKC583_00999 (Autotransporter-B)
AD54	CCAGCAACAGATCCTTCTATC	Sequenzierung von pET28_BARBAKC583_00999 (Autotransporter-B)
AD55	CAACCCATGATGATGAGTAAC	Sequenzierung von pET28_BARBAKC583_00999 (Autotransporter-B)
AD56	CATTCTCAACTGTCTACGC	Sequenzierung von pET28_BARBAKC583_01021 (hypothetisches Protein-B)
AD57	GGCACCATCACTCCATAC	Sequenzierung von pET28_BARBAKC583_01021 (hypothetisches Protein-B)
AD58	GATCGAGTTCTCATCAATGG	Sequenzierung von pET28_BARBAKC583_01023 (Autotransporter-D)
AD59	GATTGCGAGGAATAGAAGTG	Sequenzierung von pET28_BARBAKC583_01023 (Autotransporter-D)
AD60	GGTCGCTTTGTCCAACCTTAG	Sequenzierung von pET28_BARBAKC583_01024 (Autotransporter-E)
AD61	CTAACAGTTTGGGATGCTC	Sequenzierung von pET28_BARBAKC583_01024 (Autotransporter-E)
AD62	GCAACGCACCATAGTTAAC	Sequenzierung von pET28_BARBAKC583_01024 (Autotransporter-E)
AD63	CTCCAGCATTAAATACCACCAG	Sequenzierung von pET28_BARBAKC583_00820 (<i>bbadA</i>)
AD64	GGTGTAATGATGGTACTGC	Sequenzierung von pET28_BARBAKC583_00820 (<i>bbadA</i>)
AD65	GAGCATTGTGAGATCAGG	Sequenzierung von pET28_BARBAKC583_00820 (<i>bbadA</i>)
AD66	GCTTAACAAGGCTATCACC	Sequenzierung von pET28_BARBAKC583_00276 (<i>bbadB</i>)
AD67	CTGATGCGGTAACAGGTGG	Sequenzierung von pET28_BARBAKC583_00276 (<i>bbadB</i>)
AD68	GTGGTGGTGCATCATTCG	Sequenzierung von pET28_BARBAKC583_00276 (<i>bbadB</i>)
AD69	CTCACTTCGGTACTAATGG	Sequenzierung von pET28_BARBAKC583_00276 (<i>bbadB</i>)
AD70	GATTTGGCTGAGCACATTGAAG	Sequenzierung von pET28_BARBAKC583_00820 (<i>bbadA</i>)

Starteroligonukleotide für die Identifizierung der Transposon

Kan2FP2	ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC	Identifizierung der Transposon Insertionsstelle mittels <i>Single Primer</i> PCR
Kan2RP1	GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG	Identifizierung der Transposon Insertionsstelle mittels <i>Single Primer</i> PCR
Tn5_fwd	CAACAAAGCTCTCATCAACC	Sequenzierung der Transposon Insertionsstelle
Tn5_rev	TTGAATATGGCTCATAACACC	Sequenzierung der Transposon Insertionsstelle

Weiterführung Tabelle 4

Starteroligonukleotide für die Erzeugung von Deletionsplasmide und Verifizierung genomischer Gendeletionen		
Bezeichnung	Sequenz	Funktion
pBIISK_sacB_fwd	CTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACC	Linearisierung von pBIISK_sacB
pBIISK_sacB_rev	TGGATCCCCCGGGCTGCAGG	Linearisierung von pBIISK_sacB
pBIISK_Seq_fwd	ATTGGTTGTAACACTGGCAGAG	Sequenzierung der inserierten Fragmente in pBIISK_sacB
pBIISK_Seq_rev	CTTTAGTGAGGGTTAATTGCGC	Sequenzierung der inserierten Fragmente in pBIISK_sacB
AD107	GTGGAAGTTCGAGTCTTCTC	Sequenzierung des inserierten α/β -Hydrolase-Fragments in pBIISK_sacB und Sequenzierung der genomischen Deletion der α/β -Hydrolase (BARBAKC583_00597)
AD108	GTGGAAGTTCGAGTCTTCTC	Sequenzierung des inserierten Porin-Fragments in pBIISK_sacB und Sequenzierung der genomischen Deletion von <i>porA</i> (BARBAKC583_00404)
Porin_down_fwd2	CTGAAGGCGTATCGCAAGGTTTAAATATTCAT	Amplifizierung des stromabwärts Genomfragments von <i>porA</i> (BARBAKC583_00404) mit homologen überhängen zum stromaufwärts liegenden Genomfragment von <i>porA</i>
Porin_down_rev	GCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGGGTGCAAAAAGCTTCTTCCC	Amplifizierung des Genomfragments stromabwärts von <i>porA</i> (BARBAKC583_00404) mit homologen überhängen zu pBIISK_sacB
Porin_up_fwd	GAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCAACCTGGTGCAGTCTTTACC	Amplifizierung des Genomfragments stromaufwärts von <i>porA</i> (BARBAKC583_00404) mit homologen überhängen zu pBIISK_sacB
Porin_up_rev2	TTAAAACCTTGCGATACGCCTTCAGCGTTC	Amplifizierung des stromaufwärts Genomfragments von <i>porA</i> (BARBAKC583_00404) mit homologen überhängen zum stromabwärts liegenden Genomfragment von <i>porA</i>
α/β -down_fwd	GATGGTGTACGGTAAAATTGTTCTCTGTGGTTGATT	Amplifizierung des stromabwärts Genomfragments von der α/β -Hydrolase (BARBAKC583_00597) mit homologen überhängen zum stromaufwärts liegenden Genomfragment der α/β -Hydrolase
α/β -down_rev	GCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGCCCAACGACAAATATAGACGC	Amplifizierung des Genomfragments stromabwärts der α/β -Hydrolase (BARBAKC583_00597) mit homologen überhängen zu pBIISK_sacB
α/β -up_fwd	GAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCAGCA GCATGTTTGAGGATTG	Amplifizierung des Genomfragments stromaufwärts der α/β -Hydrolase (BARBAKC583_00597) mit homologen überhängen zu pBIISK_sacB
α/β -up_rev	ATCAACCACAGAGAACAATTTACCGTACACCATC	Amplifizierung des stromaufwärts Genomfragments der α/β -Hydrolase (BARBAKC583_00597) mit homologen überhängen zum stromabwärts liegenden Genomfragment der α/β -Hydrolase
Oligonukleotide für die Erzeugung und Verifizierung von Komplementations-Plasmiden		
M13_fwd	GTAAAACGACGGCCAGT	Sequenzierung der MCS von pBBR1MCS2
M13_rev	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung der MCS von pBBR1MCS2
AD29_fwd	TAAGCAGGATCCGACGCATAAACGGTCTTAG	Amplifizierung des <i>porA</i> (BARBAKC583_00404) Genomfragments mit einer BamHI Schnittstelle

Weiterführung Tabelle 4

AD30_rev	TGCTTAGGATCCCGTATAGCTAGCAAGACATG	Amplifizierung des <i>porA</i> (BARBAKC583_00404) Genomfragments mit einer BamHI Schnittstelle
AD35_fwd	TAAGCAGGATCCACTCTCCATTATCGCTTAAC	Amplifizierung des α/β -Hydrolase (BARBAKC583_00597) Genomfragments mit einer BamHI Schnittstelle
AD36_rev	TGCTTAGGATCCACAACTCACTTAATGACTG	Amplifizierung des α/β -Hydrolase (BARBAKC583_00597) Genomfragments mit einer BamHI Schnittstelle
AD72_fwd	TCATTAAGTGAGTTTGTGCTGCAGGAATT CGATATCAAGC	Amplifizierung von pBBR1MCS2 mit homologen Überhängen zum α/β -Hydrolase (BARBAKC583_00597) Genomfragment
AD73_rev	TAAGACCGTTTATGCGTCGGATCCACTA GTTCTAGAGC	Amplifizierung von pBBR1MCS2 mit homologen Überhängen zum <i>porA</i> (BARBAKC583_00404) Genomfragment
AD74_fwd	TCTAGAAGTAGTGGATCCGACGCATAAA CGGTCTTAGC	Amplifizierung des <i>porA</i> (BARBAKC583_00404) Genomfragments mit homologen Überhängen zu pBBR1MCS2
AD75_rev	AAGCGATAATGGAGAGTGCGTATAGCTA GCAAGACATG	Amplifizierung des <i>porA</i> (BARBAKC583_00404) Genomfragments mit homologen Überhängen zum α/β -Hydrolase (BARBAKC583_00597) Genomfragment
AD76_fwd	TGTCTTGCTAGCTATACGCACTCTCCATT ATCGCTTAAC	Amplifizierung des α/β -Hydrolase (BARBAKC583_00597) Genomfragments mit homologen Überhängen zum <i>porA</i> (BARBAKC583_00404) Genomfragment
AD77_fwd	GATATCGAATTCCTGCAGCACAAACTCA CTTAATGACTGG	Amplifizierung α/β -Hydrolase (BARBAKC583_00597) Genomfragments mit homologen Überhängen zu pBBR1MCS2
AD86_2	CTTCTGTAAAGCGGCAGC	Sequenzierung der in pBBR1MCS2 inserierten <i>porA</i> (BARBAKC583_00404) und α/β -Hydrolase (BARBAKC583_00597) Genomfragmente
AD87	GCTATTACGCCAGCTGGC	Sequenzierung der in pBBR1MCS2 inserierten <i>porA</i> (BARBAKC583_00404) und α/β -Hydrolase (BARBAKC583_00597) Genomfragmente

fett = Bindestelle der Starteroligonukleotide, unterstrichen = BamHI Schnittstelle

3.5. Kultivierung von Mikroorganismen

3.5.1. Allgemeine Bedingungen für die Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht der verwendeten *E. coli* Stämme erfolgte in Luria-Bertani (LB) Medium oder durch Zugabe von 15 g/l Agar auf festem LB-Nährboden bei 37°C über Nacht. Flüssigkulturen wurden auf einem Kulturschüttler bei 120 rpm kultiviert. Für die Selektion Kanamycin resistenter *E. coli*-Stämme wurden 50 µg/ml Kanamycin dem Nährmedium beigelegt.

Die Kultivierung von *B. bacilliformis* in Flüssigkulturen erfolgte in *Bartonella* Liquid Medium (BaLi) bei 28°C, 120 rpm und 70%iger Luftfeuchtigkeit für 4 Tage [133]. Die Anzucht auf festem Nährboden erfolgte auf Columbia Blut Agar (CBA) Platten bei 28°C und 2% CO₂ in einem befeuchteten Inkubator für 10 - 14 Tage. Die Selektion von Kanamycin resistenten *B. bacilliformis* Stämmen erfolgte auf CBA-Platten mit 25 µg/ml Kanamycin. Die Komponenten des BaLi-Mediums sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Für die Analyse der durch *B. bacilliformis* verursachten Hämolyse wurden hämolytische und nicht hämolytische *B. bacilliformis*-Stämme auf CBA-Platten mit Zusatz von 5% Humanblut angezüchtet. Humanes Vollblut wurde über eine Venenpunktion am Unterarm des Spenders (Alexander Dichter) in ein Röhrchen ohne Zusätze (Koagulans bzw. Antikoagulans) entnommen und sofort in eine Glasflasche mit sterilen Glasperlen überführt. Durch dreiminütiges Schütteln wurde das Blut defibriniert. Zur Herstellung des Nährmediums wurde eine Columbia-Blut-Agar-Basis nach Angaben des Herstellers angesetzt und mit 5% (v/v) defibrinierten Humanblut versetzt.

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Nährmedien für die Kultivierung von Bakterien.

Bezeichnung	Hersteller / Zusammensetzung (pro Liter)
<i>Bartonella</i> -Liquid-Medium [133] (BaLi-Medium)	24,45 g Schneiders Drosophila Medium 50 g Saccharose 0,79 g CaCl ₂ x H ₂ O 0,4 g NaHCO ₃ 10% FCS (hitzeinaktiviert) auf pH 6,5 mit NaOH einstellen
CBA-Agar Schafsblut	BD, Katalognummer: 12800723
CBA-Agar Humanblut	Columbia-Blut-Agar-Basis 5% defibriniertes humanes Blut
Luria-Bertani-Medium	Roth, Katalognummer: X968.1
Luria-Bertani-Agar	Roth, Katalognummer: X969.1
RPMI 1640	Gibco, Katalognummer: 11835030
SOC-Medium	NEB, Katalognummer: B9020S
Tryptic Soja (TS) Einfriermedium	17 g Caseinpepton 3 g Sojapepton 2,5 g Glukose 5 g NaCl 2,5 g di-Kaliumphosphat 20% Glycerol
VLME RPMI 1640	PAN-Biotech, Katalognummer: P04-17526

3.5.2. Bestimmung der Zelldichte

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mittels Photometer über die Messung der optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀, NanoPhotometer P360, Implen, München, Deutschland). Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht ungefähr 8×10^8 *E. coli* Zellen/ml bzw. 5×10^8 *B. bacilliformis* Zellen/ml [134].

3.5.3. Kryokonservierung von Bakterienstämmen

Für die Kryokonservierung von *E. coli* wurden Flüssigkulturen über Nacht angezchtet, bei 5.000 g zentrifugiert und das Bakterienpellet in LB-Medium mit 20% (v/v) Glycerol resuspendiert. Für die Erstellung von *B. bacilliformis* Kryostocks wurden die Bakterien auf CBA-Platten für vier Tage kultiviert und mit einem Wattestäbchen in BaLi-Medium überführt. Anschließend wurden die Bakterien bei 5.000 g zentrifugiert und das Pellet in Trypton-Soja (TS) -Medium mit 20% (v/v) Glycerol resuspendiert. Zur Berechnung der Bakterienzahl der *B. bacilliformis* Stocks wurden serielle Verdünnungsreihen auf CBA-Platten angefertigt. Nach 10 - 14 Tagen wurden die koloniebildenden Einheiten (KBE) gezählt und die Zellzahl bestimmt. Die Lagerung bakterielle Kryostocks erfolgte bei -80°C.

3.6. Zellkultur

3.6.1. Kultivierung von humanen Zellen

Humane HeLa-229-Zellen (ATCC® CCL-2.1) wurden in VLE RPMI 1640-Medium, ergänzt mit 10% (v/v) hitzeinaktivierten fötalen Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für das Passagieren der Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen und die adhärenen Zellen durch Zugabe von 3 ml Trypsin-EDTA (0,05% [v/v], 0,02% [v/v]) für 5 min bei 37 °C abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden mit VLE RPMI 1640 auf 10 ml aufgefüllt und 1 ml der Zellsuspension wurde in eine neue Zellkulturflasche ausgesät und wie zuvor beschrieben kultiviert.

3.6.2. Gewinnung von humanen und murinen Erythrozyten

Für die Gewinnung humaner Erythrozyten wurde Blut durch Venenpunktion am Unterarm des Blutspenders (Alexander Dichter) in eine EDTA-Monovette (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) entnommen. Für die Gewinnung muriner Erythrozyten wurde Blut aus der lateralen Schwanzvene von C57BL/6 Mäusen in EDTA-Monovetten entnommen (Blutentnahme erfolgte durch Sabine Harenkamp, DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen, Frankfurt). Für die Trennung des Hämatokrits, Plasmas und Leukozytenkonzentrats (*buffy coat*) wurde das antikoagulierte Vollblut bei 500 g für 10 min zentrifugiert. Nach der Entfernung des Plasmas und Leukozytenkonzentrats wurden die humanen Erythrozyten mit 0,9%ige Kochsalzlösung und die murinen Erythrozyten mit RPMI 1640 dreimal gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl, wie in Kapitel 3.6.3 beschrieben, bestimmt.

3.6.3. Ermittlung der Lebendzellzahl von humanen und murinen Zellen

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte durch Färbung abgestorbener Zellen mit Trypanblau. Die Zellsuspension (HeLa-229, humane oder murine Erythrozyten) wurde dafür in unterschiedlichen Verhältnissen mit Trypanblau gemischt (HeLa-229 1:1, Erythrozyten 1:200) und unter einem

Lichtmikroskop in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Tote Zellen lagern hierbei den blauen Farbstoff ein und sind hierdurch von lebenden Zellen deutlich zu unterscheiden.

3.6.4. Infektion von HeLa-229-Zellen

Für die Infektion von HeLa-229-Zellen wurden 4×10^6 Zellen in 80 cm^2 Zellkulturflaschen (Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) ausgesät und wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben über Nacht bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und $5\% \text{ CO}_2$ kultiviert. Vor der Infektion wurden das Zellkulturmedium durch VLE RPMI 1640 Medium mit $2\% \text{ FCS}$ ausgetauscht. Der Ansatz wurde für 2 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und $5\% \text{ CO}_2$ inkubiert und mit *B. bacilliformis* KC583 mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 100 infiziert. Der Infektionsansatz wurde für 5 min bei 300 g zentrifugiert und für 48 Stunden bei 33°C und $5\% \text{ CO}_2$ inkubiert.

3.6.5. Infektion von Erythrozyten

Für die Infektion von humanen und murinen Erythrozyten mit *B. bacilliformis* wurden jeweils $100 \text{ }\mu\text{l}$ Erythrozytensuspension mit einer Konzentration von 10^8 Zellen/ml (1×10^7 Erythrozyten) in eine 96-Kavitäten-Platten mit U-Boden pipettiert und mit $100 \text{ }\mu\text{l}$ einer Bakteriensuspension (unterschiedliche MOIs) infiziert. Die Infektion erfolgte für 20 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und $5\% \text{ CO}_2$.

3.7. Molekularbiologische Standardmethoden zur Analyse und Modifizierung von DNA

3.7.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurden 5 ml Übernacht-Kulturen der entsprechenden Bakterienstämme angefertigt und die Plasmide unter Verwendung des NucleoSpin Plasmid Mini Kits isoliert. Der Zellaufschluss und Plasmidextraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für die Plasmidisloierung im großen Maßstab wurde DNA aus insgesamt 800 ml einer Übernacht -Kultur mit dem NucleoBond Xtra Maxi Kit nach Anweisungen des Herstellers extrahiert. Die Plasmid-DNA wurde in ddH_2O eluiert und bei -20°C gelagert.

3.7.2. Isolierung von chromosomaler DNA

Für die Isolierung genomischer DNA aus *B. bacilliformis* wurden die Bakterien auf CBA-Platten wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben kultiviert und anschließend mit einem Wattestäbchen von den Agarplatten abgenommen, in PBS resuspendiert und bei 10.000 g für drei Minuten pelletiert. Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits nach Angaben des Herstellers. Für die Isolierung von hochmolekularer genomischer DNA wurden Bakterien in BaLi-Medium kultiviert (siehe Kapitel 3.5.1) und durch Zentrifugation bei 10.000 g für drei Minuten pelletiert. Anschließend wurde die DNA mittels Qiagen MagAttract HMW Kit nach Herstellerprotokoll isoliert.

3.7.3. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm (NanoPhotometer P360, Implen). Die Bestimmung der DNA-Konzentration für PacBio Sequenzierungen erfolgte unter Verwendung des Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kits nach Herstellerprotokoll.

3.7.4. Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung der PCR-BIO HiFi-DNA-Polymerase. Reaktionsansätze für Standard-PCRs wurden, wie in Tabelle 6 beschrieben, angefertigt und mit dem Programm aus Tabelle 7 ausgeführt. Um rekombinante Plasmide in einer Stichprobe an transformierten Bakterien ($n = 10 - 32$) schnell überprüfen zu können, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierbei unterscheidet sich diese PCR-Methode von einer konventionellen PCR durch die direkte Verwendung von hitzelysierten (90°C , 3 min) Bakterienkolonien anstatt von isolierter DNA als Matrize. Dementsprechend wurde das PCR-Protokoll angepasst.

Tabelle 6: Standard-PCR-Reaktionsansätze.

Substanz	Volumen [μl]	finale Konzentration
5xPCRBIO Reaktionspuffer	10	1x
vorwärts Starteroligonukleotid (10 μM)	2	400 nM
rückwärts Starteroligonukleotid (10 μM)	2	400 nM
DNA Matrize (ca. 100 ng)	Variabel	Variabel
PCRBIO HiFi Polymerase (2 U/ μl)	0,5	
PCR-Grad dH_2O	Auf 50 μl auffüllen	

Tabelle 7: PCR-Standardprogramm.

Funktion	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [s]	Zyklus
initiale Denaturierung	95	180	1
Denaturierung	95	15	35
Anlagerung der Starteroligonukleotide	T_m Oligonukleotid	15	35
Elongation	72	30 s/Kb	35
finale Elongation	72	180	1

3.7.5. Reinigung von PCR-Produkten

Für die Reinigung der PCR-Produkte wurde überschüssige dNTPs, Oligonukleotide und Proteine mittels QIAquick PCR Purification Kits nach Angaben des Herstellers entfernt.

3.7.6. Analyse von DNA mittels der Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse von DNA erfolgte je nach Fragmentgröße in 0,8 - 2%igen Agarosegelen (0,8 – 2 [w/v] Agarose, 2 M Tris, 1 M Essigsäure, 100 mM EDTA, pH 8,1). Zum Beladen der Geltaschen wurden 3 µl der zu analysierenden DNA mit 2 µl Ladepuffer, 0,5 µl Midori Green Direct gemischt und auf ein Volumen von 12 µl mit dH₂O aufgefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte in TAE Puffer (2 M Tris, 1 M Essigsäure, 100 mM EDTA, pH 8,1) bei 80 V für 45 min. Entsprechend der Fragmentgröße wurden die Größenstandards 1 kb DNA *ladder* bzw. 100 bp DNA *ladder* verwendet. Die Dokumentation der DNA erfolgte anschließend bei 505 nm mittels Blue/Green Transilluminator und dem Geldokumentationssystem Photoprint (Peqlab, Erlangen, Deutschland).

3.7.7. Gelextraktion

Für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das Quiagen MinElute Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Die zu extrahierenden DNA Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und über eine Silikamembran-Säule gereinigt. Die DNA wurde mit dH₂O eluiert und bei -20°C gelagert.

3.7.8. Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau von DNA erfolgte unter Verwendung von Restriktionsenzymen nach Angaben der Hersteller für 1 h bei 37°C. Für die Erstellung der *B. bacilliformis* Expressionsbibliotheken wurde ein unvollständiger Verdau genomischer DNA mit 0,2 U Sau3AI bei 37°C für 25 min durchgeführt. Die Restriktionsenzyme wurden bei 65°C für 20 min inaktiviert.

3.7.9. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Vor der Ligation wurden die 5'-Enden verdauter Vektor-DNA dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu minimieren. Dafür wurde nach Beendigung des Restriktionsverdaus 1 U alkalische Shrimp-Phosphatase in den Ansatz gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die alkalische Shrimp-Phosphatase bei 65°C für 5 min inaktiviert.

3.7.10. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA erfolgte unter Verwendung der T4 DNA Ligase nach Angaben des Herstellers. Das molare Verhältnis von Vektor-DNA zu DNA-Fragment betrug 1:5. Die Ligation erfolgte für 1 h bei RT oder über Nacht bei 16°C.

3.7.11. Assemblierung von DNA-Fragmenten mittels NEBuilder® HiFi DNA Assembly

Für die Assemblierung von Vektor-DNA mit DNA-Fragmenten wurde das NEBuilder HiFi DNA Assembly Kit verwendet. Dabei handelt es sich um eine modifizierte Methode in Anlehnung an die Gibson Assemblierung [135] bei der eine 5'-Exonuklease, einzelsträngige 3'-Überhänge herstellt und die Anlagerung der Fragmente ermöglicht. Eine Polymerase füllt die Lücken auf und eine DNA-Ligase ligiert die assemblierte DNA. Die hierfür verwendeten Starteroligonukleotide für DNA-Fragmente und Vektoren wurden so konstruiert, dass die PCR-Produkte 15 - 30 bp lange komplementäre Überhänge zueinander aufweisen. Für den Reaktionsansatz wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu DNA-Fragment von 1:2 mit einer Stoffmenge zwischen 0,003 pmol und 0,2 pmol verwendet. Die Assemblierung erfolgte für 1 h bei 50 °C im Heizblock.

3.7.12. Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen (NEB-5alpha und BL21 [DE3]) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1-5 µl Plasmid-DNA mit einer Gesamtmenge von 1 pg - 100 ng versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 30 s mit *E. coli* NEB-5alpha Zellen und für 10 s mit *E. coli* BL21 (DE3) Zellen. Danach wurden die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert und mit 950 µl SOC-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden anschließend auf LB-Agar mit dem entsprechenden Selektionsmarker ausplattiert und wie zuvor beschrieben kultiviert (siehe Kapitel 3.5.1).

3.7.13. Transformation von *B. bacilliformis*

Die Transformation von *B. bacilliformis* erfolgte mittels Elektroporation. Für die Herstellung elektrokompeter Zellen wurden 7-10 bewachsenen CBA-Platten mit einem Wattestäbchen abgeerntet und in 10 ml BaLi-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden bei 5000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert, drei Mal mit eiskaltem 10%igen (v/v) Glycerin gewaschen und auf eine Konzentration von 10^{10} Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden 40 µl der Bakteriensuspension und 40 µl Plasmid DNA mit einer Konzentration von 1 µg/µl in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) gegeben und mit einem Pulse Controller II (Bio-Rad Laboratories) bei einer Feldstärke von 2,5 kV/cm und einer konstanten Kapazität von 25 mF bei 200 V elektroporiert. Direkt nach der Elektroporation wurden die Zellen in 1 ml Recovery Medium überführt und für 1 h bei 30°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden je 100 µl der Transformationsansätze auf CBA-Platten mit Kanamycin ausplattiert und für 10 - 14 Tage bei 28°C inkubiert.

3.8. Proteinbiochemische Methoden

3.8.1. Heterologe Produktion von Proteinen in *E. coli*

Die Induktion der T7-Promoter-gesteuerten Proteinproduktion erfolgte durch Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG). Dazu wurden *E. coli* BL21 (DE3) Kulturen bis zu einer optischen OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert und anschließend die Proteinproduktion mit 1 mM IPTG Endkonzentration induziert, gefolgt von einer vier-stündigen Inkubationszeit.

3.8.2. Reinigung rekombinanter Proteine mittels His-Tag Affinitätschromatographie

Rekombinante Proteine wurden durch His-Tag-Affinitätschromatographie gereinigt. Dazu wurden die Produktion der rekombinanten Proteine wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben mittels IPTG induziert. Die Bakterien wurden anschließend durch Zentrifugation bei 4.500 g und 4°C für 15 min geerntet. Der Zellaufschluss erfolgte durch einen Gefrier-Auftau-Zyklus und Zugabe eines Lysepuffers (1 mg/ml Lysozym, 0,1% (v/v) Triton X-100) sowie dreimaliger Ultraschallbehandlung (SonoPlus HD-2070 Bandelin, Berlin, Deutschland) für 30 Sekunden. Die Suspension wurde 30 Minuten lang bei 15.000 g zentrifugiert, und das resultierende Pellet wurde über Nacht bei 4°C auf einem Wippschüttler gelöst (8 M Harnstoff, 10 mM Tris, 50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 8,0). Der Überstand wurde durch Zentrifugation bei 15.000 g für 20 min von Zelltrümmern befreit und mit einer Kobaltmatrix für 1 h schüttelnd inkubiert. Das Matrix-Protein-Gemisch wurde auf eine Säule übertragen, gewaschen und mit Solubilisierungspuffer (250 mM Imidazol) eluiert. Die gereinigten Proteine wurden mittels SDS-PAGE Kapitel 3.8.3 qualitativ analysiert, sowie durch einen Bradford-Protein-Assay nach Angaben des Herstellers quantifiziert.

3.8.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Größenauftrennung von Proteinen erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [136]. Die Proteine (Zelllysate, gereinigte Proteinlösungen) wurden in 2xLaemmli-Probenpuffer gelöst und bei 95°C für 5 min denaturiert. Die Taschen eines großporigen Sammelgels wurden daraufhin mit den Proben geladen und in Laemmli-Laufpuffer (SDS 10 g/l, Glycerin 30,3 g/l und Tris-HCl 144,1 g/l, pH 8,5) initial bei 15 mA für 10 min laufen gelassen, um die Proteine in der Lauffront zu fokussieren. Anschließend wurden die Proteine durch das feinporige Trenngel der Größe nach bei einer Stromstärke von 30 mA für 30 min separiert. Die Porengröße des Trenngels wurde durch 8 - 15% (v/v) Acrylamid der Größe des Zielproteins angepasst. SDS-Gele wurden entweder durch Instant Blue für 1 h angefärbt oder in einem Western Blot analysiert. Die Zusammensetzung des Laufpuffers sowie der Sammel- und Trenngele sind in Tabelle 8 einzusehen.

Tabelle 8: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele.

Komponente	Sammelgel	Trenngel 8%	Trenngel 10%	Trenngel 12%
30% (w/v) Acrylamid / Bisacrylamid	335 µl	1,3 ml	1,7 ml	2 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	250 µl	-	-	-
10% (w/v) SDS	20 µl	50µl	50 µl	50 µl
TEMED	3 µl	2µl	2 µl	2 µl
10% (w/v) APS	20 µl	50 µl	50 µl	50 µl
ddH ₂ O	1,4 ml	2,3 ml	1,9 ml	1,6 ml

3.9. Immunologische Methoden

3.9.1. Antikörper und Serum

Die verwendeten Humansenen, Kaninchensenen und Antikörper sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Verwendete Humansenen, Kaninchensenen und Antikörper.

Antikörper	eingesetzte Verdünnung	Referenz
anti-T7 tag Antikörper (ab9138)	1:2.500	Abcam, Cambridge, UK
Esel anti-Ziege IgG H&L (HRP) (ab205723)	1:5.000	Abcam, Cambridge, UK
Kaninchen-Präimmunsere	IFT: 1:80 - 1:1.600	Eurogentec, Seraing, Belgien (diese Arbeit)
Kaninchen anti- <i>B. bacilliformis</i> KC583 Immunsere	Immunoblot: 1:2.000 IFT: 1:80 - 1:1.600	Eurogentec, Seraing, Belgien (diese Arbeit)
Schwein anti-Kaninchen HRP	1:1.000	Abcam, Cambridge, UK
Humane Patientensere Carrión- Krankheit	Immunoblot: 1:1.000 IFT: 1:80, 1:160, 1:320 Lineblot: 1:100 ELISA 1:100	Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru

Weiterführung Tabelle 9

Humanseren Blutspendedienst (Baden-Württemberg-Hessen, Frankfurt, Deutschland)	Immunoblot: 1:1.000 IFT: 1:80, 1:160, 1:320 Line Blot: 1:100 ELISA 1:100	diese Arbeit
Kaninchen anti-Human IgG H&L (ab97156)	1:800	Abcam, Cambridge, UK
Ziege anti-Human IgG FITC	Gebrauchsfertig	Euroimmun, Lübeck, Deutschland
Ziege anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor® 488	1:200	Dianova, Hamburg, Deutschland

3.9.1.1. Humanseren

Experimente mit Humanseren wurden von der Ethikkommission der Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), Lima, Peru (Referenznummer: SIDISI 200047) und von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Frankfurt am Main (Referenznummer 423/11) genehmigt. Serumproben von peruanischen Patienten (n = 26) mit der klinischen Diagnose einer *B. bacilliformis*-Infektion wurden am Instituto de Medicina Tropical der UPCH zwischen dem 23. Dezember 1990 und dem 5. Mai 2018 als Teil der klinischen Standardversorgung entnommen und anonymisiert. Die Seren wurden an der UPCH bei -20°C gelagert und gemäß dem Kooperationsvertrag (Referenznummer: 737-01-19, 11. November 2019) bereitgestellt. Die Patienten wurden von einem Arzt auf Anzeichen und Symptome einer akuten (Fieber, Schweißausbrüche, Hepatomegalie, Gelbsucht, Lymphadenopathie, Splenomegalie) oder chronischen Form (*Verruga peruana*, Fieber, Arthralgien) der Krankheit untersucht. Das Blut wurde aus einer Antekubitalvene in ein Röhrchen mit einer Antikoagulans sowie in ein zweites Röhrchen mit Gerinnungsaktivatoren entnommen. Die Proben wurden anhand eines positiven Giemsa-Abstrichs oder eines anschließenden *B. bacilliformis*-Wachstums auf CBA-Medium ausgewählt. Zur Gewinnung des Blutserums wurden nach der Vollendung der Gerinnung die Proben zentrifugiert, um das Serum vom Hämatokrit zu trennen. Die Reaktivität der Patientenseren wurde durch einen Immunfluoreszenz (IFT, siehe Kapitel 3.9.3) und durch Western Blots (Verdünnung von 1:1.000) mit *B. bacilliformis* KC583 Ganzzelllysat (Kapitel 3.9.2) analysiert.

Als Kontrolle wurden Serumproben von gesunden deutschen Blutspendern ohne Reisevorgeschichte nach Südamerika (Negativkontrolle; n = 96) in die Studie einbezogen. Diese Kontrollseren wurden zwischen dem 28. August 2020 und dem 31. August 2020 als gewöhnliche Blutspende entnommen, über den DRK-Blutspendedienst (Baden-Württemberg-Hessen, Frankfurt, Deutschland) gesammelt und bei -20°C gelagert.

3.9.1.2. Herstellung von anti-*B. bacilliformis* Kaninchenserum

Ein Kaninchen-Antiserum gegen *B. bacilliformis* KC583 wurde durch eine 28-tägige Immunisierung (Eurogentec, Seraing, Belgien) mit inaktivierten Bakterien gewonnen. Zur Herstellung des Gesamtbakterienlysats wurden 5×10^7 Bakterien/ml in BaLi-Medium kultiviert und durch Zugabe von 500 µg/ml Erythromycin für 6 h bei 37°C inaktiviert. Die Kaninchen wurden durch vier subkutane Injektionen (an Tag 0, 7, 10 und 18) mit 5×10^7 Bakterien pro Injektion, in Übereinstimmung mit den nationalen und europäischen Richtlinien, immunisiert. Die Reaktivität des Kaninchenserums gegen *B. bacilliformis* wurde durch Immunfluoreszenz und Immunoblotting (Verdünnung 1:400 bzw. 1:2.000) bestimmt (Kapitel 3.9.3 und 3.9.2).

3.9.2. Western Blot

Die immunologische Detektion von Proteinen, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden, erfolgte durch das Tank-Blot Verfahren. Dafür wurden die SDS-Gele mit einer Nitrocellulose-Membran (GE Healthcare, Solingen, Deutschland) in eine Blot-Vorrichtung eingespannt und senkrecht zur elektrischen Spannung in eine Elektrophoresekammer befüllt mit Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycerin und 10% [v/v] Methanol) gegeben. Die Proteine wurden bei einer konstanten Stromstärke von 300 mA für 1 h elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Für die Immunodetektion der Proteine wurde die Membranen in Blockierungspuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,15 M NaCl, 0,2% [v/v] Tween 20, 5% [w/v] Magermilchpulver) für 1 h blockiert. Anschließend wurden die Membranen mit Waschpuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,15 M NaCl, 0,2% [v/v] Tween 20) gewaschen und mit Serum bzw. Antikörper in den entsprechenden Verdünnungen über Nacht bei 4°C auf einem Wippschüttler inkubiert. Danach wurden die Membranen mit Waschpuffer gewaschen und mit den entsprechenden Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörpern für 1 h bei RT (Tabelle 9) inkubiert. Die Blots wurden mit SuperSignal Chemilumineszenz-Substraten entwickelt, und mit einem ChemiDOC XRS+ System und der Software ImageLab V6.0.1. (BioRad, Dreieich, Deutschland) dokumentiert.

3.9.3. Entwicklung eines Anti-*B. bacilliformis* IgG-Immunfluoreszenztest

Um die Reaktivität von Patientenseren zu bewerten, wurde ein Immunfluoreszenztest in Anlehnung an bereits existierende Protokolle mit geringfügigen Änderungen erstellt [31,137]. Für die Gewinnung des Antigens wurden humane HeLa-229-Zellen (ATCC® CCL-2.1), wie zuvor beschrieben, angezchtet und mit *B. bacilliformis* infiziert (siehe Kapitel 3.6.1 und 3.6.4). Die Zellen wurden durch Abschaben geerntet, mit PBS gewaschen und mit 3.75% (v/v) PBS-gepuffertem Paraformaldehyd für 10 min bei 4°C fixiert. Nach einem weiteren Waschschriff wurden 30 µl der Antigensuspension auf Objektträger mit Reaktionsfelder (Knittel Glass, Braunschweig, Deutschland) getropft und anschließend an der Luft getrocknet. Die Patientenseren wurden in verschiedenen Verdünnungen (1:80, 1:160, 1:320) auf das Antigen pipettiert und für 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer

befeuchteten Kammer inkubiert, mit PBS gewaschen und für weitere 60 Minuten mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugierten Ziegen anti-Human IgG Antikörpern inkubiert. Der Nachweis des anti-*B. bacilliformis* Kaninchenserums erfolgte mit Alexa Fluor® 488-konjugiertem Ziegen anti-Kaninchen IgG und diente als technische Positivkontrolle. DNA wurde mit 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI, 10 µg/ml gelöst in PBS) gegengefärbt. Die Proben wurden mit einem Zeiss Axio Imager 2 Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) analysiert und ausgewertet. Mikroskop-Aufnahmen wurden mit einer Spot RT3 Mikroskopkamera (Diagnostic Instruments Inc., MI, USA) unter Verwendung der Software VisiView V.2.0.5 aufgenommen und mit Photoshop CS6 V.13.0 bearbeitet. Serumproben wurden bei einem Titer von ≥ 320 als positiv bzw. bei einem Titer von < 80 als negativ eingestuft. Proben mit einem Titer ≥ 80 und < 320 wurden als nicht eindeutig eingestuft.

3.10. DNA-Sequenzierung

3.10.1. Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmid DNA

Die Verifizierung der erstellten rekombinanten Plasmide, Transposonmutanten und markerlosen Deletionsmutanten erfolgte durch Sanger-Sequenzierung unter Verwendung der entsprechenden Sequenzierungs-Oligonukleotide. PCR-Produkte wurden für die Sequenzierung wie in Kapitel 3.7.5 beschrieben gereinigt. Alle Sanger-Sequenzierungen erfolgten durch Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) oder Microsynth (Balgach, Schweiz) unter Einhaltung der erforderlichen Reinheit und DNA-Konzentration.

3.10.2. Genomsequenzierung

Für die Genomsequenzierung von *B. bacilliformis* KC583 und KC584 wurde ein hybrider Ansatz aus Illumina *paired-end*-Sequenzierung und Pac Bio *single molecule real-time* (SMRT) Sequenzierung verfolgt.

3.10.2.1. Illumina Sequenzierung

Für die Illumina Sequenzierung wurde *B. bacilliformis* KC584 aus dem Kryostock auf CBA-Platten ausgestrichen und bei 28°C für 3 Tage kultiviert. Die Bakterien wurde mit einem Wattestäbchen von den Agarplatten abgenommen und in einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (pH 7,0–7,3) resuspendiert und anschließend bei 10.000 g für 3 min pelletiert. Die Isolierung genomischer DNA erfolgte unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits. Anschließend wurde die DNA durch Ultraschallbehandlung fragmentiert (S2 Ultrasonicator, Covaris, Brighton, UK) und mit Illumina Adaptoren gekoppelt. Die *paired-end*-Sequenzierung erfolgte als *Nano-Run* mit 2x250 bp auf einem MiSeq System unter Verwendung von MiSeq v2 Chemie (Illumina, Berlin). Die Kultivierung der Bakterien und die Isolierung der genomischen DNA erfolgte durch Frau Sabrina Becker [138]. Die Präparation der NGS-Bibliothek sowie die Sequenzierung wurden von StarSEQ (Mainz, Deutschland) durchgeführt.

3.10.2.2. PacBio Sequenzierung

Für die PacBio Sequenzierung wurden KC583 und KC584 in BaLi-Medium für 4 Tage bei 28°C auf einem Schüttler bei 120 rpm kultiviert und anschließend bei 10.000 g für 3 min pelletiert. Hochmolekulare genomische DNA wurde mittels Qiagen MagAttract HMW Kit isoliert und anschließend durch Covaris g Tubes (Covaris, Brighton, UK) in einheitliche 10 - 12 kb große Fragmente geschert. Die Erstellung der NGS-Bibliothek erfolgte nach Protokoll von PacBio Sciences für *multiplexed microbial SMRTbell*-Bibliotheken mit Hairpin-Barcode-Adaptoren (IDT, Leuven, Belgien) sowie PacBio-Barcode-Adaptoren. Die SMRT-Sequenzierung der NGS-Bibliothek erfolgte auf einem Pacific Biosciences Sequel System unter Verwendung von V3.0 Chemie (V3.0 Sequel Polymerase und V3.0 Sequel SMRT Cell). Die generierten DNA *reads* wurden unter Verwendung der Software SMRT Link (v5.1.0.26412) über eine *barcoding pipeline* mit einem minimalen Barcode Score von 26 demultiplext. Die Präparation der NGS-Bibliothek sowie die Sequenzierung wurden vom Norwegian Sequencing Centre (Oslo, Norwegen) durchgeführt.

3.10.2.3. Qualitätskontrolle und Genomannotation

Die Qualität der übermittelten Sequenzdateien (FASTQ Format) wurde mittels FastQC v0.11.8 überprüft [139]. Die hybride *de novo* Genomassemblierung von Stamm KC584 wurde mit Unicycler v.0.4.8 unter Verwendung der Standardeinstellungen durchgeführt [140]. Für den Stamm KC583 wurde auf gleiche Weise eine einfache Assemblierung der PacBio Sequenzen durchgeführt. Als finale Qualitätskontrolle wurden die *long reads* von KC583 bzw. KC584 mit Minimap2 gegen das Referenzgenom von KC583 (NC_008783.1) bzw. gegen das *de novo* assemblierte Genom von KC584 getestet [141]. Die Annotation der Genome erfolgte über die NCBI Prokaryotic Genomes Annotation Pipeline [142]. Die Sequenzen der PacBio Sequenzierung von Stamm KC583 wurden im Sequence Read Archive (SRA) des National Center of Biotechnology Information (NCBI) hinterlegt (Eintragsnummer SRR13618139). Das erstmals sequenzierte und vollständig geschlossene Genom von Stamm KC584 wurde in Sequenzdatenbank GenBank unter der Eintragsnummer CP045671 hinterlegt. Die Qualitätsprüfung, Assemblierung und Annotation erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Tilman Schultze (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Frankfurt).

3.11. Sequenzanalyse und Vergleich von *B. bacilliformis* Genomen

Genomische Sequenzalignments wurden mit MAUVE Version 20150226 Build 10 erstellt [143]. Um vergleichbare Annotationen für alle Stämme zu erhalten, wurden die FASTA-Sequenzen von KC583, FDAARGOS_174 (NZ_CP014012.2), ATCC 35685 und KC584 (NZ_CP045671.1) unter Verwendung der Software Prokka Version 1.14.6 annotiert. Die bereits zuvor verfügbare Genomsequenz von Stamm KC583 (NC_008783.1) wurde als Referenz für detaillierte Sequenzanalysen verwendet. Zu diesem Zweck wurden die PacBio *long reads* für jeden Stamm (SRA-Eintragsnummern: KC583, SRR13618139; KC584, SRR10344655; FDAARGOS_174, SRR2823708)

mit Minimap2 unter Verwendung der Standardparameter für PacBio *reads* zueinander ausgerichtet. Zur Überprüfung auf kleinere Sequenzunterschiede zwischen den Stämmen wurde das *read-mapping* abweichender Basen mit der CLC Genomics Workbench 12.0.3 analysiert.

Das Vorhandensein der analysierten Antigene (Autotransporter-E, Porin-B, hypothetisches Protein-B, BbadB und Pap31) wurde in allen verfügbaren geschlossenen *B. bacilliformis* Genomen (KC583: [NC_008783.1], KC583 [aus dieser Arbeit], ATCC® 35685™, KC583 [NZ_CP014012] und KC5848 [NZ_CP045671.1]) mit Hilfe von Protein-Protein BLAST (NCBI, Bethesda MD, USA) untersucht. Das Vorhandensein homologer Proteinsequenzen in *B. ancashensis* (NZ_CP010401.1), *B. henselae* (NZ_CP020742.1) und *B. quintana* (NZ_AP019773.1) wurde ebenfalls durch einen Protein-Protein-BLAST ermittelt. Die entsprechenden Identitätswerte wurden mit Geneious Prime Version 020.2.4 unter Verwendung einer Blossum-62-Matrix (*open gap penalty*: 12; *gap extension penalty*: 3) berechnet.

3.12. Identifizierung immundominanter *B. bacilliformis* Proteine für die Entwicklung serodiagnostischer Tests

3.12.1. Reverse Vakzinologie

Für die *in silico* Vorhersage immunreaktiver Proteine wurde eine Reverse-Vakzinologie-Strategie verfolgt. Um stammspezifische Ergebnisse auszuschließen, wurden die zuvor sequenzierten und annotierten genomische Sequenzen von *B. bacilliformis* KC583 und KC584 (siehe Kapitel 3.10.2) für die Analyse verwendet. Die *in silico*-Vorhersage potenzieller Antigene erfolgte mit der Softwareanwendung Vaxign [144] unter Verwendung von Proteinsequenzen. Dafür wurden die annotierten Gensequenzen von KC583 und KC584 mit der Software Geneious Prime extrahiert und in Proteinsequenzen übersetzt. Diese wurden anschließend in einer dynamischen Vaxign-Analyse unter Berücksichtigung folgender Kriterien analysiert: (I) Proteine müssen oberflächenexponiert oder sezerniert sein (Außenmembran- und extrazelluläre Proteine), (II) Adhäsionswahrscheinlichkeit höher als 0,4, (III) Ausschluss von Proteinen mit mehr als einer Transmembranhelix, (IV) MHC-Klasse-I- und -II-Epitopbindung und (V) keine Sequenzähnlichkeiten mit Proteinen von Menschen, Schwein oder Maus. Die Adhäsionswahrscheinlichkeit wurde an Flagellin angepasst, da erste Versuche mit Kaninchenserum eine starke Seroreaktivität zeigten.

3.12.2. Herstellung von rekombinanten *B. bacilliformis* Expressionsbibliotheken

Genomische DNA von *B. bacilliformis* KC583 wurde wie zuvor beschrieben (Kapitel 3.7.2) isoliert und durch 0,2 Einheiten Sau3AI für 25 min bei 37°C partiell verdaut (siehe Kapitel 3.7.8). Der DNA-Verdau wurde, wie in Kapitel 3.7.6 beschrieben, mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und DNA-Fragmente im Bereich von 1 - 4 kb ausgeschnitten, extrahiert und gereinigt (siehe Kapitel 3.7.7). Die Vektoren pET28 a, b und c wurden mit 1 U BamHI-HF bei 37 °C für 1 h linearisiert und die

5'-Phosphatgruppen an den entstandenen DNA-Enden wie in Kapitel 3.7.9 beschrieben entfernt. Der linearisierte Vektor DNA wurde anschließend gereinigt (Kapitel 3.7.5) und mit den 1 - 4 kb großen *B. bacilliformis* DNA-Fragmenten mittels T4-DNA Ligase (siehe Kapitel 3.7.10) über Nacht bei 16°C ligiert. Kompetente *E. coli* NEB 5-alpha-Zellen wurden anschließend mit den rekombinanten Plasmiden transformiert (Kapitel 3.7.12) und auf LB-Agar mit Kanamycin selektioniert. Nach einer über Nacht Inkubation wurden stecknadelkopfgroße Kolonien von den Platten abgenommen, in PBS vereinigt und die Gesamt-Plasmid-DNA isoliert (Kapitel 3.7.1). Diese isolierte Plasmid-Bibliotheken wurde verwendet, um chemisch Kompetente *E. coli* BL21 (DE3) zu transformieren. Die drei resultierenden *B. bacilliformis* Expressionsbibliotheken wurden bei -80°C gelagert. Um die Variabilität der inserierten DNA-Fragmente nachzuweisen, wurden aus jeder Expressionsbibliothek 32 zufällige Transformanten ausgewählt und mittels Kolonie-PCR (Kapitel 3.7.4) unter Verwendung der Starteroligonukleotide pET28_seq_fw und pET28_seq_rev analysiert. Die erforderliche Anzahl rekombinanter Klone, die für eine Genomabdeckung von 99% benötigt wird, wurde nach der Formel $N = \ln(1 - p) / \ln(1 - f)$ ($p=0,99$; $f=$ durchschnittliche Größe DNA-Fragmente/Genom) berechnet.

3.12.3. Immunologisches screening von *B. bacilliformis* Expressionsbibliotheken und Identifizierung der inserierten DNA-Fragmente

Die Analyse der genomischen Expressionsbibliotheken auf immunreaktive Proteine erfolgte durch Kolonie-Immunoblotting und Verwendung eines Serumpools bestehend aus den fünf reaktivsten Patientenseren (siehe Kapitel 3.9.1.1) [145]. Zur Verringerung der Rate an falsch positiven Kolonien und der Reduzierung des Hintergrundsignals wurde der Serumpool zwei Mal gegen ein ultraschallbehandeltes *E. coli* BL21 (DE3) Zellysate, bei 4°C über Nacht präadsorbiert. Für das Screening wurden jeweils 50 µl der Expressionsbibliotheken auf LB-Agarplatten (Kanamycin; 50 µg/ml) ausplattiert, um ungefähr 300 koloniebildenden Einheiten zu erhalten. Nach einer Übernacht-Inkubation wurden die stecknadelkopfgroßen Kolonien auf Nitrozellulose-Disks (GE Healthcare, Solingen, Deutschland) gestempelt und mit der Kolonieseite nach oben auf LB-Kanamycin-Agarplatten mit 1 mM IPTG gelegt, um die Proteinproduktion zu induzieren. Nach 4 Stunden Inkubation erfolgte die Zellyse der Bakterien direkt auf den Nitrozellulose-Disks durch eine 15-sekündige Inkubation mit Chloroform. Im Anschluss erfolgte die Immun-Detektion seroreaktiver Proteine wie zuvor beschrieben (Kapitel 3.9.2). Als interne Kontrolle wurde bei jedem Test ein anti-*B. bacilliformis*-Kaninchenserum verwendet. Das Kaninchen anti-*B. bacilliformis* Serum und die Patientenseren wurden dabei jeweils in einer 1:1.000 Verdünnung verwendet. Reaktive Kolonien wurden anhand ihrer Position auf der Masterplatte zurückverfolgt. Diese Kolonien wurden subkultiviert und die Serum-Reaktivität nochmals via Immuno-Blot bestätigt. Die in das Plasmid inserierten DNA-Fragmente der reaktiven Klone wurden sequenziert und durch ein Alignment mit der Genomsequenz von *B. bacilliformis* KC583 unter Verwendung von Geneious Prime identifiziert. Die

Rate der Proteinproduktion der drei Bibliotheken wurde durch Anti-T7-Tag-Immunoblotting quantifiziert.

3.12.4. Klonierung, Produktion und Western Blot Analyse von immundominanten

B. bacilliformis Proteinen

Die *in silico* vorhergesagten immunreaktiven Proteine, sowie das in der Expressionsbibliothek identifizierte Protein wurden durch heterologe Produktion und anschließender Immuno-Detektion auf ihre Reaktivität mit Patienten, Kaninchen und Blutspendenserern überprüft. Die entsprechenden Gene und pET28a Vektor-DNA wurden mittels PCR amplifiziert und unter Verwendung von NEBuilder HiFi DNA Assembly Kit assembliert (siehe Kapitel 3.7.4 und 3.7.11). Die rekombinanten Plasmide wurden anschließend durch eine Hitzeschock-Transformation in *E. coli* BL21 (DE3) eingebracht. Die Induktion der Proteinproduktion erfolgte nach der Methode von Studier durch Inkubation in ZYP-5052 Autoinduktionsmedium (Tabelle 10) für 4 h bei 37°C und anschließend für 12 h bei 28°C. Nicht-induzierte Kontrollen wurden auf gleiche Weise in ZYP-0,8G Medium (Tabelle 10) inkubiert [146]. Anschließend wurde die Zellysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert (siehe Kapitel 3.8.3 und 3.9.2). Die Proteinproduktion wurde durch anti-T7-Tag Antikörper bestätigt. Die Analyse der Seroreaktivität der Proteine erfolgte unter Verwendung eines Serumpools (bestehend aus den fünf reaktivsten Patientenserern) und mit einem anti-*B. bacilliformis* Kaninchenserum. Die Klonierung und Testung der Antigenkandidaten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Anne Wenigmann [131].

Tabelle 10: Medien zur Induktion der Proteinproduktion nach der Methode von Studier.

Komponente	ZYP-5052	ZYP-0,8G Medium
Trypton	10 g/l	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l	5 g/l
Na ₂ HPO ₄	50 mM	50 mM
KH ₂ PO ₄	50 mM	50 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	25 mM	25 mM
MgSO ₄	1 mM	1 mM
Glukose	0,5 g/l	8 g/l
Glycerol	5 g/l	-
Laktose	2 g/l	-

3.12.5. Entwicklung eines rekombinanten anti-*B. bacilliformis* Lineblots

Die Seroreaktivität der Zielproteine mit den Patienten- und Blutspenderseren wurde mittels Lineblots analysiert. Für die Herstellung der Lineblots wurden die Zielproteine (siehe Kapitel 3.8.1) mit unterschiedlichen Konzentrationen (100 µg/ml, 50 µg/ml oder 10 µg/ml) durch einen Dispenser (Frontline HR Microliter Contact, BioDot, Irvine, U.S.A.) mit einer Auftragungsrate von 0,7 µl/cm auf Nitrozellulosemembranen (GE-Healthcare) aufgetragen. Die Membranen wurden luftgetrocknet, in 3 mm breite Streifen geschnitten und bei 4°C gelagert. Für die Bestimmung der Seroreaktivität wurden die Lineblots in Probenverdünnungspuffer (NovaTec Immundiagnostica, Dietzenbach, Deutschland) äquilibriert, bevor sie für 1 h mit Serum (1:100 in Probenverdünnungspuffer) und anschließend für 30 min mit NovaLisa®-Konjugat [Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppeltes Protein A/G 1:18.000] inkubiert wurden. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Streifen dreimal mit Waschpuffer (pH 7,2; NovaTec Immundiagnostica) gewaschen und zuletzt durch 10-minütige Inkubation in 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung entwickelt. Durch Waschen mit destilliertem Wasser wurde die Farbreaktion gestoppt. Die Signalstärke der Lineblots wurde mit dem GS 900 Densitometer (BioRad) gemessen und unter Verwendung der Software Image Lab V 6.0.1 quantifiziert.

3.12.6. Entwicklung eines rekombinanten anti-*B. bacilliformis* IgG-ELISAs

Medium-bind 96-Kavitäten-Platten (Greiner, Nürtingen, Deutschland) wurden mit jeweils 0,1 µg der rekombinant exprimierten Antigene (Porin-B, Autotransporter-E und hypothetisches Protein-B) gelöst in Carbonat-Puffer (pH 9,6) über Nacht bei 4°C beschichtet. Anschließend wurde die Platten gewaschen, mit Rinderserumalbumin (BSA, 0,45% in PBS) blockiert, luftgetrocknet und bei 4°C gelagert. Pro Well wurden 100 µl Patienten- und Blutspenderseren (1:100 in Probenverdünnungspuffer) zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation mit NovaLisa®-Konjugat [HRP-gekoppeltes Protein A/G 1:18.000, RT]. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Die Entwicklung erfolgte durch 100 µl TMB für 15 Minuten und wurde durch Zugabe von 100 µl Stopplösung (NovaTec Immundiagnostica) gestoppt. Die Absorption wurde bei 450 nm mit 620 nm als Referenz in einem UV-Spektrophotometer (Sunrise, Tecan, Wiesbaden, Deutschland) gemessen. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung getestet, wobei der Mittelwert für die weitere Analyse verwendet wurde.

3.13. Identifizierung der an der Hämolyse beteiligten Pathogenitätsfaktoren

3.13.1. Transposonmutagenese

Für die Identifizierung von Hämolyse vermittelnde Pathogenitätsfaktoren wurde eine Transposonmutagenese mit den *B. bacilliformis* Stämmen KC583 und KC584 durchgeführt. Dafür wurde das EZ-Tn5 <KAN-2> Tnp Transposom verwendet, ein stabiler Komplex bestehend aus Transposase und Transposon. Das Transposon enthält das Kanamycin-Resistenzgen Tn903 (Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase), dass das von zwei 19-Basenpaar langen Mosaikenden, den

Transposase-Erkennungssequenzen, flankiert wird. Die Transformation kompetenter *B. bacilliformis*-Zellen mit dem Transposom erfolgte durch Elektroporation wie in Kapitel 3.7.13 erläutert. In den Bakterienzellen wird die Transposase durch Mg^{2+} Ionen aktiviert und vermittelt die zufällige Integration des EZ-Tn5-Transposons in die genomische DNA. Jeweils 100 μ l der Transformationsansätze wurden auf CBA-Platten mit Kanamycin ausplattiert und für 10 - 14 Tage bei 28°C inkubiert. Für die Erstellung der *B. bacilliformis* Transposonbibliothek wurden die Transposonmutanten isoliert und wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben kryokonserviert. Die Transposonbibliotheken wurden in 96-Kavitäten-Platten (pro Kavität 1 ml Bakteriensuspension) in Duplikaten bei -80°C gelagert.

3.13.2. Hämolyse screening

Die Identifizierung von Hämolyse *knock-out* Mutanten erfolgte auf CBA-Platten mit 5% (v/v) Schafsblut und 25 μ g/ml Kanamycin. Die Transposonbibliotheken wurden dafür auf Eis aufgetaut und sorgfältig resuspendiert. Jeweils 2 μ l der Bakteriensuspension wurden auf die CBA-Platten getropft und bei 28°C für 14 - 20 Tage inkubiert. Eine verlängerte Inkubationszeit von 20 Tagen war nötig, um Hämolyse gut beobachten zu können. Mutanten, die die Fähigkeit zur Hämolyse verloren hatten (Hämolyse-defiziente Mutanten), wurden in einer zweiten Runde auf gleiche Weise nochmals verifiziert. In einer dritten Runde wurde die hämolytische Aktivität auf CBA-Platten mit 5% (v/v) Humanblut verifiziert.

3.13.3. Amplifizierung der Transposon-Insertionsstelle im Genom von *B. bacilliformis*

Die Position der Transposon Insertionsstelle im Genom von Hämolyse-defizienten Mutanten wurde mittels *Single Primer* PCR und anschließender Sanger Sequenzierung (Kapitel 3.10.1) ermittelt. Bei diesem PCR-Verfahren wird lediglich ein einziges Transposon-spezifisches Starteroligonukleotid eingesetzt, sowie ein angepasstes PCR-Programm, bestehend aus drei unterschiedlichen Amplifikationszyklen. Der erste Zyklus dient der linearen Amplifikation einzelsträngiger, Transposon-spezifischer DNA und wird bei der spezifischen Anlagerungstemperatur des jeweiligen Starteroligonukleotids durchgeführt. Die Amplifikate des ersten Zyklus dienen in den nachfolgenden Zyklen als Matrize. Im zweiten Zyklus wird eine Anlagerungstemperatur von 30°C eingesetzt, um unspezifische Bindungen des Starteroligonukleotids zu erlauben. Hierbei soll die Bindung am gegenüberliegenden DNA-Einzelstrang, idealerweise in direkter Nachbarschaft zur Transposon-Insertionsstelle, erreicht werden. Dadurch werden neue Matrizen erzeugt, die Oligonukleotid spezifische Bindestellen enthalten. Der dritte Zyklus dient der weiteren Amplifikation der PCR-Produkte aus Zyklus zwei unter Verwendung der Oligonukleotid spezifischen Anlagerungstemperatur. Die verwendeten Reaktionsansätze sind in Tabelle 11 und das PCR-Programm in Tabelle 12 beschrieben.

Tabelle 11: *Single-Primer-PCR* Reaktionsansätze.

Komponente	Volumen [μ l]	Finale Konzentration
5xPCRBIO Reaktionspuffer	10	1x
Starteroligonukleotid	2	400 nM
DNA-Matrize (ca. 100 ng)	Variabel	Variabel
PCRBIO HiFi Polymerase (2 U/ μ l)	0,5	
PCR-Grad dH ₂ O	auf 50 μ l auffüllen	

Tabelle 12: *Single Primer-PCR* Programm.

	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [s]	Zyklus
initiale Denaturierung	95	60	1
Denaturierung	95	30	20
Anlagerung der Starteroligonukleotide	T _m Starter-Oligonukleotid	30	
Elongation	72	120	
Denaturierung	95	30	30
Anlagerung der Starteroligonukleotide	30	30	
Elongation	72	120	
Denaturierung	95	30	30
Anlagerung der Starteroligonukleotide	T _m Oligonukleotid	30	
Elongation	72	120	
finale Elongation	72	420	1

3.13.4. Identifizierung von Hämolyse vermittelnde Pathogenitätsfaktoren

Zur Identifizierung der Gene, die im Hämolyseprozess involviert sind, wurden die PCR-Produkte aus Kapitel 3.13.3 mit Transposon-spezifischen Oligonukleotiden (Tabelle 4) sequenziert und über ein Alignment unter Verwendung von Geneious Prime im Genom lokalisiert. Für nachfolgende Deletions- und Komplementationsexperimente wurde für die identifizierten Gene mit der Software Operon Mapper [147] überprüft, ob diese ein Bestandteil eines Operons bilden. Des Weiteren wurden die Promotersequenzen mittels BPROM [148] unter Verwendung der Basisparameter *in silico* vorhergesagt.

3.13.5. Deletion und Komplementation von *porA* und der α/β -Hydrolase

Die Deletion der Gene *porA* (Porin-A) und *hyd* (α/β -Hydrolase) erfolgte durch eine markerlose Mutagenese nach Stahl [132]. Kurz zusammengefasst wurden dafür Deletionsplasmide basierend auf dem Vektor pBIISK_ *sacB/kanR* erstellt, die ca. 1.200 bp lange stromaufwärts und stromabwärts Regionen von *porA* bzw. *hyd* enthalten. Der Vektor sowie die stromauf- und stromabwärts Regionen wurden unter Verwendung von Starteroligonukleotiden mit komplementären Überhängen (Tabelle 4)

in einer PCR amplifiziert (Kapitel 3.7.4) und unter Verwendung des NEBuilder HiFi DNA Assembly Kits nach Angaben des Herstellers assembliert (Kapitel 3.7.11). Um mögliche Effekte bei der Genexpression benachbarter Gene zu vermeiden, wurden die ersten und letzten 30 Basen von *porA* und *hyd* mitamplifiziert. Die Transformation von *B. bacilliformis* KC583 mit den entsprechenden Deletionsplasmiden erfolgte wie in Kapitel 3.7.13 beschrieben durch Elektroporation. Die Selektion von Transformanten, bei denen das Plasmid in das Genom integriert werden konnte, erfolgte auf CBA-Kanamycin-Platten für 10 - 14 Tage. Die Integration des Plasmids wurde anschließend nochmals durch eine Kolonie-PCR überprüft. Die Segregation des Plasmids erfolgte durch eine Gegenselektion auf CBA-Platten mit 10% (v/v) Saccharose für weitere 10 - 14 Tage. Zur Verifizierung der Segregation wurde der Verlust der Kanamycin Resistenz durch Kultivierung auf CBA-Kanamycin-Platten bestätigt. Die Verifizierung der Deletion erfolgte durch PCR und anschließender Sanger-Sequenzierung (Kapitel 3.10.1) der Genregion der jeweiligen Mutanten. Dabei wurden die entsprechenden Starter- bzw. Sequenzierungsoligonukleotide aus Tabelle 4 verwendet.

Die Deletionen von *porA* und *hyd* wurden unter Verwendung des Vektors pBBR1MCS-2 mit dem jeweiligen Gen komplementiert. Für die Erstellung der Komplementationsplasmide wurden die Gene mit ca. 150 - 300 bp langen Stromaufwärts- und Stromabwärtsbereichen mit Starteroligonukleotiden die eine BamHI Schnittstelle enthalten (Tabelle 4) amplifiziert. Die gereinigten Amplifikate und pBBR1MCS2 Plasmid-DNA wurden mit 1 U BamHI-HF bei 37°C für 1 h geschnitten. Mittels alkalischer Shrimp Phosphatase wurden die freien 5'-Phosphatgruppen an DNA-Enden von pBBR1MCS2 wie in Kapitel 3.7.9 beschrieben entfernt. Die geschnittenen Amplifikate und die linearisierte Vektor-DNA wurden anschließend gereinigt (Kapitel 3.7.5) und mittels T4-DNA Ligase (siehe Kapitel 3.7.10) über Nacht bei 16 °C ligiert. Kompetente *E. coli* NEB 5-alpha-Zellen wurden anschließend mit den rekombinanten Plasmiden transformiert (Kapitel 3.7.12) und auf LB-Agar mit Kanamycin selektioniert.

Für die Erstellung des Doppel-Komplementationsplasmids für *porA* und *hyd* wurden die Gene (ebenfalls mit ca. 150 - 300 bp langen Stromaufwärts- und Stromabwärtsbereichen) mit den amplifiziert, gereinigt und mittels NEBuilder HiFi DNA Assembly Kits nach Angaben des Herstellers mit pBBR1MCS2 assembliert. Die Transformation der Deletionsmutanten mit den entsprechenden Komplementationsplasmiden erfolgte mittels Elektroporation und anschließender Selektion auf CBA-Kanamycin-Platten. Die Transformanten wurden anschließend durch Sequenzierung verifiziert.

3.13.6. *In silico* Charakterisierung von PorA und der α/β -Hydrolase

Die an der Hämolyse beteiligten Pathogenitätsfaktoren Porin-A und α/β -Hydrolase wurden *in silico*, ähnlich zu bestehenden Protokollen, näher charakterisiert [149]. Um das Vorhandensein von Porin-A und der α/β -Hydrolase in anderen *B. bacilliformis* Stämmen zu überprüfen, wurde eine NCBI BlastP

Suche gegen die nicht redundante Protein-Datenbank durchgeführt. Für die Homologieanalysen von Porin-A und der α/β -Hydrolase wurden die entsprechenden Aminosäuresequenzen von 16 weiteren *B. bacilliformis* Stämmen bzw. Isolaten extrahiert und in einem multiplen Sequenzalignment durch die Software Clustal Omega auf Sequenzidentität überprüft. Unterschiedliche physikalische und chemische Eigenschaften wie molekulare Masse, isoelektrischer Punkt, Extinktionskoeffizient, Stabilitätsindex, aliphatischer Index und GRAVY (durchschnittliche Hydrophobizität) wurden von Porin-A und der α/β -Hydrolase mit ProtParam analysiert [150]. Die subzelluläre Lokalisation von Porin-A und der α/β -Hydrolase wurden mittels PSORTb Version 3.0.3, CELLO v.2.5 und LocTree3 vorhergesagt [151–153]. Die Identifizierung von Signalpeptiden erfolgte durch SignalP 6.0 [154]. Für die Motiv- und Domänenanalyse wurden die Softwareanwendungen NCBI Conserved Domain Search Service (CD Search), Pfam und InterProScan verwendet [155–157]. Vorhersagen zur Proteinfaltung von Porin-A und der α/β -Hydrolase erfolgten unter Verwendung von Colabfold, bei der MMSeqs2 Homologiesuche mit AlphaFold2 Strukturvorhersagen kombiniert werden [158,159]. Als Eingabe wurden die entsprechenden Proteinsequenzen nach Entfernung der Signalsequenzen verwendet. Die Vorhersage der Proteinfaltung erfolgte unter Verwendung der Standardeinstellungen. Die Ergebnisse wurden in UCSF ChimeraX 1.2.5 visualisiert [160].

3.13.7. Hämolyse-Test mit humanen und murinen Erythrozyten

Die *B. bacilliformis* Hämolyse wurde mittels Erythrozyten Infektion und nachfolgender photometrischen Messung des Überstandes untersucht. Dazu wurden 10^7 humane Erythrozyten wie zuvor beschrieben (Kapitel 3.6.5) mit unterschiedlichen MOIs in einer 96-Kavitäten-Platten infiziert und für 20 h inkubiert. Für die Messung der Hämolyse wurden die Platten bei 500 g zentrifugiert, 100 μ l des Überstands vorsichtig abgenommen und in eine Flachboden 96-Kavitäten-Platten transferiert. Die Messung des freien Hämoglobins erfolgte photometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 541 nm in einem UV-Spektrophotometer (Sunrise, Tecan).

3.14. Statistik

Für die statistische Analyse der Lineplot- und ELISA-Tests wurden die Varianzen innerhalb der Gruppen mit dem Shapiro-Wilk-Normalitätstest überprüft. Da diese nicht normalverteilt waren, wurden die Unterschiede in der IgG-Reaktivität gegenüber den Zielproteinen zwischen den Versuchs- und Kontrollgruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit der ELISAs wurde eine *Receiver-Operating-Characteristic*-Analysen durchgeführt. Dabei wurde die Fläche unter der Kurve (AUC), Cut-off-Werte sowie Sensitivität und Spezifität (Konfidenzintervall von 95%) berechnet. Um die Signifikanz zwischen den Hämolyse-Mutanten zu testen, wurde eine einfaktorische ANOVA mit Sidaks multiplen Vergleichstest durchgeführt. Hierbei galt ein p-Wert $> 0,05$ als nicht signifikant und p-Werte $\leq 0,05$ als signifikant. Die statistischen Analysen wurden mit Prism V6 durchgeführt.

3.15. Verwendete Chemikalien, Enzyme, Kits und Software

Im Folgenden werden die verwendeten Chemikalien, Enzyme, Kits und Softwareanwendungen tabellarisch aufgelistet. Die verwendeten Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 13 zu finden.

Tabelle 13: Verwendete Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller	Katalognummer
A		
Acrylamid-Bisacrylamid	Roth	3029.1
Agar	BD	214010
Agarose	Sigma-Aldrich	A9539
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad	131-0700
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich	A4418
Ampicillin	Sigma-Aldrich	A9518
B		
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich	A7030
C		
Caseinpepton	Roth	8986.1
Columbia-Agar-Basis	Becton Dickinson	211124
Columbia-Blutagar-Platten (5% Schafsblut)	Becton Dickinson	254005
Chloroform	Sigma-Aldrich	288306
D		
4',6-Diamidin-2-Phenylindol	Sigma-Aldrich	D8417
Dimethylsulfoxid	Roth	A994.2
di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Sigma-Aldrich	1.37092
DNA ladder 100 bp	NEB	N0551
DNA ladder 1kb	NEB	N3232
Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung	Gibco	14190-169
E		
EDTA Dinatriumsalz	J.T. Baker	1073
ELISA Stopplösung	Novatec	-
Erythromycin	Roth	4166.1
Ethanol (absolut)	Sigma-Aldrich	32221
F		
Fötale Kälberserum	Sigma-Aldrich	F7524
Fluoreszenzmontagemedium	Dako	S3023
G		
Glycerol	Sigma-Aldrich	G-6279
Glycin	Roth	3783.2
Glukose	Sigma-Aldrich	G8270

Weiterführung Tabelle 13**H**

Hefeextrakt	BD	212750
-------------	----	--------

I

Imidazol	Roth	3899.4
Instant Blue	Expedeon	ISB1L
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	Roth	2316.1
Isotone Kochsalz-Lösung 0,9%	Braun	08646871

K

di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth	P749.1
Kobaltmatrix	ABT	6BCL-QHCo-X
Kanamycin Monosulfat	MP	150029

L

Laemmli Probenpuffer (2X)	Sigma-Aldrich	S3401
Laktose	Sigma-Aldrich	17814
Luria/Miller broth (LB) Basis	Roth	X968.1
Luria/Miller broth (LB Agar Basis)	Roth	X969.1
Ladepuffer Agarosegel (6X)	NEB	B7024

M

Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich	M8266
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich	203726
Methanol	Sigma-Aldrich	32213
Midori Green Direct	Nippon Genetics	MG06

N

Natriumchlorid	Sigma-Aldrich	31434
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich	L5750
Natriumhydroxid	VWR	31627.290
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich	S5011

P

Paraformaldehyd	EMS	15710
Penicillin-Streptomycin Mix	Gibco	15140122
phosphatgepufferte Salzlösung	Gibco	11503387
Protein ladder pre-stained	Thermo Fisher Scientific	26619

S

Saccharose	Thermo Fisher Scientific	J65148.36
Salzsäure	Roth	T134.1
Schneiders <i>Drosophila</i> -Medium	SERVA	47521
Sojapepton	Roth	2365.1
SuperSignal Chemilumineszenz-Substrat	Thermo Fisher Scientific	34577

T

TEMED	Roth	2367.3
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	Novatec	-
Tris	AppliChem	A1086.1000

Weiterführung Tabelle 13

Triton X-100	AppliChem	A1388.0500
Trypanblaulösung	Gibco	15250061
Trypton	Gibco	211705
Trypsin/EDTA	Gibco	25300054
Tween 20	Roth	9127.1
U		
Urea	Riedel-de Haen	33247

Die verwendeten Enzyme sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14: Verwendete Enzyme.

Enzym	Hersteller	Katalognummer
alkalische Shrimp-Phosphatase	NEB	M0371
BamHI-HF	NEB	R3136
PCRBIO HiFi-DNA-Polymerase	PCRBIO SYSTEMS	PB10.41-02
Sau3AI	NEB	R0169
T4 DNA Ligase	NEB	M0202

In Tabelle 15 werden alle Kits, die für die Anfertigung dieser Arbeit verwendet wurden, aufgeführt.

Tabelle 15: Verwendete Kits

Kit	Hersteller	Katalognummer
Bradford-Protein Assay Kit	BioRad	5000001
EZ-Tn5 <KAN-2> Tnp Transposome Kit	Epicentre	-
MagAttract HMW Kit	Qiagen	67563
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen	28604
NEBuilder HiFi DNA Assembly Kit	NEB	E2621
NucleoBond Xtra Maxi Kit	Macherey-Nagel	740414.50
NucleoSpin Plasmid Mini Kit	Macherey-Nagel	740588.50
QIAamp DNA Mini Kits	Qiagen	56304
QIAquick PCR Purification Kits	Qiagen	28104
Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kits	Invitrogen	P7589

Die verwendeten Softwareanwendungen sind in Tabelle 16 aufgelistet.

Tabelle 16: Verwendete Software.

Software	Hersteller/Referenz
CLC Genomics Workbench 12.0.3	Qiagen, Hilden, Deutschland
Clustal Omega	EMBL-EBI, Cambridge, UK
FastQC V0.11.8	Babraham Institute Enterprise, Cambridge, UK
Geneious Prime V020.2.4	Biomatters, Auckland, Neuseeland
ImageLab V6.0.1	BioRad, Dreieich, Deutschland
MAUVE V20150226 Build 10	[143]
Minimap2	[141]
NCBI Prokaryotic Genomes Annotation Pipeline	National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA
Photoshop	Adobe Systems, CA, USA
Prism V6	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Prokka V1.14.6	[161]
ProtParam	ExpPASy, Lausanne, Schweiz
BLAST	National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA
SMRT Link V5.1.0.26412	Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA
Unicycler V0.4.8	[140]
Vaxign	[144]
VisiView V2.0.5	Visitron Systems, Puchheim, Deutschland

4. Ergebnisse

4.1. Genomanalyse von verschiedenen *B. bacilliformis* Stämmen und Isolaten

Für die Entwicklung eines serologischen Tests zum Nachweis von anti-*B. bacilliformis*-Antikörpern sollten immundominante Proteine durch Genomanalysen unter Zuhilfenahme von reverser Vakzinologie vorhergesagt werden. Zum Ausschluss stammspezifischer Ergebnisse wurden die Genomsequenzen der beiden *B. bacilliformis* Stämme KC583 und KC584 für die Vorhersage immunreaktiver Proteine verwendet. Da von Stamm KC584 noch keine Genomsequenz verfügbar war, wurde eine *de novo* Sequenzierung vorgenommen. Dabei wurde ein hybrider Ansatz aus Illumina *paired-end*-Sequenzierung und PacBio *Single Molecule Real-Time* (SMRT) Sequenzierung verfolgt [8]. Für *B. bacilliformis* KC584 ergab die Illumina-Sequenzierung 1.266.387 *read* Paare, die zu 23 *contigs* zusammengefasst werden konnten. Davon wiesen 14 *contigs* eine Länge von über 500 bp auf. Bei der PacBio Sequenzierung wurden insgesamt 2,89 Giga-Basenpaare (Gb) mit 1.020.607 *subreads* generiert, welche durch zirkuläre Konsensus-Sequenzierung (CCS) in 37.022 CCS *reads* mit insgesamt 165,31 Mega-Basenpaaren (Mb) zusammengefasst werden konnten. Für KC583 war zwar bereits eine vollständige Genomsequenz verfügbar, jedoch wurde zur Sicherstellung einer vergleichbaren Sequenzqualität der laboreigene KC583 Stamm mittels PacBio SMRT ebenfalls sequenziert. Die Sequenzierung erbrachte insgesamt 2,68 Gb mit 868.857 *subreads*, welche in 33.425 CCS *reads* mit 163,4 Mb zusammengefasst werden konnten. Nachdem die Qualität aller Sequenzen überprüft wurde, erfolgte eine hybride *de novo* Assemblierung unter Verwendung der entsprechenden Pac-Bio und Illumina Sequenzen. Da für KC583 im Rahmen dieser Arbeit keine Illumina Sequenzierung angefertigt wurde, wurden für die Assemblierung die Illumina Sequenzen des zuvor sequenzierten Referenzgenoms NC_008783.1 verwendet. Für KC583 resultierte die Assemblierungen und Genom-Annotation in einer geschlossenen Sequenz mit einer Größe von 1.417.364 bp und 1.209 Genen und für KC584 in einer geschlossenen Sequenz von 1.411.580 bp mit 1.200 Genen. Beide Genome weisen einen GC-Gehalt von 38,2% auf.

Für eine detaillierte Sequenzanalyse wurden die Genome von KC583 und KC584 mit der Referenzsequenz von KC583 (NC_008783.1; 1.445.021 bp) verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Sequenz von NC_008783.1 eine repetitive 30 kb große Sequenz aufweist, die in den Stämmen KC583 und KC584 nicht zu finden ist (Abbildung 9). Der Vergleich zu NC_008783.1 zeigt außerdem, dass bei KC583 vier zusätzliche Gene und bei KC584 22 Gene von Mutationen betroffen sind (siehe Anhang Tabelle 24). Darüber hinaus zeigte die Analyse, dass im Genom von KC584 eine größere Deletion zum Verlust des Gens *bbadB* (BARBAKC583_RS1505), das für ein Trimeres-Autotransporter-Adhäsion kodiert, geführt hat. Im Zuge dieser Deletion kam es zu einer Fusion der beiden benachbarten Gene BARBAKC583_RS1500 und -RS1510. Die Qualitätsprüfung der Sequenzierung sowie die Assemblierung und Annotation der Genome erfolgte in Zusammenarbeit mit

Dr. Tilman Schultze (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universitätsklinikum Frankfurt) [8].

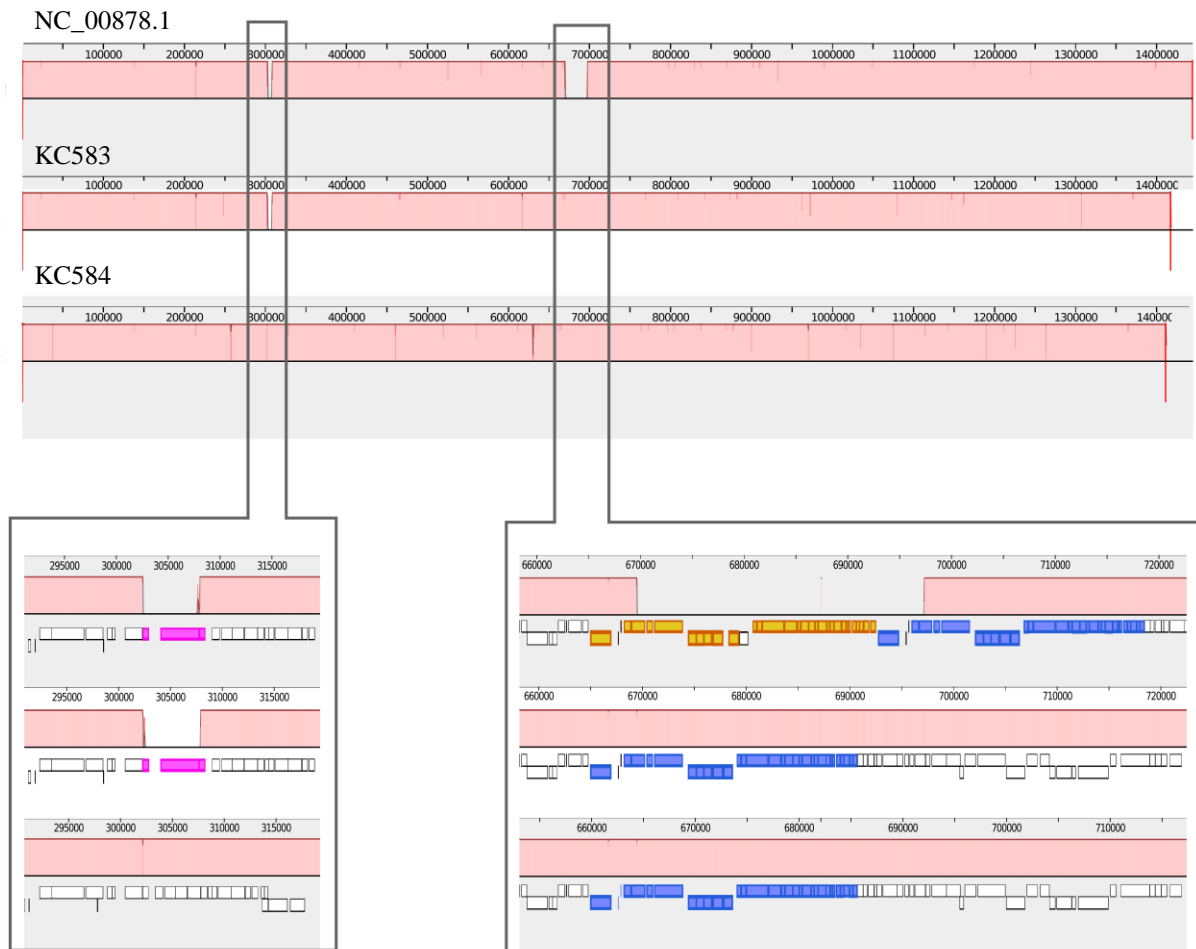


Abbildung 9: Genomvergleich von *B. bacilliformis* KC583 und KC584. Die sequenzierten Genome von KC583 und KC584 wurden mit der zuvor veröffentlichte KC583 Sequenz (NC_008783.1) verglichen. In den beiden Kästen sind die variablen Regionen, die mehr als ein Gen betreffen, dargestellt. Der rechte Kasten zeigt zwei Genecluster (orange und blau gefärbt) einer 30 kb großen repetitiven Region im Genom von NC_008783.1 von denen nur ein Satz in den Sequenzen von KC583 und KC584 vorhanden ist. Im linken Kasten ist der Genlocus, der *bbadB* umfasst, dargestellt. Die zwei pink gefärbten Gene *ialB* (BARBAKC583_RS01500) und *bbadB* (BARBAKC583_RS01505) sind im Genom von KC584 nicht vorhanden. Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Tilman Schultze (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universitätsklinikum Frankfurt) erstellt. Verändert nach [162].

4.2. Identifizierung immundominanter *B. bacilliformis*-Proteine

4.2.1. Reverse Vakzinologie

Die Methodik der reversen Vakzinologie wurde bereits erfolgreich zur Identifizierung immundominanter Antigenkandidaten bei Gruppe-B-Streptokokken und Gruppe-B-Meningokokken eingesetzt [163,164]. Da nur begrenzt Kenntnisse über immundominante Proteine von *B. bacilliformis* vorliegen [23], wurde eine umfassende reverse Vakzinologie-Strategie zur Vorhersage potenziell immundominanter Proteine angewandt, bei der 1.209 Proteinsequenzen von Stamm KC583 und 1.200 Proteinsequenzen von Stamm KC584 in einer dynamischen Vaxign-Analyse *in silico* auf immunogene Eigenschaften untersucht wurden. Da sekretierte und oberflächenexponierte Proteine dem Immunsystem meist direkt ausgesetzt sind und insbesondere Adhäsine ideale immunogene Ziele darstellen, wurde die Antigen-Vorhersage auf Außenmembranproteine und extrazelluläre Proteine beschränkt und diese auf die Wahrscheinlichkeit, Adhäsine zu sein untersucht. Insgesamt wurden so 20 potenziell immundominante Proteinkandidaten identifiziert (Tabelle 17), darunter 15 Außenmembranproteine und fünf extrazelluläre Proteine. Dabei wurden kleinere Proteine wie z. B. das hypothetische Protein-A mit einer Länge von 124 Aminosäuren (AS) bis hin zu großen Proteinen wie BbadA mit einer Länge von 1.259 AS als potenziell immunreaktiv identifiziert. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei den Proteinkandidaten um ein Adhäsine handelt, liegt zwischen 0,401 für Flagellin und 0,872 für das hypothetische Protein-B. Interessanterweise wurde BbadB, ein Homolog zum immundominanten BadA aus *B. henselae*, nicht als potenzielles immundominantes Protein identifiziert, da die Software die subzelluläre Lokalisierung des Proteins nicht bestimmen konnte.

Tabelle 17: Potenziell immundominante Antigenkandidaten von *B. bacilliformis*. Die 22 gelisteten Proteine wurden *in silico* durch (a) eine Vaxign-Analyse oder (b) experimentell durch genomische *B. bacilliformis* Expressionsbibliotheken (siehe Kapitel 3.12.3) identifiziert. Aufgrund der hohen Homologie zum immundominanten BadA aus *B. henselae* wurde zusätzlich BbadB (c) ausgewählt. Aufgeführt ist die Proteinlänge (Anzahl an Aminosäuren), sowie die durch Vaxign vorhergesagte Proteineigenschaften (zelluläre Lokalisierung, Adhäsionswahrscheinlichkeit und Transmembranhelices). Die Proteine wurde in folgende Gruppen eingeteilt (I) Flagellum-assoziierte Proteine, (II) Autotransporter, (III) Porine, (IV) andere Außenmembranproteine. Verändert nach [162].

#	Protein-ID	Bezeichnung	zelluläre Lokalisierung	Adhäsionswahrscheinlichkeit	Transmembranhelix	Länge (AS)
1 ^a	WP_005765706.1	AprI/Inh (IV)	OM, 0,992	0,437	0	177
2 ^a	WP_005766217.1	BbadC (II)	OM, 1,000	0,643	0	551
3 ^a	WP_005766273.1	hypothetisches Protein-A (IV)	OM, 0,992	0,698	1	124
4 ^a	WP_005766494.1	Porin-A (III)	OM, 0,992	0,689	0	406
5 ^a	WP_005766517.1	TonB-abhängiger Rezeptor (IV)	OM, 1,000	0,464	0	731
6 ^a	WP_035453117.1	LptD (IV)	OM, 1,000	0,735	1	791
7 ^a	WP_005766622.1	Autotransporter-A (II)	OM, 0,983	0,652	0	800
8 ^a	WP_005766636.1	LysM (IV)	OM, 0,886	0,453	0	397
9 ^a	WP_005767307.1	DUF1561 (IV)	EZ, 0,965	0,610	0	649
10 ^a	WP_005767360.1	BbadA (II)	OM, 0,995	0,861	0	1,259
11 ^a	WP_011807398.1	Flagellin (I)	EZ, 0,971	0,401	0	380
12 ^a	WP_005767706.1	Autotransporter-B (II)	OM, 0,949	0,561	0	1.193
13 ^a	WP_005767730.1	FlgE (I)	EZ, 1,000	0,751	0	404
14 ^a	WP_051007750.1	hypothetisches Protein-B (IV)	EZ, 0,965	0,872	0	610
15 ^a	WP_193741240.1	Autotransporter-C (II)	EZ, 0,964	0,652	0	297
16 ^a	WP_005767753.1	Autotransporter-D (II)	OM, 0,952	0,855	0	825
17 ^a	WP_005767762.1	FlgH (I)	OM, 0,992	0,410	1	230
18 ^a	WP_005767896.1	Porin-B (III)	OM, 1,000	0,424	0	284
19 ^a	WP_005767899.1	Pap31 (III)	OM, 0,993	0,534	0	300
20 ^a	WP_005767902.1	Porin-C (III)	OM, 1,000	0,493	0	281
21 ^b	WP_011807413.1	Autotransporter-E (II)	OM, 0,992	0,351	0	1.058
22 ^c	WP_005766221.1	BbadB (II)	Vorhersage nicht möglich	0,670	1	1.235

OM = Außenmembran, EZ = extrazellulär

4.2.2. Evaluierung der Carrión-Krankheit Patientenseren

Für die Untersuchung der Immunogenität von potenziellen Antigenen wurde eine Serumbank bestehend aus 26 Serumproben von Patienten, die nachweislich an der Carrión-Krankheit erkrankt waren, evaluiert. Diese Serumproben wurden von der Kollaborationspartnerin Dr. Palmira Ventosilla (UPCH, Lima, Peru) zur Verfügung gestellt. Zur Bestimmung des anti-*B. bacilliformis* IgG-Titers der Patientenseren wurde ein neuer *B. bacilliformis* IFT in Anlehnung an bereits existierende Protokolle von *B. henselae* entwickelt. [31,137]. Dieser IFT-Test wurde mit Kaninchen anti-*B-bacilliformis*-Serum (technische Positivkontrolle) validiert und zeigte eine Reaktivität bis zu einem Titer von 1.600, während Kaninchen-Präimmunserum und Kontrollserum eines nicht erkrankten Blutspenders nicht reaktiv waren (d. h. keine spezifischen Fluoreszenzsignale bei Titern unter 80). Zwölf (46%) der 26 Patientenseren wurden mit einem Titer von 320 positiv auf *B. bacilliformis* IgG-Antikörper getestet (Proben 1, 2, 4, 6-9, 16, 17, 19, 23 und 24). Drei repräsentative IFT-positive Proben sind in Abbildung 10 A dargestellt und zeigen eine starke Fluoreszenz bei einem Titer von 320. Des Weiteren wiesen elf (42%) Proben einen Titer zwischen ≥ 80 und < 320 auf und konnten in Bezug auf Reaktivität deshalb nicht eindeutig eingestuft werden (Proben 3, 5, 10, 11, 13-15, 18, 21, 25 und 26) wohingegen drei (12%) Patientenseren mit einem Titer unter 80 als IgG-negativ klassifiziert wurden (Proben 12, 20 und 22). Alle Patientenseren wurden zusätzlich in Immunoblots, unter Verwendung von *B. bacilliformis* Gesamtzell-Lysate, auf ihre IgG-Reaktivität untersucht. Hierbei zeigten die Seren 1, 2, 4, 8, 9 die stärkste Reaktivität mit dem *B. bacilliformis* Zellysate (Abbildung 10 B). Die reaktivsten Patientenseren aus IFT und Immunoblots (Seren Nr. 1, 2, 4, 8, 9) wurden in gleichen Teilen gemischt und als Serumpool für das Screening von Expressionsbibliotheken sowie für die Analyse der *in silico* vorhergesagten Antigenkandidaten eingesetzt.

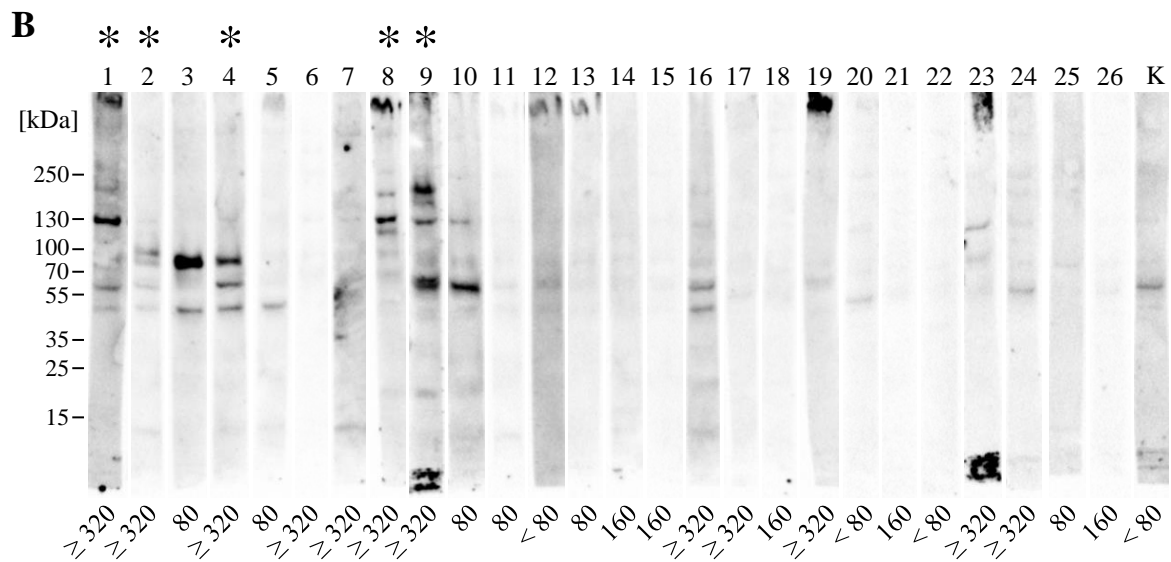
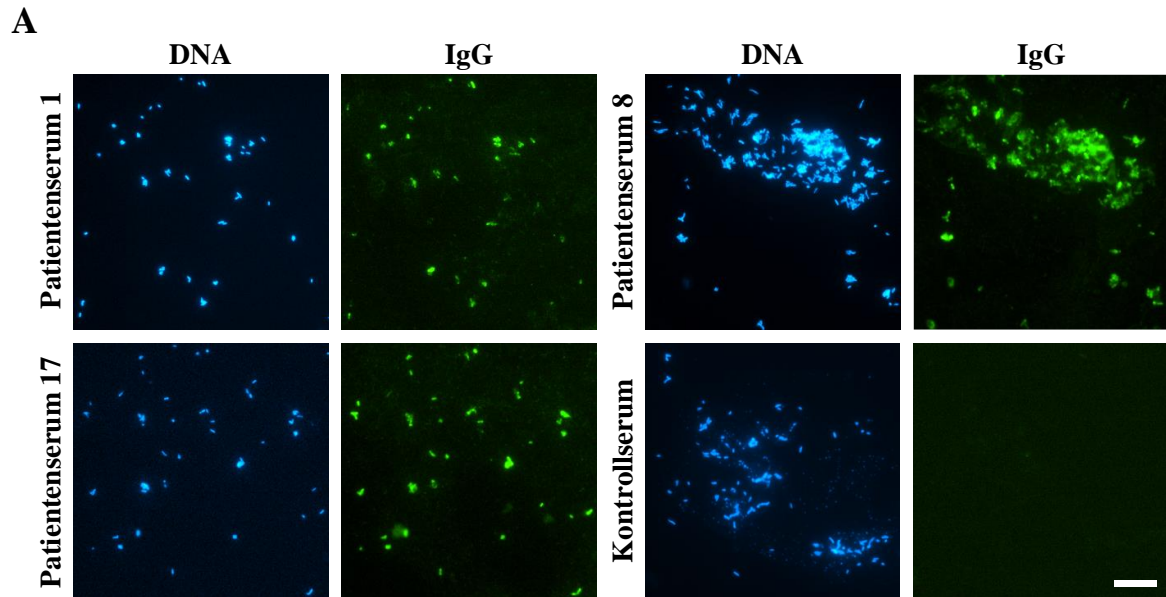


Abbildung 10: Evaluierung der Reaktivität von Patientenseren mit *B. bacilliformis*. **(A)** Für die IFT-Analysen wurden *B. bacilliformis* KC583 infizierte HeLa-229-Zellen als Antigen verwendet und mit Patientenseren und Kontrollseren in einer Verdünnung von 1:80 bis 1:320 auf Serumreaktivität getestet. Die Patientenseren 1, 8, und 17 zeigten bei einer Verdünnung von 1:320 eine hellgrüne Fluoreszenz (Alexa Fluor® 488), während die Kontrollseren keine Fluoreszenz zeigten. Als technische Kontrolle wurde das Antigen (*B. bacilliformis*) mit DAPI (hellblau) gegengefärbt. Belichtungszeit: 200 ms, Maßstabsbalken: 10 μ m. **(B)** 26 Serumproben von Patienten mit der klinischen Diagnose einer *B. bacilliformis*-Infektion wurden auf Reaktivität gegen *B. bacilliformis* KC583 Gesamtzell-Lysate mittels Western Blots getestet. Serum eines nicht erkrankten gesunden Blutspenders diente als Negativkontrolle (K). Die IFT-Titer der Patientenseren sind unterhalb der Western Blots angegeben. Die mit * gekennzeichneten Serumproben wurden in gleiche Volumina vereinigt und für die anschließende Analyse der Expressionsbibliotheken und der rekombinant exprimierten Zielproteine verwendet. Verändert nach [162].

4.2.3. Analyse und *screening* der heterologen *B. bacilliformis* Expressionsbibliotheken

Genomische Expressionsbibliotheken haben sich als wertvolle Werkzeuge für die Identifizierung immunogener Proteine erwiesen [165]. Daher wurden, ergänzend zur Reversen-Vakzinologie, induzierbare genomische *B. bacilliformis* Expressionsbibliotheken hergestellt und auf die Produktion immundominanter Proteine untersucht. Für diesen Zweck wurden 1 - 4 kb große Fragmente genomischer *B. bacilliformis* DNA in drei unterschiedlichen Leserahmen in Expressionsplasmide inseriert. Eine Transformation von *E. coli* DH5 α mit den erstellten Plasmiden resultierte in insgesamt 24.700 rekombinanten Klonen (pET28a: ca. 9.100; pET28b: ca. 5.400; pET28c: ca. 10.200 Klone), die eine durchschnittliche DNA-Fragmentgröße von 1.900 bp aufweisen und mehr als 99% des Genoms von *B. bacilliformis* KC583 abdecken. Anschließend wurden für jeden Leserahmen die Klone vereinigt und eine Gesamt-Plasmidisolierung durchgeführt, um drei induzierbare *B. bacilliformis* Expressionsbibliotheken in *E. coli* BL21 (DE3) zu erstellen. Um die Redundanz der Fragmente in der Expressionsbibliothek überprüfen zu können, wurden 32 zufällige Klone ausgewählt und mittels Kolonie-PCR analysiert (siehe Anhang Abbildung 29). Dabei ergab sich für alle drei Expressionsbibliotheken eine hohe Variabilität in den Fragmentgröße zwischen den jeweils analysierten Klonen. Des Weiteren wurde durch eine Analyse der Proteinproduktion mit T7-Tag Antikörpern eine Expressionsrate von > 96% (321/332 Kolonien) bestimmt. Als Nachweis der Funktionsfähigkeit der Expressionsbibliotheken wurde ein *Screening* von 4.500 Kolonien mit Kaninchen-anti-*B. bacilliformis*-Serum durchgeführt. Hierbei konnten zwei Proteine (GroEL, Flagellin) erfolgreich als exprimiert identifiziert werden, was die grundsätzliche Funktionsfähigkeit der Bibliotheken belegt.

Für die Identifizierung von immundominanten *B. bacilliformis* Proteinen wurden die Expressionsbibliotheken mit dem Patienten-Serumpool untersucht (Abbildung 11). Insgesamt wurden 7.435 Kolonien analysiert, dies führte zur Identifizierung von sechs reaktiven Klonen. Die Sequenzanalyse der jeweiligen Plasmide ergab, dass alle sechs Kolonien Genfragmente enthielten, die für das Außenmembranproteinen „Autotransporter-E“ (ID: WP_011807413.1, Tabelle 17) kodieren.

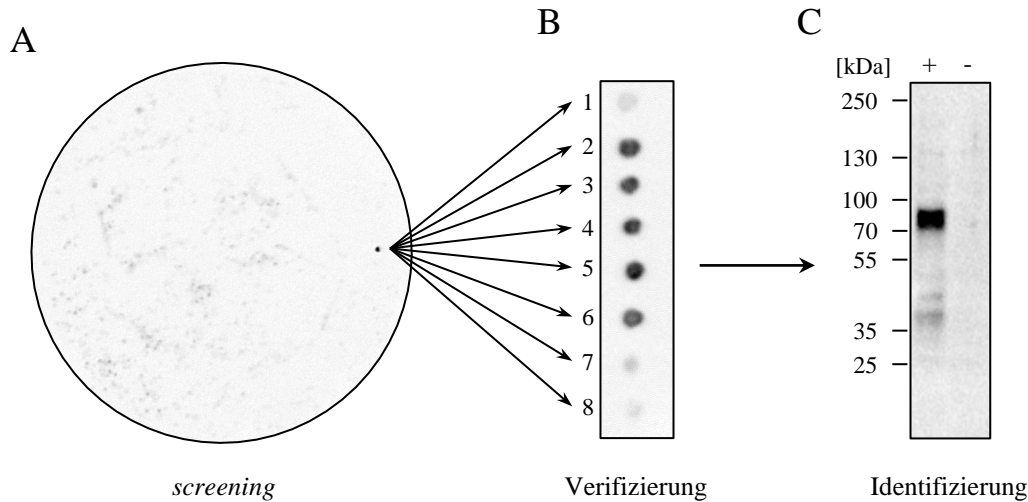


Abbildung 11: Analyse der *B. bacilliformis* Expressionsbibliotheken. (A) Das Screening der Expressionsbibliothek resultierte in einer reaktiven Kolonie (schwarzer Punkt auf der Nitrocellulose-Disk), die anschließend isoliert und vereinzelt wurde. (B) Zur Verifizierung der Serum Reaktivität wurden acht Sub-Klone erneut durch Kolonie-Blots mit Patientenserum getestet. (C) Der reaktive Sub-Klon 5 wurde anschließend mittels Western Blot und Plasmid-Sequenzierung weiter analysiert. Dabei wurde in der durch IPTG induzierten Kultur (+) ein 75 kDa-Fragment des Autotransporter-E nachgewiesen, während in der nicht-induzierten Kultur (-) kein Signal zu erkennen war. Verändert nach [162].

4.2.4. Systematische Analyse von *B. bacilliformis* Zielproteinen

Für eine systematische Analyse der Immundominanz wurden alle 22 Antigenkandidaten (Tabelle 17) in Zusammenarbeit mit Frau Anne Wenigmann [131] in pET28a Expressionsplasmide eingebracht und heterolog in *E. coli* BL21 (DE3) produziert. Durch eine Western Blot Analyse mit anti-T7-Tag Antikörper wurde die erfolgreiche Proteinsynthese für alle Antigenkandidaten mit Ausnahme von AprI/Inh nachgewiesen werden, weshalb AprI/Inh in allen nachfolgenden Analysen nicht weiter mit einbezogen wurde. Die immunologische Analyse der Antigenkandidaten resultierte in sechs reaktiven Proteinen (LysM, BbadA, Flagellin, FlgE, Pap31 und BbadB) mit *anti-B. bacilliformis* Kaninchenserum und in 14 Proteinen (hypothetisches Protein-A, Porin-A, TonB-abhängiger Rezeptor, LysM, DUF1561, BbadA, hypothetisches Protein-B, Autotransporter-C, FlgH, Porin-B, Pap31, BbadC, BbadB und Autotransporter-E), die Reaktivität mit den humanen Patientenserum zeigten (Abbildung 12).

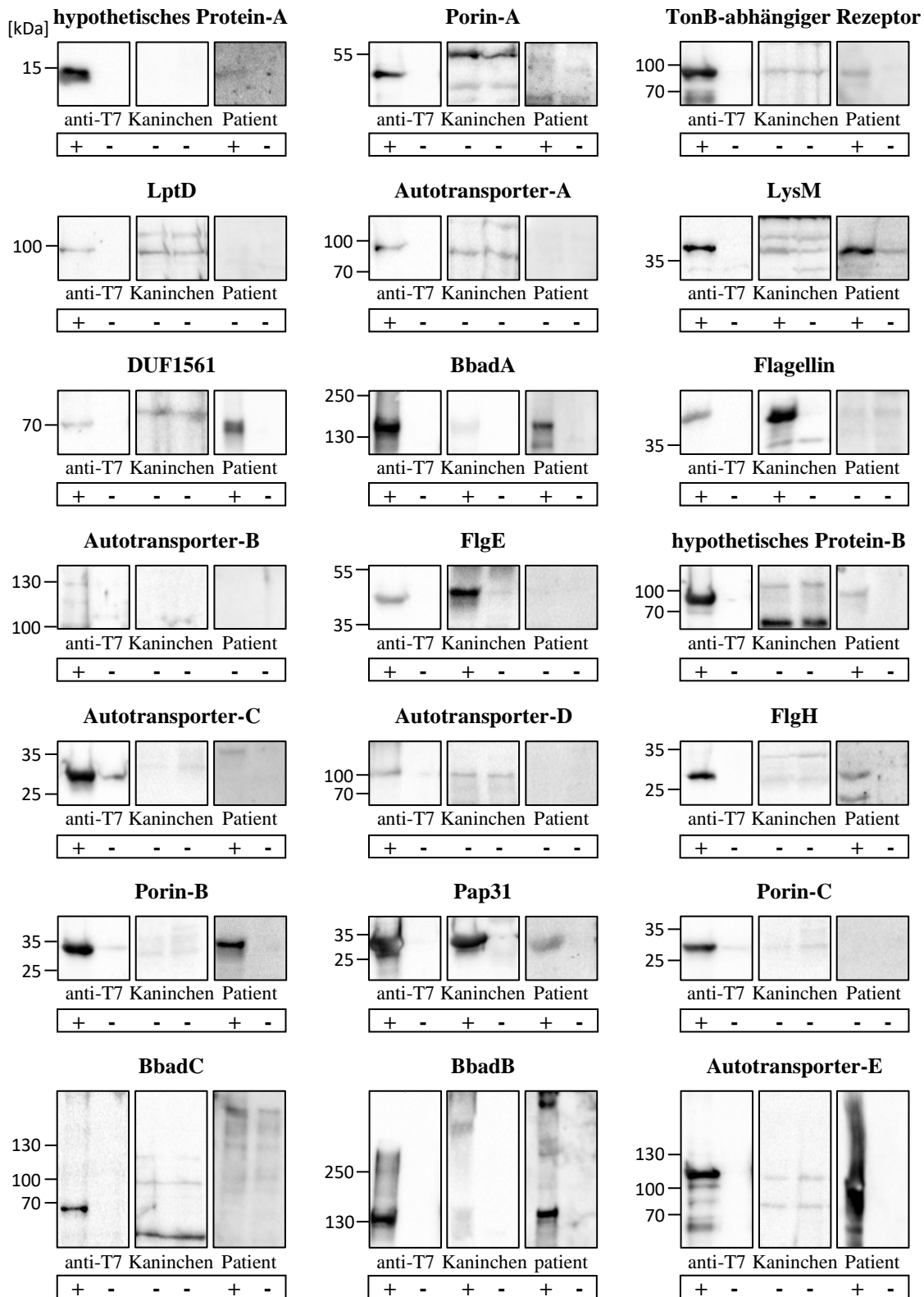


Abbildung 12: Systematische Analyse von *B. bacilliformis* Zielproteinen. Alle Antigenkandidaten wurden in *E. coli* BL21 (DE3) heterolog produziert und in Western Blots analysiert (linke Spure: induzierte Expression, rechte Spure: nicht induziert). Die Proteinproduktion wurde durch T7-Tag-Antikörper (Anti-T7; technische Kontrolle) bestätigt. Für die Analyse der Immunreaktivität wurde das Serum eines *B. bacilliformis* immunisierten Kaninchens und ein Pool von fünf IFT- und Western-Blot positiven Patientenseren verwendet. Die Reaktivität ist für jedes Zielprotein einzeln angegeben ("+" reaktiv und "-" nicht reaktiv). Die Western-Blots wurden in Zusammenarbeit mit Frau Anne Wenigmann [131] erstellt. Abbildung verändert nach [162].

4.2.5. Serologische Evaluierung immunreaktiver *B. bacilliformis*-Proteine mittels Lineblots

Die 14 identifizierten seroreaktiven Proteine wurden anschließend in verschiedenen Konzentrationen auf Lineblots aufgetragen (2,1 ng, 10,5 ng oder 21 ng pro Antigenlinie; 13 A, B). Aufgrund der starken Reaktivität mit humanen Kontrollseren wurde LysM von weiteren Analysen ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Für die Evaluierung der Antigenkandidaten wurden die Patientenseren in drei Gruppen eingeteilt: (I) IFT-positive Patientenseren mit einem anti-*B. bacilliformis* IgG Titer ≥ 320 ; (n = 12), (II) nicht eindeutige oder negative Patientenseren mit einem Titer < 320 (n = 14) und zur Kontrolle (III) Seren von gesunden Blutspendern ohne Reisevorgeschichte nach Südamerika (n = 96). Keines der getesteten Humansenen zeigte ein spezifisches Signal für BbadC, Porin-A, den TonB-abhängigen Rezeptor, FlgH, hypothetische Protein-A und Autotransporter-C, wohingegen DUF1561 mit den Kontrollseren hoch reaktiv war (n = 11/96; 11,5 %). Sowohl BbadA als auch BbadB reagierten mit n = 1/12 (8,3%) der IFT-positiven Patientenseren und waren hochreaktiv mit den Kontrollseren (BbadA n = 10/96; 9,6% bzw. BbadB n = 6/96; 6,3%). Pap31 zeigte kaum Reaktivität mit IFT positiven (n = 1/12; 8,3%) oder im IFT uneindeutigen Patientenseren (n = 1/14; 7,1%), und wies keinen statistisch signifikanten Unterschied zu den Kontrollseren auf (13 C). Das hypothetische Protein-B reagierte mit n = 2/12 (16,6%) und Porin-B mit n = 3/12 (25%) der IFT-positiven Seren, beide wiesen in ihrer Reaktivität einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf ($p < 0,05$). Autotransporter-E zeigte die stärkste Reaktivität mit den Patientenseren unter den getesteten Antigenen. Hier zeigten n = 7/12 (58,3%) der IFT-positiven Patientenseren Reaktivität, wohingegen keines der Kontrollseren ein Signal zeigte ($p < 0,05$). Interessanterweise erwiesen sich zwei der zwölf IFT-positiven Seren (Patientenserum Nr. 16 und Nr. 17) mit keinem getesteten Antigen als reaktiv.

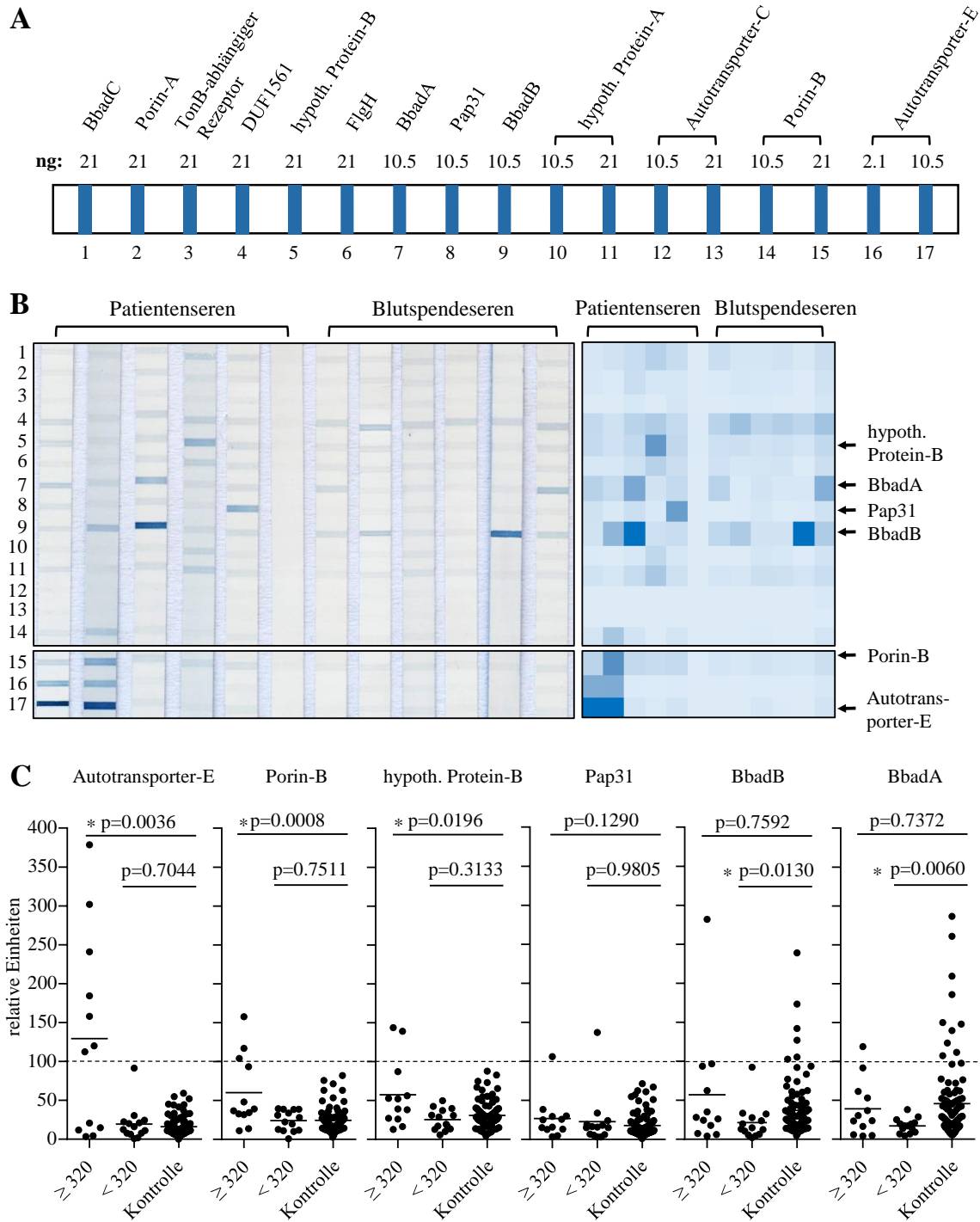


Abbildung 13: Lineblot-Analysen seroreaktiver *B. bacilliformis*-Proteine mit Patienten- und Kontrollseren. **(A)** Schematische Darstellung des Lineblot-Tests. **(B)** Patientenseren (IFT-Titer ≥ 320 , $n = 6$) oder Kontrollseren gesunder Blutspender ($n = 6$) wurden mit Lineblots auf Seroreaktivität getestet (links). Die Intensität der Lineblot-Banden wurde densitometrisch gemessen und farblich dargestellt (hellblau schwach bzw. nicht reaktiv, dunkelblau stark reaktiv). Die Antigene mit der höchsten Reaktivität sind mit Pfeilen gekennzeichnet. **(C)** Die Lineblot Ergebnisse für BbadA, BbadB, Pap31, hypothetisches Protein-B, Porin-B und Autotransporter-E sind für drei Serum-Gruppen dargestellt: Patientenseren mit hohem anti-*B. bacilliformis* IFT-Titer ($n = 12$; ≥ 320), Patientenseren mit IFT-Titer < 320 ($n = 14$) und Kontrollseren ($n = 96$) gesunder Blutspender. Werte, die über einer Intensität von 100 Einheiten liegen, gelten als positiv. Die Signifikanz zwischen den Probenkategorien wurde mit einem Mann-Whitney-U-Test analysiert (* $p < 0,05$). Entnommen aus [162] und modifiziert.

4.2.6. Serodiagnostische Bewertung immunreaktiver *B. bacilliformis*-Proteine mittels ELISA

Für die Entwicklung eines *B. bacilliformis* IgG ELISAs wurden die Antigenkandidaten ausgewählt, die in der Lineblotanalyse Reaktivität mit IFT positiven Patientenseren zeigten und einen signifikanten Unterschied zu den Kontrollseren aufwiesen (Autotransporter-E, Porin-B und hypothetisches Protein-B). Dafür wurden zwei verschiedene Antigenkombinationen bestehend aus Autotransporter-E und Porin-B oder Autotransporter-E, Porin-B und hypothetisches Protein-B mit IFT positiven Patientenseren (Titer ≥ 320 [n = 12]), IFT uneindeutigen bzw. negativen Patientenseren (Titer < 320 [n = 14]) und Kontrollseren (Blutspenderseren [n = 96]) getestet.

Es konnte gezeigt werden, dass beide ELISAs einen statistisch signifikanten Nachweis ($p < 0,05$) von IFT-positiven Seren ermöglichten (Abbildung 14 A, B). Eine *Receiver-Operating-Characteristic-Curve* (ROC) Analyse erzielte für den ELISA mit Autotransporter-E und Porin-B eine Fläche unter der ROC-Kurve (AUC) von 0,9335, wenn alle Patientenseren in die Analyse mit einbezogen werden (Abbildung 14 C). Ein Cut-off-Wert bei einer OD₄₅₀ von 0,38 erzielte eine Sensitivität (n = 12/12) und Spezifität (n = 96/96) von jeweils 100% für IFT-positive Seren bzw. 69,2% Sensitivität (n = 18/26) und 100% Spezifität (n = 96/96), wenn alle Patientenseren (IFT positive und IFT negative) berücksichtigt werden. Durch einen niedrigeren Cut-off-Wert von 0,29 konnte die Sensitivität des ELISAs auf Kosten der Spezifität verbessert werden. Hierbei erzielte der Test eine Sensitivität von 100% (n = 12/12) und eine Spezifität von 94,8% (n = 91/96) für IFT-positive Seren bzw. eine Sensitivität von 80,8% (n = 21/26) und eine Spezifität von 94,8% (n = 91/96), wenn alle Patientenseren berücksichtigt wurden. Der ELISA mit der Antigenkombination aus Autotransporter-E, Porin-B und hypothetischem Protein-B wies einen AUC-Wert von 0,9083 auf (Abbildung 14 D). Bei einem Cut-off-Wert von 0,34 (OD₄₅₀) erzielte dieser ELISA-Test eine Sensitivität von 100% (n = 12/12) und eine Spezifität von 93,8% (n = 90/96) für IFT-positive Seren bzw. 76,9% (n = 20/26) und 93,8% (n = 90/96) unter Berücksichtigung aller Patientenseren. In einer ROC-Analyse in der ausschließlich IFT-positiven Patientenseren mit einbezogen wurden, wurden AUC-Werte von 1,000 für den ELISA mit Autotransporter-E und Porin-B und 0,9983 für den ELISA mit Autotransporter-E, Porin-B und hypothetischem Protein-B erzielt (Abbildung 14 E, F).

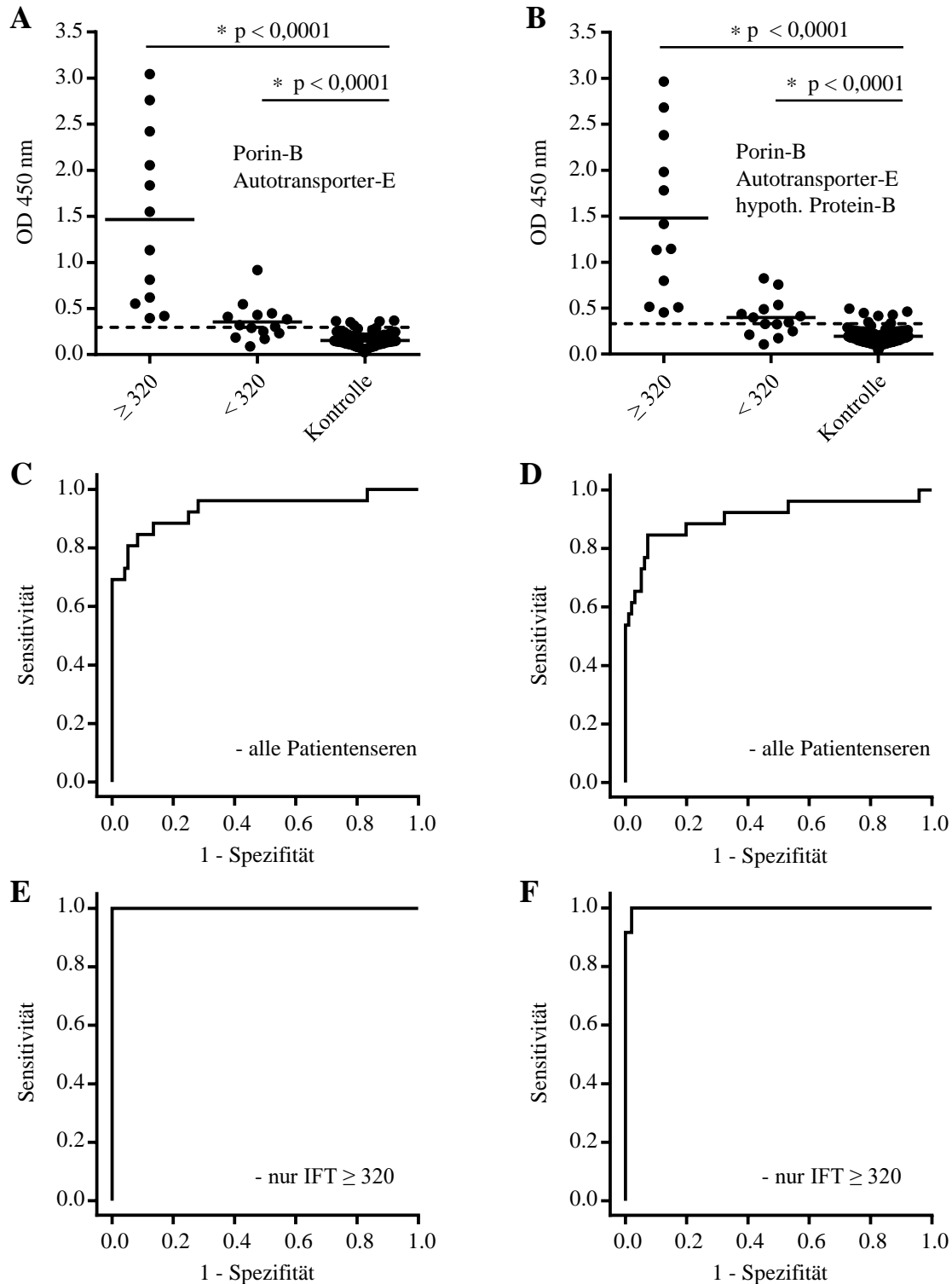


Abbildung 14: Analyse von Patienten- und Kontrollseren mit *B. bacilliformis*-ELISAs. (A, B) ELISA-Analyse. Antigenzusammensetzung: Autotransporter-E + Porin-B (links), Autotransporter-E + Porin-B + hypothetisches Protein-B (rechts). Für die Analysen wurden Patientenserien mit hohen Anti-*B. bacilliformis* IFT-Titern von ≥ 320 ($n = 12$), Patientenserien mit einem niedrigen IFT-Titer < 320 ($n = 14$) und Kontrollseren ($n = 96$) verwendet. Werte über OD_{450} 0,29 (A) und 0,34 (B) wurden als positiv gewertet. Die Signifikanz zwischen den Probenkategorien wurde mit einem Mann-Whitney-U-Test analysiert ($* p < 0,0001$). (C, D) ROC-Kurve unter Verwendung aller Patientenserien ($n = 26$) und (E, F) ROC-Kurve unter Verwendung von Patientenserien mit einem IFT-Titer ≥ 320 ($n = 12$). Die Werte sind in einem ROC-Diagramm nach Sensitivität (richtig-positive Rate) und 1-Spezifität (falsch-positive Rate) dargestellt. Entnommen aus [162] und modifiziert.

4.2.7. Homologie-Analyse der im ELISA eingesetzten rekombinanten Proteine

Die Homologie-Analyse der Proteinsequenzen von Autotransporter-E, Porin-B und hypothetischem Protein-B ergab eine 99,8 - 100%ige Homologie mit den abgeleiteten Proteinen aus allen analysierten *B. bacilliformis* Genomen, wohingegen die Homologien zu abgeleiteten Proteinen anderer *Bartonella* spp. wie *B. ancashensis*, *B. henselae* und *B. quintana* weitaus geringer waren (Autotransporter-E: 35,2 - 35,8%, Porin B: 41,5 - 45,3%, hypothetisches Protein-B: 30,4 - 41,8%, Tabelle 18).

Tabelle 18: Gepaarte Sequenzalignments von ausgewählten *B. bacilliformis* Proteinen. Werte sind in Prozent angegeben. Entnommen aus [162].

<i>Bartonella</i> spp.	Autotransporter-E	Porin-B	hypothetisches Protein-B	BbadB	Pap31
<i>B. bacilliformis</i> KC583 (diese Arbeit)	100	100	100	100	100
<i>B. bacilliformis</i> NC_008783.1	100	100	100	100	100
<i>B. bacilliformis</i> ATCC® 35685™	100	100	100	100	100
<i>B. bacilliformis</i> FDAARGOS_174	100	100	100	100	100
<i>B. bacilliformis</i> KC584 (diese Arbeit)	99,8	100	100	-----	96
<i>B. ancashensis</i> NZ_CP010401.1	35,8	45,3	41,8	42,0	59,9
<i>B. henselae</i> NZ_CP020742.1	35,5	42,5	30,4	33,2	50,5
<i>B. quintana</i> NZ_AP019773.1	35,2	41,5	32,3	36,2	51,5

4.3. Untersuchung der durch *B. bacilliformis* vermittelten Hämolyse und Identifizierung der daran beteiligten Pathogenitätsfaktoren

4.3.1. Etablierung eines *B. bacilliformis* *in vitro* Hämolyse-Tests

Die hämolytische Anämie ist die bedrohlichste klinische Manifestation des Oroya-Fiebers. Sie wird durch die bakterielle Infektion von Erythrozyten hervorgerufen und endet in vielen Fällen tödlich. Es wird angenommen, dass die durch *B. bacilliformis* vermittelte Hämolyse während der Erythrozyten-Infektion dabei die wesentliche Rolle spielt, jedoch sind die zugrunde liegende biologischen Mechanismen nicht bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst ein *B. bacilliformis* Hämolyse-Test etabliert, bei dem die Lyse von humanen Erythrozyten *in vitro* durch *B. bacilliformis* mittels Photometer quantitativ gemessen werden kann. Dafür werden die Erythrozyten mit den Bakterien bei 37°C inkubiert und anschließend das freigesetzte Hämoglobin im Überstand bei einer Wellenlänge von 541 nm gemessen. Für die Bestimmung der optimalen Test-Bedingungen wurden verschiedenen Parameter, wie Erythrozytenzahl, MOI und Inkubationszeitpunkte getestet. Dabei erwies sich eine Infektion von 10^7 Erythrozyten mit *B. bacilliformis* KC583 bei MOIs zwischen 2 - 10 als geeignet, um eine Hämolyse *in vitro* optimal untersuchen zu können (Abbildung 15). Hierbei zeigt sich eine Dosis-abhängige Hämolyse, die bei einer MOI von 10 nach 20 h Inkubationszeit ein Maximum erreicht.

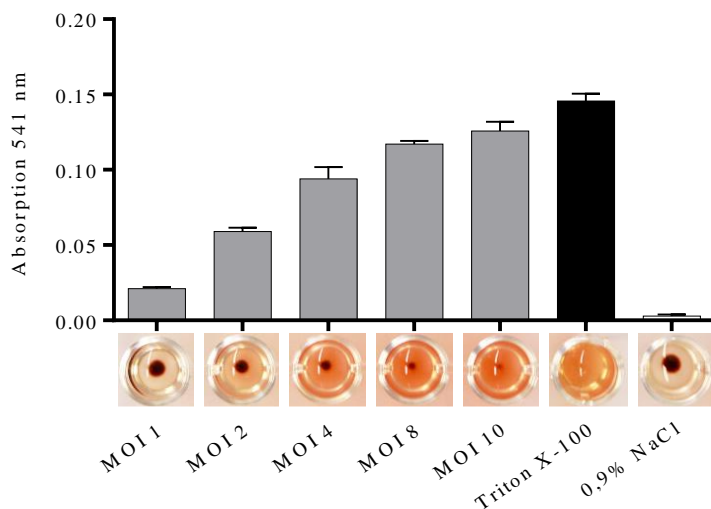


Abbildung 15: *In vitro* Hämolyse-Test. Für die Untersuchung der hämolytischen Aktivität von *B. bacilliformis* wurden humane Erythrozyten mit unterschiedlichen *B. bacilliformis* KC583 MOIs (MOI 1, 2, 4, 8 und 10) für 20 h inkubiert und die Hämolyse photometrisch bestimmt (Wellenlänge: 541 nm). Als Positivkontrolle wurden die Erythrozyten mit 1% (v/v) Triton X-100 lysiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Zugabe von Bakterien (0,9% [w/v] NaCl). Unterhalb des Balkendiagramms ist für jeden Ansatz das lysierte bzw. nicht lysierte Erythrozyten-Pellet zu sehen.

4.3.2. Identifizierung von Hämolyse vermittelnden Pathogenitätsfaktoren durch Transposon-Mutagenese

Für die Identifizierung von Pathogenitätsfaktoren, die im Hämolyse-Prozess von *B. bacilliformis* involviert sind, wurde eine Tn5-Transposon-Mutantenbibliothek für die Stämme KC583 und KC584 erstellt. Die Transposon-Mutagenese resultierte in insgesamt 1.728 Insertions-Mutanten, die systematisch auf (Schafs-)Blutagar hinsichtlich ihrer hämolytischen Aktivität untersucht wurden (repräsentative Blutagar-Platte in Abbildung 16 dargestellt). Insgesamt konnten sechs Hämolyse-defiziente Mutanten identifiziert werden, die auf hierfür extra hergestelltem Humanblut-Agar keine Hämolyse verursachen.

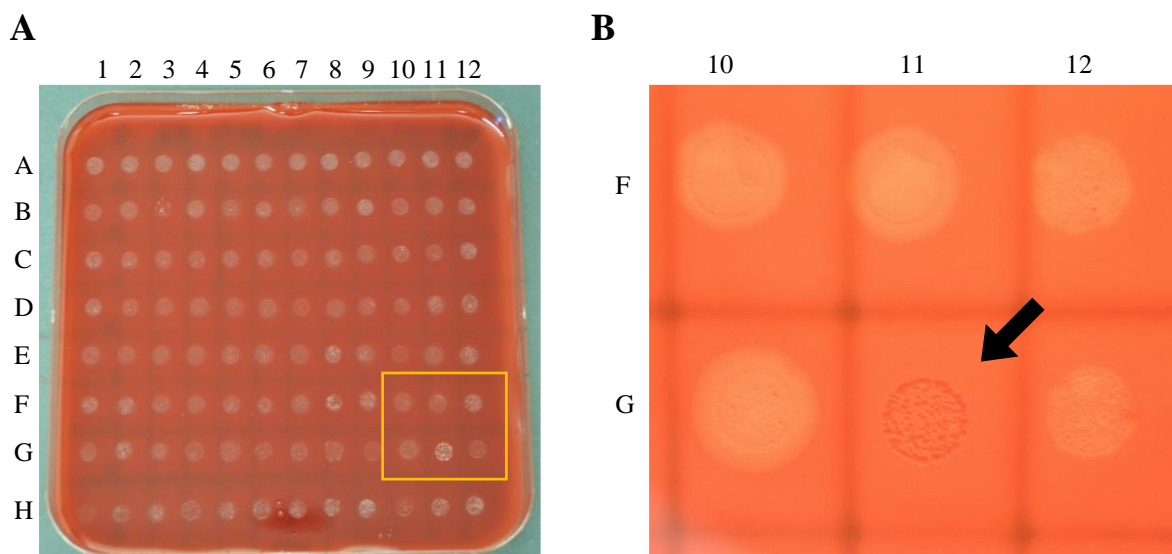


Abbildung 16: Systematische Analyse der Hämolyse von *B. bacilliformis* Tn5 Transposonmutanten. (A) Repräsentative CBA-Platte bewachsen mit 96 unterschiedlichen Transposon Mutanten nach 20 Tagen Inkubation. (B) Vergrößerter Ausschnitt der Reihen F und G und der Spalten 10 - 12 auf der Agar-Platte (gelber Rahmen). Die Platte wurde zur Bewertung der Hämolyse gegen eine Lichtquelle gehalten. Die Transposonmutante G-11 verursacht keine Hämolyse.

Eine Sequenzierung aus der Transposonsequenz heraus in die genomische Umgebung der Hämolyse-defizienten Mutanten hinein zeigte, dass zwei Genloci, die als BARBAKC583_RS02155 und BARBAKC583_RS03125 annotiert sind, von den Transposon-Insertionen betroffen waren. Bei vier Hämolyse-defizienten Mutanten war das Tn5-Transposon in Genlocus BARBAKC583_RS02155 und bei zwei Mutanten in BARBAKC583_RS03125 inseriert. Beim Genlocus BARBAKC583_RS02155 handelt es sich um eine 1.221 Nukleotidsequenz, die für ein 407 Aminosäure langes Porin kodiert. Das Gen bzw. Protein wird daher fortlaufend als *porA* bzw. Porin-A bezeichnet. BARBAKC583_RS03125 weist einen offenen Leserahmen von 1.212 Nukleotiden auf und kodiert für eine 404 Aminosäure lange α/β -Hydrolase. Das Gen bzw. Protein wird nachfolgend als *hyd* bzw. α/β -Hydrolase bezeichnet. Auf genregulatorischer Ebene weisen beide Gene eigene Promotoren auf und gehören keinem Operon an. Darüber hinaus liegen beide Gene in weit voneinander entfernten Bereichen im Genom vor (Distanz 208.740 Nukleotide). Die Annotation der beiden Genloci sowie die

vermuteten hypothetischen Funktionen der Genprodukte stammen von der *B. bacilliformis* KC583 Referenzsequenz (NC_008783.1), die durch die NCBI Prokaryotic Genomes Annotation Pipeline, basierend auf Homologien verwandter Gene, annotiert wurde.

4.3.3. *In silico*-Charakterisierung von Porin-A und der α/β -Hydrolase

Für eine nähere Charakterisierung von Porin-A und der α/β -Hydrolase wurden umfangreiche *in silico* Analysen durchgeführt. Zuerst wurde das Vorhandensein von Porin-A und der α/β -Hydrolase in den Genomen der anderen *B. bacilliformis* Stämme bzw. Isolaten durch eine BlastP Analyse untersucht. Diese ergab, dass sowohl Porin-A als auch die α/β -Hydrolase in allen vorhandenen *B. bacilliformis* Sequenzen enthalten sind. Die größte Homologie zwischen Porin-A und Proteinen aus anderen *Bartonella* Spezies zeigte sich in *B. henselae* mit einer Sequenzidentität von 64% und *B. vinsonii* mit 63%. Für die α/β -Hydrolase konnten homologe Proteine mit einer Sequenzidentität zwischen 65% - 83% in mehreren *Bartonella* spp., wie beispielsweise *B. henselae* (83%) oder *B. vinsonii* (82%) gefunden werden.

Anschließend wurde die Sequenzidentität von Porin-A und der α/β -Hydrolase zwischen den *B. bacilliformis* Stämmen und Isolaten untersucht. Dafür wurden die Proteinsequenzen aus den zu analysierenden Stämmen (n = 17) extrahiert und in einem multiplen Sequenz-Alignment mit Clustal Omega analysiert. Die Identitätsmatrix zeigt für Porin-A eine hohe Sequenzidentität zwischen den Stämmen und Isolaten, die von 89,16% bis 100% reicht. Die Porin-A-Sequenz des Laborstammes (KC583) weist dabei eine Sequenzidentität von 100% mit neun Stämmen, 96,55% mit fünf Stämmen und 96,55% sowie 89,16% mit jeweils einem Stamm auf (Tabelle 19). Für die α/β -Hydrolase ergab die Analyse ebenfalls eine hohe Homologie innerhalb der Spezies mit Werten zwischen 89,22% und 100% (Tabelle 20). Die α/β -Hydrolase von Stamm KC583 weist eine Sequenzidentität von 100% mit zehn Stämmen, 99,75% mit fünf Stämmen und 89,47% mit einem Stamm auf.

Tabelle 19: Multiples Sequenz-Alignment von Porin-A Sequenzen aus 17 verschiedenen *B. bacilliformis* Stämmen bzw. Isolaten. Die Werte sind in Prozent angegeben.

<i>B. bacilliformis</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
KC583 1																	
KC584 2	100																
INS 3	100	100															
ATCC 35685D-5 4	100	100	100														
San Pedro600-02 5	100	100	100	100													
USM-LMMB06 6	100	100	100	100	100												
Peru-18 7	99,26	99,26	99,26	99,26	99,26	99,26											
CUSCO5 8	99,26	99,26	99,26	99,26	99,26	99,26	100										
Peru38 9	99,26	99,26	99,26	99,26	99,26	99,26	100	100									
Ver075 10	99,26	99,26	99,26	99,26	99,26	99,26	100	100	100								
USM-LMMB07 11	99,26	99,26	99,26	99,26	99,26	99,26	100	100	100	100							
Heidi Mejia 12	100	100	100	100	100	100	99,26	99,26	99,26	99,26	99,26						
Hosp800-02 13	100	100	100	100	100	100	99,26	99,26	99,26	99,26	99,26	100					
VAB9028 14	100	100	100	100	100	100	99,26	99,26	99,26	99,26	99,26	100	100				
CAR600-02 15	100	100	100	100	100	100	99,26	99,26	99,26	99,26	99,26	100	100	100			
Cond044 16	96,55	96,55	96,55	96,55	96,55	96,55	96,55	96,55	96,55	96,55	96,55	96,55	96,55	96,55	96,55		
Ver97 17	89,16	89,16	89,16	89,16	89,16	89,16	89,16	89,16	89,16	89,16	89,16	89,16	89,16	89,16	89,16	90,91	

Tabelle 20: Multiples Sequenz-Alignment von α/β -Hydrolase Sequenzen aus 17 verschiedenen *B. bacilliformis* Stämmen bzw. Isolaten. Die Werte sind in Prozent angegeben.

<i>B. bacilliformis</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
KC583 1																	
KC584 2	100																
INS 3	100	100															
ATCC 35685D-5 4	100	100	100														
San Pedro600-02 5	100	100	100	100													
USM-LMMB06 6	100	100	100	100	100												
Peru-18 7	100	100	100	100	100	100											
CUSCO5 8	100	100	100	100	100	100	100										
Peru38 9	100	100	100	100	100	100	100	100									
Ver075 10	100	100	100	100	100	100	100	100	100								
USM-LMMB07 11	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100							
Heidi Mejia 12	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75						
Hosp800-02 13	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	100					
VAB9028 14	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	100	100				
CAR600-02 15	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	100	100	100			
Cond044 16	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,75	99,5	99,5	99,5	99,5		
Ver97 17	89,47	89,47	89,47	89,47	89,47	89,47	89,47	89,47	89,47	89,47	89,47	89,22	89,22	89,22	89,22	89,22	

Verschiedene physikalisch-chemische Eigenschaften von Porin-A und der α/β -Hydrolase wurden mittels ExPASy ProtParam bestimmt (Tabelle 21). Porin-A weist eine molekulare Masse von 44.609,03 Da, einen isoelektrischen Punkt von 8,16 und einen Extinktionskoeffizienten von 86.875 auf. Mit einem Instabilitätsindex von 19,97, einem aliphatischen Index von 79,33 und einem hydrophatischen Index von -0,272 ist Porin-A ein thermisch stabiles schwach hydrophiles Protein. Die α/β -Hydrolase weist eine molekulare Masse von 44.866,49 Da, einen isoelektrischen Punkt von 9,37 und einen Extinktionskoeffizienten von 37.945 auf. Mit einem Instabilitätsindex von 30,5, einem aliphatischen Index von 88,81 und einem hydrophatischen Index -0,117 ist die α/β -Hydrolase ebenfalls ein thermisch stabiles schwach hydrophiles Protein.

Tabelle 21: Liste der errechneten physikalischen und chemischen Parameter.

	Protein-ID	molekulare Masse (Da)	Isoelektrischer Punkt (pI)	Extinktionskoeffizient ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Instabilitätsindex	Aliphatischer Index	Hydrophatischer Index
Porin-A	WP_005766494.1	44.609,03	8,16	86.875	19,97 (stabil)	79,33	-0,272
α/β -Hydrolase	WP_005766862.1	44.866,49	9,37	37.945	30,50 (stabil)	88,81	-0,117

Informationen über die zelluläre Lokalisierung von Proteinen liefern häufig Hinweise über deren biologische Funktion. Daher wurde die subzelluläre Lokalisierung von Porin-A und der α/β -Hydrolase mittels PSORTb, CELLO und Loc Tree3 *in silico* vorhergesagt, sowie das Vorhandensein einer Signalsequenz durch SignalP 6.0 überprüft (Tabelle 22). Porin-A wurde von allen Software-Anwendungen als Außenmembranprotein vorhergesagt und weist eine Sec/SPI Signalsequenz auf. Für die α/β -Hydrolase konnte keine übereintreffende Vorhersage in Bezug auf die zelluläre Lokalisierung getroffen werden. CELLO ordnet die α/β -Hydrolase dem periplasmatischen Raum zu, wohingegen LocTree3 die α/β -Hydrolase als sezerniertes Protein klassifiziert. PSORTb konnte keine Vorhersage liefern. Als Signalpeptid wurde eine Sec/SPII Signalsequenz für Lipoproteine erkannt.

Tabelle 22: Vorhersage der subzellulären Lokalisierung und der Signalsequenzen von Porin-A und der α/β -Hydrolase.

	Protein-ID	subzelluläre Lokalisierung			Signalsequenz SignalP 6.0
		PSORTb	CELLO	LocTree3	
Porin-A	WP_005766494.1	Außenmembran	Außenmembran	Außenmembran	Sec/SPI Signalsequenz
α/β -Hydrolase	WP_005766862.1	unbekannt	Periplasma	sekretiert	Sec/SPII Signalsequenz

Um weitere Hinweise über die biologische Funktion zu erhalten wurden die konservierten Domänen und Motive von Porin-A und der α/β -Hydrolase durch verschiedener Datenbanken (Conserved Domain [CD] Search, Pfam und Interproscan) analysiert. Alle verwendeten Datenbanken klassifizierten Porin-A als alphaproteobakterielles Porin mit einer für Porine typischen

Domänenarchitektur zwischen Aminosäure 26 - 397 (Tabelle 23). Die α/β -Hydrolase konnte mittels CD-Search der Überfamilie der Esterase/Lipasen zugeordnet werden. Darüber hinaus identifizierte Pfam und Interproscan für die α/β -Hydrolase eine Domäne mit unbekannter Funktion (DUF900) zwischen Aminosäurepositionen 135 - 349.

Tabelle 23: Protein-Klassifizierung durch Motiv- und Domänen-Analyse.

	Porin-A (WP_005766494.1)	α/β -Hydrolase (WP_005766862.1)
Conserved Domain Search	Überfamilie: Außenmembrankanäle Unterfamilie: Porine Datenbank ID: 10495026 Domäne (AS Intervall): 26-397 E-Value: $4,1e^{-85}$	Überfamilie: Esterasen/Lipasen Datenbank ID: COG4782 Domäne (AS Intervall) 57-385 E-Value: $7,42e^{-71}$
Pfam	Überfamilie: Außenmembrankanäle Unterfamilie: Porine Datenbank ID: PF02530 Domäne (AS Intervall): 27-397 E-Value: $3,6e^{-85}$	Überfamilie: α/β -Hydrolase Familie: Protein mit unbekannter Funktion (DUF900) Datenbank ID: PF05990 Domäne (AS Intervall): 135-349 E-Value: $3,6e^{-52}$
Interproscan	Familie: Porine der Alphaproteobakterien Datenbank ID: IPR003684 Domäne (AS Intervall): 27-397 E-Value: nicht verfügbar	Überfamilie: α/β -Hydrolase Familie: Protein mit unbekannter Funktion (DUF900) Datenbank ID: IPR010297 Domäne (AS Intervall): 135-349 E-Value: nicht verfügbar

4.3.4. Vorhersage der Proteinstrukturen von Porin-A und der α/β -Hydrolase

Die Vorhersage der Proteinstrukturen von Porin-A und der α/β -Hydrolase erfolgte unter Verwendung von Colabfold, einer Softwareanwendung, die multiple Sequenzalignments (MSA) mit AlphaFold2 Strukturvorhersagen kombiniert. Mittels MSAs können verwandte Proteinstrukturen (in verschiedenen Proteindatenbanken) identifiziert werden, welche als Vorlage für die Strukturvorhersage dienen. Die aus den MSAs resultierende Sequenzabdeckung und Sequenzidentität geben Aufschluss über die Qualität der vorhergesagten Proteinstruktur. Für Porin-A konnte eine Sequenzabdeckung von ca. 500 - 3000 Sequenzen pro Aminosäurerest mit Sequenzidentitäten bis 0,6 gefunden werden (Abbildung 17 A). Sequenzen mit besonders hohen Homologien wurden für die Aminosäurepositionen 1 - 140 identifiziert, wohingegen die Sequenzabdeckung und Identität für die restlichen Aminosäurepositionen (141 - 384) stetig abfallen. Für drei Regionen (AS: 160 - 200, 250 - 275 und 340 - 370) konnten allerdings kaum homologe Sequenzen gefunden werden (400 - 1.000 Sequenzen pro AS), was in einer sehr niedrigen Abdeckung für diese Bereiche resultierte. Unter Verwendung der identifizierten Sequenzen erfolgte eine AlphaFold2-Strukturvorhersage, bei der fünf Modelle vorgeschlagen wurden und von denen das Modell mit der höchsten Gesamtwertung im *predicted local distance difference test*

(pLDDT) für weitere Analysen verwendet wurde. Der pLDDT-Score ist ein Konfidenzmaß für die Vorhersagegenauigkeit der einzelnen Aminosäure-Koordinaten und lässt sich wie folgt interpretieren: 100 – 90: hohe Genauigkeit der vorhergesagten AS-Koordinaten, 90 – 70: lediglich das Aminosäure-Rückgrat konnte mit hoher Genauigkeit modelliert werden, 70 – 50: Vorhersage mit niedriger Konfidenz und 50 – 0: Vorhersage mit unzureichender Genauigkeit, daher sollten Aminosäuren nicht interpretiert werden. Das ausgewählte Porin-A Modell (Abbildung 17 B, rank_1, blau) besitzt insgesamt einen hohen pLDDT-Score mit Werten von 100 - 80. Allerdings weisen einige Aminosäuren (Positionen 1 - 14, 59 - 64, 102 - 104, 173 - 182, 196 - 201, 351 - 362) lediglich eine niedrige Konfidenz auf und müssen mit Vorsicht interpretiert werden.

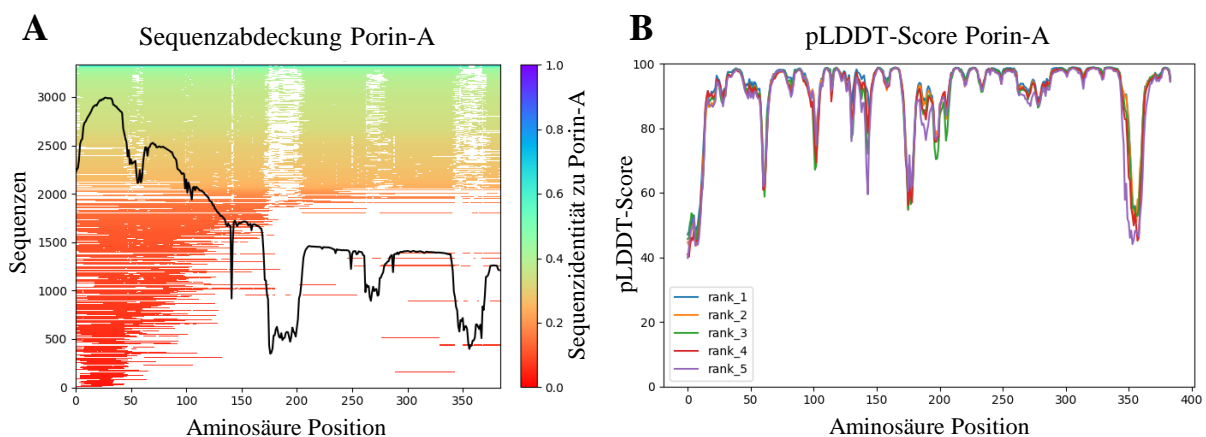


Abbildung 17: Qualitätsanalyse der Porin-A Strukturvorhersage. **(A)** Multiples Sequenz-Alignment für Porin-A. Gezeigt werden die Sequenzabdeckung und Sequenzidentität von homologen Strukturvorlagen pro Aminosäure, die für die AlphaFold2 Strukturvorhersage genutzt wurden. **(B)** pLDDT-Scores von Porin-A. Aufgetragen sind die pLDDT-Scores pro Aminosäureposition für die fünf errechneten Porin-A Modelle. Für die weiteren Analysen wurde das Modell mit der höchsten pLDDT-Score gewählt (blau, rank_1).

Das dreidimensionale Bändermodell von Porin-A weist ein 16 strängiges β -barrel Motiv auf, wodurch theoretisch die Bildung einer Pore ermöglicht wird (Abbildung 18). Im Zentrum der Pore befinden sich zwei Schleifen, die die Pore teilweise verschließen. Die vorhergesagten Aminosäure-Koordinaten wurden entsprechend ihrer pLDDT-Scores farblich gekennzeichnet, wobei dunkelblau (100 - 90) für eine hohe Genauigkeit, hellblau bis gelb (90 - 70) für eine mittlere Genauigkeit, gelb bis orange (70 - 50) für eine niedrige Konfidenz und orange bis rot (50 - 0) für eine unzureichende Konfidenz stehen. Wie dem Farbcode zu entnehmen ist, konnten die Aminosäurekoordinaten die an der Ausbildung des β -barrels beteiligt sind, mit einer hohen Konfidenz bestimmt werden. Aminosäuren mit niedrigen pLDDT-Scores (gelb bzw. orange) sind am N-Terminus, sowie in den Regionen mit niedriger Sequenzabdeckung zu finden.

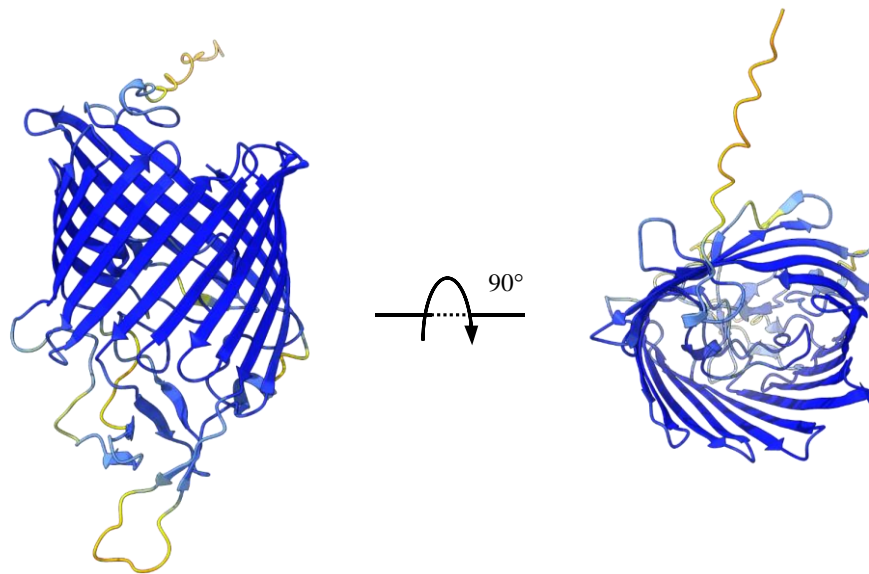


Abbildung 18: Bänderdarstellung der vorhergesagten Proteinstruktur von Porin-A. Porin-A weist ein β -barrel Motiv auf, das mit hoher Konfidenz durch AlphaFold2 bestimmt werden konnte. Die pLDDT-Scores sind in diesem Modell farblich hinterlegt: dunkelblau: 100 - 90, hellblau bis gelb: 90 - 70, gelb bis orange: 70 - 50 und orange bis rot: 50 - 0.

Das MSA der α/β -Hydrolase ergab eine insgesamt hohe Sequenzabdeckung (4.500 - 7.000 Sequenzen pro AS) mit mittleren Sequenzidentitäten im Bereich von 0,3 - 0,5 (Abbildung 19 A). Ausnahmen bilden die N- und C-terminalen Bereiche (AS-Positionen 1 - 50 und 320 - 374), für die lediglich eine sehr geringe Sequenzabdeckung erzielt werden konnte. Die AlphaFold2 Strukturvorhersage resultierte auch hier in fünf Modellen, von denen das Modell mit der besten pLDDT-Score für weitere Analysen gewählt wurde. Für das ausgewählte α/β -Hydrolase Modell (Abbildung 19 B, rank 1, blau) konnten insgesamt hohe pLDDT-Scores mit Werten zwischen 70 und 100 erzielt werden. Konfidenzwerte unter 70 finden sich am N-Terminus (AS 1 - 30), C-Terminus (AS 322 - 374) sowie an den Aminosäurepositionen 48 - 52, 82 - 89 und 269 - 281.

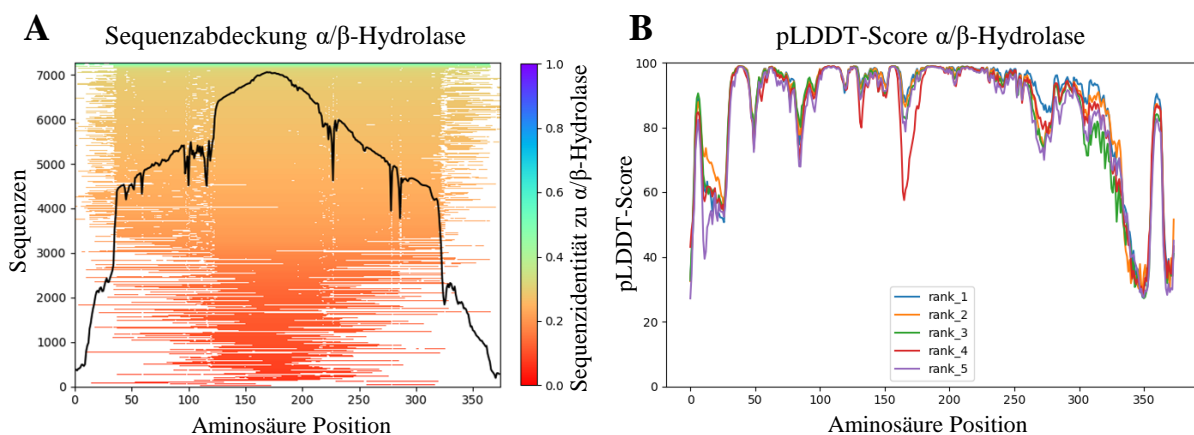


Abbildung 19: Qualitätsanalyse der Strukturvorhersage für die α/β -Hydrolase. **(A)** Multiples Sequenz-Alignment der α/β -Hydrolase. Darstellung der Sequenzabdeckung sowie Sequenzidentität von homologen Strukturvorlagen, die für die AlphaFold2 Strukturvorhersage genutzt wurden. **(B)** pLDDT-Scores von α/β -Hydrolase. Aufgetragen sind die pLDDT-Scores pro Aminosäureposition für die fünf errechneten α/β -Hydrolase Modelle. Für die weiteren Analysen wurde das Modell mit der höchsten pLDDT-Score gewählt (blau, rank_1).

Die dreidimensionale Struktur des α/β -Hydrolase Modells ist in Abbildung 20 dargestellt und weist als Kernmotiv eine α/β -Faltblatt auf. Anhand der pLDDT-Scores (100 - 70, dunkel- bis hellblau) zeigt sich, dass das Kernmotiv mit hoher Konfidenz modelliert werden konnte. Wie bereits bei den MSA- und pLDDT-Plots beschrieben, weisen die N- und C-terminalen Aminosäuren eine geringe Vorhersagegenauigkeit auf, was durch die gelbliche Färbung der entsprechenden Aminosäuren nochmal verdeutlicht wird. Diese Regionen enthalten eine α -Helix (N-Terminus) und ein β -Faltblatt und gehören nicht dem α/β -Faltblatt Kernmotiv an.

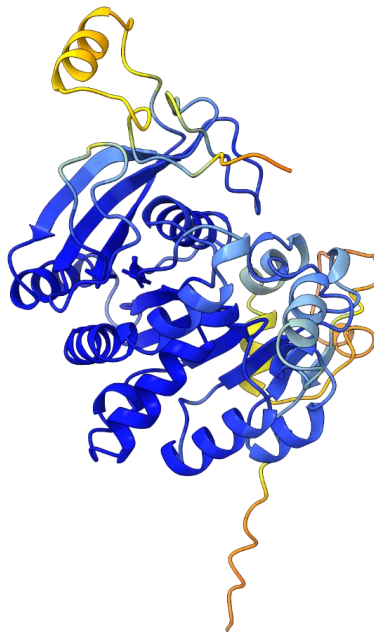


Abbildung 20: Bänderdarstellung der vorhergesagten Proteinstruktur der α/β -Hydrolase. Die α/β -Hydrolase weist ein α/β -Faltblatt Motiv auf, das mit hoher Konfidenz bestimmt werden konnte. Die pLDDT-Scores sind farblich markiert: dunkelblau:100 - 90, hellblau bis gelb: 90 - 70, gelb bis orange: 70 - 50 und orange bis rot: 50 - 0.

Das α/β -Faltblatt Motiv enthält neun β -Faltblätter, welche mit Ausnahme von $\beta 1/\beta 2$ und $\beta 2/\beta 3$ über α -Helices miteinander verbunden sind (Abbildung 21 A). Die Anordnung der β -Faltblätter und α -Helices ermöglicht die Ausbildung eines aktiven Zentrums mit einer katalytischen Triade. Das aktive Zentrum ist unter den α/β -Hydrolasen hochkonserviert und besteht aus einem Nukleophil, einer Säure und einem Histidin (Abbildung 21 B). Bei der *B. bacilliformis* α/β -Hydrolase dient ein Serin an Position 205 als Nukleophil, welches zwischen β -Faltblatt $\beta 6$ und α -Helix $\alpha 4$ in der Konsensussequenz AXSXG liegt. Die Säure des aktiven Zentrums ist eine Asparaginsäure und befindet sich an der Position 267 zwischen β -Faltblatt $\beta 8$ und α -Helix $\alpha 6$. Das hochkonservierte Histidin ist nach dem letzten β -Faltblatt $\beta 9$ an AS-Position 310 lokalisiert.

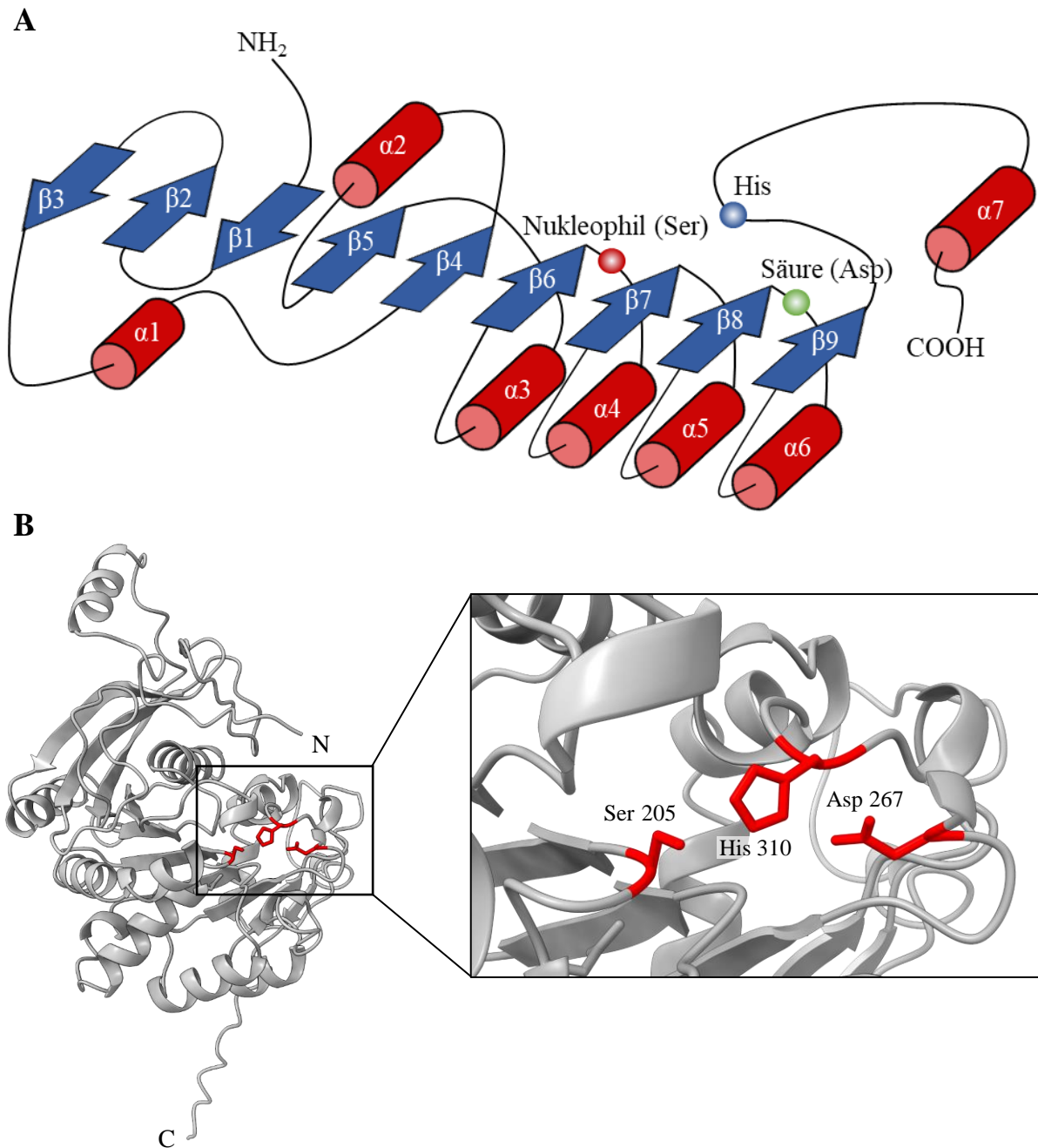


Abbildung 21: Domänenarchitektur und Strukturanalyse der α/β -Hydrolase. **(A)** Schematische Darstellung des α/β -Faltblatt Motivs. Die α -Helices werden durch Zylinder und die β -Faltblätter durch Pfeile repräsentiert. Die eingezeichneten Kreise markieren die Positionen des Nucleophils (rot), der Säure (grün) und des Histidins (blau) der katalytischen Triade. **(B):** Lokalisierung und Topologie der katalytischen Triade. Die katalytische Triade wird durch Ser²⁰⁵, His³¹⁰ und Asp²⁶⁷ gebildet. Die entsprechenden Aminosäurereste sind in Rot dargestellt.

4.3.5. Generierung von Hämolyse-defizienten Mutanten mittels markerloser zielgerichteter Mutagenese

Um die Rolle von Porin-A und der α/β -Hydrolase im Prozess der Hämolyse genauer untersuchen und um *downstream*-Effekte der Transposon Insertion auf die Hämolyse ausschließen zu können, wurden die beiden Gene *porA* und *hyd* mittels markerloser zielgerichteter Mutagenese deletiert. Die generierten $\Delta porA$ und Δhyd Einzel- und Doppeldeletionsmutanten wurden anschließend durch Transformation mit Plasmiden, die *porA* bzw. *hyd* unter Kontrolle des entsprechenden nativen Promotors enthielten, komplementiert. Der Erfolg der Deletion- und Komplementation wurde mittels PCR sowie Sequenzierung überprüft. Die erstellten Hämolysemutanten sind in Abbildung 22 schematisch dargestellt.

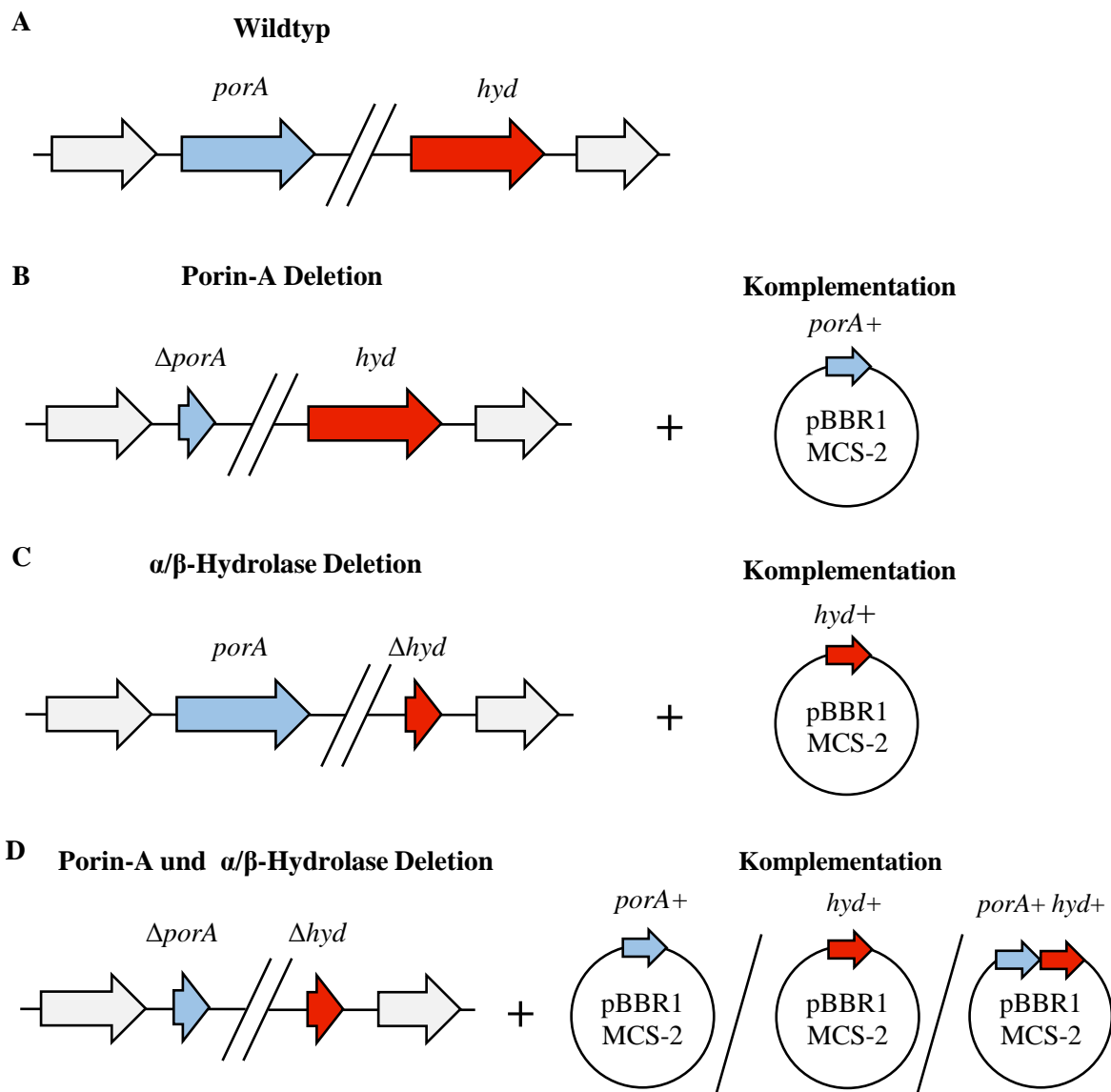


Abbildung 22: Generierte *B. bacilliformis*-Mutanten. Eine markerlose zielgerichtete Mutagenese wurde durchgeführt, um $\Delta porA$ und Δhyd Deletionsmutanten zu generieren (Einzel- und Doppeldeletion). Für die Komplementation der Deletionen wurden anschließend die Gene mit den entsprechenden nativen Promotoren über einen Vektorplasmid eingebracht (Einzel- und Doppelkomplementation).

Für eine Funktionsanalyse der generierten Deletions- und Komplementationsmutanten wurde die hämolytische Aktivität untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass allein die Deletion eines der beiden Gene ausreicht, um die durch *B. bacilliformis* vermittelte Hämolyse vollständig zu unterbinden (Abbildung 23). Durch die Komplementation der entsprechenden Gene konnte die hämolytische Aktivität, ähnlich zur Wildtyp Aktivität, wiederhergestellt werden. Diese Ergebnisse konnten nochmals durch die Doppeldeletion ($\Delta porA/\Delta hyd$) und den entsprechenden Einzel- und Doppelkomplementationen ($\Delta porA, porA+/\Delta hyd$; $\Delta porA/\Delta hyd, hyd+$; $\Delta porA, porA+/\Delta hyd, hyd+$) verdeutlicht werden und demonstrieren, dass beide Gene in *B. bacilliformis* vorhanden sein müssen, um Hämolyse zu vermitteln. Die Ergebnisse wurden insgesamt in drei unabhängigen Versuchen reproduziert und bestätigt.

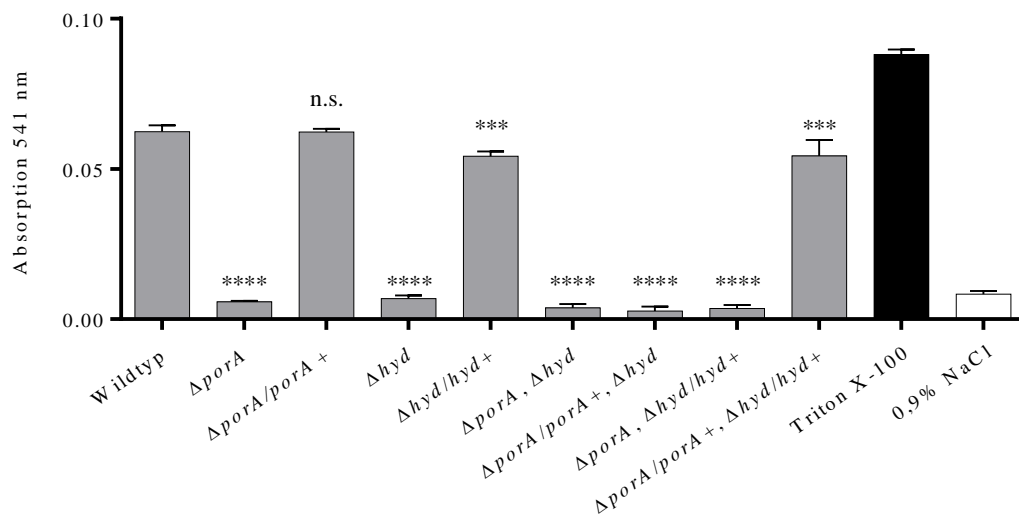


Abbildung 23: Funktionsanalyse der Hämolyse-defizienten *B. bacilliformis*-Mutanten. Die hämolytische Aktivität von *B. bacilliformis* wurde 20 Stunden nach Inkubation mit menschlichen Erythrozyten photometrisch bestimmt (Wellenlänge: 541 nm). Die Infektion erfolgte mit *B. bacilliformis* KC583 und den daraus abgeleiteten Porin-A und α/β -Hydrolase Deletions- und Komplementationsmutanten (MOI: 10). Als Positivkontrolle wurden die Erythrozyten mit 1% (v/v) Triton X-100 lysiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Zugabe von Bakterien. Mit einer einfaktoriellen ANOVA wurde überprüft, ob sich die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen statistisch signifikant von der Wildtyp-Hämolyse unterscheiden (nicht signifikant [n. s.] p-Wert > 0,05; *** p-Wert $\leq 0,001$; **** p-Wert $\leq 0,0001$).

4.3.6. Infektion muriner Erythrozyten mit *B. bacilliformis* als Grundlage für die Entwicklung eines murinen *in vivo* *B. bacilliformis* Hämolysemodells.

In Studien aus den 1920er Jahren wurden Infektionsversuche mit Rhesus-Makaken als einziges geeignetes Tiermodell beschrieben, bei dem der Verlauf einer *B. bacilliformis* Infektion vergleichbar zu dem eines Menschen ist [128]. Da Primaten-Infektionsmodelle in Deutschland gegenwärtig kaum realisierbar sind, sollte ein Kleintier-Nager-Infektionsmodell etabliert werden. Zunächst wurde deshalb untersucht, ob murine Erythrozyten von C57BL/6-Mäusen experimentell durch *B. bacilliformis* lysiert werden können. Dafür wurden humane und murine Erythrozyten parallel mit *B. bacilliformis* KC583 für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Versuch konnte demonstrieren, dass es zwischen der *B. bacilliformis* verursachten Lyse von humanen Erythrozyten und Erythrozyten von C57BL/6-Mäusen keinen statistisch signifikanten Unterschied gibt und die Ausprägung der Hämolyse ähnlich zur Hämolyse von menschlichen Erythrozyten ist (Abbildung 24). Darüber hinaus zeigen die *porA*- und *hyd*-Deletionsmutanten auch bei murinen Erythrozyten keine hämolytische Aktivität.

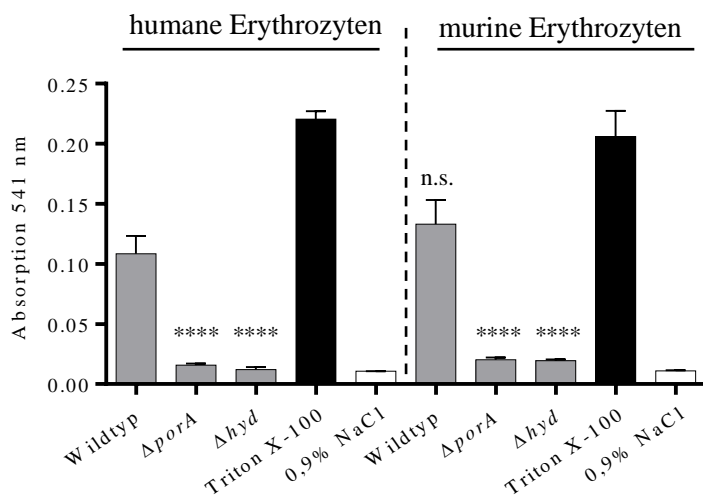


Abbildung 24: Hämolyse von murinen Erythrozyten durch *B. bacilliformis*. Die hämolytische Aktivität von *B. bacilliformis* KC583, $\Delta porA$ und Δhyd wurde 6 Stunden nach der Infektion von murinen und humanen Erythrozyten mit einem photometrischen Test (Wellenlänge: 541 nm) bestimmt. Die Erythrozyten wurden mit einer MOI von 20 infiziert. Als Positivkontrolle wurden die Erythrozyten mit 1% (v/v) Triton X-100 lysiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Zugabe von Bakterien. Mit einer einfaktoriellem ANOVA wurde überprüft, ob sich die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen statistisch signifikant von der Wildtyp-Hämolyse humaner Erythrozyten unterscheiden (nicht signifikant [n. s.] p-Wert > 0,05; *** p-Wert \leq 0,001; **** p-Wert \leq 0,0001).

5. Diskussion

Die Carrión-Krankheit ist eine vernachlässigte armutsbedingte Tropenkrankheit, die vor allem in Peru in ländlichen Gebieten des Anden-Hochlands endemisch ist. Trotz der hohen Letalität der Erkrankung ist die wissenschaftliche Aufmerksamkeit für das Oroya-Fieber und die *Verruga peruana* sehr gering, was sich in der Anzahl an wissenschaftlichen Publikationen widerspiegelt. Eine PubMed-Publikationssuche im Mai 2023 mit dem Suchbegriff „*Bartonella bacilliformis*“ resultierte in lediglich 297 Publikationen, von denen viele aus Peru stammen (im Gegensatz dazu; *Staphylococcus aureus*: 147.086 Publikationen; *Trypanosoma cruzi* [ebenfalls endemisch in Südamerika]: 17.714 Publikationen). Obwohl ein Impfstoff sowie serologische Werkzeuge für die epidemiologische Überwachung (z. B. ELISA) dringend benötigt werden, existieren zu beiden (verwandten) Themengebieten kaum Arbeiten. Bislang konnten zwar vier immundominante Proteine identifiziert werden (GroEL, Succinyl-CoA-Synthetase, *phage-associated protein* [Pap31] und *lysin motif-containing protein* [LysM]), jedoch führten diese weder zu einem potenziellen Impfstoff noch zu einem serologischen Testverfahren [30]. Erythrozyten-Invasion und Hämolyse sind wahrscheinlich die wichtigsten Schritte in der Pathogenese der Carrión-Krankheit und verantwortlich für die hohe Sterblichkeitsrate beim Menschen. Unter allen zuvor veröffentlichten Arbeiten lassen sich keine Studien finden, in denen die Hämolyse systematisch analysiert wurde. Auch wenn diese Hämolyse in der Literatur schon vor ca. 100 Jahren beschrieben wurde [166], wurden die verantwortlichen Pathogenitätsfaktoren bislang nicht identifiziert [76]. Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren daher die Identifizierung immundominanter Proteine sowie der Hämolyse-vermittelnden Pathogenitätsfaktoren. Dadurch sollten wichtige Erkenntnisse für die zukünftige Entwicklung von potenziellen Impfstoffen, seroepidemiologischen Tests und Therapeutika gewonnen werden.

5.1. Gesamt-Genom-Sequenzierung von *B. bacilliformis* Stämmen als Voraussetzung zur Identifizierung immundominanter Proteine und Pathogenitätsfaktoren

Seit der Einführung der *next-generation*-Sequenzierung (NGS) in den frühen 2000er Jahren ermöglichten technologische Fortschritte sowie Kostenreduktionen die Etablierung von NGS als Standardtechnik für eine Vielzahl verschiedener Anwendungen in biologischen Fragestellungen [167,168]. NGS-Technologien haben vor allem in der Bakteriologie große Bedeutung, da durch Gesamt-Genom-Sequenzierung (engl. *whole-genome-sequencing*, WGS) und Genomanalysen die Identifizierung von Antigenen und Pathogenitätsfaktoren für die Entwicklung von Therapeutika, Diagnostika und Impfstoffen revolutioniert wurde. Für die Identifizierung von immunreaktiven *B. bacilliformis* Proteinen sowie von Pathogenitätsfaktoren, die eine Rolle bei der Hämolyse spielen, wurden die Stämme KC583 und KC584 unter Verwendung eines hybriden Ansatzes aus Illumina MiSeq und PacBio SMRT sequenziert.

Die Illumina-MiSeq Technologie basiert auf der *sequencing-by-synthesis* (SBS)-Methode, die es erlaubt den Einbau einzelner Basen während der Synthese des komplementären DNA-Stranges zu identifizieren [169]. Hierfür wird hochmolekulare DNA fragmentiert (in etwa 500 bp große Fragmente) und über die Einführung spezifischer Adaptoren auf einem Glasobjektträger (*flow cell*) gebunden. Aufgrund der niedrigen Sensitivität bei der Fluoreszenzmessung und zur Reduktion der Hintergrundsignale müssen die DNA-Fragmente vor der Sequenzierung in einem Amplifikationsschritt (*bridge-amplification*) vervielfältigt werden. Dabei werden klonale Cluster gebildet (ca. 1000 Kopien pro DNA-Fragment), die als Matrizen für die bevorstehende Sequenzierreaktion dienen. In jedem Sequenzierzyklus wird ein fluoreszenzmarkiertes Nukleotid, komplementär in den Synthesestrang eingebaut und das basenspezifische Fluoreszenzsignal aufgenommen. Die Fluoreszenzgruppen agieren darüber hinaus auch als reversible Terminatoren der Synthesereaktion und werden nach der Fluoreszenzmessung abgespalten, wodurch ein neuer Sequenzierzyklus erfolgen kann [169]. Ein Nachteil der Illumina MiSeq Sequenzierung ist die geringe Synchronität zwischen den einzelnen Synthesereaktionen innerhalb der Cluster, wodurch es mit dem Fortschreiten der Synthesereaktionen zu einem hohen Signalrauschen kommt. Dadurch wird die Erzeugung einer genauen Konsenssequenz beeinträchtigt, was sich negativ auf die Qualität und die Länge der generierten *reads* auswirkt [170]. Ein Vorteil von Illumina MiSeq ist jedoch die Möglichkeit eine *paired-end*-Sequenzierung durchzuführen bei der die DNA von beiden Enden, mit einer definierten Leseweite, sequenziert wird, und dass zu einer Erhöhung Sequenzierungs-Qualität führt [171]. Je nach Größe der Matrize können die Sequenzen überlappend oder voneinander getrennt sein. Für die Sequenzierung, die im Rahmen dieser Arbeit erfolgte, wurde eine *paired-end* Sequenzierung von 2x250 bp durchgeführt, wodurch *reads* mit hoher Sequenzabdeckung und Spezifität generiert werden konnten.

PacBio SMRT weist im Vergleich zu Illumina MiSeq eine stark verbesserte Sensitivität auf und benötigt keine zusätzliche Amplifikation der DNA-Matrizen. Die Präparation einer DNA-Bibliothek erfolgt wie zuvor beschrieben durch Fragmentierung und Einführung spezifischer Adaptoren mit der Besonderheit, dass die Fragmentation im Kilobasen Größenbereich liegt und die eingeführten Adaptoren Haarnadel Strukturen aufweisen, wodurch die generierten DNA-Fragmente zirkulär vorliegen [172]. Ein Nachteil der SMRT-Methode ist, dass zur Erstellung dieser Bibliotheken große Mengen an hochmolekularer DNA benötigt werden (1 - 5 µg), wodurch Anwendung mit geringen DNA Mengen limitiert sind [172]. Die Sequenzierung findet auf einer SMRT-Zelle statt, die mit ca. 150.000 Kavitäten (*zero-mode waveguides*, ZMW) versehen ist. Am Boden jeder ZMW ist ein einziger Komplex, bestehend aus einem Matrizen-DNA-Molekül, einem Sequenzierungsoligonukleotid, und einer DNA-Polymerase, gebunden. Im Gegensatz zur Illumina-Technologie kann die Verlängerung des komplementären Stranges und die Detektion des Fluoreszenzsignals ohne Zwischenschritt in Echtzeit stattfinden [172]. Die Messung der Fluoreszenz

erfolgt, nachdem das Nukleotid von der Polymerase eingebaut wurde und sich in der Illuminations-Zone des ZMW befindet. Die Fluoreszenzgruppe wird beim Einbau des nächsten Nukleotids abgespalten und diffundiert aus der Illuminations-Zone. Mit dieser Technologie können sehr lange *reads* von > 10 Kb generiert werden [172]. Die Fehlerrate bei PacBio SMRT liegt allerdings zufällig auf die ganze Sequenz verteilt vor, wodurch die generierten *reads* im Vergleich zur Illumina Technologie von niedrigerer Qualität sind [172].

Durch den Einsatz einer hybriden Strategie aus Illumina MiSeq und PacBio SMRT Sequenzierung wurden die Genomsequenzen von KC583 und KC584 mit hoher Qualität aufgelöst. Durch die langen PacBio *reads* konnte eine geschlossene Genomsequenz erstellt werden, die als Grundgerüst für die Assemblierung der kurzen, aber hochqualitativen Illumina *reads* diente. Durch eine hohe Sequenzabdeckung konnten kleinere Mutationen wie beispielsweise SNPs mit hoher Konfidenz ermittelt werden.

Die Genomanalyse ergab für beide Stämme ein kleines Genom mit ca. 1.4 Mb und 1.200 Genen, was den zu erwartenden Werten für *B. bacilliformis* Genome entspricht [3]. Im Allgemeinen weisen Genome der Gattung *Bartonella* typischerweise kleine Genome auf, die auf den jeweiligen Lebensstil der Erreger optimal angepasst sind. Der Vergleich des neu assemblierten Genoms mit der Referenzsequenz NC_008783 zeigte, dass NC_008783 eine repetitive 30 Kb große Sequenz aufweist, für die es in den PacBio SMRT *reads* von KC583 und KC584 keine Sequenzabdeckung gibt. Da die Sequenzierung der Referenzsequenz NC_008783 mittels Illumina *short-reads* Sequenzierung erfolgte, könnte es sich bei der repetitiven 30 Kb Region um eine fehlerhafte Duplikation dieser Region bei der Assemblierung des Genoms handeln, welcher auf die kurze Länge der *reads* zurückzuführen ist.

Der Vergleich zwischen den Genomen von KC584 mit KC583 zeigte, dass sich KC584 neben kleineren Mutationen vor allem in der Deletion von *bbadB* unterscheidet. BbadB ist ein TAA und ein Homolog zu BadA, einem Pathogenitätsfaktor von *B. henselae* der die Adhäsion an extrazellulären Matrixproteine und Wirtszellen vermittelt sowie bei der Induktion der Angiogenese involviert ist [62,173,174]. Der Verlust von BbadB könnte, ähnlich zu BadA, eine Rolle in der Wirtszell-Adhärenz spielen und in einer verminderten Virulenz des Stammes resultieren. Ob es sich hierbei um einen artifiziellen Verlust der genomischen Ausstattung in Folge einer Deletion unter *in vitro* Kultivierungsbedingungen bei fehlendem biologischem Druck (Wirtsorganismus) handelt, kann in Analogie zu BadA in *B. henselae* gegenwärtig nur vermutet werden [173].

5.2. Entwicklung neuer serologischer Tests für Diagnose von *B. bacilliformis*-Infektionen

Ausbrüche von *B. bacilliformis*-Infektionen treten in der Regel in Andengemeinden auf, breiten sich aber inzwischen auch auf angrenzende Gebiete und Regionen aus [175–177]. Bislang konnte nicht geklärt werden, wo der Ursprung der *B. bacilliformis* Ausbrüche liegt. Da aber nur der Mensch als Wirt von *B. bacilliformis* bekannt ist wird vermutet, dass asymptomatische Träger die Quelle neuer Infektionen darstellen. Aufgrund der schlechten epidemiologischen Kenntnisse sowie der hohen Letalität des Oroya-Fiebers und dem Aufkommen neuer, antibiotikaresistenter Stämme [178] ist die Einführung zuverlässiger Serodiagnostika, die eine epidemiologische Überwachung der Carrión-Krankheit bei Menschen ermöglichen, sowie die Verfügbarkeit eines Impfstoffs von hoher Dringlichkeit. Die Immunbiologie einer *B. bacilliformis* Infektion ist bislang jedoch weitestgehend unbekannt und nur wenige spezifische immunogene Zielproteine wurden analysiert [30,106]. Detaillierte immunologische Kenntnisse über immundominante *B. bacilliformis*-Antigene sind jedoch für die Entwicklung zuverlässiger infektiöserologischer Diagnostika und für die Identifizierung potenzieller Impfstoffkomponenten unabdingbar. Serodiagnostische Tests könnten dazu beitragen, Personen zu identifizieren, die eine asymptomatische Infektion durchgemacht haben oder die mit dem Erreger in Kontakt gekommen sind, bei denen aber keine Diagnose gestellt wurde. Solche Tests dürften einen hohen Nutzen für die Erforschung der Epidemiologie und Kontrolle der Carrión-Krankheit zukommen.

5.2.1. Reverse-Vakzinologie

Die Entwicklung neuer Sequenzierungstechniken und rasante Fortschritte in der Bioinformatik haben das Feld der klinischen Mikrobiologie und der Impfstoffentwicklung in den letzten Jahren revolutioniert [163]. Die „Reverse-Vakzinologie“ nutzt Genom-Informationen von Krankheitserregern, für die Identifizierung von Antigenen, die sich potenziell für eine Immunisierung oder als seroreaktive Markerproteine eignen. Dieses Konzept konnte bereits erfolgreich für einen Impfstoff gegen *Neisseria meningitidis* oder gegen das respiratorische Synzytial-Virus (RSV) angewandt werden [163,179].

Eine Weiterentwicklung dieser Methode kombiniert klassische Ansätze der Reversen-Vakzinologie mit vergleichenden Multigenomanalysen, um spezieskonservierte Antigene zu identifizieren und um stammspezifische und hochvariable Zielproteine auszuschließen. Dieses Konzept ermöglichte erstmals die Entwicklung eines universellen Impfstoffs gegen Streptokokken der Gruppe B [164]. Um die genetische Variabilität innerhalb verschiedener Stämme bzw. Isolate zu bestimmen, wurden in der vorliegenden Arbeit insgesamt fünf Genom-Sequenzen von *B. bacilliformis* in die Reverse-Vakzinologie Analyse mit einbezogen, wobei mehrere genetische Diskrepanzen festgestellt werden konnten. Insbesondere der Verlust des TAAs BbadB im Stamm KC584 und die hohe Variabilität von

Pap31 schränken die Verwendung dieser beiden Proteine als Diagnostik- oder Impfstoffziele eindeutig ein, wenngleich nicht klar ist, ob es sich um *in vitro* Deletionsartefakte handelt [8,180].

In dieser Arbeit wurde für die *B. bacilliformis*-Stämme KC583 und KC584 eine dynamische Vaxign-Analyse durchgeführt, die in 20 oberflächenexponierten Zielproteinen resultierte, welche in Flagellum-assoziierte Proteine, Autotransporter, Porine und andere Außenmembranprotein gruppiert wurden. Eine Immunreaktivität ist für einige homologe Proteine aus Infektionen mit anderen Krankheitserregern bereits bekannt. Flagellum-assoziierte Proteine (z. B. FlgE und p41 Flagellin von *Borrelia burgdorferi*) sind häufig reaktiv mit Serumproben von Patienten mit Lyme-Borreliose [181,182]. Auch Flagellin und FlgE aus *B. bacilliformis* weisen immundominante Eigenschaften auf und zeigten eine starke Reaktivität mit Seren von immunisierten Kaninchen. Im Gegensatz dazu zeigte in der vorliegenden Arbeit weder Flagellin noch FlgE eine Reaktion mit Seren von Patienten, die eine *B. bacilliformis* Infektion durchgemacht haben. Da auch das flagellare L-Ring Protein FlgH lediglich eine schwache Reaktivität mit Patientenserum aufweist, dürfte die Gruppe der Flagellum-assoziierten Proteine demnach keine geeigneten serologischen Marker zum Nachweis von *B. bacilliformis*-Infektionen sein.

Autotransporter-Proteine sind als Schlüsselkomponenten für Impfstoffe bekannt (z. B. Pertactin von *Bordetella pertussis*) [183,184]. In dieser Arbeit wies der Autotransporter-E die stärkste Seroreaktivität unter allen getesteten Proteinen auf, was einen potenziellen Einsatz in der Serodiagnostik und eine Verwendung als Impfstoffkandidat möglich erscheinen lässt. Trimere Autotransporter-Adhäsine sind eine Familie obligat homotrimerer, nicht-fimbriärer und nicht-pilusförmiger bakterieller Adhäsine, denen zahlreiche biologischen Funktionen, wie z. B. bakterielle Autoagglutination, Bindung an Proteine der extrazellulären Matrix und Wirtszellen sowie die Induktion verschiedener Wirtszellreaktionen zukommen. Sie sind in α -, β - und γ -Proteobakterien weit verbreitet und sorgen in erster Linie für die anfängliche Adhäsion an spezifische molekulare Komponenten von abiotischen und biotischen Oberflächen [97,185,186]. TAAs sind häufig immundominant und gelten als vielversprechende Impfstoffkandidaten (z. B. *Acinetobacter* trimerer Autotransporter [Ata], *Haemophilus influenzae* Adhäsine [Hia]) [173]. Die TAAs von *B. bacilliformis* wurden aufgrund ihrer Homologie zu NadA von *Neisseria meningitidis*, das im Impfstoff Bexsero® (GlaxoSmithKline, Brentford, UK) gegen Meningokokken der Gruppe B enthalten ist, bereits als potenzielle Impfstoffziele betrachtet [106,163]. Allerdings zeigten BbadA und BbadB eine erhöhte Reaktivität mit den Kontrollseren (10%) und wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollseren auf. Daher muss ihre mögliche Verwendung als spezifische immunreaktive Proteine ausgeschlossen werden. Eine hohe Kreuzreaktivität war allerdings zu erwarten, da homologe TAAs in vielen anderen humanpathogenen Erregern wie z. B. *Yersinia enterocolitica* (*Yersinia* Adhäsine A [YadA]) [187], *N. meningitidis* (*Neisseria* Adhäsine [NadA]) [94],

Haemophilus influenzae (Hia) [188], *Acinetobacter baumannii* (Ata) [189], einigen pathogenen *E. coli* (immunoglobulin Bindeprotein [Eib] [190], autoagglutinierendes Adhäsion [Saa] [191], uropathogenes *E. coli*-Adhäsion G [UpaG] [192]) und *Salmonella enterica* (*Salmonella* Adhäsion A) [193] vorkommen. Eine Immunogenität wurde bereits für viele der bislang bekannten TAAs nachgewiesen und einige TAAs wie YadA, NadA, Ata und SadA lösen eine schützende Immunreaktion im jeweiligen Wirt aus [173].

Bisher werden keine Porine in Humanimpfstoffen verwendet, aber ihre potenzielle Verwendung wurde durch Porine aus *S. enterica* Serovar Typhimurium demonstriert, die bei Mäusen eine starke Antikörperreaktion hervorriefen [194]. In der Vaxign-Analyse wurden für *B. bacilliformis* mehrere Porine (Porin-A, -B, -C und Pap31) als potenzielle immundominante Ziele identifiziert. Darüber hinaus zeigten Porin-A, Porin-B und Pap31 Reaktivität mit Patientenseren. Weitere Analysen unter Verwendung von Lineblots und ELISAs verdeutlichen den potenziellen Nutzen von Porin-B als serologischer Marker und Impfstoffkomponente.

Von den übrigen Außenmembranproteinen (TonB-abhängiger Rezeptor, LysM, DUF1561 und hypothetisches Protein-B) zeigte nur das hypothetische Protein-B einen statistisch signifikanten Unterschied in der Reaktivität gegenüber den Kontrollseren und wurde daher auch für die Entwicklung eines *B. bacilliformis* ELISAs in Betracht gezogen. Die Funktion bzw. Identität des hypothetischen Protein-B ist bislang unbekannt.

Der Einsatz der reversen-Vakzinologie weist Limitationen auf. In einer Studie wurden verschiedene Softwareanwendungen für reverse-Vakzinologie-Vorhersagen auf ihre Vorhersagegenauigkeit getestet, indem ein Satz an bekannten bakteriellen Antigenen durch die Programme analysiert wurde. Dabei wurde festgestellt, dass im besten Fall 75% der Proteine *in silico* als Antigene erkannt werden konnten [195]. Um das Risiko zu minimieren, aufgrund dieser Limitationen relevante Antigene zu „verpassen“, wurde in dieser Arbeit, die *in silico* Vorhersage von Vaxign mit einem experimentellen Immunscreening von *B. bacilliformis*-Expressionsbibliotheken kombiniert, wodurch es tatsächlich gelang, den immundominanten Autotransporter-E zu identifizieren [165]. Das Screening der Expressionsbibliotheken mit Kaninchenserum resultierte mit GroEL und Flagellin in zwei weiteren reaktiven Antigenen. Die Gründe für die Diskrepanzen bei der Antigenidentifizierung könnten in den Suchalgorithmen der Vaxign-Software, dem Ursprung der Serumproben (Mensch, Kaninchen) und in den unterschiedlichen Expositionswegen gegenüber dem Erreger liegen. Bei den humanen Patientenseren erfolgte eine natürliche Infektion mit zunächst einer intradermalen und nachfolgend systemischen Immunreaktion, wohingegen die Kaninchenserum durch eine Immunisierung mit inaktivierten Bakterien generiert wurden. Kaninchen sind zwar außerordentlich wertvoll für die Generierung hochspezifischer Antikörper, dennoch haben Immunsere von Kaninchen nur eine

bedingte Aussagekraft für die Entwicklung von Serodiagnostika für menschliche Erkrankungen, da Kaninchen im Vergleich zum Menschen andere Mechanismen zur genetischen Erzeugung und Diversifizierung ihrer primären und sekundären Antikörper nutzen und sich deshalb womöglich das Antikörperrepertoire zwischen immunisierten Kaninchen und Menschen, die eine natürliche Infektion mit *B. bacilliformis* durchgemacht haben, unterscheidet [196].

5.2.2. Immunreaktive Proteine von *B. bacilliformis*

In früheren Arbeiten wurden fünf immunreaktive Proteine von *B. bacilliformis* beschrieben (GroEL, LysM, Pap31, SCS- α , SCS- β) [30,103,197,198]. Im Falle von GroEL wurde nachgewiesen, dass spezifische Antikörper die GroEL-vermittelte Mitogenität bei Endothelzellen hemmen, was auf eine Verwendung als potenziellen Impfstoff hindeutet [92,198]. Trotzdem wurde bislang kein validierter Diagnostik-Test bzw. ein Impfstoff entwickelt. Auch war es nicht möglich, GroEL durch die Vaxign-Analyse oder durch ein Screening der *B. bacilliformis*-Genomexpressionsbibliotheken mit Patientenseren nachzuweisen [30,197]. Aus nicht geklärten Gründen zeigt GroEL jedoch eine hohe Reaktivität mit anti-*B. bacilliformis* Kaninchenserum.

Im Falle von LysM wurde eine Reaktion mit Patientenseren, die an einer *B. bacilliformis* Infektion erkrankten, nachgewiesen [198]. Dieses Protein wurde ebenfalls von der Vaxign-Software als potenzielles Antigen identifiziert und zeigte eine gute Reaktivität mit Patientenseren, war aber hoch reaktiv mit Seren gesunder Blutspender (91,6%), wodurch es frühzeitig als Zielprotein ausgeschlossen wurde.

Aufgrund der Reaktivität mit IgM- und IgG-Antikörpern wurde Pap31 als potenzieller serologischer Marker für akute und vergangene *B. bacilliformis*-Infektionen vorgeschlagen [30,199]. Überraschenderweise zeigte Pap31 lediglich eine Reaktivität mit zwei der 26 Patientenseren, von denen ein Serum einen IFT-Titer von 320 und das andere Serum einen Titer von 160 aufwies. Da in der Lineblot Analyse kein signifikanter Unterschied zu Kontrollgruppe auftrat, wurde Pap31 nicht als geeigneter Seromarker in Betracht gezogen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Verwendung von denaturierten Proteinen in der Lineblot-Analyse sein. Die ausbleibende Seroreaktivität könnte auch durch linearisierten Epitope erklärt werden, was darauf hindeutet, dass Pap31 als Konformationsepitop reaktiver sein könnte. In einer zuvor veröffentlichten *in silico* Studie wurde für *pap31* eine hohe genetische Variabilität zwischen verschiedenen *B. bacilliformis*-Stämmen beschrieben, die in den hier durchgeführten Genomanalysen ebenfalls bestätigt werden konnte [180]. Es wird spekuliert, dass diese Variabilität in einem genetisch hoch-variablen Gen möglicherweise, ähnlich zum *CAMP-like factor autotransporter* (CFA) [200], an der Umgehung der Immunantwort des Wirts beteiligt sein könnte, was die Verwendung von Pap31 für weitere Diagnose- und Impfstrategien einschränkt.

Darüber hinaus wurden die beiden Untereinheiten der Succinyl-CoA-Synthetase SCS- α und SCS- β zuvor als immundominante Proteine beschrieben [30]. Allerdings zeigt eine Studie, dass der Einsatz von SCS- α und SCS- β in einem ELISA in einer nicht zufriedenstellenden Spezifität und Sensitivität resultieren. Aus diesem Grund wurden SCS- α und SCS- β für die Entwicklung eines ELISAs hier nicht in Betracht gezogen [184].

5.2.3. Analyse einer Carrión-Krankheit Serumbank

Für die Identifizierung und Evaluierung von immundominanten Proteinen wurde eine Serumsammlung, bestehend aus 26 Serumproben von Patienten mit einer diagnostizierten *B. bacilliformis*-Infektion, verwendet. Da keine immunologischen Daten zu den Seren vorlagen, aber diese für die Entwicklung von serologischen Tests verwendet werden sollten, wurde zunächst behelfsweise der anti-*B. bacilliformis* IgG Titer durch einen IFT bestimmt. Die Entwicklung des IFT orientierte sich dabei bereits vorhandenen Protokollen für *B. henselae* und *B. quintana* [137], die für *B. bacilliformis* angepasst wurden. Mittels IFT wurden von 26 Patientenseren bei zwölf Seren eindeutigem anti-*B. bacilliformis* IgG Antikörper-Titer bestimmt (> 320). Bei elf Seren war jedoch eine Bestimmung nicht eindeutig (Titer < 320 aber > 80) und drei Seren waren negativ (< 80). Warum nicht alle Seren reaktiv waren, kann nicht eindeutig geklärt werden. Dabei könnte beispielsweise der Immunstatus des Patienten oder der Zustand der Seren eine Rolle spielen. Studien zeigen, dass beispielsweise IgG Antikörper gegen SARS-CoV-2 erst acht Tage nach Infektionsbeginn detektierbar sind [201]. Möglicherweise wurden die nicht reaktiven Seren zu einem Zeitpunkt entnommen, als noch keine oder nur eine geringe Anzahl an IgG Antikörper gebildet wurden. Zudem ist es im Falle der Carrión-Krankheit nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt des Krankheitsverlauf die Bildung von IgG-Antikörper stattfindet.

5.2.4. Entwicklung eines Lineblot und ELISA-Tests

IFTs sind zwar zuverlässige serologische Diagnostika, setzen aber eine hohe fachliche Kompetenz in der Bewertung und relativ teures Equipment (Fluoreszenzmikroskop) voraus und sind daher in Regionen mit hoher Armut nur bedingt einsetzbar [202,203]. Darüber hinaus sind IFTs nicht für epidemiologische Studien mit hoher Probenanzahl geeignet, da diese durch den hohen Arbeits- und Interpretationsaufwand keinen Hochdurchsatz erlauben. Als Alternative wurden Lineblot- und ELISA-Tests in Betracht gezogen, da diese günstig und einfach in der Durchführung sind und einen hohen Durchsatz bei der Bearbeitung von Patientenproben ermöglichen.

Die Evaluation der 14 identifizierten Antigenkandidaten wurden unter Verwendung von Lineblots durchgeführt, da diese die individuelle, aber dennoch gleichzeitige Untersuchung zahlreicher Antigene ermöglichen. Hierdurch wurden insgesamt drei potenzielle Antigene (Porin-B, Autotransporter-E und hypothetisches Protein-B) identifiziert, die sich für den Nachweis von *B. bacilliformis* IgG-Antikörper

eignen. Für die Diagnose einer akuten *B. bacilliformis* Infektion wurden die Antigenkandidaten auch auf IgM-Antikörper-Seroreaktivität untersucht (Daten nicht gezeigt), allerdings zeigte sich hier keine Reaktivität mit den Patientenseren. Lineblots sind einfach in der Durchführbarkeit, können im Hochdurchsatz verarbeitet werden und sind kostengünstig, da keine teuren Geräte oder Materialien benötigt werden. Allerdings sind Lineblots in der Auswertung subjektiv und ohne Densitometer nicht quantifizierbar, was die Sensitivität und Spezifität negativ beeinflusst. Die in dieser Arbeit hergestellten ELISA-Tests zeigten eine deutlich höhere Sensitivität und Spezifität als der Lineblot. Ähnlich wie Lineblots zeichnen sich ELISAs durch ihre einfache Durchführung und relativ geringe Geräte- sowie Materialkosten aus. Darüber hinaus sind ELISA-Testergebnisse quantifizierbar und ELISAs eignen sich grundsätzlich für Hochdurchsatzanalysen durch eine Skalierbarkeit auf bis zu 96 Reaktionen pro ELISA-Platte.

Durch systematische Testung wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass beide hier entwickelten ELISAs mit verschiedenen Antigenkombinationen (Porin-B, Autotransporter-E und hypothetisches Protein-B) für den Nachweis von anti-*B. bacilliformis*-IgG-Antikörpern geeignet sind. Mit einer Spezifität von jeweils > 93% liegt die Sensitivität beider ELISAs bei 100% wenn nur die IFT-positiven Seren betrachtet werden und zwischen 75 - 80% wenn alle 26 Patientenseren in die Analyse eingeschlossen werden.

5.2.5. Ausblick: Seroepidemiologische Feldstudien zur Evaluierung der ELISA-Tests

Die Entwicklung eines serologischen Diagnostiktests war durch die geringe Anzahl der einbezogenen Serumproben von Patienten mit einer *B. bacilliformis*-Infektion limitiert, obwohl die Anzahl der hier verwendeten definierten Patientenproben eine der höchsten ist, über die berichtet wurde. Die Verwendung dieser Patientenserumproben stellte daher die einzige Möglichkeit dar, immundominante *B. bacilliformis* Proteine zu identifizieren und zu evaluieren, auch wenn diese in größeren Studien, aufgrund möglicher Kreuzreaktivitäten mit anderen Erregern, validiert werden müssen [204]. Weitere Arbeiten werden sich daher auf die Herstellung von ELISA-Kits auf einer professionellen Produktionsplattform konzentrieren, damit der *B. bacilliformis* ELISA zukünftig für seroepidemiologische Analysen in Peru und anderen südamerikanischen Ländern eingesetzt werden kann. Die Ergebnisse dieser Studien könnten dabei helfen, ein besseres epidemiologisches Verständnis für *B. bacilliformis*-Infektionen zu erhalten und sollten darüber hinaus wichtige Erkenntnisse liefern, welche Antigene sich für die Entwicklung eines Impfstoffes gegen *B. bacilliformis* eignen und eine langfristige Immunität gegen das tödliche Oroya-Fieber verleihen.

5.3. Molekulare Analyse der durch *B. bacilliformis* verursachten Hämolyse

5.3.1. *B. bacilliformis* weist eine einzigartige Kontakt-abhängige Hämolyse auf

Der pathogenetisch wohl wichtigste Schritt in *B. bacilliformis*-Infektionen ist die Invasion von Erythrozyten, die mit fortschreitendem Verlauf des Oroya-Fiebers in einer schweren hämolytischen Anämie endet [205]. Da die Lyse der Wirtserythrozyten zur hohen Sterblichkeitsrate beiträgt, wurde zuvor versucht, diejenigen Pathogenitätsfaktoren zu identifizieren, die am Prozess der Hämolyse beteiligt sind. Allerdings konnten die Hämolyse zugrundeliegenden Pathogenitätsfaktoren und molekulare Mechanismen bislang nicht aufgeklärt werden. Untersuchungen zeigten, dass *B. bacilliformis* eine Kontakt-abhängige Hämolyse aufweist, die wohl auf ein Protein zurückzuführen ist, dass für seine Aktivität keine Energie von Erythrozyten und keine Beteiligung eines Erythrozyten-Proteins benötigt [76]. Die Kontakt-Abhängigkeit wurde in weiteren Experimenten in der Arbeitsgruppe unlängst verifiziert, in denen Erythrozyten und Bakterien in einem durch einen Filter getrennten Zwei-Kammer Infektionsmodell inkubiert wurden. Dieser Filter war nur durchlässig für Proteine und Moleküle, jedoch nicht für Bakterien [206]. Dabei wurde nachgewiesen, dass ohne direkten Zell-Zell-Kontakt keine Hämolyse stattfindet und dass kein sezernierter Faktor mit hämolytischer Aktivität involviert ist. Scheinbar weist die Flagellierung der Bakterien einen Effekt auf die hämolytische Aktivität auf, da Flagellin-defiziente Bakterien eine geringere Hämolyse verursachten als Wildtyp-Bakterien [76,206]. Der beobachtete Effekt auf die Hämolyse lässt sich zum einen dadurch erklären, dass frei bewegliche Bakterien vermehrt Kontakt mit Erythrozyten aufnehmen könnten. Zum anderen gibt es auch Hinweise darauf, dass Flagellen eine Rolle bei der Adhärenz an Erythrozyten spielen und dadurch ein stabiler Zellkontakt für nachfolgende Hämolyse-verursachende Ereignisse hergestellt wird [51]. Auch müssen *B. bacilliformis* Zellen zur Verursachung der Hämolyse nicht lebendig sein, da inaktivierte Bakterien (Behandlung mit Antibiotika, Ultraschall-Lyse) immer noch hämolytische Aktivität aufweisen. Denaturierende Inaktivierungsmethoden (Hitzeinaktivierung bei 95°C) resultieren jedoch im Verlust der hämolytischen Aktivität. Daraus kann geschlossen werden, dass die *B. bacilliformis* vermittelte Hämolyse keine floride Infektion benötigt, sondern das Vorhandensein präformierter Proteine ausreichend ist [76,206].

Ein Hämolysin ähnlich zu Hly dem α -Hämolysin aus *Staphylococcus aureus* [207] oder HlyA aus *E. coli* [208] ist in *B. bacilliformis* nicht vorhanden (NCBI-Blast-Analyse Siehe Anhang Tabelle 25 und Tabelle 26). Jedoch sind in den verschiedenen *B. bacilliformis* Genomen mehrere Gene annotiert, die für ein vermutetes Hämolysin-A (NCBI-Zugangsnummern: KZN22078.1, KZM38023.1, EKS44973.1, ABM44735.1) oder Hämolysin Sekretionsprotein-D (NCBI-Zugangsnummern: KZN22169.1, KZM38155.1, KZN21496.1 und KZM37455.1) kodieren. Diese Einträge wurden allerdings nicht infektionsbiologisch-funktionell bestätigt. Eine Analyse der konservierten Domänen der vermuteten Proteine mit InterProScan [209] ordnet „Hämolysin-A“ zur Familie der TlyA rRNA (Cytidin-2'-O)-Methyltransferasen zu (siehe Anhang Abbildung 30). TylA weist diverse biologische

Funktionen auf und fungiert bspw. bei *Mycobacterium tuberculosis* als Immunevasionsfaktor, der wesentlich zur Pathogenese beiträgt, indem er adaptive Immunantworten durch Hemmung der wirtsschützenden Th1- und Th17-Zytokinantworten sowie der Autophagie moduliert [210]. Darüber hinaus katalysiert TlyA die 2'-O-Methylierung an den Nukleotiden C1409 in der 16S rRNA und C1920 in 23S rRNA und spielt eine Rolle bei der Ribosomen-Biogenese [211]. TylA zeigt *in vitro* auch eine hämolytische Aktivität, die durch Bindung und Oligomerisierung an Wirtszellmembranen erfolgt [212]. Das „Hämolsin Sekretionsprotein-D“ wurde zur Familie der HlyD ähnlichen Sekretionsproteine zugeordnet (siehe Anhang Abbildung 31). HlyD ist ein Membranfusionsprotein und wesentlich an der Sekretion des hämolytischen RTX-Toxins HlyA aus *E. coli* beteiligt [213]. Bei der HlyA Sekretion handelt es sich um ein Typ1 Sekretionssystem, bestehend aus einem Komplex aus drei Membranproteinen: einem inneren ABC-Transporter HlyB, einem Adaptorprotein HlyD und einem äußeren Membranporin TolC [214]. T1SS sind in Gram-negativen Bakterien weit verbreitet und an der Sekretion von Adhäsinen, Eisen-Aufnahme-Proteinen, Lipasen, Proteasen oder porenbildenden Toxinen beteiligt [215]. Da in *B. bacilliformis* kein Homolog für HlyA existiert und bereits gezeigt wurde, dass in der *B. bacilliformis* Hämolyse kein sezernierter Faktor involviert ist [76,103] erscheint es allerdings unwahrscheinlich, dass eines der vermuteten *B. bacilliformis* „Hämolsine“ eine Rolle in der Hämolyse spielt.

5.3.2. Identifizierung von Hämolyse-assoziierten Pathogenitätsfaktoren mittels Transposon-Mutagenese

Die Transposon-Mutagenese hat sich als zuverlässiges Werkzeug bewährt, um Gene oder Genfunktionen unterschiedlicher biologische Fragenstellungen aufzuklären. Daher wurde für die Identifizierung von Genen, die im Prozess der Hämolyse involviert sind, eine Transposon Mutagenese mit *B. bacilliformis* durchgeführt. Die daraus resultierenden Transposon-Mutanten wurden im Anschluss systematisch auf Hämolyse-Defizienz untersucht. Dabei wurden zwei Gene identifiziert, die für ein Porin (Porin-A) oder eine α/β -Hydrolase kodieren und deren *knock-out in vitro* zum vollständigen Verlust der hämolytischen Aktivität von *B. bacilliformis* führte. Diese Ergebnisse wurden durch Hämolyse-Versuche mit markerlosen *porA* und *hyd* Einzel- und Doppeldeletionsmutanten verifiziert und durch Komplementationen beider Gene *in trans* (Einzel und Doppelkomplementation) weiter bestätigt. Bislang sind allerdings der exakte Mechanismus, sowie die Interaktionen zwischen Porin-A und der α/β -Hydrolase unbekannt. Interessanterweise gehören *porA* und *hyd* keinem gemeinsamen Operon an und liegen im Genom weit voneinander entfernt (*porA*: Position 454.155 bp - 452.935 bp; *hyd*: Position 662.900 bp - 664.111 bp; Entfernung: 209.965 bp), obwohl beiden Gene funktionell eine essenzielle Rolle für den gleichen biologischen Prozess „Hämolyse“ zukommt. Bakterielle Gene sind häufig in Operons organisiert und liegen in enger räumlicher Nähe zueinander, sodass diese Gene gemeinsam reguliert werden können [216]. Die Gruppierung verwandter Gene unter einem gemeinsamen Regulationsmechanismus ermöglicht den

Bakterien eine schnelle Anpassung an Veränderungen in der Umwelt. Dass *porA* und *hyd* nicht gemeinsam, sondern unabhängig voneinander reguliert werden, könnte bedeuten, dass *porA* und *hyd* noch in weiteren biologischen Prozessen involviert sind, die nicht unmittelbar mit der Hämolyse zusammenhängen.

All diese Ergebnisse deuten auf einen neuartigen, bislang unbekanntem Hämolyse-Mechanismus bei *B. bacilliformis* hin, bei dem einem Außenmembran-Porin und einer α/β -Hydrolase eine zentrale Funktion zukommt. Allerdings ist unklar, ob noch weitere Faktoren an der durch *B. bacilliformis* bedingten Hämolyse beteiligt sind, die durch Einsatz der Transposon-Mutanten-Bibliothek nicht identifiziert wurden. Beispielsweise könnten auch essenzielle Gene am Prozess der Hämolyse beteiligt sein wie z. B. Eisenaufnahmesysteme oder Membranassemblierungssysteme aber die Identifizierung entsprechender *knock-out* Mutanten ist nicht möglich, da diese Mutanten nicht lebensfähig wären und deshalb nicht entdeckt würden. Ein Beispiel dafür ist der β -barrel assembly machinery (BAM)-Komplex Gram-negativer Bakterien. Die meisten integralen Außenmembranproteine bilden eine β -Fass-Struktur wobei der BAM-Komplex an der Insertion und Faltung fast aller bekannten OMPs beteiligt ist. Der Bam-Komplex besteht aus einem integralen β -Fass-Membranprotein BamA und vier Lipoproteinen, die mit der äußeren Membran assoziiert sind (BamB-E). Obwohl auch andere Komponenten für die funktionelle Integrität des BAM-Komplexes entscheidend sind, sind nur BamA und BamD für die Viabilität der Bakterienzelle und die OMP-Biogenese von essenzieller Bedeutung. Daher könnte BamA oder BamD bei der Integration bzw. Faltung von Porin-A und damit für die Hämolyse eine Rolle spielen aber nicht durch eine Transposonmutagenese identifiziert werden. Darüber hinaus könnten weitere Pathogenitätsfaktoren involviert sein, die keine essenzielle Rolle für die Hämolyse spielen und deren *knock-out* lediglich zu einer Reduktion der hämolytischen Aktivität führt. Grund dafür könnte eine unzureichende Anzahl an analysierten Mutanten sein oder eine zu geringe Sensitivität bei der Evaluierung der Hämolyse (Bewertung der Reduktion der hämolytischen Aktivität auf CBA-Agar mit dem bloßen Auge).

5.3.3. *In silico*-Analyse von Porin-A und der α/β -Hydrolase

Porine sind Transmembranproteine in der äußeren Membran von Gramnegativen Bakterien und bestehen aus 8 - 24 antiparallel ausgerichteten β -Faltblättern, die zusammen ein β -Fass Motiv bilden. Die dadurch gebildete Pore formt einen mit Wasser gefüllten Kanal, der eine Diffusion kleiner hydrophiler Verbindungen durch die äußere Membran ermöglicht (Abbildung 25) [217]. Porine machen einen großen Anteil aller Außenmembranproteine aus und werden nach ihrer Struktur (Monomere oder Trimere), Substratspezifität oder in klassische Porine mit einer unspezifischen Diffusion (bis 600 Da) klassifiziert. Ihnen kommen verschiedene Funktionen zu wie z. B. Aufnahme von Nährstoffen oder Ausbildung von Antibiotikaresistenzen z. B. durch Ausschleusung antibakterieller Substanzen [218].

Wie die Ergebnisse der *in silico* Charakterisierung zeigen, handelt es sich bei Porin-A um ein Porin der Familie der alphaproteobakteriellen Porine und weist eine typische Domänenarchitektur mit 16 β -Faltblättern auf.

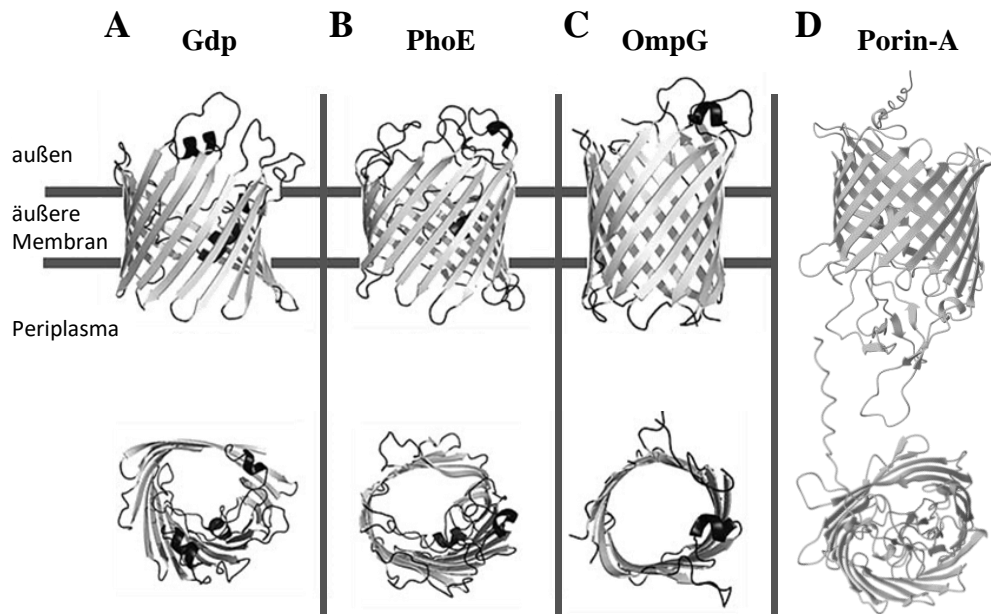


Abbildung 25: Dreidimensionale Strukturen verschiedener bakterieller Porine in der äußeren Membran. Gezeigt sind Gdp aus *Rhodobacter capsulatus*, PhoE und OmpG aus *E. coli* sowie Porin-A aus *B. bacilliformis*. Die Oberfläche und die inneren Schleifen sind für Gdp, PhoE und OmpG dunkelgrau dargestellt. Entnommen aus [217] und modifiziert.

Die α/β -Hydrolasen bilden eine der größten Familien an strukturell miteinander verwandten Enzymen und weisen ein breites Spektrum an katalytischen Reaktionen und phylogenetischer Diversität auf [219]. Alle Familienmitglieder besitzen ein charakteristisches Strukturmotiv: ein α/β -Faltblatt bestehend aus mehreren β -Faltblättern, die durch α -Helices verbunden sind und ein aktives Zentrum mit einer katalytischen Triade, ähnlich zu einer Serinprotease. Das Kernmotiv der prototypischen α/β -Hydrolasen, wie z. B. der Dienelacton-Hydrolase aus *Pseudomonas knackmussii*, besteht aus acht β -Faltblätter, von denen das zweite β -Faltblatt eine antiparallele Orientierung aufweist. Topologisch liegen die β -Faltblätter in der Reihenfolge 1, 2, 4, 3, 5, 6, 7, 8 vor und werden mit Ausnahme von den ersten beiden β -Faltblätter durch Helices miteinander verbunden (Abbildung 26 A und C) [220]. Durch superhelikale Windungen weisen das erste und das letzte β -Faltblatt eine zueinander senkrechte Orientierung auf (Abbildung 26 E). Die katalytische Triade der α/β -Hydrolasen besteht aus einem Nukleophil (Serin, Cystein oder Asparaginsäure), einer Säure (Glutamat oder Asparaginsäure) und einem Histidin. Die am höchsten konservierte Struktur der α/β -Hydrolase-Faltung ist der *nucleophilic elbow*, eine enge Schleife zwischen dem fünften β -Faltblatt und α -Helix c mit dem katalytische Nukleophil am Wendepunkt der Schleife. Durch die sterische Anordnung der Schleife nimmt das

Nukleophil ungewöhnliche Psi und Phi Torsionswinkel ein und ist oftmals kleinen Resten wie Glycin zwei Positionen vor und nach dem Nukleophil (Nu-2 und Nu+2) benachbart. Die Geometrie des *nucleophilic elbow* ermöglicht eine enge Annäherung zwischen Nukleophil und Substrat und erlaubt es, das Oxyanionen-Loch auszubilden, wodurch der negativ geladene Übergangszustand während der Hydrolyse stabilisiert wird [219]. Das Oxyanion-Loch befindet sich in direkter Nähe des Nukleophils und wird hauptsächlich durch die Stickstoffatome zweier Aminosäuren der Hauptkette gebildet, die als Oxyanion I und Oxyanion II bezeichnet werden. Der Oxyanion I Rest befindet sich nach dem Nukleophil an der Position +1 des *nucleophilic elbow* [221]. Das Hauptketten-Stickstoffatom des Oxyanions II befindet sich in der Schleife zwischen β -Faltblatt 3 und α -Helix a (Abbildung 26 A) und trägt bei den meisten α/β -Hydrolasen zur Bildung des Oxyanion-Lochs bei. Die Säure und das Histidin der katalytischen Triade liegen in der Regel in einer Schleife nach dem siebten oder achten β -Faltblatt. Auch wenn die katalytische Maschinerie bei allen α/β -Hydrolasen in ihrer Funktionsweise gleich ist, variiert die Substratvariabilität innerhalb der Proteinfamilie stark. Am häufigsten erfolgt eine Substratbindung über die *cap* Struktur die meist topologisch über der katalytischen Triade lokalisiert ist [219]. Mitglieder der Familie der α/β -Hydrolasen können unter anderem Esterasen (E.C. 3.1.1), Acetylcholinesterasen (E.C. 3.1.1.7), Phospholipasen (E.C. 3.1.1.32), Thioesterasen (E.C. 3.1.2.14), Hydroxynitrilysasen (E.C. 4.1.2.39), Lysophospholipasen (E.C. 3.1.1.5) oder Acyltransferasen (E.C. 2.3.1) [219].

Die α/β -Hydrolase aus *B. bacilliformis* weist ebenfalls ein derartiges charakteristisches α/β -Faltblatt Motiv auf und ermöglicht die Ausbildung einer katalytischen Triade im Aktiven Zentrum (Abbildung 26 C). Sie besteht aus Serin²⁰⁵, Asparaginsäure²⁶⁷, Histidin³¹⁰ und weist für das Nukleophil die Konsensus-Sequenz (Nu-2 und Nu+2) AXSXG auf. Im Gegensatz zu den prototypischen α/β -Hydrolasen weist die *B. bacilliformis* α/β -Hydrolase neun β -Faltblätter auf, die in der topologischen Reihenfolge 3, 2, 1, 5, 4, 6, 7, 8, 9 angeordnet sind. Die Oxyanionenschleife auf der das Oxyanion II lokalisiert ist liegt hier zwischen β -Faltblatt 4 und α -Helix b. Die charakteristische superhelikale Windung der β -Faltblätter ist ebenfalls im vorhergesagten Modell vorhanden (Abbildung 26 F).

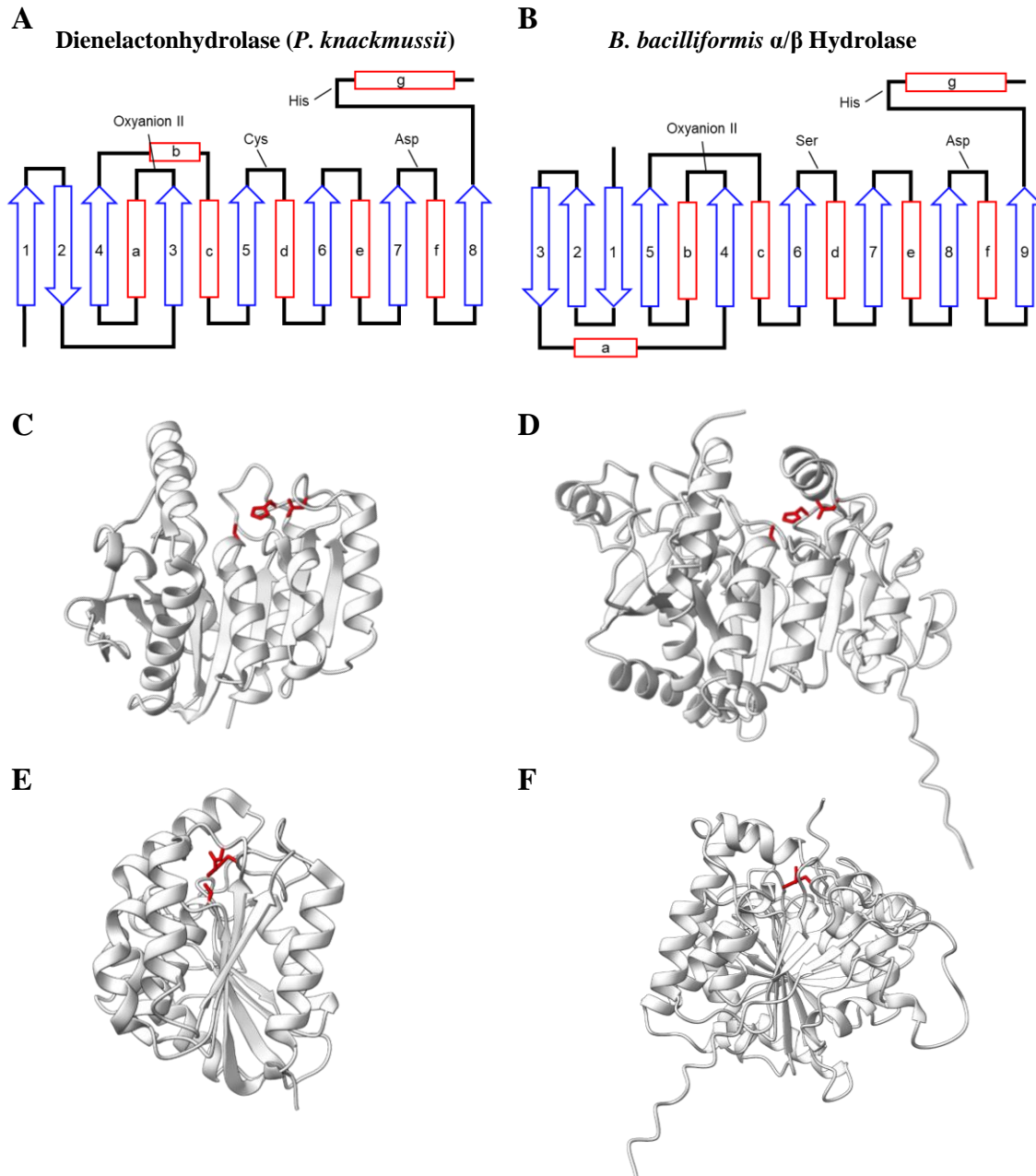


Abbildung 26: Schematische Darstellung und Bändermodelle der Dienelacton-Hydrolase sowie der *B. bacilliformis* α/β -Hydrolase. A-B: Schematische Darstellung der α/β -Hydrolase-Faltung, die die topologische Abfolge der α -Helices (rote Rechtecke) und β -Faltblätter (blaue Pfeile) sowie die Aminosäurepositionen der katalytischen Triaden und des Oxyanions II zeigt. C-F: Bändermodelle der Dienelacton-Hydrolase und der *B. bacilliformis* α/β -Hydrolase. Die Aminosäurereste der katalytischen Triade sind als Stäbchenmodell in Rot hervorgehoben. Die superhelikale Windung (E-F) setzen das erste und das letzte β -Faltblatt in eine zueinander senkrechte Orientierung. Entnommen aus [219,222] und modifiziert.

5.3.4. Bakterielle Hämolyse-Mechanismen

Bislang kann über die genauen Funktionen bzw. Mechanismen von Porin-A und der α/β -Hydrolase nur spekuliert werden. Beispiele über die Funktionsweise anderer Hämolsine können jedoch Aufschluss über potenzielle Hämolyse-Mechanismen bei *B. bacilliformis* geben. Das α -Hämolsin humanpathogener *Staphylococcus aureus* Bakterien wird als ein ca. 33 kDa großes wasserlösliches Monomer sekretiert und besitzt die Fähigkeit, an verschiedene humane Zelltypen wie Erythrozyten, Thrombozyten, Lymphozyten oder Endothelzellen zu binden. Membrangebundene Monomere können sich zu einer ca. 232 kDa großen homo-heptameren Transmembran-Pore assemblieren (Abbildung 27), die einen 100 Å langen Wasser-gefüllten Kanal mit einem Durchmesser von 14 - 46 Å bildet [223]. Die lytische Transmembran-Domäne bildet dabei die untere Hälfte eines 14 strängigen antiparallelen β -Fasses, welches aus je zwei β -Faltblättern pro Monomer gebildet wird. Die Assemblierung des Heptamers und Ausbildung der Transmembran-Pore permeabilisiert die Membran für Ionen, Wasser und kleine Moleküle und führt somit zur Zellyse. Die Sensitivität gegenüber α -Hämolsin für die Zellyse variiert zwischen verschiedenen Zelltypen und liegt im Bereich zwischen $> 1 \mu\text{M}$ bei humanen Erythrozyten und 1 nM bei Thrombozyten.

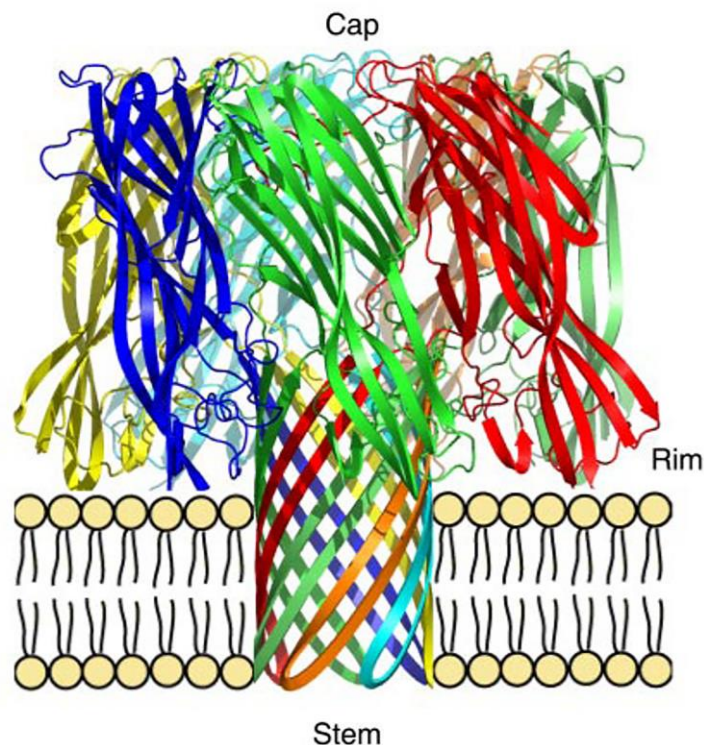


Abbildung 27: Struktur der heptameren Transmembran-Pore des *S. aureus* α -Hämolsins in der Zellmembran. Jede der sieben Untereinheiten ist in einer anderen Farbe dargestellt. Entnommen aus [224].

Einen ähnlichen Mechanismus weisen die Aerolysine aus *Aeromonas* spp. oder das α -Toxin von *Clostridium septicum* auf. Diese Toxine werden ebenfalls in das extrazelluläre Milieu sezerniert und assemblieren sich in der Zellmembran zu Transmembranporen, die die Wirtszellmembranen zerstören

und zur Zelllyse führen [225,226]. Porin-A von *B. bacilliformis* könnte sich als porenbildendes Protein ähnlich zu den zuvor genannten Hämolytinen in die Wirtszellmembranen integrieren, diese permeabilisieren und dadurch eine Lyse der Erythrozyten bewirken. Ein hämolytisches Potenzial von Porinen wurde bereits in einer Studie mit zwei gereinigten Porinen aus *Salmonella typhi* Ty2 demonstriert. Diese Porine integrierten *in vitro* in Membranen von Erythrozyten und beeinflussten dadurch die Permeabilität der Zellmembran, was letztendlich zur Lyse der Erythrozyten führte [227].

Einen anderen Hämolyse-Mechanismus weisen Phospholipasen auf, die Phosphatidylcholin als Substrat nutzen und Phospholipide in Zellmembranen hydrolysieren. Ein Vertreter dieser Gruppe ist beispielsweise die sekretierte hämolytische Phospholipase PlcHR aus *Pseudomonas aeruginosa* [228]. Die α/β -Hydrolase aus *B. bacilliformis* weist ein Motiv auf, für das *in silico* eine Lipase Funktion zugeschrieben wurde. Es benötigt hier zweifelsohne weitere Versuche, die eine mögliche Phospholipase-Aktivität der α/β -Hydrolase von *B. bacilliformis* bestätigen.

5.3.5. Infektionsstrategien interzellulärer Erreger: Die mögliche Rolle von Porin-A und der α/β -Hydrolase im Infektionsprozess von Erythrozyten

Intrazelluläre Krankheitserreger weisen eine Vielzahl unterschiedlichster Mechanismen auf, um in Wirtszellen einzudringen und dort zu persistieren, ohne dabei eine Immunantwort auszulösen und vom Wirt eliminiert zu werden. Eine Gruppe an Virulenzfaktoren, mit dem eine intrazelluläre Persistenz und Immunevasion ermöglicht werden kann, bilden die porenbildenden Proteine (PBP) [229]. PBPs spielen vor allem eine Rolle bei der Freisetzung intrazellulärer Erreger wie *Listeria*, *Shigella*, *Escherichia*, *Rickettsia* oder *Trypanosoma cruzi* aus membranumschlossenen Organellen wie Phagosomen, Phagolysosomen oder Endosomen [229]. Hauptfunktion von PBPs ist die Ausbildung von Kanälen in Zellmembranen, wodurch es zu einer osmotischen Lyse kommt. Der am besten erforschte Vertreter von PBPs ist Listeriolysin-O (LLO), ein porenbildendes Zytolysin, das von *Listeria monocytogenes* produziert wird. Die Invasion von *L. monocytogenes* in (nicht-phagozytierenden) Wirtszellen erfolgt über einen rezeptorvermittelten Mechanismus unter Beteiligung der bakteriellen Internaline-A und -B und dem Wirtszellrezeptor E-Cadherin. Durch einen Zipper-Mechanismus werden die Bakterien von der Wirtszellmembran umschlossen und liegen nach Abschluss des Internalisierungsprozesses intrazellulär in Vakuolen vor [230]. *L. monocytogenes* kann sich anschließend aus den Vakuolen mit Hilfe von LLO und einer Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase-C (PlcA) befreien und sich frei im Zytosol bewegen. Bei Kontakt mit der inneren Plasmamembran werden zelluläre Ausstülpungen hervorrufen, wodurch die *L. monocytogenes* in benachbarte Zellen wandern kann. Durch Abspaltung der Invagination liegen die Bakterien dann in Doppelmembranvakuolen innerhalb der neu infizierten Zellen vor. Aus diesen kann sich *L. monocytogenes* mit Hilfe von LLO, PlcA und einer weiteren Phospholipase (PlcB) erneut befreien und sich weiter von Zelle zu Zelle ausbreiten. [230–232].

B. bacilliformis weist eine Infektionsbiologie auf, die in ihren Grundzügen gewisse Ähnlichkeiten mit dem zuvor beschriebenen Infektionsmechanismus von *L. monocytogenes* aufweist. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen beispielsweise, dass *B. bacilliformis* nach Invasion der Wirtszelle (Erythrozyt) in membranumschlossenen Vakuolen oder frei im Zytosol vorliegen [52]. Möglicherweise könnte der „Hämolyse-Mechanismus“ von *B. bacilliformis* für die Befreiung aus intrazellulären Vakuolen genutzt werden. Darüber hinaus sind, ähnlich zu *L. monocytogenes*, ein porenbildendes Protein und eine Hydrolase mit möglicher Phospholipase-Aktivität involviert (Abbildung 28). Interessanterweise zeigt *B. bacilliformis* eine starke hämolytische Aktivität *in vitro*, jedoch können die Bakterien im Gegensatz dazu *in vivo* innerhalb infizierter Erythrozyten persistieren.

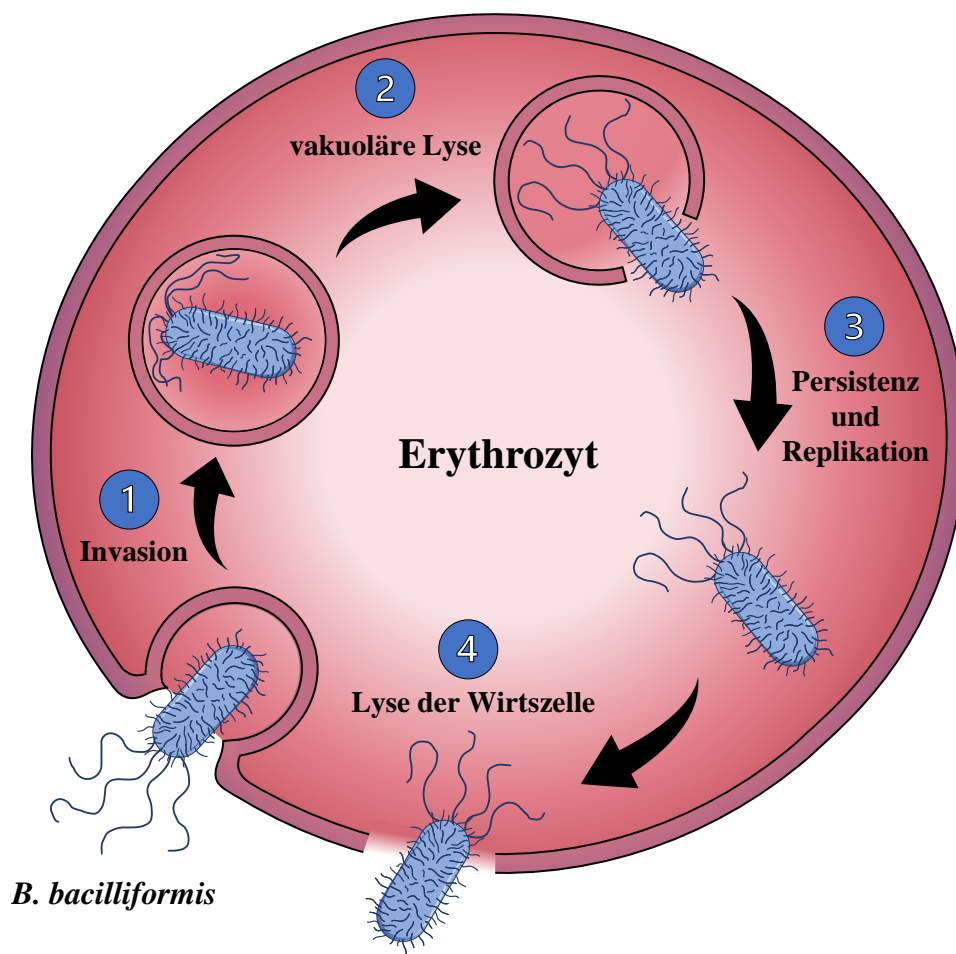


Abbildung 28: Hypothetische Infektionsstrategie von *B. bacilliformis* in humanen Erythrozyten. **(1)** *B. bacilliformis* wird durch mechanisches Einwirken auf die Erythrozytenmembran durch Flagellen in einem aktiven Prozess (erzwungene Endozytose) internalisiert. Im Laufe des Internalisierungsprozesses werden die Bakterien von der Wirtszellmembran umschlossen und durch einen Zipper-Mechanismus abgespalten, wodurch die Bakterien intrazellulär in Vakuolen vorliegen. **(2)** Die Bakterien lysieren mit Hilfe der Pathogenitätsfaktoren Porin-A und der α/β -Hydrolase die Membran der Vakuole und gelangen in das Zytosol. **(3)** Im Zytosol replizieren sich die Bakterien, wo sie über langen Zeitraum intraerythrozytär persistieren können. **(4)** Durch Lyse der Wirtszellmembran (Porin-A und α/β -Hydrolase) kann sich *B. bacilliformis* aus den Erythrozyten befreien und die sekundäre Nische (Endothelzellen) befallen (*Verruga peruana*).

Darüber hinaus ist es für einen intrazellulären Erreger eigentlich nicht von Vorteil, sein Habitat „Wirtszelle“ zu zerstören. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der Regulation der beiden Gene liegen, die es ermöglicht, dass die Pathogenitätsfaktoren unter physiologischen Bedingungen erst intraerythrozytär exprimiert werden, um eine vorzeitige Lyse der Erythrozyten zu verhindern. Der Hämolyse-Mechanismus könnte nach intrazellulärer Erregervermehrung auch genutzt werden, um aus den Erythrozyten wieder auszubrechen (Oroya-Fieber) und eine sekundäre Nische (Endothelzellen) zu befallen (*Verruga peruana*). Allerdings wird auch diskutiert, ob Erythrozyten durch Wirtsreaktionen zerstört werden und nicht direkt durch einen bakteriellen Faktor (Porin-A, α/β -Hydrolase) [3,233]. Untersuchungen von Patientenproben zeigten beispielsweise eine erhöhte mechanische Zerbrechlichkeit sowie eine verkürzte Lebensdauer der befallenen Erythrozyten sowie eine erhöhte Sequestration von Erythrozyten durch Leber und Milz [234]. Daher wird angenommen das *Bartonella*-Erythrozyten-Komplexe durch Makrophagen in der Leber und Milz zerstört werden. [3,233]. Für die Beantwortung dieser Fragen sind weitere Infektionsexperimente notwendig mit besonderem Fokus auf Genregulation von Porin-A und der α/β -Hydrolase, Funktionsanalysen und *in vivo* Untersuchungen, letztere dürften aufgrund der Notwendigkeit von Primaten-Infektionsmodellen allerdings kaum durchführbar sein.

5.3.6. Etablierung eines *B. bacilliformis* Tiermodells zur Untersuchung der Hämolyse

Bislang gibt es kein zuverlässiges *B. bacilliformis* Kleintierinfektionsmodell, zelluläre Mikrobiologie ist gegenwärtig Methode der Wahl, um die zugrundeliegenden Pathogenitätsmechanismen von *B. bacilliformis* zu analysieren. Daher wurden verschiedene *in vitro* Infektionsmodelle unter Verwendung von humanen Erythrozyten und Endothelzellen entwickelt, die der Beantwortung weniger komplexer biologischer Fragestellungen dienen [52,76,78,82]. Für die Untersuchung komplexerer Prozesse (z. B. Immunbiologie, Infektionsverlauf) sind diese Modelle zu artifiziell. Als Alternative können zugrunde liegende Immunantworten z. B. Antikörper anhand von Blut- und Serumproben infizierter Patienten zumindest deskriptiv bestimmt werden [26,30]. Wie zuvor diskutiert sind diese Proben jedoch kaum verfügbar, nicht standardisierbar und schwer zu beschaffen. Ein geeignetes Tierinfektionsmodell ist daher dringend erforderlich.

In den 1920er Jahren erfolgten zahlreiche Versuche zur Identifizierung von Tierarten, die für eine *B. bacilliformis*-Infektion empfänglich sind und als potenzielle Infektionsmodelle genutzt werden könnten. Unter anderem wurden Hunde, Esel, Meerschweinchen, Mäuse, Kaninchen, Ratten, Meerkatzen, Rhesusaffen (*Macaca mulatta*), Schimpansen und Orang-Utans getestet. Jedoch zeigte sich, dass nur Primaten (Rhesusaffen, Schimpansen und Orang-Utans) charakteristische Symptome der Carrión-Krankheit entwickelten [129,235]. Im Vergleich zu *M. mulatta* waren die Symptome bei Schimpansen und Orang-Utans jedoch schwächer ausgeprägt und wiesen weniger Ähnlichkeit zum Krankheitsverlauf im Menschen auf [129]. Ähnliche Ergebnisse wurden später auch in Nachtaffen

beobachtet. Diese entwickelten ebenfalls nach einer intravenösen *B. bacilliformis* Injektion eine nachweisbare intraerythrozytäre Bakteriämie, dennoch schlug der Nachweis von *B. bacilliformis* in Blutkulturen und durch PCR fehl [107]. In Deutschland sind die Versuchstierzahlen in den letzten Jahren stetig gesunken. Die Zahl der verwendeten Affen und Halbaffen in Tierversuchen ist weiterhin rückläufig und betrug im Jahr 2022 1.886 Versuche (Vergleich zum Vorjahr: 2.031 Versuche)[236]. Die Verwendung von Menschenaffen ist aktuell in Deutschland nicht vorstellbar, Experimente an Menschenaffen wurden zuletzt im Jahre 1991 für wissenschaftliche Zwecke vorgenommen [236]. Theoretisch wäre es also möglich, ein *M. mulatta* Infektionsmodell für *B. bacilliformis* Infektionen auch in Deutschland zu etablieren, dies dürfte aber aufgrund der geringen medizinischen Bedeutung der Carrión-Krankheit in Deutschland (kein Endemiegebiet) gegenwärtig kaum realisierbar erscheinen. Daher ist die Entwicklung eines Kleintier-Nager-Infektionsmodell am naheliegendsten. Bislang wurden Mäuse und Ratten in Betracht gezogen, da diese gut etablierte und erforschte Tiermodelle für Infektionskrankheiten darstellen. Versuche mit BALB/c-Mäusen, denen intraperitoneal, intradermal oder subkutan verschiedene Mengen lebende *B. bacilliformis* Bakterien injiziert wurden, zeigten allerdings keine Entwicklung entsprechender klinischer Symptome: weder traten eine Bakteriämie noch histopathologische Läsionen ähnlich zu *Verruga peruana* auf [237]. Versuche, ein Ratteninfektionsmodell zu etablieren, um den Mechanismus der Gefäßproliferationen durch *B. bacilliformis* zu untersuchen, waren etwas erfolgreicher [238]. Hierzu wurden Polyvinylalkohol-Schwammscheiben subkutan in adulte Sprague-Dawley-Ratten implantiert und drei Tage nach der Implantation mit *B. bacilliformis*-Kulturextrakten injiziert. Die Schwämme wurden anschließend nach sieben Tagen mikroskopisch untersucht und eine etwa 2,5-fache Zunahme der Blutgefäßbildung festgestellt. Dieses Infektionsmodell ist allerdings hochgradig artifiziell und spiegelt keinesfalls den natürlichen Verlauf einer Infektion wider.

B. bacilliformis gilt als strikt humanpathogen und es existiert in der Literatur keinerlei Hinweis für eine Infektions-Suszeptibilität von Mäusen und Ratten, was sich durch das Fehlen eines Trw-T4SS erklären lässt. Der Trw-Locus der jeweiligen tierpathogenen *Bartonella* spp. ermöglicht eine wirtsspezifische Adhäsion an Erythrozyten, was entscheidend für den Erfolg einer Infektion ist [50], dieser fehlt bei *B. bacilliformis* als Vertreter der ältesten phylogenetischen Linie.

Eine mögliche Alternative zur Nachahmung der Oroya-Fieber Phase (Bakteriämiephase) und zur Überwindung der Speziesbarriere in murinen Infektionsmodellen stellt die Verwendung von Mäusen dar, die mit humanen Erythrozyten transfundiert wurden. Da *B. bacilliformis* an humane Erythrozyten angepasst ist, würde ein derartiges Modell eine vielversprechende Alternative für die *in vivo* Analyse der bakteriellen Pathogenitätsmechanismen von *B. bacilliformis* dar. Allerdings sind die Endothelzellen, die eine potenzielle Nische für *B. bacilliformis* darstellen, weiterhin murinen

Ursprungs und es ist nicht bekannt welche Rolle Endothelzellen im Infektionsverlauf des Oroya-Fiebers spielen und ob hier ebenfalls ein Wirtstropismus vorliegt.

5.3.7. Ausblick: Entwicklung eines murinen *in vivo* *B. bacilliformis* Hämolysemodells

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich murine Erythrozyten von C57BL/6-Mäusen *in vitro* mit *B. bacilliformis* „infizieren“ lassen bzw. lysiert werden können, obwohl Mäuse (BALB/c) als resistent gegen *B. bacilliformis* Infektionen gelten. Da die murinen Erythrozyten eine Hämolyse zeigen, die in der Ausprägung ähnlich zur Hämolyse menschlicher Erythrozyten ist, lässt vermuten, dass der Hämolyse-Mechanismus von *B. bacilliformis* nicht wirtsspezifisch ist bzw. murine und humane Erythrozyten die gleichen Rezeptoren aufweisen. Für die Weiterführung dieses Projekts wäre es wünschenswert, ein murines Infektionsmodell (C57BL/6) für die *in vivo* Untersuchung der *B. bacilliformis* Hämolyse zu etablieren. Hierbei sollen Tierversuche mit nativen (murinen) Erythrozyten sowie mit transfundierten humanen Erythrozyten erfolgen, von denen erwartet wird, dass die Ergebnisse aus den bislang erfolgten *in vitro* Experimente *in vivo* bestätigt werden können. Diese Versuche bilden eine experimentelle Basis, um die Rolle von Porin-A und der α/β -Hydrolase näher untersuchen zu können und um potenzielle (Porin-A und α/β -Hydrolase) Inhibitoren mit anti-hämolytischer und damit therapeutischer Wirkung testen zu können. Dies würde eine weitere sog. „anti-Virulenzstrategie“ darstellen, die dort ansetzt, wo die tödliche Schlüsselreaktion in *B. bacilliformis* abläuft: bei der Hämolyse humaner Erythrozyten, im Laufe des Oroya-Fiebers.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Hotez PJ, Aksoy S, Brindley PJ, Kamhawi S. What constitutes a neglected tropical disease? *PLoS Negl Trop Dis* 2020;14:1–6. doi:10.1371/journal.pntd.0008001.
- [2] Okaro U, Addisu A, Casanas B, Anderson B. *Bartonella* species, an emerging cause of blood-culture-negative endocarditis. *Clin Microbiol Rev* 2017;30:709–46. doi:10.1128/cmr.00013-17.
- [3] Harms A, Dehio C. Intruders below the radar: Molecular pathogenesis of *Bartonella* spp. *Clin Microbiol Rev* 2012;25:42–78. doi:10.1128/cmr.05009-11.
- [4] Mullins KE, Hang J, Jiang J, Leguia M, Kasper MR, Ventosilla P, et al. Description of *Bartonella ancashensis* sp. nov., isolated from the blood of two patients with verruga peruana. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;65:3339–43. doi:10.1099/ijsem.0.000416.
- [5] Engel P, Salzburger W, Liesch M, Chang CC, Maruyama S, Lanz C, et al. Parallel evolution of a type IV secretion system in radiating lineages of the host-restricted bacterial pathogen *Bartonella*. *PLoS Genet* 2011;7:1001296. doi:10.1371/journal.pgen.1001296.
- [6] Harms A, Segers FHID, Quebatte M, Mistl C, Manfredi P, Körner J, et al. Evolutionary dynamics of pathoadaptation revealed by three independent acquisitions of the VirB/D4 type IV secretion system in *Bartonella*. *Genome Biol Evol* 2017;9:761. doi:10.1093/gbe/evx042.
- [7] Mullins KE, Hang J, Clifford RJ, Onmus-Leone F, Yang Y, Jiang J, et al. Whole-genome analysis of *Bartonella ancashensis*, a novel pathogen causing verruga peruana, rural Ancash region, Peru. *Emerg Infect Dis* 2017;23:430. doi:10.3201/EID2303.161476.
- [8] Dichter AA, Schultze TG, Becker SA, Tsukayama P, Kempf VAJ. Complete genome sequence of *Bartonella bacilliformis* strain KC584 (ATCC 35686). *Microbiol Resour Announc* 2020;9:e01377-19. doi:10.1128/mra.01377-19.
- [9] Engel P, Dehio C. Genomics of host-restricted pathogens of the genus *Bartonella*. *Genome Dyn* 2009;6:158–69. doi:10.1159/000235769.
- [10] Prutsky G, Domecq JP, Mori L, Bebeko S, Matzumura M, Sabouni A, et al. Treatment outcomes of human bartonellosis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis* 2013;17:e811–9. doi:10.1016/j.ijid.2013.02.016.
- [11] Yuan C, Zhu C, Wu Y, Pan X, Hua X. Bacteriological and molecular identification of *Bartonella* species in cats from different regions of China. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:1301. doi:10.1371/journal.pntd.0001301.
- [12] Holmes AH, Greenough TC, Balady GJ, Regnery RL, Anderson BE, O'Keane JC, et al. *Bartonella henselae* endocarditis in an immunocompetent adult. *Clin Infect Dis* 1995;21:1004–7. doi:10.1093/clinids/21.4.1004.
- [13] Ohl ME, Spach DH. *Bartonella quintana* and urban trench Fever. *Clin Infect Dis* 2000;31:131–5. doi:10.1086/313890.

- [14] Karem KL, Paddock CD, Regnery RL. *Bartonella henselae*, *B. quintana*, and *B. bacilliformis*: historical pathogens of emerging significance. *Microbes Infect* 2000;2:1193–205. doi:10.1016/S1286-4579(00)01273-9.
- [15] Koehler JE, Sanchez MA, Garrido CS, Whitfield MJ, Chen FM, Berger TG, et al. Molecular epidemiology of *Bartonella* infections in patients with bacillary angiomatosis–peliosis. *N Engl J Med* 1997;337:1876–83. doi:10.1056/nejm199712253372603.
- [16] Garcia-Quintanilla M, Dichter AA, Guerra H, Kempf VAJ. Carrion’s disease: More than a neglected disease. *Parasite Vectors* 2019;12:1–12. doi:10.1186/S13071-019-3390-2.
- [17] Amano Y, Rumbela J, Knobloch J, Olson J, Kron M. Bartonellosis in Ecuador: Serosurvey and current status of cutaneous verrucous disease. *Am J Trop Med Hyg* 1997;57:174–9. doi:10.4269/ajtmh.1997.57.174.
- [18] Lydy SL, Lascano MS, Garcia-Perez JE, Williams-Newkirk AJ, Grijalva MJ. Seroprevalence and risk factors for infection with *Bartonella bacilliformis* in Loja province, Ecuador. *Emerg Microbes Infect* 2018;7:1–10. doi:10.1038/S41426-018-0110-5.
- [19] Battisti JM, Lawyer PG, Minnick MF. Colonization of *Lutzomyia verrucarum* and *Lutzomyia longipalpis* sand flies (Diptera: Psychodidae) by *Bartonella bacilliformis*, the Etiologic Agent of Carrion’s Disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;e0004128. doi:10.1371/journal.pntd.0004128.
- [20] Gomes C, Ruiz J. Carrion’s Disease: The sound of silence. *Clin Microbiol Rev* 2018;31. doi:10.1128/cmr.00056-17.
- [21] Minnick MF, Anderson BE, Lima A, Battisti JM, Lawyer PG, Birtles RJ. Oroya fever and verruga peruana: Bartonelloses unique to South America. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8:1–19. doi:10.1371/journal.pntd.0002919.
- [22] Maguina C, Garcia PJ, Gotuzzo E, Cordero L, Spach DH. Bartonellosis (Carrion’s disease) in the modern era. *Clin Infect Dis* 2001;33:772–9. doi:10.1086/322614/2/33-6-772.
- [23] Gomes C, Pons MJ, del Valle Mendoza J, Ruiz J. Carrion’s disease: An eradicable illness? *Infect Dis Poverty* 2016;5:105. doi:10.1186/s40249-016-0197-7.
- [24] Ellis BA, Rotz LD, Leake JAD, Samalvides F, Bernable J, Ventura G, et al. An outbreak of acute bartonellosis (Oroya fever) in the Urubamba region of Peru, 1998. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:344–9. doi:10.4269/ajtmh.1999.61.344.
- [25] Del Valle Mendoza J, Silva Caso W, Tinco Valdez C, Pons MJ, Del Valle LJ, Casabona Oré V, et al. Diagnosis of Carrion’s disease by direct blood PCR in thin blood smear negative samples. *PLoS One* 2014;9:1–7. doi:10.1371/journal.pone.0092283.
- [26] Pons MJ, Gomes C, Aguilar R, Barrios D, Aguilar-Luis MA, Ruiz J, et al. Immunosuppressive and angiogenic cytokine profile associated with *Bartonella bacilliformis* infection in post-outbreak and endemic areas of Carrion’s disease in Peru. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11:e0005684. doi:10.1371/journal.pntd.0005684.

- [27] Noguchi H, Lorcnte S. Etiology of Oroya fever X. Comparative studies of different strains of *Bartonella bacilliformis*, with special reference to the relationship between the clinical types of Carrion's disease and the virulence of the infecting organism. *J Exp Med* 1928;47:219–34. doi:10.1084/jem.47.2.219.
- [28] Noguchi H, Muller H, Tilden E, Tyler J. Etiology of Oroya fever XV : Effect of immune serum on the course of *Bartonella bacilliformis* infection in *Macacus rhesus*. *J Exp Med* 1929;50:355–64.
- [29] Knobloch J, Solano L, Alvarez O, Delgado E. Antibodies to *Bartonella bacilliformis* as determined by fluorescence antibody test, indirect haemagglutination and ELISA. *Trop Med Parasitol* 1985;36:183-185.
- [30] Gomes C, Palma N, Pons MJ, Magallón-Tejada A, Sandoval I, Tinco-Valdez C, et al. Succinyl-CoA synthetase: New antigen candidate of *Bartonella bacilliformis*. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10:e0004989. doi:10.1371/journal.pntd.0004989.
- [31] Chamberlin J, Laughlin L, Gordon S, Romero S, Solórzano N, Regnery RL. Serodiagnosis of *Bartonella bacilliformis* infection by indirect fluorescence antibody assay: Test development and application to a population in an area of bartonellosis endemicity. *J Clin Microbiol* 2000;38:4269–71. doi:10.1128/jcm.38.11.4269-4271.2000.
- [32] Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010 10:3 2010;10:170–81. doi:10.1038/nri2711.
- [33] Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *CRC crit rev immunol* 2012;32:23–63. doi:10.1615/critrevimmunol.V32.I1.30.
- [34] Huarcaya E, Maguina C, Best I, Solorzano N, Leeman L. Immunological response in cases of complicated and uncomplicated bartonellosis during pregnancy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2007;49:335–7. doi:10.1590/S0036-46652007000500012.
- [35] Breitschwerdt EB, Kordick DL. Bartonella infection in animals: Carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:428. doi:10.1128/cmr.13.3.428-438.2000.
- [36] Hambuch TM, Handley SA, Ellis B, Chamberlin J, Romero S, Regnery R. Population genetic analysis of *Bartonella bacilliformis* isolates from areas of Peru where Carrion's disease is endemic and epidemic. *J Clin Microbiol* 2004;42:3675. doi:10.1128/jcm.42.8.3675-3680.2004.
- [37] Caceres A. G. Geographic distribution of *Lutzomyia verrucarum* (Townsend, 1913 Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), vector of human bartonellosis in Peru. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1993;35:485–90. doi:10.1590/S0036-46651993000600002.
- [38] Mändle T, Einsele H, Schaller M, Neumann D, Vogel W, Autenrieth IB, et al. Infection of human CD34+ progenitor cells with *Bartonella henselae* results in intraerythrocytic presence of *B. henselae*. *Blood* 2005;106:1215–22. doi:10.1182/blood-2004-12-4670.

- [39] Kordick DL, Brown TT, Shin K, Breitschwerdt EB. Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. *J Clin Microbiol* 1999;37:1536. doi:10.1128/jcm.37.5.1536-1547.1999.
- [40] Pérez C, Maggi RG, Diniz PPVP, Breitschwerdt EB. Molecular and serological diagnosis of *Bartonella* infection in 61 dogs from the United States. *J Vet Intern Med* 2011;25:805–10. doi:10.1111/J.1939-1676.2011.0736.X.
- [41] Plettenberg A, Lorenzen T, Burtsche BT, Rasokat H, Kaliebe T, Albrecht H, et al. Bacillary angiomatosis in HIV-infected patients - An epidemiological and clinical study. *Dermatology* 2000;201:326–31. doi:10.1159/000051547.
- [42] Foote LE, Geer JC, Stich YE. Electron microscopy of the *Anaplasma* body: Ultra-thin sections of bovine erythrocytes. *Science* 1958;128:147–8. doi:10.1126/science.128.3316.147-A.
- [43] Groebel K, Hoelzle K, Wittenbrink MM, Ziegler U, Hoelzle LE. *Mycoplasma suis* invades porcine erythrocytes. *Infect Immun* 2009;77:576–84. doi:10.1128/iai.00773-08.
- [44] Vogl G, Plaickner A, Szathmary S, Stipkovits L, Rosengarten R, Szostak MP. *Mycoplasma gallisepticum* invades chicken erythrocytes during infection. *Infect Immun* 2008;76:71–7. doi:10.1128/iai.00871-07.
- [45] Tougan T, Edula JR, Morita M, Takashima E, Honma H, Tsuboi T, et al. The Malaria parasite *Plasmodium falciparum* in red blood cells selectively takes up serum proteins that affect host pathogenicity. *Malar J* 2020;19. doi:10.1186/s12936-020-03229-1.
- [46] Sojka D, Jalovecká M, Perner J, Babesia H, Olivieri A, Lentini G, et al. *Babesia*, *Theileria*, *Plasmodium* and hemoglobin. *Microorganisms* 2022;10. doi:10.3390/microorganisms10081651.
- [47] Boulouis HJ, Barrat F, Bermond D, Bernex F, Danie` D, Thibault D, et al. Kinetics of *Bartonella birtlesii* infection in experimentally infected mice and pathogenic effect on reproductive functions. *Infect Immun* 2001;69:5313–7. doi:10.1128/iai.69.9.5313-5317.2001.
- [48] Schülein R, Seubert A, Gille C, Lanz C, Hansmann Y, Piémont Y, et al. Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes: A unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *J Exp Med* 2001;193:1077–86. doi:10.1084/jem.193.9.1077.
- [49] Abbott RC, Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kikuchi Y, Koehler JE, et al. Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1997;20:41–51. doi:10.1016/S0147-9571(96)00025-2.
- [50] Vayssier-Taussat M, Rhun L, Deng DK, Biville HK, Cescau F. The Trw type IV secretion system of *Bartonella* mediates host-specific adhesion to erythrocytes. *PLoS Pathog* 2010;6:1000946. doi:10.1371/journal.ppat.1000946.
- [51] Scherer DC, Deburon-Connors I, Minnick MF. Characterization of *Bartonella bacilliformis* flagella and effect of anti-flagellin antibodies on invasion of human erythrocytes. *Infect Immun* 1993;61:4962–71. doi:10.1128/iai.61.12.4962-4971.1993.

- [52] Ann Benson L, Kar S, Mclaughlin G, Ihler GM. Entry of *Bartonella bacilliformis* into erythrocytes. *Infect Immun* 1986;54:347–53. doi:10.1128/iai.54.2.347-353.1986.
- [53] Dehio C. Infection-associated type IV secretion systems of *Bartonella* and their diverse roles in host cell interaction. *Cell Microbiol* 2008;10:1591. doi:10.1111/J.1462-5822.2008.01171.X.
- [54] Deng HK, Le Rhun D, Le Naour E, Bonnet S, Vayssier-Taussat M. Identification of *Bartonella* Trw host-specific receptor on erythrocytes. *PLoS One* 2012;7:e41447. doi:10.1371/journal.pone.0041447.
- [55] Schröder G, Dehio C. Virulence-associated type IV secretion systems of *Bartonella*. *Trends Microbiol* 2005;13:336–42. doi:10.1016/j.tim.2005.05.008.
- [56] Schülein R, Guye P, Rhomberg TA, Schmid MC, Schröder G, Vergunst AC, et al. A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of *Bartonella henselae* into human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:856–61. doi:10.1073/.0406796102.
- [57] Buckles EL, McGinnis Hill E. Interaction of *Bartonella bacilliformis* with human erythrocyte membrane proteins. *Microb Pathog* 2000;29:165–74. doi:10.1006/mpat.2000.0381.
- [58] Rearden A, Magnet A, Kudo S, Fukuda M. Glycophorin B and glycophorin E genes arose from the glycophorin A ancestral gene via two duplications during primate evolution. *J Biol Chem* 1993;268:2260–7. doi:10.1016/s0021-9258(18)53991-0.
- [59] Mayer DCG, Cofie J, Jiang L, Hartl DL, Tracy E, Kabat J, et al. Glycophorin B is the erythrocyte receptor of *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding ligand, EBL-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:5348–52. doi:10.1073/pnas.0900878106.
- [60] Goel VK, Li X, Chen H, Liu SC, Chishti AH, Oh SS. Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5164–9. doi:10.1073/pnas.0834959100.
- [61] Xu YH, Lu ZY, Ihler GM. Purification of deformin, an extracellular protein synthesized by *Bartonella bacilliformis* which causes deformation of erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta* 1995;1234:173–83. doi:10.1016/0005-2736(94)00271-P.
- [62] Kaiser PO, Riess T, O'Rourke F, Linke D, Kempf VAJ. *Bartonella* spp.: Throwing light on uncommon human infections. *Int J Med Microbiol* 2011;301:7–15. doi:10.1016/j.ijmm.2010.06.004.
- [63] Seubert A, Schulein R, Dehio C. Bacterial persistence within erythrocytes: a unique pathogenic strategy of *Bartonella* spp. *Int J Med Microbiol* 2002;291:555–60. doi:10.1078/1438-4221-00167.
- [64] Cartwright JL, Britton P, Minnick MF, McLennan AG. The IalA invasion gene of *Bartonella bacilliformis* encodes a (di)nucleoside polyphosphate hydrolase of the MutT motif family and has homologs in other invasive bacteria. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;256:474–9. doi:10.1006/bbrc.1999.0354.

- [65] Mitchell SJ, Minnick MF. Characterization of a two-gene locus from *Bartonella bacilliformis* associated with the ability to invade human erythrocytes. *Infect Immun* 1995;63:1552–62.
- [66] Saenz HL, Engel P, Stoeckli MC, Lanz C, Raddatz G, Vayssier-Taussat M, et al. Genomic analysis of *Bartonella* identifies type IV secretion systems as host adaptability factors. *Nat Genet* 2007 39:12 2007;39:1469–76. doi:10.1038/ng.2007.38.
- [67] Blanc L, Salomao M, Guo X, An X, Gratzer W, Mohandas N. Control of erythrocyte membrane-skeletal cohesion by the spectrin-membrane linkage. *Biochemistry* 2010;49:4516–23. doi:10.1021/BI1003684.
- [68] Jay DG. Role of band 3 in homeostasis and cell shape. *Cell* 1996;86:853–4. doi:10.1016/S0092-8674(00)80160-9.
- [69] Hanspal M, Dua M, Takakuwa Y, Chishti AH, Mizuno A. *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-2 cleaves erythrocyte membrane skeletal proteins at late stages of parasite development. *Blood* 2002;100:1048–54. doi:10.1182/blood-2002-01-0101.
- [70] Deguercy A, Hommel M, Schrével J. Purification and characterization of 37-kilodalton proteases from *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* which cleave erythrocyte cytoskeletal components. *Mol Biochem Parasitol* 1990;38:233–44. doi:10.1016/0166-6851(90)90026-I.
- [71] Ben-Tekaya H, Gorvel J-P, Dehio C. *Bartonella* and *Brucella*-weapons and strategies for stealth attack. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;1–19. doi:10.1101/cshperspect.a010231.
- [72] Rolain JM, Scola B La, Liang Z, Davoust B, Raoult AD. Immunofluorescent detection of intraerythrocytic *Bartonella henselae* in naturally infected cats. *J Clin Microbiol* 2001;39:2978–80. doi:10.1128/JCM.39.8.2978-2980.2001.
- [73] Rolain JM, Novelli S, Ventosilla P, Maguina C, Guerra H, Raoult D. Immunofluorescence detection of *Bartonella bacilliformis* flagella *in vitro* and *in vivo* in human red blood cells as viewed by laser confocal microscopy. *Ann N. Y. Acad Sci* 2003;990:581–4. doi:10.1111/J.1749-6632.2003.TB07430.X.
- [74] Rolain JM, Foucault C, Guieu R, La Scola B, Brouqui P, Raoult D. *Bartonella quintana* in human erythrocytes. *Lancet* 2002;360:226–8. doi:10.1016/S0140-6736(02)09462-X.
- [75] Kordick DL, Breitschwerdt EB. Intraerythrocytic presence of *Bartonella henselae*. *J Clin Microbiol* 1995;33:1655–6. doi:10.1128/JCM.33.6.1655-1656.1995.
- [76] Hendrix LR. Contact-dependent hemolytic activity distinct from deforming activity of *Bartonella bacilliformis*. *FEMS Microbiol Lett* 2000;182:119–24. doi:10.1111/J.1574-6968.2000.TB08884.X.
- [77] Ricketts WE. *Bartonella bacilliformis* anemia (Oroya fever): A study of thirty cases. *Blood* 1948;3:1025–49. doi:10.1182/blood.V3.9.1025.1025.

- [78] Hill EM, Raji A, Valenzuela MS, Garcia F, Hoover R. Adhesion to and invasion of cultured human cells by *Bartonella bacilliformis*. *Infect Immun* 1992;60:4051–8. doi:10.1128/iai.60.10.4051-4058.1992.
- [79] Williams-Bouyer NM, Hill EM. Involvement of host cell tyrosine phosphorylation in the invasion of HEp-2 cells by *Bartonella bacilliformis*. *FEMS Microbiol Lett* 1999;171:191–201. doi:10.1111/J.1574-6968.1999.TB13432.X.
- [80] Musso T, Badolato R, Ravarino D, Stornello S, Panzanelli P, Merlino C, et al. Interaction of *Bartonella henselae* with the murine macrophage cell line J774: Infection and proinflammatory response. *Infect Immun* 2001;69:5974–80. doi:10.1128/iai.69.10.5974-5980.2001.
- [81] Kempf VAJ, Schairer A, Neumann D, Grassl GA, Lauber K, Lebidziejewski M, et al. *Bartonella henselae* inhibits apoptosis in Mono Mac 6 cells. *Cell Microbiol* 2005;7:91–104. doi:10.1111/J.1462-5822.2004.00440.X.
- [82] Garcia FU, Wojta J, Hoover RL. Interactions between live *Bartonella bacilliformis* and endothelial cells. *Infect Dis* 1992;165:1138–41. doi:10.1093/infdis/165.6.1138.
- [83] Verma A, Ihler GM. Activation of Rac, Cdc42 and other downstream signalling molecules by *Bartonella bacilliformis* during entry into human endothelial cells. *Cell Microbiol* 2002;4:557–69. doi:10.1046/J.1462-5822.2002.00217.X.
- [84] Verma A, Davis GE, Ihler GM. Infection of human endothelial cells with *Bartonella bacilliformis* is dependent on Rho and results in activation of Rho. *Infect Immun* 2000;68:5960–9. doi:10.1128/iai.68.10.5960-5969.2000.
- [85] Verma A, Davis GE, Ihler GM. Formation of stress fibres in human endothelial cells infected with *Bartonella bacilliformis* is associated with altered morphology, impaired migration and defects in cell morphogenesis. *Cell Microbiol* 2001;3:169–80. doi:10.1046/J.1462-5822.2001.00104.X.
- [86] Schmid MC, Scheidegger F, Dehio M, Balmelle-Devaux N, Schulein R, Guye P, et al. A translocated bacterial protein protects vascular endothelial cells from apoptosis. *PLoS Pathog* 2006;2:e115. doi:10.1371/journal.ppat.0020115.
- [87] Salcedo R, Young HA, Ponce ML, Ward JM, Kleinman HK, Murphy WJ, et al. Eotaxin (CCL11) induces *in vivo* angiogenic responses by human CCR3+ endothelial cells. *TJ Immunol* 2001;166:7571–8. doi:10.4049/jimmunol.166.12.7571.
- [88] Kempf VAJ, Volkmann B, Schaller M, Sander CA, Alitalo K, Rieß T, et al. Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. *Cell Microbiol* 2001;3:623–32. doi:10.1046/J.1462-5822.2001.00144.X.
- [89] Tsukamoto K, Shinzawa N, Kawai A, Suzuki M, Kidoya H, Takakura N, et al. The *Bartonella* autotransporter BafA activates the host VEGF pathway to drive angiogenesis. *Nat Commun* 2020;11:1–14. doi:10.1038/s41467-020-17391-2.

- [90] Tsukamoto K, Kumadaki K, Tatematsu K, Suzuki N, Doi Y. The passenger domain of *Bartonella bacilliformis* BafA promotes endothelial cell angiogenesis via the VEGF receptor signaling pathway. *MSphere* 2022. doi:10.1128/msphere.00081-22.
- [91] Cerimele F, Brown LF, Bravo F, Ihler GM, Kouadio P, Arbiser JL. Infectious angiogenesis: *Bartonella bacilliformis* infection results in endothelial production of angiopoietin-2 and epidermal production of vascular endothelial growth factor. *Am J Pathol* 2003;163:1321–7. doi:10.1016/S0002-9440(10)63491-8.
- [92] Minnick MF, Smitherman LS, Samuels DS. Mitogenic effect of *Bartonella bacilliformis* on human vascular endothelial cells and involvement of GroEL. *Infect Immun* 2003;71:6933–42. doi:10.1128/iai.71.12.6933-6942.2003.
- [93] Pepe JC, Wachtel MR, Wagar E, Miller VL. Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. *Infect Immun* 1995;63:4837. doi:10.1128/IAI.63.12.4837-4848.1995.
- [94] Comanducci M, Bambini S, Brunelli B, Adu-Bobie J, Aricò B, Capecchi B, et al. NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med* 2002;195:1445–54. doi:10.1084/JEM.20020407.
- [95] Kaiser PO, Riess T, Wagner CL, Linke D, Lupas AN, Schwarz H, et al. The head of *Bartonella* adhesin A is crucial for host cell interaction of *Bartonella henselae*. *Cell Microbiol* 2008;10:2223–34. doi:10.1111/J.1462-5822.2008.01201.X.
- [96] Kaiser PO, Linke D, Schwarz H, Leo JC, Kempf VAJ. Analysis of the BadA stalk from *Bartonella henselae* reveals domain-specific and domain-overlapping functions in the host cell infection process. *Cell Microbiol* 2012;14:198–209. doi:10.1111/J.1462-5822.2011.01711.X.
- [97] Linke D, Riess T, Autenrieth IB, Lupas A, Kempf VAJ. Trimeric autotransporter adhesins: Variable structure, common function. *Trends Microbiol* 2006;14:264–70. doi:10.1016/j.tim.2006.04.005.
- [98] Mernaugh G, Ihler GM. Deformation factor: An extracellular protein synthesized by *Bartonella bacilliformis* that deforms erythrocyte membranes. *Infect Immun* 1992;60:937–43. doi:10.1128/iai.60.3.937-943.1992.
- [99] Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, Rassoulian Barrett SL, Cookson BT, Logan SM, et al. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:9247–52. doi:10.1073/pnas.0502040102.
- [100] Lund PA. Microbial molecular chaperones. *Adv Microb Physiol* 2001;44:93–140. doi:10.1016/S0065-2911(01)44012-4.
- [101] Zeaiter Z, Fournier PE, Ogata H, Raoult D. Phylogenetic classification of *Bartonella* species by comparing groEL sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:165–71. doi:10.1099/00207713-52-1-165.

- [102] Callison JA, Battisti JM, Sappington KN, Smitherman LS, Minnick MF. Characterization and expression analysis of the groESL operon of *Bartonella bacilliformis*. *Gene* 2005;359:53. doi:10.1016/j.gene.2005.06.031.
- [103] Taye A, Chen H, Duncan K, Zhang Z, Hendrix L, Gonzalez J, et al. Production of recombinant protein Pap31 and its application for the diagnosis of *Bartonella bacilliformis* infection. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1063:280–5. doi:10.1196/annals.1355.045.
- [104] Zimmermann R, Kempf VAJ, Schiltz E, Oberle K, Sander A. Hemin binding, functional expression, and complementation analysis of Pap 31 from *Bartonella henselae*. *J Bacteriol* 2003;185:1739. doi:10.1128/JB.185.5.1739-1744.2003.
- [105] Dabo SM, Confer AW, Anderson BE, Gupta S. *Bartonella henselae* Pap31, an extracellular matrix adhesin, binds the fibronectin repeat III13 module. *Infect Immun* 2006;74:2513–21. doi:10.1128/IAI.74.5.2513-2521.2006.
- [106] Henriquez-Camacho C, Ventosilla P, Minnick MF, Ruiz J, Maguiña C. Proteins of *Bartonella bacilliformis*: Candidates for vaccine development. *Int J Pept Res Ther* 2015;2015:702784. doi:10.1155/2015/702784.
- [107] Bentzel DE, Espinosa BJ, Canal E, Blazes DL, Hall ER. Susceptibility of Owl Monkeys (*Aotus nancymaae*) to experimental infection with *Bartonella bacilliformis*. *Comp Med* 2008;58:76.
- [108] Miller VL, Falkow S. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 1988;56:1242–8. doi:10.1128/IAI.56.5.1242-1248.1988.
- [109] Conyers GB, Bessman MJ. The gene, ialA, associated with the invasion of human erythrocytes by *Bartonella bacilliformis*, designates a nudix hydrolase active on dinucleoside 5'-polyphosphates. *J Biol Chem* 1999;274:1203–6. doi:10.1074/JBC.274.3.1203.
- [110] Mitchell SJ, Minnick MF. A carboxy-terminal processing protease gene is located immediately upstream of the invasion-associated locus from *Bartonella bacilliformis*. *Microbiology N Y* 1997;143:1221–33. doi:10.1099/00221287-143-4-1221.
- [111] Coleman SA, Minnick MF. Establishing a direct role for the *Bartonella bacilliformis* invasion-associated locus B (IalB) protein in human erythrocyte parasitism. *Infect Immun* 2001;69:4373–81. doi:10.1128/IAI.69.7.4373-4381.2001.
- [112] Deng H, Pang Q, Xia H, Le Rhun D, Le Naour E, Yang C, et al. Identification and functional analysis of invasion associated locus B (IalB) in *Bartonella* species. *Microb Pathog* 2016;98:171–7. doi:10.1016/j.micpath.2016.05.007.
- [113] Coleman SA, Minnick MF. Differential expression of the invasion-associated locus B (ialB) gene of *Bartonella bacilliformis* in response to environmental cues. *Microb Pathog* 2003;34:179. doi:10.1016/S0882-4010(03)00005-6.

- [114] Derrick SC, Ihler GM. Deformin, a substance found in *Bartonella bacilliformis* culture supernatants, is a small, hydrophobic molecule with an affinity for albumin. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27:1013–9. doi:10.1006/bcmd.2001.0475.
- [115] Hendrix LR, Kiss K. Studies on the identification of deforming factor from *Bartonella bacilliformis*. *Ann N Y Acad Sci* 2003;990:596–604. doi:10.1111/J.1749-6632.2003.TB07433.X.
- [116] Iwaki-Egawa S, Ihler GM. Comparison of the abilities of proteins from *Bartonella bacilliformis* and *Bartonella henselae* to deform red cell membranes and to bind to red cell ghost proteins. *FEMS Microbiol Lett* 1997;157:207–17. doi:10.1111/J.1574-6968.1997.TB12775.X.
- [117] Hong J, Li Y, Hua X, Bai Y, Wang C, Zhu C, et al. Lymphatic circulation disseminates *Bartonella* infection into bloodstream. *J Infect Dis* 2017;215:303–11. doi:10.1093/infdis/JIW526.
- [118] Ready PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol* 2013;58:227–50. doi:10.1146/annurev-ento-120811-153557.
- [119] Townsend CHT. A *Phlebotomus* the practically certain carrier of verruga. *Science* 1913;38:194–5. doi:10.1126/science.38.971.194.
- [120] Noguchi H, Shannon RC, Tilden EB, Tyler JR. Etiology of Oroya fever XIV. The insect vectors of Carrion's disease. *J Exp Med* 1929;49:993–1008. doi:10.1084/jem.49.6.993.
- [121] Alexander B. A review of Bartonellosis in Ecuador and Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 1995;52:354–9. doi:10.4269/ajtmh.1995.52.354.
- [122] Ulloa GM, Asquez-Achaya F V, Audia Gomes C, Del Valle LJ, Ruiz J, Pons MJ, et al. Molecular detection of *Bartonella bacilliformis* in *Lutzomyia maranonensis* in Cajamarca, Peru: A new potential vector of Carrion's disease in Peru? *Am J Trop Med Hyg* 2018;99:1229–33. doi:10.4269/ajtmh.18-0520.
- [123] Moo-Llanes DA, Arque-Chunga W, Carmona-Castro O, Yañez-Arenas C, Yañez-Trujillano HH, Cheverría-Pacheco L, et al. Shifts in the ecological niche of *Lutzomyia peruensis* under climate change scenarios in Peru. *Med Vet Entomol* 2017;31:123–31. doi:10.1111/mve.12219.
- [124] Vargas CM, Pachas P. Experiences in the prevention and control of Carrión's disease in Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2014;31. doi:10.17843/rpmesp.2014.312.57.
- [125] Romero S. Detection of *Bartonella bacilliformis* by real-time PCR in naturally infected sandflies. Bachelor's thesis. Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, USA, 2004.
- [126] Villaseca P, Padilla C, Ventura G, Samalvides F, Yañez H, Chevarría L, et al. Importancia de la *Lutzomyia peruensis* en la transmisión de la enfermedad de Carrión en el Valle Sagrado de los Incas, Urubamba-Cusco, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 1999;16:28–30.

- [127] Carrazco Montalvo AR. Detección molecular de *Bartonella bacilliformis* en flebótomos (Diptera: Psychodidae) en la zona fronteriza Ecuatoriana-Peruana. Bachelor's thesis. Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador, 2017.
- [128] Noguchi H. Etiology of Oroya fever III. The behavior of *Bartonella bacilliformis* in *Macacus rhesus*. J Exp Med 1926;44:697–713. doi:10.1084/jem.44.5.697.
- [129] Noguchi H. Etiology of Oroya fever IV. The effect of inoculation of anthropoid apes with *Bartonella bacilliformis*. J Exp Med 1926;44:715–28. doi:10.1084/jem.44.5.715.
- [130] Noguchi H. Etiology of Oroya fever VIII. Experiments on cross-immunity between Oroya fever and verruga peruana. J Exp Med 1927:781–6.
- [131] Wenigmann A. Analyse der Serumreaktivität von *in silico* als immundominant vorhergesagten *Bartonella bacilliformis* Antigenen. Bachelorthesis. Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt, Deutschland, 2020.
- [132] Stahl J, Bergmann H, Göttig S, Ebersberger I, Averhoff B. *Acinetobacter baumannii* virulence is mediated by the concerted action of three phospholipases D. PLoS One 2015;10. doi:10.1371/journal.pone.0138360.
- [133] Riess T, Dietrich F, Schmidt K V., Kaiser PO, Schwarz H, Schäfer A, et al. Analysis of a novel insect cell culture medium-based growth medium for *Bartonella* species. Appl Environ Microbiol 2008;74:5224–7. doi:10.1128/aem.00621-08.
- [134] Wu N, Matand K, Kebede B, Acquah G, Williams S. Enhancing DNA electrotransformation efficiency in *Escherichia coli* DH10B electrocompetent cells. Electron J Biotechnol 2011. doi:10.2225/vol13-issue5-fulltext-11.
- [135] Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nat Methods 2009;6:343–5. doi:10.1038/nmeth.1318.
- [136] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970 227:5259 1970;227:680–5. doi:10.1038/227680a0.
- [137] Baneth G, Kordick DL, Hegarty BC, Breitschwerdt EB. Comparative seroreactivity to *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* among cats from Israel and North Carolina. Vet Microbiol 1996;50:95–103. doi:10.1016/0378-1135(96)00006-5.
- [138] Becker SA. Funktionelle und genetische Analyse von Flagellin und *brpA* in *Bartonella bacilliformis*. Bachelorthesis. Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt, Deutschland, 2018.
- [139] Andrews S, Krueger F, Seaman Pichon A, Biggins F, Wingett S. FastQC. A quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics 2015;1:1.
- [140] Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. PLoS Comput Biol 2017;13:1–22. doi:10.1371/journal.pcbi.1005595.

- [141] Li H. Minimap2: Pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics* 2018;34:3094–100. doi:10.1093/bioinformatics/bty191.
- [142] Tatusova T, Dicuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res* 2016;44:6614–24. doi:10.1093/nar/gkw569.
- [143] Darling ACE, Mau B, Blattner FR, Perna NT. Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res* 2004;14:1394–403. doi:10.1101/gr.2289704.
- [144] He Y, Xiang Z, Mobley HLT. Vaxign: The first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vaccine development. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010. doi:10.1155/2010/297505.
- [145] Hang L, John M, Asaduzzaman M, Bridges EA, Vanderspurt C, Kirn TJ, et al. Use of *in vivo*-induced antigen technology (IVIAT) to identify genes uniquely expressed during human infection with *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8508–13. doi:10.1073/pnas.1431769100.
- [146] Studier W. New Studier media for auto-induction and other applications ZYM-5052 medium for auto-induction ZYP-5052 medium for auto-induction ZYM-505 medium for plasmid preparation. *Prot Exp Pur* 2005;41:207–34. doi:10.1038/nature06025.
- [147] Taboada B, Estrada K, Ciria R, Merino E. Operon-mapper: a web server for precise operon identification in bacterial and archaeal genomes. *Bioinformatics* 2018;34:4118. doi:10.1093/bioinformatics/BTY496.
- [148] Umarov RK, Solovyev V. Recognition of prokaryotic and eukaryotic promoters using convolutional deep learning neural networks. *PLoS One* 2017;12. doi:10.1371/journal.pone.0171410.
- [149] Rabbi MF, Akter SA, Hasan MJ, Amin A. *In silico* characterization of a hypothetical protein from *Shigella dysenteriae* ATCC 12039 reveals a pathogenesis-related protein of the type-VI secretion system. *Bioinform Biol Insights* 2021;15. doi:10.1177/11779322211011140.
- [150] Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol* 1999;112. doi:10.1385/1-59259-584-7:531.
- [151] Goldberg T, Hecht M, Hamp T, Karl T, Yachdav G, Ahmed N, et al. LocTree3 prediction of localization. *Nucleic Acids Res* 2014;42:W350. doi:10.1093/nar/gku396.
- [152] Yu NY, Wagner JR, Laird MR, Melli G, Rey S, Lo R, et al. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* 2010;26:1608–15. doi:10.1093/bioinformatics/BTQ249.

- [153] Yu C-S, Lin C-J, Hwang J-K. Predicting subcellular localization of proteins for gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Sci* 2004;13. doi:10.1110/ps.03479604.
- [154] Teufel F, Almagro Armenteros JJ, Johansen AR, Gíslason MH, Pihl SI, Tsirigos KD, et al. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nat Biotechnol* 2022;40:1023. doi:10.1038/S41587-021-01156-3.
- [155] Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, et al. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res* 2005;33. doi:10.1093/nar/gki442.
- [156] El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, Eddy SR, Luciani A, Potter SC, et al. The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res* 2019;47:D427–32. doi:10.1093/nar/gky995.
- [157] Lu S, Wang J, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales NR, et al. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Res* 2020;48:D265–8. doi:10.1093/nar/gkz991.
- [158] Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods* 2022;19:679–82. doi:10.1038/S41592-022-01488-1.
- [159] Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 2021 596:7873 2021;596:583–9. doi:10.1038/s41586-021-03819-2.
- [160] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI, et al. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci* 2021;30:70–82. doi:10.1002/PRO.3943.
- [161] Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 2014;30:2068–9. doi:10.1093/bioinformatics/BTU153.
- [162] Dichter AA, Schultze TG, Wenigmann A, Ballhorn W, Latz A, Schlüfter E, et al. Identification of immunodominant *Bartonella bacilliformis* proteins: a combined *in-silico* and serology approach. *Lancet Microbe* 2021;2:e685–94. doi:10.1016/S2666-5247(21)00184-1.
- [163] Pizza M, Scarlato V, Maignani V, Giuliani MM, Aricò B, Comanducci M, et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B *Meningococcus* by whole-genome sequencing. *Science* 2000;287:1816–20. doi:10.1126/science.287.5459.1816.
- [164] Maione D, Margarit I, Rinaudo CD, Maignani V, Mora M, Scarselli M, et al. Identification of a universal group B *Streptococcus* vaccine by multiple genome screen. *Science* 2005;309:148–50. doi:10.1126/science.1109869.
- [165] Miller L, Richter M, Hapke C, Stern D, Nitsche A. Genomic expression libraries for the identification of cross-reactive orthopoxvirus antigens. *PLoS One* 2011;6:1–10. doi:10.1371/journal.pone.0021950.
- [166] Monge C. Las ictericias hemolíticas en patología tropical. *Ref Med Lima* 1915;1.

- [167] Didelot X, Bowden R, Wilson DJ, Peto TEA, Crook DW. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nat Rev Genet* 2012;13:601–12. doi:10.1038/nrg3226.
- [168] Wu J, Wu M, Chen T, Jiang R. Whole genome sequencing and its applications in medical genetics. *Quant Biol* 2016;4:115–28. doi:10.1007/S40484-016-0067-0.
- [169] Emiyu K, Lelisa K. Review on Illumina sequencing technology. *Austin J Vet Sci & Anim Husb* 2022;9:1088.
- [170] Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of next generation sequencing technologies. *Curr Protoc Mol Biol* 2018;122:e59. doi:10.1002/cpmb.59.
- [171] Ambardar S, Gupta R, Trakroo D, Lal R, Vakhlu J. High throughput sequencing: An overview of sequencing chemistry. *Indian J Microbiol* 2016;56:394. doi:10.1007/S12088-016-0606-4.
- [172] Rhoads A, Au KF. PacBio sequencing and its applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2015;13:278–89. doi:10.1016/J.gpb.2015.08.002.
- [173] Thibau A, Dichter AA, Vaca DJ, Linke D, Goldman A, Kempf VAJ. Immunogenicity of trimeric autotransporter adhesins and their potential as vaccine targets. *Med Microbiol Immunol* 2020;209:243–63. doi:10.1007/s00430-019-00649-y.
- [174] Riess T, Andersson SGE, Lupas A, Schaller M, Schäfer A, Kyme P, et al. *Bartonella* adhesin a mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp Med* 2004;200:1267–78. doi:10.1084/JEM.20040500.
- [175] Silva-Caso W, Mazulis F, Weilg C, Aguilar-Luis MA, Sandoval I, Correa-Nuñez G, et al. Co-infection with *Bartonella bacilliformis* and *Mycobacterium* spp. in a coastal region of Peru. *BMC Res Notes* 2017;10:1–6. doi:10.1186/S13104-017-2977-Y.
- [176] Clemente NS, Ugarte-Gil C, Solorzano N, Maguiña C, Moore D. An outbreak of *Bartonella bacilliformis* in an endemic Andean community. *PLoS One* 2016;11:e0150525. doi:10.1371/journal.pone.0150525.
- [177] Maco V, Maguiña C, Tirado A, Maco CV, Vidal JE. Carrion's disease (*Bartonellosis bacilliformis*) confirmed by histopathology in the High Forest of Peru. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2004;46:171–4. doi:10.1590/S0036-46652004000300010.
- [178] Mendoza-Mujica G, Flores-León D. Antimicrobial resistance of *Bartonella bacilliformis* strains from regions endemic to bartonellosis in Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2015;32:659–66. doi:10.17843/rpmpesp.2015.324.1755.
- [179] Qamar MTU, Shokat Z, Muneer I, Ashfaq UA, Javed H, Anwar F, et al. Multiepitope-based subunit Vaccine design and evaluation against respiratory syncytial virus using reverse vaccinology approach. *Vaccines* 2020;8:1–27. doi:10.3390/Vvaccines8020288.
- [180] Ruiz J, Gomes C. *In silico* analysis of Pap31 from *Bartonella bacilliformis* and other *Bartonella* spp. *Infect Genet Evol* 2020;84:104482. doi:10.1016/j.meegid.2020.104482.

- [181] Jwang B, Dewing P, Fikrig E, Flavell RA. The hook protein of *Borrelia burgdorferi*, encoded by the *flgE* gene, is serologically recognized in Lyme disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995;2:609–15. doi:10.1128/cdli.2.5.609-615.1995.
- [182] Luft BJ, Dunn JJ, Dattwyler RJ, Gorgone G, Gorevic PD, Schubach WH. Cross-reactive antigenic domains of the flagellin protein of *Borrelia burgdorferi*. *Res Microbiol* 1993;144:251–7. doi:10.1016/0923-2508(93)90009-Q.
- [183] Wells TJ, Tree JJ, Ulett GC, Schembri MA. Autotransporter proteins: Novel targets at the bacterial cell surface. *FEMS Microbiol Lett* 2007;274:163–72. doi:10.1111/J.1574-6968.2007.00833.X.
- [184] Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68:692–744. doi:10.1128/mnbr.68.4.692-744.2004.
- [185] Łyskowski A, Leo JC, Goldman A. Structure and biology of trimeric autotransporter adhesins. *Adv Exp Med Biol* 2011;715:143–58. doi:10.1007/978-94-007-0940-9.
- [186] Qin W, Wang L, Lei L. New findings on the function and potential applications of the trimeric autotransporter adhesin. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2015;108 doi:10.1007/S10482-015-0477-4.
- [187] Heise T, Dersch P. Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:3375–80. doi:10.1073/pnas.0507749103.
- [188] St Geme JW, Kumar V V, Cutter D, Barenkamp SJ. Prevalence and distribution of the *hmw* and *hia* genes and the HMW and Hia adhesins among genetically diverse strains of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 1998;66:364. doi:10.1128/IAI.66.1.364-368.1998.
- [189] Bentancor L V., Routray A, Bozkurt-Guzel C, Camacho-Peiro A, Pier GB, Maira-Litrán T. Evaluation of the trimeric autotransporter *ata* as a vaccine candidate against *Acinetobacter baumannii* infections. *Infect Immun* 2012;80:3381–8. doi:10.1128/IAI.06096-11.
- [190] Sandt CH, Hill CW. Four different genes responsible for nonimmune immunoglobulin-binding activities within a single strain of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2000;68:2205–14. doi:10.1128/iai.68.4.2205-2214.2000.
- [191] Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun* 2001;69:6999–7009. doi:10.1128/IAI.69.11.6999-7009.2001.
- [192] Valle J, Mabbett AN, Ulett GC, Toledo-Arana A, Wecker K, Totsika M, et al. UpaG, a new member of the trimeric autotransporter family of adhesins in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2008;190:4147–61. doi:10.1128/JB.00122-08.

- [193] Raghunathan D, Wells TJ, Morris FC, Shaw RK, Bobat S, Peters SE, et al. SadA, a trimeric autotransporter from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, can promote biofilm formation and provides limited protection against infection. *Infect Immun* 2011;79:4342–52. doi:10.1128/iai.05592-11.
- [194] Secundino I, López-Macías C, Cervantes-Barragán L, Gil-Cruz C, Ríos-Sarabia N, Pastelin-Palacios R, et al. *Salmonella* porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology* 2006;117:59–70. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02263.x.
- [195] Dalsass M, Brozzi A, Medini D, Rappuoli R. Comparison of open-source reverse vaccinology programs for bacterial vaccine antigen discovery. *Front Immunol* 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.00113.
- [196] Weber J, Peng H, Rader C. From rabbit antibody repertoires to rabbit monoclonal antibodies. *Exp Mol Med* 2017 49:3 2017;49:e305–e305. doi:10.1038/emm.2017.23.
- [197] Knobloch J, Schreiber M. Bb65, a major immunoreactive protein of *Bartonella bacilliformis*. *Am J Trop Med Hyg* 1990;43:373–9. doi:10.4269/ajtmh.1990.43.373.
- [198] Padmalayam I, Kelly T, Baumstark B, Massung R. Molecular cloning, sequencing, expression, and characterization of an immunogenic 43-kilodalton lipoprotein of *Bartonella bacilliformis* that has homology to NlpD/LppB. *Infect Immun* 2000;68:4972–9. doi:10.1128/iai.68.9.4972-4979.2000.
- [199] Angkasekwinai N, Atkins EH, Romero S, Grieco J, Chao CC, Ching WM. An evaluation study of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant protein Pap31 for detection of antibody against *Bartonella bacilliformis* infection among the Peruvian population. *Am J Trop Med Hyg* 2014;90:690–6. doi:10.4269/ajtmh.13-0131.
- [200] Siewert LK, Korotaev A, Sedzicki J, Fromm K, Pinschewer DD, Dehio C. Identification of the *Bartonella* autotransporter CFA as a protective antigen and hypervariable target of neutralizing antibodies in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022;119. doi:10.1073/pnas.2202059119.
- [201] Hou H, Wang T, Zhang B, Luo Y, Mao L, Wang F, et al. Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. *Clin Transl Immunology* 2020;9. doi:10.1002/CTI2.1136.
- [202] Taber LH, Brasier F, Couch RB, Greenberg SB, Jones D, Knight V. Diagnosis of herpes simplex virus infection by immunofluorescence. *J Clin Microbiol* 1976;3:309–12. doi:10.1128/JCM.3.3.309-312.1976.
- [203] Duan Y, Miao L, Ye H, Yang C, Fu B, Schwartz PH, et al. A faster immunofluorescence assay for tracking infection progress of human cytomegalovirus. *Acta Biochim Biophys Sin* 2012;44:597. doi:10.1093/abbs/GMS041.
- [204] Knobloch J. Analysis and preparation of *Bartonella bacilliformis* antigens. *Am J Trop Med* 1988;39:173–8. doi:10.4269/ajtmh.1988.39.173.

- [205] Ghigo E, Minnick MF, Blaho VA, Deng H, Pang Q, Zhao B, et al. Molecular mechanisms of *Bartonella* and mammalian erythrocyte interactions: A review. *Front Cell Infect Microbiol* 2018;8:431. doi:10.3389/fcimb.2018.00431.
- [206] Rabo LL. Funktionelle Analyse der hämolytischen Aktivität von *Bartonella bacilliformis*. Bachelor Thesis. Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt, Deutschland, 2022.
- [207] Bhakdil S, Trantum-Jensen J. Alpha-Toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev* 1991;55:733–51. doi:10.1128/mr.55.4.733-751.1991.
- [208] Skals M, Jorgensen NR, Leipziger J, Praetorius HA. α -hemolysin from *Escherichia coli* uses endogenous amplification through P2X receptor activation to induce hemolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:4030–5. doi:10.1073/pnas.0807044106.
- [209] Jones P, Binns D, Chang HY, Fraser M, Li W, McAnulla C, et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 2014;30:1236. doi:10.1093/bioinformatics/BTU031.
- [210] Sobia Parveen. TylA has an essential virulence role in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. Dissertation. University of KwaZulu-Natal, Durban, South Africa, 2015.
- [211] Monshupanee T, Johansen SK, Dahlberg AE, Douthwaite S. Capreomycin susceptibility is increased by TlyA-directed 2'-O-methylation on both ribosomal subunits. *Mol Microbiol* 2012;85:1194–203. doi:10.1111/J.1365-2958.2012.08168.X.
- [212] Joerling J, Willems H, Ewers C, Herbst W. Differential expression of hemolysin genes in weakly and strongly hemolytic *Brachyspira hyodysenteriae* strains. *BMC Vet Res* 2020;16:1–13. doi:10.1186/S12917-020-02385-5.
- [213] Pimenta AL, Racher K, Jamieson L, Blight MA, Holland IB. Mutations in HlyD, part of the Type 1 translocator for hemolysin secretion, affect the folding of the secreted toxin. *J Bacteriol* 2005;187:7471–80. doi:10.1128/jb.187.21.7471-7480.2005.
- [214] Zhao H, Lee J, Chen J. The hemolysin A secretion system is a multi-engine pump containing three ABC transporters. *Cell* 2022;185:3329-3340.e13. doi:10.1016/j.cell.2022.07.017.
- [215] Spitz O, Erenburg IN, Beer T, Kanonenberg K, Holland IB, Schmitt L. Type I secretion systems - One mechanism for all? *Microbiol Spectr* 2019;7. doi:10.1128/microbiolspec.psib-0003-2018.
- [216] Osbourn AE, Field B. Operons. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:3755. doi:10.1007/S00018-009-0114-3.
- [217] Galdiero S, Falanga A, Cantisani M, Tarallo R, Pepa ME Della, D'Oriano V, et al. Microbe-host interactions: Structure and role of gram-negative bacterial porins. *Curr Protein Pept Sci* 2012;13:843. doi:10.2174/138920312804871120.
- [218] Vergalli J, Bodrenko I V., Masi M, Moynié L, Acosta-Gutiérrez S, Naismith JH, et al. Porins and small-molecule translocation across the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2019;18:164–76. doi:10.1038/s41579-019-0294-2.

- [219] Ollis DL, Carr PD. Alpha/beta hydrolase fold: An update. *Protein Pept Lett* 2009;16:1137–48. doi:10.2174/092986609789071298.
- [220] David L, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Sybille M, et al. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* 1992;5:197–211. doi:10.1093/protein/5.3.197.
- [221] Dimitriou PS, Denesyuk AI, Nakayama T, Johnson MS, Denessiouk K. Distinctive structural motifs co-ordinate the catalytic nucleophile and the residues of the oxyanion hole in the alpha/beta-hydrolase fold enzymes. *Protein Sci* 2019;28:344. doi:10.1002/pro.3527.
- [222] Rauwerdink A, Kazlauskas RJ. How the same core catalytic machinery catalyzes 17 different reactions: The serine-histidine-aspartate catalytic triad of α/β -hydrolase fold enzymes. *ACS Catal* 2015;5:6153–76. doi:10.1021/acscatal.5B01539.
- [223] Song L, Hobaugh MR, Shustak C, Cheley S, Bayley H, Gouaux JE. Structure of *staphylococcal* α -hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 1996;274:1859–66. doi:10.1126/science.274.5294.1859.
- [224] Jayasinghe L, Miles G, Bayley H. Role of the amino latch of *staphylococcal* α -hemolysin in pore formation: A co-operative interaction between the N terminus and position 217. *J Biol Chem* 2006;281:2195–204. doi:10.1074/jbc.m510841200.
- [225] Thomas Buckley J, Peter Howard S. The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* is aerolysin. *Infect Immun* 1999;67:466. doi:10.1128/iai.67.1.466-467.1999.
- [226] Kennedy CL, Krejany EO, Young LF, O'Connor JR, Awad MM, Boyd RL, et al. The α -toxin of *Clostridium septicum* is essential for virulence. *Mol Microbiol* 2005;57:1357–66. doi:10.1111/J.1365-2958.2005.04774.X.
- [227] Calderon I, Lobos SR, Mora GC. The hemolytic effect of *Salmonella typhi* Ty 2 porins. *Eur J Biochem* 1984;141:579–83. doi:10.1111/J.1432-1033.1984.TB08232.X.
- [228] Terada LS, Johansen KA, Nowbar S, Vasil AI, Vasil ML. *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect Immun* 1999;67:2371–6. doi:10.1128/iai.67.5.2371-2376.1999.
- [229] Almeida-Campos FR, Noronha FSM, Horta MF. The multitasking pore-forming proteins of intracellular pathogens. *Microbes Infect* 2002;4:741–50. doi:10.1016/S1286-4579(02)01593-9.
- [230] La Pietra L. Regulation des porenbildenden Toxins Listeriolysin O durch die enzymatische Aktivität der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C von *Listeria monocytogenes*. Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen, Deutschland, 2020.
- [231] Quereda JJ, Andersson C, Cossart P, Johansson J, Pizarro-Cerdá J. Role in virulence of phospholipases, listeriolysin O and listeriolysin S from epidemic *Listeria monocytogenes* using the chicken embryo infection model. *Vet Res* 2018;49:1–9. doi:10.1186/S13567-017-0496-4.
- [232] Nguyen BN, Peterson BN, Portnoy DA. Listeriolysin O: A phagosome-specific cytolysin revisited. *Cell Microbiol* 2019;21:e12988. doi:10.1111/cmi.12988.

- [233] Walker TS, Winkler HH. *Bartonella bacilliformis*: Colonial types and erythrocyte adherence. *Infect Immun* 1981;31:480–6. doi:10.1128/IAI.31.1.480-486.1981.
- [234] Reynafarje C, Ramos J. The hemolytic anemia of human Bartonellosis. *Blood* 1961;17:562–78.
- [235] Noguchi H, Muller HR, Tilden EB, Tyler JR. Etiology of Oroya fever XVI. Verruga in the dog and the donkey. *J Exp Med* 1929;50:455–61. doi:10.1084/jem.50.4.455.
- [236] Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). Abwärtstrend bei den Versuchstierzahlen setzt sich fort 2022. https://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/2022/46/abwaertstrend_bei_den_versuchstierzahlen_setzt_sich_fort-309280.html (Stand 28.03.2023).
- [237] Infante B, Villar S, Palma S, Merello J, Valencia R, Torres L, et al. BALB/c mice resist infection with *Bartonella bacilliformis*. *BMC Res Notes* 2008;1:1–4. doi:10.1186/1756-0500-1-103.
- [238] Garcia FU, Wojta J, Broadley KN, Davidson JM, Hoover RL. *Bartonella bacilliformis* stimulates endothelial cells *in vitro* and is angiogenic *in vivo*. *Am J Pathol* 1990;136.

Anhang

Tabelle 24: Genomvergleich zwischen den *B. bacilliformis* Stämmen bzw. Isolaten KC583, KC584 und FDARAGOS_174 mit der Referenzsequenz NC_008783.1

Position	Mutation *	Referenz Sequenz	Isolat Sequenz	Effekt	Locus-Tag	Protein
KC583 vs. NC_008783						
616797	Ins	G	GATCAAA ATATCAGT TTCTCAA CCTGATAT	<i>in-frame</i> Insertion	RS02895	ComEC/Rec2 Kompetenz Protein
677872..6794399	Del	CGTA[...]	-	Deletion	RS06805	Untereinheit ABC Transporter Permease
691499..717655	Del	AAAG[...]	A	Deletion	RS03290 RS03450	
870224	SNP	G	A	<i>missense</i> - Variante	RS04165	Lrp/AsnC transkriptioneller Regulator
1189790	Ins [#]	T	TG	Leseraster- verschiebung	RS05615	flagellares Motor Protein MotA
KC584 vs. NC_008783						
23089	Del	AT	A	Leseraster- verschiebung	RS00115	Zellteilungsprotein ZapE
38004..38172	Del	GTCG[...]	G	<i>in-frame</i> Insertion	RS00160	Untereinheit A Monovalenter Kationen / H ⁺ -Antiporter
138041	SNP	G	T	<i>missense</i> - Variante	RS00610	CarD transkriptioneller Regulator
302563..308045	Del	GCAA[...]	G	Deletion / Fusion	RS01500, RS01505, RS01510	IalB bbadB IalB
334385	Ins	A	AT	Leseraster- verschiebung	RS01630	Phospholipase-D
465775	Ins	T	TG	Leseraster- verschiebung	RS02220	TonB-abhängiger Hämoglobin/Transferrin/Lactoferrin Rezeptor
465844	Del	AT	A	Rekonstruktion des Leserasters	RS02220	TonB-abhängiger Hämoglobin/Transferrin/Lactoferrin Rezeptor
466367..466389	Del	ATAA[...]	A	bidirektionale Genfusion	RS02220	TonB-abhängiger Hämoglobin/Transferrin/Lactoferrin Rezeptor
467133	SNP	T	C	Verlust des Stopp – Codons	RS02225	TonB
617297	SNP	C	T	<i>missense</i> - Variante	RS02895	ComEC/Rec2 Kompetenz Protein
635930	Ins	G	GTG[+604]	<i>in-frame</i> Insertion	RS02990	hypothetisches Protein
666912	SNP	T	C	<i>missense</i> - Variante	RS03135	DUF1561
677872..6794399	Del	CGTA[...]	-	Deletion	RS06805	Untereinheit ABC Transporter Permease
691499..717655	Del	AAAG[...]	A	Deletion	RS03290.. RS03450	
797206	SNP	C	G	<i>missense</i> - Variante	RS03830	Untereinheit NADH-Quinon Oxidoreduktase NuoH
837346	SNP	A	G	<i>missense</i> - Variante	RS03990	CDP-Alkohol Phosphatidyltransferase
901497	SNP	C	T	<i>missense</i> - Variante	RS04285	DEAD/DEAH Box Helikase

Weiterführung Tabelle 24

909549	SNP	T	C	<i>missense-Variante</i>	RS04315	TerC
910853	SNP	T	C	<i>missense-Variante</i>	RS04315	TerC
1002864	Ins	T	TCA[+68]	Insertion Stopp Codon	RS04680	mechanosensitives Ionen-Kanal Protein
1067720..1067977	del	TAAA[...]	T	Leseraster-verschiebung	RS05005	Peptid ABC-Transporter Substrat Bindeprotein
1146943	Ins	C	CT	Leseraster-verschiebung	RS05385	hypothetisches Protein
1174785	SNP	G	A	<i>missense-Variante</i>	RS05535	Autotransporter-E
1175131	SNP	C	T	<i>missense-Variante</i>	RS05535	Autotransporter-E
1222760..1222825	Del	AAAG[...]	A	Leseraster-verschiebung	RS05770	hypothetisches Protein
1258727..1258763	Del	CTAC[...]	C	<i>in-frame</i> Deletion	RS05920	Pap31
1296464..1296782	Del	AAAG[...]	A	<i>in-frame</i> Deletion	RS06095	Transkriptions-Terminator / Antiterminator NusA
1398118	SNP	G	C	<i>missense-Variante</i>	RS06530	Translokations / Assemblierungs Modul TamB
1399276	SNP	G	A	<i>missense-Variante</i>	RS06530	Translokations / Assemblierungs Modul TamB
* Ins = inserierte Sequenz, Del = Deletion, SNP = <i>single nucleotide polymorphism</i> ; #: in allen Varianten gefunden						

Tabelle 25: BLASTP Analyse zur Überprüfung des Vorhandenseins von α -Hämolysin Homologen in *B. bacilliformis*.

Analyse	BLASTP 2.14.0+
Datenbank	Alle nicht redundante GenBank CDS Übersetzungen + PDB+ SwissProt + PIR + PRF.
Analysierter Organismus	<i>B. bacilliformis</i> (taxid:774), <i>B. bacilliformis</i> Cond044 (taxid:1293906), <i>B. bacilliformis</i> KC583 (taxid:360095), <i>B. bacilliformis</i> Hosp800-02 (taxid:1293908), <i>B. bacilliformis</i> CAR600-02 (taxid:1293907), <i>B. bacilliformis</i> str. Heidi Mejia (taxid:1427332), <i>B. bacilliformis</i> INS (taxid:1206782), <i>B. bacilliformis</i> VAB9028 (taxid:1293909), <i>B. bacilliformis</i> Ver075 (taxid:1293904), <i>B. bacilliformis</i> Peru38 (taxid:1293905), <i>B. bacilliformis</i> San Pedro600-02 (taxid:1427333)
Eingabesequenz	α -Hämolysin (Hly), <i>Staphylococcus aureus</i> MKTRIVSSVTTLTLLGSILMNPVAGAADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDL VTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGAN KSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPNRSIDTKEYMSTLTYGFGNGV TGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDKTILESPTDKKVGWKVIFNNM VNQNWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSS GFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTK DKWTDRSSERYKIDWEKEEMTN
Sequenzlänge	319 Aminosäuren
Analysierte Sequenzen	543.536.034
Ergebnis	Keine signifikante Ähnlichkeit gefunden

Tabelle 26: BLASTP Analyse zur Überprüfung des Vorhandenseins von HlyA Homologen in *B. bacilliformis*.

Analyse	BLASTP 2.14.0+
Datenbank	Alle nicht redundante GenBank CDS Übersetzungen + PDB+ SwissProt + PIR + PRF.
Analysierter Organismus	<i>B. bacilliformis</i> (taxid:774), <i>B. bacilliformis</i> Cond044 (taxid:1293906), <i>B. bacilliformis</i> KC583 (taxid:360095), <i>B. bacilliformis</i> Hosp800-02 (taxid:1293908), <i>B. bacilliformis</i> CAR600-02 (taxid:1293907), <i>B. bacilliformis</i> str. Heidi Mejia (taxid:1427332), <i>B. bacilliformis</i> INS (taxid:1206782), <i>B. bacilliformis</i> VAB9028 (taxid:1293909), <i>B. bacilliformis</i> Ver075 (taxid:1293904), <i>B. bacilliformis</i> Peru38 (taxid:1293905), <i>B. bacilliformis</i> San Pedro600-02 (taxid:1427333)
Eingabesequenz	HlyA, <i>Escherichia coli</i> MPTITAAQIKSTLQSAKQSAANKLHSAGQSTKDALKKAAEQTRNAGNRLI LLIPKDYKGGSSLNDLVRTADELGIEVQYDEKNGTAITKQVFGTAEKLI LTERGVTIFAPQLDKLLQKYQKAGNKLGGSAENIGDNLGKAGSVLSTFQ FLGTALSSMKIDELIKKQKSGGNVSSSELAKASIELINQLVDTAASLNNVN SFSQQLNKLGSVLSNTKHLNGVGNKLQNLPLDNIGAGLDTVSGILSAISA SFILSNADADTGTKAAAGVELTTKVLGNVGGKISQYIIAQRAAQLSTSA AAAGLIASVVTLAISPLSFLSIADKFKRANKIEEYSQRFKKLGYDGD SLLA AFHKETGAIDASLTRISTVLASVSSGISAAATTSVLGAPVSALV GAVTGIIS GILEASKQAMFEHVASKMADVIAEWEKKHGKNYFENGYDAR HAAFLED NFKILSQYNKEYSVERSVLITQQHWDTLIGELAGVTRNGDK TLGKSYIDY YEEGKRLEKKPDEFQKQVFDPLKGNIDLSKSSSTLLK FVTPLLTPGEEIRE RRQSGKYEYITELLVKGVDKWTVKGVQDKGSVYD YSNLIQHASVGNNQ YREIRIESHLGDGDDKVFLSAGSANIYAGKGHDV VYDKTDTGYLTIDGT KATEAGNYTVTRVLGGDVKVLQEVVKEQEV SVGKRTEKTQYRSYEFTHI NGKNLTETDNLYSVEELIGTTRADKFFG SKFADIFHGADGDDHIEGNDGN DRLYGDKGNDTLGGNGDDQLYGGD GNDKLIGGAGNNYLNNGGDGDE LQVQGNLAKNVLSGGKGNKLYGSE GADLLDGGEGNDLLKGGYGNDI YRYLSGYGHHIIDDGKDDKLSLAD IDFRDVAFRREGNDLIMYKAEGN VLSIGHKNGITFKNWFEEKESGD ISNHQIEQIFDKDGRVITPDSLKKALEYQQ SNNKASYVYGNDALAY GSQGNLNPLINEISKIISAAGNFDVKEERAAASLL QLSGNASDFS YGRNSITLTASA
Sequenzlänge	1.023 Aminosäuren
Analysierte Sequenzen	543.536.034
Ergebnis	Keine signifikante Ähnlichkeit gefunden

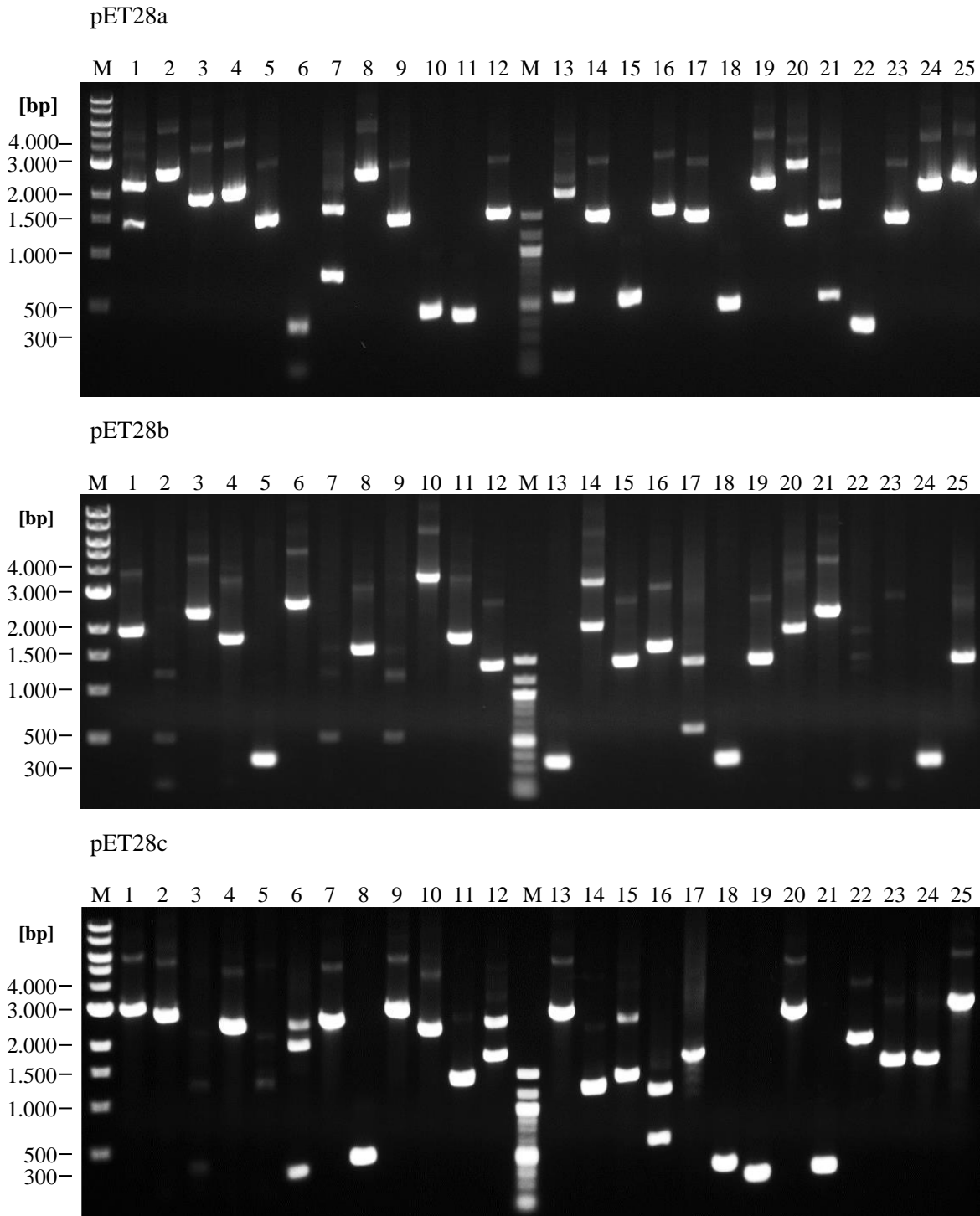


Abbildung 29: Analyse der inserierten DNA-Fragmente der heterologen *B. bacilliformis* KC583 Expressionsbibliotheken. Die Insertgrößen der genomischen Expressionsbibliothek wurde durch Kolonie-PCRs und Gelelektrophorese ausgewertet. Insgesamt wurden 32 Kolonien für jeden Leserahmen (pET28a/b/c) getestet (gezeigt: 25 Kolonien pro Leserahmen). Die Größe der Inserts entsprach der erwarteten Größe von 0,5 - 4 Kb. Entnommen aus [162].

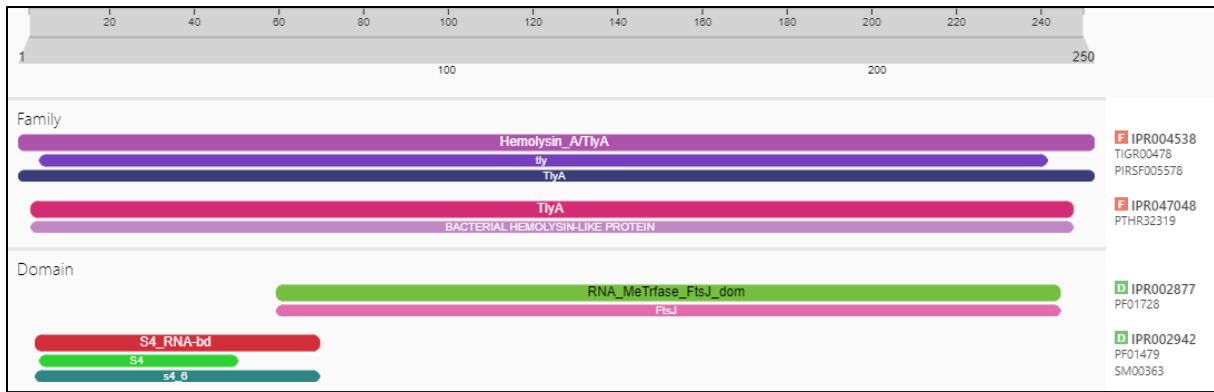


Abbildung 30: Analyse der konservierten Domänen des vermuteten Hämolyisin-A aus *B. bacilliformis*. Durch eine InterproScan Analyse wurden konservierten Domänen der 250 Aminosäuren lange Sequenz des vermuteten Hämolyisin-A (NCBI Zugangsnummern: KZN22078.1, KZM38023.1, EKS44973.1, ABM44735.1) identifiziert und vorhersagen über mögliche Funktionen getroffen. Die Analyse klassifizierte das vermutete Hämolyisin-A als Mitglied der TlyA Familie und identifizierte eine RNA-Bindedomäne sowie eine Methyltransferase-Domäne.

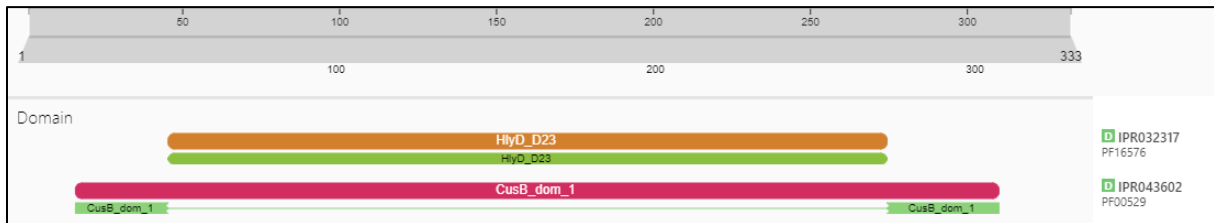


Abbildung 31: Analyse der konservierten Domänen des vermuteten Hämolyisin Sekretionsprotein-D aus *B. bacilliformis*. Durch eine InterproScan Analyse wurden konservierten Domänen der 333 Aminosäuren lange Sequenz des vermuteten Hämolyisin Sekretionsproteins-D (NCBI Zugangsnummern: KZN22169.1, KZM38155.1, KZN21496.1 und KZM37455.1) identifiziert und vorhersagen über mögliche Funktionen getroffen. Die Analyse identifizierte eine homologe konservierte Domäne für HlyD, ein Membranfusionsprotein und wesentlicher Faktor bei der Sekretion des hämolytischen RTX-Toxins HlyA aus *E. coli* sowie eine Domäne für das Kationen- Efflux-System-Protein CusB.