

**Aus der Universitätsklinik für Allgemeine Chirurgie  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. H. D. Becker**

**Arbeiten zur  
Erythrozyteninvasion  
von *Bartonella tribocorum***

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Christian Gille  
aus  
Bonn-Bad Godesberg**

2003

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. M. Sessler

2. Berichterstatter:

Professor Dr. I. B. Authenrieth

Wie unvermögend ist doch der gutwilligste Fleiß des Menschen gegen die Allmacht der ungeteilten Begeisterung. Sie weilt nicht auf der Oberfläche, faßt nicht da und dort uns an, braucht keiner Zeit und keines Mittels;  
Gebot und Zwang und Überredung braucht sie nicht; auf allen Seiten, in allen Tiefen und Höhen ergreift sie im Augenblick uns, und wandelt, ehe sie da ist für uns, ehe wir fragen, wie uns geschieht, durch und durch in ihre Schönheit, ihre Seeligkeit uns um.

(F. Hölderlin, Hyperion)

FÜR MEINE LIEBEN ELTERN

SABINE UND ANDI

# Inhaltsverzeichnis

## **1 EINLEITUNG** **1**

---

1.1 Allgemeines zum Genus <i>Bartonella</i> .....	1
1.2 <i>Bartonella</i> spezie als Humanpathogen: Besonderheiten der Pathogenese .....	2
1.2.1 Hämolytisch-pyretische Erkrankungen .....	3
1.2.2 Entzündlich-granulomatöse Erkrankungen .....	3
1.2.3 Vasoproliferative Erkrankungen .....	4
1.3 <i>Bartonella</i> spezie im tierischen Wirt .....	5
1.4 Pathogenitätsmechanismen der Gattung <i>Bartonella</i> .....	6
1.4.1 Das intrazelluläre Auftreten von Bakterien .....	7
1.4.2 Die Erythrozyteninvasion von <i>Bartonella</i> .....	8
1.5 Ausgangspunkt und Ziel der Arbeit .....	13
1.5.1 Etablierung eines Tiermodells der Erythrozyteninvasion .....	14
1.5.2 Generierung von Defektmutanten .....	15
1.5.3 Zusammenfassung .....	16

## **2 MATERIAL** **17**

---

2.1.1 Allgemeine Materialien .....	17
2.1.2 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien .....	17
2.1.3 Chemikalien und Kits .....	17
2.2 Material für das Arbeiten mit DNA .....	18
2.2.1 Plasmide .....	18
2.2.2 Oligonukleotide .....	18
2.2.3 Enzyme .....	18
2.2.4 Allgemeine Lösungen .....	19
2.2.5 Puffer für Restriktionsenzyme .....	19
2.2.6 Puffer für andere Enzyme .....	19
2.2.7 Lösungen für die Isolierung von Plasmid-DNA .....	20
2.2.8 Lösungen für die Isolierung genomischer DNA .....	20
2.3 Material für das Arbeiten mit Proteinen .....	21
2.3.1 Sarcosyl-Präparation der äußeren Membran von <i>Bartonella</i> .....	21
2.3.2 SDS-PAGE .....	21
2.3.3 Lösungen für Silberfärbung .....	21
2.4 Material für das Arbeiten mit Bakterien .....	22
2.4.1 <i>Escherichia coli</i> -Stämme .....	22
2.4.2 <i>Bartonella</i> -Stämme .....	23
2.4.3 Antibiotika und Zusätze .....	23
2.4.4 Lösungen für die Herstellung kompetenter Zellen .....	23
2.4.5 Medien für die Bakterienkultur .....	23
2.5 Material für das Arbeiten mit Tieren .....	24
2.5.1 Versuchstiere .....	24
2.5.2 Blutentnahmen .....	24
2.6 Material für das Arbeiten mit Zellen .....	24
2.6.1 Allgemeine Lösungen .....	24
2.6.2 Antikörper .....	24

## **3 METHODEN** **26**

---

3.1 Arbeiten mit DNA .....	26
3.1.1 Isolation genomischer DNA .....	26

3.1.2 Plasmidpräparationen .....	27
3.1.3 DNA-Modifikationen .....	27
3.1.4 Gelelektrophoresen von DNA .....	28
3.1.5 DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen .....	29
3.1.6 PCR - Verfahren .....	30
3.1.7 Sequenzierarbeiten .....	30
3.2 Arbeiten mit Proteinen .....	31
3.2.1 Sarcosyl-Präparation der äußeren Membranproteine von <i>B. tribocorum</i> .....	31
3.2.2 SDS-PAGE .....	31
3.3 Arbeiten mit Bakterien .....	33
3.3.1 Kultur von Bakterien .....	33
3.3.2 Transformation .....	33
3.3.3 Konjugation .....	34
3.4 Arbeiten mit Tieren .....	35
3.4.1 Infektion von Laborratten mit <i>Bartonella tribocorum</i> .....	35
3.4.2 Blutabnahme bei Ratten .....	35
3.4.3 Organentnahme bei Ratten .....	35
3.5 Arbeiten mit Zellen .....	35
3.5.1 IF-Färbungen von Vollblut aus Ratten .....	35
3.5.2 FACS-Analyse von Vollblut von Ratten zur Bestimmung des Bakterientiters .....	36
3.6 Statistische Methoden .....	36

## **4 ERGEBNISSE** **38**

---

4.1 Etablierung eines <i>in vivo</i> -Modells der Erythrozyteninvasion .....	38
4.1.1 Die Ratte als Modell für die Erythrozyteninvasion .....	38
4.1.2 Verlauf der Bakteriämie nach experimenteller Infektion von Ratten mit <i>B. tribocorum-gfp</i> .....	38
4.1.3 Interaktion von <i>B. tribocorum-gfp</i> mit Erythrozyten .....	42
4.1.4 Untersuchung der ersten drei Tage der Infektion .....	43
4.1.5 Organspezifische Akkumulation von <i>B. tribocorum-gfp</i> .....	44
4.1.6 Interaktion mit Erythrozyten und die Beteiligung von erythroiden Vorläuferzellen .....	45
4.2 Arbeiten zu einem lokusspezifischen Mutagenesesystem für <i>B. tribocorum</i> .....	48
4.2.1 Der <i>ialA/B</i> -Locus von <i>B. tribocorum</i> .....	48
4.2.2 Herstellung von Defektmutanten im <i>ialB</i> -Locus von <i>Bartonella tribocorum</i> durch unvollständige Duplikation .....	48
4.2.3 Genotypische Analyse der Konjuganten .....	54
4.2.4 Phänotypische Analyse der Defektmutanten durch SDS-PAGE .....	57
4.2.5 Phänotypische Analyse der Defektmutanten im Tiermodell .....	58
4.2.6 Klonierung eines Komplementationsvektors für <i>ialB</i> -defiziente <i>B. tribocorum</i> -Stämme .....	59
4.2.7 Analyse des Komplementationsvektors im Tiermodell .....	59
4.2.8 Komplementation der <i>ialB</i> -defizienten <i>B. tribocorum</i> -Stämme .....	62

## **5 DISKUSSION** **63**

---

5.1 Etablierung eines <i>in vivo</i> -Modells der Erythrozyteninvasion .....	63
5.1.1 Das Modellsystem Ratte .....	63
5.1.2 Verlauf der Bakteriämie in der Ratte .....	64
5.1.3 Die FACS-Analyse und <i>gfp</i> als Untersuchungsmethode für einen hämotrophen Infektionsverlauf .....	66
5.1.4 Interaktion mit Erythrozyten .....	66
5.1.5 Die präbakterämische Phase: Untersuchung der ersten drei Tage der Infektion .....	69
5.1.6 Interaktion mit erythroetischen Vorläuferzellen .....	73
5.1.7 Zusammenfassende Betrachtung und Ausblicke .....	75
5.2 Arbeiten zu einem lokusspezifischen Mutagenesesystem und Anwendung dieses Systems zur Klärung der Rolle des <i>ialB</i> -Lokus für die Erythrozyteninvasion von <i>B. tribocorum in vivo</i> .....	81
5.2.1 Der <i>ialA/B</i> -Lokus von <i>B. tribocorum</i> 506 <sup>T</sup> .....	81
5.2.2 Lokusspezifische Mutagenese des <i>ialB</i> -Lokus von <i>B. tribocorum</i> 506 <sup>T</sup> .....	82

5.2.3 Phänotypische Analyse der <i>B. tribocorum-ialB</i> -Defektmutanten und Versuch der Komplementierung .....	83
5.2.4 Zusammenfassende Betrachtung und Ausblicke .....	86

---

**6 ZUSAMMENFASSUNG** **89**

---

**7 LITERATUR** **91**

# Abkürzungen

Abkürzungen für Einheiten entsprechen dem Système International d'Unités

i.v.	intravenös
s.c.	subkutan
i.d.	intradermal
p.i.	post infectionem
CFU	colony forming unit
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
bp	Basenpaare

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeines zum Genus *Bartonella*

Bartonellen sind gram-negative, fakultativ intrazellulär lebende Stäbchen, die hämotroph viele Säugetiere und auch den Menschen besiedeln (Tab. 1) (Dehio, 2001). Sie sind 0,3 bis 0,5 µm dick und 1,0 bis 1,7 µm lang, gehören der Ordnung der *Rickettsiales* an und sind somit nahe verwandt mit der Gattung der *Rickettsiae* und *Coxiellae* (Maurin and Raoult, 1996).

Art	Wirt	Übertragung
<i>B. bacilliformis</i>	Mensch	Sandfliege
<i>B. quintana</i>	Mensch	Läuse
<i>B. henselae</i>	Mensch, Katze	Katze
<i>B. clarridgeiae</i>	Mensch, Katze	Katze
<i>B. elisabethae</i>	Mensch, Ratte	unbekannt
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i>	Wühlmaus	-?-
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	Mensch, Maus	-?-
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffi</i>	Hund	-?-
<i>B. talpae</i>	kleine Waldtiere	-?-
<i>B. peromysci</i>	kleine Waldtiere	-?-
<i>B. grahamii</i>	kleine Waldtiere	-?-
<i>B. taylorii</i>	kleine Waldtiere	-?-
<i>B. doshiae</i>	kleine Waldtiere	-?-
<i>B. alsatica</i>	Wildkaninchen	-?-
<i>B. tribocorum</i>	Ratte	-?-
<i>B. birtlesii</i>	kleine Waldtiere	-?-
<i>B. koehlerae</i>	Katze	-?-
<i>B. schoenbuchii</i>	Rehwild	-?-
<i>B. weissii</i>	Rind	-?-

**Tab. 1: Übersicht über die heute bekannten *Bartonella* spezies**

In Kultur wachsen Bartonellen sehr langsam, sie benötigen komplexe Nährmedien mit Hämin (Sander et al., 2000). Am besten wachsen sie in Ko-Kultur mit Endothelzellen. Einfacher und sehr effizient ist aber die Kultivierung auf Columbia-Agar, versetzt mit 5 % Schaf- oder Kaninchenblut bei 35 °C bis 37 °C (*B. bacilliformis*: 30 °C) in 5 % CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

Für die Kultur von Primärisolaten sollten die Bakterienkulturen für mindestens vier Wochen inkubiert werden. Es tritt zunächst ein langsam wachsender „rough“-Typ auf, der später vom schneller wachsenden „smooth“-Typ überwachsen wird. Es ist zu beachten, dass CO<sub>2</sub>-getriggerte Nachweissysteme wie BACTEC<sup>®</sup> für den Nachweis von *Bartonella* spezies nicht geeignet sind (Schwartzman, 1996).





Abb. 1: Einzelkolonie von *B. henselae* nach mehreren Wochen Kultivierung

## 1.2 *Bartonella* spezies als Humanpathogen: Besonderheiten der Pathogenese

Nur einige der heute bekannten *Bartonella* spezies sind humanpathogen. Sie werden durch Arthropoden oder durch Kontakt mit dem infizierten Säugetierwirt auf den Menschen übertragen und rufen sehr unterschiedliche Krankheitsbilder hervor, die zum Teil ineinander über gehen können und je nach Immunstatus des Infizierten sehr unterschiedlich sind.

Eine Übersicht über die Krankheiten der sechs bisher bekannten humanpathogenen *Bartonella* spezies sind in Tab. 2 zusammengestellt.

hämolytisch-pyretisch	
Oroya-Fieber	<i>B. bacilliformis</i>
Fünf-Tage-Fieber	<i>B. quintana</i>
Bakterämie	<i>B. bacilliformis</i> , <i>B. henselae</i> , <i>B. quintana</i> , <i>B. clarridgeiae</i> , <i>B. elisabethae</i> , <i>B. vinsonii ssp. arupensis</i>
Bakterämie (beim Immunsupprimierten)	<i>B. henselae</i> , <i>B. quintana</i>
entzündlich-granulomatös	
Katzenkratzkrankheit (KKK)	<i>B. henselae</i> , <i>B. clarridgeiae</i>
Neuroretinitis	<i>B. henselae</i> , <i>B. grahamii</i> (?)
Endokarditis	<i>B. henselae</i> , <i>B. quintana</i> , <i>B. elisabethae</i>
Endokarditis (beim Immunsupprimierten)	<i>B. henselae</i> , <i>B. quintana</i>
vasoproliferativ	
Verruga peruana	<i>B. bacilliformis</i>
Bazilläre Angiomatose (beim Immunsupprimierten)	<i>B. henselae</i> , <i>B. quintana</i>
Bazilläre Peliose (beim Immunsupprimierten)	<i>B. henselae</i>

Tab. 2: Humanpathogenität von *Bartonella* spezies

Die Besonderheiten der einzelnen Formenkreise der Erkrankungen sollen nun kurz erläutert werden.

### 1.2.1 Hämolytisch-pyretische Erkrankungen

Das **Oroya-Fieber** ist eine hämolytische Erkrankung, die durch die Infektion des Menschen mit *B. bacilliformis* hervorgerufen wird. Dieses Bakterium wird durch die Sandmücke (*Lutzomyia verrucorum*) übertragen. Durch die limitierte regionale Ausbreitung des Vektors sind die Infektionsorte auf die höheren Regionen der Anden beschränkt. Das Krankheitsbild manifestiert sich mit rasch ansteigendem, unregelmäßig verlaufenden Fieberschüben, Lymphadenopathien, starken Kopfschmerzen, Skelettschmerzen, Hepatosplenomegalie und einer sich rasch entwickelnden, hämolytischen Anämie. Letztere wird durch eine bakterielle Besiedlung der Erythrozyten hervorgerufen. In der akuten Phase sind 40-100 % der Erythrozyten befallen (Ihler et al., 1996). Außergewöhnlich ist, dass *B. bacilliformis* dabei in die roten Blutzellen eindringt und diese zerstört. Es gibt eine Vielzahl von Bakterien, die während ihrer Infektion des Menschen intrazellulär auftreten. Dabei handelt es sich bei den Wirtszellen vor allem um Epithelzellen oder Makrophagen, die invadiert werden (siehe 1.4.1). Die Invasion von Erythrozyten ist eine Besonderheit, die bisher nur Spezies der Gattung *Bartonella* und der Familie der *Anaplasmataceae* beschrieben wurde (Ristic, 1979) und daher Gegenstand aktueller Forschung ist (siehe 1.4.2). Das akute Krankheitsbild kann in eine chronische Phase übergehen, die durch vasoproliferative Tumore gekennzeichnet ist (siehe unten). Beide Krankheitsbilder werden unter dem Begriff **Carrion'sche Erkrankung** zusammengefasst.

Das **Fünf-Tage-Fieber** ist eine Erkrankung, die durch *B. quintana* hervorgerufen wird. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt über die Körperlaus (*Pediculus humanus*) und ist mit schlechten hygienischen Verhältnissen assoziiert. Das Krankheitsbild manifestiert sich mit periodisch auftretenden Fieberschüben in einem Intervall von vier bis acht Tagen über einen Zeitraum von bis zu zwei Monaten. Eine Hämolyse gehört nicht zum typischen Verlauf, wenn auch von Fällen mit begleitender Anämie berichtet wird (Liberto and Matera, 2000; Maurin et al., 1997; Maurin and Raoult, 1996).

### 1.2.2 Entzündlich-granulomatöse Erkrankungen

Zu diesem Formenkreis zählen die Katzenkratzkrankheit (KKK), die Endokarditis und die Neuroretinitis. Annahmen, die die koronare Herzkrankheit mit *Bartonella* spezieis in Verbindung brachten, konnten nicht bestätigt werden (Ender et al., 2001).

Während die Endokarditis und die Neuroretinitis sehr selten auftreten, (Holmes, 1995; Kerkhoff et al., 1999; Maurin and Raoult, 1996), ist die **Katzenkratzkrankheit** die am häufigsten auftretende Erkrankung beim Menschen, die durch *Bartonella* spezie ausgelöst wird. 1997 schätzte man, daß in den USA jährlich 22.000 Patienten aufgrund einer KKK ambulant behandelt wurden. Dies entspricht einer Prävalenz von 9,3 pro 100.000 (Bass et al., 1997).

Die KKK wird durch eine Infektion des Immunkompetenten mit *B. henselae* hervorgerufen und geht in unkomplizierten Fällen mit Lymphknotenschwellungen und unspezifischen Symptomen wie Fieber oder Kopfschmerz einher. In den allermeisten Fällen heilt die Erkrankung ohne antibiotische Behandlung innerhalb von 8 bis 12 Wochen aus.

*B. henselae* wird von Katzen durch Kratzwunden auf den Menschen übertragen. Während das Bakterium beim Menschen pathogen ist, lebt es in der Katze in der Regel als asymptomatisch persistierender Parasit in den Erythrozyten. Die intraerythrozytäre Kolonisation des tierischen Wirts erinnert an die gleiche Lokalisation von *B. bacilliformis* beim Oroya-Fieber (s.o.).

Bei immunsupprimierten Menschen werden zweit weitere, zu den vasoproliferativen Erkrankungen zählende Krankheitsbilder durch *B. henselae* ausgelöst, die bazilläre Angiomatose und die bazilläre Peliosis hepatis.

### **1.2.3 Vasoproliferative Erkrankungen**

Die **bazilläre Angiomatose (BA)** und die **bazilläre Peliosis hepatis (BPH)** sind vasoproliferative Manifestationen, die durch Infektion immunsupprimierter Menschen mit *B. henselae* und/ oder *B. quintana* ausgelöst werden (die BPH-Fälle wurden bisher nur mit *B. henselae* assoziiert) (Koehler et al., 1997). Besonders AIDS-Patienten, aber auch Immunsupprimierte nach Organtransplantationen, sind betroffen (Ahsan et al., 1998; Kemper, 1995). Es sind aber auch schon Fälle von BA bei immunkompetenten Personen beschrieben worden (Cockerell, 1995).

In diesen Formenkreis gehört außerdem die **Verruga peruana**, die als Sekundärstadium der Carrion'schen Erkrankung (siehe oben) oder auch als primäre Manifestation einer *B. bacilliformis*-Infektion auftreten kann.

Diesen Krankheitsbildern ist gemein, dass es zur Ausbildung multipler Tumoren an der Haut kommt, die dem Kaposi-Sarkom ähnlich sind. Es handelt sich um milliäre oder noduläre, vaskularisierte Papeln, die bei der Verruga peruana vor allem an den

Extremitäten, bei der BA auch an den Schleimhäuten oder inneren Organen auftreten. Es können die Epidermis, Dermis oder alle Schichten bis in die Subkutis betroffen sein (Arias-Stella et al., 1986; Maurin and Raoult, 1996).

Histologisch findet man bei diesen Erkrankungen endotheliale Hyperplasien, die ausgeformte Kapillaren bilden oder ohne Lumen in pseudoepitheloider Anordnung vorliegen. Bakterien findet man extrazellulär zwischen den Endothelzellen, aber auch intrazellulär (Arias-Stella et al., 1986; Sander et al., 1996). Diese „Einschlüsse“ werden bei der *Verruga peruana* nach ihrem Erstbeschreiber manchmal Rocha-Lima-Körperchen genannt.

Diese Krankheitsbilder beruhen auf einem weiteren, sehr speziellen Pathogenitätsmechanismus: die Fähigkeit zur Invasion von Endothelzellen und vor allem deren Induktion zur Aussprossung und Bildung neuer Kapillaren oder kapillarähnlichen Strukturen. Dieser Prozess, den man als Neoangiogenese bezeichnet, wird aus verschiedenen Gründen zur Zeit intensiv erforscht. Zum Beispiel ist er bei der Krebsentstehung von Bedeutung, außerdem versucht man, ihn therapeutisch einzusetzen, um Umgehungskreisläufe um stenosierte Gefäßstellen zu induzieren.

### **1.3 *Bartonella* spezies im tierischen Wirt**

Die meisten *Bartonella* spezies besiedeln das Blut verschiedener Säuger. Dazu zählen sowohl Haustiere wie Hund und Katze als auch Mäuse und Ratten, die in nächster Umgebung des Menschen anzutreffen sind, aber auch Wapiti, Rehe und Pumas. Es wird vermutet, dass die verschiedenen *Bartonella* spezies nur ein definiertes, sehr enges Wirtsspektrum besiedeln (siehe Tab. 1).

Die Durchseuchungsrate der einzelnen Wirtspopulationen ist groß. Bei einer Studie von Heller et al. waren 53 % der streunenden Katzen in Frankreich bakterämisch mit *B. henselae* (Heller et al., 1997). In Freiburg i.B. waren 13 % der untersuchten Katzen aus Haushalten bakterämisch (Sander et al., 1997), in den USA konnte sogar eine Prävalenz von *B. henselae* in Hauskatzen von 41 % gezeigt werden (Glaser et al., 1994).

Verschiedene Untersuchungen von kleinen Waldtieren in den USA und England zeigten, dass aus über 50 % der gefangenen Tiere *Bartonella* spezies isoliert werden konnten (Birtles et al., 1994; Kosoy et al., 1998; Kosoy et al., 1997). In Frankreich

konnten bei einer Untersuchung von Wildkaninchen in 9 von 30 Blutkulturen *Bartonella* spezies gefunden werden (Heller et al., 1999).

Im Gegensatz zur Infektion des Menschen, die immer mit der Auslösung eines Krankheitsgeschehens verbunden ist, verläuft die Infektion des tierischen Wirts meist in Form einer lang andauernden, asymptomatischen Bakteriämie. Dies konnte bei experimentellen Infektionen von Katzen (Regnery et al., 1996), Ratten (Hansmann, 2000; Schülein et al., 2001) und Mäusen (Koesling et al., 2001) ermittelt werden und wird auch für den natürlichen Infektionsverlauf angenommen (Dehio, 2001).

Die Invasion in die roten Blutzellen wird als kennzeichnend für die Infektion des natürlichen Reservoir-Wirtes angenommen. Die intraerythrozytäre Lokalisation im tierischen Wirt ist für einige *Bartonella* spezies verifiziert worden. Kordick et al. fanden durch elektronenmikroskopische Zwei Studien wiesen in 3-6 % der Erythrozyten natürlich infizierter Katzen intrazelluläre Bakterien (Kordick and Breitschwerdt 1995; Rolain et al. 2001). Heller et al. beschrieben solche Stadien nach experimenteller Infektion von Kaninchen mit *B. alsatica* aufgrund lichtmikroskopischer Analysen (Heller et al., 1999). Auch für *B. talpae* und *B. permysci* (früher: *Grahamella* spezies) sind intraerythrozytäre Stadien beschrieben worden (Birtles et al., 1994; Birtles, 1995). Auf welche Weise *Bartonella* spezies es schaffen, das intraerythrozytäre Kompartiment zu Besiedeln ist bisher ebenso wenig verstanden, wie die Bedeutung dieser Strategie für den asymptomatischen Infektionsprozeß und den Lebenszyklus dieser Bakterien.

#### **1.4 Pathogenitätsmechanismen der Gattung *Bartonella***

Bei der Besiedlung eines Organismus mit *Bartonella* spezies kann es also zu sehr unterschiedlichen Reaktionen kommen: die asymptomatische Kolonisation im tierischen Wirt auf der einen Seite und akute oder chronische Erkrankungen bei Besiedlung des Menschen auf der anderen Seite. Zwei Virulenzstrategien fallen dabei auf: (1) die Induktion von Angiogenese und (2) die Invasion in Erythrozyten.

Die Induktion von angiogenetischen Prozessen ist nur bei der Besiedlung des immunsuprimierten Menschen mit *B. henselae* oder *B. quintana* bekannt. Auf diesen Prozeß soll hier nicht näher eingegangen werden. Es sei hier auf folgende Literatur hingewiesen: (Dehio, 1999; Dehio, 2001; Kempf, Volkmann et al., 2001).

Die intraerythrozytäre Kolonisation scheint bei die Besiedlung des natürlichen Wirts für alle *Bartonella* spezie eine spezielle Virulenzstrategie zu sein. Die damit verbundene Fähigkeit zur Invasion in rote Blutzellen ist beinahe einzigartig. Darauf soll nun näher eingegangen werden.

#### **1.4.1 Das intrazelluläre Auftreten von Bakterien**

Ein weit verbreiteter Mechanismus vieler Mikroorganismen für die Invasion in Zellen ist die Induktion eines phagozytotischen Vorgangs der Wirtszelle. Review: (Dramsı and Cossart, 1998). Dieser Prozeß ist fundamental wichtig für sehr viele intrazellulär auftretende Pathogene, und der amerikanische Forscher S. Silverstein schrieb 1995:“ Phagozytosis appeals to almost everyone. [...] Science fiction devotes will revel as invading microbial pathogens evade the cell’s outer defences and win the day by striking at a station along the endocytic pathway. The laid-back of all ages will appreciate the many ways procaryotes from life-long, sometimes symbiotic, associations with the cells that phagocytose them. ...“(Silverstein, 1995).

Der Prozeß der Phagozytose kann vereinfacht in drei charakteristische Phasen unterteilt werden: (1) Nach der **Adhäsion** des Bakteriums über einen rezeptorvermittelten Prozeß kommt es durch eine intrazelluläre Signalkette zur Reorganisation des Zytoskeletts. Es folgt (2) die **Internalisation** der Plasmamembran mit dem Partikel als endozytotisches Vesikel. (3) Nach der Aufnahme des Mikroorganismus verhindert dieser auf verschiedenste Weise, daß er durch den normalen Verdauungsvorgang der Zelle zerstört wird (**Escape**). Diese Prozesse sind hochdynamisch und erfordern vor allem seitens der Wirtszelle ein aktives Zytoskelett und einen streng gesteuerten Membranfluß zwischen den einzelnen Kompartimenten der Zelle. Die Bakterien liegen nach der Aufnahme meist in kleinen Membranvesikeln vor, die oft in der Nähe des Zellkerns lokalisiert sind (Alberts et al., 1995; Greenberg, 1995).

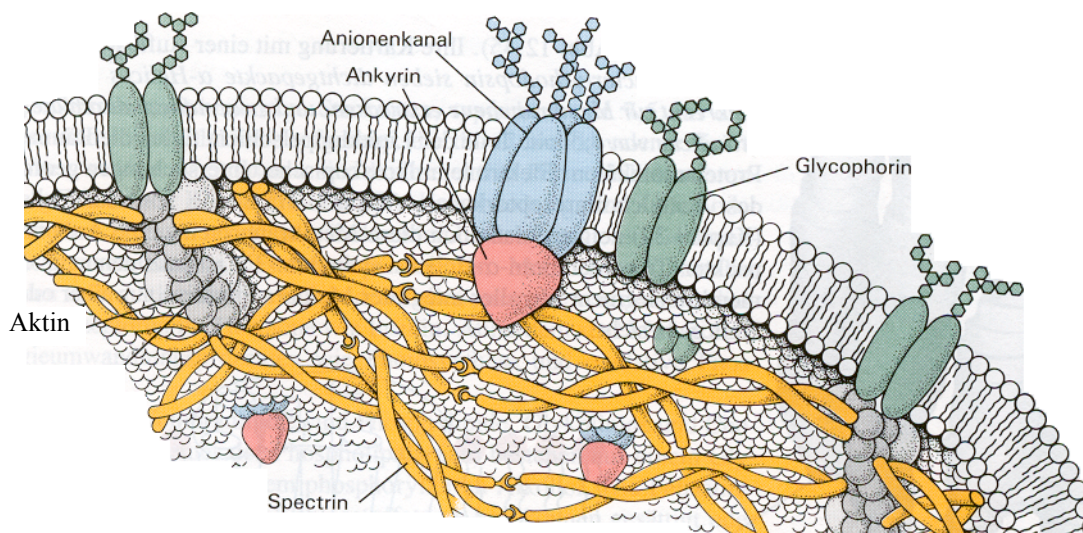
Dieses Prinzip, welches von verschiedenen Bakterien auf recht unterschiedliche Weise verwirklicht wird, gilt nicht nur für die Invasion in sogenannte ‘professionelle Phagozyten’, wie Granulozyten oder Makrophagen, die zum Beispiel von Gonokokken oder Mykobakterien besiedelt werden. Auch andere Zellen, die normalerweise gar nicht zur Phagozytose befähigt sind, können von Bakterien veranlaßt werden, diese durch Phagozytose aufzunehmen. Chlamydien besiedeln das Epithel des Urogenitaltraktes und des Auges (Wyrick, 2000). Auch Neisserien (Merz and So, 2000) Shigellen (Bourdet-

Sicard et al., 2000), Mycobakterien (Bermudez and Sangari, 2001), Salmonellen (Falkow, 1997; Raupach et al., 1999) und andere sind gut erforschte Beispiele.

Auch für *B. bacilliformis* (Garcia et al., 1992), *B. henselae* (Dehio et al., 1997; Dehio, 1999) und für *B. quintana* (Brouqui and Raoult, 1996) konnte *in vitro* (für *B. quintana* auch *in vivo*) gezeigt werden, daß diese in verschiedene Epithelien und Endothelien aufgenommen werden. Dabei kommt es in ähnlicher Weise wie oben geschildert, zur Induktion der aktiven, phagozytotischen Aufnahme in die Wirtszellen.

#### 1.4.2 Die Erythrozyteninvasion von *Bartonella*

Erythrozyten stellen eine besondere Klasse von Zellen dar: Ein ausgereifter Erythrozyt hat weder einen Zellkern, den andere Zellen für die Steuerung phagozytotischer Vorgänge benutzen, noch weist er, wie andere Zellen, die Möglichkeit der Aktin-abhängigen Bildung von endozytotischen Vesikeln auf oder zeigt einen aktiven Membranfluß zwischen der Plasmamembran und dem intrazellulären Raum.



**Abb. 3: Aufbau des Membranzytoskeletts des Erythrozyten**

Die Erythrozytenmembran ist vielmehr auf Stabilität gegen äußere Scherkräfte ausgelegt (Hoffbrand et al., 1997).

Es stellt sich die Frage, wie es zur intraerythrozytären Lokalisation von *Bartonella* spezie kommt? Liegt der Invasion in die Erythrozyten vielleicht ein völlig neuer Mechanismus zugrunde?

Der jetzige Wissensstand soll im Folgenden dargestellt werden.

#### 1.4.2.1 Deformin, Flagellen und Fimbriae als mögliche Pathogenitätsfaktoren für die Erythrozyteninvasion von *Bartonella*

1986 konnten Benson et al. durch elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, daß *B. bacilliformis* stabile Komplexe mit humanen Erythrozyten *in vitro* bildet.

Die Aggregatbildung zeigte sich in Abhängigkeit von der Beweglichkeit von *B. bacilliformis*, die es durch seine starke Flagellierung erhält (Benson et al., 1986). Antikörper gegen Flagellin, ein 42 kDa-Protein, welches die Flagellen von *B. bacilliformis* aufbaut, konnten die Aggregation stark vermindern (Scherer et al., 1993). Es ist nicht bekannt, welche Rolle die Flagellen spielen; sie könnten zum einen Adhärenzstrukturen aufweisen, zum anderen könnte es aber auch sein, dass sie durch die Fähigkeit zur Motilitätsvermittlung einen entscheidenden Pathogenitätsfaktor darstellen (Minnick and Anderson, 2000; Minnick et al., 1996). Allerdings scheint die Invasion nicht zwingend von flagellenvermittelten Strukturen oder der Motilität abhängig zu sein, da beispielsweise *B. henselae* nicht flagelliert ist (Dehio, 1997).

Auch die Rolle der von einigen *Bartonella* spezies ausgebildeten Fimbrien (auch bundle-forming-pili, BFP genannt), die bei vielen anderen Bakterien eine Rolle bei der Adhäsion spielen, ist nicht geklärt (Minnick et al., 1996).

Bei der von Benson et al. beschriebenen Aggregatbildung von *B. bacilliformis* mit Erythrozyten kam es zu einer deutlichen Formveränderung der roten Blutzellen, die auch nach dem Ablösen der Bakterien erhalten blieb (Benson et al., 1986). Es konnte ein hydrophober Faktor, Deformin genannt, aus dem Überstand der Kulturen von *B. bacilliformis* und *B. henselae* isoliert werden, welcher, auch ohne die Anwesenheit von Bakterien, bei Zugabe zu roten Blutzellen zu Deformationen der Erythrozytenwand führt (Iwaki-Egawa and Ihler, 1997). Zunächst nahm man an, es handele sich um ein Protein (Xu et al., 1995), neuere Bericht weisen aber darauf hin, dass Deformin ein kleines, hydrophobes Molekül mit einem Molekulargewicht von ungefähr 1,4 kDa ist (Derrick & Ihler, 2001). Es kann von Albumin als hitze- und protease-resistentes, wasserlösliches Molekül gelöst werden (Dehio, 2001). Die beschriebenen Invaginationen gehen durch Behandlung mit Vanadate, einem ATPase-Inhibitor, oder dem Phospholipid Dilauroylphosphatidylcholine sowie durch Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration zurück (Mernaugh and Ihler, 1992). Die Bedeutung dieses Faktors und der genaue Wirkmechanismus ebenso wie die Frage, wie Deformin in den extrazellulären Raum gelangt, sind bisher nicht geklärt.



#### 1.4.2.2 Typ IV-Sekretionssysteme

Viele pathogene Mikroorganismen haben spezielle Systeme entwickelt, um Pathogenitätsfaktoren (meist Proteine, aber auch andere Stoffe) in den extrazellulären Raum zu transportieren, da hier die Interaktion mit dem Wirt stattfinden kann. Diese Transportsystemen werden heute allgemein in fünf Familien unterschieden (Henderson et al., 2000; Lory, 1998). Für *B. henselae* und *B. tribocorum* konnte ein Typ IV-Transporter identifiziert werden (Baron, O'Callaghan et al, 2002; Dehio 2001a). Bei diesen Transportsystemen handelt es sich um Abwandlungen von Konjugationssystemen, welche als erstes bei *Agrobacterium tumefaciens* entdeckt wurden und nun auch für viele Humanpathogene, wie z.B. *Bordetella pertussis*, *Brucella* spezie und *Helicobacter pylori* bekannt sind (Christie and Vogel, 2000). Durch Lokusspezifische Mutagenese von zwei der für dieses Transportsystem notwendigen Proteine in *B. tribocorum* konnte gezeigt werden, dass der Typ IV-Transporter für die Erythrozyteninvasion wichtig sein könnte (Dehio, 2001).

#### 1.4.2.3 Membran-Rezeptor-Proteine für die Interaktion von *Bartonella* spezie mit Erythrozyten

Für die Interaktion von *B. bacilliformis* und *B. henselae* mit menschlichen und auch tierischen Erythrozyten sind einige Proteine identifiziert worden, die möglicherweise eine Rolle als Rezeptorproteine spielen. In zwei unterschiedlichen Studien konnte ein 230 kDa großes Protein in der Membran von humanen Erythrozyten ermittelt werden, welches von *B. bacilliformis* gebunden wird. Es wurde die Vermutung angestellt, dass es sich um Spektrin handele. Auch aufgereinigtes Spektrin wird von *B. bacilliformis* gebunden. Darüberhinaus wurden weitere Proteine benannt, so zum Beispiel Glycophorin A/B und Aktin (Buckles and McGinnis Hill, 2000; Iwaki-Egawa and Ihler, 1997). Ob es sich dabei um funktionell wichtige Interaktionen handelt, ist nicht klar. Schon früher wurde jedoch nach *in-vitro*-Infektionsexperimenten mit *B. bacilliformis* postuliert, dass die Bindungsstrukturen am Erythrozyten keine Glykoproteine seien, sondern wahrscheinlich Glykolipide (Walker and Winkler, 1981). Insgesamt ist die Frage nach der molekularen Interaktion von *Bartonella* spezie mit der Erythrozytenmembran bisher noch wenig geklärt.

#### 1.4.2.4 Der *ialA/B*-Locus

Neben den oben genannten zellbiologischen Erkenntnissen wurde 1995 von Mitchell und Minnick erstmals auf genetischer Ebene ein Hinweis für die Identifikation von

Pathogenitätsfaktoren für die Erythrozyteninvasion von *B. bacilliformis* veröffentlicht. Es wurde vom Genom von *B. bacilliformis* eine Plasmidbank in *E. coli* erstellt. Dazu wurde das Genom in Stücke geteilt, die größer sind, als die durchschnittliche Länge eines Gens und somit potentiell Gene enthalten, die für einen bestimmten Phänotyp notwendig sind. In einem *in vitro*-Infektionsversuch mit diesen genetisch veränderten *E. coli* erhielt man Klone, die vorher nicht invasiv waren, nun aber die Fähigkeit zur Erythrozyteninvasion erhalten hatten. Sie mußten Gene erhalten haben, die für diesen Phänotyp notwendig sind. Es wurde so ein chromosomales, 1,469 kb großes Fragment identifiziert, welches zwei offene Leseraster von 510 bp und 558 bp enthielt, die von einer intergenischen Sequenz von 116 bp getrennt wurden und als *ialA* und *ialB* bezeichnet wurden (für „invasion associated locus“).

*IalA* kodiert für ein 21 kDa großes Protein (Mitchell and Minnick, 1995). Es handelt sich bei diesem Protein um eine Nudix-Hydrolase (Nucleotid-Diphosphat und X-Rest). Diese Enzyme hydrolysieren Stoffe, bestehend aus einem NDP (Nucleosid-Diphosphat) und einer weiteren Gruppe. Substrate können Nucleosidtriphosphate sein, genauso wie Dinucleosid Polyphosphate oder Nucleotide mit weiteren Kohlenhydratketten. Dabei sind einige dieser Enzyme hoch spezifisch, andere hingegen können unterschiedliche Stoffe als Substrat verwenden. *IalA* hydrolysiert als bevorzugtes Substrat ein Diadenosintetraphosphat, Adenosin 5'-tetraphospho-5'-adenosin (Ap<sub>4</sub>A). Es können aber auch Diadenosine mit bis zu sechs Phosphatgruppen verstoffwechselt werden, oder Dinucleotide mit der Purinbase Guanin statt Adenin. Nudix-Hydrolasen sind sowohl in menschlichen Zellen als auch bei Prokaryonten und Pflanzen gefunden worden. Funktionell werden sie mit einer Vielzahl von Prozessen in Verbindung gebracht. Dazu zählt auch die Anpassung an, durch Sauerstoffradikale ausgelösten, metabolischen Stress und die Regulation der DNA-Replikation während der Zellteilung. Dies sind Fähigkeiten, die bei der Invasion von Zellen möglicherweise eine Rolle spielen. So vermittelt ein sehr ähnliches Gen aus *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in *E. coli* die Fähigkeit in Epithelzellen der Mundschleimhaut eindringen zu können (Cartwright et al., 1999; Conyers and Bessman, 1999). Review: (McLennan, 1999).

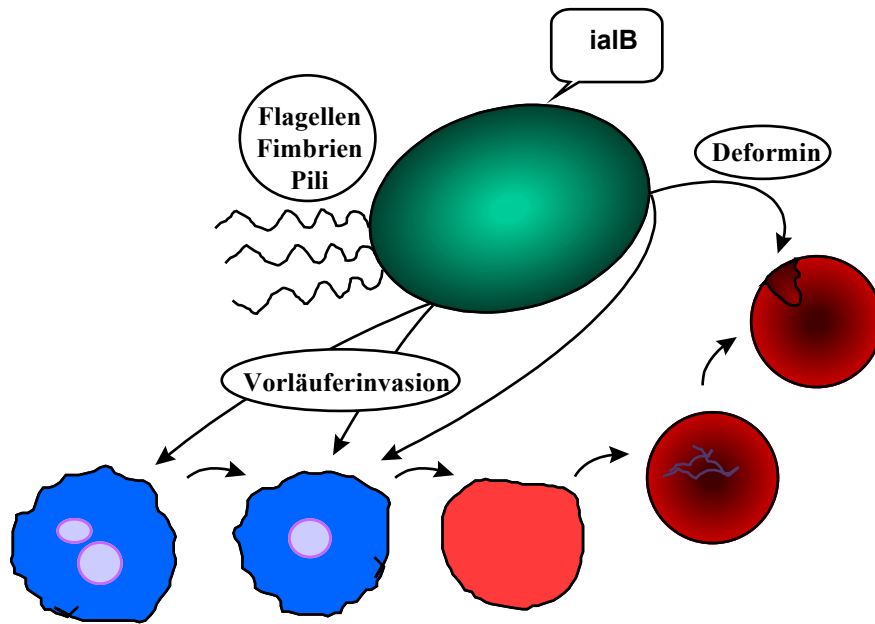
Das Protein des *ialB*-Locus wurde durch *in vitro*-Expression mit einer relativen Masse von 20 kDa angegeben. Die Expression in *E. coli* zeigte eine relative Masse von 18 kDa. Dieses Ergebnis, und die computergestützte Identifikation einer möglichen

Signalpeptidase-Schnittstelle führten zu der Vermutung, es könne sich um ein posttranslational verändertes Protein, möglicherweise ein Protein mit einer Signalsequenz für die extrazelluläre Präsentation bzw. Sekretion handeln. Die Proteinsequenz zeigt eine 63,6 %ige Ähnlichkeit zu dem Ail-Protein von *Yersinia enterocolitica*, welches bei Expression in *E. coli* ebenfalls zu einem invasiven Verhalten in Kulturzellen führt (Miller et al, 1990; Mitchell and Minnick, 1995). Man nahm zunächst an, daß es sich bei dem durch den *ialB*-Locus kodierten Protein um ein äußeres Membranprotein handelt (Coleman et al., 1998), später konnte gezeigt werden, daß es sich um ein Protein der inneren Membran handelt (Coleman and Minnick, 2001). *In vitro*-Experimente deuteten zunächst darauf hin, dass die Adhäsion an Erythrozyten von *ialB* nicht gefördert wird. Eine Rolle für den Invasionsprozeß wurde aber als wahrscheinlich angenommen (Mitchell and Minnick, 1995). In einer aus der gleichen Arbeitsgruppe stammenden neuern Veröfentlichung über Adhäsions- und -Invasionsexperimente *in vitro* mit einem generierten *IalB*-defizienten *B. bacilliformis*-Stamm wurde jedoch deutlich, dass *IalB* wohl doch für die Adhäsion an und auch für die Invasion von *B. bacilliformis* in humane Erythrozyten wichtig ist (Coleman and Minnick, 2001). Daten über die Bedeutung von *IalB* für das *in vivo*-Verhalten von *Bartonella* spezie gibt es bisher nicht.

#### 1.4.2.5 Weitere Hypothesen

Ein weiterer Mechanismus, der die intraerythrozytäre Lokalisation von Bartonellen erklären könnte, wäre die Infektion von erythroiden Vorläuferzellen. Diese Zellen, die vor allem im roten Knochenmark liegen, sind endozytotisch hoch aktiv. Sie könnten daher Bakterien über induzierte Phagozytose aufnehmen, um dann als ausgereifte Erythrozyten im peripheren Blut zu erscheinen.

Der Reifungsprozess der erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark, der Erythropoese genannt wird, dauert bis zur Entlassung in den Blutstrom fünf bis sieben Tage. Die zunächst im Blut erscheinenden Zellen sind die Retikulozyten, kernlose Zellen, die nur noch ein Rest RNA enthalten und innerhalb von einem Tag zu murenen Erythrozyten ausdifferenzieren.



**Abb. 4: Bisher bekannte oder vermutete Pathogenitätsfaktoren der Erythrozyteninvasion von *Bartonella* spezie**

Etwa 5 % der roten Blutzellen im peripheren Blut sind Retikulozyten. Physiologisch befinden sich auch noch andere, weniger differenzierte erythroide Vorläuferzellen in sehr geringer Zahl im Blut. Ihre Zahl wird auf unter 0,1 % geschätzt (Dörmer and Clemens, 1994).

Bisher ist über die Interaktion von *Bartonella* spezie mit erythropoetischen Vorläuferzellen nichts bekannt.

### 1.5 Ausgangspunkt und Ziel der Arbeit

Ausgangspunkt der Arbeit war die Beobachtung, dass *Bartonella* spezie zur Invasion von Erythrozyten fähig sind. In den meisten Fällen gelangen intrazellulär vorkommende Mikroorganismen durch induzierte Endozytose ins Zellinnere, also durch einen aktiven Prozess der Wirtszelle, wofür ein aktives Zytoskelett benötigt wird (Alberts et. al, 1995; Cossart et al, 1996; Dramsi and Cossart 1998, Finlay and Falkow, 1989). Dies haben Erythrozyten nicht. Auf welche Weise *Bartonella* spezie in diese Zellen invadieren ist bisher nicht bekannt. Ebenso wenig weiß man darüber Bescheid, welche Bedeutung diese für *Bartonella* spezie typische Pathogenitätsstrategie für die Besiedlung unterschiedlicher Wirtsorganismen hat. Wenige Instrumente zur Beantwortung dieser Fragen und der Frage nach anderen Pathogenitätsmechanismen standen bislang zur Verfügung.

Die Erythrozyteninvasion von *Bartonella* sollte von zwei Seiten her untersucht werden: (1) deskriptiv in einem Tiermodell, mit besondere Hinsicht auf die Interaktion mit erythroiden Vorläuferzellen und (2) auf genetischer Ebene, mit dem Ziel, für die Invasion notwendige Pathogenitätsfaktoren identifizieren zu können.

### **1.5.1 Etablierung eines Tiermodells der Erythrozyteninvasion**

Für die Erythrozyteninvasion wurden *in vitro*-Infektionsmodelle für *B. bacilliformis* (Mitchell and Minnick, 1995) und *B. henselae* (Mehock et al., 1998) beschrieben. Die Invasionsraten waren allerdings sehr gering. So schienen diese Systeme ungeeignet für die Analyse des Invasionsprozesses.

Als 1998 die Spezies *B. tribocorum* beschrieben wurde, schien diese gut geeignet zu sein, um das Verhalten von *Bartonella* spezies *in vivo* untersuchen zu können; *B. tribocorum* ist ein natürlicher, asymptomatisch persistierender Parasit im Blut von Wanderratten (*Rattus norvegicus*) und ist nach dem heutigen Kenntnisstand für den Menschen nicht pathogen. Heller et al. war es möglich gewesen, eine Bakteriämie in experimentell infizierten Ratten hervorzurufen (Heller et al., 1998).

Über den Verlauf der Infektion, speziell die Lokalisation der Bakterien *in vivo* und ihrer Interaktion mit Erythrozyten war bisher nichts bekannt. Ziel dieser Arbeit war daher die gründliche Untersuchung des natürlichen Infektionsverlaufes in diesem Modell. So sollten weitere Aufschlüsse über die ökologischen Besonderheiten von *Bartonella* erarbeitet werden. Insbesondere sollte dabei die Frage nach einer möglichen Interaktion von *Bartonella* spezies mit erythropoetischen Vorläuferzellen bearbeitet werden. Außerdem sollte es als Grundlage dienen, um generierte Defektmutanten phänotypisch analysieren zu können (siehe unten).

Dazu stand ein von R. Schüle (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Tübingen) genetisch veränderter Stamm von *B. tribocorum* 506<sup>T</sup> zur Verfügung, der GFP (green fluorescent protein) exprimiert (*B. tribocorum-gfp*). GFP ist ein Protein, welches ursprünglich aus einer Qualle (*Aequoria victoria*) isoliert wurde. Die in seiner dreidimensionalen Struktur veränderte Form *gfp<sub>mut3</sub>* kann in Prokaryonten exprimiert werden. Es führt bei Anregung mit einem Argonlaser (488 nm) zu einer Fluoreszenz-Emission mit einer Wellenlänge von ca. 500 - 530 nm, die im FITC-Kanal eines Durchflußzytometers bzw. eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops registriert werden kann. *gfp<sub>mut3</sub>* wurde erstmals 1998 von Dehio et al. in Bartonellen exprimiert (Dehio et al., 1998).

*B. tribocorum-gfp* zeigte eine konstitutive GFP-Expression (R. Schülein, persönliche Mitteilung), die es möglich machte, das Verhalten dieser Bakterien in der Ratte als möglichem Infektionsmodell mit Hilfe der Durchflußzytometrie und der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie sehr differenziert verfolgen zu können.

### 1.5.2 Generierung von Defektmutanten

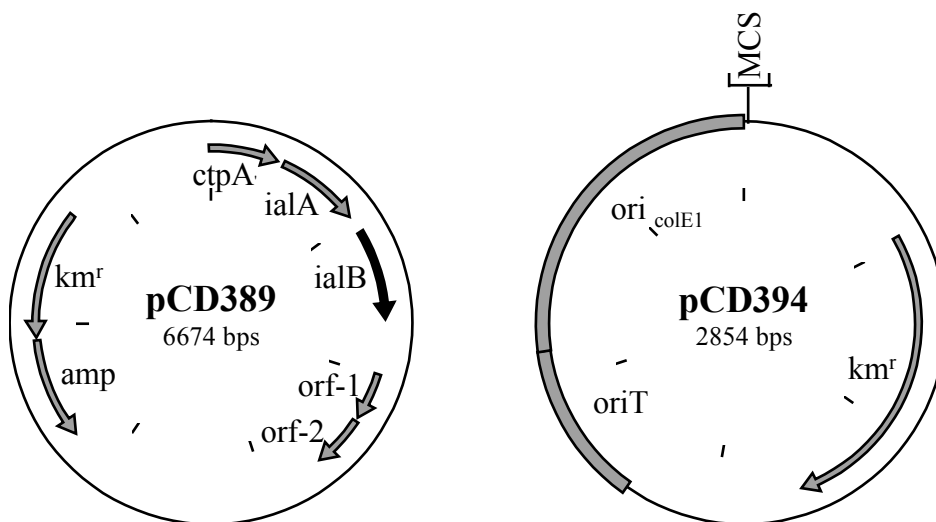
Mitchell und Minnick suchten erstmals nach Pathogenitätsfaktoren von *Bartonella* spezies auf genetischer Ebene (Mitchell and Minnick, 1995). Mit ihrem Versuch konnte eine bestimmte Region des Chromosoms von *B. bacilliformis* identifiziert werden, der *ialA/B*-Locus, der nicht invasionsfähigen *E. coli*-Stämmen die Fähigkeit zur Erythrozyteninvasion *in vitro* vermittelte (siehe 1.4.2.4). Es stellten sich nun die Frage, ob auch bei *B. tribocorum* diese Gene vorhanden sind, und ob *ialA* und *ialB* oder eines von ihnen eine funktionelle Rolle für die Erythrozyteninvasion von *B. tribocorum in vivo* spielt/spielen?

Um diese Fragen zu beantworten, sollte der *ialA/B*-Locus von *B. tribocorum* zunächst kloniert und sequenziert werden, um dann Defektmutanten herstellen zu können und diese auf ihre Invasionsfähigkeit in Erythrozyten zu untersuchen.

Für die Klonierung wurden von C. Dehio und C. Lanz (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Tübingen) aus der von Mitchell et al. (Mitchell and Minnick, 1995) veröffentlichten Sequenz des *ialA/B*-Locus von *B. bacilliformis* zwei Primer, prCHD101 und prCHD103, abgeleitet.

Durch Standard-PCR wurde mit diesen Primern aus chromosomaler DNA von *B. tribocorum* eine genetische Sequenz amplifiziert und in den pTOPOII-Vektor von Invitrogen kloniert, pCD389 (Abb. 5). Nach der Sequenzierung mittels Primer-Walking konnten die offenen Leseraster von *ialA*, *ialB* und zwei weiteren, *orf1* und *orf2* genannten Genen identifiziert werden.

Zur Generierung von Defektmutanten sollte in dieser Arbeit ein System entwickelt werden, welches eine lokusspezifische Mutagenese erlaubt. Zu Beginn der Arbeit gab es nur ein einziges System zur genetischen Manipulation von *Bartonella* spezies, welches die Generierung von Zufallsmutanten durch Transposon-Mutagenese ermöglicht (Dehio and Meyer, 1997). Durch inkomplette Duplikation einzelner Gene sollte nun eine Möglichkeit zur gezielten Mutagenese geschaffen und angewendet werden.



**Abb. 5: (A) Sequenzierungsvektor pCD389 mit dem *ialA/B*-Locus von *B. tribocorum***  
Upstream des *ialB*-Gens liegt *ialA* und *ctpA*, ein Gen für eine c-terminal prozessierende Protease (Mitchell and Minnick, 1997a).

**(B) Minimal-Plasmid pCD 394**

Das Plasmid trägt einen Origin of Transfer (*oriT*) und ein Gen für Kanamycinresistenz (*Km<sup>r</sup>*). Der Startpunkt für die Replikation des Plasmids während der Zellteilung, *oriV* (vegetativer Origin) ist der *ori<sub>colE1</sub>*, ein in *Bartonella* nicht replizierender Origin. Daher wird das Plasmid bei der Zellteilung von *B. tribocorum* nicht weitergegeben.

Als Ausgangspunkt für diese single-cross-over Mutagenese (weiteres zum Mutagenesesystem 3.2.2) diente ein Minimalvektor, pMin1 (Kahrs et al., 1995), welcher mit einem in *B. henselae* bereits erprobten Kanamycin-Resistenzmarker (*km<sup>r</sup>*) (Dehio and Meyer, 1997) versehen, das Minimal-Plasmid pCD394 (Abb. 5) ergab.

Die Komplementation der Defektmutanten sollte mit einem von Dehio et al. in *Bartonella* spezie eingesetzten Vektor pPR39 erfolgen (Dehio and Meyer, 1997).

**1.5.3 Zusammenfassung**

Die Etablierung eines *in vivo*-Infektionsmodells und die genaue Beschreibung des Infektionsverlaufs und der Interaktion von *Bartonella* mit dem erythroiden System des Wirts sollte die Möglichkeit bieten, Aufschluß über einen möglichen Mechanismus der intraerythrozytären Kolonisation von *Bartonella* zu gewinnen.

Die Kombination dieses Infektionsmodells zusammen mit der Möglichkeit der genetischen Manipulation spezieller Loci im Genom von *Bartonella* sollte optimale Voraussetzungen für die Aufklärung von Pathogenitätsfaktoren schaffen. In dieser Arbeit sollte die Etablierung dieser Systeme an der Untersuchung des *ialB*-Locus erfolgen.

## **2 Material**

### **2.1.1 Allgemeine Materialien**

#### **2.1.2 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien**

FACS (Becton Dickinson), Brutschränke (Bühler, Keräus, Heinicke, Memmert), Einmalspritzen und Kanülen (Becton Dickinson und Braun Melsungen), Gelapparaturen für SDS-PAGE (Biorad), Glaswaren (Schott), Küvetten (Sarstedt), Magnetrührer (Heidolph),

mikroskopische Deckgläschen (rund, Ø 12 mm und 30 mm) (Multimed), Nitrozellulosefilter (Millipore), Parafilm (American National Can), Pasteurpipetten (Brand, Hirschmann), pH-Meter (Radiometer Kopenhagen), Photometer (Beckmann), Plastikwaren für die Zellkultur (Costar, Nunc, Greiner), Plastikwaren allgemein (Eppendorf, Greiner, Falcon, Nunc, Sarstedt), PVDF-Membran (Millipore), Schüttelinkubatoren (New Brunswick Scientific), Schüttler (Bühler), Spannungsgeräte (Bachofer, LKB, Fischer und Delta Elektronik), Sterilbank (Gelaire, Heraeus), Sterilpumpe (Millipore), Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus), UV-Lampen (Benda), Ultraschallgerät (Branson), Vortex (Janke und Kunkel), Waagen (Wauter, Mettler, Sartorius), Wasserbäder (Köttermann, GFL, Julabo Labortechnik und Bachhofer), Zentrifugen und Zubehör (Eppendorf, Heraeus, Hermle, Sorvall, Beckmann)

#### **2.1.3 Chemikalien und Kits**

Acrylamid (Roth), Agar-Agar (Difco), Agarose (SeaKem), Antibiotika (Sigma), Columbia Agar (Difco Laboratories), DMEM (Gibco/BRL), FCS (Boehringer), Gene Clean Kit (Bio 101), IPTG (Roth),  $\beta$ -Mercaptoethanol (Serva), Natriumdodecylsulfat (SDS) (Roth), Paraformaldehyd (Merck), Proteinmarker (BioRad), Rinderserumalbumin (BSA) (Miles Laboratories), TEMED (Serva), Tris-Base (Roth), Triton X-100 (Merck), Tween 20 (Serva), Glucose (Riedel).

Alle anderen Chemikalien wurden entweder von Merck, Serva, Sigma, Fluka oder Roth bezogen.



## 2.2 Material für das Arbeiten mit DNA

### 2.2.1 Plasmide

Name	Eigenschaften	Quelle
pPR39	Gm <sup>r</sup> Tra <sup>-</sup> mob <sup>+</sup> oriRSF1010 (IncQ)	(Ratet et al., 1988)
pMin1	ori <sub>colE1</sub> Tc <sup>r</sup> ori <sub>TRP4</sub> ter <sub>fd</sub> ter <sub>trpA</sub>	(Kahrs et al., 1995)
pSUP2021	Cm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> , Tn5 mit Km <sup>r</sup> , Tra <sup>-</sup> mob <sup>+</sup> oriColE1	(Simon et al., 1983)
pTOPOII	Km <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup> oriColE1 lacZ $\alpha$ flori Plac	Invitrogen
pRK2013	Km <sup>r</sup> trpED oriColE1	(Figurski and Helinski, 1979)
pRK600	Cm <sup>r</sup> trpED oriColE1	(Figurski and Helinski, 1979)
pLAFRkm2	pLAFR5 ergänzt durch Km <sup>r</sup> aus pSUP2021, kloniert durch Dr. C. Lanz	(Keen et al., 1988)

### 2.2.2 Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'–3'	Eigenschaften
prCHD101	CGG AAT TCA AAT GGG CTA AAA TTG AAG GTT GG	bindet im <i>ctpA</i> Gen von <i>Bartonella</i> (Mitchell and Minnick, 1995)
prCHD103	CGG AAT TCA GGA ACG CAA TCT TTT GGT AAG GG	bindet downstream von <i>ialB</i> im <i>ppa</i> -Lokus von <i>Bartonella</i> (Mitchell and Minnick, 1995)
prCHD154	GTC GAC TAC GAT CTA GAG AAT CC	Sequenzierung der <i>SmaI</i> - Schnittstelle in pCD394
prCHD155	AAT TAG ATC ATT AAA GGC TCC T	Sequenzierung der <i>SmaI</i> - Schnittstelle in pCD394

### 2.2.3 Enzyme

T4-DNA-Ligase, Lysozym und Proteinase K (Boehringer), Klenow-Polymerase (Pharmacia), Pfu-Polymerase und Taq Extender (Stratagene), Taq-Polymerase

(Appligene und GibcoBRL), Restriktionsenzyme (Appligene, Biolabs, Boehringer, GibcoBRL, Pharmacia und USB).

#### 2.2.4 Allgemeine Lösungen

50 x TAE-Puffer	242 g/l Tris-Base, 57,1 ml/l Eisessig, 50 mM EDTA
GEBS-Puffer	20 % Glycerin, 50 mM EDTA, 0,05 % Bromphenolblau, 0,5 % Sarkosyl
Methylenblau	0,1 % (w/v) Methylenblau in H <sub>2</sub> O
Ethidiumbromidfärbelösung	1 mg/ml Ethidiumbromid in Wasser
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	gemischt im Verhältnis 25:24:1
Chloroform/Isoamylalkohol	gemischt im Verhältnis 24:1
Natrium-Acetat	3 M Natrium-Acetat pH 5,2

#### 2.2.5 Puffer für Restriktionsenzyme

10 x A-Puffer (Boehringer)	330 mM Tris/Acetat, 100 mM Mg-Acetat, 660 mM K-Acetat, 5 mM DTT, pH 7,9
10 x B-Puffer (Boehringer)	100 mM Tris/HCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 M NaCl, 10 mM Mercaptoethanol, pH 8,0
10 x L-Puffer (Boehringer)	100 mM Tris/HCl, 100 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM DTE, pH 7,5
10 x H-Puffer (Boehringer)	500 mM Tris/HCl, 100 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 M NaCl, 10 mM DTE, pH 7,5
10 x M-Puffer (Boehringer)	100 mM Tris/HCl, 100 mM MgCl <sub>2</sub> , 500 mM NaCl, 10 mM DTE, pH 7,5

#### 2.2.6 Puffer für andere Enzyme

10 x Ligase-Puffer	660 mM Tris, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7,5
10 x CIP	100 mM Tris/HCl, 10 mM ZnCl <sub>2</sub> , 10 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8,3

10 x Taq (Appligene)	0,1 M Tris-HCl, 0,5 M KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 1% Triton x 100, 2 mg/ml BSA, pH 9,0
----------------------	---

### 2.2.7 Lösungen für die Isolierung von Plasmid-DNA

P1-Puffer	50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0, 4 °C
P2-Puffer	200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS, RT
P3-Puffer	3 M Kaliumacetat, pH 4,8, 4 °C
QBT-Puffer	50 mM MOPS-NaOH pH 7,0, 750 mM NaCl, 15 % (v/v) Ethanol, 0,15 % Triton X-100, RT
QC-Puffer	50 mM MOPS-NaOH pH 7,0, 1 M NaCl, 15 % (v/v) Ethanol, RT
QF-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8,5, 1,25 M NaCl, 15 % (v/v) Ethanol, RT
RNAse A	10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl, 15 min bei 100 °C, abkühlen auf RT, bei -20 °C lagern

### 2.2.8 Lösungen für die Isolierung genomischer DNA

Lysepuffer	2 % SDS/0,1 M EDTA
Natriumacetat-Stammlösung	3 M NaOAc pH 5,5
1 x TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA
CsCl-Stammlösung	41 g CsCl-Salz in 45 ml Wasser
CsCl-gesättigtes Isopropanol	CsCl-Salz in Isopropanol mehrfach resuspendieren und als Bodensatz belassen
Lysozym	Stammlösung: 10 mg/ml (pro Ansatz 400 µl der frisch angesetzten Stammlösung)
Proteinase K	Stammlösung: 10 mg/ml (pro Ansatz 50 µl der frisch angesetzten Stammlösung)

## 2.3 Material für das Arbeiten mit Proteinen

### 2.3.1 Sarcosyl-Präparation der äußeren Membran von *Bartonella*

Lysozym-Lsg	Lysozym (Merck) in H <sub>2</sub> O [2 mg/ml]
Sucrose-Lösung	5 ml TRIS/HCl pH 7,8 mit 1,28 g Saccharose (Roth) [0,75 mM]
Proteinaseinhibitor-Lösung	1 Tablette Complete™ Proteinase Inhibitor cocktail tablets, Mini (Boehringer Mannheim) in 1,5 ml H <sub>2</sub> O lösen [x7]
EDTA-Lösung	30 ml TRIS/HCl pH 8,0 mit 0,017 g EDTA (Riedel-de Haen) [1,5 mM] versetzen
HEPES-Lösung	HEPES (Merck) [10 mM] pH 7,4
Sarcosyl-Lösung	2 % Sarcosyl in HEPES [10 mM] pH 7,4

### 2.3.2 SDS-PAGE

2 x Probenpuffer	20 % (v/v) Glycerin, 3 % (w/v) SDS, 3 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
Acrylamidlösung	Stammlösung von Roth (30 %-ige Acrylamidlösung mit 0,8 % Bisacrylamid)
Sammelgel-Puffer	125 mM Tris-HCl, 0,1 % SDS, pH 6,8
Trenngel-Puffer	375 mM Tris-HCl, 0,1 % SDS, pH 8,8
APS	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
TEMED	0,1 % N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Laufpuffer (5 x)	25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % (g/v) SDS, pH 8,3
Coomassie-Blue	50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig, 0,1 % Coomassie Brilliant Blue R250
Entfärbelösung für Coomassie	10 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Ethanol, 7,5 % (v/v) Essigsäure

### 2.3.3 Lösungen für Silberfärbung

Fixierer	50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure, 0,5 ml/l 37 % Formaldehyd
Waschpuffer	50 % (v/v) Ethanol
Natriumthiosulfat-Lösung	0,13 g/l Natriumthiosulfat
Silbernitrat-Lösung	2 g/l AgNO <sub>3</sub> , 0,75 ml/l 37 % Formaldehyd
Entwickler-Lösung	60 g/l Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0,25 mg/l Natriumthiosulfat, 0,5 ml/l 37% Formaldehyd
Stop-Lösung	50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure

## 2.4 Material für das Arbeiten mit Bakterien

### 2.4.1 *Escherichia coli*-Stämme

Bakterienstamm	Genotyp oder wichtige Eigenschaften	Quelle
B2150	<i>thrB1004 pro thi strA hsdS lacZΔM15</i> (F' <i>lacZΔM15 lacIq traD36 proA<sup>+</sup> proB<sup>+</sup></i> ) <i>ΔdapA::em</i> (Em <sup>r</sup> ) <i>pir</i>	(Dehio and Meyer, 1997)
B1255	<i>thrB1004 pro thi strA hsdS lacZΔM15</i> (F' <i>lacZΔM15 lacIq traD36 proA<sup>+</sup> proB<sup>+</sup></i> ) <i>ΔdapA::erm</i> (Erm <sup>r</sup> ) <i>pir::RP4</i> [:: <sup>km</sup> (Km <sup>r</sup> ) von SM10]	(Dehio and Meyer, 1997)
DH5α	F <sup>-</sup> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>k</sub><sup>-</sup></i> , <i>m<sub>k</sub><sup>-</sup></i> ), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>Δ(argF-lacZYA)U169</i> , <i>phi80d</i> , <i>lacZΔM15</i> ,	Gibco BRL
SURE	<i>gyrA96 relA1 lac recB rcJ sbcC umuC::Tn5(km<sup>r</sup>)ivrC</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZDM15 Tn10</i> (tr <sup>r</sup> )]	Stratagene
Novablue	<i>endA1 hsdR17</i> ( <i>r<sub>k12</sub><sup>-</sup></i> <i>m<sub>k12</sub><sup>+</sup></i> ) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA9 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZDM15::Tn10</i> (tr <sup>r</sup> )] DE3	Novagen

### 2.4.2 *Bartonella*-Stämme

Bakterienstamm	Genotyp oder wichtige Eigenschaften	Quelle
<i>B. tribocorum</i> 506 <sup>T</sup>		Heller et al.(1998)
<i>B. tribocorum-gfp</i> , Clone 2	<i>gfp</i>	(Schülein et al., 2001)

### 2.4.3 Antibiotika und Zusätze

Ampicillin (Ap)	50 bzw. 100 µg/ml in LB-Medium bzw. -Agar
Kanamycin (Km)	50 bzw. 100 µg/ml in LB-Medium bzw. -Agar und CBA
Gentamicin (Gm)	10 µg/ml in LB-Medium bzw. -Agar und CBA
X-Gal	32 µg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-b-D-Galaktopyranosid
IPTG	1 mM Isopropyl-b-D-Thiogalaktopyranosid

### 2.4.4 Lösungen für die Herstellung kompetenter Zellen

Waschlösung I	MilliQ-Wasser
Waschlösung II	MilliQ-Wasser mit 5 % Glycerin
Elektroporations-Lösung	Aqua bidest. mit 10 % Glycerin

### 2.4.5 Medien für die Bakterienkultur

Columbia-Schafblut-Agar	44 g Columbia Blood Agar Base (Difco) ad 1 l Aqua bidest.; nach dem Autoklavieren abkühlen auf 55°C und dann Zugabe von 5 % (v/v) sterilem defibriniertem Schafblut (Difco)
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l Aqua bidest.
LB-Platten	wie LB-Medium, 2 g/l Difco-Agar

Einfrriermedium	PPM-Medium (15 g Proteose-Pepton (Gibco), 5 g NaCl, 0,5 g Stärke, 4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 g K <sub>2</sub> PHO <sub>4</sub> , ad 1 l mit Aqua bidest., pH 7,5; vor dem animpfen mit Bakterien 1 % Vitaminmix und 0,5 % NaHCO <sub>3</sub> (8,4 %) zugeben) mit 20 % Glycerol
-----------------	--

## 2.5 Material für das Arbeiten mit Tieren

### 2.5.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 6 Wochen alte, weibliche Wistar-Ratten, die von der Firma Harlan und Winkelmann, Borchen bezogen wurden.

### 2.5.2 Blutentnahmen

Cirtatlösung (x10)	37 g Natriumcitrat in 100 ml PBS einwiegen und steril filtrieren
Spritzen	2 ml (Becton Dickinson)
Kanülen	21-27 G (Becton Dickinson, Terumo)

## 2.6 Material für das Arbeiten mit Zellen

### 2.6.1 Allgemeine Lösungen

10 x PBS	80 g NaCl, 2 g KCl, 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 14,42 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2 H <sub>2</sub> O, mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen, pH 7,2 - 7,4
Paraformaldehyd (PFA)	3,7 % Paraformaldehyd in 200 mM Hapes, pH 7,4
Moviol	6 g Glycerin, 2,4 g Moviol, 6 ml Aqua dest., bei RT lösen, Zugabe von 12 ml 0,2 M Tris, pH 8, 10 min 50 °C, 15 min bei 4.000 rpm zentrifugieren, 4 °C

### 2.6.2 Antikörper

Antikörper/Spec	Typ	Name	Herkunft	Konjugation	Hersteller	Konz.
-----------------	-----	------	----------	-------------	------------	-------

Glycophorin A			Kaninchen	unkonjugiert	Díez et al.	1:50
CD 71 (Transferrin- Rezeptor)	IgG2a	OX-26	Maus	PE	PahrMingen	1:1600



## 3 Methoden

### 3.1 Arbeiten mit DNA

#### 3.1.1 Isolation genomischer DNA

##### 3.1.1.1 CsCl-Extraktion chromosomaler DNA von *Bartonella spezie*s

Hierzu wurden 3 Platten einer 2-7 d alten Kultur der jeweiligen *Bartonella spezie*s mit einem sterilen Wattetupfer in PBS aufgenommen, pelletiert und in 500 µl Puffer I resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 400 µl 10 mg/ml Lysozym-Lösung, vortexen, 15 min inkubieren bei 37 °C, Zugabe von 50 µl einer 10 mg/ml Proteinase K-Lösung, erneutes vortexen, Zugabe von 500 µl 2 % SDS/0.1M EDTA-Lösung. Nach vorsichtigem Vermischen wurde die Lyse-Lösung für 1 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die visköse Masse bewegte sich nur träge und klarte nach und nach vollständig auf. Dies bewirkte das Aufbrechen der äußeren Membran, und die sich bildenden Sphäroblasten lysierten unter Einfluß des SDS.

Das Zellysat wird mit TE auf 1,8 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und durch vorsichtiges Invertieren vollständig gemischt. Es folgte die Zugabe von 1,845 g CsCl, welches unter Wärme und Schwenken gelöst wurde. Die DNA-Lösung wurde in 3 ml „Quick-Seal“-Zentrifugenröhrchen überführt, mit 50 µl einer 10 mg/ml EtBr-Lösung überschichtet, vorsichtig gemischt und für 5 h bei 20 °C oder 4 °C über Nacht im Vti56 Rotor bei 100.000 rpm zentrifugiert.

Unter UV-Licht konnte die chromosomale DNA-Bande aus dem CsCl-Gradienten mit einer weitlumigen Kanüle abgezogen werden, in ein neues Röhrchen überführt werden und erneut mit CsCl-Stammlösung versetzt für weitere 4 h zentrifugiert werden. Die danach abgezogene DNA-Bande wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt und durch Ausschwenken (wiederholtes Abziehen und Verwerfen der oberen, organischen Phase) mit CsCl-gesättigtem Isopropanol von EtBr befreit.

Die gewonnene DNA wurde mit Isopropanol gefällt; dazu wurde die DNA-Lösung mit Aqua bidest. verdünnt, es wurde das 0,7-fache Volumen Isopropanol hinzugefügt und bis zum Ausfallen eines aus Fäden bestehenden Klumpens vorsichtig gemischt. Die DNA wurde in 70 % EtOH gewaschen und über Nacht in TE gelöst.

### **3.1.2 Plasmidpräparationen**

#### **3.1.2.1 Midipräparation von Plasmid-DNA mit Qiagen-tip 100**

100 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika wurden mit 5 ml einer Über-Nacht-Kultur von *E. coli* angeimpft und bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,8 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden in einem SS34-Rotor bei 6000 rpm in einer Sorvall-Zentrifuge pelletiert und in 5 ml P1 mit 100 µg/ml RNase resuspendiert. Durch Zugabe von 10 ml P2 und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen lysiert und durch Zugabe von 10 ml eisgekühltem P3 wurden Proteine und chromosomale DNA gefällt. Es folgte die sofortige Zentrifugation in einem SS34 Rotor bei 13000 rpm bei 4 °C für 30 min. Der plasmidhaltige Überstand wurde auf eine mit 5 ml QBT zuvor äquilibrierte Quiagen-tip 100 Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 10 ml QC gewaschen und die DNA mit 5 ml QF eluiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol. Die DNA wurde nochmals im SS34 unter o.g. Bedingungen abzentrifugiert.

Der Überstand der Lösung nach Zentrifugation wurde verworfen, das Pellet wurde in 400 µl Bidest aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Hier erfolgte eine erneute Fällung mit 40 µl Natriumacetat, pH 4,8 und 880 µl absolutem Ethanol. Die DNA wurde für 5 min bei 13000 rpm in einer Heraeus-Tischzentrifuge pelletiert, einmal mit 500 µl Ethanol 70 % gewaschen, erneut pelletiert und in 50 bis 100 µl Bidest aufgenommen.

### **3.1.3 DNA-Modifikationen**

#### **3.1.3.1 Restriktionen**

Die Restriktionen von DNA wurden in einem Volumen von 25 µl durchgeführt. Puffer- und Reaktionsbedingungen für Restriktionsendonukleasen richteten sich nach den Angaben der jeweiligen Lieferfirmen. Für analytische Reaktionen wurden 200 ng DNA eingesetzt, für Restriktionen mit anschließender Fragmentisolierung wurden 1 µg DNA verwendet. Das Enzym/DNA Verhältnis betrug zwischen 1-5 U/µg DNA. Die Inkubationszeit dauerte zwischen 2-24 h. Für Restriktionen mit zwei oder mehreren Enzymen wurde nach Möglichkeit immer zuerst mit solchen Endonukleasen geschnitten, die bei niedrigen Salzkonzentrationen arbeiten. Für das Nachschneiden mit Enzymen die Hochsalzbedingungen erforderten, wurde das zusätzlich benötigte Salz (NaCl, KCl) in Form von 1 M Lösungen dem Restriktionsansatz hinzugefügt. Die Restriktionsendonukleasen wurden entweder durch Erhitzen für 10 min auf 68 °C

inaktiviert, wenn mit der geschnittenen DNA weitere Reaktionen durchgeführt werden sollten, bei sofortiger Gelelektrophorese wurde die Reaktion durch Zugabe von GEBS gestoppt.

#### 3.1.3.2 Klenow-fill in und Klenow-exo

Nach der Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen war es teilweise notwendig, glatte Fragmentenden zu erzeugen. Hierzu wurde die 5'-3' Polymeraseaktivität bzw. die 3'5' Exonukleaseaktivität des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I von *E. coli* benutzt. Die Reaktionsansätze enthielten bis zu 1 µg DNA in verschiedenen Restriktionspuffern in einem Volumen von 25 µl.

Für die Reaktion wurde 1 U Klenow-Polymerase eingesetzt. Zum Auffüllen von 5'-Überhängen wurden 1,25 µM Desoxyribonukleotide zugesetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Entfernen von 3'-Überhängen wurde der Ansatz nach Zugabe von Klenow-Fragment zunächst für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach wurde noch einmal für 15 min mit Desoxyribonukleotiden inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen der Lösung auf 68 °C für eine 10 min abgestoppt.

#### 3.1.3.3 Dephosphorylierung linearer DNA

Um die Selbstligation von passenden sticky-end-Fragmenten oder blunt-end-Fragmenten zu verhindern, was die Effizienz einer angestrebten Ligationsreaktion beeinträchtigen würde, wurden die 5'-Enden einiger DNA-Fragmente (meist den geschnittenen Vektoren) durch CIP (calf-intestine-phosphatase) dephosphoryliert. Hierzu wurde nach der Restriktion 1 µl [1U/µl] CIP zugefügt und für 15 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde bei 68 °C für 15 min abgestoppt.

#### 3.1.3.4 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Volumen von 20 µl bei 14 °C für 16-48 h. Der Ligationsansatz enthielt 2 µl 10x Ligase-Puffer, 2 µl T4-Ligase, Fragment-DNA und Vektor-DNA in einem geschätzten Verhältnis von 5:1. Die Ligationsreaktion wurde durch Erhitzen auf 65°C für 10 min abgestoppt.

### 3.1.4 Gelelektrophoresen von DNA

#### 3.1.4.1 Analytische Gelelektrophorese

Zur analytischen Gelelektrophorese wurden je nach Größenzusammensetzung der erwarteten DNA-Fragmente 0,8 % bis 1,4 % (w/v) Agaroseflachgele mit der Größe 15x10 cm und einem Volumen von 50 ml (bei Gelelektrophoresen von 100 µl Proben

auch 100 ml) verwendet. Dazu wurde die Agarose in TAE-Puffer eingewogen und in einem Erlenmeyerkolben in einer Mikrowelle bis zum vollständigen Lösen erhitzt; eventuell verdunstetes Volumen wurde durch eine Markierung ermittelt und sofort durch Bidest ersetzt. Die Lösung wurde nach Abkühlung auf ca. 45 °C in eine abgedichtete und mit einem Kamm bestückte Apparatur gegossen. Nach dem Erstarren (zum Teil bei 4 °C) wurden die Gele in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit TAE-Puffer knapp überschichtet. Die Elektrophoresen erfolgten bei 70-110 V für 30-90 min. Das Gel wurde für 10 min in Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) gelegt, danach kurz mit Aqua dest. gewaschen, um die aufgetrennte DNA anschließend im UV-Durchlicht sichtbar zu machen.

#### **3.1.4.2 Präparative Gelelektrophorese**

Für die präparative Gelelektrophorese von DNA wurden die oben beschriebenen Agarose-Flachgele verwendet. Die Gele wurden nach der Elektrophorese mit 1 % Methylenblau-Lösung für 3 min gefärbt und dann mit Bidest für ca. 15 min unter mehrmaligem Schwenken vorsichtig entfärbt. (Als Kontrolle diente oft ein parallel dazu laufendes analytisches Gel). Die zu präparierenden Banden wurden mit einer Klinge aus dem Gel geschnitten und nach der beschriebenen Methode aufgereinigt.

### **3.1.5 DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen**

#### **3.1.5.1 GeneClean (BIO 101)**

Für alle Aufreinigungen von DNA wurde GeneClean (BIO 101) eingesetzt. Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus einem präparativen Gel ausgeschnitten, gewogen und mit dem dreifachen Volumen NaJ versehen. Die Agarose wurde zunächst bei 50 °C vollständig aufgelöst, dann kurz auf Eis abgekühlt, bevor Glasmilch im Verhältnis 1 µl/µg DNA zugegeben (mindestens aber 5 µl) und sorgfältig mit der DNA-Agarose-Lösung vermischt wurde. Die DNA adsorbierte an der Glasmilch während einer fünfminütigen Inkubation auf Eis. Anschließend wurde für 30 s in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 13000 rpm pelletiert und der Überstand abgeschüttet. Das Glasmilchpellet wurde drei Mal in „New Wash“ resuspendiert, um Agarose-Reste zu entfernen. Danach wurde das Pellet in 10 µl Bidest aufgenommen, und die DNA wurde für 5 min bei 55 °C eluiert. Nach 30 s Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der DNA-haltige Überstand abgenommen. Der Elutionsschritt wurde ein zweites Mal mit 5 µl Bidest wiederholt.

2 µl der 15 µl DNA-Elution wurden zur Konzentrations- und Reinheitskontrolle auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen. Danach wurde die DNA zur Weiterarbeit verwendet oder bei -20 °C gelagert.

### **3.1.6 PCR - Verfahren**

#### **3.1.6.1 Standard -PCR**

Für einen Ansatz von 50 µl wurden die entsprechende Puffermenge, je 5 µl einer 10 pM Primer-Lösung mit 1 µl einer 1,25 mM dNTP-Lösung (Desoxyribunucleinsäure-triphosphate) zu 33 µl Bidest gegeben. Es wurde gereinigte DNA (Standard) oder die DNA aus Bakterienlysaten (Kolonie-PCR) in 1 µl Volumen zugefügt und 2,5 U Taq-Polymerase hinzugegeben.

Soweit nicht anders angegeben, wurde zur Amplifikation von DNA-Abschnitten das folgende Programm benutzt: initial wurde bei 95 °C für 1 min denaturiert, es folgten 25 Zyklen mit 10 s Denaturieren bei 95°C, 10 s Anlagern bei 50°C und 1 min Verlängern bei 72°C. Die finale Elongation dauerte 2 min bei 72°C.

#### **3.1.6.2 Kolonie-PCR**

Um Amplifikationen direkt von der DNA aus Bakterien möglich zu machen, wurden Bakterien von der Platte mit einer 200 µl Pipettierspitze (gelb) abgepickt, das Material wurde in 100 µl Bidest gelöst und 10 min gekocht. Das Lysat wurde für eine Standard-PCR oder eine Long-PCR eingesetzt. Hierbei wurde immer der Appligene-Inkubationspuffer verwendet.

#### **3.1.6.3 Long-PCR**

Um Fragmente von einer Größe über 4.0 kb amplifizieren zu können, wurde dem Standardansatz 2,5 U Taq-Extender-Additiv (Stratagene) zugefügt. Die initiale Denaturierung wurde auf 3 min verlängert, die Elongationszeit im Zyklus betrug hier 5 min, die finale Elongation 10 min.

### **3.1.7 Sequenzierarbeiten**

Die Sequenzierarbeiten wurden alle von I. Wagner von der Service-Gruppe des Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin geleistet.

## 3.2 Arbeiten mit Proteinen

### 3.2.1 Sarcosyl-Präparation der äußeren Membranproteine von *B. tribocorum*

Bartonellen von 20 Platten werden nach 3 d Inkubation in ca. 15 ml PBS aufgenommen und in einer Hermle Zentrifuge mit ZK 380 swing out Rotor bei 4000 rpm [ca. 4000 g] für 5 min pelletiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 1,5 ml PBS und 50 µg/ml Gentamycin aufgenommen und für 2 h inkubiert. Nach zwei Mal Waschen in PBS wird das Pellet in 5 ml Saccharose-Lösung in einem 50 ml Falcon-Tube aufgenommen, auf Eis werden 1,5 ml Proteinaseinhibitor-Lösung und 350 µl Lysozym-Lösung hinzugegeben. Danach erfolgt unter Schwenken die Zugabe von 10 ml ESTA-Lösung über den Zeitraum von 8 min. Es folgt eine Ultraschall-Aufschließung der Zellen über 20 Zyklen mit 15 Stößen (=25 s) und 15 s Pause. Die Zelltrümmer und intakten Zellen werden mit der Hermle-Zentrifuge und o.g. Rotor bei 4000 rpm in 30 min bei 0 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein Ultrazentrifuge-Röhrchen (UZ-Röhrchen) gegeben und auf  $1/100$  austariert. Es erfolgt die Zentrifugation in einer Beckman L7-Ultrazentrifuge mit Ti60-Rotor bei 30000 rpm und 4 °C über 2 h. Der Überstand wird verworfen und das Gesamtmembran-Pellet mit einer 1 ml Spritze und 0,8 mm Nadel in 5 ml HEPES-Lösung gelöst. Es erfolgt die Zugabe von 5 ml Sarcosyl-Lösung und ein erneuter UZ-Schritt. Der Überstand wird abgekippt, das Äußere Membran-Pellet wird in gleicher Weise in 1 ml HEPES-Lösung in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml) gelöst. Zur Lagerung wird die Lösung in einer Heraeus Biofuge 13 bei 13000 rpm [14000 g] pelletiert und bei -70 °C eingefroren.

### 3.2.2 SDS-PAGE

#### 3.2.2.1 Herstellen von Polyacrylamidgelen

Lösungen	Sammelgel	Trenngel (15 %)
H <sub>2</sub> O [ml]	1,63	2
Upper buffer [ml]	0,63	2
Lower buffer [ml]	-	-
30 % Acrylamidlösung [ml]	0,38	4
TEMED [µl]	10	10
APS [µl]	17,5	40

Die Angaben gelten für 2 Gele für das Mini-Protein-II-Gelkammer-System von BioRad

Zunächst wurden die zum System gehörenden Glasplatten mit Seife von Gelresten befreit und dann mit 70 % EtOH entfettet. Nach dem Einbau der Glasplatten mit Spacern in den Gießständer wurden zunächst die Lösungen für die Trenngele in o. g. Reihenfolge in einem 5 ml Becherglas zusammengebracht, sofort zwischen die Glasplatten gegossen und mit Isopropanol ca. 0,5 cm überschichtet. Nach der Polymerisation (ca. 15 min) wurde das Isopropanol durch Spülen mit H<sub>2</sub>O entfernt.

Nun wurden die Sammelgele angesetzt und sofort ca. 1,5 cm hoch über die Trenngele gegossen. Zum Aussparen der Probestaschen wurde ein Kamm, mit genügendem Abstand zum Trenngel, in das Sammelgel eingesteckt. Nach der Polymerisation der Sammelgele wurde das gesamte System aus dem Gießständer entfernt und in die mit Elektrophorese-Puffer gefüllte Elektrophoresewanne gehängt. Erst hier wurden die Kämmen entfernt.

#### 3.2.2.2 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die aufzutrennenden Proben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen, für 10 min im Wasserbad bei 100 °C in einem mit einem Loch im Deckel versehenen Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml) erhitzt und kurz abzentrifugiert. Die Proben wurden sodann auf das Gel aufgebracht. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V, 40 mA proGel, bis die blaue Bande das Gel gerade verlassen hatte.

#### 3.2.2.3 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Die SDS-PAGE Gele wurden nach der Elektrophorese im Coomassie Färbebad 5-30 min gefärbt, dann kurz mit Wasser gewaschen und unter mehrmaligem Wechseln der Entfärbelösung entfärbt (1 h bis über Nacht).

#### 3.2.2.4 Silberfärbung von SDS-Gelen

Die Polyacrylamidgele wurden für 10 min fixiert, drei Mal für die Dauer von 10 min mit 50 % Ethanol gewaschen, bevor sie 100 s mit Natriumthiosulfat (1,3 g/l) inkubiert wurden. Es folgten 3 kurze Waschschrte mit Wasser, bevor die Gele in Silbernitratlösung (2 g/l) 20 min imprägniert wurden. Nach zwei kurzen Waschschrten wurden die Proteinbanden im Entwickler sichtbar gemacht (1-15 min) und die Reaktion abgestoppt.

## 3.3 Arbeiten mit Bakterien

### 3.3.1 Kultur von Bakterien

#### 3.3.1.1 Kultur von *E. coli*

*Escherichia coli* wurden auf LB-Platten, ggf. die zur Selektion notwendigen Antibiotika enthaltend, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die Über-Nacht-Kultur wurden Bakterien von der Platte mit einer Impföse in ein entsprechendes Volumen LB-Medium, ggf. mit Antibiotika, überimpft oder aus dem Glycerolstock entnommen und bei 37 °C mit 200-250 rpm geschüttelt.

#### 3.3.1.2 Kultur von Bartonellen

Die verschiedenen Spezies der Gattung *Bartonella* wurden auf CSB-Platten bzw. auf Schokoladenagar bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>, *B. bacilliformis* bei 30 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 3.3.2 Transformation

#### 3.3.2.1 Herstellung elektrokompenter Bakterien:

Es wurde eine Flüssigkultur mit *E. coli* aus dem Stock angeimpft und über Nacht in o.g. Weise kultiviert. Von dieser Kultur wurden 4 ml in 400 ml neues Medium übertragen und auf eine OD<sub>550</sub>=0,15 (frühe log-Phase) angezogen. Die Kultur wurde dann sofort für 30 min auf Eis gestellt und ab sofort nur noch gekühlt bearbeitet. Die Bakterien wurden dann für 15 min bei 4 °C mit 3000 x g abzentrifugiert und in 400 ml (Ausgangsvolumen) eiskaltem MilliQ Wasser resuspendiert. Es folgten drei weitere Zentrifugationen, nach denen das Pellet zunächst in 200 ml (halbes Ausgangsvolumen) eiskaltem MilliQ Wasser aufgenommen wurde. Nach der zweiten Zentrifugation wurde in 8 ml (1/50 des Ausgangsvolumens) eiskalter Elektroporationslösung (MilliQ mit 10 % (w/v) Glycerol ) und zum Schluß in 2 ml (1/200 des Ausgangsvolumens) eiskalter Elektroporationslösung resuspendiert.

Die Zellen wurden nun sofort in Volumen von 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

#### 3.3.2.2 Elektrotransformation von *E. coli*

Zur Elektrotransformation von *E. coli* wurden elektrokompente Bakterien von -70 °C aufgetaut und dabei ständig auf Eis belassen. Diese wurden sodann in eisgekühlte Elektrotransformationsküvetten (2 mm, EquiBio) gegeben und mit 1 µl eisgekühltem Ligationsansatz oder Plasmid-DNA versetzt. Nach 5 min Inkubation wurde die



Elektrotransformation mit einem BIO RAD Gene Pulser durchgeführt. Dieser war zusätzlich mit einem BIO RAD Pulse-Controller und einem Capacitance Extender ausgestattet. Der Gene Pulser war standardmäßig auf 25  $\mu$ FD eingestellt, die Spannung wurde auf 25,0 V eingestellt. Der Pulse Controller war standardmäßig auf 200  $\Omega$  eingestellt, der Capacitance Extender war auf 250  $\mu$ FD justiert.

Die Transformanten wurden in 1 ml und 37 °C warmem LB-Medium (ohne Selektionsantibiotika, jedoch mit erforderlichen Zusätzen wie z.B. DAP) aufgenommen und für 30 min bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden je 100  $\mu$ l und der Rest der Bakterien auf LB-Platten mit Antibiotika und Zusätzen ausplattiert und für 16 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.3.3 Konjugation

#### 3.3.3.1 Drei-Parentale Konjugation von *Bartonella spezies*

Als Donor- und Helferstamm diente *E. coli*  $\beta$ 2150, eine DAP<sup>-</sup>-Deletionsmutante, die zum Wachstum von außen zugeführte Diaminopimelinsäure (DAP) benötigt. Dieses System ermöglicht nach der Konjugation eine wirkungsvolle Selektion gegen diese Bakterien.

Als Helferplasmide, welche die *mob*- und *Tra*-Funktion tragen, wurden pRK2013 mit einer Kanamycin-Resistenz und pRK600 mit einer Chloramphenicol-Resistenz verwendet.

Für die Konjugation wurden die entsprechenden *E. coli*-Stämme auf LB-Agar, versetzt mit 1 mM DAP und ggf. entsprechenden Antibiotika, über Nacht aus dem Glycerolstock kultiviert.

Diese wurden zwei Mal in PBS gewaschen und wenn nötig, auf eine bestimmte optische Dichte eingestellt (meist OD<sub>595</sub>=5.0).

Die 2-3 d alte Kultur von Bartonellen wurde ein Mal in PBS gewaschen; je eine halbe Platte wurde pro Konjugationsansatz mit 15  $\mu$ l Donor- und Helfersuspension gemischt, abzentrifugiert und in 100  $\mu$ l PBS auf Nitrocellulosefilter (Porengröße <0,2  $\mu$ m, r= 2 cm) aufgetragen.

Die Filter lagen auf einer frischen CSB-Agar-Platte, die mit 1mM DAP versehen war.

Die Konjugationsansätze wurde für 5-7 h bei 35 °C bei 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Sodann wurden die Bakterien vom Filter mit PBS heruntergelöst und drei Mal mit PBS gewaschen. Die Bakterien wurden in 1 ml PBS aufgenommen und je 50  $\mu$ l (=5 % des Volumens) wurden auf frische CSB-Platten – ohne DAP und mit einem auf

Konjuganten selektierendem Antibiotikum – ausplattiert. Je nachdem, um was für ein konjugiertes Plasmid es sich handelte, waren nach 5-8 Tagen die ersten Kolonien zu sehen.

### **3.4 Arbeiten mit Tieren**

#### **3.4.1 Infektion von Laborratten mit *Bartonella tribocorum***

Für die Infektion wurde *B. tribocorum* für 2-3 d auf CSB-Platte angezogen. Unmittelbar vor der Infektion wurde die Kultur mit einem sterilen Wattestäbchen abgerntet, in PBS suspendiert und auf eine optische Dichte bei 595 nm von 1,0 eingestellt.

Die Infektion erfolgte mittels Injektion von 0,3 ml der Suspension in die Schwanzvene des Tiers. Dazu wurde eine 1,0 ml Spritze und eine 27 G-Kanüle verwendet.

#### **3.4.2 Blutabnahme bei Ratten**

Die Blutabnahme erfolgte ebenfalls über die Schwanzvene des Tieres. Das Blut wurde mit einer 2 ml-Spritze abgenommen, welche mit 50 µl Citratlösung versehen wurde. Bei genauer Bestimmung des Abnahmevolumens wurde das Gewicht der Spritze vor und nach der Blutentnahme verglichen. Um die periphere Durchblutung der Tiere anzuregen, wurden die Tiere vor der Punktion in vielen Fällen für ca. 3-5 min unter eine Wärmelampe gesetzt.

#### **3.4.3 Organentnahme bei Ratten**

Zur Organentnahme wurden die Versuchstiere in einem mit Äther-Luft-Gemisch gefüllten Exikator sediert und danach mit einer intramuskulären Injektion von 0,5 ml Rompun (Bayer) und 0,3 ml Ketamin 50 (Schwabe-Curamed) narkotisiert. Nach 15-20 min wurde mit der Entnahme der Organe unter der Cleanbench begonnen. Dazu wurde die Bauchdecke des Tiers vorsichtig mit einer Schere inzidiert und ein medianer Schnitt von kaudal nach kranial gesetzt, ohne Organe zu verletzen. Die zu entnehmenden Organe wurden mit einer Pinzette angehoben und mit der Schere vollständig abgesetzt.

### **3.5 Arbeiten mit Zellen**

#### **3.5.1 IF-Färbungen von Vollblut aus Ratten**

5 µl Citratblut von Ratten wurde in 500 µl PBS aufgenommen und bei 200 g (Heraeus: 1500 rpm) für 2 min pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in 50 µl PBS aufgenommen [1:10].

Antikörper wurden entsprechend der Liste (Material) eingesetzt. Die Proben wurden für 30 min bei 4 °C im Dunkeln gehalten. Es erfolgten zwei Waschschrte in o.g. Weise, das Pellet wurde zum Schluß in 500 µl PBS aufgenommen und durch FACS analysiert.

### **3.5.2 FACS-Analyse von Vollblut von Ratten zur Bestimmung des Bakterientiters**

5-10 µl Citratblut, welches durch intravenöse Punktion des Tieres erhalten wurde, wurde in 500 bis 1000 µl sterilem, gefiltertem PBS aufgenommen, durchmischt und sofort analysiert.

Zur Bestimmung des Bakterientiters von infiziertem Rattenblut wurde die Population von Zellen die bei Auftragung forward- gegen sideward-scatter den Erythrozyten entsprach, auf fluoreszierende (GFP-positive) Ereignisse hin untersucht. Zur Errechnung der Zahl an infizierten Erythrozyten pro ml Blut wurde die Gesamtzahl der erfassten Erythrozyten ( $5 \times 10^5$ - $15 \times 10^7$ ) zu den GFP-postiven Ereignissen ins Verhältnis gesetzt. Als Bezugsgröße wurde von  $5 \times 10^9$  Erythrozyten pro ml Blut ausgegangen.

## **3.6 Statistische Methoden**

Die statistische Auswertungen in Abb. 6, 9 und 10 wurden von Herrn Prof. Klaus Dietz (Institut für Medizinische Biometrie, Universität Tübingen) mit dem Programm Jmp (SAS; Version 5) durchgeführt. Die anderen Grafiken wurden mit dem Programm Excel 7.0 für Windows 95 erarbeitet.

Soweit nicht anders angegeben wurde bei der Angabe von Werten bezogen auf ml Blut von einer Erythrozytenzahl von  $6 \times 10^9$  pro ml ausgegangen.

In Abb. 6 konnte der Verlauf des Bakterientiters bei allen Versuchstieren mit der Methode der kleinsten Quadrate durch folgendens Modell beschrieben werden:

$$c / ((1 + \text{Exp}(-(b1 * (\text{Tag} - T1)))) * (1 + \text{Exp}(b2 * (\text{Tag} - T2))))$$

Dabei bedeutet c den Maximalwert des Bakterientiters. Der Anstieg wird mit einer logistischen Funktion beschrieben. T1 ist der Wendepunkt und b1 bestimmt die Steigung im Wendepunkt. Der Maximalwert wird ebenfalls mit einer logistischen Funktion beschrieben. T2 ist deren Wendepunkt und b2 bestimmt die Steigung in diesem Wendepunkt.

In Abb. 9 wurden die Ergebnisse der Titerverläufe aus der Blutkultur mit den Ergebnissen der Titerverläufe ermittelt durch die FACS-Analyse ebenfalls durch die Methode der kleinsten Quadrate verglichen. Für eine Regressionsanalyse der Kolonie-

und FACS-Werte wurde eine Varianzstabilisierung durch eine logarithmische Transformation durchgeführt.

In Abb. 10 wurde die Anzahl der Bakterien pro Erythrozyt im Verlauf der Infektion durch die Methode der Kleinsten Quadrate mit Hilfe des folgenden Modells beschrieben:

$$m(t) = \begin{cases} 0 & t < T \\ A(1 - e^{-\lambda(t-T)}) & t \geq T \end{cases}$$

A entspricht dabei dem Wert der asymptotischen Näherung an das Sättigungsniveau,  $\lambda$  entspricht der Geschwindigkeit des Anstiegs und T dem Zeitpunkt des ersten Anstiegs.

In Abb. 11 und 12 wurde die gesamte Anzahl der registrierten Bakterien von je einem Versuchstier pro Meßzeitpunkt angegeben. Da es keine Bildung eines Mittelwertes oder Standardabweichung möglich.

In Abb. 17 und 18 sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Anzahl der Konjuganten aus 6 bis 12 ausgezählten Kulturplatten angegeben.

In Abb. 23 sind die Mittelwerte der Bakterientiter mit Standardabweichung von 5 Versuchstieren angegeben.

In Abb. 25 sind die Bakterientiter im Blut von je einem Versuchstier ermittelt auf Platten mit und ohne Selektionsmarker. Als Plasmidstabilität wurde der Quotient der Werte mit Selektionsmarker durch die Werte ohne Selektionsmarker angegeben.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Etablierung eines *in vivo*-Modells der Erythrozyteninvasion

#### 4.1.1 Die Ratte als Modell für die Erythrozyteninvasion

*B. tribocorum-gfp* (Schülein et al., 2001) sollte auf die Infektiosität im Ratten-Tiermodell getestet werden.

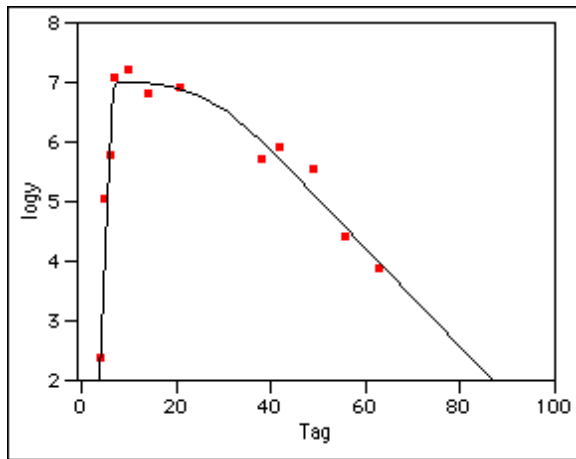
Erste Experimente zeigten zunächst, dass die Ratten (Wistar) die Infektion ohne äußere Zeichen der Beeinträchtigung tolerierten. Unterschiedliche Applikationswege (i.v., s.c., i.d.) hatten dabei keine Auswirkungen auf die Versuchstiere, bei allen Infektionen kam es zu einer Bakteriämie (siehe unten). Auch in diesem Zustand war kein Zeichen der Beeinträchtigung bei den Tieren zu bemerken.

#### 4.1.2 Verlauf der Bakteriämie nach experimenteller Infektion von Ratten mit *B. tribocorum-gfp*

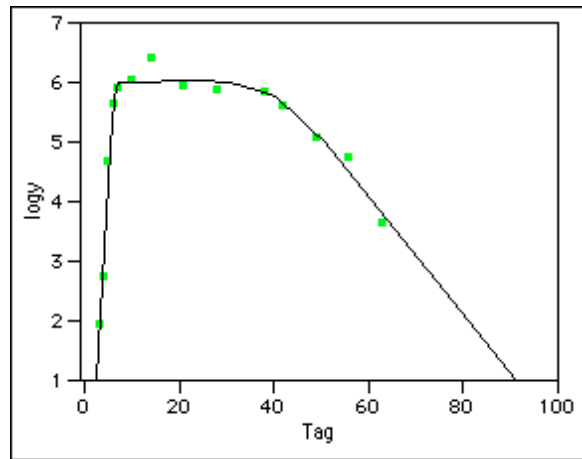
Zur genaueren Untersuchung des Infektionsverlaufes wurde nach intravenöser Infektion von vier Ratten Blut aus der Schwanzvene an unterschiedlichen Tagen entnommen und sowohl in der Blutkultur (Abb. 6) als auch mit Hilfe der Durchflußzytometrie (Abb. 8) auf *B. tribocorum-gfp* untersucht.

In der Blutkultur konnte in den ersten drei Tagen p.i. keine Bakterien aus dem Blut angezüchtet werden. Es zeigte sich dann ein rascher, exponentieller Titeranstieg ab Tag drei p.i. (zwei Tiere) bzw. an Tag vier p.i. (zwei Tiere), der sein Maximum an Tag 10 bis 14 findet. Am Tag zehn ließen sich bis zu  $16,2 \times 10^6$  Bakterien pro ml Blut kultivieren. Es folgt eine Phase, in der die Bakterientiter auf diesem maximalen Niveau relativ konstant blieben. Die Höhe des Plateaus und die Dauer dieser Phase waren bei den vier Versuchstieren sehr unterschiedlich. Es folgte der exponentielle Rückgang der Bakterienzahl im Blut, der wesentlich langsamer war, als der Anstieg des Bakterientiter.

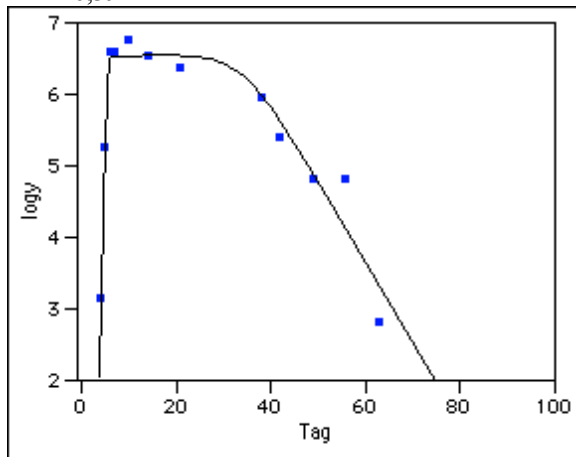
Die statistische Auswertung der Daten zeigte eine negative Korrelation zwischen der Höhe des Plateaus, angegeben als der maximal gemessene Bakterientiter  $c$ , und der Dauer der Plateauphase, errechnet aus der Differenz der Zeitpunkte T1 und T2. In der Ratte 28 (rechts oben) dauerte die Plateauphase mit 34,4 Tagen am längsten, es wurden aber nur ein maximaler Bakterientiter von  $1,09 \times 10^6$  Bakterien pro ml erreicht. In Ratte 27 (links oben) wurde ein maximaler Titer von  $1,09 \times 10^7$  Bakterien pro ml Blut gemessen. Die Plateauphase dauerte hier aber nur 19,9 Tage.



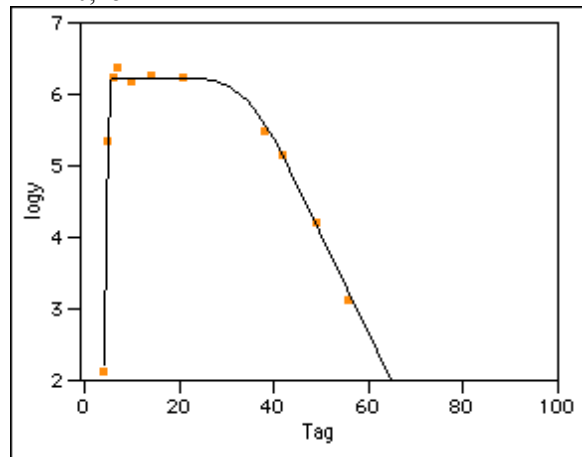
$c = 1,09 \times 10^7$   
 $b_1 = 4,08$   
 $T_1 = 6,5$   
 $b_2 = 0,19$   
 $T_2 = 26,39$



$c = 1,09 \times 10^6$   
 $b_1 = 3,14$   
 $T_1 = 6,15$   
 $b_2 = 0,23$   
 $T_2 = 40,48$



$c = 3,7 \times 10^6$   
 $b_1 = 5,01$   
 $T_1 = 5,59$   
 $b_2 = 0,26$   
 $T_2 = 33,78$



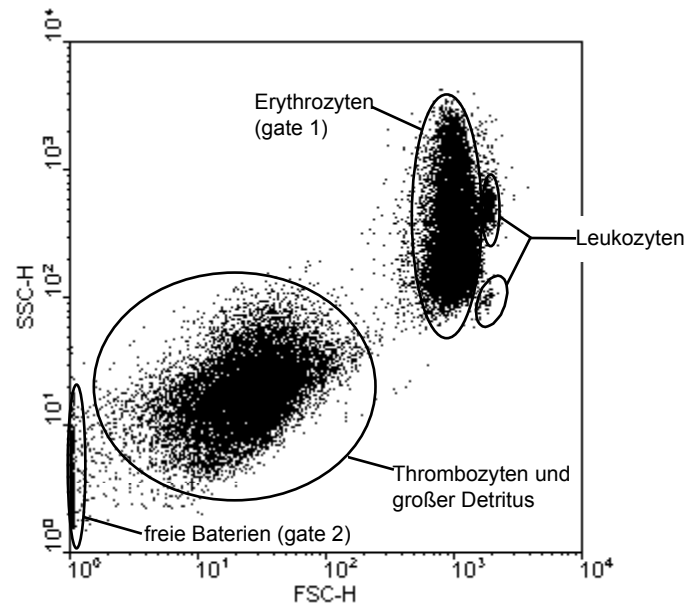
$c = 1,8 \times 10^6$   
 $b_1 = 7,51$   
 $T_1 = 5,27$   
 $b_2 = 0,32$   
 $T_2 = 33,75$

**Abb. 6: Verlauf des Titers der Bakteriämie bei vier Ratten nach intravenöser Infektion mit *B. tribocorum-gfp***

Nach intravenöser Injektion von  $3 \times 10^8$  Bakterien wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (x-Achse) Blut aus der Schwanzvene des Tiers entnommen und auf CSB-Agar ausgestrichen. Die Anzahl der CFU wurden nach ca. 7 Tagen Bebrütung ermittelt und in Bakterien pro ml Blut umgerechnet (y-Achse). Dargestellt ist die Beschreibung des Bakterientiters in den einzelnen Versuchstieren durch ein mathematisches Modell. Dabei ist  $c$  der Maximalwert des Bakterientiters. Der Anstieg wird mit einer logistischen Funktion beschrieben.  $T_1$  ist der Wendepunkt und  $b_1$  bestimmt die Steigung im Wendepunkt. Der Maximalwert wird ebenfalls mit einer logistischen Funktion beschrieben.  $T_2$  ist deren Wendepunkt und  $b_2$  bestimmt die Steigung in diesem Wendepunkt. Ab Tag 3 p.i. sind *B. tribocorum-gfp* im Blut nachweisbar. Die Anzahl der anzüchtbaren Bakterien nimmt bis zum Tag 6 exponentiell zu. Die höchsten Titer werden an Tag 10 bis 14 gemessen und nehmen dann ab. Auffällig ist der steile Anstieg der Bakteriämie an Tag 3-4, die unterschiedlich lange Plateauphase und besonders die ersten drei Tage, in denen keine Bakterien aus dem Blut anzüchtbar sind.

Außerdem wurde der Verlauf der Bakteriämie mit Hilfe der FACS-Analyse untersucht. Für diese Analyse wurde die Population von Zellen untersucht, die im forward-sideward-scatter den Erythrozyten entsprach (ein repräsentatives Bild ist in Abb. 7 wiedergegeben). Im FL1-

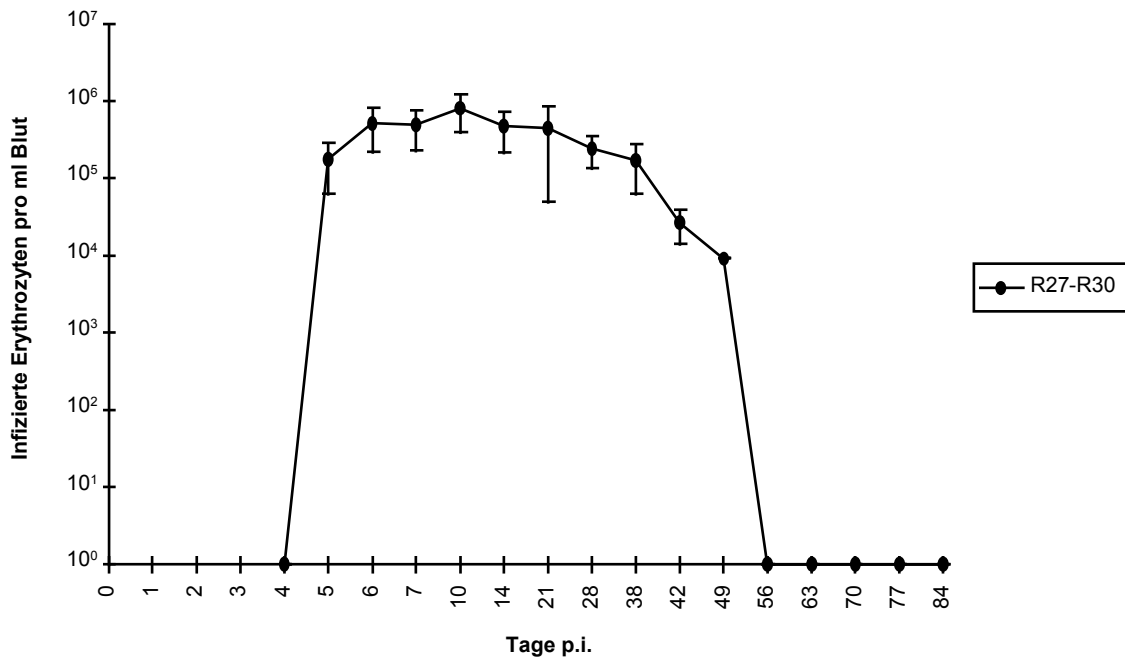
Kanal (erster Fluoreszenzkanal) registrierte GFP-positive Ereignisse entsprachen *B. tribocorum-gfp* assoziiert an Erythrozyten.



**Abb. 7: Vollblut einer mit *B. tribocorum-gfp* infizierten Ratte in Dot-Blot-Analyse, forward-gegen sideward-scatter**

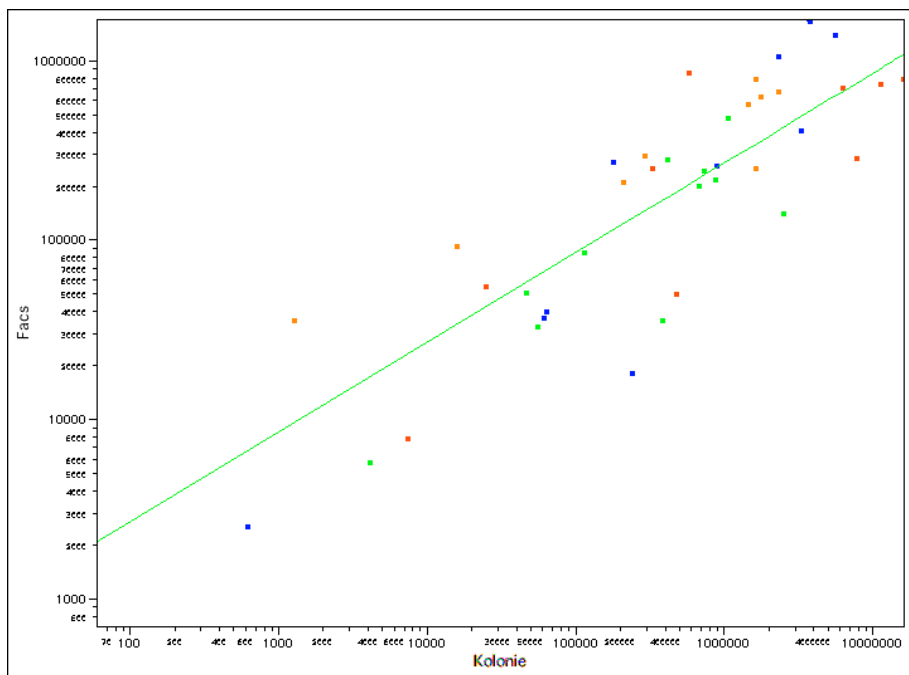
Die einzelnen Meßergebnisse werden in diesem Diagramm (relativen Einheiten) nach ihrer Größe (x-Achse) und nach ihrer Granularität (y-Achse) dargestellt. So kann man die Population der Erythrozyten (gate 1) und der freien Bakterien (gate 2) von allen anderen Ereignissen zuverlässig unterscheiden. Für jedes Ereignis wurden bei der gleichen Messung noch andere Daten registriert, z.B. die Fluoreszenzstärke. Für die folgenden Ergebnisse wurden nur die weiteren Daten der Erythrozyten und/oder der freien Bakterien dargestellt.

Mit dieser Methode konnten ab Tag vier p.i. (drei Tiere), bzw. an Tag fünf p.i. das erste Mal mit Bakterien assoziierte Erythrozyten (Fluoreszenz-positive Ereignisse in gate (1) nachgewiesen werden. Die maximale Anzahl dieser Ereignisse wurde an Tag zehn gemessen. Die Bakteriämie war bis zum Tag 63 im FACS nachweisbar. Die Zunahme an GFP-positiven Ereignissen war zwischen Tag fünf p.i. und dem Maximum an Tag zehn nur noch sehr gering. Um die Aussagekraft der durch die FACS-Analyse erhaltenen Verlaufswerte mit denen der Blutkultur vergleichen zu können, wurde ein statistischer Vergleich der FACS-Werte mit den zugrunde liegenden Werten aus der Blutkultur von Herrn Prof. Klaus Dietz (Institut für Medizinische Biometrie, Universität Tübingen) vorgenommen (Abb. 9). Es wurde zwischen FACS und Koloniezahl folgende Beziehung ermittelt:  $FACS = 272 \times (Kolonie)^{0,5}$ . Die logarithmische Regression beschreibt 70 % der Variabilität. Die Standardabweichung der logarithmischen Residuen beträgt 0,367. Dies bedeutet, dass die Beobachtungen mit einem prozentualen Fehler von 233 % um den Erwartungswert streuen.



**Abb. 8: Anzahl der bakterienassoziierten Erythrozyten von Ratten nach intravenöser Infektion mit *B. tribocorum-gfp*, ermittelt durch FACS-Analyse**

Für diese Messung wurden die Anzahl der GFP-positiven Ereignisse in der Erythrozytenpopulation ermittelt. Es wurden  $5 \times 10^5$  bis  $1,5 \times 10^6$  Zellen gemessen. Die Werte wurden auf einen ml Blut umgerechnet. Die ersten GFP-positiven Ereignisse konnten an Tag vier registriert werden. Die Anzahl der Ereignisse nimmt dann bis zum Tag fünf stark zu, um dann nicht mehr erheblich größer zu werden. Die größte Anzahl an GFP-positiven Ereignissen sind an Tag zehn ermittelt worden. Bis zum Tag 28 bleibt der Wert konstant. An Tag 38 sind bei einer Ratte keine GFP-positiven Ereignisse mehr ermittelbar, an Tag 42 bei zwei Ratten, an Tag 49 bei drei von vier Ratten. An Tag 63 sind bei keinem Versuchstier mehr GFP-positive Ereignisse in der FACS-Messung zu registrieren.



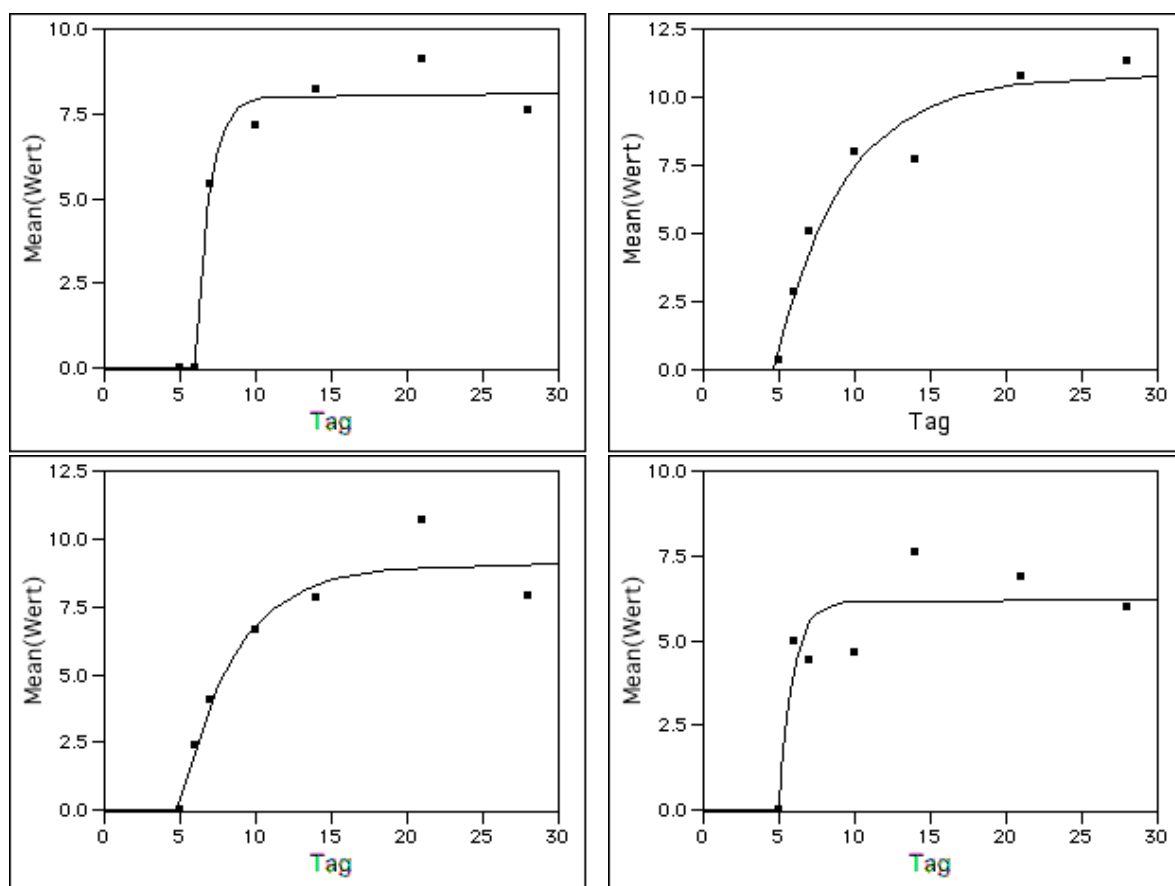
**Abb. 9: Vergleich der Ergebnisse der Blutkultur und der FACS-Analyse**



Nach log-log-Transformation der Ergebnisse wurde jedem Wert der Blutkultur (x-Achse) der entsprechende Werte der FACS-Analyse (y-Achse) zugeordnet. Die zugehörige Gerade wird durch folgende Formel beschrieben:  $FACS = 272 \times (Kolonie)^{0,5}$ . Von dieser berechneten Geraden weichen die gemessenen Werte im Mittel um den Faktor 2,33 ab.

#### 4.1.3 Interaktion von *B. tribocorum-gfp* mit Erythrozyten

Mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie konnte die Anzahl der intraerythrozytär vorhandenen Bakterien ermittelt werden. Diese Arbeit wurde von Frau Dr. C. Lanz (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Tübingen) über den Zeitraum von vier Tage p.i. bis 28 Tage p.i. durchgeführt (Abb. 10).



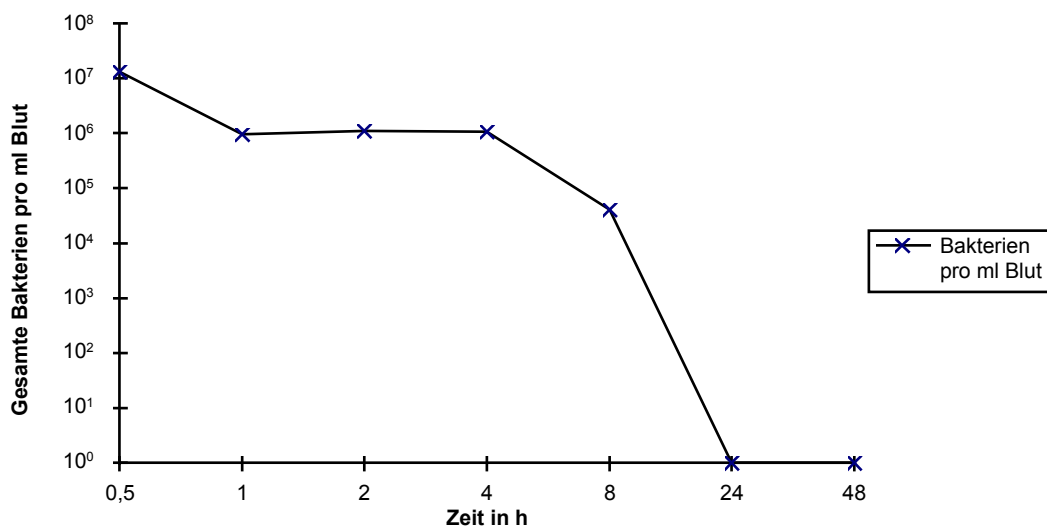
**Abb. 10: Anzahl der *B. tribocorum-gfp* pro Erythrozyt in vier infizierten Ratten, ermittelt mit Laser-Scanning-Mikroskopie**

Von direkt nach der intravenösen Blutabnahme angefertigten Blutaussstrichen wurden 5-15 infizierte Erythrozyten auf die Anzahl intraerythrozytären Bakterien mit Hilfe der Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Dargestellt ist die mittlere Anzahl von Bakterien pro Erythrozyt in allen vier Ratten (Y-Achse) im Verlauf der Infektion (X-Achse). Man erkennt eine Phase des raschen Anstiegs der Bakterienzahl pro Erythrozyt, die in eine Plateauphase übergeht.

Die ersten intraerythrozytären Bakterien waren an Tag vier p.i. zu sehen. Es folgte eine rasche Zunahme der Bakterienzahl pro Erythrozyt bis ca. zum Tag 15 p.i.. Darauf folgte eine Plateauphase, in der sich die Anzahl der Bakterien pro Erythrozyt nicht mehr änderte. Die statistische Auswertung der Daten ergab eine mittlere Geschwindigkeit des Anstiegs der

Bakterienzahl von 0,66 (0,22 - 1,09) und ein mittleres Niveau der stabilen Phase von 8,54 (6,19 - 10,78) Bakterien pro Erythrozyt. Dabei korrelierten diese beiden Werte negativ miteinander, d.h. auf einen langsamen Anstieg folgte ein höheres Plateau, in den Ratten 27 und 30 (oben links und unten rechts) erfolgte der Anstieg der Bakterienzahl pro Erythrozyt sehr rasch (Mittel: 1,07), es wurde aber nur ein Niveau der stabilen Phase von durchschnittlich 7,14 Bakterien pro Erythrozyt erreicht. In den Ratten 28 und 29 (oben rechts und unten links) erfolgte der Anstieg langsamer (Mittel: 0,25), es wurde aber ein Niveau in der stabilen Phase von 9,4 Bakterien pro Erythrozyt erreicht.

#### 4.1.4 Untersuchung der ersten drei Tage der Infektion



**Abb. 11: FACS-Messung der Gesamtzahl von Bakterien im Blut von infizierten Ratten während der ersten 48 h**

Dargestellt ist die Summe der freien und zellassoziierten Bakterien. Es handelt sich bei jedem Meßwert um eine andere Ratte.

Um das Verhalten der Bakterien in den ersten drei Tagen genauer zu untersuchen, wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Anzahl von allen Bakterien im Blut (zellassoziiert und frei) durch FACS-Analyse ermittelt. Dabei wurden nicht nur die mit Zellen assoziierten Bakterien, sondern auch sich frei im Blut befindliche Bakterien registriert (Abb. 11).

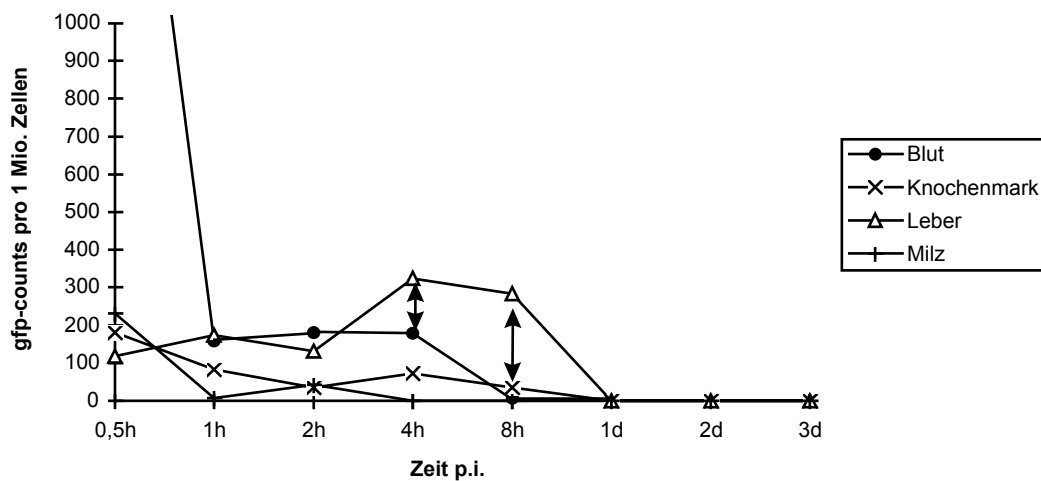
Nach 30 Minuten p.i. von ca.  $3 \times 10^8$  Bakterien konnten im Blut durch FACS-Analyse  $1,3 \times 10^7$  *B. tribocorum-gfp* pro ml Blut registriert werden. Nach einer, zwei und vier Stunden sind mit  $1,0 \times 10^7$  Bakterien pro ml Blut über drei Stunden gleichbleibende Werte registriert worden. Nach vier Stunden nimmt die Bakterienanzahl dann rapide ab, bis nach 24 Stunden keine Bakterien mehr im intravenös entnommenen Blut nachweisbar sind. Diese Phase dauert dann bis zum vierten Tag p.i. an.

Geht man von einem Blutvolumen einer Ratte (ca. sechs Wochen alt) von 15 ml aus (persönliche Mitteilung von R. Heller, Universität Straßburg), so erhält man bei gegebener Infektionsdosis einen theoretischen Wert von ca.  $2,0 \times 10^7$  Bakterien pro ml Blut. Die

Differenz des theoretischen Wertes zu den dargestellten Meßwerten zeigt, dass sich nach 30 Minuten ca. 35 %, also  $7 \times 10^6$  Bakterien schon nicht mehr frei im Blut befinden. Nach einer Stunde sind ca. 50 % der Bakterien aus dem Blutstrom entfernt.

#### 4.1.5 Organspezifische Akkumulation von *B. tribocorum-gfp*

Es stellte sich nun die Frage, ob es Organe gibt, in denen sich die frisch injizierten Bakterien akkumulieren und von dort aus eine manifeste Bakteriämie mit intraerythrozytären Stadien entwickeln. Die Frage nach der Interaktion mit dem erythropoetischen System war hierbei von besonderem Interesse, da die Invasion in phagozytisch stark aktive erythropoetische Vorläuferzellen ein Hinweis auf den Invasionsmechanismus von *Bartonella* hätte sein können.



**Abb. 12: Nachweis von GFP-markierten Bakterien in verschiedenen Organen**

Nach anfänglicher Überflutung des Tieres mit Bakterien kommt es schon in der ersten Stunde zu einem enormen Abfall der Bakterienzahl im Blut. Auffällig der vermehrte Nachweis von GFP-positiven Ereignissen in der Leber zwischen der zweiten und achten Stunde, die sogar die Detektionsrate im Blut übersteigt. Bakterielle Präsenz im Sinne GFP-positiver Ereignisse im Knochenmark konnte kaum nachgewiesen werden.

Zu diesem Zweck wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion Milz, Leber und Knochenmark entnommen und aus dem jeweiligen Organ ausgespültes Blut im FACS auf *B. tribocorum-gfp* untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 wiedergegeben.

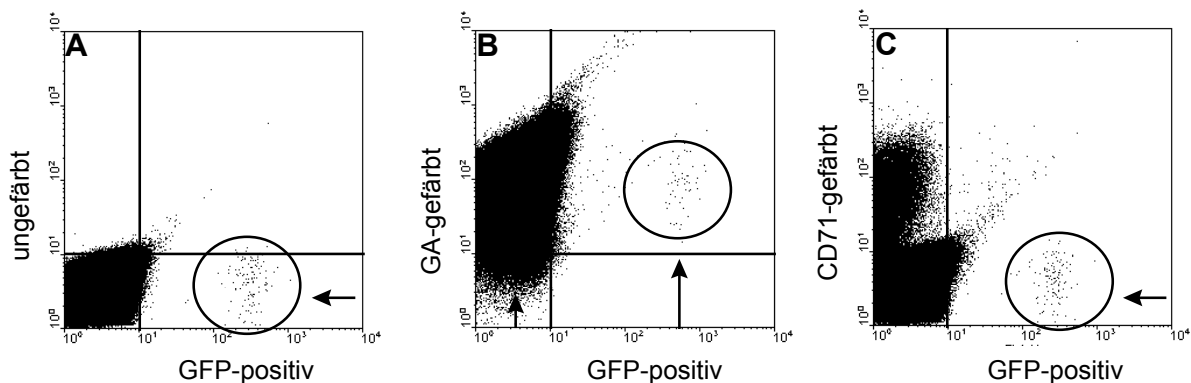
Die Untersuchung der einzelnen Organe zeigte, dass sich nach 30 Minuten 20 mal weniger Bakterien in Leber, Milz und Knochenmark befinden, als im frei zirkulierenden Blut, dass aus der Schwanzvene entnommen wurde. In Milz und Knochenmark waren relativ zum Blut auch zu den anderen Meßzeitpunkten immer weniger Bakterien nachweisbar.

Bei der Untersuchung der Leber waren nach einer Stunde genauso viele Bakterien in der Spüllösungen dieses Organs, wie im frei zirkulierenden Blut, dass aus der Schwanzvene entnommen wurde. Nach vier Stunden waren in der Leber dann 1,8 mal mehr, nach acht Stunden sogar 40 mal mehr Bakterien nachzuweisen, als im peripher venösen Blut. Nach 24

Stunden konnte in keiner der Proben GFP-positive Ereignisse registriert werden. Diese Phase dauerte bis zum Tag vier an.

#### 4.1.6 Interaktion mit Erythrozyten und die Beteiligung von erythroiden Vorläuferzellen

Um der Frage weiter nachzugehen, ob es während der Etablierung der Bakteriämie von *B. tribocorum-gfp* zu einer Interaktion mit erythroiden Vorläuferzellen kommt, sollte im peripheren Blut nach diesen Ereignissen gesucht werden.



**Abb. 13: Dot-Plot der Erythrozytenpopulation einer fünf Tage zuvor infizierten Ratte: (A) ohne Antikörperfärbung, (B) mit Anti-Glycophorin A -Färbung und (C) mit Anti-CD71-Färbung**  
 Im FL1-Kanal (X-Achse) wird GFP detektiert, im PE-Kanal (Y-Achse) Anti-GA und Anti-CD71. Deutlich kann man die infizierten Erythrozyten von den nicht infizierten Erythrozyten durch ein um mehr als eine Zehnerpotenz verstärktes GFP-Signal abtrennen (A, Pfeil). Bei Markierung des Blutes mit Glycophorin A und Färbung mit einem PE-Antikörper wird sowohl die nicht infizierte Erythrozytenpopulation angefärbt (B, links), als auch die infizierten Erythrozyten (B, rechts) angefärbt. Beide Populationen „shiften“ bei dieser Färbung auf der y-Achse (PE-Färbung). Bei der Färbung des Blutes mit CD71-Antikörpern „shiftet“ ein Teil der nicht infizierten Population, die infizierten Erythrozyten werden nicht angefärbt, sie „shiften“ nicht.

Um sicher zu stellen, dass es sich bei den bakterienassoziierten Zellen um erythroide (aus der Reihe der roten Blutzellen stammende) Zellen handelt, wurden infizierte Rattenblutproben mit einem für diese Zellen spezifischen Antikörper, Anti-Glycophorin A (Anti-GA) markiert und mit einem PE-gefärbten Sekundärantikörper angefärbt (Buhring et al., 1996; Herraes et al., 1993). In Abb. 13 ist ein Dot-Blot vom Blut einer fünf Tage zuvor infizierten Ratte mit und ohne Anti-GA-Färbung dargestellt. Deutlich ist die Population der infizierten Zellen von nicht infizierten Zellen durch mehr als eine Zehnerpotenz stärkere Signale im FITC-Kanal abzugrenzen.

Bei einer zusätzlichen Färbung mit Anti-GA (Abb. 13B) zeigen alle GFP-positiven Zellen eine um mehr als eine Zehnerpotenz größere Signalintensität im PE-Kanal. Die infizierten Zellen trugen Glycophorin A auf ihrer Oberfläche.

Auch die GFP-negative Population zeigte bei dieser Färbung eine Signalverstärkung im PE-Kanal. Es konnten hier bei Messungen mit weniger Ereignissen zunächst noch zwei

Populationen abgegrenzt werden, eine GA-positive, die den erythroiden Blutzellen entspricht und eine GA-negative, die den restlichen Blutzellen (weiße Blutzellen und Blutplättchen) entspricht. Die Abgrenzbarkeit ist allerdings bei der Darstellung von 1,5 Mio. gemessenen Ereignissen in der Erythrozytenpopulation nicht mehr möglich. Am oberen Rand der Population ist ein Auswandern der Messpunkte in diagonaler Richtung zu beobachten, was den Eindruck der Signalverstärkung im FITC-Kanal vermittelt. Dabei handelt es sich um ein Überstrahlen des sehr intensiven PE-Signals in den FITC-Kanal und sollte nicht als GFP-positiv interpretiert werden.

Bei 1,5 Mio. gemessenen Ereignissen in der Erythrozytenpopulation waren in beiden Messungen ca. 100 Ereignisse GFP-positiv.

Da Glycophorin A auf allen Zellen der erythroiden Reihe vorkommt, sollte nun unterschieden werden, um welches Differenzierungsstadium es sich bei den infizierten Zellen handelt. Im peripheren Blut kommen nur zu einem sehr kleinen Prozentsatz Vorläuferzellen der Erythrozyten vor. Vor allem handelt es sich dabei um Retikulozyten, also kernlose Zellen, in denen nur noch Reste von RNA nachzuweisen sind, die innerhalb von einem Tag zu murenen Erythrozyten ausreifen. Retikulozyten stellen 3-5 % der erythroiden Zellen des peripheren Blutes dar (Dörmer and Clemens, 1994) (dieser Wert wurde durch FACS-Analyse mit RETICOUNT®-gefärbtem Rattenblut (Becton Dickinson) bestätigt, (Ergebnisse nicht gezeigt). Es sollte nun geprüft werden, ob *B. tribocorum-gfp* bevorzugt Retikulozyten infiziert, da dies als ein Hinweis auf die Infektion von noch früheren erythroiden Zellen anzusehen wäre.

Retikulozyten, aber auch noch frühere Vorstufen der Erythrozyten tragen den Transferrin-Rezeptor (CD71) auf ihrer Oberfläche und können so von Erythrozyten unterschieden werden (Serke, 1994). Die Färbung von PE-markierte Anti-CD71-Antikörper sollte nun zeigen, ob die infizierten, GA-positiven Zellen auch CD71 auf ihrer Oberfläche trugen.

Die FACS-Analyse (Abb. 13C) zeigte für CD71-PE-gefärbtes Blut keine Signalverstärkung im PE-Kanal für die GFP-positiven Zellen. Die infizierten Zellen trugen kein CD71.

Es konnten zwar Ereignisse mit GFP-Signal und PE-Signal registriert werden. Diese stellen sich jedoch als „schweifartige“ Ausziehung der FITC- und PE-negativen Population dar und ordnen sich diagonal im Messfeld an. Sie zeigen damit das typische Darstellungsverhalten von autofluoreszenten Partikeln.

Aus der Population der GFP-negativen Zellen konnten 1,5 % der Ereignisse mit Anti-CD71 angefärbt werden. Dies entspricht der Population der frühen Retikulozyten im peripheren Blut und zeigt, dass eine Anfärbung mit diesem Antikörper möglich gewesen ist. Die Population

der infizierten Zellen unterschied sich in den mit Anti-CD71-gefärbten Proben nicht von ungefärbten Proben. Auch hier waren ca. 100 GFP-positive Zellen bei 1,5 Mio. gemessenen Ereignissen der Erythrozytenpopulation registriert.

## **4.2 Arbeiten zu einem lokusspezifischen Mutagenesesystem für *B. tribocorum***

### **4.2.1 Der *ialA/B*-Locus von *B. tribocorum***

Die Analyse der Sequenz des *ialA/B*-Locus ergab für *ialA* eine Länge von 521 bp, für *ialB* eine Länge von 560 bp, mit einer intergenischen Region von 110 bp. Für beide Gene konnte eine Ribosomen-Bindungsstelle (Shine-Dalgarno-Sequenz) identifiziert werden. Eine putative Promotor-Region im Sinne einer Pribnow-Schnaller-Box (-10-Region) und -35-Region (Birge, 2000) konnte ebenfalls für *ialA* und *ialB* festgelegt werden. Die Analyse der Translationssequenz von IalB zeigte eine mögliche Schnittstelle für ein Signalpeptid vor der Aminosäure 23 (Abb. 13). Im Vergleich zu der von Mitchell et al. veröffentlichten DNA Sequenz des *ialA/B*-Locus von *B. bacilliformis* (Mitchell and Minnick, 1995) konnte eine Homologie und Identität von 75,2 % für den *ialA/B*-Locus von *B. tribocorum* ermittelt werden (verglichen mit dem Programm bestfit von GCG (Devereux et al., 1984)).

### **4.2.2 Herstellung von Defektmutanten im *ialB*-Locus von *Bartonella tribocorum* durch unvollständige Duplikation**

#### **4.2.2.1 Das System der inkompletten Duplikation als effizientes Werkzeug für lokusspezifischen Mutagenese**

Die Mutagenese durch inkomplette Duplikation ist eine sehr leicht handhabbare Methode zur Generierung von Mutationen definierter Genorte in Bakterien. Voraussetzung für ein solches System ist ein Vektor, mit einem geeigneten Selektionsmarker, welcher in den Organismus eingebracht werden kann, dort jedoch nicht repliziert wird. Ein solcher Vektor geht bei den ersten Teilungsschritten während der Vermehrung des Bakteriums verloren und wird daher als Selbstmordplasmid bezeichnet. Die Unfähigkeit zur Replikation des Plasmides führt dazu, das dieses – und somit auch der Selektionsmarker – bei der Zellteilung nicht weiter gegeben werden kann. Wird in diesen Vektor eine homologe Sequenz von dem Chromosom des Bakteriums kloniert, so kann es nach Einbringen in den Organismus zum Crossover zwischen den homologen Sequenzen auf dem Plasmid und dem Chromosom kommen, was zu einer Integration des Plasmides im homologen Bereich des Chromosoms führt. Die komplette genetische Information des Plasmides wird nun bei der Replikation weitergetragen – die homologe

AICIGTCAACGATATATCCICLACCCGAGAGCIGICECTICEGTTAACACACCACT 60  
 S V Q T I I P L G E D G A L R L T T A L  
 T T A T A T A C C C C G I C I C C E A C T I C T A T I C A A C G A C A C C G A T T A C C C I G A T A T T A T I G T 120  
 Y Y T P S G T S I Q G T G I T P D I I V  
 A G C A A C A C T I C C I G A A A A T A T A C C G T A I G A I G T A A A G T I C C G I C A G I C C C A I T 180  
 E Q P L P E K Y K G Y D V K V G E S A L  
 A A A C C C A T A I C A A C C G A A C G A A A C A T A A A C G A I C I C G T I C A C C I C E T T T I G T 240  
 K G H I K G K R E N N K G S G S A A F V  
 T C C G A A G A I C C T A C C G A I G A T A T I C A A T I G A A I G A C E C T T A C A A C I G T T A C C C C G I G A 300  
 P K D P K D D I Q L N E A Y K L L R G E  
 G A I C C C A A I C C A C A T T I C C A C C A G A I C C C A T A C G A T A T A T A A A G I G A G A A A I G A T 360  
 M A N A A F P P D P N K D I L K \*  
 A I C T A T A C T I C C C C T T T I C A G A T A T A A I C G A I C C A G A I G T T A C T I G A G A C I C T I C 420  
 M D A D V N L K T L P  
 C T T A I C C A A A I G I G T C G A T I G I G I C I T T A A I C A I G A A G I A A A G I C I C C E G T I C C C C 480  
 Y R K C V G I V V F N H E G K V W V G R  
 G I C G T T A A I G A C G T T A C C I C A I C C A G A T A T I G A C A G A I C I C A I C G T I C C C A C E T I C C I C 540  
 R L M T L A H A D I D R S H R W Q L P Q  
 A A C G A C A I T A I G A G A I G A A A C C A T T A G A I C C A C A T A I C C G A A C T T A I G A G 600  
 G G I D E D E K P L D A A Y R E L Y E E  
 A A C C C G A T I C G A I C I G A A A G T I G A T T A A G A C C A A A A T I C G T I C T A T A I G A T 660  
 T G I R S V K L I K E A Q N W F Y Y D F  
 T I C C A C A G A C T I G I T I C C G I C C A T T A C C A T A A A A T A T I G I C C C C A A A I C A A A A T 720  
 P Q E L V A C T L S N K Y C G Q M Q K W  
 C G T I C E T T I C A G T T A C C G G A C T T I C I G A A A T I G I G A T T A I C C C C A C C A G A I G 780  
 F A F Q F T G E L S E I V I N P P P D G  
 C A T A A A C C A G A A T I C G A I C A I C G A A I C G A T I G A I C T A G A A I C C T I C C T I C G A T I G 840  
 N K A E F D Q W K W I D L E S L P S I A  
 C C G T I C T T T A A A A C C A I G T T A T A I G A A A G T I G I C A C E G A A T I C G A C G I A C E C T T A 900  
 V S F K K H V Y M K V V S E F R G S L R  
 G A I C A T T A T A A A C C T A T A I G A C T A I G A G A A C E T T T T T T A T A A G A I C C T T A I G I G A 960  
 S L \*  
 T A T A A I C A T T A T A G A I G A T A A C A I G T T I C I C I T T T A I G I A A G A C A C G A T A T A A A 1020  
 A I G A A A A G T A T T A A T T A C T I A T A G T T I G E A C I C T T T I G A G I A T T I C A I C I G T C C A 1080  
 M K K L F N L L I V C T L L S I S S V A  
 T T I C C A A A A T C A A A C E C I C C I C C A C C G A A A G A C C E A I C A C E G A C A T I C C E A A I C C C 1140  
 F A T N S K P P A P K E A S A T L P N G  
 C E T I C I C T T I G A C I G A A A C C T A C C E T T I G I G A C A T T A A C I G I C E G T T A C A G A C C G 1200  
 A S S L T E T Y G L W T I N C G L Q E G  
 A A A A G T T I C E T T A I C C A C C G I C A G A G I G A I G A C A C C C E C G I G I G T I G I C C E T 1260  
 K K V C F M H R Q E V N E Q R G V V A  
 A I C C I C T A T I C I C A I C C I G A C E G I G I G A I C C E G A A T T A A C A G I C C T T I C C C 1320  
 M A L I L N A E G V V S G N L T V P F G  
 A T T I C G T T I C T A C C C I G I C G T T A C A G T I G A I G A C C G A A A C E I G T A T I G A A C C 1380  
 I L V S K P V R L Q V D E G K A V I E T  
 C G A T I C C G A C T I G I G I A C A C A C E T I G I A I C E T I C C A G I C C E T T I G A T A A A C I C A T 1440  
 G I R T C V P A G C M V P V A F D K T H

CtpA'

ialA

ialB

G T A C A C E T T T A C G I C E T C G A A A C A G T A A A G T I C C G A I G A C A A T I C C I C C C A C E T 1500  
 V A A L R A G K Q L K L A M T I A A A G  
 G A C A C E T T I G A A I G A T T A T T I G I T A C C I C G A I C G T T T A G I A G I C C C T T A A C C G T 1560  
 E P A L N D L F V Q L D G F S S A L N R  
 T I C C I C E T T I C C A G A A A T T T A A A A T A A A A T A A A C E C C E C T T T A C C E C G T T 1620  
 L A A L Q K \*  
 T T A G T T I G I C E G I A T A A A T I G A I C A T T A A A C G A I G A G A T T A A G A T T A C E I C T A T A A T 1680  
 C A C C C T T T A A A G T T I C A G A T A T T I G I C A T T I C T I C A T T T I C A T I C G A C I C T T T T 1740  
 A A T T I G A T T I G T T I C I A C E T T T A I C A I C A T T A A A T A G A G A I G A A T A A T T I C C C 1800  
 T G T T A G T T T T T I C T I C A C C G A A I G T I C G A T A T A A A A T A T A T A T I C A A T A C A G A T I C 1860  
 A T T T T A A I G A C C E C T T I C I A T A C I C T T T I C I G T T I C C T I G A T T G A A C C G A T A C C C A I G 1920  
 M  
 G T T A I C C A T I C E T I C A A C G A T I G A T T A A T T T T I G A I T T A T A I T A I G A T T T T A A T 1980  
 V Y A L L Q T I D L I F D I Y I D I L I  
 C E T A G I G T A I C T T T I C C I C C C I C A I G I C T T T A A T A I C A T A A A A T C C C C A A I C C E T T 2040  
 A S V I F S W L Y V F N I I N S R N R F  
 G T I G T T I G A T A C C G A C T I C T A I C C E C T T A C A A I C C C G T T T A A C C C A I C C C G 2100  
 V V L I G N F L Y R L T N P V L N P I R  
 C A A T T T A C A A A T I C C G A C A A T I G A T A T I C A C C T A T I C G I G I C A T T A T A T 2160  
 Q I L P N L G T I D I S P I V V F I I I  
 T A T T T A T I C G A A T T I C A I G I C C C C E C T A C C C A C C A I G A I C T A T A G A A A T A I G A T 2220  
 Y F I R N F M W R A Y A G M Y L \*  
 T I G A C C G A T A A A I G T T T A I C A G T I G A T A A A A T A C E T I C G T T T I G I T T I G I A D A C T 2280  
 M F Y Q V D K N S L V L F V Y L  
 C A T I C C A A A I C C C G T I G A T A A A A T A T A C C G A T T G A A I G A C C G A I C G A A A C A 2340  
 I P K S S V D K I I G I E C R D G E K Q  
 A T A I C I C G T A T A C C E C T I C G I C T I C C I G A G A I G A A A C A A T A A A C C I C I C A T 2400  
 Y L V I R L R A V P E D G K A N K A L I  
 T A A T T T T T I C G A C C A G I C G A A A T T C A I C T I C T I C A T T I C I C I G A A A G I C C C C 2460  
 K F F A K Q W K I P S S S I S L K S G A  
 A A C A I C C C C A C A A C A C T I C A C I T T I C A C A C A T T A G A A G A G T A A A C C A G A T A I G 2520  
 T S R Y K Q L H F S T H L E E L K Q I W  
 C E A I C C T T A C C G A T I G A I C C G I A I G A A A T A A A T A A A C C C T A T A A A A A A T A 2580  
 Q S F R D C I S Y E N K \*  
 C C E C T A I G T A T T A A A C T A T A T A T T I C T T A T T A C C C I C A C A C E T T I C E T T A A T T A A 2640  
 T T C A I C C C A A A G T I C T A T A O C G 2664

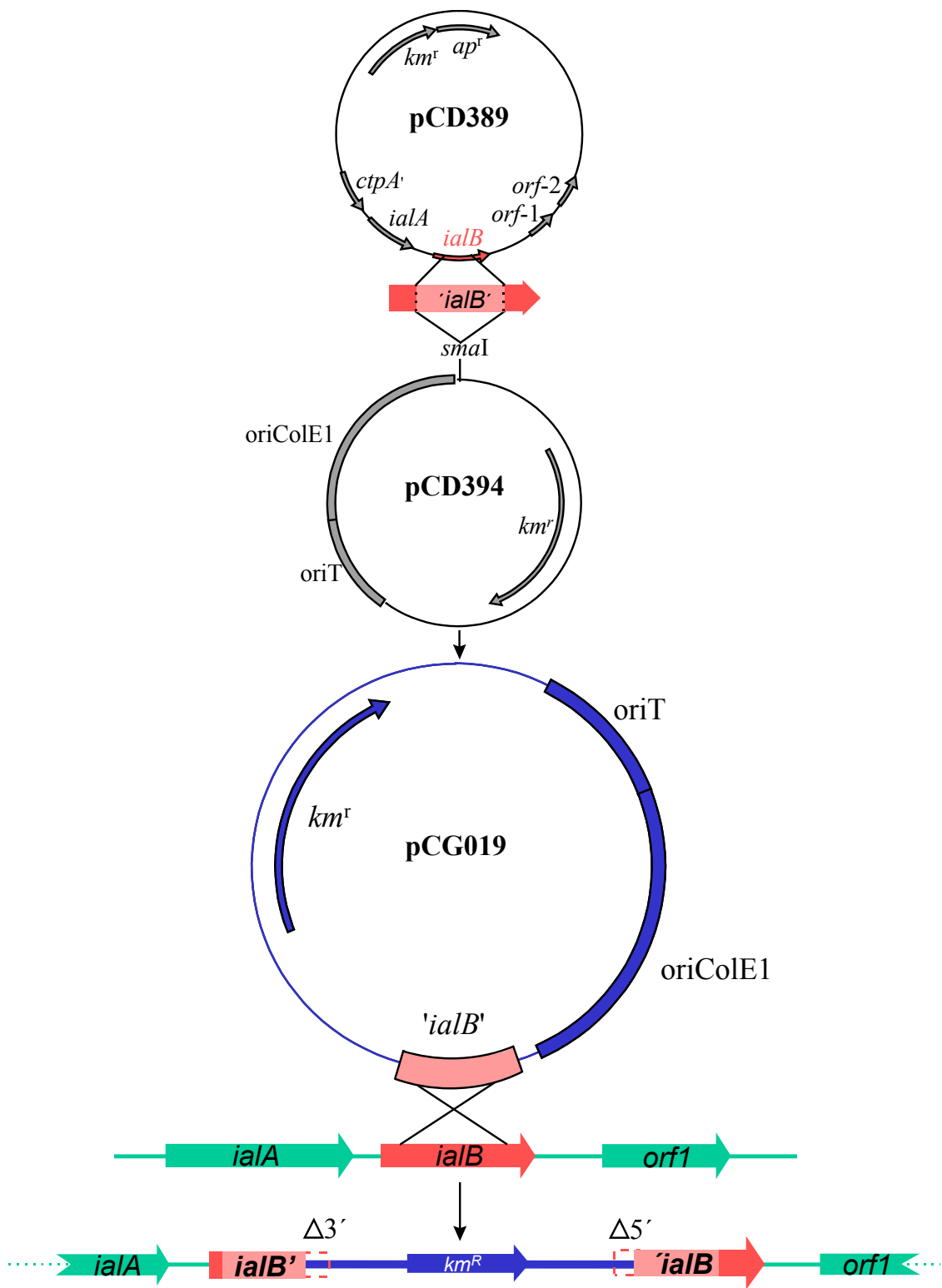
ialB

orf1

orf2

**Abb. 14:** Durch PCR mit der Primerkombination prCHD101 und prCHD103 von genomischer DNA von *B. tribocorum* amplifizierter Bereich, mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Mögliche Ribosomenbindungsstellen sind unterstrichen, eine mögliche Terminatorsequenz ist durch zwei gegenläufige Pfeile dargestellt, mögliche Schnittstelle einer Signalpeptidsequenz ist durch einen senkrechten Strich angezeigt.





**Abb. 15: Flußschema für die unvollständige Duplikation eines Genlokus am Beispiel von *ialB***

Ein internes *RsaI*-Fragment mit 344 bp (hellrot) von *ialB*, dem am 5'- und am 3'-Ende Teile fehlen, wird über *SmaI* in pCD394 integriert. Nach Konjugation in *B. tribocorum* kommt es zum Crossover des Plasmids mit der homologen Sequenz im Chromosom (dunkelrot). Es resultiert die unvollständige Duplikation von *ialB*.

Sequenz liegt doppelt vor. Entsprechende crossing-over-Ereignisse können durch das Vorhandensein des Selektionsmarkers heraus selektioniert werden. Wird nun als homologe Sequenz ein inkomplettes offenes Leseraster angeboten, welches am 5'Ende und am 3'Ende verkürzt ist, so kommt es nach einem Crossover im Prozeß der Replikation zu einer Duplikation des entsprechenden Genes. Die Duplikate sind jedoch am 5'Ende bzw. am 3'Ende deletiert. In Abb. 15 ist dieser Ablauf schematisch für den *ialB*-Locus von *B. tribocorum* gezeigt.

#### 4.2.2.2 Klonierung eines Mutagenese-Vektors für den *ialB*-Locus von *B. tribocorum*

Ein subgenisches Fragment vom *ialB*-Gen wurde durch Restriktion von pCD389 mit *RsaI* hergestellt und nach der Aufreinigung des 385 bp großen Fragmentes durch Ligation in das zuvor mit *SmaI* geöffneten pCD394 eingefügt (Abb. 15).

Dieses Minimal-Plasmid ist ein Abkömmling von pMin1 (Kahrs et al., 1995), ergänzt durch eine Kanamycin-Resistenz (Abb. 5). Es trägt einen *oriColE1* als Replikationsursprung, welcher in Bartonellen nicht repliziert. Es kann daher als Selbstmord-Plasmid für die single-Crossover-Mutagenese eingesetzt werden. Der vorhandene *oriTRP4* ermöglicht einen konjugativen Transfer des Plasmids.

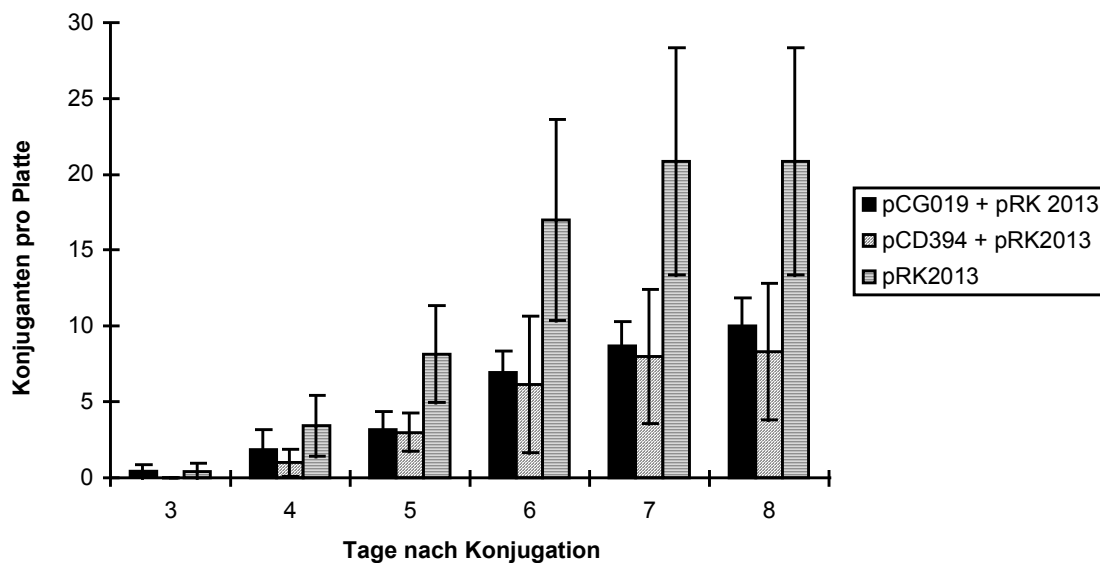
Nach erfolgter Ligation wurde die Orientierung des integrierten Fragmentes durch den analytischen Verdau des aufgereinigten Vektors mit *AgeI* und *Eco47-3* ermittelt. Es entstanden die beiden Vektoren pCG019 und pCG019iv, mit paralleler bzw. antiparalleler Richtung des '*ialB*'-Fragmentes zum  $Km^r$ -Gen. Die Ergebnisse wurden durch Sequenzierung der Insertionsstelle mit prCHD154 und prCHD155 bestätigt.

#### 4.2.2.3 Transfer des Mutagenese-Vektors in *B. tribocorum* durch Konjugation

Die beiden Mutationsplasmide pCG019 und pCG019iv sollten nun mittels dreipatentaler Konjugation in *B. tribocorum* 506 T eingebracht werden (Abb. 16).

Dazu wurde ein schon von Dehio et al. 1997 verwendetes Konjugationssystem genutzt, welches *E. coli*  $\beta$ 2150-Stämme verwendet, die auf die Zufuhr von externer Diaminopimelinsäure (DAP), einem Bestandteil der Bakterienzellwand, angewiesen sind. *E. coli*  $\beta$ 2150-Donor- und *E. coli*  $\beta$ 2150-Helferstämme können durch die Verwendung von DAP-freien Selektionsmedien nach erfolgter Konjugation effizient am Wachstum gehindert werden. Da *E. coli*  $\beta$ 2150 keine Transferfunktion auf dem Chromosom besitzt, wurde diese durch pRK2013 („Helferplasmid“) *in trans* zur Verfügung gestellt (Dehio and Meyer, 1997; Figurski and Helinski, 1979).





**Abb. 17: Kontrolle der Selbstmobilisierung von pRK2013 bei der dreiparentalen Konjugation von *B. tribocorum***

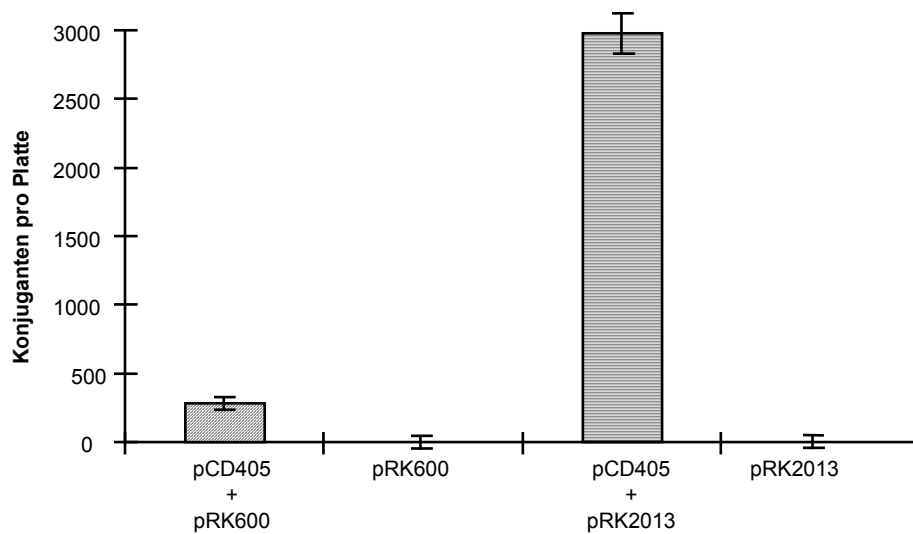
Dargestellt ist die Anzahl der kanamycinresistenten Klone zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Konjugation von *Bartonella* mit unterschiedlichen Donorstämmen als Ausdruck für die Mobilisierungsfrequenz der einzelnen Vektoren. Erkennbar ist die deutlich höhere Mobilisierungsfrequenz von pRK2013 im Gegensatz zu pCG019 und pCD394.

Die Konjugationen mit pCD394 als Donorplasmid ergaben kanamycinresistente Konjuganten in etwas geringerer Zahl als bei der Konjugationen mit pCG019, der die homologe Sequenz von *ialB* enthält. Es ist hier zu diskutieren, ob es zur Integration von pCD394 ins Chromosom von *B. tribocorum* 506<sup>T</sup> kommt, oder ob der kanamycinresistente Phänotyp auf eine andere Weise erzeugt wird.

Bei den Konjugationsansätzen ohne Donor, die nur mit einem Helferstamm angesetzt waren, entstanden sogar eine erhebliche Anzahl an kanamycinresistenten Konjuganten, deren Anzahl die Konjuganten in den Ansätzen mit pCG019 im Donorstamm um das Doppelte überstieg.

Eine effiziente Selektion auf kanamycinresistente Konjuganten, die durch Integration von pCG019 ins Chromosom entstanden sind, wurde dadurch erschwert.

Daher wurde das Helferplasmid pRK2013 durch pRK600 ersetzt, in welchem die Kanamycinresistenz durch eine Chloramphenicolresistenz ersetzt wurde (Figurski and Helinski, 1979). pRK600 wurde dazu aus *E. coli* MM394 durch (selbstmobilisierte) Konjugation in *E. coli* B2150 gebracht.



**Abb. 18: Vergleich der Mobilisationsfrequenz von pRK2013 und pRK600 in *E. coli***  
 Dargestellt ist die Anzahl der pCD405 tragenden Konjuganten (y-Achse) durch Mobilisation mit pRK600 im Vergleich zur Mobilisation mit pRK2013. Die Mobilisation durch pRK2013 ist um ca. eine Zehnerpotenz effektiver.

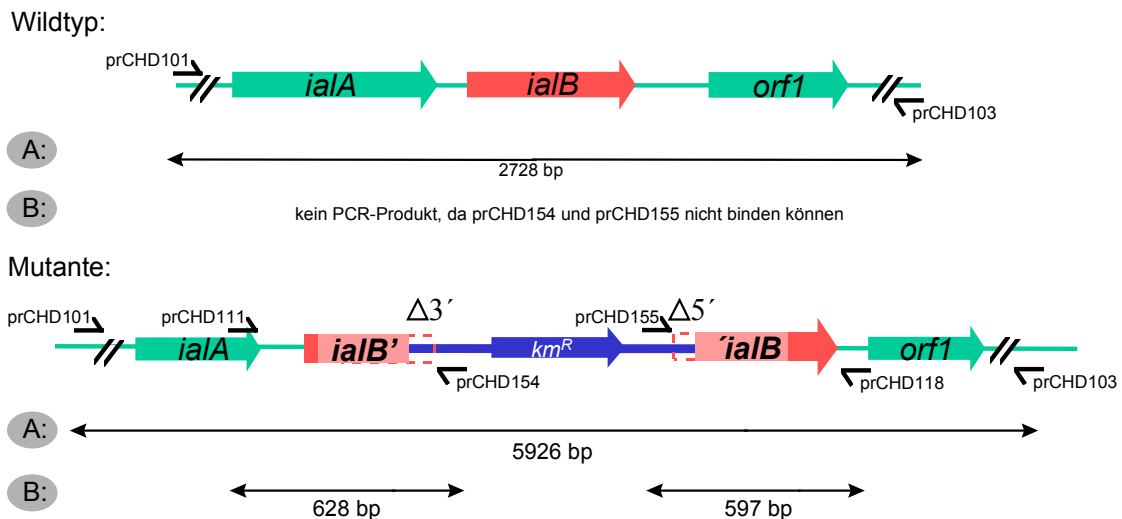
Das Helferplasmid pRK600 zeigte bei Versuchen mit *E. coli* eine etwa zehnfach geringere Mobilisation als pRK2013 (Abb. 18). In Konjugationen mit *B. tribocorum* 506<sup>T</sup> als Rezipient konnten keine Konjuganten erhalten werden.

Diese Ergebnisse machten eine genotypische Untersuchung der Konjuganten zur Identifizierung von Klonen, die durch Rekombination mit pCG019 einen kanamycinresistenten Phänotyp erhalten hatten, nötig.

### 4.2.3 Genotypische Analyse der Konjuganten

#### 4.2.3.1 Identifizierung der Defektmutanten

Zur Identifizierung der Defektmutanten sollte die Größenänderung des *ialA/B*-Locus durch Integration des Mutagenese-Vektors mittels PCR-Amplifikation nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurden zwei Strategien mit unterschiedlichen Primerkombinationen gewählt, die in Abb. 19 erläutert sind.



**Abb. 19: PCR-Strategien zur genotypischen Identifizierung und Analyse der Defektmutanten**

**A: Nachweis der Größendifferenz zwischen Wildtyp (WT) und Mutante (MUT) mittels Kolonie-long-PCR**

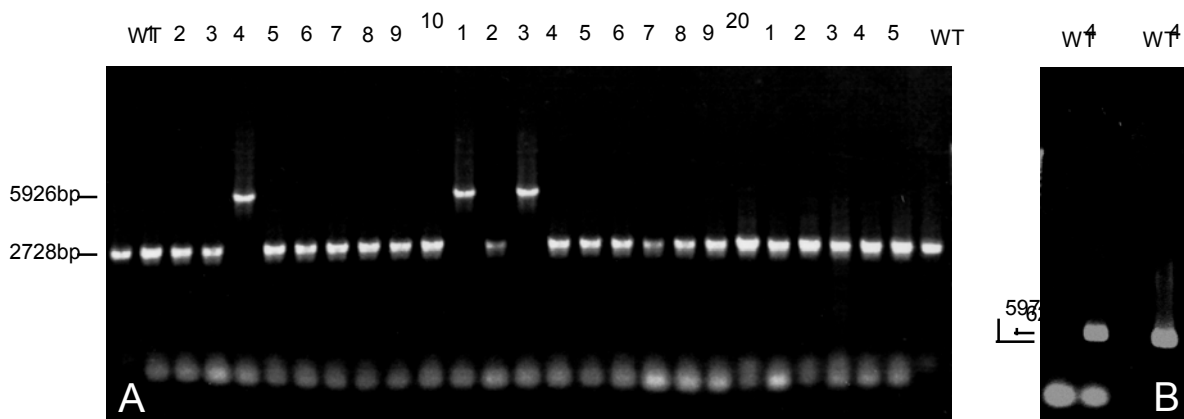
Durch Integration des Mutagenese-Vektors und dadurch erfolgte partielle Duplikation des *ialB*-Gens ergibt sich eine Längendifferenz des kompletten *ialA/B*-Lokus, der mit den Primern prCHD101 und prCHD103 amplifiziert werden kann. Die Größe des Fragments, welches im Wildtyp-Zustand entsteht, beträgt 2728 bp. Nach Integration von pCG019 beträgt die Größe des mit prCHD101 und prCHD103 amplifizierten Fragments 5926 bp.

**B: Nachweis der Integration des Mutagenese-Vektors durch Positionierung eines Primers im Chromosom und des zweiten Primers im Vektor („inside-outside-Strategie“) mittels Kolonie-PCR.**

Diese PCR ergibt nur dann ein Produkt, wenn die Integration von pCG019 im *ialB*-Lokus stattgefunden hat. Die Bindungsstelle je eines Primer liegt im Chromosom, direkt neben dem *ialB*-Lokus, der andere Primer bindet im Vektor-backbone von pCG019. Es kommt nur dann zu einer Amplifikation eines Produkts, wenn die Integration von pCG019 an der richtigen Stelle stattgefunden hat.

Ca. 25 der auf den Selektionsplatten gewachsenen Kolonien wurden nach acht Tagen überstrichen, um dann mit der Kolonie-PCR bzw. Kononie-long-PCR analysiert zu werden. Abb. 20 zeigt die gelelektrophoretische Auswertung der PCR-Produkte der ersten von drei Konjugationen.

In ca. 30 % der Fälle wurde der kanamycinresistente Phänotyp durch ein singuläres Crossover von pCG019 erzeugt und somit eine inkomplette Duplikation des *ialB*-Gens hervorgerufen. Die Konjugation mit pCG019iv ergab keine solchen Ereignisse. Daher wurde in den folgenden Konjugationen nur noch mit pCG019 gearbeitet und ähnliche Insertionsfrequenzen erreicht.



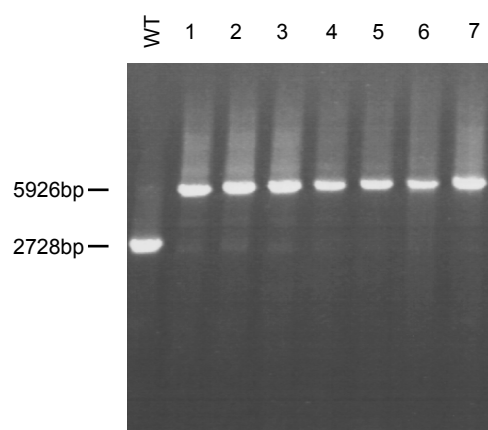
**Abb. 20: Ergebnisse der genotypischen Analyse des *ialA/B*-Locus von *B. tribocorum* nach Konjugation mit den Mutagenese-Vektoren pCG019 und pCG019iv**

A: Von 25 Kolonien (pCG019:1-13, pCG019iv:14-25), die mit prCHD101/103 getestet wurden, erhielten drei den kanamycinresistenten Phänotyp (#4, #11, #13), erkennbar durch die Größendifferenz des amplifizierten *ialA/B*-Lokus (Wildtyp 2728 bp), durch Integration von pCG019 (5926 bp).

B: PCR von Klon 4 mit prCHD111/154 und prCHD118/155. Die Integration fand an der richtigen Stelle statt.

#### 4.2.3.2 Stabilität der Defektmutanten

Um eine phänotypische Testung der Defektmutanten verlässlich durchführen zu können, musste sichergestellt werden, dass die Mutation auf genetischer Ebene stabil weitergetragen wird. Dies galt insbesondere für Bedingungen ohne Selektionsmöglichkeiten auf den Marker Kanamycin, wie es im Tiermodell der Fall ist.



**Abb. 21: Agarose-Gel der Kolonie-long-PCR von *B. tribocorum* Mut#4 bei Kultivierung ohne Selektionsdruck**

Die Spuren geben jeweils die Woche der Kultivierung an. Es wurde nach der Kultivierung der *ialA/B*-Lokus über o.g. Strategie amplifiziert. Die Größe des entstehenden Fragments gibt Auskunft darüber, ob es sich um den mutierten Genotyp (5926 bp) oder den durch Desintegration von pCG019 wiederhergestellten genetischen Wildtyp (2728 bp) handelt.

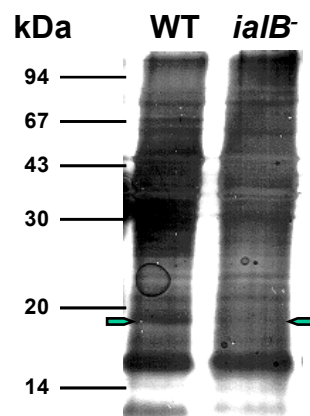
Dazu wurden 50 µl einer verdünnten Bakterienlösung [ $OD_{595\text{ nm}}=1,0 \times 10^{-12}$ ] von Mut#4 (*B. tribocorum* 506<sup>T</sup> *ialB*::pCG019) für je eine Woche auf CSB-Agar mit und ohne Selektionsbedingungen kultiviert und nach Anzahl der wachsenden Kolonien verglichen. Von einigen Kolonien der Platte ohne Selektion wurde eine Kolonie-long-PCR mit prCHD101/103 durchgeführt (Abb. 21).

Die PCR zeigte eine gleichbleibend intensive Bande bei 5926 bp, was dem mutierten Genotyp entspricht. Über den Zeitraum von sieben Wochen kam es zu keiner nachweisbaren Desintegration von pCG019. Diese Ergebnisse wurden durch Vergleich der Anzahl der Kolonien auf Nährböden mit und ohne Selektion bestätigt.

#### 4.2.4 Phänotypische Analyse der Defektmutanten durch SDS-PAGE

Um die Auswirkung der inkompletten Duplikation des *ialB*-Gens in *B. tribocorum* evaluieren zu können, sollte die Frage beantwortet werden, ob der knock out auf Proteinebene nachgewiesen werden könne. Hinweise, die für eine Lokalisation des IalB-Proteins in der äußeren Membran von *B. bacilliformis* sprachen (Coleman et al., 1998), wurden zum Anlaß genommen, die äußere Membranfraktion von *B. tribocorum* 506<sup>T</sup>-Wildtyp (WT) und der äußeren Membranfraktion von Mut#4 (*ialB*<sup>-</sup>) zu untersuchen.

Die folgende Abbildung (Abb. 22) zeigt die aufgetrennten Proteine auf einem silbergefärbtem SDS-Polyacrylamid-Gel.



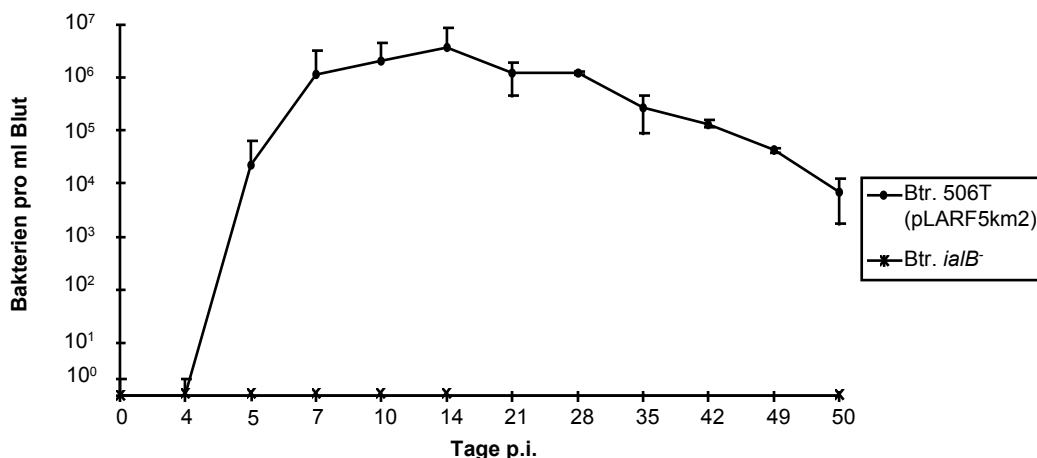
**Abb. 22: Silbergefärbte SDS-PAGE (15%) der Sarcosyl-unlöslichen Proteine der äußeren Membranen von *B. tribocorum* 506 T (WT) und Mut#4 der Konjugation mit pCG019 (*ialB*<sup>-</sup>)** Das abgeleitete Molekulargewicht von IalB liegt bei 19 kDa. Eine entsprechende Bande kann beim Wildtyp gefunden werden, fehlt jedoch bei der Mutante (siehe Pfeile).



Neuere Ergebnisse von Minnick et al. lokalisierten das *ialB*-Protein von *B. bacilliformis* allerdings in der inneren Bakterienmembran (Coleman and Minnick, 2001; Dehio, 2001).

#### 4.2.5 Phänotypische Analyse der Defektmutanten im Tiermodell

Ob der *ialB*-defiziente Genotyp in seinem Invasionsverhalten *in vivo* beeinflusst sein würde, sollte im zuvor etablierten Tiermodell untersucht werden. Dazu wurden Ratten mit Bakterien des *ialB*-defizienten Genotypes infiziert. Als Kontrolle diente ein plasmidtragender *B. tribocorum*-Stamm, *B. tribocorum* (pLAFR5km2), der die gleiche Kanamycinresistenz trug. Der Verlauf der Bakteriämie in fünf unterschiedlichen Infektionen wurde durch Kultivierung des Blutes zu unterschiedlichen Zeitpunkten verfolgt (Abb. 23).



**Abb. 23: Bakteriämie von je fünf Ratten nach Infektion mit *B. tribocorum*-Stämmen mit *ialB*-defizienten Genotyp und *B. tribocorum* (pLAFR5km2) als Kontrolle**

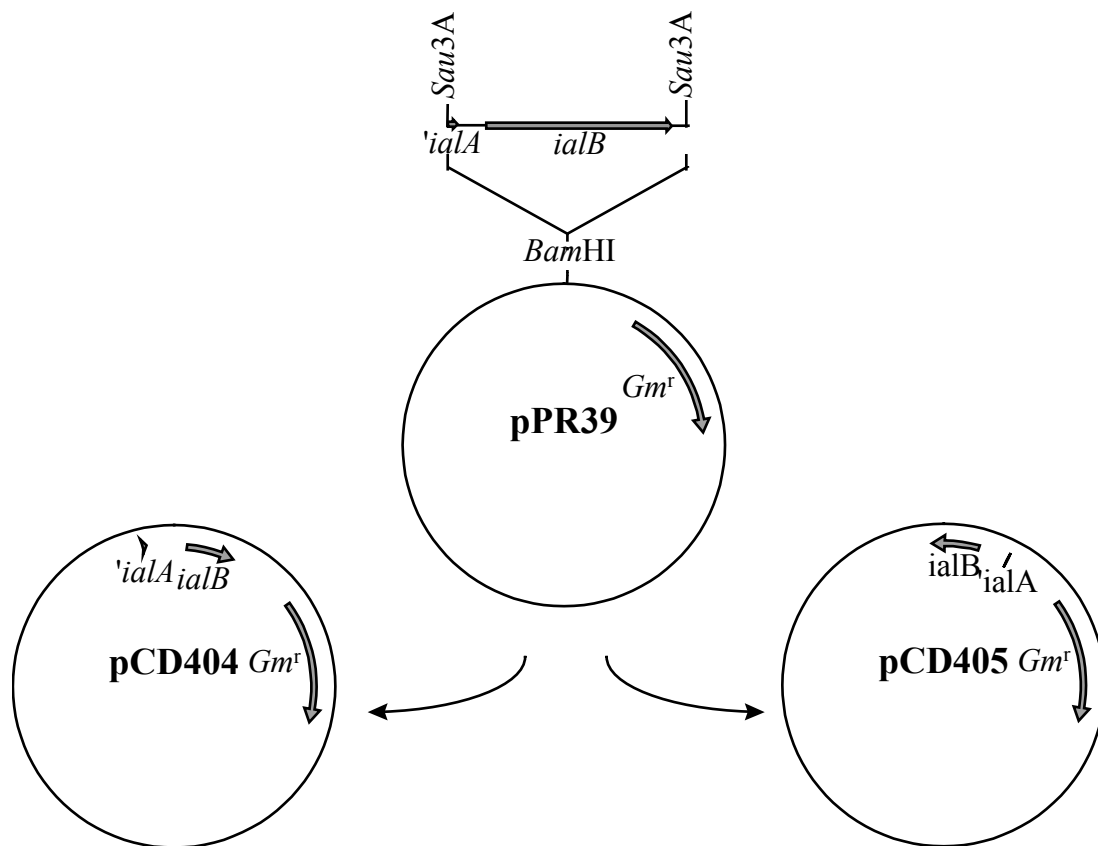
Die Infektion von Ratten mit dem *ialB*-defizienten Genotyp führt nicht zu einer Bakteriämie. Der Kontrollstamm kann einen normalen Infektionsverlauf etablieren.

In keinem der Tiere, die mit einem *ialB*-defizienten Stamm infiziert waren, konnten Bakterien aus dem Blut angezüchtet werden. Hingegen zeigten die Tiere, die mit *B. tribocorum* (pLAFR5km2) infiziert waren, einen nahezu identischen Infektionsverlauf im Vergleich zu den Experimenten, die mit *B. tribocorum-gfp* gemacht wurden; die Bakteriämie begann an Tag vier bis fünf, der höchste Titer wurde an Tag 10 bis 14 erreicht. Allerdings waren die maximalen Titer mit bis zu  $13 \times 10^6$  Bakterien pro ml Blut etwas geringer. Diese Ergebnisse zeigen, dass der *ialB*-defiziente Stamm von *B. tribocorum* 506<sup>T</sup> seine Infektiosität verloren hat.

#### 4.2.6 Klonierung eines Komplementationsvektors für *ialB*-defiziente *B. tribocorum*-Stämme

Für *B. tribocorum ialB::*(pCG019) sollte die Komplementation *in trans* erfolgen, also durch die Einführung des Wildtypgens auf einem Plasmid.

Dazu wurde in einen auf Gentamycin selektionierbaren Klonierungsvektor pPR39 (Ratet et al, 1988) das *ialB*-Gen von *B. tribocorum* und die davor liegende intergenische Region bis zum Ende des offenen Leserasters von *ialA* kloniert (Abb. 24). Die daraus resultierenden Vektoren pCD404 und pCD405 wurden sodann in *E. coli*  $\beta$ 2150 transformiert und mittels dreiparentaler Konjugation in *B. tribocorum* überführt.



**Abb. 24: Klonierung der Komplementationsvektoren pCD404 und pCD405**  
pCD389 wurde mit *Sau3A* geschnitten und das entstehenden 740 bp-Fragment, mit dem 3'-Bereich des ORFs von *ialA*, der intergenischen Region und des ORFs von *ialB*, wurde über ein Agarosegel aufgereinigt und in den mit *Bam*HI geschnittenen Vektor pPR39 ligiert.

#### 4.2.7 Analyse des Komplementationsvektors im Tiermodell

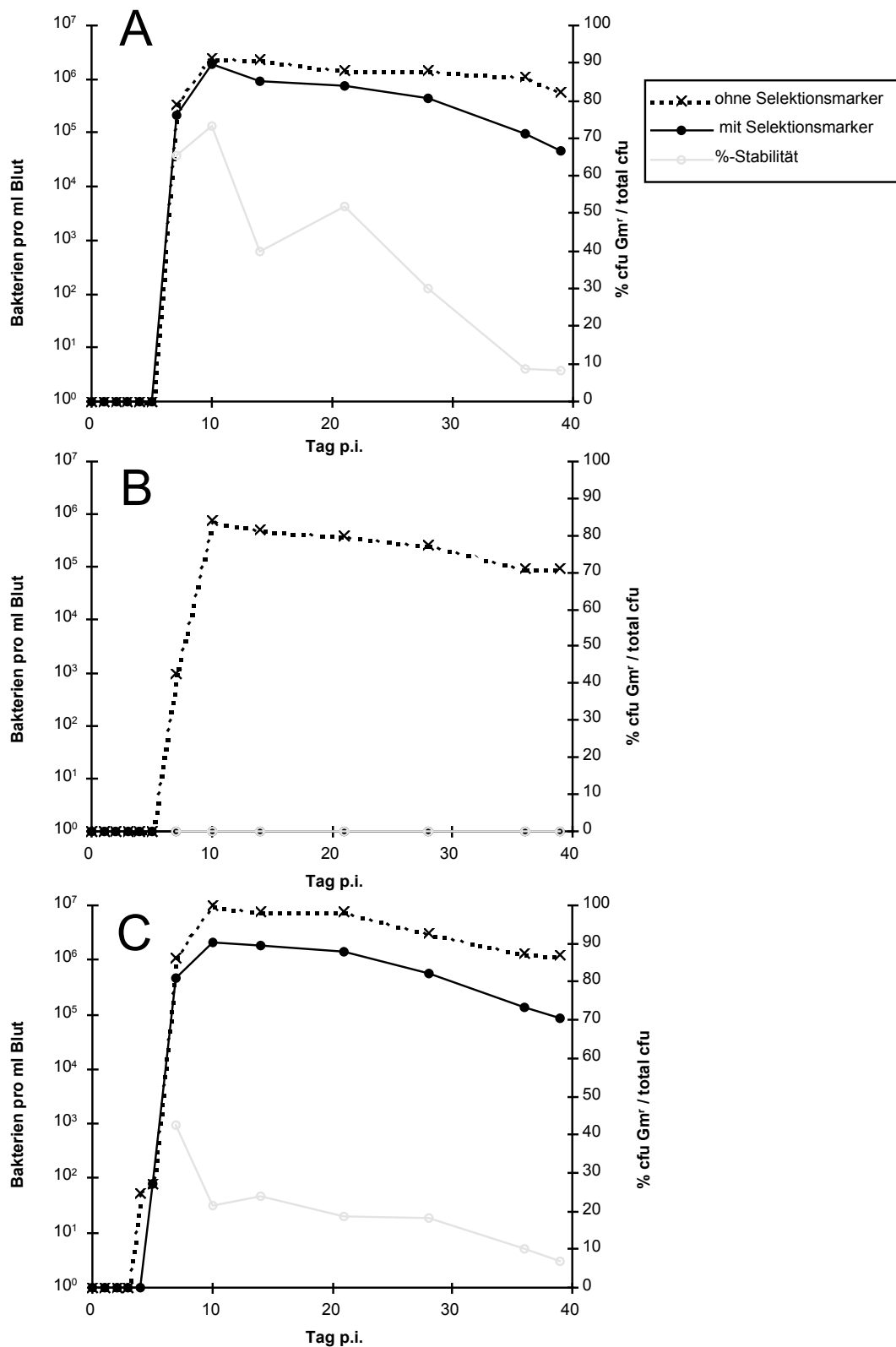
Eine wichtige Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit eines Komplementationsvektors ist dessen Plasmidstabilität, d.h. der dauerhafte Verbleib im Bakterium, auch wenn diese nicht unter Selektionsbedingungen wachsen. Außerdem darf das Tragen des Vektors keine anderen Eigenschaften des Bakteriums

beeinträchtigen oder verändern. Um die Eignung von pPR39 als Komplementationsvektor zu ermitteln, wurden pPR39, pCD404 und pCD405 durch dreiparentale Konjugation in *B. tribocorum* 506<sup>T</sup> (Wildtyp) eingebracht. Alle drei Stämme wurden dann im Rattenmodell auf ihre Fähigkeit, eine Bakteriämie hervorzurufen, analysiert.

Dazu wurden je eine Ratte mit *B. tribocorum* (pPR39), *B. tribocorum* (pCD404) oder *B. tribocorum* (pCD405) infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten Blut entnommen. Die Blutproben wurden zu gleichen Teilen auf Nährböden mit und ohne Selektionsmarker ausplattiert und in gleicher Weise bebrütet. So konnten zwei wesentliche Informationen erhalten werden: zum einen wurde die gesamte Anzahl der Bakterien im Blut bestimmt (Titer). Zum anderen wurde die Anzahl an Bakterien bestimmt, die noch den auf dem Plasmid kodierten Resistenzmarker Gentamycin trugen („Plasmidstabilität“). So konnte der Prozentsatz an Bakterien ermittelt werden, der das Plasmid während des Infektionsvorganges verloren hatten (Abb. 25).

Die Infektionsverläufe von *B. tribocorum* (pPR39) und *B. tribocorum* (pCD404) sind mit dem von *B. tribocorum* (pLAFR5 km2) vergleichbar. Die Infektion mit *B. tribocorum* (pCD405) rief wesentlich niedrigere Bakterientiter hervor. Hier konnten auch von Beginn der Bakteriämie an keine gentamycinresistenten Bakterien angezogen werden.

pPR39 und pCD404 konnten über den gesamten Infektionszeitraum von 40 Tagen Gentamycinresistenz vermitteln. Bei *B. tribocorum* (pPR39) waren nach zehn Tagen nur noch 20 % der Bakterien gentamycinresistent. Dieser Prozentsatz sank dann bis zum Ende des Versuchs auf 10 % ab. Die CFU von *B. tribocorum* (pCD404) waren nach zehn Tagen nur noch zu 70 % gentamycinresistent, zum Ende des Versuchs sank der Prozentsatz dann auch auf 10 % ab. Insgesamt beschreibt die Kurve, die den prozentualen Anteil der Anzahl der resistenten Bakterien an der Gesamtzahl der anzüchtbaren Klone zeigt einen sehr unregelmässigen Verlauf.



**Abb. 25: (A) *B. tribocorum* (pPR39), (B) *B. tribocorum* (pCD404) oder (C) *B. tribocorum* (pCD405) infiziert waren. Titerbestimmung auf Nährmedien mit und ohne Selektionsmarker. Durch den Vergleich der Titerbestimmung mit und ohne Selektionsmedium kann eine Aussage über die Präsenz des das Resistenzgen tragende Plasmid getroffen werden (=Plasmidstabilität). Man beachte die fehlende Stabilität von pCD404.**

#### **4.2.8 Komplementation der *ialB*-defizienten *B. tribocorum*-Stämme**

Bei diesem Versuch kam es darauf an, die Fähigkeit der *ialB*-Mutanten zur Etablierung einer Bakterämie *in vivo* wieder herstellen. Daher wurde darauf geachtet, die Mutanten keiner unnötigen Passagierung über Nährböden auszusetzen. Die Konjugation der Mutanten mit dem Komplementationsplasmid wurde daher direkt nach deren genotypischer Analyse durchgeführt. Es wurden alle Vektoren (pPR39, pCD404 und pCD405) und auch eine Kombination von pCD404 und pCD405 konjugiert und im Rattenmodell getestet. In keinem der Fälle konnte jedoch eine Bakterämie festgestellt werden.

## 5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zum Verständnis der Erythrozyteninvasion von *Bartonella spezies* beizutragen. Wichtige Grundlagen wurden in dieser Arbeit für die Beantwortung dieser Frage gelegt:

- Etablierung eines *in vivo*-Modells der Erythrozyteninvasion durch *B. tribocorum-gfp* in der Ratte und Beschreibung der Interaktion von *B. tribocorum-gfp* mit Erythrozyten *in vivo* unter besonderer Berücksichtigung der:
  1. Intraerythrozytären Lokalisation
  2. Frage nach der Interaktion mit erythropoetischen Vorläuferzellen
- Arbeiten zu einem lokusspezifischen Mutagenesesystem und Anwendung dieses Systems zur Klärung der Rolle des *ialB*-Lokus für die Erythrozyteninvasion *in vivo*.

### 5.1 Etablierung eines *in vivo*-Modells der Erythrozyteninvasion

Die Entwicklung eines gut handhabbaren Tiermodells der Erythrozyteninvasion von *Bartonella spezies* war aus mehreren Gründen wichtig: zum einen sollte dieses System dazu verwendet werden, den Infektionsverlauf *in vivo* und die Interaktion von *Bartonella spezies* mit Erythrozyten im natürlichen tierischen Wirt exakt zu beschreiben. Zum anderen hatte sich gezeigt, daß *in vitro*-Modelle der Erythrozyteninvasion nur sehr bedingt aussagekräftige Ergebnisse lieferten (Mehock et al., 1998). Daher sollte ein *in vivo* System als Grundlage für die phänotypische Testung von Defektmutanten (s.u.) (Mitchell and Minnick, 1995) entwickelt werden.

#### 5.1.1 Das Modellsystem Ratte

Um *Bartonella spezies in vivo* zu untersuchen, wurde die Ratte als Infektionsmodell gewählt. Für diese Tiere wurde *B. tribocorum* als natürlicher Parasit beschrieben, und erste experimentelle Infektionen waren gelungen (Heller et al., 1998). Bisher wurden experimentelle Infektionen mit *Bartonella spezies* im natürlichen tierischen Wirt nur für *B. henselae* in der Katze (Abbott et al., 1997; Greene et al., 1996; Guptill et al., 1997; Kordick and Breitschwerdt, 1997; Regnery et al., 1996), sowie die experimentelle Infektionen von Woll-Ratten (*Sigmodon hispidus*) (Kosoy et al., 1999) und verschiedenen Labormäusen (Balb/c, C57Bl/6, Swiss mice) (Barrat et al., 1999) beschrieben (siehe Tab. 3). In den beiden letztgenannten Fällen wurde allerdings mit

Primärisolaten aus wildlebenden Tieren infiziert, ohne zu bestimmen, um welche *Bartonella spezie*s es sich hierbei handelt.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Infektionsmodellen bietet das hier etablierte Modellsystem viele Vorteile: neben der einfachen Handhabung dieser Tiere sind sie kostengünstig, und es existiert ein großer experimenteller Erfahrungsschatz. Im Hinblick auf weiterführende Fragestellungen im Bereich der Immunologie gibt es darüber hinaus viele etablierte Instrumente (z.B. Antikörper oder immundefiziente Inzuchtstämme), die das Modellsystem Ratte zu einer wichtigen und vorteilhaften Arbeitsgrundlage machen. Allerdings sollte die Maus als ebenfalls etabliertes Infektionsmodell in mancherlei Hinsicht als überlegen angesehen werden (Koesling et al., 2001).

Um die Infektion von *B. tribocorum* im Tier genau analysieren zu können, wurde in dieser Arbeit ein durch R. Schülein (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Tübingen) genetisch veränderter Stamm verwendet, der das green fluorescent protein (GFP) exprimiert (Dehio et al., 1998; Schülein et al., 2001). So konnte der Infektionsverlauf mit Hilfe der Durchflußzytometrie (FACS) und der Laser-scanning-Mikroskopie untersucht werden.

GFP-exprimierende *B. quintana* wurden kürzlich zur Untersuchung der Transmitterfunktion von humanen Körperläusen in einem Infektionsmodell mit infizierten Kaninchen eingesetzt. In diesen Experimenten wurde GFP jedoch nur zur Identifizierung von *Bartonella*-Kolonien in Ausstrichen auf Nährböden genutzt (Fournier et al., 2001).

### **5.1.2 Verlauf der Bakteriämie in der Ratte**

Die intravenöse Infektion der Ratten mit *B. tribocorum-gfp* wurde von allen Versuchstieren über die gesamte Versuchsdauer ohne äußere Zeichen der Beeinträchtigung und ohne klinische Zeichen einer Infektion toleriert.

Die Ergebnisse der Blutkultur und der Auswertung der FACS-Analysen zeigten ein einheitliches Bild. Nach der Clearance des bakteriellen Inokulums während des ersten Tages sind Bakterien nach drei bis vier Tagen p.i. erstmals im Blut nachweisbar. Bis zum Tag 6 bis 10 p.i. kommt es zu einer raschen Vermehrung der Bakterien im Blut. Danach kommt es zu einer stabilen Phase der Infektion, während der die Bakterientiter konstant bleiben. Diese wird gefolgt durch eine langsame Abnahme der Anzahl der Bakterien.

Der Infektionsverlauf kann aufgrund dieser Beobachtungen in vier Phasen eingeteilt werden:

1. präbakterämische Initiationsphase
2. bakterämische Vermehrungsphase
3. Phase der Persistenz
4. Phase der Elimination

Der zeitliche Ablauf der Beobachtungen sind sehr gut mit den Kenntnissen aus den anderen Tiermodellen vereinbar. Ein Vergleich ist in der nachfolgenden Tabelle aufgestellt.

Tier/ Infektion mit	Bakterämie (Tage p.i.)			Autor
	Beginn	Höhepunkt	Ende	
<b>Ratte</b> <i>B. tribocorum</i>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>70</b>	<b>eigene Studie</b>
Maus <i>B. grahamii</i>	5-7	14-21	77	(Koesling et al., 2001)
Ratte <i>B. tribocorum</i>	7	14-28	56-70	(Hansmann, 2000)
Woll-Ratte <i>B. spezies</i>	<7	14	49-105	(Kosoy et al., 1999)
Katze <i>B. henselae</i>	7	n.n.	>56	(Regnery et al., 1996)
Katze <i>B. henselae</i>	<14	n.n.	112	(Guptill et al., 1997)
Katze <i>B. henselae</i>	11	n.n.	n.n.	(Kordick and Breitschwerdt, 1997)
Katze <i>B. henselae</i>	7	14	56-126	(O'Reilly et al., 1999)
Katze <i>B. henselae</i> und <i>B. clarridgeiae</i>	intermittierend von Tag 4 bis Tag 454 nachgewiesen			(Kordick et al., 1999)

**Tab. 4: Vergleich der experimentellen Infektionen von natürlichen tierischen Wirten mit *Bartonella spezies* (=autologe Infektion)**

Gemeinsames Kennzeichen dieser Modellinfektionen ist ihre lange Dauer, der o.g. beschriebene vierphasige Verlauf mit der präbakterämischen Initiationsphase sowie ein hoher Manifestationsindex, d.h. jede Inokulation führte zu einer manifesten Infektion. Die Besiedlung scheint dabei um so erfolgreicher, je weniger massiv die



Auseinandersetzung zwischen Wirt und Bakterium ist. Dafür könnte die Beobachtung sprechen, dass ein hoher Bakterientiter in der Phase der Persistenz eine kürzere Infektionsdauer nach sich zieht. Ähnliche Schlußfolgerungen wären für die Beobachtung möglich, dass ein langsamer Anstieg der Bakterienzahl pro Erythrozyt zu einer höheren Gesamtzahl an Bakterien pro Erythrozyt führt. In dieses Bild würde auch die Tatsache passen, dass niedrigere Infktionsdosen im Wollrattenmodell von Kosoy et al. zu einer stärkeren und länger andauernden Bakterämie führten (Kosoy et al., 1999). Zusammenfassend lassen diese Daten das Bild entstehen, dass es sich bei der Etablierung der Infektion von *B. tribocorum* in seinem natürlichen Wirt um einen mehrstufigen Prozeß handelt, bei dem die Besiedlung der Erythrozyten im peripheren Blut nicht den ersten Schritt darstellt, erkennbar an der präbakterämischen Initiationsphase.

Es handelt sich nicht um eine perakut verlaufende Bakterämie, die mit einer erheblichen Reaktion des Wirtsorganismus (bis hin zu einer septischen Reaktion) einhergeht, sondern um einen subklinisch verlaufenden Infektionsprozeß.

### **5.1.3 Die FACS-Analyse und gfp als Untersuchungsmethode für einen hämotropen Infektionsverlauf**

Die FACS-Analyse in Kombination mit gfp-markierten Bakterien wurde erstmals zur Untersuchung eines Bakterämieverlaufs eingesetzt. Der Vergleich der Ergebnisse mit die den Ergebnissen aus der Blutkultur als Standardmethode ergab eine 233 %ige Streuung der durch die Ergebnisse. Ein mittlerer Faktor von 2,33 ist allerdings nicht als erheblich einzustufen. Die Ergebnisse beider Methoden liegen in der gleichen Größenordnung. Berücksichtigt man, dass die Ergebnisse über die Zeit mehrere Größenordnungen durchlaufen, so kann die FACS-Analyse durch den Vergleich mit der Blutkultur als Standardmethode als zuverlässige Meßmethode angesehen werden. In der Praxis hat die Methode den Vorteil, dass ein Ergebnis sofort vorliegt und dass nicht steril gearbeitet werden muß. Der Nachweis der ersten Bakterien im Blut gelang einen Tag verzögert im Vergleich zur Blutkultur. Außerdem konnte die Bakterämie nicht so lange nachgewiesen werden wie durch Kultivierung.

### **5.1.4 Interaktion mit Erythrozyten**

Die intraerythrozytäre Lokalisation von *B. tribocorum* konnte im Verlauf der experimentellen Infektion von Ratten eindeutig festgestellt werden. Darüber hinaus

konnte gezeigt werden, dass es zu einer Teilungsaktivität von *B. tribocorum-gfp* im intraerythrozytären Kompartiment kommt. Das hier etablierte Tiermodell eignet sich also hervorragend als *in vivo*-Modell der Erythrozyteninvasion.

Die intraerythrozytäre Lokalisation bietet viele Vorteile für das kolonisierende Bakterium: Dieses Kompartiment ist vor der Immunantwort durch Antikörper geschützt. Es kann keine intrazelluläre Antigenprozessierung stattfinden, da keine Lysosomen vorhanden sind; somit ist der eindringende Organismus auch vor der spezifischen, zellulären Immunantwort verborgen (Reynafarje and Ramos, 1961).

Neben dem Schutz vor der Immunabwehr des Wirtes bietet der Erythrozyt ein optimales Nährstoffangebot, denn Bartonellen benötigen als Wachstumsfaktor Hemin, welches intraerythrozytär reichlich vorhanden ist (Sander et al., 2000).

Die Lebensdauer eines roten Blutkörperchens ist beim Menschen mit 120 Tagen im Vergleich zu anderen Zellen recht lang. Dieses Kompartiment eignet sich auch aus diesem Grund für die langandauernde Besiedlung.

Nicht geklärt werden konnte in dieser Arbeit, ob es durch die Invasion und nachfolgende Teilungsaktivität der Bakterien im intraerythrozytären Kompartiment zur Lyse der Erythrozyten oder frühzeitigen Elimination durch das retikuloendotheliale System kommt.

R. Schülein und A. Seubert (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Tübingen) konnten in weiteren Experimenten zeigen, dass die intraerythrozytäre Teilungsaktivität von *B. tribocorum-gfp* nach ca. 15-21 Tagen p.i. sistiert (Schülein et al., 2001). Wie es zu diesem Phänomen kommt, ist bisher unklar. Vielleicht kommt es zu einem Replikationsstop durch Verarmung an Nährstoffen oder die Anhäufung toxischer Stoffwechselendprodukte.

Möglicherweise handelt es sich aber auch um eine aktive Regulation der Teilungsaktivität, reguliert durch Botenstoffe, die Informationen innerhalb der Bakterienpopulation übermitteln. Dieser Prozeß, der als quorum sensing (quorum= beschlußfähige Gruppe, sensing = messen, fühlen) bezeichnet wird, erlaubt es einzelligen Organismen wie Bakterien, abhängig von der Zelldichte der eigenen Population im augenblicklichen Lebensraum, unterschiedlich zu reagieren. Dieses wird durch Sekretion von Signalmolekülen erreicht, die in der Zellpopulation akkumulieren. Die regulative Antwort der einzelnen Organismen hängt von der Konzentration der

Signalstoffe ab. *Myxococcus xanthus* koordiniert über quorum sensing das Verhalten einer Population unter Nährstoffmangel, was dazu führt, dass ein Fruchtkörper gebildet wird, der Sporen enthält. Auf diese Art und Weise wird aber auch die Produktion bestimmter Antibiotika in *Streptomyces spezie*s reguliert, ebenso wie die Fähigkeit zur Transformation von *Bacillus subtilis*. Das am besten untersuchte Beispiel ist allerdings die Regulation der Luminescens-Aktivität von *Vibrio fischeri*, die erst ab einer bestimmte Zelldichte in der Bakterienpopulation beginnt (Bassler, 1999; Dale, 2001). Möglicherweise wird im abgeschlossenen intraerythrozytären Kompartiment das Wachstum dieser *B. tribocorum*-Population ebenfalls auf diese Weise reguliert, mit dem Ziel des Erhalts des vorteilhaften intraerythrozytären Kompartiments als Besiedlungsnische.

R. Schülein und A. Seubert fanden außerdem, dass die Zirkulationszeit der invadierten Erythrozyten im Vergleich zu nicht invadierten Erythrozyten kaum verkürzt ist, die Invasion und Besiedlung von *B. tribocorum-gfp* also als „nicht-lytisch“ betrachtet werden kann. In der replikativen Phase der intraerythrozytären Bakterien haben die invadierten roten Blutzellen einen leicht erhöhten turn-over. In der darauf folgenden nicht replikativen Phase der Bakterien werden die Wirtszellen jedoch nicht schneller abgebaut (Schülein et al., 2001). Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass es im Kolonisierungsprozess wiederholt zu Reinfektionen von Erythrozyten kommt, was an sprunghaften Anstiegen der Zahl der invadierten Erythrozyten bis zur vierten Woche p.i. deutlich wurde. Von welchem Ort aus diese Reinfektion stattfindet bleibt unklar (Schülein et al., 2001).

Wozu dient diese offensichtlich auf eine lang andauernde Kolonisation ausgelegte Infektion des natürlichen Wirts durch *Bartonella spezie*s?

Die wenig immunogene, nicht lytische Vermehrungs- und Persistenzphase in den roten Blutzellen ist möglicherweise deshalb im Lebenszyklus von *Bartonella spezie*s wichtig, da es den Bakterien durch diese Lokalisation möglich ist, über blutsaugende Insekten andere Organismen zu infizieren (Ihler et al., 1996). Für die Infektion von Katze zu Katze wurde eindeutig gezeigt, daß eine Übertragung durch die Katze besiedelnde Flöhe möglich ist (Chomel et al., 1996; Foil et al., 1998). Auch für *B. bacilliformis* weiß man um die Bedeutung des Insektenvektors, der Schmetterlingsmücke, für die Infektion des Menschen (Ihler et al., 1996).

### 5.1.5 Die präbakterämische Phase: Untersuchung der ersten drei Tage der Infektion

Die als präbakterämische Phase bezeichnete abakterämische Periode des Infektionsverlaufes wurde bisher bei allen autologen (= Infektion des Wirts mit dem natürlich in ihm vorkommenden Bakterienstamm) experimentellen Infektionen gefunden und konnte auch in den hier vorgestellten Versuchen klar abgegrenzt werden (Tab. 3). Was während dieser Phase geschieht, war bisher unklar.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse ermöglichten es, das Verhalten von *B. tribocorum-gfp* während dieser Zeit quantitativ im Blut, Leber, Milz und Knochenmark zu erfassen.

Bereits nach einer Stunde sind 50 % der injizierten Bakterien aus dem Blutstrom entfernt, nach 24 Stunden sind keine Bakterien mehr im Blutstrom nachweisbar.

Die Möglichkeit, dass die Bakterien innerhalb der ersten Stunde durch die unspezifische Immunabwehr des peripheren Blutes abgeräumt werden, ist unwahrscheinlich. In diesem Fall wäre zu erwarten, dass die phagozytischen Blutzellen in der FACS-Analyse mit GFP-positiven Signalen registriert worden wären. Experimente mit Anti-CD45-Antikörperfärbungen des peripheren Blutes als pan-Leukozytenmarker zeigten keine Akkumulation von GFP-positiven Ereignissen in diesen Zellen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es nach experimenteller, intravenöser Infektion von Ratten mit *B. tribocorum-gfp* zu einer Akkumulation der Bakterien in der Leber zwei Stunden p.i. gekommen ist, die bis 24 Stunden p.i. nachweisbar war. Direkt vergleichbare Daten von autologen Infektionsexperimenten mit *Bartonella spezieis* gibt es bisher nicht.

Kerem et al. konnten in einem heterologen Mausmodell mit experimenteller intraperitonealer Infektion von BALB/c-Mäusen mit *B. henselae* sechs Stunden p.i. bis zum Ende des Beobachtungszeitraums nach sieben Tagen, bakterielle DNA nur in der Leber und den mesenterialen Lymphknoten dieser Tiere nachweisen. Die Kultur der Bakterien aus Milz, Leber, Lymphknoten und Gehirn gelang nur in den ersten 24 Stunden p.i. und nur bei hohen Infektionsdosen ( $3 \times 10^8$  CFU) (Karem et al., 1999).

In einer weiteren Studie mit C57BL/6-Mäusen, die ebenfalls mit *B. henselae* infiziert wurden, konnte über sechs Tage aus Leber und Milz Bakterien kultiviert werden. Die Kultur aus dem Blut gelang nie. In der Leber konnte über drei Monate *B. henselae*-

DNA nachgewiesen werden. In anderen Organen war dies nicht möglich (Regnath et al., 1998).

Die Elimination von Antigenen ist eine der Hauptaufgaben der Leber, die dadurch eine wichtige regulative Funktion für das Immunsystem hat. Die meisten der in die Blutzirkulation eingetretenen Bakterien werden hier aus dem Blut entfernt. Die Filterfunktion ist aber auch für aus dem Darm aufgenommene Antigenstrukturen aus der Nahrung und der intestinalen Darmflora wichtig. Durch den sehr hohen Blutdurchfluß durch dieses Organ (beim Menschen wird täglich 360 Mal das gesamte Blut durch die Leber gepumpt) und dem 5-7 µm messenden, geringen Durchmesser der Lebersinusoiden, gelangen im Blut vorhandene Antigene sehr schnell in engen Kontakt mit den Blutgefäßen der Leber. Im Periportalbereich (Bereich des einströmenden Blutes aus dem Darm) der Lebersinusoiden befindet sich eine große Anzahl spezieller, gewebsständiger Makrophagen, die Kupffer'schen Sternzellen in den Gefäßwänden, die in dieser Position Antigene sehr effizient eliminieren können. Außerdem sind die Endothelzellen der Sinusoiden stark endozytotisch aktiv. Reviews: (Cousens and Wing, 2000; Knolle and Gerken, 2000; Wisse et al., 1996).

Die Akkumulation von *B. tribocorum-gfp* in der Leber der Versuchstiere nach der i.v.-Infektion könnte also ein unspezifisches Ereignis als Folge der Filterfunktion der Leber sein. Allerdings müßte man sich dann die Frage stellen, warum in einigen Fällen noch so lange genetisches Material von *Bartonella* gefunden werden kann.

Viele Mikroorganismen besiedeln sehr spezifisch die Leber, und nutzen diese als Ausgangspunkt für die Kolonisation des Organismus.

Solch ein Infektionsweg ist zum Beispiel für *Listeria monocytogenes* als bakterielles Pathogen beschrieben. Die Bakterien sind nach experimenteller i.v.-Infektion von Mäusen nach zehn Minuten aus der Blutzirkulation entfernt. Sie adherieren an Kupffer'sche Sternzellen und sind nach sechs Stunden zu 90 % in den Hepatozyten zu finden. Die Infektion mit *Listeria monocytogenes* ruft dabei eine heftige Immunantwort hervor, die von ortsständigen Zellen der Leber ausgeht, und zur Rekrutierung peripherer Immunzellen, v.a. neutrophiler Granulozyten führt. Dazu gehört, dass von den Kupffer'schen Sternzellen die Interleukine IL-6, IL-1β und TNF-α gebildet werden, die stimulierend auf Neutrophile wirken, außerdem IL-12 und IL-18,

die alle als proinflammatorische Zytokine angesehen werden. Von den Endothelzellen der Sinusoide und den Kupffer'schen Sternzellen werden Zelladhäsionsmoleküle exprimiert, die zur Adhäsion von Neutrophilen und zur Eindämmung der *Listeria*-Infektion wichtig sind. Auch Hepatozyten könnten durch ihre Produktion von Akute-Phase-Proteinen wichtig für die Kontrolle der Infektion sein. In einer späteren Phase wird die Infektion durch die dann einsetzende adaptive Immunantwort terminiert (Cousens and Wing, 2000).

Auch von den Erregern der Malaria, *Plasmodium* spezie ist ein Hepatotropismus bekannt, und obwohl es sich hier um Protozoen handelt, sollen kurz einige Besonderheiten in deren Lebensweise in Bezug auf die Kolonisation der Leber dargestellt werden.

Auch hier gibt es nicht nur humanpathogene Stämme, sondern u. a. auch murine Pathogene (und viele andere), die oft im Tiermodell beschrieben werden. So konnte in verschiedenen experimentellen Infektionen gezeigt werden, dass Plasmodien innerhalb von 15-60 Minuten aus dem peripheren Blutstrom entfernt werden und spezifisch in der Leber akkumulieren (Meis et al., 1983). Diese Filterfunktion der Leber konnte auch *in vitro* am isolierten Organ gezeigt werden. Diese Beobachtung war nicht an die Vitalität des Parasiten gebunden. Auch abgetötete *Plasmodium* spezie wurden mit einer Effizienz von 70 % aus der Zirkulation entfernt (Sinden and Smith, 1982).

*Plasmodium spezie* sind, wie *Bartonella spezie* auch, obligat intrazellulär vorkommende Pathogene. In der Leber können diese mit drei Zellarten interagieren: dem Gefäßendothel, den Hepatozyten und den Kupffer'schen Sternzellen.

Die erste Phase der Vermehrung durchlaufen diese in den Hepatozyten. Die Hepatozyten können *in vitro* direkt invadiert werden (Pirson, 1982). *In vivo* liegen diese jedoch hinter dem die Blutgefäße auskleidenden Endothel und einem sich dahinter befindenden Extrazellularraum, dem Dissé-Raum. Das Endothel ist ein sogenanntes „fenestriertes Endothel“, welches ca. 0,1 µm große Interzellularspalten aufweist und keine durchgehende Basalmembran hat. Trotzdem sind die Fenster nicht frei durchgängig und für Plasmodien viel zu klein. Experimentelle Daten sprechen dafür, dass Kupffer'schen Sternzellen eine Transportfunktion über die Endothelbarriere hinweg übernehmen, und die Plasmodien aus dem Blutstrom an die Hepatozyten herantransportieren (Meis et al., 1983; Sinden and Smith, 1982). Es könnte aber auch sein, dass die Parasiten direkt in die Hepatozyten eindringen, indem sie an Mikrovilli

dieser Zellen binden, die durch das fenestrierte Endothel in das Sinusoidallumen hineinhängen. Der Transport in die Hepatozyten erfolgt auf jeden Fall sehr schnell, denn schon nach einer Stunde p.i. konnten Sporoziten in diesen Zellen nachgewiesen werden (Meis et al., 1983). Die Infektion der Hepatozyten wird mit der Ausschüttung von  $\text{INF}\gamma$  und Induktion einer Stickstoffmonoxid-Synthase beantwortet. Die Überlebensstrategie von *Plasmodium* scheint darin zu bestehen, sich sehr rasch und massenhaft in den Leberzellen zu vermehren und so das Immunsystem des Wirts zu überrollen (Hildebrandt, 1996). Nach dieser initialen Vermehrungs- und Reifungsphase verlassen die Pathogene die Hepatozyten, um Erythrozyten zu invadieren. Interessant ist, dass einige Erreger in den Leberzellen in Form von Hypnozoiten verbleiben, die ihren Stoffwechsel auf ein Minimum einschränken, und nach Jahren eine erneute klinische Infektion auslösen können. Auf bisher ungeklärte Weise wird eine Immunantwort gegen befallene Wirtszellen verhindert (Hildebrandt, 1996). Review: (Sinnis and Sim, 1997).

Warum zeigen diese Pathogene einen so ausgeprägten Hepatotropismus mit sehr rascher Aufnahme in die Hepatozyten? Die Leber, als immunologisch sehr kompetentes Organ müßte die Besiedlung von Pathogenen doch gut verhindern können.

Die Hepatozyten stellen immunologisch eine Besonderheit dar, die sich aus der geschützten Lage hinter dem sinusoidalen Endothel und dem Dissé-Raum ergibt. Bei intakter Sinusoidal-Architektur führt eine Infektion der Hepatozyten nicht zu einer Infiltration von mononukleären Zellen und auch nicht zu einer Aktivierung von spezifischen T-Zellen. Dies konnte durch Experimente mit transgenen Mäusen nachgewiesen werden, die ein fremdes nicht sekretiertes Protein selektiv in Hepatozyten exprimierten. Spezifische T-Zellen wurden in diesen Tieren nicht aktiviert, jedoch erfolgte eine Aktivierung bei Tieren, die dieses Protein auf anderen Zellen trugen. Im Verlauf der meisten Infektionen werden allerdings immunogene Stoffe des Pathogens aus der Wirtszellen abgegeben, und es kommt so doch zu einer proinflammatorischen Aktivierung (Limmer, 1998). Die Endothelien der Sinusoide können diese Antigene aufnehmen, und haben die Möglichkeit, diese auf MHC-I-Molekülen für  $\text{CD8}^+$  T-Zellen zu präsentieren, ein Vorgang, der cross-presentation genannt wird. Dadurch kann eine Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene eingeleitet werden. Allerdings gibt es auch hier Hinweise, dass in manchen Situationen diese Antigenpräsentation auf den

Sinusoidalendothelien eher zu einer Toleranz des Immunsystems führt, als zur Einleitung einer Abwehrreaktion (Limmer et al., 2000).

Vielleicht sind diese Besonderheiten ein Grund für viele Pathogene, Hepatozyten als primäre Nische zu nutzen.

Es könnte sich auch bei der beschriebenen Akkumulation von *B. tribocorum-gfp* um solche Prozesse handeln. Die Hepatozyten könnten dann vielleicht als primäre Nische während der präbakterämischen Phase für *Bartonella spezies* dienen und möglicherweise von dort die Besiedlung der Erythrozyten erfolgen.

Naheliegender wäre auch, dass Bartonellen in die sinusoidalen Endothelzellen invadieren, da auch im Fall der Besiedelung eines immunsupprimierten Fehlwirts bei der BA und BPH Bartonellen in enger Assoziation mit Endothelzellen gefunden werden.

Die hier vorgestellten Beobachtungen sollten aber nur als orientierende Ergebnisse angesehen werden und bedürfen auf jeden Fall weiterer Prüfung. Da es sich zu jedem Meßzeitpunkt um ein unterschiedliches Tier handelte, sind Vergleiche mit anderen Zeitpunkten aufgrund der gleichen Infektionsbedingungen zwar möglich, doch sind individuelle Abweichungen nicht ausgeschlossen. Außerdem handelte es sich immer nur um ein Versuchstier pro Messzeitpunkt und nicht um eine Gruppe von Tieren. Außerdem sollte hinsichtlich des methodischen Vorgehens bedacht werden, dass ein histologischer Nachweis der Bakterien in den verschiedenen Organen wesentlich aussagekräftiger wäre.

Der hier geschilderte Versuch läßt auch keine Aussagen darüber zu, ob für *B. tribocorum-gfp* die Leber einen ersten Infektionsort darstellt, oder ob es hier nur zur Abräumung der Bakterien durch die Immunabwehr der Ratte kommt.

#### **5.1.6 Interaktion mit erythropoetischen Vorläuferzellen**

Erkenntnisse über den Mechanismus der Invasion von *Bartonella spezies* in die roten Blutzellen zu gewinnen, war ein Ziel dieser Arbeit. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass es zu einer Interaktion von *Bartonella* mit erythropoetischen Vorläuferzellen kommt. Diese Zellen sind endozytotisch sehr aktiv, daher wurde die Überlegung angestellt, dass in diesem Reifungsstadium der roten Blutzellen die Aufnahme der Bakterien über einen Mechanismus erfolgt, der der induzierten Phagozytose ähnlich ist und für viele andere, intrazellulär vorkommende Bakterien beschrieben wurde.



Die 3-4tägige Latenzzeit vor Beginn der Bakteriämie wäre mit der Reifungszeit von infizierten erythroiden Vorläuferzellen vereinbar gewesen. Diese hätten in einem frühen, noch endozytosefähigen Stadium durch *B. tribocorum-gfp* invadiert werden können, um dann als infizierte, fast reife Erythrozyten im peripheren Blut aufzutauchen.

Die Ergebnisse konnten die Hypothese, dass es während der Infektion von *B. tribocorum-gfp* zu einer Interaktion mit erythropoetischen Vorläuferzellen kommt, nicht bestätigen. Zum einen konnte keine Akkumulation von Bakterien im Knochenmark der Ratten festgestellt werden, was der wahrscheinlichste Ort für eine Interaktion mit erythropoetischen Stammzellen gewesen wäre. Zum anderen konnte im peripheren Blut keine Assoziation von *B. tribocorum-gfp* mit erythroiden Vorläuferzellen nachgewiesen werden. In den hier vorgestellten Versuchen wurde die Kolokalisation von Retikulozyten und *B. tribocorum-gfp* in der ersten Zeit der bakterämischen Phase überprüft. Retikulozyten sind die spätesten Entwicklungsstadien der erythropoetischen Zellen vor der Ausreifung zur murenen roten Blutzelle. Falls eine Infektion von frühen erythropoetischen Vorstadien stattgefunden hätte, wären die Bakterien auf jeden Fall auch im Entwicklungsstadium der Retikulozyten nachzuweisen gewesen.

Die Verwendung von CD71 als Oberflächenmarker für den Nachweis von Retikulozyten ist ein Standardverfahren in der klinischen Diagnostik (Serke, 1994). Es sollte also eine verlässliche Methode sein, um diese Zellen nachzuweisen.

Die Ergebnisse sollten allerdings vor dem Hintergrund gesehen werden, dass versucht wurde, infizierte Blutzellen an den ersten beiden Tagen der bakterämischen Phase, also an Tag vier p.i. und an Tag fünf p.i. nachzuweisen. Die Anzahl infizierter Zellen ist zu diesem Zeitpunkt noch sehr gering. Die Fluoreszenz-Signalintensität der GFP-positiven roten Blutzellen ist noch relativ schwach, so dass diese keine eindeutig abgrenzbare Population bildeten. Es konnte nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob eine sichere Diskriminierung gegenüber GFP-negativen Zellen stattgefunden hat. Außerdem ist es schwierig zu beurteilen, ob es sich bei den Ereignissen in den Anti-CD71-PE-Färbungen, die sowohl GFP-positiv als auch PE-positiv waren, ausschließlich um Autofluoreszenz handelte.

Zu bedenken ist auch, dass in diesem Stadium der Infektion nur ca. 1/10.000 bis 1/100.000 Erythrozyten infiziert sind. Es handelt sich also um seltene Ereignisse, die

eine sorgfältige Abtrennung von Autofluoreszenzen erfordern, durch die die Ergebnisse sonst verfälscht würden.

R. Schülein und A. Seubert konnten in nachfolgenden Experimenten eindeutig nachweisen, dass *B. tribocorum-gfp* in mature Erythrozyten invadiert (Schülein et al., 2001). Vor der Infektion von Ratten mit *B. tribocorum-gfp* wurden die muren roten Blutzellen *in vivo* durch Biotin markiert. Nur in diesen Zellen konnten nach der Infektion der Tiere invadierte *B. tribocorum-gfp* gefunden werden. So konnte ausgeschlossen werden, dass prämatere Erythrozyten invadiert werden.

Die Frage nach dem Invasionsmechanismus von *Bartonella spezies* in reife rote Blutzellen bleibt ungeklärt.

### **5.1.7 Zusammenfassende Betrachtung und Ausblicke**

Die Etablierung des hier vorgestellten Tiermodells der Erythrozyteninvasion konnte zeigen, dass es sich bei der Infektion des natürlichen Wirts von *B. tribocorum* um einen mehrstufigen Prozeß handelt. Die Leber ist möglicherweise die primäre Nische für die Bakterien, die Besiedlung der Erythrozyten ist erst ein nachfolgender Schritt. Die Invasion in die roten Blutzellen erfolgt nicht über die Aufnahme der Bakterien durch endozytosefähige erythroide Vorstufen.

Es wäre sehr interessant, die immunologische Reaktion des Wirts auf *Bartonella*-Infektionen zu untersuchen.

Die Antikörpertiter von natürlich infizierten, bakterämischen kleinen Waldtieren werden in verschiedenen Fällen als sehr gering (>1:32) oder sogar fehlend beschrieben. Für Baumwollratten (*Sigmodon hispidus*) und Weißfußmäuse (*Peromyscus leucopus*) konnte gezeigt werden, dass eine vertikale Übertragung von der Mutter auf die Nachkommen erfolgen kann; diese bildeten keine Antikörper gegen *Bartonella spezies*, möglicherweise als Folge einer Präsentation bakterieller Antigene im Föten während der lymphozytären Prägungsphase. Bei experimenteller Infektion von Baumwollratten (*Sigmodon hispidus*) mit entsprechenden Isolaten wurde eine Antikörperantwort beobachtet (Kosoy et al., 1998; Kosoy et al., 1997).

Die Infektion von Katzen mit *B. henselae* geht regelmäßig mit einer Antikörperreaktion einher. So finden sich bei einem erheblichen Teil der Hauskatzen Antikörpertiter gegen *B. henselae* (bis zu 80 %) (Jameson et al., 1995; Kosoy et al., 1997; Zangwill et al., 1993). Bei der experimentellen Infektion von Katzen wird eine

rasche IgM- und IgG-vermittelte Immunantwort mit mittleren Titern bis 1:640 beobachtet, die nach dem Ende der Bakteriämie wieder zurückgehen. Die Antikörperantwort könnte hier für die Eindämmung der Infektion eine Rolle spielen (Freeland et al., 1999; Greene et al., 1996). Eine Reinfektion mit *B. henselae* wird durch diese humorale Immunantwort verhindert (Regnery et al., 1996). Injiziert man *B. henselae* jedoch in Mäuse, also in einen Fehlwirt, so kommt es sehr schnell zu einer Antikörperbildung, die eine Bakteriämie in diesen Tieren, auch bei sehr hohen Infektionsdosen verhindert (Karem et al., 1999).

Eine horizontale Übertragung der Infektion von *B. henselae* in Katzen konnten nicht beobachtet werden (Abbott et al., 1997; Guptill et al., 1997; Guptill et al., 1998). Allerdings wurde durch Experimente mit neugeborenen Katzen deutlich, daß diese auch peroral infiziert werden können, und daraufhin eine Antikörperantwort ebenso ausbleibt, wie nach transplazentarer Übertragung von *Bartonella spezieis* bei Nagetieren (siehe oben). Bei intravenöser Infektion dagegen bildeten die neugeborenen Katzen Antikörper. Die Dauer der bakterämischen Phase wurde im Vergleich zum Verlauf ohne humoraler Immunantwort nicht verkürzt (Guptill et al., 1999). Diese Ergebnisse lassen es fraglich erscheinen, ob die humorale Immunantwort zur Eindämmung und/ oder Terminierung der Infektion dient.

Eine Studie mit B-Zell- und B+T-Zell-defizienten Mäusen mit *B. grahamii* hingegen konnte eindeutig zeigen, dass die humorale Immunantwort für die Terminierung der Infektion wichtig ist. Der Infektionsverlauf in allen immundefizienten Tieren zeigte einen Anstieg der Bakterientiters bis zur vierten Woche p.i., und lag um eine Zehnerpotenz höher als bei immunkompetenten Mäusen. Im Gegensatz zu dem Verlauf in immunkompetenten Tieren persistierte die Bakteriämie über den gesamten Beobachtungszeitraum von 77 Tagen auf diesem hohen Niveau. Die sonst beobachtete Phase der Persistenz/ Elimination konnte also nicht beobachtet werden. Es wird davon ausgegangen, dass die von Schülein et al. (2001) beschriebenen Wellen der Reinfektion von Erythrozyten durch die humorale Immunantwort immer weiter eingedämmt werden und so schließlich zur Beendigung der Infektion führen.

Bemerkenswert ist außerdem, dass die immundefizienten Versuchstiere durch die Infektion ebenso wenig beeinträchtigt wurden, wie es aus autologen Infektionsexperimenten mit immunkompetenten Tieren bekannt ist (Koesling et al.,

2001). Es wird wiederum deutlich, dass Bartonellen sehr gut an ihren tierischen Wirt angepasst sind.

In diesem Zusammenhang soll hier noch einmal auf eine Besonderheit der immunologischen Kompetenz der Leber hingewiesen werden, die möglicherweise für die Besiedlung des natürlichen Wirts durch *Bartonella spezies* eine entscheidende Rolle spielt.

Vieles deutet darauf hin, dass die Leber Pathogene nicht nur sehr rasch und effizient eliminieren kann und gegen diese eine schützende Immunantwort triggert, sondern auch gegen eine große Anzahl von Antigenen immunologische Toleranz aufbauen muß. Hierbei handelt es sich vor allem um Antigene aus dem Gastrointestinaltrakt, die aus der aufgenommenen Nahrung und Darmflora stammen. Gegen diese Antigene muß eine spezifische Toleranz aufgebaut werden, um eine unnötige Immunantwort zu verhindern, die immer eine Gefahr für die Integrität des körpereigenen Gewebe darstellt. Experimentelle Daten sprechen dafür, dass die Leber schneller eine Immuntoleranz aufbauen kann, als eine abwehrende Immunantwort. Dazu ist eine feine Regulation der immunologischen Vorgänge notwendig, und es muß sehr spezifisch zwischen Pathogen und ungefährlichen Antigenen unterschieden werden. Review: (Knolle and Gerken, 2000)

Wie relevant die Exposition mit Antigenen aus der Nahrung für die Leber ist, kann man daran erkennen, dass die Zahl der mononukleären Zellen in der Leber von special-pathogen-free (SPF) gefütterten Mäusen erheblich geringer ist, als unter normalen Bedingungen (Seki et al., 2000).

Die Antigene der physiologischen Darmflora gelangen ebenfalls in die Leber. Hier sind besonders die Lipopolysaccharide (LPS) zu erwähnen, Bruchstücke der bakteriellen Zellwände, die sehr schnell eine heftige Entzündungsreaktion auslösen können. Unter physiologischen Bedingungen wurden im venösen Portalblut LPS-Konzentrationen bis zu 1ng/ml gemessen. Doch scheinen die Immunzellen der Leber hierauf nicht mit einer Inflammation zu reagieren. Experimentelle Daten mit Kupffer'schen Sternzellen zeigen, dass diese auf LPS in physiologisch auftretenden Konzentrationen mit der Ausschüttung von Zytokinen reagieren, die zur Dämpfung einer inflammatorischen Reaktion führen. Dazu gehört v.a. IL-10, aber auch andere Zytokine. Reviews: (Loppnow, 2001; Moore et al., 2001). Dies hat zu Folge, dass die Leukozytenadhäsion an den Endothelzellen gesenkt wird. Eine wiederholte, niedrigdosierte LPS-Exposition dieser Zellen führt zu

einer Art Refraktärität dieser Zellen, in der es keine Aktivierung der Leukozytenadhäsion auf proinflammatorische Reize mehr gibt. Diese kann durch hohe LPS-Exposition wieder beendet werden (Knolle and Gerken, 2000). IL-10 führt sowohl in den Kupfferzellen selbst als auch in den sinusoidalen Endothelzellen zu einer Senkung der rezeptorvermittelten Antigenaufnahme sowie einer Verminderung der MHCII-Expression und der Expression der co-stimulatorischen Signale CD80 und CD86 (Knolle, 1998). Außerdem gibt es Hinweise, dass LPS in physiologischer Konzentration zu einer Alkalisierung des endosomal/lysosomalen Kompartiments in den Endothelien führt, was die Antigenprozessierung behindert (Knolle, 1999).

Die Möglichkeiten der Leber, eine Immuntoleranz zu induzieren, konnte auch bei Transplantationsexperimenten demonstriert werden. Die Injektion von Donorspezifischen Leukozyten in das Portalblut von Empfänger-Mäusen, führt bei danach erfolgter Hauttransplantation zur Verhinderung einer Abstoßung (Gorcynski et al., 1996). Umgekehrt konnte die selektive Ausschaltung der Kupffer'schen Sternzellen die Ausbildung einer Toleranz verhindern (Ronald et al., 1993).

Vielleicht spielen solche oder ähnliche durch die Leber vermittelte Mechanismen der Toleranzentwicklung für *Bartonella spezies* eine Rolle bei der Etablierung der Infektion und Übertragung in den Populationen ihrer natürlichen Wirte.

Dies könnte die Beobachtung von Guptill et al. erklären, dass es bei peroraler Infektion von jungen Katzen mit *B. henselae* nicht zu einer Antikörperbildung kommt. Möglicherweise kann eine solche Toleranzentwicklung aber auch nach hämatogener Infektion erfolgen, wenn es zu einer Interaktion mit der Leber kommt.

Im Hinblick darauf wäre es interessant, die immunologische Reaktion in der Leber und anderen Organen des natürlichen Wirts auf *Bartonella*-Infektionen differenziert zu betrachten. Dabei könnte die Untersuchung der ausgeschütteten Zytokinmuster vielleicht helfen, eine Aussage darüber zu treffen, ob eine abwehrende Immunantwort oder die Toleranzentwicklung durch *Bartonella spezies* getriggert wird. Die Frage, warum die Immunantwort des Wirts in dieser bestimmten Weise ausfällt, könnte daran anschließen und wichtige Antworten hinsichtlich des Lebenszyklus von *Bartonella spezies* erhalten werden. Darüber hinaus könnte die Funktion des Immunsystems besser verstanden werden.

Für andere bakterielle Infektionen wurden dämpfende Reaktionen des Immunsystems bereits beschrieben. Bei der *Helicobacter pylori* assoziierten

chronischen Gastritis wurde eine erhöhte IL-10-Sekretion, im Vergleich zu nicht mit *Helicobacter pylori* assoziierter chronischer Gastritis gemessen (Bodger et al., 2001; Bodger et al., 1997). Allerdings beschreibt eine andere Studie, dass auch IL-12, als Schlüssel-Zytokin der Immunantwort gegen bakterielle Pathogene bei positivem *Helicobacter pylori*-Status erhöht ist. Die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 korrelierte nur mit dem Entzündungsstatus, war aber unabhängig vom *Helicobacter pylori*-Status (Bauditz et al., 1999). Es wird vermutet, dass die Ausschüttung von IL-10 möglicherweise fördernd auf die Chronizität der Infektion und beeinträchtigend auf die Abräumung der Bakterien wirkt.

Bei Infektionen der Lunge mit dem Cillium-Associated-Respiratory-Bacillus (CAR), einem gram-negativen, extrazellulär lebendem Bakterium, welches persistierende Infektionen des Respirationstraktes von Nagetieren hervorruft, konnte nachgewiesen werden, dass IL-10 und IL-4 für die Etablierung einer Infektion von sensiblen Mäusestämmen wichtig sind, IFN $\gamma$  - ein proinflammatorisches Zytokin - dagegen bei resistenten Mäusestämmen dominant ist (Kendall et al., 2001).

Es scheint für das Überleben des Wirtsorganismus in verschiedenen Situationen von entscheidender Bedeutung zu sein, die immunologische Antwort auf Pathogene zu bremsen, auch wenn dadurch in Kauf genommen wird, dass die Infektion weiter exazerbiert und/ oder nicht terminiert werden kann. IL-10 gendefiziente Mäuse zeigten in einer experimentell induzierten Peritonitis mit *E. coli* gravierendere Organschädigungen bei gleichzeitig niedrigeren Bakterientitern in Blut, Lunge und Peritonealflüssigkeit, im Vergleich zu IL-10-Gen tragenden Mäusen. Obwohl IL-10 die Bekämpfung der Bakterien behindert, ist es für die Integrität des Gesamtorganismus förderlich (Sewnath et al., 2001).

Vielleicht spielen solche Mechanismen auch bei der Infektion des natürlichen Wirts durch *Bartonella spezies* eine Rolle.

Möglicherweise haben *Bartonella spezies* aber nicht nur die Immunantwort modulierende Mechanismen entwickelt, sondern auch Strategien, um der Immunantwort des Wirts zu entkommen. Es wäre zum Beispiel auch denkbar, dass für den oralen Infektionsweg die Zerstörung des mukosaeigenen, humoralen Immunschutzes durch IgA-Antikörper wichtig ist. Viele der bedeutendsten bakteriellen Krankheitserreger, die sich auf Schleimhäuten vermehren oder diese als Eingangspforte in tiefere

Gewebsschichten nutzen, haben die Fähigkeit, IgA-Proteasen zu bilden (Kilian et al., 1996; Lamm, 1997).

Eine weitere Frage, die ebenfalls mit der immunologischen Reaktion des Wirts auf eine Bartonellen-Infektion assoziiert ist, ist die Frage nach der Entstehung der Wirtsspezifität von *Bartonella spezies*. Warum kommt es dazu, dass *Bartonella spezies* in einem Organismus eine asymptomatische, lange andauernde Besiedlung etabliert und in anderen Wirten zu Erkrankungen mit sehr unterschiedlichen pathologischen Korrelaten führt (Tab. 5).

Tier/ Infektion mit	Klinik	Autor
<b>Ratte</b> <i>B. tribocorum</i>	<b>keine Klinik</b> <b>Ak-Antwort: ja</b>	<b>eigene Studie</b>
Ratte <i>B. tribocorum</i>	keine Klinik Ak-Antwort: n.n.	(Hansmann, 2000)
Woll-Ratte <i>B. spezies</i>	keine Klinik Ak-Antwort: ja	(Kosoy et al., 1999)
Katze <i>B. henselae</i>	keine Klinik Ak-Antwort: ja	(Regnery et al., 1996)
Katze <i>B. henselae</i>	Fieber, Gewichtsverlust Ak-Antwort: ja Pathologie: Leberabszeß	(Guptill et al., 1997)
Katze <i>B. henselae</i>	Fieber, Verhaltensauffälligkeiten, Anämie Ak-Antwort: ja	(Kordick and Breitschwerdt, 1997)
Katze <i>B. henselae</i>	Fieber, Schnupfen, Gewichtsverlust, Entzündungen, Ak-Antwort: ja	(O'Reilly et al., 1999)
Katze <i>B. henselae</i> und <i>B. clarridgeiae</i>	Fieber Ak-Antwort: ja Pathologie: chron. Entzündung in Milz, peripheren Lymphknoten, Niere und Gallenwegen	(Kordick et al., 1999)

**Tab. 5: Vergleich der klinischen Verläufe von *Bartonella*-Infektionen im natürlichen Wirt**

Auch beim Blick auf die Infektion des natürlichen Wirts zeigt sich, dass es hinsichtlich der Auswirkung der Infektion auf den Wirtsorganismus Unterschiede gibt: vier von fünf Infektionsexperimente mit *B. henselae* bzw. *B. clarridgeiae* in Katzen zeigten, dass es zu klinisch und pathologisch erkennbaren Reaktionen auf die Infektion des Wirtsorganismus kommt. Derartige Zeichen wurden bei den genannten Experimenten mit Nagetieren nicht festgestellt. Dabei ist es unwahrscheinlich, dass diese

unterschiedlichen Beobachtungen allein aufgrund der verschiedenen Beobachtungsbedingungen der Versuchstiere zu erklären ist. Denn auch bei intensiver Untersuchung von Entzündungsparametern (Klinik, Fieber, Blutbild) im Rattenmodell mit *B. tribocorum* konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden (R. Schüle und A. Seubert, persönliche Mitteilung). Selbst bei den verschiedenen Infektionsexperimenten mit Katzen mit unterschiedlichen *B. henselae*-Isolaten wurden verschiedene Reaktionen der Versuchstiere beobachtet. Daher wurde schon früher von O'Reilly et al. und anderen angenommen, dass sich die verschiedenen *Bartonella* spezies unterschiedlich stark an den jeweiligen Wirt angepasst haben (O'Reilly et al., 1999). Dafür spricht auch die Tatsache, dass es bei den bisher beschriebenen, heterologen Infektionsmodellen nie zu einer Bakteriämie gekommen ist (Fournier et al., 2001; Karem et al., 1999; Regnath et al., 1998).

Sind die jetzt zu beobachtenden unterschiedlichen Lebensweisen der einzelnen Spezies dann nur Momentaufnahmen in einer langen Entwicklung vom Pathogen zum Kommensalen? Wie sieht es dann mit den humanpathogenen Spezies aus – handelt es sich bei der Infektion des Menschen um eine Besiedlung eines Fehlwirtes, oder könnten hier auch entsprechende Adaptationsprozesse in einer langen Entwicklung denkbar sein?

## **5.2 Arbeiten zu einem lokusspezifischen Mutagenesesystem und Anwendung dieses Systems zur Klärung der Rolle des *ialB*-Lokus für die Erythrozyteninvasion von *B. tribocorum* *in vivo***

### **5.2.1 Der *ialA/B*-Lokus von *B. tribocorum* 506<sup>T</sup>**

Die Auswertung des DNA-Sequenzvergleichs des *ialA/B*-Lokus von *B. tribocorum* 506<sup>T</sup> mit der von Mitchell und Minnick veröffentlichten DNA-Sequenz von *B. bacilliformis* ergab eine Homologie und Identität von 75,2 %. Die Sequenzierung des gleichen Lokus weiterer *Bartonella* spezies zeigte ähnlich hohe Übereinstimmungen (C. Dehio, persönliche Mitteilung). Es kann daraus geschlossen werden, dass es sich um eine konservierte Region des Genoms von *Bartonella* handelt, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass hier für diese Bakterien essentielle genetische Information liegt.



### 5.2.2 Lokusspezifische Mutagenese des *ialB*-Lokus von *B. tribocorum* 506<sup>T</sup>

In dieser Arbeit konnte ein System zur lokusspezifischen Mutagenese für *B. tribocorum* 506<sup>T</sup> etabliert werden. Dazu wurde das mobilisierbare Selbstmord-Plasmid pCD394 verwendet, in welches ein internes Fragment des ORFs vom *ialB* kloniert wurde. Das resultierende Plasmid pCG019 wurde eingesetzt, um durch Integration ins Chromosom eine unvollständige Duplikation des Gens und somit eine polare Mutation zu erzeugen. von *B. tribocorum* 506<sup>T</sup> zur Mutagenese dieses Lokus diene.

Der Transfer des Mutagenese-Plasmids pCG019 in *B. tribocorum* 506<sup>T</sup> erfolgte über ein dreiparentales Konjugationssystem mit dem DAP-abhängigen *E. coli*-Stamm  $\beta$ 2150 und pRK2013 als Helferplasmid.

Die Mutagenese wurde erfolgreich am *ialB*-Lokus durchgeführt, und ergab in der genotypischen Analyse stabile Mutanten. Das System eignet sich also zur lokusspezifischen Mutagenese von *B. tribocorum* 506<sup>T</sup>.

Eine Schwierigkeit stellt allerdings die Selektion auf Mutanten mit kanamycinresistentem Phänotyp nach der Konjugation dar. Die hier vorgestellten Versuche zeigen, dass nur 10 % der kanamycinresistenten Konjuganten tatsächlich durch Integration von pCG019 in den *ialB*-Lokus entstanden. 90 % der Konjuganten zeigten in der genotypischen Analyse mittels PCR keine Integration von pCG019 in den *ialB*-Lokus.

Dafür können folgende Ursachen angenommen werden: (1) Das Mutageneseplasmid pCG019 wurde an einer anderen Stelle in das Chromosoms integriert und vermittelte von dort aus den resistenten Phänotyp. (2) pRK2013 wurde in den Rezipienten übertragen und wurde über eine (zufällige) homologe Sequenz in das Chromosom integriert und vermittelt die Kanamycinresistenz oder (3) es ist zu einer spontanen Resistenzbildung gekommen.

Geht man von der Annahme aus, dass eine Integration von pCG019 an einer anderen Stelle des Chromosoms in einem so erheblichen Maße stattfindet (90 % der Klone), so wäre dies wahrscheinlich durch eine weitere homologe Sequenz des Vektorrückgrades zu einer anderen Stelle im Chromosom verursacht. Konjugationsansätze mit pCD394 ohne die homologe Sequenz des *ialB*-Lokus erbrachten aber weniger kanamycinresistente Konjuganten im Vergleich zu Ansätzen mit pCG019. Hingegen war die Anzahl der kanamycinresistenten CFUs nach Konjugation mit pRK2013 ohne

pCG019 bis zu drei mal höher. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass die Kanamycinresistenz der Konjuganten ohne Integration von pCG019 in den *ialB*-Lokus durch Selbstmobilisation und nachfolgende Integration von pRK2013 ins Chromosom vermittelt wird.

Versuche, das Helferplasmid pRK2013 durch das Chloramphenicol als Resistenzmarker tragende Plasmid pRK600 zu ersetzen, waren erfolglos. Die genaue Ursache hierfür konnte nicht ermittelt werden. Die Mobilisationsfrequenz von pRK600 war in Experimenten mit *E. coli* sehr viel geringer als die von pRK2013.

Vielleicht könnte der hohe Hintergrund an kanamycinresistenten Klonen durch Verwendung eines zweiparentalen Konjugationssystems umgangen werden.

### **5.2.3 Phänotypische Analyse der *B. tribocorum-ialB*-Defektmutanten und Versuch der Komplementierung**

Die hier vorgestellten Experimente konnten zeigen, dass der im *ialB*-Lokus durch unvollständige Duplikation veränderte Stamm *B. tribocorum* 506<sup>T</sup> *ialB*::pCG019 im Rattenmodell nicht infektiös war. Dieses Ergebniss deutet darauf hin, dass dieser Lokus für die Invasivität von *B. tribocorum* 506<sup>T</sup> eine Rolle spielen könnte.

Es ist zu diskutieren, ob dieser Phänotyp (a) aufgrund des *ialB*-defizienten Genotyps zustande kommt, oder ob die Bakterien aus einem anderen Grund nicht mehr infektiös waren, und (b), ob die Infektiosität aufgrund des Verlusts der Fähigkeit zur Erythrozyteninvasion verloren ging, oder ob der Infektionsprozeß an einer anderen Stelle unterbrochen wurde.

Zu (a): Eine generelle Attenuierung des Klons aufgrund einer häufigen Passagierung über Nährböden mit konsekutiver Akkumulierung von unspezifischen Mutationen sollte als unwahrscheinlich angenommen werden, wie in vielen anderen Experimenten gezeigt werden konnte (C. Dehio, persönliche Mitteilung).

Zu bedenken ist jedoch, dass die hier angewandte Mutagenese-Strategie der unvollständigen Duplikation durch singuläres crossing-over nicht nur Einfluß auf den auszuschaltenden Genlocus haben kann, sondern noch weitere Effekte entstehen können. Zum einen führt der Verbleib des gesamten Mutagenese-Plasmids im Chromosom zu polaren Effekten. Ebenso können plasmidkodierte Eigenschaften zu unvorhersehbaren Folgen führen, die ebenfalls den Phänotyp beeinflussen.

Unter polaren Effekten (downstream-Effekte) versteht man die Beeinflussung anderer, in Leserichtung downstream des mutierten Gens liegende ORFs durch Veränderungen an DNA-Abschnitten, die oberhalb dieser liegen.

Solche Effekte treten besonders dann auf, wenn das mutierte Gen innerhalb eines Operons mit mehreren Strukturgenen liegt. So kann es passieren, dass nicht durch das gesamte Plasmid transkribiert wird, aufgrund von auf dem Plasmid liegenden Terminatoren. Ebenso ist es möglich, dass durch auf dem Vektor liegende Promotoren, die Transkription in eine falsche Richtung gestartet wird, was das regelhafte Ablesen der chromosomalen Strukturgene behindert. Außerdem kann die entstehende mRNA als antisense-RNA für das Transkript der richtigen Leserichtung auftreten, was die Translation verhindert.

Ob dies wirklich für den *ialA/B*-Lokus und die danach folgenden Gene eine Relevanz hat, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Dagegen spricht die Lokalisation einer putativen Terminator-Sequenz nach *ialB*.

Die unvollständige Duplikation des *ialB*-Lokus kann außerdem auf der Ebene der Proteinfunktion zu Störungen der Zellfunktion und Verlust der Invasivität führen, die nicht auf der spezifischen Ausschaltung der IalB-Funktion beruht. Die Integration von pCG019 in das offene Leseraster von *ialB* hatte zur Folge, dass zwei unvollständige ORFs gebildet wurden. Dem upstream gelegenen ORF fehlen am 3'-Ende 186 von 558 Basenpaaren; dem Protein würde der C-Terminus fehlen, die putative *sec*-Erkennungssequenz für die Sekretion ist aber noch vorhanden. Dieses Protein könnte mit der inneren oder äußeren Membran der Zellen interagieren oder im Periplasma akkumulieren und dort, aufgrund der unvollständigen Struktur, zu Störungen führen. Dem nachfolgenden ORF fehlen 31 von 558 Basenpaaren am 5'-Ende; es ist unwahrscheinlich, dass dieser ORF abgelesen wird, da der ATG-Start fehlt. Wenn es zur Translation käme, dann würde wahrscheinlich eine „nonsense“-Sequenz entstehen, weil es zu einer Verschiebung des Leserasters gekommen ist. Das entstehende Protein könnte toxisch auf die Zelle wirken.

Um beweisen zu können, dass die unvollständige Duplikation des *ialB*-Lokus und damit verbundene Ausschaltung dessen Funktion die Ursache für den veränderten Phänotyp ist, wäre es nötig gewesen, den ursprünglichen Phänotyp durch Wiederherstellung des Genotyps zu erhalten. Dies sollte durch die Komplementation *in trans* mit pPR39 als

Vektor erfolgen. Der nicht invasive Phänotyp war jedoch nicht mit den dafür konstruierten Plasmiden pCD404 und pCD405 komplementierbar. Folgende Faktoren könnten als Grund dafür angenommen werden:

(1) Der DNA-Abschnitt, der zur Komplementation in pPR39 eingebracht wurde, konnte nicht abgelesen werden, da ein entsprechender Promotor fehlt. Es wurde nur das offene Leseraster des *ialB*-Lokus und die intergenische Region zwischen *ialA* und *ialB* in den Komplementationsvektor subkloniert. Möglicherweise liegen notwendige regulatorische Genabschnitte upstream von *ialA* oder sogar noch weiter entfernt.

(2) Möglicherweise konnte das offene Leseraster von *ialB* im Plasmid zwar durch den zum Gentamycin-Resistenzgen gehörenden Promoter abgelesen werden, jedoch war diese Expression fehlgesteuert, d.h. es könnte zu einer Überexpression, zu einer zu schwachen Expression oder zu einer Expression zum falschen Zeitpunkt gekommen sein. Dafür spricht das unterschiedliche Verhalten der Vektoren pCD404 und pCD405, mit unterschiedlicher Orientierung des ORFs von *ialB*. pCD405 war überhaupt nicht stabil in *B. tribocorum* 506<sup>T</sup> unter Infektionsbedingungen, während pCD404 eine 10-20 % Plasmidstabilität aufwies. Möglicherweise wurde *ialB* vom Plasmid pCD405 in toxischen Konzentrationen abgelesen und war daher instabil.

Eine zu starke Expression könnte theoretisch auch durch das Vorliegen einer zu großen Anzahl von Plasmiden in den Zellen („copy-number“) hervorgerufen werden, was jedoch für das low-copy-number-Plasmid pPR39 nicht wahrscheinlich ist.

(3) Die oben genannten Probleme der Mutagenese-Strategie könnten auch der Grund für das Scheitern des hier dargestellten Komplementationsversuchs sein. Würden durch downstream-Effekte andere Gene in ihrer Funktion gestört, so müssten diese auch komplementiert werden, um wieder einen phänotypischen Wildtyp zu erhalten. Es könnte dann keine spezifischen Aussagen über die Funktion von *ialB* gemacht werden.

Die Komplementation könnte außerdem durch das Vorhandensein der Produkte der unvollständig duplizierten Gene behindert werden. Diese Genprodukte könnten die Funktion des vom Plasmid abgelesenen, funktionellen *IalB*s behindern und so die Ausprägung eines phänotypischen Wildtyps verhindern. Ein solcher Effekt wird als 'negative Dominanz' bezeichnet.

Zu (b): Die im ersten Teil dieser Arbeit vorgestellten Versuche zur Etablierung eines *in vivo*-Infektionsmodells der Ratte mit *B. tribocorum* und weitere Experimente von

Schülein et al. verdeutlichen, dass es sich um einen komplexen Ablauf der Besiedlung des Tieres durch die Bakterien handelt (Schülein et al., 2001), bei der die Invasion in Erythrozyten nicht der erste Schritt ist. Invasierte Erythrozyten konnten erst an Tag vier p.i. nachgewiesen werden. Die Prozesse bis zu diesem Stadium sind bisher ungeklärt. Es ist also auch möglich, dass die Ausschaltung von *IalB* einen anderen Prozeß während der Etablierung der intraerythrozytären Infektion unterbricht.

#### **5.2.4 Zusammenfassende Betrachtung und Ausblicke**

Die hier erarbeitete Methode zur Mutagenese des *ialB*-Lokus von *B. tribocorum* 506<sup>T</sup> durch das Erzeugen einer unvollständigen Duplikation ist eine einfache und schnelle Methode zur lokusspezifischen Mutagenese. Sie gehört zu den Standardverfahren in der Genetik (Watson et al., 1987). Im Laufe dieser Arbeit wurde ein solches System für die lokusspezifische Mutagenese in *B. bacilliformis* veröffentlicht (Minnick, 1999). Man kann daran erkennen, dass die Möglichkeit der lokusspezifischen Mutagenese ein wichtiges Werkzeug zur Erforschung von *Bartonella* spezieis ist.

Die hier durchgeführten Experimente verdeutlichen aber auch, dass diese Strategie viele Nachteile hinsichtlich der Kontrollierbarkeit der im Genom ablaufenden Prozesse mit sich bringt. Aussagen über die Funktion des spezifisch zu untersuchenden Genlokus können so sehr schwer oder unmöglich gemacht werden.

So lassen die hier vorgestellten Experimente keine definitive Aussage über die Rolle des *ialB*-Lokus für die Erythrozyteninvasion von *B. tribocorum* 506<sup>T</sup> *in vivo* zu.

Im Hinblick auf das methodische Vorgehen zur lokusspezifischen Mutagenese könnten die Probleme des hier vorgestellten Systems durch die Etablierung anderer Verfahren, die einen allelischen Austausch von spezifischen Genloci ermöglichen, umgangen werden. Dabei wird ebenfalls mit einem Selbstmord-Plasmid mit geeignetem Marker zur Positivselektion gearbeitet. In dieses wird die homologe Sequenz des Zielgens kloniert, die eine interne Deletion bei Erhalt des Leserasters aufweist, eine „in-frame Deletion“. Außerdem liegt auf dem Plasmid ein Marker zur Negativselektion. Negativselektionsmarker lassen eine Selektion auf die Organismen zu, die diese Eigenschaft nicht besitzen. Nach Einbringen des Konstrukts in das Chromosom mit Hilfe der Selektion auf den positiven Selektionsmarker, kann durch Kulturbedingungen, die dem negativen Selektionsmarker entsprechen, auf die Organismen selektioniert werden, die das Plasmid wieder aus dem Chromosom desintegriert haben. Bei der

Desintegration kommt in gleicher Weise wie bei der Integration des Plasmids zu einem Crossover. In diesem Fall legen sich jedoch homologen Sequenzen aneinander, die beide im Chromosom sind, nämlich das zu mutierende Wildtyp-Gen (Wildtyp-Allel) und das durch das Plasmid eingebrachte Homolog mit interner Deletion (mutiertes Allel). Das desintegrierte Plasmid enthält statistisch verteilt entweder das Wildtyp-Allel oder, wie im Ausgangszustand, das mutierte Allel, während im Chromosom jeweils das andere Allel verbleibt. So kann das Wildtyp-Gen durch ein deletiertes Gen ersetzt werden.

Die Mutagenese mit einem doppelten Crossover bietet den Vorteil, dass es zu einem vollständigen allelischen Austausch kommt, ohne dass Resistenzgene oder regulative Elemente des integrierten Plasmids im Chromosom verbleiben. Dadurch und durch den Austausch des Wildtyp-Allels durch ein in-frame deletiertes Allel, kommt es zu keinen down-stream Effekten.

Für das weitere genetische Arbeiten mit dem *ialA/B*-Lokus wäre es außerdem sinnvoll, die genau Lokalisation der regulativen Elemente, v.a. der Promotoren dieser Gene zu ermitteln. Dies könnte durch subklonieren einzelner Abschnitte dieses Lokus in einen Vektor mit einem geeigneten Reporter-Gen erreicht werden oder durch primer-extension-Analyse. So könnte auch etwas über die Beziehung zu dem für *B. bacilliformis* beschriebenen upstream gelegenen ORF *ctpA* (carboxyl-terminal-protease) und den downstream gelegenen, bisher noch nicht weiter spezifizierten ORFs 1 und 2 sowie dem ORF des *ppa*-Gens erfahren werden (Minnick et al., 1996; Mitchell and Minnick, 1997a; Mitchell and Minnick, 1997b).

Würde man die Promotoren dieser Gene kennen, so könnte man der Frage nachgehen, unter welchen Bedingungen diese aktiv sind. Man könnte so ermitteln, ob diese Gene zum Beispiel während der Invasion des Bakteriums in Erythrozyten abgelesen werden, was ein Hinweis auf eine Funktion im Invasionsprozeß wäre.

Das methodische Vorgehen zur phänotypischen Testung von Defektmutanten mit dem in dieser Arbeit etablierten Infektionsmodell in der Ratte bietet den Vorteil, dass die Virulenz von Defektmutanten *in vivo* untersucht werden kann, und so dem natürlichen Infektionsprozeß sehr viel näher kommt, als *in vitro*-Experimente. Der Nachteil ist, dass es sich um einen mehrschrittigen Infektionsprozeß handelt, während dem die Invasion

der Erythrozyten nur eine Phase darzustellen scheint. Wann und wo dieser Prozeß abläuft ist bisher ebenso wenig verstanden, wie der Mechanismus selbst. Um spezifisch die Invasion von *Bartonella spezies* in rote Blutzellen *in vivo* untersuchen zu können, wäre es eine Voraussetzung, die Stellung dieses Prozesses während der Kolonisation besser zu verstehen. Es scheint außerdem sinnvoll, auch entsprechende *in vitro*-Experimente zur Aufklärung der Erythrozyteninvasion zu entwickeln. Versuche mit sehr geringen Invasionsraten wurden von verschiedenen Autoren bereits beschrieben (Mehock et al., 1998; Mitchell and Minnick, 1995). Es sollte Ziel weiterer Bemühungen sein, auch diese Systeme zu verbessern.

Die Erforschung und Beschreibung der genetischen Grundlagen in Kombination mit der deskriptiven Beschreibung der Pathogenitätsstrategien von *Bartonella spezies* sind elementare Schlüssel zum Verständnis der Lebensweise dieser Gattung.

## 6 Zusammenfassung

Bartonellen sind fakultativ intrazelluläre Bakterien, die hämotroph den Menschen und viele Säugetiere besiedeln können. Sie rufen bei der Infektion des Menschen ein weites Spektrum an Krankheitsbildern hervor, u.a. das hämolytische Oroya-Fieber, die bazilläre Angiomatose und bazilläre Peliosis hepatis, das Fünf-Tagefieber und die Katzenkratzkrankheit.

Ein Charakteristikum im Infektionsverhalten von *Bartonella spezie*s ist die bisher nur für diese Bakterien bekannte Fähigkeit zur Erythrozyteninvasion, die als kennzeichnend für die Infektion des natürlichen Reservoir-Wirtes angesehen wird.

Über die Bedeutung und den Mechanismen der Invasion für die Virulenz von Bartonellen ist bisher wenig bekannt und es standen bis vor kurzem wenige Methoden für deren Aufklärung zur Verfügung.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Erythrozyteninvasion *in vivo* zu untersuchen und dafür benötigte Virulenzfaktoren auf genetischer Grundlage zu identifizieren.

Dazu sollte ein *in vivo*-Infektionsmodell für eine *Bartonella* Spezies etabliert werden, für die es gleichzeitig genetisches Handwerkzeug zu entwickeln galt, um Defektmutanten herzustellen und dann phänotypisch *in vivo* testen zu können.

Zunächst wurde ein *in vivo*-Infektionsmodell für einen GFP-tragenden Klon von *B. tribocorum* 506<sup>T</sup> (Heller et al., 1998), *B. tribocorum-gfp* (Schülein et al., 2001) in der Ratte etabliert. Der Infektionsverlauf sowie die Lokalisation und Vermehrung der Bakterien im Tier wurde analysiert. Es konnte durch intravenöse Injektion von *B. tribocorum-gfp* eine klinisch asymptomatische Bakteriämie der Versuchstiere erzeugt werden. Der Verlauf der Infektion konnte in eine präbakterämische Initiationsphase, eine bakterämische Expansionsphase und die Phase der Persistenz/ Elimination eingeteilt werden. In der präbakterämischen Phase fanden sich Hinweise für eine Akkumulation der injizierten Bakterien in der Leber. Unklar blieb jedoch, ob es sich hier um die Elimination der Bakterien durch dieses Organ handelt, oder um eine spezifische Besiedlung. Während den bakterämischen Phasen konnte die intraerythrozytäre Lokalisation durch FACS-Analysen und Laser-Scanning-Mikroskopie nachgewiesen werden. Möglicherweise sind beide Lokalisationen, die Leber und das intraerythrozytäre Kompartiment, für den mehrschrittigen Prozess der Etablierung der asymptomatischen Kolonisation wichtig.



Die Hypothese, es könnte sich bei den primär infizierten Zellen um erythroide Vorläuferzellen handeln, konnte durch Untersuchungen von Knochenmark der Ratten während der Infektion und durch Immunfluoreszenzfärbungen der Vorläuferzellen im Blut nicht bestätigt werden.

Um *Bartonella spezies* genetisch manipulieren zu können, wurde ein System zur lokusspezifischen Mutagenese etabliert, welches durch unvollständige Duplikation von Genen erlaubt, Defektmutanten zu generieren. Es stellt ein einfaches und schnelles System zur lokusspezifischen Mutagenese dar. Dazu wurde ein auf Kanamycin selektionierbares, nicht replikatives Minimalplasmid, pCD394 erstmals eingesetzt. Mit diesem System wurden *B. tribocorum* 506<sup>T</sup>-Defektmutanten im *ialB*-Lokus erzeugt. Diese waren genetisch stabil und im Ratteninfektionsmodell nicht mehr infektiös. Da die hier durchgeführten Komplementationsversuche nicht zu einer Rekonstitution des phänotypischen Wildtyps führten und die unvollständige Duplikation viele unkontrollierte Folgen im Genom haben kann, bleibt unklar, ob der Verlust der Infektiösität auf der Ausschaltung der Funktion des *ialB*-Lokus beruht. Ebenso ist nicht klar, ob der *in vivo* nicht infektiöse Phänotyp aufgrund eines Verlust der Invasionsfähigkeit in die roten Blutzellen zustande kommt, oder ob der Infektionsprozeß an einem anderen Punkt gestört wurde.

Zur Fortsetzung der Suche nach Virulenzfaktoren für die Erythrozyteninvasion von *Bartonella* sollte der hier erstmals skizzierte, mehrschrittige Infektionsablauf *in vivo*, weiter untersucht werden, um die Rolle der Erythrozyteninvasion für die Infektion durch *Bartonella spezies* besser zu verstehen. Dazu stellt das während dieser Arbeit etablierte Ratteninfektionsmodell ein sehr nützliches Instrument dar, welches sich auch zur Klärung anderer Fragestellungen eignen sollte.

Das hier etablierte System zur lokusspezifischen Mutagenese durch unvollständige Duplikation sollte durch ein anderes System ergänzt oder ersetzt werden, welches hinsichtlich der Einflüsse auf den Genotyp besser kontrollierbar ist.

## 7 Literatur

- Abbott, R.C., Chomel, B.B., Kasten, R.W., Floyd-Hawkins, K.A., Kikuchi, Y., Koehler, J.E., and Pedersen, N.C. (1997). Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 20, 41-51.
- Ahsan, N., Holman, M.J., Riley, T.R., Abendroth, C.S., Langhoff, E.G., and Yang, H.C. (1998). Peliosis hepatis due to *Bartonella henselae* in transplantation: a hemato-hepato-renal syndrome. *Transplantation* 65, 1000-1003.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. (1995). Membrantransport kleiner Moleküle und Ionen als Grundlage der Membranerregbarkeit, 599-650. In: Jaenicke, L.: *Molekularbiologie der Zelle*. VCH-Verlag, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokio.
- Arias-Stella, J., Lieberman, P.H., Erlandson, R.A., Arias, S., and Jr, J. (1986). Histology, immunohistochemistry, and ultrastructure of the verruga in Carrion's disease. *American Journal of Surgical Pathology* 10, 595-610.
- Baron, C., O'Callaghan, D., Lanka, E. (2002). Bacterial secrets of secretion: EuroConference on the biology of type IV secretion processes. *Molecular Microbiology* 43, 1359-1365.
- Barrat, F., Bermond, D., Bouillin, C., Gandoin, C., Thibault, D., Chomel, B., Heller, R., Piemont, Y., and Boulouis, H.J. (1999). A mouse model of *Bartonella* infection. Abstract at the 1st Congress on *Bartonella* as Emerging Pathogen.
- Bass, J.W., Vincent, J.M., and Person, D.A. (1997). The expanding spectrum of *Bartonella* infections: II. Cat-scratch disease. [Review] [215 refs]. *Pediatric Infectious Disease Journal* 16, 163-179.
- Bassler, B.L. (1999). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinions in Microbiology* 2, 582-587.
- Bauditz, J., Ortner, M., Bierbaum, M., Niedobitek, G., Lochs, H., and Schreiber, S. (1999). Production of IL-12 in gastritis relates to infection with *Helicobacter pylori*. *Clinical and Experimental Immunology* 117, 316-323.
- Benson, L.A., Kar, S., McLaughlin, G., and Ihler, G.M. (1986). Entry of *Bartonella bacilliformis* into erythrocytes. *Infection & Immunity* 54, 347-353.
- Bermond, D., Heller, R., Barrat, F., Delacour, G., Dehio, C., Alliot, A., Monteil, H., Chomel, B., Boulouis, H.J., and Piemont, Y. (2001). *Bartonella birtlesii* sp. nov., isolated from small mammals (*Apodemus* spp.). *International Journal of Evolution and Microbiology* 50, 1973-1979.
- Bermudez, L.E. and Sangari, F.J. (2001). Cellular and molecular mechanisms of internalization of mycobacteria by host cells. *Microbes and Infection* 3, 37-42.
- Birge, E.A. (2000). Transcription and translation: processes and basic regulation, 103-142. In: Birge, E.A.: *Bacterial and bacteriophage genetics*. Springer-Verlag, New York.
- Birtles, R., Harrison, T.G., and Molyneux, D.H. (1994). *Grahamella* in small woodland mammals in the U.K.: isolation, prevalence and host specificity. *Annals of tropical medicine and parasitology* 88, 317-327.
- Birtles, R.J. (1995). Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peroysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, 1-8.

- Bodger, K., Bromelow, K., Wyatt, J.I., and Heatley, R.V. (2001). Interleukin 10 in *Helicobacter pylori* associated gastritis: immunohistochemical localisation and in vitro effects on cytokine secretion. *Journal of Clinical Pathology* *54*, 285-292.
- Bodger, K., Wyatt, J.I., and Heatley, R.V. (1997). Gastric mucosal secretion of interleukin-10: relations to histopathology, *Helicobacter pylori* status, and tumor necrosis factor-alpha secretion. *Gut* *40*, 739-744.
- Bourdet-Sicard, R., Egile, C., Sansonetti, P.J., and Tran Van Nhieu, G. (2000). Diversion of cytoskeletal processes by shigella during invasion of epithelial cells. *Microbes and Infection* *2*, 813-819.
- Breitschwerdt, E.B., Sontakke, S., Cannedy, A., Hancock, S.I., and Bradley, J.M. (2001). Infection with *Bartonella weissii* and detection of *Nanobacterium* antigens in a north carolina beef herd. *Journal of Clinical Microbiology* *39*, 879-882.
- Brenner, D.J., O'Connor, S.P., Winkler, H.H., and Steigerwalt, A.G. (1993). Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea* with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., *Bartonella elisabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the Order *Rickettsiales*. *International Journal of Systematic Bacteriology* *43*, 777-786.
- Brouqui, P. and Raoult, D. (1996). *Bartonella quintana* invades and multiplies within endothelial cells in vitro and in vivo and forms intracellular blebs. *Research in Microbiology* *17*, 719-731.
- Buckles, E.L. and McGinnis Hill, E. (2000). Interaction of *Bartonella bacilliformis* with human erythrocyte membrane proteins. *Microbial Pathogenesis* *29*, 165-174.
- Buhring, H.J., Muller, T., Herbst, R., Cole, S., Rappold, I., Schuller, W., Zhu, Fritsch, U., Faul, C., Armeanu, S., Ullrich, A., Klein, G., and Schmidt, H. (1996). The adhesion molecule E-cadherin and a surface antigen recognized by the antibody 9C4 are selectively expressed on erythroid cells of defined maturational stages. *Leukemia* *10*, 106-116.
- Carithers, H.A. (1970). Cat-scratch disease; notes on its history. *American Journal of Diseases of Children* *119*, 200-203.
- Cartwright, J.L., Britton, P., Minnick, M.F., and McLennan, A.G. (1999). The *IalA* invasion gene of *Bartonella bacilliformis* encodes a (de)nucleoside polyphosphate hydrolase of the MutT motif family and has homologs in other invasive bacteria. *Biochemical & Biophysical Research Communications* *256*, 474-479.
- Chomel, B.B., Kasten, R.W., Floyd-Hawkins, K., Chi, B., Yamamoto, K., Roberts, W., Gurfield, A.N., Abbott, R.C., Pedersen, N.C., and Koehler, J.E. (1996). Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *Journal of Clinical Microbiology* *34*, 1952-1956.
- Christie, P.J. and Vogel, J.P. (2000). Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to the host cells. *Trends in Microbiology* *8*, 354-360.
- Cockerell, C.J. (1995). Bacillary Angiomatosis. *Archives of Dermatology* *22*, 501-512.
- Coleman, S.A. and Minnick, M.F. (2001). Establishing a direct role for the *Bartonella bacilliformis* invasion-associated locus B (*IalB*) protein in human erythrocyte parasitism. *Infection & Immunity* *69*, 4373-4381.
- Coleman, S.A., Mitchell, S.J., and Minnick, M.F. (1998). Surface localisation of the invasion associated locus B protein in *Bartonella bacilliformis*. Abstract at the ASM 98th general meeting, Atlanta, U.S.A.
- Conyers, G.B. and Bessman, M.J. (1999). The Gene, *ialA*, associated with the invasion of human erythrocytes by *Bartonella bacilliformis*, designates a nudix hydrolase active on dinucleoside 5'-Polyphosphates. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 1203-1206.

- Cossart, P., Boquet, P., Normark, S., and Rappuoli, R. (1996). Cellular microbiology emerging. *Science* 271, 315-316.
- Cousens, L.P. and Wing, E.J. (2000). Innate defenses in the liver during *Listeria* infection. *Immunological Reviews* 174, 150-159.
- Dale, J.D. (2001). Regulation of gene expression, 69-98. In: Dale, J.D.: Molecular genetics of bacteria. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Dehio, C. (1997). Pathogenesis of Bartonella (Rochalimaea) infections [Review]. *Bulletin de L'Institut Pasteur* 95, 197-207.
- Dehio, C. (1999). Interactions of Bartonella henselae with vascular endothelial cells [Review]. *Current Opinion in Microbiology* 2, 78-82.
- Dehio, C. (2001). Molecular and cellular basis of Bartonella interactions with endothelial cells and erythrocytes. *Trends in Microbiology* 9, 279-285.
- Dehio, C., Lanz, C., Pohl, R., Behrens, P., Bermond, D., Piemont, Y., Pelz, K., and Sander, A. (2001). Bartonella schoenbuchii sp. nov., isolated from the blood of wild roe deer. *International Journal of Evolution and Microbiology* 518Pt4, 1557-1565.
- Dehio, C. and Meyer, M. (1997). Maintenance of broad-host-range incompatibility group P and group Q plasmids and transposition of Tn5 in Bartonella henselae following conjugal plasmid transfer from Escherichia coli. *Journal of Bacteriology* 179, 538-540.
- Dehio, C., Meyer, M., Berger, J., Schwarz, H., and Lanz, C. (1997). Interaction of Bartonella henselae with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. *Journal of Cell Science* 110, 2141-2154.
- Dehio, M., Knorre, A., Lanz, C., and Dehio, C. (1998). Construction of versatile high-level expression vectors for Bartonella henselae and the use of green fluorescent protein as a new expression marker. *Gene* 215, 223-229.
- Derrick, S.C., Ihler, G.M. (2001). Deformin, a substance found in Bartonella bacilliformis culture supernatants, is a small, hydrophobic molecule with an affinity for albumin. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 27, 1013-1019
- Devereux, J., Haeberli, P., and Smithies, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Research* 12, 387-395.
- Dörmer, P. and Clemens, M.R. (1994). Erythrozytäres System und Hämoglobin, 9-16. In: Hämatologie. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Dramsfi, S. and Cossart, P. (1998). Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annual Review of Cell Developmental Biology* 14, 137-166.
- Droz, S., Chi, B., Horn, E., Steigerwalt, A.G., Whitney, A.M., and Brenner, D.J. (1999). Bartonella koehlerae sp. nov., isolated from cats. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 1117-1122.
- Ender, P.T., Phares, J., Gerson, G., Taylor, S.E., Regnery, R., Challeuer, R.C., and Dolan, M.J. (2001). Association of Bartonella species and Coxiella burnetii infection with coronary artery disease. *Journal of Infectious Diseases* 183, 831-834.
- Falkow, S. (1988). Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Reviews on Infectious Diseases* 10, S274-S276

- Falkow, S. (1997). Probing the intracellular life of bacteria. *Harvey Lectures* 93, 65-74.
- Figurski, D.H. and Helinski, D.R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 1648-1652.
- Finlay, B.B. and Falkow, S. (1989). Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiology Reviews* 53, 210-230.
- Foil, L., Andress, E., Freeland, R.L., Roy, A.F., Rutledge, R., Triche, P.C., O'R, and KL (1998). Experimental infection of domestic cats with *Bartonella henselae* by inoculation of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) feces. *Journal of Medical Entomology* 35, 625-628.
- Fournier, P.E., Minnick, M.F., Lepidi, H., Salvo, E., and Raoult, D. (2001). Experimental model of human body louse infection using green fluorescent protein-expressing *Bartonella quintana*. *Infection & Immunity* 69, 1876-1879.
- Freeland, R.L., Scholl, D.T., Rohde, K.R., Shelton, L.J., and O'Reilly, K.L. (1999). Identification of *Bartonella*-specific immunodominant antigens recognized by the feline humoral immune system. *Clinical & Diagnostic Laboratory Immunology* 6, 558-566.
- Garcia, F., Wojta, J., and Hoover, R. (1992). Interactions between live *Bartonella bacilliformis* and endothelial cells. *Journal of Infectious Diseases* 165, 1138-1141.
- Glaser, C.A., Trappero, J.W., and Koehler, J.E. (1994). *Rochalimea henselae* infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 271, 531-535.
- Gorcynski, R.M., Chen, Z., Hoang, Y., and Rossi-Bergmann, B. (1996). A subset of gamma-delta T-cell receptor-positive cells produce T-helper type-2 cytokines and regulate mouse skin graft rejection following portal venous pretransplant preimmunization. *Immunology* 87, 381-389.
- Greenberg, S. (1995). Signal transduction of phagocytosis. *Trends in Microbiology* 5, 93-97.
- Greene, C.E., McDermott, M., Jameson, P.H., Atkins, C.L., and Marks, A.M. (1996). *Bartonella henselae* infection in cats: evaluation during primary infection, treatment, and rechallenge infection. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 1682-1685.
- Guptill, L., Slater, L., Wu, C.C., Glickman, L.T., Lin, T.L., Welch, D.F., Crippen, J.T., and Hogenesch, H. (1999). Immune response of neonatal specific pathogen-free cats to experimental infection with *Bartonella henselae*. *Veterinary Immunology & Immunopathology* 71, 233-243.
- Guptill, L., Slater, L., Wu, C.C., Lin, T.L., Glickman, L.T., Welch, D.F., and Hogenesch, H. (1997). Experimental infections of young specific pathogen-free cats with *Bartonella henselae*. *Journal of Infectious Diseases* 176, 206-216.
- Guptill, L., Slater, L.N., Wu, C.C., Lin, T.L., Glickman, L.T., Welch, D.F., Tobolski, J., and Hogenesch, H. (1998). Evidence of reproductive failure and lack of perinatal transmission of *Bartonella henselae* in experimentally infected cats. *Veterinary Immunology & Immunopathology* 65, 177-189.
- Hansmann, Y. (2000). Experimental bacteremia of the rat after inoculation with *Bartonella tribocorum*. *Medizinische Dissertation, Universität Straßburg*.
- Heller, R., Artois, M., Xemar, V., De Briel, D., Gehin, H., Jaulhac, B., Monteil, H., and Piemont, Y. (1997). Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 1327-1331.

- Heller, R., Kubina, M., Mariet, P., Riegel, P., Delacour, G., Dehio, C., Lamarque, F., Kasten, R., Boulouis, H.J., Monteil, H., Chomel, B., Piemont, Y. (1999). *Bartonella alsatica* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rabbits. *International Journal of Systematic Bacteriology* *49*, 283-288.
- Heller, R., Riegel, P., Hansmann, Y., Delacour, G., Bermond, D., Dehio, C., Lamarque, F., Monteil, H., Chomel, B., Piemont, Y., *Bartonella*, t.s., Rat, and Zoonoses (1998). *Bartoennlla tribocorum* sp. nov., a new *Bartonella* species isolates from the bloos of wild rats. *International Journal of Systematic Bacteriology* *48*, 1333-1339.
- Henderson, I.R., Nataro, J.P., Kaper, J.B., eyer, T.F., arrand, S.K., runs, D.L., Finlay, B.B., and St Geme, J.W.3rd. (2000). Renaming protein secretion in the gram-negative bacteria. *Trends in Microbiology* *8*, 352
- Herraez, A., Diaz, A., Luque, J., and Diez, J.C. (1993). Immunological relationship among rat erythrocyte membrane sialoglycoproteins and with human glycoporphins. *International Journal of Biochemistry* *25*, 1009-1014.
- Hildebrandt, J.P. (1996). Malaria - Biologische Aspekte einer für den Menschen bedeutsamen Infektionskrankheit. *Naturwissenschaften* *83*, 359-369.
- Hoffbrand, A., Pettit, J.E., and Hoelzer, A. (1997). Erythropoese und allgemeine Aspekte der Anämie, 12-36. In: Hoffbrand,A.: Roche Grundkurs Hämatologie. Blackwell Wissenschaftsverlag GmbH, Berlin.
- Holmes, A.H. (1995). *Bartonella henselae* endocarditis in an immunocompetent adult. *Clinical Infectious Diseases* *21*, 1004-1007.
- Ihler, G.M., Bartonella, b., Oroya, f., Carrions, d., and Verruga, p. (1996). *Bartonella bacilliformis* - dangerous pathogen slowly emerging from deep background [Review]. *FEMS Microbiology* *144*, 1-11.
- Iwaki-Egawa, S. and Ihler, G.M. (1997). 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 Microbiology* *157*, 207-217.
- Jameson, P., Greene, C., Regnery, R., Dryden, M., Marks, A., Brown, J., Cooper, J., Glaus, B., and Greene, R. (1995). Prevalence of *Bartonella henselae* antibodies in pet cats throughout regions of North America. *Journal of Infectious Diseases* *172*, 1145-1149.
- Kahrs, A.F., Odenbreit, S., Schmitt, W., Heuermann, D., Meyer, T.F., and Haas, R. (1995). An improved TnMax mini-transposon system suitable for sequencing, shuttle mutagenesis and gene fusions. *Gene* *167*, 53-57.
- Karem, K.L., Dubois, K.A., McGill, S.L., and Regnery, R.L. (1999). Characterisation of *Bartoennlla henselae*-specific immunity in BALB/c mice. *Immunology* *97*, 352-358.
- Keen, N., Tamaki, S., Kobayashi, D., and Trollinger, D. (1988). Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* *70*, 191-197.
- Kemper, C. (1995). The tolerance for zidovudine plus thrice weekly or daily trimethoprim-sulfamethoxazole with and without leucovorin for primary prophylaxis in advanced HIV disease. California Collaborative Treatment Group. *American Journal of Medicine* *89*, 216-222.
- Kempf, V.A.J.; Volkmann, B.; Schaller, M.; Sander, C.A.; Alitalo, K.; Rieß, T.; Autenrieth, I.B. (2001). Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. *Cellular Microbiology* *3*, 623-632
- Kendall, L.V., Riley, L.K., Hook, R.R.J., Besch-Williford, C.L., and Franklin, C.L. (2001). Differential interleukin-10 and gamma interferon mRNA expression in lungs of cillium-associated respiratory bacillus-infected mice. *Infection & Immunity* *69*, 3697-3702.

- Kerkhoff, F.T., Bergmans, A.M.C., van der Zee, A., and Rothova, A. (1999). Demonstration of *Bartonella grahamii* DNA in ocular fluids of patients with neuroretinitis. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 4034-4038.
- Kilian, M., Reinholt, J., Lomholt, H., Poulsen, K., and Frandsen, E.V. (1996). Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 104, 321-338.
- Knolle, P.A. (1998). IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules. *Clinical and Experimental Immunology* 114, 427-433.
- Knolle, P.A. (1999). Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells. *Journal of Immunology* 162, 1401-1407.
- Knolle, P.A. and Gerken, G. (2000). Local control of the immune response on the liver. *Immunological Reviews* 174, 21-34.
- Koehler, J.E., Sanchez, M.A., Garrido, C.S., Whitfield, M.J., Chen, F.M., Berger, T.G., Rodriguezbarradas, M.C., Leboit, P.E., and Tappero, J.W. (1997). Molecular epidemiology of Bartonella infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. *New England Journal of Medicine* 337, 1876-1883.
- Koesling, J., Aebischer, T., Falch, C., Schulein, R., and Dehio, C. (2001). Cutting edge: antibody-mediated cessation of hemotropic infection by intraerythrocytic mouse pathogen *Bartonella grahamii*. *Journal of Immunology* 167, 11-4.
- Kordick, D.L. and Breitschwerdt, E.B. (1995). Intraerythrocytic presence of Bartonella henselae. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 1655-1656.
- Kordick, D.L. and Breitschwerdt, E.B. (1997). Relapsing bacteremia after blood transmission of *Bartonella henselae* in cats. *American Journal of Veterinary Research* 58, 492-497.
- Kordick, D.L., Brown, T.T., Shin, K., and Breitschwerdt, E.B. (1999). Clinical and pathologic evaluation of chronic Bartonella henselae or Bartonella clarridgeiae infection in cats. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 1536-1547.
- Kosoy, M.Y., Regnery, R.L., Kosaya, O.I., and Childs, J.E. (1999). Experimental infection of cotton rats with three naturally occurring Bartonella species. *Journal of Wildlife Diseases* 35, 275-284.
- Kosoy, M.Y., Regnery, R.L., Kosaya, O.I., Jones, D.C., Marston, E.L., and Childs, J.E. (1998). Isolation of Bartonella spp. from embryos and neonates of naturally infected rodents. *Journal of Wildlife Diseases* 34, 305-309.
- Kosoy, M.Y., Regnery, R.L., Tzianabos, T., Marston, E.L., Jones, D.C., Green, D., Maupin, G.O., Olson, J.G., and Childs, J.E. (1997). Distribution, diversity, and host specificity of Bartonella in rodents from the Southeastern United States. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 57, 578-588.
- Köhler, W. (1994). Historische Entwicklung der Medizinischen Mikrobiologie, 3-17. In: H. Brandis, W. Köhler, H.J. Eggers, and G. Pulverer: *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Lamm, M.E. (1997). Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annual Review of Microbiology* 51, 311-340.
- Liberto, M.C. and Matera, G. (2000). Pathogenic mechanisms of Bartonella quintana. *The New Microbiologica* 23, 449-456.
- Limmer, A. (1998). Failure to induce organ-specific autoimmunity by breaking of tolerance: importance of the microenvironment. *European Journal of Immunology* 28, 2395-2406.

- Limmer, A., Ohl, J., Liunggern, H.G., Reiss, Y., Groettrup, M., Momburg, F., Arnold, B., and Knolle, P.A. (2000). Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8<sup>+</sup> T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nature medicine* *6*, 1348-1354.
- Lohse, A.W. (1996). Antigen-presentation function and B7 expression of murine sinusoidal lining cells and Kupffer cells. *Gastroenterology* *110*, 1175-1181.
- Loppnow, H. (2001). Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen. *Der Internist* *42*, 13-27.
- Lory, S. (1998). Secretion of proteins and assembly of bacterial surface organelles: shared pathways of extracellular protein targeting. *Current Opinion in Microbiology* *1*, 27-35.
- Maurin, M., Birtles, R., and Raoult, D. (1997). Current knowledge of Bartonella species. [Review] [159 refs]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* *16*, 487-506.
- Maurin, M. and Raoult, D. (1996). Bartonella (Rochalimaea) quintana infections. [Review] [170 refs]. *Clinical Microbiology Reviews* *9*, 273-292.
- McLennan, A.G. (1999). The MutT motif family of nucleotide phosphohydrolases in man and human pathogens. [Review]. *International Journal of Molecular Medicine* *4*, 79-89.
- Mehock, J.R., Greene, C.E., Gherardini, F.C., Hahn, T.W., and Krause, D.C. (1998). Bartonella henselae invasion of feline erythrocytes in vitro. *Infection & Immunity* *66*, 3462-3466.
- Meis, J.F.G.M., Verhave, J.P., Jap, P.H.K., and Meuwissen, J.H.E.Tn. (1983). An ultrastructural study on the role of Kupffer cells in the process of infection by Plasmodium berghe sporozoites in rats. *Parasitology* *86*, 231-242.
- Mernaugh, G. and Ihler, G.M. (1992). Deformation factor: an extracellular protein synthesized by Bartonella bacilliformis that deforms erythrocyte membranes. *Infection & Immunity* *60*, 937-943.
- Merz, A.J. and So, M. (2000). Interactions of pathogenic neisseriae with epithelial cell membranes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* *16*, 423-457.
- Minnick, M.F. (1999). Genetic manipulation of Bartonella virulence determinants. Abstract at the 1st Congress on Bartonella as Emerging Pathogen.
- Minnick, M.F. and Anderson, A.J. (2000). Bartonella interactions with host cells. *Subcellular Biochemistry* *33*, 97-123.
- Minnick, M.F., Mitchell, S.J., and McAllister, S.J. (1996). Cell entry and the pathogenesis of Bartonella infections. [Review] [20 refs]. *Trends in Microbiology* *4*, 343-347.
- Mitchell, S.J. and Minnick, M.F. (1995). Characterization of a two-gene locus from Bartonella bacilliformis associated with the ability to invade human erythrocytes. *Infection & Immunity* *63*, 1552-1562.
- Mitchell, S.J. and Minnick, M.F. (1997a). A carboxy-terminal processing protease gene is located immediately upstream of the invasion-associated locus from Bartonella bacilliformis. *Microbiology* *143*, 1221-1233.
- Mitchell, S.J. and Minnick, M.F. (1997b). Cloning, functional expression, and complementation analysis of an inorganic pyrophosphatase from Bartonella bacilliformis. *Canadian Journal of Microbiology* *43*, 734-743.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology* *19*, 683-765.
- Noguchi, H. and Battistini, T. (1926). Cultivation of Bartonella bacilliformis. *Journal of Experimental Medicine* *43*, 851-864.



- O'Reilly, K.L., Bauer, R.W., Freeland, R.L., Foil, L.D., Hughes, K.J., Rohde, K.R., Roy, A.F., Stout, R.W., and Trichle, P.C. (1999). Acute clinical disease in cats following infection with a pathogenic strain of *Bartonella henselae* (LSU 16). *Infection & Immunity* *67*, 3066-3072.
- Pirson, P.H. (1982). Culture of the extraerythrocytic liver stages of *Plasmodium berghei* sporozoites in rat hepatocytes. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* *76*, 422.
- Ratet, P., Schell, J., and de Bruijn, F.J. (1988). Mini-Mulac transposons with broad-host-range origins of conjugal transfer and replication designed for gene regulation studies in Rhizobiaceae. *Gene* *63*, 41-52.
- Raupach, B., Mecsas, J., Heczko, U., Falkow, S., and Finlay, B.B. (1999). Bacterial epithelial cell cross talk. *Current Topics in Microbiology and immunology* *236*, 137-161.
- Regnath, T., Mielke, M.E., Arvand, M., and Hahn, H. (1998). Murine model of *Bartonella henselae* infection in the immunocompetent host. *Infection & Immunity* *66*, 5534-5536.
- Regnery, R.L., Anderson, B.E., Clarridge, J.E., Rodriguez-Barradas, M.C., Jones, D.C., and Carr, J.H. (1992). Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *Journal of Clinical Microbiology* *30*, 265-274.
- Regnery, R.L., Rooney, J.A., Johnson, A.M., Nesby, S.L., Manzewitsch, P., Beaver, K., and Olson, J.G. (1996). Experimentally induced *Bartonella henselae* infections followed by challenge exposure and antimicrobial therapy in cats. *American Journal of Veterinary Research* *57*, 1714-1719.
- Reynafarje, C. and Ramos, J. (1961). The hemolytic anemia of human bartonellosis. *Blood* *17*, 562-578.
- Ristic, M. (1979). Hemotropic bacteria. *New England Journal of Medicine* *301*, 937-939.
- Rolain, J.M., La Scola, B., Liang, Z., Davoust, B., Raoult, D. (2001). Immunofluorescent detection of intraerythrocytic *Bartonella henselae* in naturally infected cats. *Journal of Clinical Microbiology* *39*, 2978-2980
- Ronald, C.R., Mangino, M.J., Duffy, B.F., and Flye, M.W. (1993). Lymphocyte suppression by Kupffer cells prevents portal venous tolerance induction: a study of macrophage function after intravenous gadolinium. *Transplantation* *55*, 1151-1158.
- Sander, A., Buhler, C., Pelz, K., Voncramm, E., and Bredt, W. (1997). Detection and identification of two *Bartonella henselae* variants in domestic cats in Germany. *Journal of Clinical Microbiology* *35*, 584-587.
- Sander, A., Kaliebe, T., and Bredt, W. (1996). *Rochalimaea* infections - cat scratch fever and bacillary angiomatosis [German]. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* *121*, 65-69.
- Sander, A., Ketzer, S., Bredt, W., Oberle, K., and Bereswill, S. (2000). Hemin-dependent growth and hemin binding of *Bartonella henselae*. *FEMS Microbiology* *189*, 55-59.
- Scherer, D.C., DeBuron-Connors, I., and Minnick, M.F. (1993). Characterization of *Bartonella bacilliformis* flagella and effect of anti-flagellin antibodies on invasion of human erythrocytes. *Infection & Immunity* *61*, 4962-4971.
- Schülein, R., Seubert, A., Gille, C., Lanz, C., Hansmann, Y., Piemont, Y., and Dehio, C. (2001). Invasion and persistent intracellular colonisation of erythrocytes: a unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *Journal of Experimental Medicine* *193*, 1077-1086.
- Schwartzman, W. (1996). *Bartonella* (*Rochalimaea*) infections: beyond cat scratch. [Review] [26 refs]. *Annual Review of Medicine* *47*, 355-364.

- Seki, S., Habu, Y., Kawamura, T., Takeda, K., Dobashi, H., Ohkawa, T., and Hiraide, H. (2000). The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the role of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses. *Immunological Reviews* 174, 35-46.
- Serke, S. (1994). Identifizierung und Quantifizierung "unreifer" Erythrozyten, d.h. Retikulozyten, im Vollblut, 153-162. In: Schmitz, G. and Rothe, G.: Durchflußzytometrie in der klinische Diagnostik. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Sewnath, M.E., Olszyna, D.P., Birjmohun, R., ten Kate, F.J., Gouma, D.J., and van der Poll, T. (2001). IL-10-deficient mice demonstrate multiple organ failure and increased mortality during *Escherichia coli* peritonitis despite an accelerated bacterial clearance. *Journal of Immunology* 166, 6323-6331.
- Seyffert, W., Gassen, H.G., Hess, O., Jäckle, H., and Fischbach, K.F. (1998). Rekombination bei Prokaryonten, 499-525. In: Seyffert, W.: Lehrbuch der Genetik. Fischer Verlag, Stuttgart.
- Silverstein, S.C. (1995). Phagocytosis of microbes: insights and prospects. *Trends in Microbiology* 5, 141-142.
- Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1, 784-791.
- Sinden, R.E. and Smith, J.E. (1982). The role of the Kupffer cell in the infection of rodents by sporozoites of *Plasmodium*: uptake of sporozoites by perfused liver and the establishment of infection in vivo. *Acta Tropica* 39, 11-27.
- Sinnis, P. and Sim, B.K.L. (1997). Cell invasion by the vertebrate stages of *Plasmodium*. *Trends in Microbiology* 5, 52-58.
- Walker, T.S. and Winkler, H.H. (1981). *Bartonella bacilliformis*: colonial types and erythrocyte adherence. *Infection & Immunity* 31, 480-486.
- Watson, J.D., Hopkins, N.H., Roberts, J.W., Steitz, J.A., and Weiner, A.M. (1987). Recombinant DNA at Work, 1002-1123. In: Gillen J.R.: Molecular biology of the gene. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park.
- Wisse, E., Braet, F., Luo, D., De Zanger, R., Jans, D., Crabbe, E., and Vermoesen, A. (1996). Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. *Toxicologic Pathology* 24, 100-111.
- Wyrick, P.B. (2000). Intracellular survival by Chlamydia. *Cellular Microbiology* 2, 275-282.
- Xu, Y.H., Lu, Z.Y., and Ihler, G.M. (1995). Purification of deformin, an extracellular protein synthesized by *Bartonella bacilliformis* which causes deformation of erythrocyte membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1234, 173-183.
- Zangwill, K.M., Hamilton, D.H., Perkins, B.A., Regnery, R.L., Plikaytis, B.D., Hadler, J.L., Cartter, M.L., and Wenger, J.D. (1993). Cat scratch disease in Connecticut. Epidemiology, risk factors, and evaluation of a new diagnostic test [see comments]. *New England Journal of Medicine* 329, 8-13.

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, die durch eine Kooperation der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Michael Sessler (Abteilung Allgemeine Chirurgie, Direktor: Prof. Dr. Horst D. Becker) und von Prof. Dr. Christoph Dehio (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Direktor: Prof. Dr. Thomas Meyer) möglich wurde. Mein besonderer Dank gilt

Prof. Dr. Michael Sessler für die Überlassung des Themas und uneingeschränkte Hilfe als Doktorvater sowie die wertvolle wissenschaftliche Anleitung,

Herrn Prof. Dr. Christoph Dehio für die immer wieder begeisterte Betreuung und Wegweisung im Labor,

Herrn Prof. Dr. Klaus Dietz für die uneingeschränkte Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse,

Frau Dr. Christa Lanz für die Einarbeitung in viele Methoden, die ständige Hilfsbereitschaft und ihre muntere Fröhlichkeit im Labor,

Dr. Ralf Schüle, Dr. Anja Seubert und Christine Falch für die motivierende Zusammenarbeit zu jeder Tages- und Nachtzeit,

Dr. Anja Seubert für die spontane Diskussionsbereitschaft und Hilfe beim Verfassen der Arbeit,

Dr. Michaela Dehio für ihre Hilfe bei vielen kleinen und großen Fragen,

Frau PD Dr. Anne Sander (Freiburg) für die Unterstützung mit Fotomaterial,

Dr. Yves Hansmann (Straßburg) für die Diskussionsbereitschaft,

allen anderen Mitarbeitern der Abteilungen.

Im Gedenken an Uwe Kagels.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir den Freiraum für mein Studium und die Dissertation ermöglichten. Einen großen Dank richte ich an Birgit Klupsch für so vieles.

# Lebenslauf

Name	Christian Gille
Geburtsdatum	30.12.1975
Geburtsort	Bonn- Bad Godesberg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

## Schulische Ausbildung

1982-1986	Wilhelm-Busch-Grundschule in Ratingen-Hösel
1986-1995	Theodor-Fliehdner-Gymnasium in Düsseldorf-Kaiserswerth
1995	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

## Akademische Ausbildung

1995	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
1997	Ablegen der ärztlichen Vorprüfung in Tübingen
1998	Beginn der Dissertationsarbeit unter Anleitung von Dr. Christoph Dehio am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Tübingen
1999	Ablegen der ersten ärztlichen Prüfung in Tübingen
2002	Ablegen der zweiten ärztlichen Prüfung in Tübingen
22.05.2003	Ablegen der dritten ärztlichen Prüfung in Tübingen