

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität Tübingen

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. I. B. Autenrieth

**Untersuchungen zum Einsatz eines neuartigen
Flüssigmediums für *Bartonella* spp. und zum Nachweis
von *B. henselae* DNA in europäischen Zecken**

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

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

vorgelegt von

Florian Dietrich

aus

München

2011

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. V. Kempf

2. Berichterstatter:

Professor Dr. C. Sinzger

3. Berichterstatter:

Professor Dr. C. Dehio

4. Berichterstatter:

Professor Dr. S. Hammerschmidt

1	Einleitung	1
1.1	Die Gattung <i>Bartonella</i>	1
1.1.1	Durch <i>Bartonella</i> spp. verursachte Erkrankungen.....	2
1.1.1.1	Carrión-Krankheit (<i>B. bacilliformis</i>).....	2
1.1.1.2	Fünftagefieber (<i>B. quintana</i>).....	3
1.1.1.3	Katzenkratzkrankheit (<i>B. henselae</i>)	3
1.1.1.4	Vaskuloproliferative Krankheitsbilder	4
1.1.2	Diagnostik von Infektionen mit <i>Bartonella</i> spp.....	5
1.1.3	Antibiotische Therapie von Infektionen mit <i>Bartonella</i> spp.....	6
1.1.4	Kultivierung von <i>Bartonella</i> spp.	6
1.1.5	Pathogenitätsfaktoren von <i>Bartonella</i> spp.....	8
1.1.5.1	Typ IV Sekretionssysteme von <i>Bartonella</i> spp.....	8
1.1.5.2	Trimere Autotransporter Adhäsine	9
1.1.5.3	Weitere Pathogenitätsfaktoren	10
1.1.6	Interaktion mit Wirtszellen (Angiogenese)	11
1.1.6.1	Grundlagen der Angiogenese	11
1.1.6.2	Regulation der Angiogenese	12
1.1.6.3	Angiogenese durch bakterielle Pathogene	13
1.1.7	Zecken als Vektoren verschiedener Krankheitserreger	13
1.1.8	Übertragung von <i>B. henselae</i> durch Arthropoden.....	14
1.2	Zielsetzung dieser Arbeit	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Geräte.....	16
2.1.2	Plastik und Verbrauchsmaterialien	17
2.1.3	Chemikalien	18
2.1.4	Kits	19
2.1.5	Antibiotika	19
2.1.6	Größenstandarts, Enzyme, Zytokine	20
2.1.7	Antikörper.....	20
2.1.8	Bakterienstämme und Kulturmedien	21
2.1.9	Zelllinien und Zellkulturmedien	22
2.1.10	Puffer und Lösungen	22

2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Herstellung von Bakterienstocks	26
2.2.2	Untersuchung des Wachstumsverhaltens von <i>Bartonella</i> spp. in verschiedenen Flüssigmedien	26
2.2.3	Anzucht von Bakterien für funktionelle Experimente.....	27
2.2.4	Anzucht von Bakterien auf Columbia Blutagarplatten zur Keimzahlbestimmung	28
2.2.5	Zellkultur	28
2.2.6	Kultivierungsbedingungen	28
2.2.7	Bestimmung der Lebendzellzahl	29
2.2.8	Infektionsbedingungen.....	29
2.2.9	Immunfluoreszenzfärbungen	30
2.2.10	IFT zum Nachweis der BadA-Expression von <i>B. henselae</i>	30
2.2.11	Doppelimmunfluoreszenz (DIF).....	31
2.2.12	Adhärenz von <i>B. henselae</i> an HUVECs.....	31
2.2.13	Gewinnung von Zellkulturüberständen	33
2.2.14	Zytokinkonzentrationsmessungen in Zellkulturüberständen	33
2.2.15	VEGF-A ELISA	34
2.2.16	IL-8 ELISA.....	34
2.2.17	Anreicherung von BadA aus Flüssigkulturüberstand	35
2.2.18	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	36
2.2.19	Herstellung der Gele und SDS-PAGE	36
2.2.20	Herstellung der Ganzzelllysate.....	37
2.2.21	Coomassiefärbung.....	37
2.2.22	Immunoblot	37
2.2.23	Elektronenmikroskopie	38
2.2.24	Sammlung und Identifikation der Zecken	39
2.2.25	DNA-Extraktion aus Zecken	39
2.2.26	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	40
2.2.27	Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	40
2.2.28	Sequenzierung.....	41
2.2.29	Statistik	41
3	Ergebnisse	43
3.1	Entwicklung eines Flüssigkulturmediums für <i>Bartonella</i> spp.....	43
3.1.1	Wachstums von <i>B. henselae</i> in Schneidermedium mit FCS.....	43
3.1.2	Vergleich des Wachstums von <i>B. henselae</i> aus tiefgefrorenen Stocks und auf CBA kultivierten <i>B. henselae</i> in Schneidermedium mit FCS	44

3.1.3	Wirkung verschiedener Supplemente auf das Wachstum von <i>B. henselae</i>	45
3.1.4	Untersuchung verschiedener Standard-Flüssigmedien zur Kultivierung von <i>B. henselae</i>	47
3.1.5	Vergleich des Wachstums von <i>B. henselae</i> in Schneidermedium mit und ohne FCS.....	47
3.1.6	Vergleich des neuen Flüssigmediums mit BAPGM.....	49
3.1.7	Wachstum verschiedener <i>Bartonella</i> spp. in Schneidermedium mit 10% FCS.....	50
3.1.8	Einfluss verschiedener Zuckerzusätze auf das Wachstum von <i>B. henselae</i>	52
3.2	Funktionelle Analyse von Flüssigmedium-kultivierten <i>B. henselae</i>.....	55
3.2.1	Immunfluoreszenztest (IFT) zum Nachweis der BadA-Expression.....	55
3.2.2	Elektronenmikroskopische Darstellung von in Flüssigmedium kultivierten <i>B. henselae</i>	56
3.2.3	Nachweis der Induktion der VEGF-A-Sekretion durch <i>B. henselae</i>	57
3.2.4	Nachweis der IL-8-Sekretion nach Infektion mit <i>B. henselae</i>	58
3.2.5	Adhärenz und Invasion von <i>B. henselae</i> an HUVECs.....	60
3.2.6	Gewinnung von BadA aus dem Flüssigkulturüberstand nach Kultivierung von <i>B. henselae</i>	61
3.2.7	Proteinexpressionsmuster und Antigenprofil von in Flüssigmedium kultivierten <i>B. henselae</i>	62
3.3	Epidemiologische Auswertung der Mittels PCR untersuchten Zecken.....	64
3.3.1	Prävalenz von <i>B. henselae</i> DNA in europäischen Zecken.....	64
3.3.2	Prävalenz von <i>B. burgdorferi</i> sensu lato DNA in europäischen Zecken.....	64
3.3.3	Statistische Analyse der Prävalenz-Daten.....	67
4	Diskussion.....	68
4.1	Allgemeines.....	68
4.1.1	Einsatzmöglichkeiten des neuen Flüssigmediums in Diagnostik und Forschung.....	69
4.1.2	Vergleich mit bereits vorhandenen Flüssigmedien für <i>Bartonella</i> spp.	70
4.1.3	Wachstumskinetik von <i>B. henselae</i> in Flüssigmedium.....	71
4.1.4	Verwendung von in Flüssigmedium kultivierten <i>B. henselae</i> in Infektions-Experimenten.....	72
4.1.5	Abhängigkeit des Wachstums von <i>B. henselae</i> von verschiedenen Zuckerzusätzen.....	73
4.1.6	Ausblick auf zukünftige Experimente.....	75

4.2	Zecken als mögliche Vektoren für <i>B. henselae</i>	75
4.2.1	Reservoirwirte verschiedener <i>Bartonella</i> spp.	75
4.2.2	Übertragung von <i>Bartonella</i> spp. durch Arthropoden	77
4.2.3	Limitationen der Untersuchungen zur Anwesenheit von <i>B. henselae</i> in Zecken	78
5	Zusammenfassung	79
5.1	Entwicklung und Optimierung eines Flüssigmediums für <i>Bartonella</i> spp.	79
5.2	Untersuchung der Prävalenz von <i>B. henselae</i> DNA in europäischen Zecken	80
6	Literaturverzeichnis	81
7	Publikationen	96
8	Abkürzungen	97
9	Danksagung	100
10	Lebenslauf	101

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Bartonella*

Bei *Bartonella* spp. handelt es sich um Gram-negative, aerobe, fakultativ intrazellulär wachsende Stäbchenbakterien. Sie gehören zur Klasse der α 2-Proteobakterien und sind phylogenetisch eng mit den Gattungen *Brucella*, *Rhizobium* und *Agrobacterium* verwandt (103). *B. bacilliformis* war lange Zeit die einzige Spezies der Gattung *Bartonella*, bis 1993 die Gattungen *Grahamella* und *Rochalimaea* aufgrund molekulargenetischer Analysen in die Gattung *Bartonella* aufgenommen wurden (17, 19). Mittlerweile umfasst diese Gattung rund 20 Arten, von denen 10 als humanpathogen beschrieben wurden: *B. bacilliformis*, *B. quintana*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. vinsonii*, *B. koehlerae*, *B. rochalimae* und *B. washoensis* (50). Diese sind jeweils auf verschiedene Reservoirwirte innerhalb der Säugetiere spezialisiert und besiedeln dort Endothelzellen und Erythrozyten. Ihre Übertragung erfolgt hauptsächlich durch blutsaugende Arthropoden wie Flöhe (35), Läuse (12) und wahrscheinlich auch Zecken (43). Während die Infektion eines Reservoirwirts zu einer langanhaltenden intraerythrozytären Bakteriämie und einer Assoziation der Erreger mit den Endothelzellen führt (48), kommt es bei der Infektion von Fehlwirten zu unterschiedlichen klinischen Manifestationen (76). Der Reservoirwirt von *B. henselae* ist die Hauskatze, in der die Infektion eine langdauernde, typischerweise asymptomatische Bakteriämie verursacht (85). *B. henselae* wurde darüber hinaus im peripheren Blut vieler weiterer domestizierter [Hunde, Pferde (78, 112)] und wildlebender Tiere [Löwen, Geparden, Schweinswalen, Wildkatzen (98, 111, 154)] nachgewiesen. Für *B. bacilliformis* und *B. quintana* ist allein der Mensch Reservoirwirt (11, 13). Beim Menschen handelt es sich um einen Fehlwirt von *B. henselae*. *B. henselae*, *B. quintana* und *B. bacilliformis* sind in der Lage beim Menschen angioproliferative Krankheitsbilder auszulösen. Diese Fähigkeit macht sie unter bakteriellen Infektionserregern einzigartig (50).

1.1.1 Durch *Bartonella* spp. verursachte Erkrankungen

Infektionen des Menschen durch *Bartonella* spp. sind häufig. So sind 13% der unklaren Halslymphknotenschwellungen durch eine *Bartonella*-Infektion bedingt (126). Bei gesunden Blutspendern in Europa liegt die Seroprävalenz von anti-*Bartonella*-Antikörpern (abhängig von Bewertungsgrenze und geographischer Lage) zwischen 5% und 30% (1). Vermutlich werden 3-4% aller Endokarditiden durch *Bartonella* spp. verursacht (3, 37). Vor allem bei alkoholkranken und obdachlosen Patienten stellen *Bartonella* spp. die Hauptursache für kulturnegative Endokarditiden dar. Prinzipiell können infektionen mit humanpathogenen *Bartonella* spp. sowohl akut als auch chronisch verlaufen (36, 51).

1.1.1.1 Carrión-Krankheit (*B. bacilliformis*)

Die Carrión-Krankheit wird durch *B. bacilliformis* hervorgerufen. Die Mensch-zu-Mensch-Übertragung erfolgt durch die Sandfliege *Lutzomyia verrucarum* (7). Da dieser Vektor in den westlichen Anden (Peru) oberhalb von 800 m Höhe endemisch ist, beschränkt sich die Verbreitung der Krankheit ebenfalls auf dieses Gebiet (66). Die Infektion verläuft in zwei Phasen wobei nach 2-4-wöchiger Inkubationszeit die erste Phase (Oroya-Fieber) eintritt, in der es nach dem Befall der Erythrozyten ebenfalls zur Kolonisierung von Leber und Milz kommt. Klinisch ist diese Phase durch hohes Fieber, Lymphknotenschwellung und schwere Hämolyse gekennzeichnet und verläuft ohne Antibiotikatherapie meist tödlich (66). Die zweite Phase beginnt nach 2-4 Monaten und äußert sich durch das Auftreten der so genannten Verruga peruana (Peru-Warze). Hierbei handelt es sich um charakteristische noduloverruköse Läsionen an Gesicht und Extremitäten, die nach einigen Monaten spontan abheilen (9, 99).

1.1.1.2 Fünftagefieber (*B. quintana*)

Infektionen mit *B. quintana* führen zu klinisch sehr unterschiedlichen Manifestationen, die von asymptomatischen Verläufen bis hin zu schweren Erkrankungen reichen. Das durch *B. quintana* ausgelöste Fünftagefieber zeichnet sich klassisch durch plötzlich einsetzendes hohes Fieber, starke Kopfschmerzen, sowie Schmerzen in Rücken und Beinen und eine aseptische Meningitis aus. Während der beiden Weltkriege kam es zu großen Epidemien, weswegen die Erkrankung auch unter dem Namen Schützengrabenfieber („trench fever“) bekannt wurde (104). Die Mensch-zu-Mensch-Übertragung erfolgt durch die Kleiderlaus *Pediculus humanus corporis* (12), wodurch zu erklären ist, dass heutzutage vor allem Personen, die unter schlechten hygienischen Bedingungen leben, betroffen sind (21, 75, 145). Diese vor allem Obdachlose und Alkoholiker betreffende Manifestation der Infektion wird als „urban trench fever“ bezeichnet. Neben dem Fünftagefieber kann *B. quintana* auch Endokarditiden auslösen und wurde 1992 als ein Erreger der bazillären Angiomatose (BA) identifiziert (121).

1.1.1.3 Katzenkratzkrankheit (*B. henselae*)

Die Infektion mit *B. henselae* führt beim Immunkompetenten zur sogenannten Katzenkratzkrankheit (KKK). Ihren Namen trägt die KKK deshalb, weil die Übertragung von Katzen auf den Menschen durch Kratz- oder Bissverletzungen erfolgt (34). Auch die indirekte Übertragung durch den Katzenfloh *Ctenocephalides felis* konnte mittlerweile nachgewiesen werden (34, 35). In Deutschland lässt sich *B. henselae* in 10% bis 70% der Katzen nachweisen, wobei diese zwar als Überträger fungieren, selbst aber keine Krankheitszeichen entwickeln (85).

Zu Beginn der Erkrankung bildet sich an der Keimeintrittsstelle typischerweise eine rotbraune, indolente Papel, die sich nach einigen Tagen bis Wochen

zurückbildet. Im Bereich des Lymphabflussgebietes folgt mit einer Latenz von 7-40 Tagen eine Lymphadenitis (Entzündung und Schwellung der Lymphknoten) (13), die in den meisten Fällen selbstlimitierend verläuft. Weitere Symptome wie Fieber, Übelkeit, Kopfschmerzen, Gewichtsverlust und Splenomegalie können hinzukommen.

Bei etwa 10% der Patienten kommt es zu schwerwiegenden Komplikationen. Hier ist beispielsweise das Parinaud'sche okuloglanduläre Syndrom zu nennen, das sich durch Enzephalitis, zerebrale Arteritis, Radikulitis und eine granulomatöse Entzündung von Leber und Milz manifestiert (25, 86, 152). Bei Betrachtung eines durch *B. henselae* befallenen Lymphknoten in der histologischen Untersuchung zeigt sich eine nekrotisierende, granulomatöse Entzündungsreaktion mit lymphatischen Infiltraten und mehrkernigen Riesenzellen (8).

1.1.1.4 Vaskuloproliferative Krankheitsbilder

Die durch *B. henselae* beim Menschen ausgelösten vaskuloproliferativen Krankheitsbilder treten vor allem bei immunsupprimierten Patienten auf, wobei schwerwiegende Verläufe vor allem Patienten mit eingeschränkter zellulärer Immunität betreffen (20, 86, 119, 148). Dies könnte auf der Fähigkeit des Erregers zur zellulären Invasion und intrazellulären Persistenz beruhen (20).

Bei Befall der Haut oder innerer Organe mit Ausnahme der Leber spricht man von einer Bazillären Angiomatose (BA). Diese sowohl durch *B. henselae*, als auch durch *B. quintana* ausgelöste Erkrankung wurde aufgrund ihrer Häufung bei HIV-Patienten in der CDC-Klassifikation des U.S. Center for Disease Control and Prevention als AIDS-Assoziierte Erkrankung klassifiziert. Bei der BA wird eine kutane Form mit einzeln oder multipel auftretenden kutanen Läsionen, die derb rötlich-livide imponieren (77), und eine parenchymatöse Form, bei der ausschließlich innere Organe wie Milz, Lymphknoten oder Knochenmark befallen sind, unterschieden (77).

Bei Befall der Leber spricht man von einer Peliosis hepatis, die als Sonderform der Bazillären Angiomatose angesehen werden kann. Typisch sind hier dilatierte Lebersinusoide und zystisch-gekammerte, blutgefüllte Endothelzell-Proliferationen (86, 88, 144). Die Peliosis hepatis kann nach Lehrbuchmeinung im Gegensatz zur Bazillären Angiomatose nur durch *B. henselae* verursacht werden.

1.1.2 Diagnostik von Infektionen mit *Bartonella* spp.

Der diagnostische Nachweis der Katzenkratzkrankheit, der Bazillären Angiomatose und der Peliosis hepatis erfolgt in erster Linie serologisch durch indirekten Immunfluoreszenztest zum Nachweis von Serumantikörpern gegen *Bartonella* spp. (120). Der Vorteil dieses zeitaufwendigen Tests ist seine hohe Sensitivität. Das Ergebnis muss jedoch auf Grund der subjektiven Beurteilung der untersuchenden Person und bekannter Kreuzreaktivität gegenüber weiteren humanpathogenen Bakterien wie z.B. *Coxiella burnetii*, *Chlamydia* spp., *Rickettsia rickettsii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Treponema pallidum*, *Francisella tularensis* sowie *Mycoplasma pneumoniae* kritisch bewertet werden (41, 55, 109). Bei der Bazillären Angiomatose und Peliosis hepatis kann zusätzlich der Versuch einer direkten Erregeranzucht aus Biopsiematerial unternommen werden. Aufgrund der technisch aufwendigen kulturellen Anzucht von *Bartonella* spp. und langen Inkubationszeiten (92, 146) gilt diese Methode nicht als effektiv und reproduzierbar (106). Die Methode zum direkten Erregernachweis stellt heute die PCR dar. Hier existieren verschiedene Protokolle unterschiedlicher Spezifität und Sensitivität (46, 63).

1.1.3 Antibiotische Therapie von Infektionen mit *Bartonella* spp.

Eine antibiotische Therapie der Katzenkratzkrankheit erfolgt lediglich bei komplikationsreichem Verlauf mit Azithromycin über 5 Tage. Bei komplikationslosen Verläufen genügt die symptomatische Therapie. Die Bazilläre Angiomatose und die Peliosis hepatis erfordern im Gegensatz dazu aufgrund der Blutungsneigung immer eine antibiotische Therapie (5). Diese erfolgt in der Regel mit Makroliden, Tetracyclinen oder Rifampicin über mindestens drei Wochen. Dies führt meist zur vollständigen Rückbildung der vaskuloproliferativen Läsionen (2, 8). Entscheidend bei der Wahl des Antibiotikums ist das Erreichen einer ausreichenden intrazellulären Wirkstoffkonzentration, da davon ausgegangen werden muss, dass *Bartonella* spp. intrazellulär persistieren (50).

1.1.4 Kultivierung von *Bartonella* spp.

Aufgrund ihrer Pathogenität, ihrer Übertragung durch Vektoren und ihrer Anpassung an eine Vielzahl von Säugetierwirten gehören *Bartonella* spp. zur Zeit zu den wichtigsten an klinischer Relevanz gewinnenden Pathogenen („emerging pathogens“) (51). Die Diagnostik der durch *Bartonella* spp. ausgelösten Erkrankungen stützt sich vor allem auf klinische Symptome und den serologischen Nachweis von Antikörpern. Häufig wird hierzu ein Immunfluoreszenztest durchgeführt (149), ein direkter Erregernachweis unterbleibt meist. Da jedoch bekannte serologische Kreuzreaktionen zwischen *B. henselae* und *B. quintana*-Antigenen bestehen (44) und darüber hinaus auch seronegative Krankheitsverläufe (108) beobachtet wurden, erscheint eine zusätzliche mikrobiologische Diagnostik sinnvoll. In der Praxis stößt man hier jedoch auf einige Schwierigkeiten. Die Auswahl der Medien, die das Wachstum von *Bartonella* spp. ermöglichen ist äußerst eingeschränkt (91). Berichte über die Anzucht liegen für verschiedene feste Nährböden vor, darunter Schaf-,

Hasen-, und Humanblut-basierte Medien (132). Hier sind jedoch Inkubationszeiten von bis zu 45 Tagen notwendig, um sichtbares Wachstum zu detektieren. Die daraus resultierende Kontaminationsgefahr durch schnellwachsende Umweltkeime erschwert die Anzucht und Handhabung von *Bartonella* spp. zusätzlich (105). Zwar wurde das Wachstum von *Bartonella* spp. in Flüssigmedien wie *Brucella*-Medium mit Fildes-Lösung, Blutkulturmedien (BACTEC Flaschen), *Rochalimaea* isolation Medium, BAPGM („*Bartonella* alpha-Proteobacteria growth medium“) und BBH-H Medium beschrieben (33, 97, 136, 142, 153), ein Standardflüssigmedium für die Anzucht von *Bartonella* spp. konnte sich bis heute jedoch nicht etablieren. Die Hauptprobleme der genannten Medien sind komplexe Formulierungen (BAPGM; ca. 20 Ingredienzien), chargenabhängige Wachstumserfolge und färbende Bestandteile (Blut oder Blutbestandteile), die eine Keimzahlbestimmung durch Messung der optischen Dichte verhindern.

Bei BAPGM handelt es sich um ein Flüssigkulturmedium, das auf der Basis des Insektenzellmediums DS2 durch Zugabe zahlreicher, verschiedener Aminosäuren, Coenzyme und Schafsblut entwickelt wurde (97). In diesem Medium wurden vielversprechende Wachstumserfolge erzielt, die leider durch die genannten Nachteile limitiert werden. Wachstum von *Bartonella* spp. in allen anderen oben genannten Medien konnte bislang nicht bestätigt werden.

Uneinigkeit besteht ebenfalls im Bezug auf die optimalen Wachstumsbedingungen für *Bartonella* spp.. Angaben für die optimale Kulturtemperatur reichen von 30°C bis 37°C, wobei widersprüchliche Effekte in Bezug auf Wachstumsgeschwindigkeiten beobachtet wurden. Oft wird die Atmosphäre auf 5% CO₂ angereichert. Kontroversen bestehen ebenfalls in Bezug auf die Abhängigkeit des Wachstums von Blutbestandteilen, im Besonderen von Häm. Hier wird von vielen Autoren beschrieben, dass ein Wachstum von *Bartonella* spp. lediglich unter Zugabe bestimmter Blutbestandteile zu beobachten ist.

Kokultivierung mit Zellen soll im Vergleich zu blutbasierten Medien höhere Wachstumsraten und erhöhte Sensibilität bei der Erregeranzucht ermöglichen (74). Trotz aller genannten Techniken bleibt die Isolation von *Bartonella* spp.

aus humanem Material eine Seltenheit, was beweist, dass ein leistungsfähiges, praxisorientiertes Flüssigmedium noch immer nicht zur Verfügung steht.

Verbesserte Kulturbedingungen sind jedoch nicht nur aus Sicht der mikrobiologischen Diagnostik wünschenswert. So erschwert die komplizierte und langwierige Anzucht vor allem die molekularbiologische Erforschung der Pathogenese von *Bartonella*-Infektionen (33).

1.1.5 Pathogenitätsfaktoren von *Bartonella* spp.

1.1.5.1 Typ IV Sekretionssysteme von *Bartonella* spp.

Typ IV Sekretionssysteme (TIVSS) werden von verschiedenen pathogenen Bakterien verwendet, um Proteine oder an Proteine gekoppelte DNA in Wirtszellen zu transportieren und so deren Stoffwechselprozesse zu beeinflussen (31, 38).

Eines der zwei bekannten TIVSS von *B. henselae* ist das VirB/VirD4-TIVSS, das homolog zum TIVSS von *Agrobacterium tumefaciens* ist (138). Hierbei handelt es sich um einen Komplex mehrerer Proteine, die wahrscheinlich gemeinsam einen nadelartigen Pilus und einen die Bakterienwand übergreifenden kanalartigen Porenkomplex bilden (38, 47, 50). Mit Hilfe dieses Komplexes ist das Bakterium in der Lage, Kontakt mit der Wirtszelle aufzunehmen und bestimmte Proteine - im Falle von *B. henselae* die Effektorproteine BepA-G (*Bartonella-translocated effector proteins*) - in die Wirtszelle zu transportieren (140). Diese Proteine vermitteln einige für die Infektion charakteristische Endothelzellantworten, wie Apoptoseinhibition, Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts und Aktivierung einer proinflammatorischen Wirtszellantwort (135, 136).

Beim Trw-TIVSS, dem zweiten bei *B. henselae* bekannten TIVSS, sind zwar alle Komponenten des Porenkomplexes kodiert, es fehlt jedoch der für die Translokation notwendige Substratrezeptor (VirD4-Homolog). Es wird deshalb angenommen, dass das Trw-TIVSS keine Effektorproteine transportiert. Ihm

wird jedoch eine Rolle bei der Invasion von Erythrozyten und der damit verbundenen intraerythrozytären Bakteriämie zugeschrieben (139, 143).

1.1.5.2 Trimere Autotransporter Adhäsine

Trimere Autotransporter-Adhäsine (TAA) sind bedeutende Pathogenitätsfaktoren Gram-negativer Bakterien und bilden charakteristische trimere Außenmembranproteine mit einer Kopf-Stiel-Anker Architektur („*head-stalk-anchor*“) (72, 96). Der am N-terminalen Ende sitzende Kopf („*head*“) ist über eine „*neck*“-Domäne mit dem langen Stiel („*stalk*“) verbunden, welcher in die C-terminale Membrananker-Domäne („*membrane anchor*“) übergeht. Besonders gut untersucht ist hier das als Prototyp der TAAs betrachtete *Yersinia* Adhäsin A (YadA) von *Yersinia enterocolitica*. Das mit 328 kDa außerordentlich große *Bartonella* Adhäsin A (BadA) von *B. henselae* ist das am besten charakterisierte TAA der Gattung *Bartonella* (127). BadA ist stark immunogen und weist strukturelle Ähnlichkeiten zu YadA auf. Aufgrund seiner ungewöhnlichen Größe wurde es lange Zeit fälschlicherweise als „Pilus“ beschrieben (14, 127). BadA ist in der Lage, an Endothelzellen und Bestandteile der extrazellulären Matrix (Fibronectin, Kollagen) zu binden. Darüber hinaus spielt es eine elementare Rolle in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors *hypoxia-inducible factor* (HIF-1) und damit dem Auslösen einer proangiogenetischen Wirtszellantwort. Auch die Sekretion der proangiogenetischen Zytokine „*vascular endothelial growth factor*“ (VEGF), Adrenomedullin (ADM) und anderer Zytokine konnte ausschließlich bei Infektion mit BadA-positiven *B. henselae* beobachtet werden (127). Auch in anderen *Bartonella* spp. wurden zu BadA homologe Proteine beobachtet. So stellen bei *B. quintana* die „*variably expressed outer membrane proteins*“ (Vomps) (156) und bei *B. vinsonii* die „*Bartonella repeat proteins*“ (BrpA-C) BadA-Äquivalente dar (64).

1.1.5.3 Weitere Pathogenitätsfaktoren

B. henselae besitzt verschiedene Außenmembranproteine (outer membrane proteins, OMPs), die in Endothelzellen sowohl eine proinflammatorische Wirtszellantwort (62) als auch eine Endothelzellproliferation (40) auslösen. Das 43 kDa-Außenmembranprotein bindet an einen bislang nicht identifizierten Endothelzellrezeptor und wird deshalb als wichtiger Pathogenitätsfaktor von *B. henselae* angesehen (22, 23).

Es wurde beschrieben, dass das Wachstum von *B. henselae* häminabhängig ist. Unter einigen Außenmembran-assoziierten Proteinen, denen die Fähigkeit zur Bindung von Hämin zugesprochen wird, kommt Pap31 offenbar eine wichtige Rolle in der Bereitstellung von Hämin zu (157). Ähnliche Hämin-Bindeproteine wurden auch bei *B. quintana* beschrieben (30).

Das LPS von *Bartonella* spp. besitzt im Gegensatz zum LPS vieler anderer humanpathogener Erreger lediglich eine geringe endotoxische Aktivität. Gemessen an der TLR4-Reaktion ist die Aktivität des *Bartonella* spp. LPS um den Faktor 1000-10000 geringer als die des enterobakteriellen LPS (100, 155). Wahrscheinlich verursacht die Bakteriämie durch *B. henselae* aus diesem Grund keinen septischen Schock.

Ein weiterer Pathogenitätsfaktor ist das von *B. bacilliformis* sezernierte hydrophobe Deformin, welches eine Verformung der Erythrozytenmembran bewirkt. (15, 52).

Der aus den beiden Genen *ialA* und *ialB* bestehende Invasions-Assoziierte Locus ist bisher nur unzureichend charakterisiert (110). Dieser bei *Bartonella* spp. konservierte Genomabschnitt ist jedoch möglicherweise an der Invasion von Erythrozyten beteiligt (*ial*).

B. bacilliformis nimmt eine Sonderrolle in der Gattung *Bartonella* ein, da es kein TIVSS besitzt. Es bildet jedoch wie auch *B. clarridgeiae* mehrere unipolare Flagellen aus, die ihm eine hohe Beweglichkeit verleihen (134). Die ausgeprägte hämolytische Anämie des Oroya-Fiebers ist durch das von

B. bacilliformis exprimierte Hämolyse bedingt (68). Bei anderen *Bartonella* spp. nimmt die Invasion der Erythrozyten einen chronisch-nicht-hämolytischen Verlauf, was höchstwahrscheinlich an die Anwesenheit eines funktionierenden VirB/D4 TIVSS gekoppelt ist (49).

1.1.6 Interaktion mit Wirtszellen (Angiogenese)

1.1.6.1 Grundlagen der Angiogenese

Angiogenese beschreibt den Prozess der Expansion des Gefäßbettes durch Sprossung neu gebildeter Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen. Das angiogenetische Wachstum erfolgt durch eine gesteuerte Abfolge von Migration und Proliferation der gefäßauskleidenden Endothelzellen mit dem Ergebnis der Bildung organspezifischer Kapillarstrukturen. Während der Embryonalentwicklung kommt der Angiogenese eine Schlüsselrolle bei der Bildung und Reifung aller Organsysteme zu, da sie die Versorgung der entstehenden Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen sicherstellt (130).

Der entscheidende Stimulus für die Angiogenese ist die Hypoxie des umgebenden Gewebes. Übersteigt die Gewebsdicke das Diffusionsvermögen des Sauerstoffs, wird das Gefäßwachstum durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 („*hypoxia-inducible factor-1*“) eingeleitet. Dieser Transkriptionsfaktor kontrolliert eine Vielzahl von Genen, deren Genprodukte eine proangiogenetische Wirkung zeigen (116). Von herausragender Bedeutung ist hierbei der angioproliferativ wirksame "*vascular endothelial growth factor*" (VEGF) (28). Beim Erwachsenen tritt Angiogenese physiologischerweise nur im Verlauf des weiblichen Menstruationszyklus, während der Schwangerschaft und bei Wundheilungsprozessen auf (27). Bei einer Vielzahl von pathologischen Vorgängen ist jedoch auch im Erwachsenenalter ein verstärktes Wachstum von Blutgefäßen zu beobachten. Dies gilt insbesondere für neoplastische (61) und entzündliche Erkrankungen (26). Solide Tumoren müssen zum Überschreiten einer gewissen Größe die

Fähigkeit zur Angiogenese entwickeln, da die Vaskularisierung des entstehenden Gewebes eine Voraussetzung für das weitere Wachstum darstellt (29). Die Versorgung von Gewebe durch Diffusion ist lediglich bis zu einer Dicke von 100-200 μm möglich, wodurch die Fähigkeit zur Angiogeneseinduktion unumgänglich für die Bildung größerer Tumore ist. Aus diesem Grund ist Angiogenese ein wichtiger Forschungsbereich, der bereits erste Therapiemöglichkeiten in der Tumormedizin hervorbrachte. Im Besonderen ist hier die Entwicklung von Bevacizumab zu nennen, einem monoklonalen anti-VEGF-Antikörper, der bereits mit großem Erfolg in der Therapie von Brustkrebs, metastasierten kolorektalen Karzinomen, inoperablen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen und fortgeschrittenen Nierenzellkarzinomen eingesetzt wird (53, 69, 79, 95, 129).

1.1.6.2 Regulation der Angiogenese

Die Regulation der Angiogenese unterliegt einem Gleichgewicht aus proangiogenetisch und antiangiogenetisch wirksamen Zytokinen, die gemeinsam den „angiogenic switch“ auslösen (67). Unter den proangiogenetischen Zytokinen kommt der Familie der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) eine zentrale Rolle zu (130). Diese durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 regulierte Zytokinfamilie beinhaltet neben VEGF-A, -B, -C, -D, und NO auch die placentaren Wachstumsfaktoren 1 und 2 (PLGF-1, PLGF-2). Während VEGF-A vor allem das Wachstum neuer Blutgefäße reguliert, sind VEGF-C und VEGF-D am Wachstum von Lymphgefäßen beteiligt (80).

Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor in der Regulation der Angiogenese ist der Nukleäre Faktor- κB (NF- κB). Verschiedene mikrobielle Strukturen (bakterielle Lipopolysaccharide) sowie diverse Zytokine [darunter Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1)] aktivieren NF- κB (94). Dieser reguliert seinerseits verschiedene Gene, deren Genprodukte an

Vorgängen wie der Angiogenese, der Apoptoseinhibition und der inflammatorischen Immunantwort beteiligt sind (4, 158). Von besonderem Interesse ist die antiapoptotische Wirkung von NF- κ B sowie die Induktion des sowohl proinflammatorisch als auch proangiogenetisch wirksamen Zytokins IL-8 (Interleukin 8) (84).

1.1.6.3 Angiogenese durch bakterielle Pathogene

Im Gegensatz zu viralen Pathogenen ist die Fähigkeit zur Modulation angiogenetischer Prozesse bei Bakterien eine bislang lediglich bei *B. bacilliformis*, *B. quintana* und *B. henselae* beobachtete Rarität. So verursachen diese (wie vorangehend bereits erwähnt) die vaskuloproliferativen Erkrankungen Verruga peruana, Bazilläre Angiomatose und Peliosis hepatis. (87, 104). Dies kann als Pathogenitätsstrategie verstanden werden, durch die sich diese *Bartonella* spp. ihr eigenes Habitat „Endothelzelle“ sichern (81).

1.1.7 Zecken als Vektoren verschiedener Krankheitserreger

Ixodes ricinus Zecken dienen vielen Pathogenen, wie *Borrelia burgdorferi*, dem Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) Virus, *Anaplasma phagocytophila* und *Babesia* spp. als Vektor. Der Erreger der Lyme-Krankheit, *B. burgdorferi* sensu lato, kommt in ganz Mitteleuropa vor. Kleine Nagetiere und bodenlebende Vögel stellen das Erregerreservoir für *B. burgdorferi* sensu lato dar (101, 124). Zecken nehmen diesen Erreger als Larven und Nymphen bei Blutmahlzeiten an infizierten Reservoirwirten auf und behalten diese, während sie sich zu ihrem nächsten Stadium entwickeln. Die hierbei entstehenden Nymphen und adulten Zecken können den Erreger nun bei einer weiteren Blutmahlzeit auf einen nicht infizierten Wirt übertragen. Da adulte *I. ricinus* Zecken während vorangegangener Blutmahlzeiten zwei Gelegenheiten hatten (als Larve und als

Nymphen), den Erreger der Lyme-Krankheit aufzunehmen, ist die Prävalenz von *B. burgdorferi* sensu lato in adulten Zecken in der Regel höher als die in Nymphen (122, 123).

1.1.8 Übertragung von *B. henselae* durch Arthropoden

Katzenflöhe sind gut untersuchte Vektoren in der Übertragung von *B. henselae* auf Katzen und Menschen (35, 71). Die Möglichkeit der Übertragung von *B. henselae* durch andere Arthropoden, allen voran Zecken, wurde diskutiert, da *B. henselae* DNA in *Ixodes pacificus* und *I. persulcatus* Zecken aus Nordamerika und Osteuropa nachgewiesen wurde (32, 70, 73, 113, 118). Auch in *I. ricinus* Zecken, die in Zentraleuropa von Menschen oder Haustieren entfernt wurden, war *B. henselae* DNA nachweisbar (115, 133). In Stechfliegen, Milben und Schafblausfliegen wurde die DNA verschiedener *Bartonella* spp. nachgewiesen [zusammengefasst in (16)]. Kürzlich wurden *I. ricinus* Zecken durch Membranfütterung experimentell mit *B. henselae* infiziert und anschließend Katzen mit deren Speicheldrüsen inokuliert. In darauffolgenden Messungen wurde in den Katzen eine Bakteriämie mit *B. henselae* nachgewiesen (43). Dies macht die Übertragung von *B. henselae* durch Zecken wahrscheinlich. Es existieren jedoch auch kontroverse Daten über die Prävalenz von *Bartonella* spp. in Zecken (147). Letztlich bleibt die Rolle der Zecken als Vektoren von *B. henselae* weitgehend unklar.

1.2 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, ein zellfreies Flüssigkulturmedium für *Bartonella* spp. auf Basis eines Insektenzellmediums zu entwickeln und zu optimieren. Dieses Medium sollte ein möglichst schnelles und verlässliches Wachstum von

Bartonella spp. ermöglichen, ohne die Möglichkeit der Wachstumskontrolle durch Messung der optischen Dichte aufgrund der Zugabe von stark färbenden Substanzen (z.B. Hämin) zu beeinträchtigen. Wichtig war außerdem die Möglichkeit der Anzucht ausgehend von einer geringen eingepfunden Keimzahl, sowie das Erreichen ausreichend hoher Keimzahlen zur Durchführung molekulargenetischer Experimente. Darüber hinaus sollte das Medium einfach aus möglichst kostengünstigen Bestandteilen herzustellen sein.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, die Prävalenz von *B. henselae* DNA und *B. burgdorferi* sensu lato DNA in Zecken aus vier verschiedenen Orten in Europa [Eberdingen, Klasdorf (Deutschland); Lembach (Frankreich); Madeira (Portugal)] zu bestimmen, um die Hypothese der Übertragung von *B. henselae* durch Zecken auf den Menschen zu unterstützen. Da es sich bei *B. burgdorferi* sensu lato um einen gut untersuchten durch Zecken übertragenen Erreger handelt, wurde dessen DNA-Prävalenz in den untersuchten Proben als Plausibilitätskontrolle mitbestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab.1: In dieser Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose Gelelektrophoresekammern	BioRad, München
Analysenwaage BP610, PT1200	Sartorius, Göttingen
Blot Apparatur: Mini-PROTEAN II	BioRad, München
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Hanau
ELISA-Reader	Tecan, Crailsheim
ELISA-Washer	Tecan, Crailsheim
Eppendorfpipetten und Multistepper	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Zeiss, Jena
Geldokumentation: Bio Doc Analyze	Biometra, Göttingen
Heizblock: Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Konfokales Laserscanningmikroskop DM IRE 2	Leica, Bensheim
Mikroskope (Zellkultur)	Zeiss, Jena
Mikrowellenherd: Mikromat	AEG, Frankfurt/Main
PCR-Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Pipettus-akku	Hirschmann, Fluorn-Winzeln
Photometer: Ultrospec 3000 pro	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter: inoLab Level 2	WTW, Weilheim
Software: Photoshop 8.0.1	Adobe Systems, Mountain View, USA
Spannungsquellen für Gelelektrophorese	BioRad, München
Sterilwerkbank	BDK, Sonnenbühl
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasserbad	Memmert, Schwabach

Zentrifugen:

Eppendorf 5417R	Eppendorf, Hamburg
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
Biofuge Stratos	Heraeus, Hanau
MiniSpin plus	Eppendorf, Hamburg
Probenschüttler	IKA, HS 260 basic

2.1.2 Plastik und Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden alle Plastik- und Verbrauchsmaterialien von folgenden Firmen bezogen: Eppendorf, Hamburg; Falcon / Becton-Dickinson, Heidelberg; Greiner, Nürtingen; Nunc.

Tab.2: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schüll, Dassel
Coverslips	Roth, Karlsruhe
Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Glaskolben und Flaschen	Schott Duran, Mainz
Neubauer-Zählkammer	Superior, Lauda-Königshofen
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Menasha, Wyoming, USA
Pasteurpipetten	Hilgenberg, Malsfeld
PCR-Gefäße	Fisher Scientific, Schwerte
Wattestäbchen	MSP Schmeiser GmbH, Horb
Whatman-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.1.3 Chemikalien

Tab.3: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Tebu-bio, Offenbach
APS	Applichem, Darmstadt
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg
BSA	Biomol, Hamburg
DAB	Applichem, Darmstadt
DAPI	Merck, Darmstadt
dNTPs	Roche, Grenzach-Wyhlen
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FCS	Sigma-Aldrich, Hamburg
Fluoprep	BioMérieux, Marcy l'Etoile, France
Fructose	Merck, Darmstadt
Galactose	Merck, Darmstadt
Glucose	Merck, Darmstadt
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt
H ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt
Imidazol	Applichem, Darmstadt
Kollagen G	Biochrom, Berlin
L-Glutamin	Gibco BRL-Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Sucofin, Düsseldorf
Mannose	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Orange G Auftragepuffer	Sigma-Aldrich, Hamburg
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Hamburg
PBS (+CaCl ₂ /MgCl ₂)	Gibco, Karlsruhe
PMA	Sigma-Aldrich, Hamburg
Phalloidin-TRITC	Sigma-Aldrich, Hamburg

Ponceau S Lösung	Serva, Heidelberg
Saccharose	Merck, Darmstadt
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe
TEMED	Sigma-Aldrich, Hamburg
Tris	Sigma-Aldrich, Hamburg
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich, Hamburg
Triton-X100	Sigma-Aldrich, Hamburg
Trypsin/EDTA	Gibco BRL-Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20	Merck, Darmstadt
Streptavidin für IL-8 ELISA	Dako, Hamburg

2.1.4 Kits

Tab.4: In dieser Arbeit verwendete Kits

Kit	Hersteller
QIA amp DNA minikit	Qiagen, Hilden
Quantikine Immunoassay human VEGF	R&D Systems, Wiesbaden

2.1.5 Antibiotika

Tab.5: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller
Gentamicin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Kanamycin-Plättchen (30 µg)	Oxoid, Wesel

2.1.6 Größenstandarts, Enzyme, Zytokine

Tab. 6: In dieser Arbeit verwendete Größenstandarts, Enzyme und Zytokine

Reagenz	Hersteller
Page Ruler Protein-Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot
1 kb Plus DNA -Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Roche, Grenzach-Wyhlen
Proteinase K	Qiagen, Hilden
Rekombinantes humanes IL-8	Pharmingen, San Diego, USA

2.1.7 Antikörper

Tab. 7: In dieser Arbeit verwendete Antikörper

Antikörper	Verwendung	Herkunft
anti-BadA (Kaninchen)	IFT, Westernblot	(127)
anti-Kaninchen Cy2	IFT	Dianova
anti-Kaninchen FITC	IFT	Dianova
anti-Human IL-8 (Capture Antibody)	ELISA	Becton-Dickinson, Heidelberg
anti-Human IL-8 biotinyliert (Detection Antibody)	ELISA	Becton-Dickinson, Heidelberg
anti-Kaninchen Cy5	IFT	Dianova
anti-Kaninchen HRP-konjugiert	Western Blot	Dako, Hamburg
VKS 29	Western Blot	(157)

2.1.8 Bakterienstämme und Kulturmedien

Tab. 8: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Referenz
<i>Bartonella henselae</i> Marseille	(54)
<i>Bartonella henselae</i> Houston-1	(119)
<i>Bartonella henselae</i> BadA ⁻	(127)
<i>Bartonella quintana</i> Toulouse	(6)
<i>Bartonella quintana</i> JK31	(156)
<i>Bartonella vinsonii</i> berkhoffii	(90)

Tab. 9: In dieser Arbeit verwendete Bakterienkulturmedien

Medium	Hersteller
Columbia-Blutagarplatten mit 5 % Schafsblut	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
Luria-Bertani (LB)-Medium	Becton-Dickinson, Heidelberg
Einfriermedium für Bakterien	20 % Glycerol in LB-Medium
Hirn-Herz-Bouillon	Merk, Darmstadt
Schneider's <i>Drosophila</i> (Mediumpulver)	Serva, Heidelberg
Endothelial Cell Growth Medium	Promocell, Heidelberg
BAPGM	zur Verfügung gestellt von Ricardo Maggi North Carolina State University, USA (97)

2.1.9 Zelllinien und Zellkulturmedien

Tab. 10: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien und Zellkulturmedien.

Zelllinie	Zelltyp	Kulturmedium	Infektionsmedium
HeLa-229	Humane Epithelzelllinie aus stark proliferierendem Zervixkarzinom ATCC (CCL-2.1)	RPMI 1640 (Biochrom, Berlin) 10% FCS 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	RPMI 1640 (Biochrom, Berlin) 2 mM L-Glutamin
HUVEC	Humane venöse Nabelschnur-Endothelzellen	<i>Endothelial Cell Growth Medium</i> (PromoCell, Mannheim) Supplement Mix 10% FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	<i>Endothelial Cell Basal Medium</i> (PromoCell, Mannheim)

2.1.10 Puffer und Lösungen

Tab. 11: Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
SDS-Probenpuffer (5x) (Laemmli Puffer)	312,5 mM Tris/HCl (pH 6,8) 50% Glycerin 10% (w/v) SDS 250 mM DTT 0,5% (w/v) Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer	50 mM Tris 384 mM Glycin 0,1% SDS ad 1000 ml H ₂ O

Lösung für Sammelgel (2 Gele)	500 µl 30% Acrylamid-Stammlösung 380 µl 1 M Tris (pH 6,8) 30 µl 10% SDS 30 µl 10% APS 3 µl TEMED 2,1 ml H ₂ O
Lösung für 12%-iges Trenngel (2 Gele)	4 ml 30% Acrylamid-Stammlösung 2,5 ml 1 M Tris (pH 8,8) 100 µl 10% SDS 100 µl 10% APS 4 µl TEMED 3,3 ml H ₂ O
Blot-Puffer (10x)	25 mM Tris 192 mM Glycin ad 1000 ml H ₂ O
Waschpuffer (10x)	10 mM Tris/HCl (pH 7,4) 0,15 M NaCl 0,2% Tween 20 ad 2000 ml H ₂ O
Blockpuffer	5% Magermilchpulver in Waschpuffer

Tab. 12: Lösungen für Coomassiefärbung

Lösung	Zusammensetzung
Coomassie-Färbelösung	0,15% (w/v) Coomassie Blue R 250 30% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure ad H ₂ O _{dest}
Entfärbelösung	30% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure ad H ₂ O _{dest} .

Tab. 13: Lösungen zum Entwickeln von Westernblots (DAB Detektion)

Lösung / Puffer	Zusammensetzung
Substratpuffer	3,03 g Tris 122 mg Imidazol (3,5 mM) ad 500 ml H ₂ O, (pH 7,4)
DAB-Färbelösung	12 ml Substratpuffer 12,5 mg DAB 6 µl H ₂ O ₂
Stopplösung	486,3 ml H ₂ O 13,7 ml H ₂ SO ₄ (95-98 %)

Tab. 14: Puffer und Lösungen für IL-8 ELISA

Puffer	Zusammensetzung
Waschpuffer	PBS + 0,05% Tween 20
Blockierungspuffer	PBS + 10% FCS
Bindungspuffer	0,1 M Na ₂ HPO ₄ (pH 9)
Substratpuffer	0,05 M NaHCO ₃ (pH 8,09) 0,05 M Na ₂ CO ₃ (pH 11,3) 0,5 mM MgCl ₂
Konjugat	4,5 µl Streptavidin 4,5 µl Biotin-alkalische Phosphatase 491 µl PBS 30 min inkubieren ad 25 ml PBS
Entwicklerlösung	1 mg PNPP/ml Substratpuffer

Tab. 15: Zum Nachweis von *Bartonella* spp. und *Borrelia burgdorferi* sensu lato verwendete Primer.

Target	Amplicon- größe (bp)	Primer- bezeichnung	Primer- sequenz	Quelle
<i>Bartonella</i> spp. 16S-rDNA (erste Runde)	1.210	A-proteo r-Alpha-sh	AGA GTT TGA TC/AC TGG CTC AGA GTA GCA CGT GTG TAG CCC A	(46)
<i>Bartonella</i> spp. 16S-rDNA (zweite Runde)	990	Bart r-BH	CAC TCT TTT AGA GTG AGC GGC AA CCC CCT AGA GTG CCC AAC CA	(46)
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato ospA (erste Runde)	496	OspA _{outer} fw OspA _{outer} rev	GGT CTA ATA TTA GCC TTA ATA GGC ATG TCA GCA GCT AGA GTT CCT TCA AG	(57)
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato ospA (zweite Runde)	398	OspA _{inner} fw OspA _{inner} rev	CAT GTA AGC AAA ATG TTA GCA GCC CTG TGT ATT CAA GTC TGG TTC C	(57)
mitochondriale Zeckenl 16S-rDNA	490	MT16SA MT16SB	CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT CTC CGG TTT GAA CTC AGA TC	(102)

Tab. 16: Puffer für Agarosegelelektrophorese

Puffer	Zusammensetzung
TBE Puffer (5x)	54g Tris 27,5g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1000 ml H ₂ O _{dest}

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Bakterienstocks

Zur Herstellung von Bakterienstocks von *Bartonella* spp. wurden die Bakterien nach Aussaat 4-5 Tage bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit auf Columbia Blutagarplatten kultiviert. Der entstandene Bakterienrasen wurde mit Wattestäbchen abgeerntet und in PBS suspendiert. Anschließend wurde die Suspension für 10 Minuten bei 2700 g und 4°C zentrifugiert, das erhaltene Pellet in Einfriermedium (20% Glycerol in LB-Medium) resuspendiert und bei -80°C tiefgefroren. Um die Keimzahl der Bakterienstocks zu bestimmen, wurden serielle Verdünnungsreihen aus zwei Proben des Stocks angefertigt, auf Columbia Blutagarplatten ausplattiert und diese nach 14 Tagen Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit ausgezählt.

2.2.2 Untersuchung des Wachstumsverhaltens von *Bartonella* spp. in verschiedenen Flüssigmedien

Um das Wachstumsverhalten von *Bartonella* spp. in verschiedenen Kulturmedien zu untersuchen, wurden jeweils 20 ml des Mediums in einer Zellkulturflasche mit 10⁵-10⁷ Bakterien/ml aus einem Bakterienstock beimpft

und unter Gasaustausch mit der Umgebung bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit auf einem Probenschüttler (im Brutschrank bei 60 rpm) inkubiert. Zur Bestimmung des Bakterienwachstums wurden alle 24 Stunden Messungen der optischen Dichte (OD_{600 nm}) vorgenommen und serielle Verdünnungsreihen der Suspension auf Columbia Blutagarplatten ausplattiert, um später die genaue Keimzahl (CFU) durch Auszählen der Kolonien bestimmen zu können.

2.2.3 Anzucht von Bakterien für funktionelle Experimente

Zur Anzucht von Bakterien in Flüssigmedium wurde Schneiders *Drosophila* Medium verwendet, dem 10% FCS und 5% Saccharose zugesetzt waren. Je 20 ml Medium wurde in eine Zellkulturflasche gefüllt und mit 10⁶ Bakterien/ml aus einem Bakterienstock beimpft. Die Inkubation erfolgte über 3-5 Tage unter Gasaustausch mit der Umgebung bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit auf einem Probenschüttler (60 rpm). Zur Bestimmung der Keimzahl (CFU) im Ansatz wurde dessen optische Dichte (OD_{600 nm}) gemessen und anhand der aus vorherigen Versuchen gewonnenen Wachstumskurven auf die Keimzahl geschlossen (OD_{600 nm} 1 = 7,85*10⁸ Bakterien/ml). Infektionsexperimente wurden mit in Flüssigmedium kultivierten Bakterien und parallel dazu mit Bakterienstocks (wie oben beschrieben) durchgeführt. Durch Zentrifugation bei 2700 g für 5 Minuten wurden die Bakterien nach dem Auftauen oder direkt aus dem Flüssigmedium pelletiert. Die Einstellung der gewünschten Keimzahl erfolgte dann im jeweiligen Zellkulturmedium der in diesem Versuch untersuchten Zelllinien.

2.2.4 Anzucht von Bakterien auf Columbia Blutagarplatten zur Keimzahlbestimmung

Zur Bestimmung der in Proben vorhandenen Keimzahl von *Bartonella* spp. wurden serielle Verdünnungsreihen in PBS (1x) angefertigt und diese mit einem Glasspatel auf Columbia Blutagarplatten mit 5% Schafsblut ausplattiert. Die Anzucht erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Nach 14-tägiger Inkubation erfolgte die Auszählung der Agarplatten mit einer Koloniedichte zwischen 0 und ca. 200 Kolonien pro Platte. Aus den erhaltenen Werten wurde die Keimzahl des Ansatzes errechnet.

2.2.5 Zellkultur

Folgende Zelllinien wurden in Zellkulturexperimenten verwendet: HeLa-229 (humane Zervixkarzinomzellen) und HUVEC (human umbilical vein endothelial cells). Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, Medien und Materialien wurden entweder steril vom Hersteller bezogen oder sterilfiltriert (s. Tab. 10).

2.2.6 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Zellkultur-Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (im Falle der HUVEC-Zellen wurden diese zuvor mit 0,1% Kollagen G in PBS für mindestens 4 h beschichtet) mit Zellkulturmedium, das alle 2-3 Tage ausgetauscht wurde, kultiviert. Je nach Bedarf wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:5 geteilt, in frische Flaschen gefüllt und weiterkultiviert.

Um die Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen abzulösen, wurden sie zuerst mit 3 ml Trypsinlösung gespült und anschließend mit 3 ml frischer Trypsinlösung bei 37°C inkubiert, bis eine Ablösung sichtbar wurde. Das Trypsin wurde durch Zugabe von frischem Zellkulturmedium mit 10% FCS inaktiviert.

2.2.7 Bestimmung der Lebendzellzahl

Um die Anzahl lebender Zellen in der Suspension zu bestimmen, wurden 90 µl Trypan-Blau mit 10 µl Zellsuspension gemischt in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Alle ungefärbten (lebenden) Zellen in den vier äußeren Eckquadranten der Zählkammer wurden ausgezählt, durch vier geteilt und sowohl mit dem Faktor der Kammer (10^4) als auch dem der Trypan-Blau Verdünnung (10^1) multipliziert, woraus sich die Anzahl lebender Zellen pro ml Suspension ergab.

2.2.8 Infektionsbedingungen

Alle bei Infektionsexperimenten verwendeten Zellkulturmedien enthielten keine Antibiotika. Infektionsexperimente zur Bestimmung der VEGF-A-Sekretion wurden zusätzlich ohne Zusatz von FCS durchgeführt, um eine unspezifische Aktivierung der Zellen zu vermeiden. Am Tag vor der Infektion wurden die Zellen wie oben beschrieben vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, suspendiert und ausgezählt. Anschließend wurden die Zellen in eine 24-Well Zellkulturplatte ausgesät (10^5 Zellen/Well). Zur Infektion wurden Bakterien in gewünschter Zahl zu den Zellen pipettiert und anschließend bei 300 g für 5 Minuten auf die Zellen zentrifugiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit im Zellkulturbrutschrank. In allen Infektionsexperimenten wurden Zellen, die mit reinem Zellkulturmedium

inkubiert wurden, als Negativkontrollen verwendet. Als Positivkontrollen bei Versuchen zur Bestimmung der VEGF-A-Sekretion diente PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat), das in einer Konzentration von 25 ng/ml in reinem Zellkulturmedium zugegeben wurde.

2.2.9 Immunfluoreszenzfärbungen

Das Prinzip einer Immunfluoreszenzfärbung beruht darauf, bestimmte Bestandteile von Bakterien und eukaryonten Zellen mit Hilfe spezifischer Antikörper sichtbar zu machen. An die gegen bestimmte Zellbestandteile gerichteten Primärantikörper binden wiederum Sekundärantikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Bei Bestrahlung mit UV-Licht emittieren diese Farbstoffe in verschiedenen definierten Wellenlängen, wodurch die Struktur, an die der Primärantikörper bindet, sichtbar wird.

2.2.10 IFT zum Nachweis der BadA-Expression von *B. henselae*

100 µl Flüssigmedium mit den darin enthaltenen Bakterien wurden in ein Eppendorfgefäß pipettiert und anschließend für 5 Minuten bei 2700 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Bakterien in 500 µl PBS resuspendiert. 30 µl dieser Suspension wurden nun auf einen Objektträger pipettiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Alle nun folgenden Schritte fanden in einer feuchten Kammer statt, um das Austrocknen der Reagenzien zu verhindern. Die Fixierung der Bakterien erfolgte durch zehnmünütige Inkubation mit 40 µl PFA bei 4°C. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden 40 µl Primärantikörper (anti-BadA; 1:250) zugesetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde der Objektträger erneut zweimal mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 40 µl Cy2-konjugiertem Sekundärantikörper

(anti-Kaninchen-IgG; 1:100) 45 Minuten unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt erfolgte die Anfärbung der DNA mit DAPI (1 µg/ml) durch fünfminütige Inkubation bei 4°C und anschließendem Waschen mit PBS. Jetzt wurde der Objektträger mit Fluoprep und einem Deckglas eingebettet, mit Entellan versiegelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.2.11 Doppelimmunfluoreszenz (DIF)

Die Methode der Doppelimmunfluoreszenz beruht auf der Tatsache, dass intakte Zellmembranen von Säugetierzellen für Antikörper undurchlässig sind. Sie kann jedoch durch bestimmte Detergenzien permeabel gemacht werden, wodurch mit Hilfe einer sequentiellen Färbung zuerst extrazelluläre Bakterien und nach Permeabilisierung der Zellen extra- und intrazelluläre Bakterien mit verschiedenen Antikörpern angefärbt werden können. Dadurch eignet sich die Methode, um den Infektionsverlauf von Zellen fluoreszenzmikroskopisch darzustellen.

2.2.12 Adhärenz von *B. henselae* an HUVECs

Am Tag vor der Infektion wurden HUVEC Zellen auf mit Kollagen beschichteten (0,1% Kollagen G in PBS für mindestens 4 h) Coverslips ausgesät. Die Zellen wurden dann entweder mit *B. henselae* aus einem Bakterienstock oder nach Anzucht in Flüssigmedium infiziert (MOI 100). Zu den Zeitpunkten 30 Minuten, 2 Stunden und 24 Stunden nach Infektion wurde jeweils ein Teil der Proben dreimal mit Zellkulturmedium gewaschen und mit 3,75%iger PFA-Lösung für 15 Minuten bei 4°C fixiert. Die fixierten Coverslips wurden zu Beginn der Färbung und nach jedem Inkubationsschritt dreimal mit PBS gewaschen, um

überschüssige Reagenzien zu entfernen. Alle Inkubationsschritte fanden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss statt.

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die fixierten Zellen für 15 Minuten mit 0,1%igem BSA in PBS inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation zuerst mit einem gegen BadA gerichteten Primärantikörper (Verdünnung: 1:250 in PBS) dann mit einem Cy2-konjugierten anti-Kaninchen-IgG Sekundärantikörper (1:100 in PBS) für jeweils eine Stunde (Grünfärbung der extrazellulären Bakterien). Im nächsten Schritt wurde die Zellmembran mit 0,1%igem Triton X-100 für 15 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert, um das Aktinskelett der Zelle und intrazelluläre Bakterien für Antikörper und Farbstoffe zugänglich zu machen. Nach erneutem Blockieren der Zellen mit BSA folgte wiederum die einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem anti-BadA Primärantikörper, wobei diesmal zusätzlich TRITC-konjugiertes Phalloidin (1:1000) zugegeben wurde, um das Aktinskelett der Zellen rot anzufärben. Als Sekundärantikörper diente ein mit Cy5-konjugierter anti-Kaninchen-IgG Antikörper, der nach erneuter einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur für eine Dunkelrotfärbung extra- und intrazellulärer Bakterien sorgte. In den Abbildungen wurde für Cy5 zur besseren Übersichtlichkeit die virtuelle Falschfarbe Blau gewählt. In einem letzten Schritt wurde die DNA der Bakterien und der Zellen durch zehnmünütige Inkubation bei Raumtemperatur mit DAPI (1 µg/ml) hellblau angefärbt.

Die gefärbten Coverslips wurden mit Fluoprep eingedeckt, auf einen Objektträger gelegt und mit Entellan versiegelt. Die Auswertung der Proben fand unter einem konfokalen Laserscanning Mikroskop statt, wobei die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe auf verschiedenen Kanälen detektiert wurden. Die im sequentiellen Modus gewonnenen Bilder verschiedener Kanäle (Cy2 = grün, Cy5 = dunkelblau, TRITC = rot, DAPI = hellblau) wurden mit Adobe Photoshop 8.0.1 bearbeitet und aus ihnen Overlay-Bilder erstellt.

2.2.13 Gewinnung von Zellkulturüberständen

Zellkulturüberstände wurden gewonnen, indem Zellen in 24-Well Platten mit Bakterien infiziert, oder mit einer Kontrollsubstanz versetzt für weitere 24 Stunden im Zellkulturbrutschrank inkubiert wurden. Um störende Partikel zu entfernen, wurden die Überstände nach Abnahme bei 20 000 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Alle Proben wurden dreifach angesetzt und die gemessenen Werte gemittelt.

2.2.14 Zytokinkonzentrationsmessungen in Zellkulturüberständen

Die Sekretion von VEGF-A und IL-8 durch HeLa-229 und HUVEC Zellen wurde mittels ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) aus Zellkulturüberständen bestimmt.

Da mit Hilfe des ELISAs sehr geringe Zytokinkonzentrationen nachgewiesen werden können, eignet sich dieses Verfahren besonders gut zur Analyse von Zytokinen in Zellkulturüberständen. Dabei reagiert das zu messende Zytokin in einer Antigen-Antikörper-Reaktion als Antigen mit einem monoklonalen Primärantikörper, der in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte haftet. In einem nächsten Schritt bindet ein hinzugegebener Sekundärantikörper ebenfalls an das Zytokin und katalysiert gleichzeitig eine Farbreaktion. Da das Ausmaß der Farbreaktion proportional zur Zytokinkonzentration ist, kann mit Hilfe einer Standardkurve, die mit rekombinanten Zytokinen bekannter Konzentration angesetzt wird, auf die absolute Zytokinkonzentration der Probe zurück geschlossen werden.

2.2.15 VEGF-A ELISA

Zum quantitativen Nachweis von humanem VEGF-A in Zellkulturüberständen wurde der Quantikine Immunoassay human VEGF-A ELISA Kit (R&D Systems) verwendet, wobei in der Durchführung die Angaben des Herstellers befolgt wurden.

Nach dem Vorlegen von 50 µl Verdünnungspuffer pro Well wurden im ersten Schritt 200 µl der Zellkulturüberstände beziehungsweise des Standards (0-1000 pg/ml rekombinantes humanes VEGF-A, verdünnt in Zellkulturmedium) zugegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden jeweils 200 µl konjugierter Sekundärantikörper zugegeben und der Ansatz wiederum für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei erneute Waschschritte und die Zugabe von 200 µl Entwicklerlösung, wobei die Entwicklung nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur mit 50 µl Stopplösung beendet wurde. Im ELISA-Reader wurde die Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 540 nm bestimmt und anhand der Standardkurve auf die Zytokinkonzentration zurück gerechnet.

2.2.16 IL-8 ELISA

Zur Durchführung eines IL-8 ELISA wurden die Vertiefungen einer 96-Well Platte über Nacht bei 4°C mit 50 µl des monoklonalen Primärantikörpers (3 µg/ml in 0,1 M Na₂HPO₄ bei pH 9) inkubiert (141) und ungebundene Antikörper durch viermaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit Blockpuffer für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Nach erneutem viermaligen Waschen mit Waschpuffer wurden in jedes Well 100 µl Zellkulturüberstand pipettiert, wobei als Standard eine Verdünnungsreihe von rekombinantem humanen IL-8 (0-800 pg/ml, verdünnt in Zellkulturmedium) diente. Der Ansatz wurde

2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, um das in den Überständen vorhandene IL-8 an den Primärantikörper zu binden. Nach viermaligem Waschen mit Waschpuffer wurden pro Well 100 µl biotinylierter Sekundärantikörper (0,5 µg/ml) zugegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz erneut gewaschen und mit 50 µl Konjugat je Well für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurden 50 µl PNPP (1 mg/ml in Substratpuffer) pro Well zugesetzt und für 20 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. In einem ELISA Reader wurde schließlich über die Absorption der Proben bei einer Messwellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm auf die Zytokinkonzentration der Proben geschlossen.

2.2.17 Anreicherung von BadA aus Flüssigkulturüberstand

Zur Gewinnung von BadA wurde Flüssigmedium mit *B. henselae* (10^7 Bakterien/ml) beimpft und für 10 Tage bei 37°C, 5% CO₂, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 60 rpm inkubiert. Die so gewonnene Suspension wurde für 15 Minuten bei 3000g zentrifugiert, um Bakterien zu entfernen. Nun wurde der Überstand abpipettiert und mit 100%iger Trichloressigsäure (TCA) versetzt, so dass eine 10%ige TCA-Lösung entstand. Diese wurde für eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend für 20 Minuten bei 18000 g und 4°C zentrifugiert (Proteinfällung). Nun wurde der Überstand vorsichtig abgegossen, das Pellet in 1 ml eiskaltem Aceton resuspendiert und die Suspension 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde erneut für 15 Minuten bei 18000 g und 4°C zentrifugiert und dieser Waschschrift mit Aceton noch zweimal wiederholt. Zuletzt wurde das Pellet in 700 µl Ampuwa gelöst und bei -20°C gelagert.

2.2.18 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Proteine unter denaturierenden Bedingungen und konstanter Oberflächenladung in einem elektrischen Feld durch ein Polyacrylamidgel nach Größe aufgetrennt werden. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Tensid, das die Eigenschaft besitzt, nichtkovalente Bindungen in Proteinen zu unterbrechen und so deren Tertiärstruktur zu zerstören. An 1 g Protein bindet 1,4 g SDS. Dies sorgt aufgrund seiner negativen Ladung zu einem Ladungsüberschuss in Abhängigkeit der Molekülgröße, der die Eigenladung des Proteins vernachlässigbar macht. Gemeinsam mit der Denaturierung sorgt die negative Ladung für eine stabförmige Konformation des Proteins, wodurch der Einfluss der nativen Proteinstruktur auf das Wanderungsverhalten im Gel verloren geht. Die Wanderungsgeschwindigkeit so behandelte Proteine in einem Polyacrylamidgel ist proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes (42).

2.2.19 Herstellung der Gele und SDS-PAGE

Die fertige Trenngel-Lösung (12% SDS) wurde in eine Vertikalgelkammer gefüllt und mit 70%igem Isopropanol überschichtet, um eine glatte Trennfläche zu erhalten. Nach halbstündiger Polymerisation des Trenngels und Entfernung des Isopropanols wurde die Sammelgel-Lösung in das verbliebene Volumen der Gelkammer gegossen und ein Kamm eingebracht. Nach halbstündiger Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und die Proben in die Geltaschen pipettiert. Zuvor wurden diese Proben mit SDS-Probenpuffer (2x) versetzt, für 3 Minuten bei 98°C inkubiert und eine Minute bei 14000 g und 4°C zentrifugiert. Die SDS-PAGE wurde in Lauffpuffer (1x) bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro eingesetztem Gel durchgeführt.

2.2.20 Herstellung der Ganzzelllysate

Zur Herstellung der Ganzzelllysate wurden Bakterien aus Flüssigmedium entnommen und auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 2,0 eingestellt. Auf CBA kultivierte Bakterien wurden in PBS resuspendiert und ebenfalls auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 2,0 eingestellt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert, der Überstand verworfen, und die Bakterien wurden im gleichen Volumen Laemmli-Puffer resuspendiert. Vor der anschließenden Gelelektrophorese wurden die Proben 3 min bei 98°C gekocht.

2.2.21 Coomassiefärbung

Zur Darstellung der Proteine im SDS-Gel wurde dieses nach Durchführung der Gelelektrophorese für 30 Minuten in Coomassiefärbelösung auf einem Probenschüttler inkubiert. Anschließend wurde das gefärbte Gel solange in Entfärbelösung auf einem Probenschüttler inkubiert, bis dass ein guter Kontrast der angefärbten Banden beobachtet werden konnte.

2.2.22 Immunoblot

Mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine können elektrophoretisch weiter auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen werden. Anschließend kann das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen und diese durch eine sehr sensitive Antigen-Antikörperreaktion nachgewiesen werden.

Dazu wurde das Gel auf eine Nitrozellulose-Membran gelegt und beides auf jeder Seite mit einer Lage Whatman-Papier und einem Schwamm bedeckt. Diese Schichtung wurde in eine Blotkammer eingesetzt und der Proteintransfer in Blot-Puffer bei einer konstanten Stromstärke von 300 mA für 60 Minuten

durchgeführt. Die Effizienz des Proteintransfers wurde durch reversible Färbung mit Ponceau Rouge S Lösung kontrolliert und der Farbstoff anschließend durch Spülen mit H₂O entfernt. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrozellulose-Membran für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur in Blockpuffer auf einer Schüttelplattform inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (1:500 verdünnt in Blockpuffer) erfolgte über Nacht bei 4°C auf einer Schüttelplattform. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit Waschpuffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde sie für eine Stunde mit einem Meerrettichperoxidase konjugierten Sekundärantikörper auf einer Schüttelplattform inkubiert. Nach erneutem Waschen (3x5 Minuten mit Waschpuffer) wurde die Membran mit DAB-Entwicklerlösung versetzt und inkubiert, bis die Banden in gewünschter Deutlichkeit in brauner Farbe sichtbar wurden. Nun wurde die Reaktion durch Zugabe der Stopplösung beendet, die Membran mit H₂O gewaschen und unter Lichtausschluss getrocknet.

2.2.23 Elektronenmikroskopie

Schneidermedium mit 10% FCS und 5% Saccharose wurde mit *B. henselae* Marseille (1,0 x 10⁶/ml) angeimpft und über vier Tage inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde mit 2,5% Glutaraldehyd in PBS für 15 Minuten bei 37°C fixiert und für 24 Stunden bei 4°C aufbewahrt. Die fixierten Bakterien wurden mit 2%igem Agarosegel überdeckt und zu Blöcken geschnitten. Die Nachfixierung erfolgte mit 1% Osmiumtetroxid in 100 mM PO₄ Puffer (pH 7,2) für eine Stunde auf Eis. Die so erhaltenen Blöcke wurden nun gespült (H₂O_{bidest.}), mit 1% wässrigem Uranacetat für eine Stunde bei 4°C behandelt, in einer aufsteigenden Verdünnungsreihe mit Ethanol entwässert und in Epon eingebettet. Die Schnitte wurden mit 1% wässrigem Uranacetat und Bleizitrat gefärbt und in einem Philips CM 10 Elektronenmikroskop bei 60 kV mit einer 30 µm Objektivapparatur analysiert (Kooperation mit Dr. Heinz Schwarz, MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen).

2.2.24 Sammlung und Identifikation der Zecken

Zu untersuchende Nymphen und adulte Zecken (*Ixodes ricinus*) wurden 2004 an einem Waldrand in Eberdingen in der Nähe von Stuttgart (Deutschland), im Sumpfland außerhalb der südlich von Berlin gelegenen Ortschaft Kladorf (Deutschland), nahe der Stadt Lembach in der nördlichen Vogesenregion (Frankreich) und auf den Weiden der Insel Madeira (Portugal) gesammelt indem die Vegetation mit einem Flanneltuch abgestreift wurde. Art und Entwicklungsstadium wurden unter dem Mikroskop identifiziert. Anschließend wurden die Zecken in 80% Ethanol konserviert (Zecken wurden bereitgestellt von Prof. Dr. Franz-Rainer Matuschka, Institut für Pathologie, Abteilung Parasitologie, Charité Universitätsmedizin, Berlin).

2.2.25 DNA-Extraktion aus Zecken

Die Extraktion von Erreger-DNA aus Zecken erfolgte mit Hilfe des Qiagen QIAmp DNA mini Kit unter Verwendung des "Tissue Protocol". Die in Ethanol bei 4°C gelagerten Zecken wurden im ersten Schritt einzeln aus dem Aufbewahrungsgefäß entnommen, kurz auf Zellstoff abgetupft, um anhaftendes Ethanol zu entfernen, und in je ein Eppendorfgefäß gelegt. Nun wurden die Zecken mit einer sterilen Pipettenspitze im Eppendorfgefäß zerkleinert. Nach Zugabe von Proteinase K und Lysepuffer erfolgte die Inkubation des Ansatzes über Nacht bei 56°C. Die weiteren Schritte der Extraktion erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers, wobei der Elutionsschritt zweimal durchgeführt wurde, um die DNA-Konzentration im Eluat zu maximieren.

2.2.26 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR kann ein definiertes DNA-Fragment exponentiell amplifiziert werden. Für diese Reaktion benötigt man im wesentlichen zwei Oligonukleotidprimer, die komplementär zum zu amplifizierenden DNA-Abschnitt sind, alle vier dNTPs (Desoxyribonucleotriphosphate) und eine hitzestabile DNA-Polymerase. Die PCR ist eine zyklisch verlaufende Reaktion, in der die Reaktionsschritte Denaturierung, Annealing und Elongation 20-30 mal wiederholt werden. Durch die Denaturierung lösen sich beide Stränge der DNA voneinander, wodurch die Oligonukleotidprimer im zweiten Schritt (Annealing) mit komplementären Abschnitten auf den beiden Einzelsträngen hybridisieren können. Während der Elongation synthetisiert die hitzestabile DNA-Polymerase mit Hilfe der dNTPs neue DNA-Fragmente komplementär zur vorhandenen DNA-Matrize. So nimmt die Menge des von den beiden Primern flankierten DNA-Abschnitts während der Reaktion immer weiter zu, so dass nach Abschluss der Reaktion nur noch dieser Abschnitt in relevanter Konzentration vorliegt.

2.2.27 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Zum Nachweis von DNA-Fragmenten wurden diese in einem 1,5%igen Agarosegel mittels Elektrophorese aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid markiert, um sie unter UV-Licht detektierbar zu machen. Zur Herstellung des Gels wurden 3 g Agarosepulver in 200 ml TBE-Puffer (0,5x) in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Zum Polymerisieren wurde die warme Lösung in eine Gelkammer gegossen, um dort weiter abzukühlen. Die Geltaschen des fertigen Gels wurden mit einer Mischung aus 13 µl Proben-DNA und 2 µl OrangeG beladen, wobei die äußersten Taschen stets 7,5 µl einer DNA-Leiter enthielten, um später die Größe der nachgewiesenen DNA-Fragmente kontrollieren zu können. Nach der Gelelektrophorese, die für 60 Minuten bei 90 V erfolgte, wurde das Gel in

Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml) für 15-20 Minuten gefärbt und anschließend 20-30 Minuten in H₂O_{dest.} entfärbt. In einer Geldokumentationsanlage wurde das gefärbte Gel unter UV-Licht fotografiert und die Bilder in Adobe Photoshop 8.0.1 digital bearbeitet.

2.2.28 Sequenzierung

Bei der DNA Sequenzierung nach Sanger wird eine abgewandelte Form der PCR angewandt, in der durch Zugabe geringer Konzentrationen fluoreszenzmarkierter Didesoxyribonucleosidtriphosphate (ddNTP) zum Reaktionsgemisch Kettenabbrüche induziert werden. Man erhält somit DNA-Fragmente verschiedenster Länge, die alle mit dem Einbau eines ddNTP abgebrochen wurden. Diese Fragmente werden nun mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und die vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe der ddNTPs durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt. Das Farbsignal wird von einem Detektor aufgenommen und gibt direkt die Basensequenz des sequenzierten DNA-Abschnittes wieder. Sämtliche Sequenzierungen dieser Arbeit wurden durch die Firma 4Baselab (Reutlingen, Deutschland) ausgeführt.

2.2.29 Statistik

Die Anwesenheit von *B. henselae* und *B. burgdorferi* sensu lato DNA wurde auf systematische Unterschiede in der Verteilung zwischen Nymphen und adulten Zecken untersucht. Dafür wurden die Daten der einzelnen Sammelorte in einer logistischen Regression abgeglichen. Für χ^2 -Tests wurden Freiheitsgrade (*df*) und *P* Werte angegeben. 95%-Konfidenzintervalle (CI) und Odds Ratios der Prävalenzen wurden unter Verwendung des Programms JMP 7.0.2 (SAS

Institute, Heidelberg, Germany) errechnet. Die Unabhängigkeitshypothese für beide Infektionen wurde unter Stratifizierung nach Sammelort und Stadium (Nymphen oder Adulte) unter Annahme der Unabhängigkeit der Untergruppen geprüft. Der exakte P Wert wurde, unter Verwendung der erwarteten Wahrscheinlichkeiten (aus den Daten errechnet), als Produkt der binomial kumulativen Wahrscheinlichkeiten der beobachteten Zahl Null der Koinfektionen errechnet. Die Berechnung erfolgte mit R 2.5.0 (The R Foundation for Statistical Computing 2007; Kooperation mit Dr. rer. pol. Reinhard Vonthein, Institut für Medizinische Biometrie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen).

Alle unter 3.1 und 3.2 beschriebenen Experimente wurden in Triplets ausgeführt. Die Versuche wurden wiederholt und ergaben übereinstimmende Resultate. Die Unterschiede der Mittelwerte von Versuchs- und Kontrollgruppen wurden mit Hilfe des Zweistichproben t-Test analysiert. Ein p-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung eines Flüssigkulturmediums für *Bartonella* spp.

Bartonella spp. sind schwer anzüchtbare (65), langsam wachsende Bakterien, die bisher nur unzuverlässig in einigen komplexen Flüssigmedien (91) anzüchtbar sind. Gewöhnlich werden *Bartonella* spp. auf Columbia Blutagarplatten (CBA) kultiviert, wachsen jedoch nicht in dessen flüssiger Formulierung (91).

3.1.1 Wachstums von *B. henselae* in Schneidermedium mit FCS

In Experimenten zur Beobachtung der Interaktionen von *B. henselae* mit Insektenzellen (Schneiderzellen von *Drosophila melanogaster*) wurde zufällig Wachstum von *B. henselae* im entsprechenden Zellkulturmedium nachgewiesen. Bei diesem Medium handelte es sich um Schneiders Drosophilazellmedium mit einem Zusatz von 10% FCS und 1% Glutamin. Zur Inkubation wurden die Proben in Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit unter Gasaustausch mit der Umgebung inkubiert. Diese Bedingungen wurden (soweit nicht anders beschrieben) auch in allen folgenden Versuchen verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass *B. henselae* in diesem Medium in hoher Keimzahl reproduzierbar kultiviert werden kann (137). Ausgehend von dieser Beobachtung wurden nun weitere Experimente unternommen um das Wachstum von *B. henselae* in derartigen Medien genauer zu untersuchen.

3.1.2 Vergleich des Wachstums von *B. henselae* aus tiefgefrorenen Stocks und auf CBA kultivierten *B. henselae* in Schneidermedium mit FCS

Um eventuelle Unterschiede im Wachstumsverhalten von aus einem tiefgefrorenen Bakterienstock entnommenen und auf CBA kultivierten *B. henselae* festzustellen, wurden jeweils drei Erlenmeyerkolben mit 20 ml Schneidermedium mit 10% FCS und 1% Glutamin befüllt und mit einer Keimzahl von 10^7 Bakterien/ml beimpft. Hierbei wurden die Bakterien des ersten Dreifachansatzes aus einem tiefgefrorenen Bakterienstock definierter Keimzahl entnommen. Die Bartonellen des zweiten Ansatzes wurden mit einem Wattestäbchen von CBA abgeerntet, in PBS suspendiert und die Keimzahl durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Diese Ansätze wurden nun über 11 Tage inkubiert. Alle 24 Stunden wurde eine Probe zur Messung der $OD_{600\text{ nm}}$ entnommen und die Keimzahl durch serielle Verdünnungsreihen und nachfolgende Kultivierung bestimmt. Am Tag 14 erfolgte in gleicher Weise eine Abschlussmessung. Sowohl der gemittelte Verlauf der $OD_{600\text{ nm}}$ als auch die bei der Auszählung der Verdünnungsreihen ermittelte Keimzahl ergaben nur unwesentliche Unterschiede zwischen *B. henselae* von CBA und aus tiefgefrorenen Bakterienstocks. Allerdings konnte bei den aus dem Stock beimpften Ansätzen eine deutlich genauere Einstellung der initialen Keimzahl erreicht werden. In beiden Ansätzen fiel eine schnelle Abnahme der Keimzahl nach Erreichen des Maximums auf, wobei die $OD_{600\text{ nm}}$ -Werte konstant blieben, oder nur noch leicht anstiegen. Aufgrund unwesentlicher Unterschiede im Wachstumsverhalten und Vorteilen des Bakterienstocks im Bezug auf präzise Einstellung der initialen Keimzahl und somit der Vergleichbarkeit der Experimente, wurden für alle folgenden Versuche Bakterienstocks zum Beimpfen verwendet.

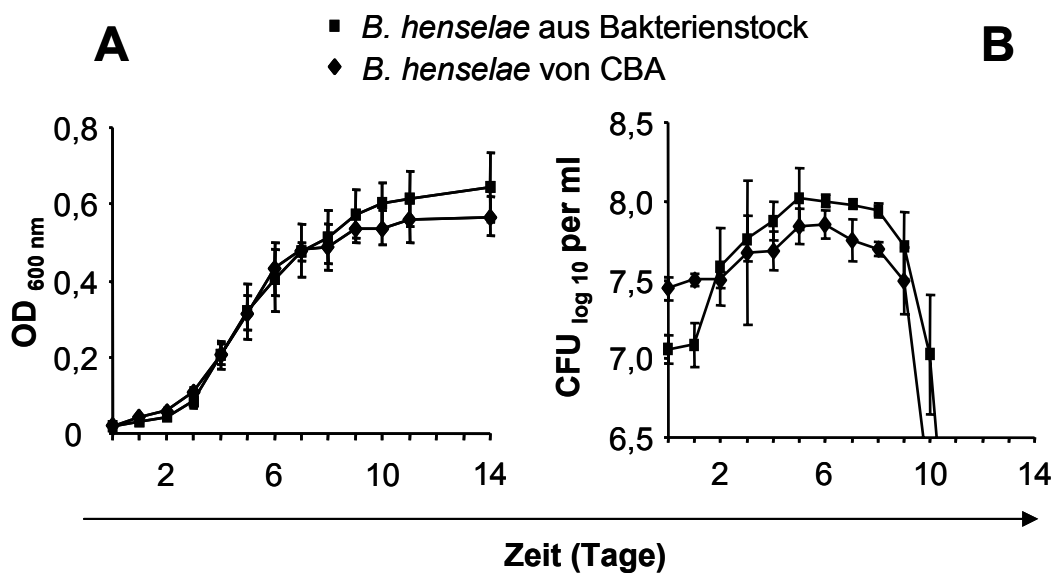


Abb. 1: Vergleich des Wachstums von *B. henselae* aus tiefgefrorenen Bakterienstocks und auf CBA kultivierten *B. henselae* in Schneidermedium mit FCS. Schneidermedium mit FCS wurde jeweils mit *B. henselae* aus tiefgefrorenen Bakterienstocks und auf CBA kultivierten *B. henselae* beimpft (10^7 /ml). Die Wachstumskurven (A) wurden in 24-Stunden-Intervallen mit Hilfe der optischen Dichte (OD_{600 nm}) bestimmt. Die Keimzahlbestimmung (B) erfolgte durch Anfertigen serieller Verdünnungsreihen auf CBA in 24-Stunden-Intervallen. Es konnten keine wesentlichen Unterschiede im Wachstumsverhalten festgestellt werden.

3.1.3 Wirkung verschiedener Supplemente auf das Wachstum von *B. henselae*

Um die Wirkung verschiedener Zusätze auf das Wachstum von *B. henselae* genauer zu untersuchen, wurde für diesen Versuch Schneidermedium einmal mit 10% FCS und 1% Glutamin, einmal nur mit 10% FCS, einmal nur mit 1% Glutamin und einmal mit 10% FCS, 1% Glutamin und 5% Schafsblut versetzt. Jeder Ansatz bestand aus drei Proben zu je 20 ml, die in Zellkulturflaschen bei 60 RPM auf einem Probenschüttler inkubiert wurden. Die initiale Keimzahl wurde auf 10^5 Bakterien/ml eingestellt. Im Lauf von 10 Tagen wurden im Abstand von 24 Stunden aus jedem Ansatz Proben entnommen und deren OD_{600 nm} gemessen. Zusätzlich erfolgte eine Abschlussmessung am Tag 13. Anhand des Verlaufes der OD_{600 nm} war zu beobachten, dass Bakterienwachstum lediglich in den Ansätzen von Schneidermedium mit 10%

FCS und 1% Glutamin und Schneidermedium mit 10% FCS auftrat. Die Wachstumskurven verhielten sich hier sehr ähnlich, wobei der Anstieg im Ansatz mit Glutamin etwa einen Tag verzögert auftrat. Im Falle von Schneidermedium mit 1% Glutamin (ohne Zusatz von FCS) wurde kein Wachstum beobachtet. Bei der Messung des Ansatzes von Schneidermedium mit 10% FCS, 1% Glutamin und 5% Schafsblut trat eine ausgeprägte Streuung der Messwerte im unteren Messbereich auf. Ein ausgeprägter Anstieg der optischen Dichte wie in den anderen FCS-haltigen Ansätzen konnte nicht beobachtet werden. Da beim Zusatz von Blut keine positiven Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten von *B. henselae* beobachtbar waren, die Streuungen, die wahrscheinlich durch die Trübung des Mediums entstanden, das Messen aber zusätzlich erschwerten, wurde auf einen Zusatz von Blut in den weiteren Versuchen verzichtet.

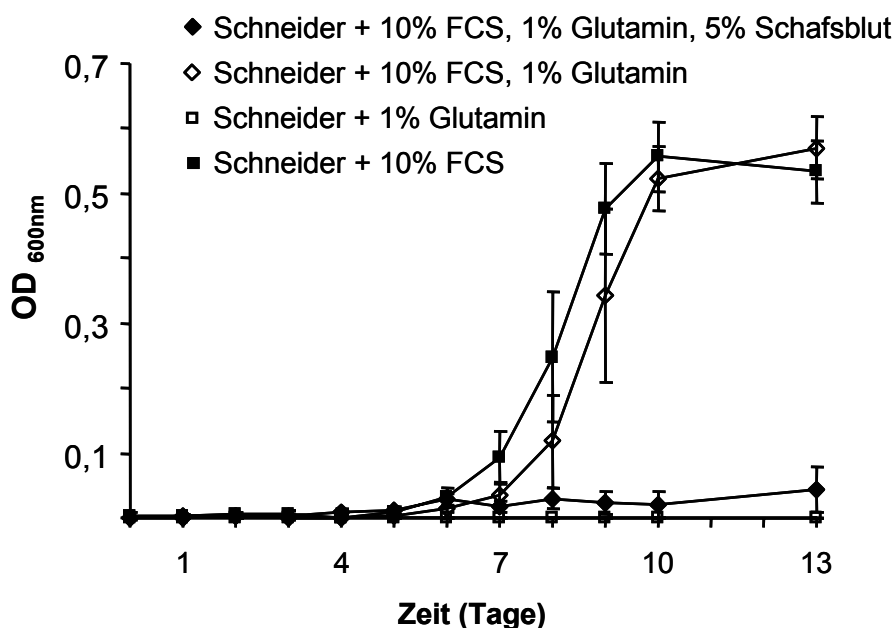


Abb. 2: Einfluss verschiedener Zusätze auf das Wachstum von *B. henselae* in Schneidermedium. Schneidermedium mit verschiedenen Zusätzen wurde jeweils mit *B. henselae* beimpft ($10^5/\text{ml}$). Die Wachstumskurven wurden in 24-Stunden-Intervallen mit Hilfe der optischen Dichte ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) bestimmt. Ein eindeutiges Wachstum von *B. henselae* war lediglich in den Ansätzen von Schneidermedium mit 10% FCS und Schneidermedium mit 10% FCS und 1% Glutamin zu beobachten.

3.1.4 Untersuchung verschiedener Standard-Flüssigmedien zur Kultivierung von *B. henselae*

Da sich im vorhergehenden Versuch FCS als der für das Wachstum von *B. henselae* relevante Zusatz zu Schneidermedium gezeigt hatte, sollte die Anzüchtbarkeit von *B. henselae* in gängigen Flüssigkulturmedien für Bakterien und Zellen unter Zusatz von 10% FCS und 1% Glutamin überprüft werden. Hierzu wurden LB-Medium, Hirn-Herz-Medium, Endothelzellmedium und als Positivkontrolle Schneidermedium verwendet. Jeder Ansatz bestand aus drei Proben zu je 20 ml, die in Zellkulturflaschen bei 60 RPM auf einem Proben-schüttler inkubiert wurden. Die initiale Keimzahl wurde auf 10^5 Bakterien/ml eingestellt. Das Wachstum der Bakterien wurde durch Messung der optischen Dichte in Abständen von 24 Stunden über 10 Tage bestimmt. Zusätzlich wurde eine Abschlussmessung an Tag 13 vorgenommen. Der mit dem Wachstum von *B. henselae* verbundene Anstieg der $OD_{600\text{ nm}}$ konnte lediglich im Ansatz des Schneidermediums beobachtet werden (Abb. 3). LB-Medium, Endothelzellmedium und Hirn-Herz-Medium eigneten sich folglich nicht zur Kultivierung von *B. henselae*.

3.1.5 Vergleich des Wachstums von *B. henselae* in Schneidermedium mit und ohne FCS

Die Ergebnisse aus den o. g. Versuchen legen nahe, dass es sich bei FCS um den für das Wachstum von *B. henselae* in Schneidermedium elementaren Zusatz handelt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Versuche durchgeführt, in denen das Wachstum von *B. henselae* in Ansätzen von Schneidermedium mit und ohne FCS verglichen wurde. In je dreifacher Ausführung wurden diese Proben mit 10^6 Bakterien/ml beimpft und inkubiert. Das Wachstum von Bakterien wurde in Abständen von 24 Stunden durch Messung der $OD_{600\text{ nm}}$ kontrolliert. Der im Ansatz mit FCS sichtbare Anstieg der

OD_{600 nm} an Tag 6 blieb im Ansatz ohne FCS aus. Der Versuch wurde bis Tag 13 vorge setzt, es konnte jedoch kein Wachstum von *B. henselae* im Ansatz ohne Zusatz von FCS festgestellt werden.

Aufgrund der bisher genannten Experimente wurde die Formulierung des Flüssigmediums für die folgenden Versuche auf Schneidermedium mit 10% FCS festgelegt.

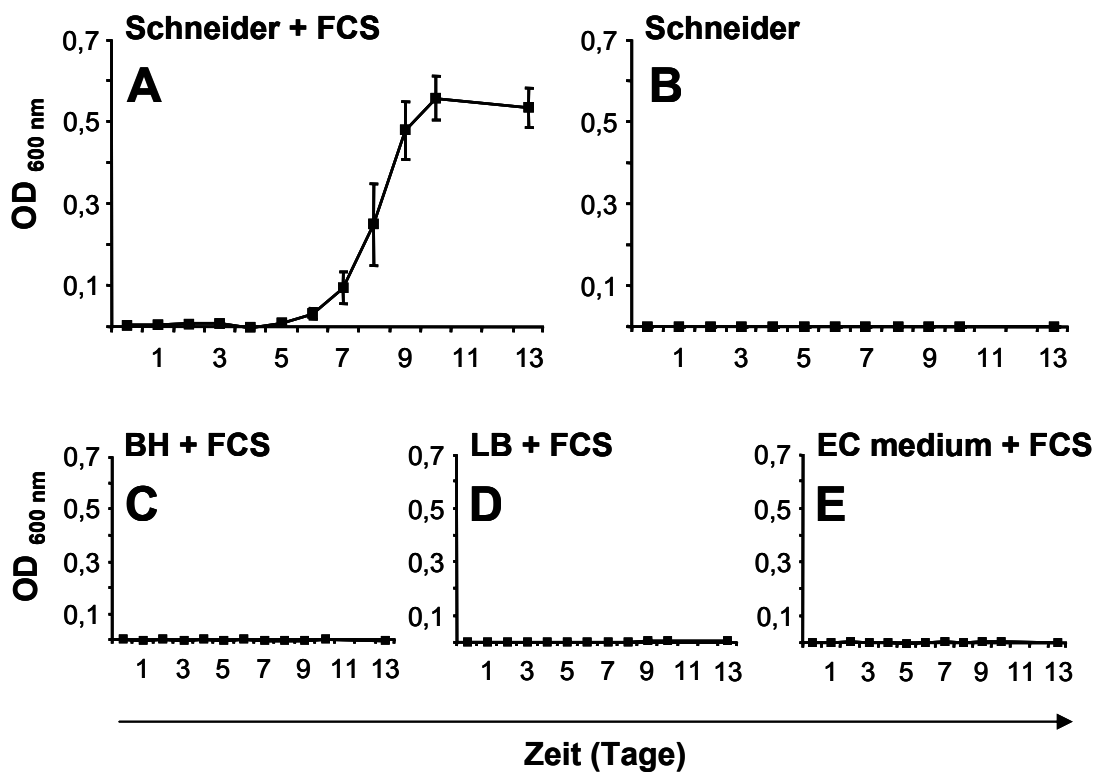


Abb. 3: Wachstumskurven von *B. henselae* in verschiedenen Standard-Flüssigmedien. Verschiedene Flüssigkulturmedien wurden mit *B. henselae* beimpft (10^5 /ml) um die Wachstumskurven mit Hilfe der optischen Dichte (OD_{600 nm}) in 24-Stunden-Intervallen zu ermitteln. (A) Schneidermedium mit 10% FCS, (B) Schneidermedium ohne FCS, (C) BH-Medium mit 10% FCS, (D) LB-Medium mit 10% FCS, (E) Endothelzellmedium (EC) mit 10% FCS. Wachstum von *B. henselae* wurde nur in Schneidermedium mit 10% FCS beobachtet.

3.1.6 Vergleich des neuen Flüssigmediums mit BAPGM

Um die Eigenschaften unseres Flüssigmediums (Schneidermedium mit 10% FCS) zu beurteilen, wurde es direkt mit BAPGM [„*Bartonella* alpha-proteobacteria growth medium“ (97)], einem bereits bekannten Flüssigmedium zur Anzucht von *Bartonella* spp. verglichen. Um eine bessere Bestimmbarkeit der OD_{600 nm} zu erreichen, wurde der im Originalzitat beschriebene Blutzusatz von BAPGM durch 10% FCS ersetzt. Pro Ansatz wurden drei Proben a 20 ml mit 10⁵ Bakterien/ml beimpft und bei 60 RPM auf einem Probenschüttler inkubiert. Über 10 Tage erfolgten in 24-stündigen Abständen Messungen der OD_{600 nm} und die Anfertigung serieller Verdünnungsreihen (zur genauen Bestimmung der Keimzahl) auf CBA. Am Tag 13 wurde eine Abschlussmessung der OD_{600 nm} und der Keimzahl durchgeführt. Bei Betrachtung des Verlaufes der optischen Dichte fiel auf, dass es in beiden Fällen ab Tag 6 zu einem deutlichen Anstieg kam, wobei dieser bei BAPGM deutlich steiler verlief und einen Maximalwert von ca. 0,8 erreichte während, im Schneidermedium mit 10% FCS lediglich Werte um 0,6 erreicht wurden. Interessanterweise korrelierten diese Werte nicht mit den erreichten maximalen Keimzahlen. So erreichte die Keimzahl in BAPGM einen Maximalwert von etwa 1,2 x 10⁸ Bakterien/ml, wo hingegen im Schneider Flüssigmedium ein Wert von ca. 1,9 x 10⁸ Bakterien/ml erreicht wurde. Diese Werte fielen in beiden Fällen bereits kurz nach Erreichen des Maximums wieder ab. Eine für bakterielles Wachstum gewöhnlich typische Plateauphase konnte nicht beobachtet werden. Obwohl sich die Kinetik des Wachstums von *B. henselae* in beiden Medien weitgehend ähnelte, wurde im Schneider-Flüssigmedium dennoch eine deutlich höhere maximale Keimzahl gemessen.

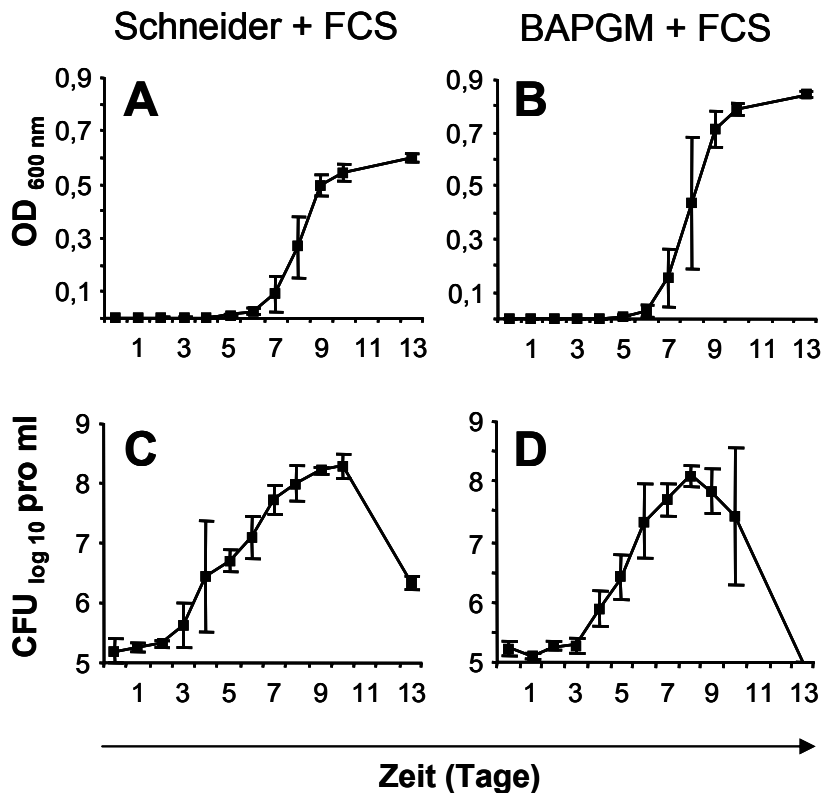


Abb. 4: Wachstumskurven von *B. henselae* in Schneidermedium und BAPGM. Sowohl Schneidermedium als auch BAPGM wurden mit 10% FCS sublementiert und mit *B. henselae* (10^5 /ml) beimpft. Die Wachstumskurven wurden mit Hilfe der optischen Dichte ($OD_{600\text{ nm}}$) in 24-Stunden-Intervallen ermittelt (A, B). Die Keimzahlbestimmung erfolgte durch Anfertigen serieller Verdünnungsreihen auf CBA (C, D).

3.1.7 Wachstum verschiedener *Bartonella* spp. in Schneidermedium mit 10% FCS

Im folgenden Versuch wurde das Wachstum anderer medizinisch relevanter *Bartonella* spp. in Flüssigmedium untersucht. Dabei handelte es sich um *B. henselae* Marseille, *B. henselae* Houston-1, *B. quintana* Toulouse, *B. quintana* JK 31 und *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*. Jeweils drei Proben à 20 ml des Flüssigmediums wurden mit 10^5 Bakterien/ml der verschiedenen *Bartonella* spp. beimpft. Alle Ansätze wurden in Zellkulturflaschen bei 60 RPM auf einem Probenschüttler inkubiert. Über 10 Tage wurden in 24-stündigem Abstand Messungen der $OD_{600\text{ nm}}$ vorgenommen. Obwohl alle im Versuch befindlichen Spezies Wachstum zeigten, konnten deutliche Unterschiede im Wachstums-

verhalten der Spezies beobachtet werden. *B. henselae* Marseille zeigte in Analogie zu den vorherigen Versuchen ab Tag 5 einen deutlichen OD_{600 nm} Anstieg, der bis Tag 9 einen Maximalwert von ca. 0,6 erreichte. Bei *B. henselae* Houston-1 war bereits an Tag 3 ein sehr steiler Anstieg beobachtbar, der an Tag 5 Maximalwerte von 1,0 erreichte. Auch *B. quintana* Toulouse zeigte einen außerordentlich steilen OD_{600 nm} Anstieg ab Tag 3, der am Tag 5 Maximalwerte von 1,1 erreichte. Bei *B. quintana* JK 31 zeigte sich ein ebenfalls sehr steiler Anstieg erst an Tag 5. Bereits an Tag 6 wurden hier Maximalwerte um 1,2 erreicht, die wie in allen Ansätzen bis Tag 10 nahezu konstant blieben. *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* zeigte erst ab Tag 7 eindeutiges Wachstum mit einem vergleichsweise flachen Anstieg der OD_{600 nm}. Hier wurde am Tag 10 ein Maximalwert der OD_{600 nm} von ca. 0,8 gemessen.

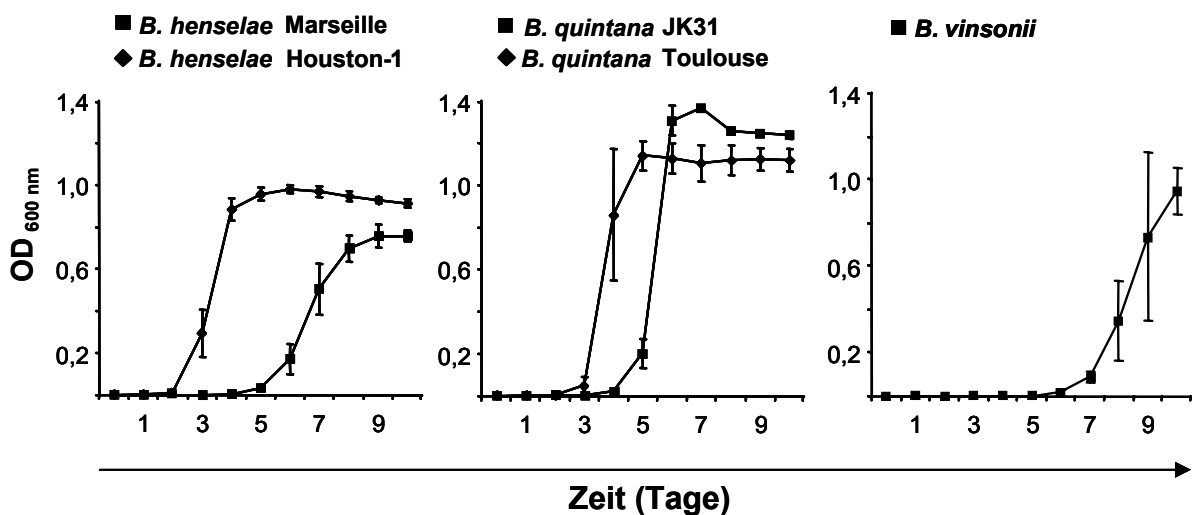


Abb. 5: Wachstumskurven verschiedener *Bartonella* spp. in Schneidermedium. Schneidermedium mit 10% FCS wurde mit *B. henselae* Marseille, *B. henselae* Houston-1, *B. quintana* Toulouse, *B. quintana* JK31 und *B. vinsonii* (10^5 /ml) beimpft. Die Wachstumskurven wurden durch Messung der optischen Dichte (OD_{600 nm}) in 24-Stunden-Intervallen ermittelt. Bei allen Stämmen konnte in diesem Medium ein Wachstum beobachtet werden, die maximal erreichte OD_{600 nm} und der Zeitpunkt des Beginns der logarithmischen Wachstumsphase wiesen jedoch Unterschiede auf.

3.1.8 Einfluss verschiedener Zuckerzusätze auf das Wachstum von *B. henselae*

In diesem Versuch wurden Schneidermedium mit 10% FCS verschiedene Mono- und Disaccharide zugesetzt, um deren Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *B. henselae* zu untersuchen. Bei den je 5%ig (w/v) zugesetzten Zuckern handelte es sich um Saccharose, Glukose, Fruktose, Galaktose und Mannose. Zusätzlich wurde ein Ansatz ohne weiteren Zusatz durchgeführt, um die Ergebnisse mit bisherigen Experimenten vergleichen zu können. Die Ansätze wurden mit 10^6 Bakterien/ml beimpft und auf einem Probenschüttler inkubiert. Im Verlauf von 9 Tagen wurden im Abstand von 24 Stunden Messungen der $OD_{600\text{ nm}}$ durchgeführt, um das Wachstum der Bakterien zu beurteilen. Bereits an Tag 2 war im Ansatz mit Saccharosezusatz ein deutlicher Anstieg der $OD_{600\text{ nm}}$ zu beobachten, der ab Tag 4 in einen stationären Wert von etwa 0,8 überging. Im Ansatz mit Fruktosezusatz konnte an Tag 3 ein deutlicher Anstieg verzeichnet werden, wobei ab Tag 6 ein Maximalwert von etwa 0,7 erreicht wurde. Im Ansatz ohne Zuckerszusatz begann der Anstieg geringfügig früher, erreichte jedoch etwas geringere Maximalwerte (0,6). Bei Glukosezusatz war ab Tag 3 ein relativ flacher anstieg der $OD_{600\text{ nm}}$ zu beobachten, der am Tag 7 in Werten um 0,6 gipfelte. Beim Zusatz von Galaktose und Mannose erfolgte innerhalb der 9 Tage kein messbarer Anstieg der $OD_{600\text{ nm}}$.

Zusammenfassend wurde beobachtet, dass ein Zusatz von Saccharose sowohl die Geschwindigkeit als auch die Höhe des $OD_{600\text{ nm}}$ -Wertes positiv beeinflusst, während Fructose und Glucose lediglich geringe Wirkungen erzielen. Galaktose und Mannose scheinen das Wachstum von *B. henselae* zu hemmen.

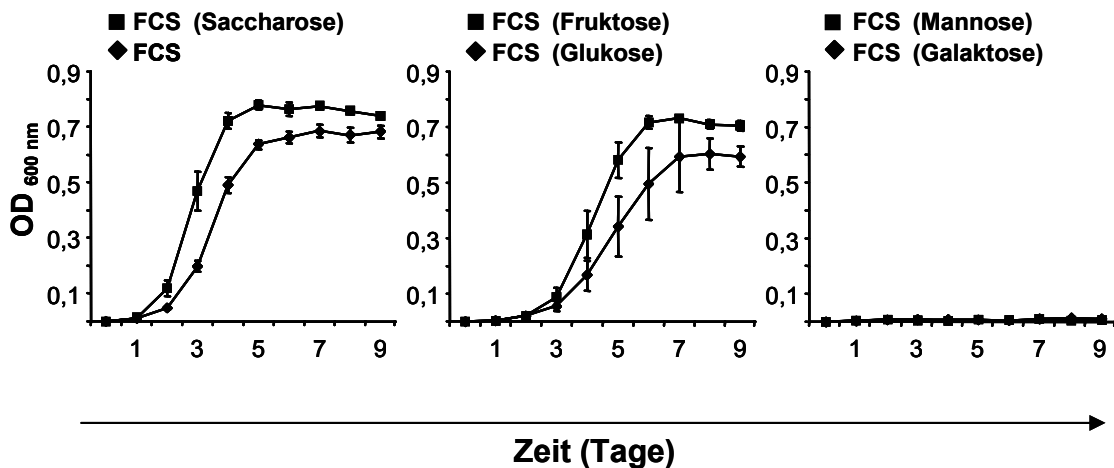


Abb. 6: Einfluss verschiedener Zuckerzusätze auf das Wachstum von *B. henselae* in Schneidermedium. Schneidermedium mit 10% FCS wurde mit jeweils 5% (w/v) Saccharose, Fruktose, Glukose, Mannose oder Galaktose supplementiert und mit *B. henselae* (10^6 /ml) beimpft. Die Wachstumskurven wurden mit Hilfe der optischen Dichte ($OD_{600\text{ nm}}$) in 24-Stunden-Intervallen ermittelt. Die höchsten Wachstumsraten und die maximale optische Dichte wurde in Schneidermedium mit 10% FCS und 5% (w/v) Saccharose beobachtet.

Um zu überprüfen, ob der in Schneidermedium mit 10% FCS und 5% Saccharose beobachtete frühere und höhere Anstieg der $OD_{600\text{ nm}}$ auch in einer höheren Keimzahl resultiert, wurden als nächstes neben der $OD_{600\text{ nm}}$ auch die Keimzahl der Ansätze bestimmt (serielle Verdünnungsreihen). Dazu wurden je drei Proben à 20 ml mit 10^6 Bakterien/ml beimpft. In diesem 8-tägigen Versuch wurden alle 24 Stunden Messungen durchgeführt. Die $OD_{600\text{ nm}}$ stieg im Schneidermedium mit 10% FCS und 5% Saccharose wie erwartet deutlich an und erreichte hier auch deutlich höhere Maximalwerte. Im Bezug auf die Keimzahl wurde die Überlegenheit von Schneidermedium mit 10% FCS und 5% Saccharose noch deutlicher. So wurden hier bereits am Tag 3 Werte von ca. 2×10^8 Bakterien/ml gemessen, was in etwa dem am Tag 5 erreichten Maximalwert ohne Saccharosezusatz entsprach. Der in Schneidermedium mit 10% FCS und 5% Saccharose gemessene Maximalwert an Tag 5 entsprach mit $4,8 \times 10^8$ Bakterien/ml mehr als dem Doppelten des Wertes der Keimzahl von *B. henselae*, die ohne Saccharosezusatz gemessen worden war.

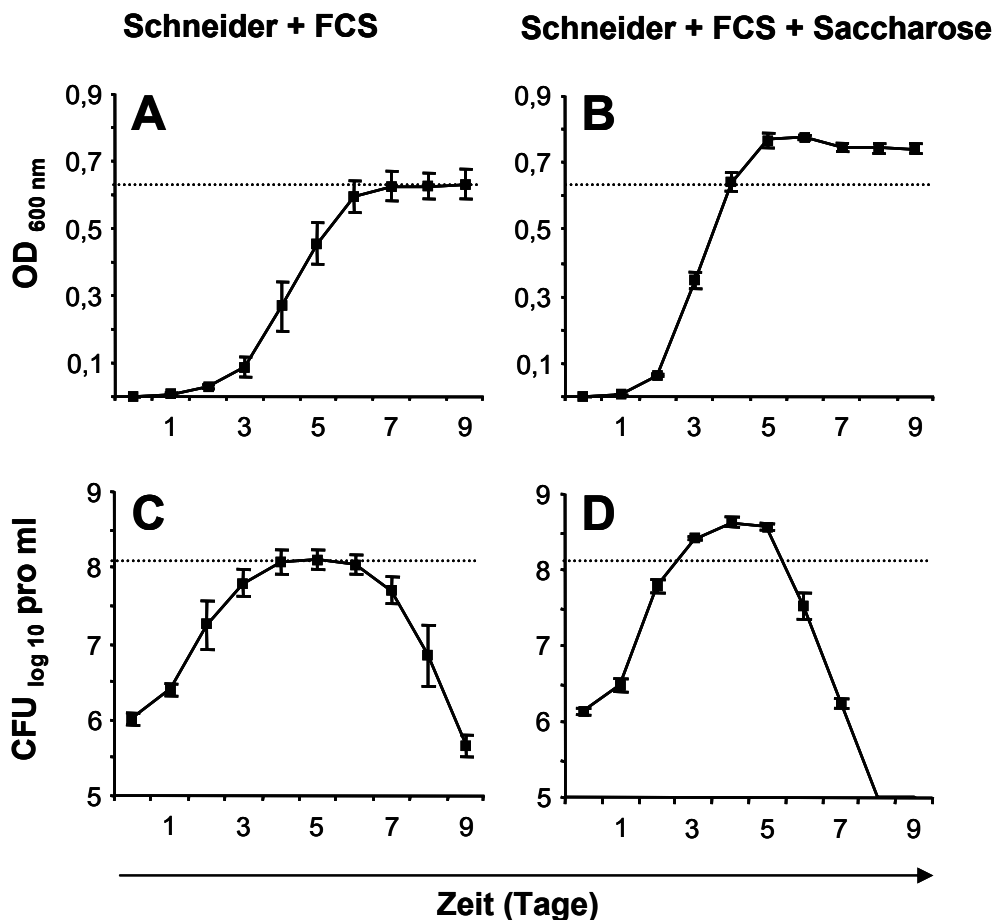


Abb. 7: Vergleich der Wachstumsraten von *B. henselae* in Schneidermedium in Abhängigkeit des Zusatzes von 5% (w/v) Saccharose. Die Medien wurden mit *B. henselae* (10^6 /ml) beimpft und die Wachstumskurven sowohl durch Messung der optischen Dichte ($OD_{600\text{ nm}}$; **A, B**), als auch durch Bestimmung der Keimzahl (**C, D**) in 24-Stunden-Intervallen ermittelt. Sowohl die Wachstumsraten, als auch die maximal erreichte Keimzahl sind bei Zusatz von Saccharose deutlich erhöht.

Schließlich wurde das Wachstum von *B. henselae* Wildtyp im Vergleich zu *B. henselae* BadA⁻ in Flüssigmedium untersucht. Alle Ansätze wurden mit 10^6 Bakterien/ml beimpft. Während der Versuchsdauer von 9 Tagen wurden alle 24 Stunden die $OD_{600\text{ nm}}$ der Proben gemessen und Verdünnungsreihen auf CBA angefertigt, um genaue Informationen über die Keimzahl der Ansätze zu erhalten. Während das Wachstum des Wildtyps den vorangegangenen Experimenten entsprach, erschwerten sichtbare Verklumpungen in den Ansätzen mit *B. henselae* BadA⁻ die Messung der $OD_{600\text{ nm}}$. Mit Sicherheit konnte jedoch beobachtet werden, dass auch *B. henselae* BadA⁻ in

Schneidermedium mit 10% FCS und 5% Saccharose schneller höhere Keimzahlen erreicht, die dann jedoch auch schneller wieder abfielen als ohne Saccharosezusatz. Ebenfalls war zu beobachten, dass *B. henselae* Wildtyp im Vergleich zu *B. henselae* BadA⁻ ein tendenziell stärkeres Wachstum aufweist und höhere maximale Keimzahlen erreicht. Dies zeigte sich übereinstimmend sowohl in der Messung der OD_{600 nm} als auch in der Bestimmung der Keimzahl.

3.2 Funktionelle Analyse von Flüssigmedium-kultivierten

B. henselae

In den folgenden Versuchen sollte überprüft werden, ob *B. henselae*, die in Flüssigmedium kultiviert wurden, in ihrer Proteinexpression und Interaktion mit Wirtszellen Unterschiede zu konventionell kultivierten *B. henselae* aufweisen.

3.2.1 Immunfluoreszenztest (IFT) zum Nachweis der BadA-Expression

In diesem Versuch wurde *B. henselae* Wildtyp und *B. henselae* BadA⁻ in Schneidermedium mit 10% FCS und 5% Saccharose kultiviert. In beiden Fällen wurden die Ansätze mit 10⁵ Bakterien/ml beimpft und für 4 Tage inkubiert. Nun wurden Proben aus diesen Ansätzen entnommen und ein IFT angefertigt, der selektiv BadA, das auf der Bakterienoberfläche exprimiert wird, darstellt. Im IFT des Wildtyps konnte das Cy2-markierte BadA in einem charakteristischen Saum um die Bakterienzelle beobachtet werden, während sich im IFT von *B. henselae* BadA⁻ keine BadA-Expression nachweisen ließ.

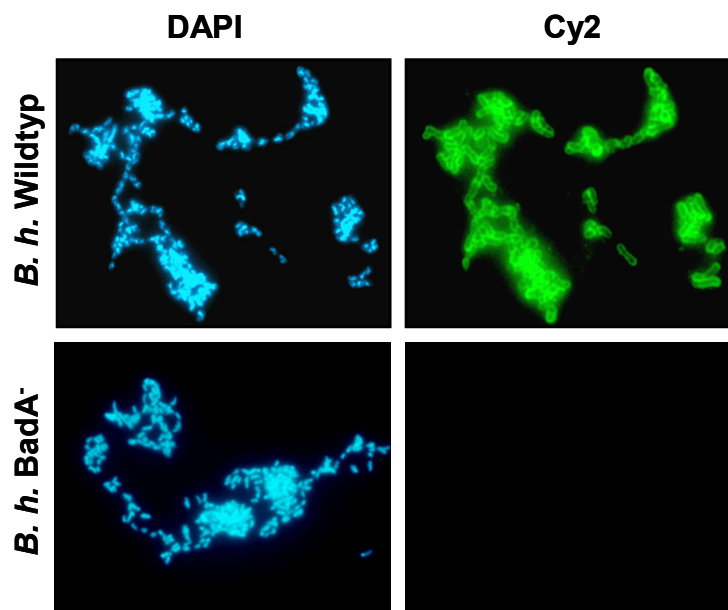


Abb. 8: BadA-Expression von in Schneidermedium kultivierten *B. henselae* Marseille und *B. henselae* BadA⁻. *B. henselae* wurde in Schneidermedium mit 10% FCS und 5% Saccharose (w/v) kultiviert. Die BadA-Expression wurde mit Hilfe eines Immunfluoreszenztests (IFT) nachgewiesen (grünes Signal: spezifischer Nachweis von BadA; blaues Signal: DAPI). Das für die Expression von BadA spezifische grüne Signal ist nur beim Wildtyp nachweisbar.

3.2.2 Elektronenmikroskopische Darstellung von in Flüssigmedium kultivierten *B. henselae*

Um die Expression von BadA genauer zu beurteilen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von in Flüssigmedium kultivierten *B. henselae* angefertigt. Die Bakterien wurden während der exponentiellen Wachstumsphase am Tag 4 entnommen, fixiert und weiterverarbeitet. Im elektronenmikroskopischen Bild zeigte *B. henselae* deutlich die typisch haarartige Expression von BadA.

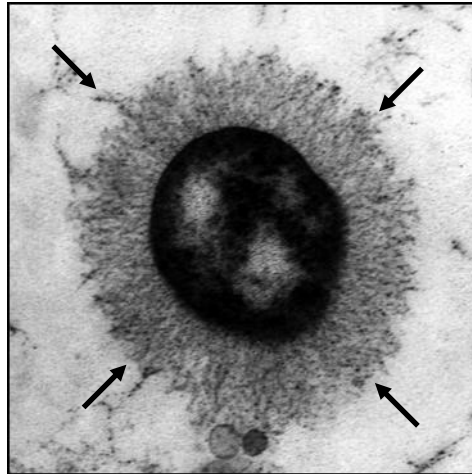


Abb. 9: Elektronenmikroskopische Darstellung von *B. henselae*. *B. henselae* wurde in Schneidermedium mit 10% FCS und 5% (w/v) Saccharose kultiviert und an Tag 4 fixiert. Im elektronenmikroskopischen Bild zeigte sich die für *B. henselae* typische Expression von BadA (Pfeile).

3.2.3 Nachweis der Induktion der VEGF-A-Sekretion durch *B. henselae*

Es ist bekannt, dass eine Infektion von HeLa-Zellen durch *B. henselae* Wildtyp in den Zellen die Sekretion von VEGF-A auslöst, während die Infektion mit *B. henselae* BadA⁻ keine Induktion von VEGF-A bewirkt (82). Um zu überprüfen, ob die Induktion von VEGF-A durch in Schneidermedium mit 10% FCS und 5% Saccharose angezogenen *B. henselae* in gleichem Maße stattfindet wie bei konventionell kultivierten *B. henselae*, wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen MOIs (250, 500, 1000) infiziert. Dabei wurden in einem Falle Bartonellen aus einem Bakterienstock, im anderen Falle in Flüssigmedium angezogene Bartonellen verwendet. Die infizierten Zellkulturen wurden nun 24 Stunden inkubiert und die Zellkulturüberstände mit Hilfe eines ELISA auf ihre VEGF-A-Konzentration untersucht. Alle Ansätze wurden in dreifacher Ausführung angefertigt und die Ergebnisse gemittelt. Die VEGF-A-Konzentration unterschied sich bei einer MOI von 250 in allen Fällen nur unwesentlich von der Negativkontrolle. Bei einer MOI von 500 und 1000 wurde unter Verwendung von *B. henselae* Wildtyp ein deutlicher Anstieg der VEGF-A-Konzentration sichtbar, wobei sich die Werte der in Flüssigmedium

angezogenen Bakterien kaum von denen des Stocks unterschieden. Der bei einer MOI von 1000 erreichte Wert entsprach mit etwa 800 pg/ml einer Verdoppelung des Kontrollwertes. Der bei Infektion mit *B. henselae* Wildtyp beobachtete Anstieg der VEGF-A-Konzentration bei MOI 500 und 1000 fiel unter Verwendung der BadA⁻-Mutante deutlich geringer aus. Zusammenfassend ergaben sich zwischen den Ansätzen aus Flüssigmedium und konventionell kultivierten *B. henselae* keine wesentlichen Unterschiede.

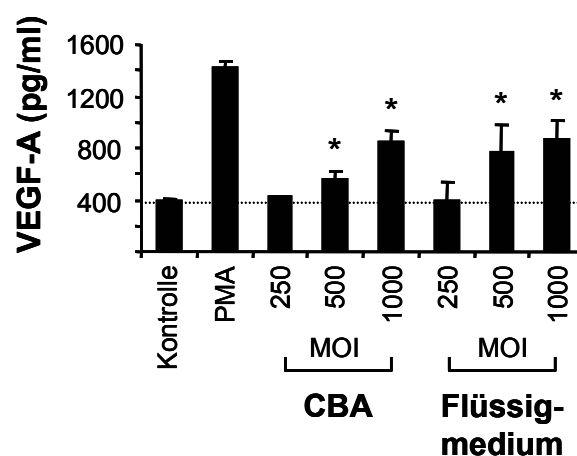


Abb. 10: Induktion der VEGF-A-Sekretion durch *B. henselae*. HeLa-299 Zellen wurden mit auf CBA oder in Flüssigmedium (Schneidermedium mit 10% FCS und 5% Saccharose) kultivierten *B. henselae* infiziert (MOI: 250, 500, 1000). Als Positivkontrolle wurde PMA (25 ng/ml) verwendet. 24 Stunden nach der Infektion wurde die VEGF-A-Konzentration der Zellkulturüberstände mittels ELISA bestimmt. Es wurden keine Unterschiede in der Induktion der VEGF-A-Sekretion zwischen der Kultivierung auf CBA oder in Flüssigmedium beobachtet. (* signifikanter Unterschied verglichen mit Kontrolle $p < 0,05$)

3.2.4 Nachweis der IL-8-Sekretion nach Infektion mit *B. henselae*

Die Infektion von HUVECs durch *B. henselae* führt zur Produktion und Sekretion von IL-8 (107). Hier sollte untersucht werden, ob die IL-8-Induktion durch *B. henselae* aus Flüssigmedium und konventionell kultivierten *B. henselae* in vergleichbarer Weise stattfindet. Dazu wurden HUVECs mit *B. henselae* aus Flüssigmedium oder Bakterienstock infiziert, 24 Stunden inkubiert und die IL-8 Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA

bestimmt. Die Infektion erfolgte jeweils mit einer MOI von 31, 62, 125 und 250, wobei jeder Ansatz in dreifacher Ausführung erfolgte. Als Positivkontrolle wurde PMA verwendet während Zellkulturmedium als Negativkontrolle diente. Die Infektion der HUVECs durch *B. henselae* resultierte unabhängig von der Kultivierungsmethode der Bakterien stets in einer Induktion der IL-8-Sekretion. So konnte bereits bei einer MOI von 31 mit einem Wert von etwa 600 pg/ml eine Verdoppelung der IL-8-Konzentration gegenüber der Negativkontrolle beobachtet werden. Dieses Ergebnis zeigte sich sowohl unter Verwendung von konventionell, als auch von in Flüssigmedium kultivierten *B. henselae*. In beiden Fällen wurde außerdem übereinstimmend eine weitere Steigerung der IL-8-Sekretion bei steigender MOI nachgewiesen. Bei einer MOI von 250 konnte bei auf konventionelle Weise kultivierten *B. henselae* mit einem Wert von über 800 pg/ml die stärkste Induktion der IL-8-Sekretion beobachtet werden. Bei in Flüssigmedium kultivierten *B. henselae* zeigte sich bei einer MOI von 250 ein leichter Abfall der IL-8-Konzentration gegenüber dem Wert bei einer MOI von 125.

Im Gesamten betrachtet verhielten sich in Flüssigmedium und konventionell kultivierte *B. henselae* jedoch beinahe identisch. Es ist somit davon auszugehen, dass sich Bakterien beider Kultivierungsverfahren in ihrer Fähigkeit IL-8-Sekretion in Wirtszellen zu induzieren nicht unterscheiden.

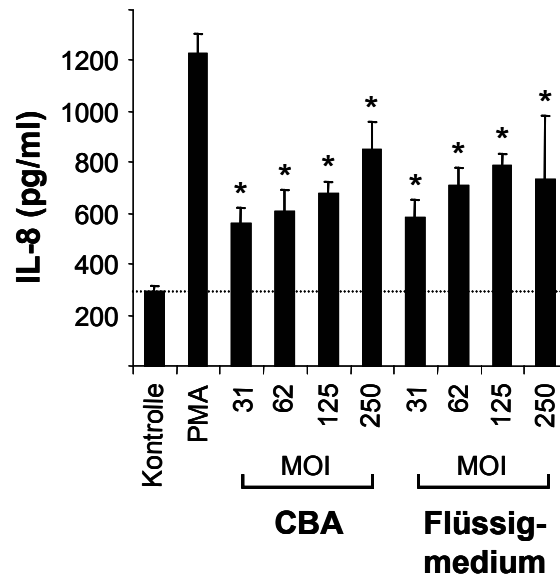


Abb. 11: Induktion der IL-8-Sekretion durch *B. henselae*. HUVECs wurden mit auf CBA oder in Flüssigmedium (Schneidermedium mit 10% FCS und 5% Saccharose) kultivierten *B. henselae* infiziert (MOI: 31, 62, 125, 250). Als Positivkontrolle wurde PMA (25 ng/ml) verwendet. 24 Stunden nach der Infektion wurde die IL-8-Konzentration der Zellkulturüberstände mittels ELISA bestimmt. Es wurden keine relevanten Unterschiede in der Induktion der IL-8-Sekretion im Bezug auf die beiden Kultivierungsverfahren beobachtet. (* signifikanter Unterschied verglichen mit Kontrolle $p < 0,01$)

3.2.5 Adhärenz und Invasion von *B. henselae* an HUVECs

B. henselae adhärert an und invadiert in HUVECs (45, 50). In diesem Versuch sollte überprüft werden, ob sich in Flüssigmedium und konventionell kultivierte *B. henselae* bei der Adhärenz an und Invasion in HUVECs unterscheiden. Um diese Vorgänge darzustellen, wurden die auf Coverslips haftenden Zellen infiziert (MOI 100) und zu den Zeitpunkten 30 Minuten, 2 Stunden und 24 Stunden nach Infektion fixiert und mittels DIF gefärbt.

In den durch Laserscanning-Mikroskopie erzeugten Bildern konnte beobachtet werden, dass *B. henselae* nach 30 Minuten an die Endothelzellen adhärte. Nach 2 Stunden wurde neben den adhärenen Bakterien bereits eine deutliche Invasion der Zellen beobachtet. Bei Betrachtung der Bilder 24 Stunden nach der Infektion fiel auf, dass sich nun beinahe alle Bakterien intrazellulär aufhielten. Hierbei war eine Gruppierung um den Zellkern und die Veränderung

der Morphologie der Endothelzellen, wie zuvor beschrieben (50), erkennbar. *B. henselae* aus Bakterienstock und in Flüssigmedium kultivierte *B. henselae* unterschieden sich in diesen Untersuchungen nicht.

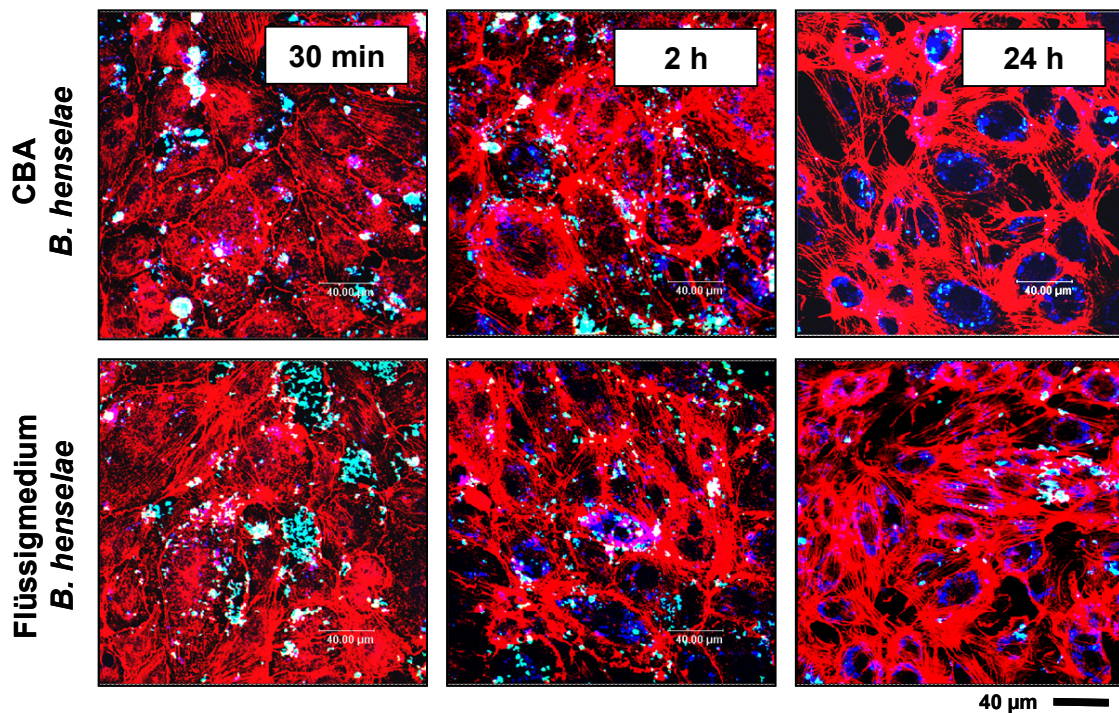


Abb. 12: Adhärenz und Invasion von *B. henselae* an HUVECs. HUVECs wurden mit auf CBA oder in Flüssigmedium (Schneidermedium mit 10% FCS und 5% Saccharose) kultivierten *B. henselae* infiziert (MOI: 100). Extra- (grünes Signal) und intrazelluläre (blaues Signal) Bakterien wurden zu den Zeitpunkten 30 min, 2 h und 24 h nach Infektion mittels CLSM dargestellt. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit TRITC-konjugiertem Phalloidin (rotes Signal) angefärbt. Im Adhärenz- und Invasionsverhalten von *B. henselae* wurden keine vom Kultivierungsverfahren abhängigen Unterschiede beobachtet.

3.2.6 Gewinnung von BadA aus dem Flüssigkulturüberstand nach Kultivierung von *B. henselae*

Unter Verwendung lysierter Bakterien zur Serumdiagnostik von *B. henselae* im Immunoblot kommt es aufgrund der Vielzahl sich überlagernder Proteine zu großen Schwierigkeiten bei der Auswertung der Ergebnisse (150). Unter Verwendung von reinerem BadA wären hier bessere Ergebnisse zu erzielen.

Da es sich bei BadA um ein Oberflächenprotein handelt, ist es denkbar, dass dieses nach Kultivierung von *B. henselae* in Flüssigmedium aus dem Überstand der abzentrifugierten Bakteriensuspension gewinnbar ist. Um dies nachzuweisen, wurden in diesem Versuch *B. henselae* Wildtyp und *B. henselae* BadA⁻ in Flüssigmedium kultiviert. Die Proteine in den aus diesen Ansätzen gewonnenen Überständen wurden mit Hilfe einer TCA-Fällung angereichert. Anschließend erfolgte ein Westernblot, der im Überstand befindliches BadA durch spezifische Antikörper nachwies. Im Falle des *B. henselae* Wildtyps waren oberhalb von etwa 100 kDa deutliche, für BadA typische, Banden zu erkennen. Bei Verwendung von *B. henselae* BadA⁻ traten diese Banden erwartungsgemäß nicht auf.

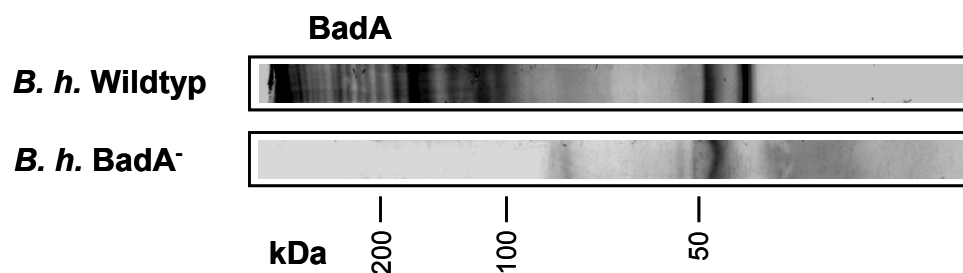


Abb. 13: Nachweis von BadA aus dem Flüssigkulturüberstand nach Kultivierung von *B. henselae*. Die Detektion von BadA im Flüssigkulturüberstand, nach Kultivierung von *B. henselae*, erfolgte mittels BadA-Westernblot. *B. henselae* BadA⁻ diente als Negativkontrolle. Im Falle des *B. henselae* Wildtyps waren deutliche, für BadA typische Banden oberhalb von etwa 100 kDa zu erkennen.

3.2.7 Proteinexpressionsmuster und Antigenprofil von in Flüssigmedium kultivierten *B. henselae*

Um einen möglichst umfassenden Vergleich der Proteinexpressionsmuster von konventionell und in Flüssigmedium kultivierten *B. henselae* zu gewinnen, wurden Ganzzelllysate im SDS-Gel aufgetrennt und die gesamten Proteine mit Coomassie gefärbt. Dazu wurde Flüssigmedium mit *B. henselae* beimpft (10^6 Bakterien/ml) und über 3 Tage inkubiert. *B. henselae* von CBA wurde von konfluent bewachsenen Platten an Tag 4 abgeerntet. Zusätzlich wurde das

Antigenprofil von konventionell und in Flüssigmedium kultivierten *B. henselae* verglichen. Dazu wurden Westernblots mit Ganzzelllysaten angefertigt. Diese wurden jeweils mit dem Serum eines mit *B. henselae* infizierten Kaninchens und dem eines Patienten mit Verdacht auf eine *B. henselae* Infektion (IFT-Titer: 1:400) inkubiert. Als weiteres spezifisches Protein wurde Pap31 ebenfalls in einem Westernblot mit Hilfe eines spezifischen anti-Pap31 Antikörpers nachgewiesen (157). Weder im durch Coomassiefärbung dargestellten Proteinexpressionsmuster noch im Antigenprofil konnten relevante Unterschiede zwischen in Flüssigmedium und auf CBA kultivierten *B. henselae* beobachtet werden.

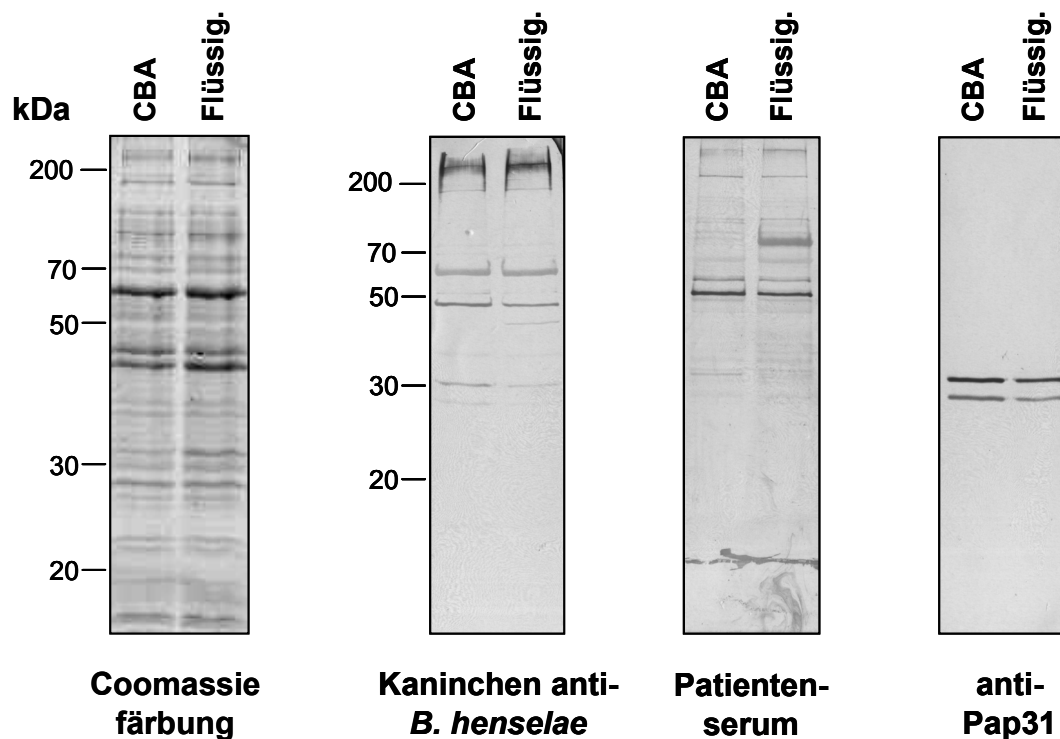


Abb. 14: Proteinexpressionsmuster und Antigenprofil von konventionell und in Flüssigmedium kultivierten *B. henselae*. Die Untersuchung der Proteinzusammensetzung von konventionell und in Flüssigmedium kultivierten *B. henselae* erfolgte mit Hilfe eines Westernblots und Coomassiefärbung. Die Westernblots wurden jeweils mit dem Serum eines mit *B. henselae* infizierten Kaninchens und dem eines Patienten mit Verdacht auf eine *B. henselae* Infektion (IFT-Titer: 1:400) inkubiert. Die Expression von Pap31 wurde mit Hilfe eines spezifischen monoklonalen Antikörpers (VKS 29) nachgewiesen. Es konnten keine relevanten Unterschiede im Expressionsmuster festgestellt werden.

3.3 Epidemiologische Auswertung der Mittels PCR untersuchten Zecken

3.3.1 Prävalenz von *B. henselae* DNA in europäischen Zecken

Von den 654 Zecken, die an allen vier Sammelstellen Eberdingen (Deutschland), Klasdorf (Deutschland), Lembach (Frankreich) und Madeira (Portugal) gesammelt wurden, konnte in 84 Fällen (12,8%) *Bartonella* spp. DNA nachgewiesen werden. Dieser Nachweis erfolgte unter Verwendung einer 16S-rDNA-spezifischen nested PCR (Tab. 15). Alle Amplifikate wurden sequenziert und zeigten einheitlich das Vorhandensein von *B. henselae* DNA. Erstaunlicherweise konnte keine andere *Bartonella* spp. nachgewiesen werden. Im Gesamten betrachtet wurde eine höhere Prävalenz von *B. henselae* DNA in Nymphen (31,9%) als in adulten Zecken (2,1%) beobachtet.

Die höchste Prävalenz von *B. henselae* DNA wurde in aus Lembach stammenden Nymphen (38,2 %) gemessen, gefolgt von Madeira (32,3%) und Eberdingen (11,8%). In Klasdorf wurden keine Nymphen gesammelt. In erwachsenen Zecken wurde die höchste Prävalenz in Lembach (12,0%), gefolgt von Klassdorf (2,9%) und Eberdingen (0,5%), beobachtet. Auf Madeira enthielt keine der untersuchten adulten Zecken *B. henselae* DNA.

3.3.2 Prävalenz von *B. burgdorferi* sensu lato DNA in europäischen Zecken

Von den insgesamt 654 untersuchten Zecken enthielten 53 (8,1%) *B. burgdorferi* sensu lato DNA, welche durch eine *ospA*-spezifische nested PCR (Tab. 15) detektiert wurde. Zur internen Kontrolle wurden stichprobenartig fünf Amplifikate sequenziert und bestätigten das Vorhandensein von *B. burgdorferi* sensu lato DNA. In der Gesamtheit wurde *B. burgdorferi* sensu lato DNA in 4,4% aller Nymphen aus Eberdingen und Lembach nachgewiesen. In 14,7%

der in Eberdingen, Klasdorf und Lembach gesammelten adulten Zecken konnte ebenfalls *B. burgdorferi* sensu lato DNA detektiert werden, während auf Madeira alle Zecken negativ waren.

In Nymphen war die Prävalenz von *B. burgdorferi* sensu lato DNA am höchsten in Eberdingen (11,8%), wohingegen sich in Lembach lediglich 2,0% der Proben als positiv erwiesen. Auf Madeira wurden erwartungsgemäß keine positiven Fälle beobachtet. In keiner Zecke (aus 654 Stück) wurde eine Koinfektion von *B. burgdorferi* sensu lato und *B. henselae* nachgewiesen.

Tab. 17: Nachweishäufigkeiten von *Bartonella henselae* und *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in europäischen Zecken.

Herkunftsart	Nachweis von <i>B. henselae</i>		Nachweis <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	
	Nymphen	Adulte	Nymphen	Adulte
Eberdingen (Germany) (48° 52' 51" N, 08° 57' 51" O)	4 / 34 (11.8%)	1 / 199 (0.5%)	4 / 34 (11.8%)	44 / 199 (22.1%)
Klasdorf (Germany)^a (52° 01' 31" N, 13° 33' 29" O)	-	2 / 70 (2.9%)	-	3 / 70 (4.3%)
Lembach (France) (49° 00' 30" N, 07° 47' 23" O)	39 / 102 (38.2%)	6 / 50 (12.0%)	2 / 102 (2.0%)	0 / 50 (0.0%)
Madeira (Portugal) (32° 42' 35" N, 16° 54' 01" W)	32 / 99 (32.3%)	0 / 100 (0.0%)	0 / 99 (0.0%)	0 / 100 (0.0%)
gesamt	75 / 235 (31.9%)	9 / 419 (2.1%)	6 / 235 (2.6%)	47 / 419 (11.2%)

^a In Klasdorf wurden keine Nymphen gesammelt

3.3.3 Statistische Analyse der Prävalenz-Daten

Die Odds Ratio des Nachweises von DNA in Nymphen relativ zu adulten Zecken war 1/3 für *B. henselae* und 28 für *B. burgdorferi* sensu lato. Da in Kladorf keine Nymphen gesammelt wurden, wurden lediglich 584 Proben aus Eberdingen, Lembach und Madeira in einer logischen Regression analysiert. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Prävalenz von *B. henselae* DNA von Ort zu Ort differiert (χ^2 mit 2 *df* entsprach 17.6, *P* Wert 0.00015) war die Chance, *B. henselae* DNA in Nymphen zu finden, 13,8 mal (CI 6,5 bis 34) höher als die Chance, *B. henselae* DNA in adulten Zecken nachzuweisen (χ^2 mit 1 *df* betrug 63, *P* Wert $1.9 \cdot 10^{-15}$). Keine der 99 Nymphen und der 100 adulten Zecken auf Madeira enthielt *B. burgdorferi* sensu lato DNA, weswegen das einseitige 95% Konfidenzintervall für die Obergrenze der Prävalenz 2,7% bzw. 2,6% beträgt. In den 385 Proben aus Eberdingen und Lembach betrug die Chance, *B. burgdorferi* sensu lato DNA in Nymphen zu finden das 0,61-fache (CI 0,21 bis 1,49) der Chance, diese in adulten Zecken zu finden (χ^2 mit 1 *df* betrug 1.13, *P* Wert 0.29). Dabei wurde berücksichtigt, dass die Prävalenzen eine Chancenverteilung (Odds Ratio) von 15 (χ^2 mit 1 *df* betrug 24.2, *P* Wert $8.5 \cdot 10^{-7}$) zwischen Eberdingen und Lembach aufwies. Bei der Testung der Unabhängigkeit beider Infektionen trugen lediglich Orte und Stadien mit einer positiven Anzahl infizierter Zecken zur Wahrscheinlichkeit der Probe bei. Ausgeschlossen wurden die Proben aus Madeira, da hier *B. burgdorferi* sensu lato DNA nicht nachweisbar war und die adulten Zecken aus Lembach. Der *P* Wert gibt mit 0.21 keinen signifikanten Hinweis, die Unabhängigkeit beider Infektionen in Frage zu stellen. Dies gilt sowohl für die kompletten 405 Zecken als auch für alle vier Untergruppen.

4 Diskussion

4.1 Allgemeines

Die Gattung *Bartonella* umfasst etwa 20 Arten, die jeweils auf verschiedene, teils unbekannte, Reservoirwirte innerhalb der Säugetiere spezialisiert sind (50). Da die Kultivierung von *Bartonella* spp. auf Grund ihres langsamen Wachstums und hohen Anspruchs an das Kulturmedium mit großen Schwierigkeiten verbunden ist (91), fällt die Erforschung dieser wichtigen Pathogenfamilie nach wie vor schwer. Sowohl die molekulargenetische Forschung als auch die klinische Diagnostik sind durch die schwierige Handhabung dieser Bakterien und deren komplizierte Isolation aus Untersuchungsmaterial stark eingeschränkt. So gestaltet sich die Forschung und Diagnostik auf Grund langer Inkubationszeiten und hoher Kontaminationsgefahr äußerst langwierig und kostspielig. Umso relevanter ist die Erforschung neuer Kulturmethoden, die eben diese Schwierigkeiten umgehen und somit Diagnostik und Forschung erleichtern (3).

Unsere Entdeckung des Schneidermedium-basierten Flüssigmediums geht bemerkenswerterweise auf zwei unabhängige, zufällige Beobachtungen zurück. In einem Experiment zur Untersuchung der Interaktion von *B. henselae* mit verschiedenen Wirtszellen fiel eine unklare Trübung in zellfreiem Schneidermedium (der Kontrollgruppe des Versuches) auf (137). Es konnte im Folgenden gezeigt werden, dass diese Trübung auf das Wachstum von *B. henselae* zurückzuführen war. Des Weiteren entdeckten wir die Fähigkeit von Saccharose, das Wachstum von *B. henselae* zu beschleunigen, während Klonierungsversuchen in denen Schneidermedium-basierte Agarplatten eingesetzt wurden, auf denen die Selektion der Mutanten durch Saccharose erfolgen sollte.

4.1.1 Einsatzmöglichkeiten des neuen Flüssigmediums in Diagnostik und Forschung

Bartonella spp. sind anspruchsvolle und langsam wachsende Krankheitserreger, bei denen Schwierigkeiten in der konventionellen Anzucht gut bekannt sind. Der geringe Erfolg bei der primären Isolation ist wohl am besten ersichtlich, wenn man die Sensitivität mikrobiologischer Isolationsmethoden anhand von *Bartonella*-Endokarditis Proben betrachtet. Die Sensitivität konventioneller Agrar-Basierter Anzucht Techniken belief sich auf lediglich 4%, im Vergleich zu 44% im Falle einer Kokultivierung der Patientenproben in „shell vials“, die ECV304 Zellen enthielten (91). Unglücklicherweise handelt es sich bei dieser Kokultivierung um ein äußerst aufwendiges und somit teures Verfahren, das somit Speziallaboratorien vorbehalten bleibt. Es ist also offensichtlich, dass ein passendes Anreicherungsmedium für die mikrobiologische Diagnostik von *Bartonella* Infektionen in höchstem Maße erstrebenswert wäre. Ein solches Medium würde darüber hinaus viele experimentelle Ansätze zur molekulargenetischen und stoffwechselbiologischen Erforschung von *Bartonella* spp. erleichtern. Das in dieser Arbeit beschriebene Flüssigkulturmedium auf Basis von Schneider's *Drosophila*-Medium kann diese Lücke schließen, da es sich aus lediglich drei handelsüblichen Komponenten (FCS, Saccharose, Schneider's *Drosophila*-Medium) zusammensetzt und somit sehr preiswert und darüber hinaus einfach herzustellen ist. Es ermöglicht außerdem eine sehr verlässliche Kultivierung von *Bartonella* spp., da es nicht durch komplexe Supplemente substituiert werden muss. Des weiteren ermöglicht die Formulierung ohne stark färbende oder trübende Zusätze eine Keimzahlbestimmung anhand der OD_{600 nm} in der exponentiellen Wachstumsphase. Dies unterscheidet es vor allem von „*Bartonella* alpha-Proteobacteria growth medium“ (BAPGM), einem Flüssigkulturmedium für das bereits erhöhte Nachweisraten in der Diagnostik von *Bartonella*-Infektionen gezeigt werden konnten (24, 56).

4.1.2 Vergleich mit bereits vorhandenen Flüssigmedien für *Bartonella* spp.

Drei verschiedene Flüssigkulturmedien sind in der Vergangenheit beschrieben worden. Zuerst beschrieb Schwartzman das Wachstum von *B. henselae* und *B. quintana* in mit Fildes-Lösung und Hämin supplementiertem „*Brucella* broth“ (142). Dieses Medium wurde später in modifizierten Formulierungen verwendet (33, 132). Wong beschrieb das Wachstum von *B. henselae* in einem RPMI-1640 basierten Medium, das ebenfalls mit Hämin supplementiert war (153). Kürzlich entdeckte Ricardo Maggi das „*Bartonella* alpha-Proteobacteria growth medium“ (BAPGM), das auf einem Insektenzellmedium basiert (DS2 Medium) und aus 18 verschiedenen Ingredienzien besteht (97). Dieses Medium wurde bereits im Bezug auf seinen diagnostischen Nutzen evaluiert (24). Trotz aller existierenden Beschreibungen konnte ein Wachstum von *Bartonella* spp. lediglich in BAPGM sicher reproduziert werden. Somit muss davon ausgegangen werden, dass die übrigen beschriebenen Medien nicht zur Kultivierung von *Bartonella* spp. geeignet sind. Obwohl wir mit BAPGM ebenfalls gute Ergebnisse bei der Anzucht von *B. henselae* erzielen konnten, muss in Betracht gezogen werden, dass unser Medium lediglich aus den drei häufig verwendeten Zutaten Schneidermedium, fetalem Kälberserum (FCS) und Saccharose besteht. Aus diesem Grund stellt es ein billiges und einfach zuzubereitendes Flüssigmedium für *Bartonella* spp. dar, das nicht auf die Zugabe von Blut oder Hämin angewiesen ist. Da es sich bei Blut und Hämin in beiden Fällen um stark trübende Substanzen handelt, erlaubt unser Medium die Detektion bakteriellen Wachstums durch visuelle Betrachtung und Messung der optischen Dichte. Ein weiterer Nachteil der komplexen Supplementierung von BAPGM ist, dass chargenabhängige Unterschiede der einzelnen Zusätze die erreichten Wachstumsraten in diesem Medium stark schwanken lässt. Dies geht so weit, dass einzelne Chargen der Supplemente kein Wachstum von *Bartonella* spp. ermöglichen und somit jede Medium-Charge vor der ersten Verwendung geprüft werden muss (Daten nicht gezeigt). In unserem einfach zusammengesetzten Flüssigmedium wurden solche chargenabhängigen

Schwankungen der Wachstumsraten nicht beobachtet. Ein weiterer Vorteil der häminfreien Rezeptur unseres Mediums ist, dass zwischen den einzelnen *Bartonella* spp. große Unterschiede in der tolerierten bzw. für das Wachstum benötigten Häminkonzentration beschrieben wurden [*B. henselae* benötigt demzufolge eine für *B. quintana* bereits hemmend wirkende Häminkonzentration (142)]. Zwar unterschied sich die Wachstumsgeschwindigkeit von *B. quintana* und *B. henselae* in gewissem Umfang auch in unserem Medium, in beiden Fällen gelang jedoch die Kultivierung dieser Erreger mit schnellen Wachstumsraten und hohen Keimzahlen.

4.1.3 Wachstumskinetik von *B. henselae* in Flüssigmedium

Die Kultivierung von *Bartonella* spp. in unserem Flüssigmedium zeigte bei Messung der optischen Dichte (600 nm) eine typische bakterielle Wachstumskurve mit einer Lag-Phase, einer Log-Phase und einer stationären Phase. Bei Analyse der Keimzahlen durch das Ausplattieren serieller Verdünnungsreihen stellte sich in Übereinstimmung mit früher gezeigten Daten (33, 97) jedoch heraus, dass der Wildtyp von *B. henselae* keine stationäre Phase erreicht, sondern nach Erreichen der maximalen Keimzahl schnell in die Absterbephase übergeht. Eine denkbare Erklärung könnte, wie früher beschrieben, die exzessive Produktion eines lytischen Phagen in dieser Phase sein (33). Dies steht jedoch im Widerspruch zu den Beobachtungen der optischen Dichte, die auch während der Absterbephase konstant erhöht blieb. Bei einer Zerstörung der Bakterien durch einen lytischen Phagen wäre im Gegensatz dazu aber ein Abfall der optischen Dichte zu erwarten (83, 151). Es könnte des Weiteren spekuliert werden, dass der Beginn der Absterbephase mit einem Mangel an Nährstoffen im Kulturmedium einhergeht. Dies betrifft vor allem essentielle Aminosäuren, die nicht vom Bakterium selbst synthetisiert werden können und deren Mangel somit zum Absterben des Bakteriums führt. Im Laufe der exponentiellen Phase werden diese Aminosäuren in immer

größerem Maße aus dem Medium entnommen, verknappen schließlich und könnten so das fulminante Absterben der Bakterien bedingen. Davon abgesehen ist ebenfalls denkbar, dass beim Wachstum von *Bartonella* spp. toxische Metaboliten anfallen, die an das umgebende Medium abgegeben werden. Diese Konzentrationen von toxischen Metaboliten, die mit der Zahl der Bakterien in der exponentiellen Phase ebenfalls stark ansteigen würde, könnte an einem gewissen Punkt einen kritischen Wert übersteigen und somit ebenfalls für das fulminante Absterben der Bakterien verantwortlich sein.

4.1.4 Verwendung von in Flüssigmedium kultivierten *B. henselae* in Infektions-Experimenten

Die Beobachtung, dass *Bartonella* spp. bei der Kultivierung in Flüssigmedium keine stationäre Phase aufweisen, sondern nach Erreichen der maximalen Keimzahl schnell in die Absterbephase übergehen, hat für die Durchführung von Infektionsexperimenten direkte Konsequenzen. Hier muss für jeden Bakterienstamm der Zeitpunkt, an dem die Absterbephase beginnt, genau bekannt sein, um eine Inokulation von toten Bakterien zu vermeiden. Andernfalls bestünde die Gefahr einer Verfälschung der Ergebnisse durch unspezifische Effekte, die durch Bestandteile der toten Bakterien [insbesondere Lipopolysaccharid (LPS)] ausgelöst werden können. Es ist bemerkenswert, dass in Flüssigmedium kultivierte *B. henselae* nicht in ihrer Expression von BadA beeinträchtigt sind (siehe Abb. 8 und 9). Dies ist insofern von elementarer Bedeutung, da es sich bei BadA um einen der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren von *B. henselae* handelt und dieser an vielen Prozessen der Wirtszellinteraktion beteiligt ist. Es erstaunt folglich nicht, dass auch im Bezug auf die Adhärenz an Wirtszellen und deren nachfolgende Invasion keine Unterschiede zu konventionell kultivierten *B. henselae* beobachtet wurden. Auch die Untersuchungen der Proteinexpressionsmuster mittels Western Blot zeigten keine relevanten Unterschiede. Es kann demnach angenommen

werden, dass in Flüssigmedium kultivierte *B. henselae* ebenfalls in der serologischen Diagnostik eingesetzt werden können. Eine weitere wichtige Beobachtung ist, dass auch die Fähigkeit, von in Flüssigmedium kultivierten *B. henselae*, zur Induktion der Sekretion des proangiogenetische wirksamen Zytokins VEGF-A in infizierten Wirtszellen im Vergleich zu konventionell kultivierten *B. henselae*, nicht verändert war. Es kann folglich angenommen werden, dass in Flüssigmedium kultivierte *B. henselae* auch uneingeschränkt zur Verwendung in Experimenten zur Erforschung der VEGF-bedingten Angiogenese eingesetzt werden können. Zusammenfassend zeigen die hier beschriebenen Beobachtungen, dass in Flüssigmedium kultivierte *B. henselae* sich weder in der Expression wichtiger Pathogenitätsfaktoren, noch in der Interaktion mit Wirtszellen von konventionell kultivierten *B. henselae* unterscheiden. Diese Tatsache, verbunden mit den Vorteilen der schnellen Verfügbarkeit großer Mengen von Bakterien durch die Kultivierung in Flüssigmedium, machen es zu einem wichtigen Hilfsmittel zukünftiger *Bartonella*-Forschung.

4.1.5 Abhängigkeit des Wachstums von *B. henselae* von verschiedenen Zuckerzusätzen

Es ist im Moment ungeklärt, aus welchem Grund Saccharose das Wachstum von *B. henselae* verbessert, während andere Kohlenhydrate das bakterielle Wachstum kaum beeinflussen (Glukose und Fruktose) oder sogar unterdrücken (Mannose und Galaktose). Im Genom von *B. henselae* sind jedoch mehrere Sequenzen für ABC-Transporter (einschließlich eines Zuckertransporters) vorhanden (6), die Saccharose als Kohlenstoffquelle nutzbar machen könnten. Warum Mannose und Galaktose das Wachstum von *B. henselae* unterdrücken, ist bis jetzt ebenfalls nicht geklärt. Denkbar wäre, dass diese beiden Monosaccharide eine toxische Wirkung auf *B. henselae* haben. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass Galaktose und Mannose in einem

energieverbrauchenden Prozess von einem Phosphoenolpyruvat (PEP) abhängigen Zucker-Phosphotransferase-System (PEP-PTS) in die Zelle aufgenommen werden (39). Phosphoenolpyruvat, selbst ein Zwischenprodukt der Glykolyse, wird durch die enzymatische Verstoffwechslung verschiedener Einfachzucker zur Verfügung gestellt. Im Falle des Fehlens von Enzymen zur Verstoffwechslung einzelner Zucker (z. B. Galaktose und Mannose) könnten diese zwar unter Verbrauch von PEP in die Zelle transportiert werden, selbst jedoch nicht mehr weiter verstoffwechselt werden und somit das PEP nicht regenerieren. Demzufolge würden hohe Konzentrationen von Mannose und Galaktose zu einem Mangel an Phosphoenolpyruvat in der Bakterienzelle führen (10), welcher durch Unterbrechung der Glykolyse wiederum einen Mangel an ATP zur Folge hätte. Dieser Mangel an energiereichem ATP würde innerhalb kurzer Zeit zur vollständigen Verknappung energiereicher Substrate im Bakterium führen und hätte somit dessen Absterben zur Folge.

Es ist denkbar, dass viele der Schwierigkeiten bei der Diagnostik von *Bartonella* spp. in kommerziellen mikrobiologischen Systemen auf die Verwendung von Monosacchariden zurückzuführen sind, die das Wachstum von *Bartonella* spp. unterdrücken. Da hier oft Charakteristika der Fermentationsleistung der nachzuweisenden Bakterien untersucht werden, enthalten die hier verwendeten Medien oft eine Vielzahl verschiedener Zucker. Es ist also nicht auszuschließen, dass das Wachstum von *Bartonella* spp. in diesen Nachweissystemen durch einen dort vorhandenen Zucker gehemmt wird, wodurch der Nachweis unmöglich wird. Ein solcher Effekt ist nicht nur für *Bartonella* spp. denkbar, sondern könnte auch Schwierigkeiten beim Nachweis anderer Erreger erklären. Um diesen Gedanken noch etwas auszuweiten, könnte man die Frage stellen, ob nicht auch bei anderen schwer kultivierbaren Bakterien eine Hemmung des Wachstums durch im Medium enthaltene Zucker oder andere Inhaltsstoffe bedingt wird. Diese Spekulation stellt in Frage, ob schwer anzüchtbare Bakterien im Allgemeinen zwangsläufig nur, wie oft praktiziert, auf komplex substituierten Medien kultiviert werden können oder ob in vielen Fällen bereits das Weglassen einer oder mehrerer Inhaltsstoffe eines Mediums genügen würde, um ein Wachstum zu ermöglichen.

4.1.6 Ausblick auf zukünftige Experimente

Das neuartige Flüssigmedium zur Kultivierung von *B. henselae* bietet uns die Möglichkeit, den Metabolismus von *B. henselae* und dessen mögliche Verbindung zur Pathogenität des Erregers weiter zu erforschen. Dies könnte beispielsweise durch die Zugabe einzelner Zucker und Aminosäuren zu Schneidermedium erfolgen, bis das so hergestellte Flüssigmedium das Wachstum von *B. henselae* ermöglicht. Auf diese Weise könnten die in FCS enthaltenen, für das Wachstum essentiellen Stoffe, identifiziert werden. Ebenfalls denkbar ist die Untersuchung des Stoffwechsels von *B. henselae* in Flüssigmedium durch Isotopenmarkierung verschiedener zugesetzter Zucker und Aminosäuren (58). Nach der Kultivierung von *B. henselae* könnten die eingebrachten Isotope in verschiedenen Stoffwechselprodukten nachgewiesen werden. Auf diese Weise wäre es möglich, Rückschlüsse auf die im Metabolismus der markierten Substanz beteiligten Stoffwechselprozesse zu ziehen.

4.2 Zecken als mögliche Vektoren für *B. henselae*

4.2.1 Reservoirwirte verschiedener *Bartonella* spp.

Humanpathogene *Bartonella* spp. verursachen eine Vielzahl von Infektionskrankheiten. Die Symptome reichen von harmlosen Zuständen bis zu lebensbedrohlichen Infektionen. Die von *B. henselae* und zu einem geringeren Anteil von *B. clarridgeiae* ausgelöste Katzenkratzkrankheit ist gewöhnlich durch eine selbstlimitierende Lymphadenopathie charakterisiert. Demgegenüber zeichnet sich das von *B. quintana* ausgelöste Schützengrabenfieber („trench fever“) durch periodisch remittierende Fieberschübe aus, die durch eine intraerythrozytäre Bakteriämie bedingt sind. *B. quintana* kann darüber hinaus zu

Endokarditis führen, wobei beide Krankheiten auch einen ernsteren Verlauf nehmen können (21, 145).

Für *B. henselae* wurden Katzen als der primäre Reservoirwirt identifiziert, wobei domestizierte Spezies die häufigste Infektionsquelle für Menschen (hauptsächlich Kinder) darstellen. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt durch Kratz- und Bissverletzungen infizierter Katzen (18); die Übertragung zwischen einzelnen Katzen erfolgt durch den Katzenfloh (*Ctenocephalides felis*) (35). Aufgrund einer durch *B. henselae* ausgelösten Osteomyelitis in Folge von Kratzverletzungen durch Hunde, wurden diese ebenfalls als ein Reservoir für *B. henselae* vorgeschlagen (93). Für *B. quintana* stellen Menschen den einzigen bekannten Reservoirwirt dar. Die Kleiderlaus (*Pediculus humanus corporis*) überträgt das Pathogen von Mensch zu Mensch (117, 145). Die biphasische Carrión-Krankheit wird durch *B. bacilliformis* ausgelöst. Der Erreger ist in einigen Gebieten der peruanischen Anden endemisch und wird durch die Sandfliege *Lutzomyia verrucarum* übertragen. Die akute Phase, die als Oroya Fieber bezeichnet wird, ist durch eine intraerythrozytäre Bakteriämie charakterisiert, die oft in einer tödlichen hämolytischen Anämie endet. Mit 40-90% wird bei *B. bacilliformis* Infektionen eine der höchsten, durch humanpathogene Bakterien verursachten Letalitäten beobachtet. Die nachfolgende chronische Phase, bekannt als Verruga Peruana, äußert sich durch vaskuläre Tumoren, die durch Proliferation kolonisierter Endothellzellen entstehen (47). Der Mensch ist der einzige Reservoirwirt für *B. bacilliformis* (125). Kürzlich wurde *Bartonella rochalimae* als neue humanpathogene Spezies identifiziert, die Bakteriämie, Fieber und Splenomegalie auslöst (59). Der Übertragungsweg ist hier noch unbekannt. Während die hämolytische Aktivität von *B. bacilliformis* unter *Bartonella* spp. einzigartig ist (8), scheinen langandauernde Perioden intraerythrozytären Parasitismus einen zentralen Aspekt der Pathogenität von *Bartonella* spp. darzustellen (89, 131).

4.2.2 Übertragung von *Bartonella* spp. durch Arthropoden

Die meisten *Bartonella* spp. werden von Arthropoden übertragen: *B. quintana* wird von der Kleiderlaus, *B. bacilliformis* von der Sandfliege *Lutzomyia verrucarum* und *B. henselae* vom Katzenfloh übertragen. Aufgrund der Fähigkeit von *Bartonella* spp. Erythrozyten einer beständig wachsenden Zahl von Säugetierwirten zu infizieren (18, 78, 98, 111, 112) und in diesen zu verweilen, häufen sich die Hinweise, dass diese Bakterien von einer Vielzahl blutsaugender Arthropoden, wie zum Beispiel Zecken, aufgenommen und übertragen werden könnten. Die potentielle Möglichkeit der zeckenvermittelten Übertragung von *B. henselae* auf den Menschen wird von der Beobachtung gestützt, dass *B. henselae* in auf Menschen gesammelten Zecken nachgewiesen wurde (133). Aus den Vereinigten Staaten sind Fälle bekannt, in denen *B. henselae* Infektionen mit Zecken-Exposition vergesellschaftet waren (60). In Kalifornien wurde DNA von *B. quintana*, *B. henselae*, *B. washoensis* und *B. vinsonii berkhoffii* in *I. pacificus* Zecken nachgewiesen (32). Darüber hinaus wurde die Zeckenexposition nicht nur als Risikofaktor für Katzenkratzkrankheit beim Menschen, sondern auch für die Seropositivität von *B. vinsonii berkhoffii* bei Hunden identifiziert (114). Kürzlich beschriebene *in vitro* Versuche bekräftigen ebenfalls die Hypothese, dass Zecken als Vektoren für die Übertragung von *Bartonella* spp. auf Säugetiere fungieren (43). Diese Daten, kombiniert mit der Tatsache, dass DNA von *Bartonella* spp. in Zecken aus USA, Russland und Europa (32, 118) nachgewiesen wurden, machen eine Übertragung von *Bartonella* spp. durch Zecken überaus wahrscheinlich.

Wir präsentieren hier den ersten zusammenhängenden Datensatz, der die Prävalenz von *Bartonella* DNA in vier unabhängigen europäischen Zeckenpopulationen erfasst. Parallel hierzu wurden die Zecken als interne Plausibilitätskontrolle auf das Vorhandensein von *B. burgdorferi* sensu lato DNA untersucht. Da die Zecken durch Abstreifen der Vegetation gesammelt wurden, konnte die Probengröße nicht geplant werden, um in statistisch signifikanten Ergebnissen bei einer vorgegebenen Odds Ratio zu münden. Obwohl die

Ergebnisse sowohl zwischen der rohen und angeglichenen Analyse, als auch zwischen den Untergruppen variierten, war die Odds Ratio für *B. henselae* zwischen Nymphen und adulten Zecken immer relativ groß (13,8-fach). Die unterschiedlichen Prävalenzen in Nymphen und Adulten könnten auf unterschiedliche Weise erklärt werden. Das höhere Vorkommen *B. burgdorferi* sensu lato DNA in adulten Zecken könnte durch die größere Anzahl von Blutmahlzeiten gegenüber den Nymphen bedingt sein. Die höhere Prävalenz von *B. henselae* DNA in Nymphen könnte durch das infektionsbedingte Absterben oder den Abbruch der Metamorphose erklärt werden. Denkbar ist auch, dass Adulte die Infektion überstanden haben oder ihre Blutmahlzeiten zu einem Zeitpunkt hatten, an dem die Prävalenz von *B. henselae* im Reservoirwirt niedriger war.

4.2.3 Limitationen der Untersuchungen zur Anwesenheit von *B. henselae* in Zecken

Es ist immer noch fraglich, ob die Erfassung von Erreger-DNA in Zecken gleichbedeutend mit dem Nachweis lebender Bakterien ist. Es könnte auch angenommen werden, dass eine Blutmahlzeit an einem bakterämischen Tier zur Anwesenheit von *B. henselae* DNA in Zecken führt, ohne dass lebensfähige Bakterien (beispielsweise in den Speicheldrüsen) vorhanden sind. Hierbei handelt es sich um eine methodische Begrenzung der gewählten molekularbiologischen Nachweismethode, die jedoch durch den Versuch der Kultivierung lebender Bakterien aus gesammelten Zecken in Flüssigmedien wie BAPGM oder unserem neuen Medium (97, 128) umgangen werden könnte. Ebenfalls wäre es denkbar, Zecken an einer Membran zu füttern (43), um mit auf diese Weise infizierten Zecken eine Übertragung von *Bartonella* spp. auf Mäuse oder Katzen auf natürlichem Wege zu untersuchen. In künftigen Experimenten sollten diese Versuche unternommen werden, um die These der Vektorkompetenz von Zecken für *Bartonella* spp. weiter zu untermauern.

5 Zusammenfassung

5.1 Entwicklung und Optimierung eines Flüssigmediums für *Bartonella* spp.

Die Gattung *Bartonella* beinhaltet eine Vielzahl human- und veterinärmedizinisch relevanter Bakterien. Da diese in Bezug auf ihre Wachstumsbedingungen hohe Ansprüche stellen, steht man bei der Isolation und Kultivierung dieser Bakterien vor großen Schwierigkeiten. Ergebnis dieser Arbeit ist die Entdeckung und Optimierung eines neuen Flüssigmediums für *Bartonella* spp., das auf der Formulierung des Schneider-Insektenzellkulturmedium basiert. Dieses Medium ist einfach herzustellen, ermöglicht schnelles und zuverlässiges planktonisches Wachstum von mindestens drei *Bartonella* spp. und erlaubt eine schnelle Keimzahlbestimmung durch Messung der optischen Dichte, da keine extinktionsbeeinflussenden Stoffe wie Blut oder Hämin zugesetzt werden müssen. Funktionelle Untersuchungen, die mit der humanpathogenen Spezies *B. henselae* durchgeführt wurden, zeigten im Bezug auf die Wirtszellinteraktion keine Unterschiede zu Bartonellen, die konventionell auf Columbia-Blutagar kultiviert wurden. Untersucht wurde hierbei die Sekretion verschiedener Zytokine (VEGF-A, IL-8) sowie die Adhärenz und Invasion von *B. henselae* an und in Endothelzellen. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass aus dem Überstand des Flüssigmediums nach der Kultivierung von *B. henselae* das Oberflächenprotein BadA gewonnen werden kann. Diese Beobachtung könnte zukünftig den Einsatz des immundominanten BadA in der serologischen Diagnostik von *B. henselae* erheblich erleichtern. Zusammengefasst hat dieses neu beschriebene Flüssigkulturmedium das Potential, die primäre Isolation und molekularbiologische Erforschung von *Bartonella* spp. in Zukunft wesentlich zu erleichtern.

5.2 Untersuchung der Prävalenz von *B. henselae* DNA in europäischen Zecken

Da *Bartonella*-Infektionen oft mit einer dauerhaft erhöhten Erregerlast im peripheren Blut einhergehen und DNA verschiedener *Bartonella* spp. bereits in Zecken aus diversen Teilen der Welt (darunter USA und Russland) nachgewiesen wurde, erhärtet sich zunehmend der Verdacht, dass Zecken als Vektoren für die Übertragung von *Bartonella* spp. fungieren können. In dieser Arbeit wurde die Prävalenz von *B. henselae* DNA und *B. burgdorferi* sensu lato DNA in Zecken aus vier verschiedenen Orten in Europa [Eberdingen, Klasdorf (Deutschland); Lembach (Frankreich); Madeira (Portugal)] untersucht. Unsere Daten zeigen, dass *B. henselae* DNA in allen vier Zeckenpopulationen nachweisbar ist, wobei die Prävalenz bis zu 40% beträgt. Die Chance, *B. henselae* DNA in Nymphen zu finden, war hierbei um das 14-fache höher als die Chance, *B. henselae* DNA in adulten Zecken zu finden. Es wurden keine Koinfektionen von Zecken mit *B. henselae* und *B. burgdorferi* sensu lato beobachtet. Unsere Daten zeigen, dass *B. henselae* auch in europäischen Zecken verbreitet ist und stützen so weiter die Theorie, dass *Bartonella* spp. durch Zecken übertragen werden. Ausgehend von unseren Daten erscheint der Vorschlag, *B. henselae* in die Liste der durch Zecken übertragenen Krankheitserreger aufzunehmen, durchaus sinnvoll. Unter Berücksichtigung des aktuellen Wissens über *Bartonella*-Infektionen, ihrer zoonotischen Natur und dem Übertragungsrisiko durch blutsaugende Arthropoden muss aufgeklärt werden, ob Strategien der Vektor-Kontrolle durch Reduktion der Ektoparasit-Wirt-Interaktion die Übertragung von *Bartonella* spp. einschränken könnten.

6 Literaturverzeichnis

1. 1999. Serodiagnosis of Emerging Infectious Diseases: *Bartonella* and *Ehrlichia* Infections (course manual). **Centers of Disease Control and Prevention**. Atlanta, USA.
2. **Adal, K. A., C. J. Cockerell, and W. A. Petri, Jr.** 1994. Cat scratch disease, bacillary angiomatosis, and other infections due to *Rochalimaea*. *N Engl J Med* **330**:1509-15.
3. **Agan, B. K., and M. J. Dolan.** 2002. Laboratory diagnosis of *Bartonella* infections. *Clin Lab Med* **22**:937-62.
4. **Aggarwal, B. B., U. Bhardwaj, and Y. Takada.** 2004. Regulation of TRAIL-induced apoptosis by ectopic expression of antiapoptotic factors. *Vitam Horm* **67**:453-83.
5. **Ahsan, N., M. J. Holman, T. R. Riley, C. S. Abendroth, E. G. Langhoff, and H. C. Yang.** 1998. Peliosis hepatitis due to *Bartonella henselae* in transplantation: a hemato-hepato-renal syndrome. *Transplantation* **65**:1000-3.
6. **Alsmark, C. M., A. C. Frank, E. O. Karlberg, B. A. Legault, D. H. Ardell, B. Canback, A. S. Eriksson, A. K. Naslund, S. A. Handley, M. Huvet, B. La Scola, M. Holmberg, and S. G. Andersson.** 2004. The louse-borne human pathogen *Bartonella quintana* is a genomic derivative of the zoonotic agent *Bartonella henselae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:9716-21.
7. **Amano, Y., J. Rumbea, J. Knobloch, J. Olson, and M. Kron.** 1997. Bartonellosis in Ecuador: serosurvey and current status of cutaneous verrucous disease. *Am J Trop Med Hyg* **57**:174-9.
8. **Anderson, B. E., and M. A. Neuman.** 1997. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin Microbiol Rev* **10**:203-19.
9. **Arias-Stella, J., P. H. Lieberman, R. A. Erlandson, and J. Arias-Stella, Jr.** 1986. Histology, immunohistochemistry, and ultrastructure of the verruga in Carrion's disease. *Am J Surg Pathol* **10**:595-610.
10. **Barabote, R. D., and M. H. Saier, Jr.** 2005. Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**:608-34.
11. **Barton, A. L.** 1909. Descripción de elementos endo-globulares hallados en las enfermos de fiebre verrucosa. *La Crónica Médica de Lima* **26**:7-10.

12. **Bass, J. B., Jr., L. S. Farer, P. C. Hopewell, R. O'Brien, R. F. Jacobs, F. Ruben, D. E. Snider, Jr., and G. Thornton.** 1994. Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and children. American Thoracic Society and The Centers for Disease Control and Prevention. *Am J Respir Crit Care Med* **149**:1359-74.
13. **Bass, J. W., J. M. Vincent, and D. A. Person.** 1997. The expanding spectrum of *Bartonella* infections: II. Cat-scratch disease. *Pediatr Infect Dis J* **16**:163-79.
14. **Batterman, H. J., J. A. Peek, J. S. Loutit, S. Falkow, and L. S. Tompkins.** 1995. *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. *Infect Immun* **63**:4553-6.
15. **Benson, L. A., S. Kar, G. McLaughlin, and G. M. Ihler.** 1986. Entry of *Bartonella bacilliformis* into erythrocytes. *Infect Immun* **54**:347-53.
16. **Billeter, S. A., M. G. Levy, B. B. Chomel, and E. B. Breitschwerdt.** 2008. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Med Vet Entomol* **22**:1-15.
17. **Birtles, R. J., T. G. Harrison, N. A. Saunders, and D. H. Molyneux.** 1995. Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **45**:1-8.
18. **Boulouis, H. J., C. C. Chang, J. B. Henn, R. W. Kasten, and B. B. Chomel.** 2005. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet Res* **36**:383-410.
19. **Brenner, D. J., S. P. O'Connor, H. H. Winkler, and A. G. Steigerwalt.** 1993. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales*. *Int J Syst Bacteriol* **43**:777-86.
20. **Brenner, S. A., J. A. Rooney, P. Manzewitsch, and R. L. Regnery.** 1997. Isolation of *Bartonella (Rochalimaea) henselae*: effects of methods of blood collection and handling. *J Clin Microbiol* **35**:544-7.
21. **Brouqui, P., B. Lascola, V. Roux, and D. Raoult.** 1999. Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients. *N Engl J Med* **340**:184-9.

22. **Burgess, A. W., and B. E. Anderson.** 1998. Outer membrane proteins of *Bartonella henselae* and their interaction with human endothelial cells. *Microb Pathog* **25**:157-64.
23. **Burgess, A. W., J. Y. Paquet, J. J. Letesson, and B. E. Anderson.** 2000. Isolation, sequencing and expression of *Bartonella henselae* omp43 and predicted membrane topology of the deduced protein. *Microb Pathog* **29**:73-80.
24. **Cadenas, M. B., R. G. Maggi, P. P. Diniz, K. T. Breitschwerdt, S. Sontakke, and E. B. Breithschwerdt.** 2007. Identification of bacteria from clinical samples using *Bartonella* alpha-Proteobacteria growth medium. *J Microbiol Methods* **71**:147-55.
25. **Carithers, H. A.** 1985. Cat-scratch disease. An overview based on a study of 1,200 patients. *Am J Dis Child* **139**:1124-33.
26. **Carmeliet, P.** 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **9**:653-60.
27. **Carmeliet, P.** 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**:932-6.
28. **Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoek, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau, and A. Nagy.** 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**:435-9.
29. **Carmeliet, P., and R. K. Jain.** 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**:249-57.
30. **Carroll, J. A., S. A. Coleman, L. S. Smitherman, and M. F. Minnick.** 2000. Hemin-binding surface protein from *Bartonella quintana*. *Infect Immun* **68**:6750-7.
31. **Cascales, E., and P. J. Christie.** 2003. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **1**:137-49.
32. **Chang, C. C., B. B. Chomel, R. W. Kasten, V. Romano, and N. Tietze.** 2001. Molecular evidence of *Bartonella* spp. in questing adult *Ixodes pacificus* ticks in California. *J Clin Microbiol* **39**:1221-6.
33. **Chenoweth, M. R., G. A. Somerville, D. C. Krause, K. L. O'Reilly, and F. C. Gherardini.** 2004. Growth characteristics of *Bartonella henselae* in a novel liquid medium: primary isolation, growth-phase-dependent phage induction, and metabolic studies. *Appl Environ Microbiol* **70**:656-63.

34. **Chomel, B. B.** 2000. Cat-scratch disease. *Rev Sci Tech* **19**:136-50.
35. **Chomel, B. B., R. W. Kasten, K. Floyd-Hawkins, B. Chi, K. Yamamoto, J. Roberts-Wilson, A. N. Gurfield, R. C. Abbott, N. C. Pedersen, and J. E. Koehler.** 1996. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J Clin Microbiol* **34**:1952-6.
36. **Chomel, B. B., R. W. Kasten, J. E. Sykes, H. J. Boulouis, and E. B. Breitschwerdt.** 2003. Clinical impact of persistent *Bartonella* bacteremia in humans and animals. *Ann N Y Acad Sci* **990**:267-78.
37. **Chomel, B. B., A. C. Wey, and R. W. Kasten.** 2003. Isolation of *Bartonella washoensis* from a dog with mitral valve endocarditis. *J Clin Microbiol* **41**:5327-32.
38. **Christie, P. J., and E. Cascales.** 2005. Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems (review). *Mol Membr Biol* **22**:51-61.
39. **Cochu, A., C. Vadeboncoeur, S. Moineau, and M. Frenette.** 2003. Genetic and biochemical characterization of the phosphoenolpyruvate:glucose/mannose phosphotransferase system of *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **69**:5423-32.
40. **Conley, T., L. Slater, and K. Hamilton.** 1994. *Rochalimaea* species stimulate human endothelial cell proliferation and migration in vitro. *J Lab Clin Med* **124**:521-8.
41. **Cooper, M. D., M. R. Hollingdale, J. W. Vinson, and J. Costa.** 1976. A passive hemagglutination test for diagnosis of trench fever due to *Rochalimaea quintana*. *J Infect Dis* **134**:605-9.
42. **Cooper, T. G.** 1981. *Biochemische Arbeitsmethoden*. Gryter, Berlin.
43. **Cotte, V., S. Bonnet, D. Le Rhun, E. Le Naour, A. Chauvin, H. J. Boulouis, B. Lecuelle, T. Lilin, and M. Vayssier-Taussat.** 2008. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerg Infect Dis* **14**:1074-80.
44. **da Costa, P. S., M. E. Brigatte, and D. B. Greco.** 2005. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **100**:853-9.
45. **Dabo, S. M., A. W. Confer, J. T. Saliki, and B. E. Anderson.** 2006. Binding of *Bartonella henselae* to extracellular molecules: identification of potential adhesins. *Microb Pathog* **41**:10-20.

46. **Dauga, C., I. Miras, and P. A. Grimont.** 1996. Identification of *Bartonella henselae* and *B. quintana* 16s rDNA sequences by branch-, genus- and species-specific amplification. *J Med Microbiol* **45**:192-9.
47. **Dehio, C.** 2005. *Bartonella*-host-cell interactions and vascular tumour formation. *Nat Rev Microbiol* **3**:621-31.
48. **Dehio, C.** 2001. *Bartonella* interactions with endothelial cells and erythrocytes. *Trends Microbiol* **9**:279-85.
49. **Dehio, C.** 2008. Infection-associated type IV secretion systems of *Bartonella* and their diverse roles in host cell interaction. *Cell Microbiol* **10**:1591-8.
50. **Dehio, C.** 2004. Molecular and cellular basis of *bartonella* pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* **58**:365-90.
51. **Dehio, C., and A. Sander.** 1999. *Bartonella* as emerging pathogens. *Trends Microbiol* **7**:226-8.
52. **Derrick, S. C., and G. M. Ihler.** 2001. Deformin, a substance found in *Bartonella bacilliformis* culture supernatants, is a small, hydrophobic molecule with an affinity for albumin. *Blood Cells Mol Dis* **27**:1013-9.
53. **Dickler, M. N., H. S. Rugo, C. A. Eberle, E. Brogi, J. F. Caravelli, K. S. Panageas, J. Boyd, B. Yeh, D. E. Lake, C. T. Dang, T. A. Gilewski, J. F. Bromberg, A. D. Seidman, G. M. D'Andrea, M. M. Moasser, M. Melisko, J. W. Park, J. Dancy, L. Norton, and C. A. Hudis.** 2008. A Phase II Trial of Erlotinib in Combination with Bevacizumab in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **14**:7878-83.
54. **Drancourt, M., R. Birtles, G. Chaumentin, F. Vandenesch, J. Etienne, and D. Raoult.** 1996. New serotype of *Bartonella henselae* in endocarditis and cat-scratch disease. *Lancet* **347**:441-3.
55. **Drancourt, M., J. L. Mainardi, P. Brouqui, F. Vandenesch, A. Carta, F. Lehnert, J. Etienne, F. Goldstein, J. Acar, and D. Raoult.** 1995. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* endocarditis in three homeless men. *N Engl J Med* **332**:419-23.
56. **Duncan, A. W., R. G. Maggi, and E. B. Breitschwerdt.** 2007. A combined approach for the enhanced detection and isolation of *Bartonella* species in dog blood samples: pre-enrichment liquid culture followed by PCR and subculture onto agar plates. *J Microbiol Methods* **69**:273-81.

57. **Eiffert, H., A. Ohlenbusch, H. J. Christen, R. Thomssen, A. Spielman, and F. R. Matuschka.** 1995. Nondifferentiation between Lyme disease spirochetes from vector ticks and human cerebrospinal fluid. *J Infect Dis* **171**:476-9.
58. **Eisenreich, W., J. Slaghuis, R. Laupitz, J. Bussemer, J. Stritzker, C. Schwarz, R. Schwarz, T. Dandekar, W. Goebel, and A. Bacher.** 2006. ¹³C isotopologue perturbation studies of *Listeria monocytogenes* carbon metabolism and its modulation by the virulence regulator PrfA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:2040-5.
59. **Eremeeva, M. E., H. L. Gerns, S. L. Lydy, J. S. Goo, E. T. Ryan, S. S. Mathew, M. J. Ferraro, J. M. Holden, W. L. Nicholson, G. A. Dasch, and J. E. Koehler.** 2007. Bacteremia, fever, and splenomegaly caused by a newly recognized *bartonella* species. *N Engl J Med* **356**:2381-7.
60. **Eskow, E., R. V. Rao, and E. Mordechai.** 2001. Concurrent infection of the central nervous system by *Borrelia burgdorferi* and *Bartonella henselae*: evidence for a novel tick-borne disease complex. *Arch Neurol* **58**:1357-63.
61. **Folkman, J., E. Merler, C. Abernathy, and G. Williams.** 1971. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* **133**:275-88.
62. **Fuhrmann, O., M. Arvand, A. Gohler, M. Schmid, M. Krull, S. Hippenstiel, J. Seybold, C. Dehio, and N. Suttorp.** 2001. *Bartonella henselae* induces NF-kappaB-dependent upregulation of adhesion molecules in cultured human endothelial cells: possible role of outer membrane proteins as pathogenic factors. *Infect Immun* **69**:5088-97.
63. **Garcia-Esteban, C., H. Gil, M. Rodriguez-Vargas, X. Gerrikagoitia, J. Barandika, R. Escudero, I. Jado, C. Garcia-Amil, M. Barral, A. L. Garcia-Perez, M. Bhide, and P. Anda.** 2008. Molecular method for *Bartonella* species identification in clinical and environmental samples. *J Clin Microbiol* **46**:776-9.
64. **Gilmore, R. D., Jr., T. M. Bellville, S. L. Sviat, and M. Frace.** 2005. The *Bartonella vinsonii* subsp. arupensis immunodominant surface antigen BrpA gene, encoding a 382-kilodalton protein composed of repetitive sequences, is a member of a multigene family conserved among *bartonella* species. *Infect Immun* **73**:3128-36.
65. **Gouriet, F., F. Fenollar, J. Y. Patrice, M. Drancourt, and D. Raoult.** 2005. Use of shell-vial cell culture assay for isolation of bacteria from clinical specimens: 13 years of experience. *J Clin Microbiol* **43**:4993-5002.

66. **Gray, G. C., A. A. Johnson, S. A. Thornton, W. A. Smith, J. Knobloch, P. W. Kelley, L. Obregon Escudero, M. Arones Huayda, and F. S. Wignall.** 1990. An epidemic of Oroya fever in the Peruvian Andes. *Am J Trop Med Hyg* **42**:215-21.
67. **Hanahan, D., G. Christofori, P. Naik, and J. Arbeit.** 1996. Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. *Eur J Cancer* **32A**:2386-93.
68. **Hendrix, L. R.** 2000. Contact-dependent hemolytic activity distinct from deforming activity of *Bartonella bacilliformis*. *FEMS Microbiol Lett* **182**:119-24.
69. **Herbst, R. S., and A. Sandler.** 2008. Bevacizumab and erlotinib: a promising new approach to the treatment of advanced NSCLC. *Oncologist* **13**:1166-76.
70. **Hercik, K., V. Hasova, J. Janecek, and P. Branny.** 2007. Molecular evidence of *Bartonella* DNA in ixodid ticks in Czechia. *Folia Microbiol (Praha)* **52**:503-9.
71. **Higgins, J. A., S. Radulovic, D. C. Jaworski, and A. F. Azad.** 1996. Acquisition of the cat scratch disease agent *Bartonella henselae* by cat fleas (*Siphonaptera: Pulicidae*). *J Med Entomol* **33**:490-5.
72. **Hoiczky, E., A. Roggenkamp, M. Reichenbecher, A. Lupas, and J. Heesemann.** 2000. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *Embo J* **19**:5989-99.
73. **Holden, K., J. T. Boothby, R. W. Kasten, and B. B. Chomel.** 2006. Co-detection of *Bartonella henselae*, *Borrelia burgdorferi*, and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes pacificus* ticks from California, USA. *Vector Borne Zoonotic Dis* **6**:99-102.
74. **Houpikian, P., and D. Raoult.** 2002. Diagnostic methods current best practices and guidelines for identification of difficult-to-culture pathogens in infective endocarditis. *Infect Dis Clin North Am* **16**:377-92.
75. **Jackson, L. A., D. H. Spach, D. A. Kippen, N. K. Sugg, R. L. Regnery, M. H. Sayers, and W. E. Stamm.** 1996. Seroprevalence to *Bartonella quintana* among patients at a community clinic in downtown Seattle. *J Infect Dis* **173**:1023-6.
76. **Jacomo, V., P. J. Kelly, and D. Raoult.** 2002. Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate). *Clin Diagn Lab Immunol* **9**:8-18.

77. **Janier, M.** 1999. Infection and angiomatous cutaneous lesions. *J Mal Vasc* **24**:135-8.
78. **Jones, S. L., R. Maggi, J. Shuler, A. Alward, and E. B. Breitschwerdt.** 2008. Detection of *Bartonella henselae* in the blood of 2 adult horses. *J Vet Intern Med* **22**:495-8.
79. **Kabbinavar, F., C. Irl, A. Zurlo, and H. Hurwitz.** 2008. Bevacizumab improves the overall and progression-free survival of patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-fluorouracil-based regimens irrespective of baseline risk. *Oncology* **75**:215-23.
80. **Karkkainen, M. J., P. Haiko, K. Sainio, J. Partanen, J. Taipale, T. V. Petrova, M. Jeltsch, D. G. Jackson, M. Talikka, H. Rauvala, C. Betsholtz, and K. Alitalo.** 2004. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* **5**:74-80.
81. **Kempf, V. A., N. Hitziger, T. Riess, and I. B. Autenrieth.** 2002. Do plant and human pathogens have a common pathogenicity strategy? *Trends Microbiol* **10**:269-75.
82. **Kempf, V. A., B. Volkmann, M. Schaller, C. A. Sander, K. Alitalo, T. Riess, and I. B. Autenrieth.** 2001. Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. *Cell Microbiol* **3**:623-32.
83. **Klein, I., L. Kittler, S. Kretschmer, F. Suss, and U. Taubeneck.** 1981. Interaction of bacteriophage O2 with strains of the genus *Oerskovia*. *Z Allg Mikrobiol* **21**:427-37.
84. **Koch, A. E., P. J. Polverini, S. L. Kunkel, L. A. Harlow, L. A. DiPietro, V. M. Elnor, S. G. Elnor, and R. M. Strieter.** 1992. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* **258**:1798-801.
85. **Koehler, J. E., C. A. Glaser, and J. W. Tappero.** 1994. *Rochalimaea henselae* infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir. *Jama* **271**:531-5.
86. **Koehler, J. E., P. E. LeBoit, B. M. Egbert, and T. G. Berger.** 1988. Cutaneous vascular lesions and disseminated cat-scratch disease in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *Ann Intern Med* **109**:449-55.
87. **Koehler, J. E., M. A. Sanchez, C. S. Garrido, M. J. Whitfeld, F. M. Chen, T. G. Berger, M. C. Rodriguez-Barradas, P. E. LeBoit, and J. W. Tappero.** 1997. Molecular epidemiology of *bartonella* infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. *N Engl J Med* **337**:1876-83.

88. **Koehler, J. E., and J. W. Tappero.** 1993. Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* **17**:612-24.
89. **Kordick, D. L., and E. B. Breitschwerdt.** 1995. Intraerythrocytic presence of *Bartonella henselae*. *J Clin Microbiol* **33**:1655-6.
90. **Kordick, D. L., B. Swaminathan, C. E. Greene, K. H. Wilson, A. M. Whitney, S. O'Connor, D. G. Hollis, G. M. Matar, A. G. Steigerwalt, G. B. Malcolm, P. S. Hayes, T. L. Hadfield, E. B. Breitschwerdt, and D. J. Brenner.** 1996. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* subsp. nov., isolated from dogs; *Bartonella vinsonii* subsp. *vinsonii*; and emended description of *Bartonella vinsonii*. *Int J Syst Bacteriol* **46**:704-9.
91. **La Scola, B., and D. Raoult.** 1999. Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from human samples: a 5-year experience (1993 to 1998). *J Clin Microbiol* **37**:1899-905.
92. **La Scola, B., and D. Raoult.** 1999. Third human isolate of a *Desulfovibrio* sp. identical to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*. *J Clin Microbiol* **37**:3076-7.
93. **Lappin, M. R., B. Griffin, J. Brunt, A. Riley, D. Burney, J. Hawley, M. M. Brewer, and W. A. Jensen.** 2006. Prevalence of *Bartonella* species, *haemoplasma* species, *Ehrlichia* species, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Neorickettsia risticii* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. *J Feline Med Surg* **8**:85-90.
94. **Li, H., H. Yin, H. Zhang, X. Cao, Z. Wang, and M. She.** 2002. Effect of NF-kappaB on the induction of PDGF-B transcription by angiotensin II in the ECV304 cell line. *Chin Med J (Engl)* **115**:433-8.
95. **Lien, S., and H. B. Lowman.** 2008. Therapeutic anti-VEGF antibodies. *Handb Exp Pharmacol*:131-50.
96. **Linke, D., T. Riess, I. B. Autenrieth, A. Lupas, and V. A. Kempf.** 2006. Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function. *Trends Microbiol* **14**:264-70.
97. **Maggi, R. G., A. W. Duncan, and E. B. Breitschwerdt.** 2005. Novel chemically modified liquid medium that will support the growth of seven *bartonella* species. *J Clin Microbiol* **43**:2651-5.
98. **Maggi, R. G., C. A. Harms, A. A. Hohn, D. A. Pabst, W. A. McLellan, W. J. Walton, D. S. Rotstein, and E. B. Breitschwerdt.** 2005. *Bartonella henselae* in porpoise blood. *Emerg Infect Dis* **11**:1894-8.

99. **Maguina, C., P. J. Garcia, E. Gotuzzo, L. Cordero, and D. H. Spach.** 2001. Bartonellosis (Carrion's disease) in the modern era. *Clin Infect Dis* **33**:772-9.
100. **Matera, G., M. C. Liberto, A. Quirino, G. S. Barreca, A. G. Lamberti, M. Iannone, E. Mancuso, E. Palma, F. A. Cufari, D. Rotiroti, and A. Foca.** 2003. *Bartonella quintana* lipopolysaccharide effects on leukocytes, CXC chemokines and apoptosis: a study on the human whole blood and a rat model. *Int Immunopharmacol* **3**:853-64.
101. **Matuschka, F. R., P. Fischer, M. Heiler, D. Richter, and A. Spielman.** 1992. Capacity of European animals as reservoir hosts for the Lyme disease spirochete. *J Infect Dis* **165**:479-83.
102. **Matuschka, F. R., A. Ohlenbusch, H. Eiffert, D. Richter, and A. Spielman.** 1996. Characteristics of Lyme disease spirochetes in archived European ticks. *J Infect Dis* **174**:424-6.
103. **Maurin, M., R. Birtles, and D. Raoult.** 1997. Current knowledge of *Bartonella* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **16**:487-506.
104. **Maurin, M., and D. Raoult.** 1996. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* infections. *Clin Microbiol Rev* **9**:273-92.
105. **Maurin, M., V. Roux, A. Stein, F. Ferrier, R. Viraben, and D. Raoult.** 1994. Isolation and characterization by immunofluorescence, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, western blot, restriction fragment length polymorphism-PCR, 16S rRNA gene sequencing, and pulsed-field gel electrophoresis of *Rochalimaea quintana* from a patient with bacillary angiomatosis. *J Clin Microbiol* **32**:1166-71.
106. **McCool, T. L., J. G. Hoey, F. Montileone, H. B. Goldenberg, E. Mordechai, and M. E. Adelson.** 2008. Discovery and analysis of *Bartonella henselae* antigens for use in clinical serologic assays. *Diagn Microbiol Infect Dis* **60**:17-23.
107. **McCord, A. M., S. I. Resto-Ruiz, and B. E. Anderson.** 2006. Autocrine role for interleukin-8 in *Bartonella henselae*-induced angiogenesis. *Infect Immun* **74**:5185-90.
108. **McGill, S., J. Rajs, E. Hjelm, O. Lindquist, and G. Friman.** 2003. A study on forensic samples of *Bartonella* spp antibodies in Swedish intravenous heroin addicts. *Apmis* **111**:507-13.
109. **McGill, S. L., R. L. Regnery, and K. L. Karem.** 1998. Characterization of human immunoglobulin (Ig) isotype and IgG subclass response to *Bartonella henselae* infection. *Infect Immun* **66**:5915-20.

110. **Mitchell, S. J., and M. F. Minnick.** 1995. Characterization of a two-gene locus from *Bartonella bacilliformis* associated with the ability to invade human erythrocytes. *Infect Immun* **63**:1552-62.
111. **Molia, S., B. B. Chomel, R. W. Kasten, C. M. Leutenegger, B. R. Steele, L. Marker, J. S. Martenson, D. F. Keet, R. G. Bengis, R. P. Peterson, L. Munson, and S. J. O'Brien.** 2004. Prevalence of *Bartonella* infection in wild African lions (*Panthera leo*) and cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Vet Microbiol* **100**:31-41.
112. **Morales, S. C., E. B. Breitschwerdt, R. J. Washabau, I. Matise, R. G. Maggi, and A. W. Duncan.** 2007. Detection of *Bartonella henselae* DNA in two dogs with pyogranulomatous lymphadenitis. *J Am Vet Med Assoc* **230**:681-5.
113. **Morozova, O. V., N. Chernousova, and I. V. Morozov.** 2005. Detection of the *Bartonella* DNA by the method of nested PCR in patients after tick bites in Novosibirsk region. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*:14-7.
114. **Pappalardo, B. L., M. T. Correa, C. C. York, C. Y. Peat, and E. B. Breitschwerdt.** 1997. Epidemiologic evaluation of the risk factors associated with exposure and seroreactivity to *Bartonella vinsonii* in dogs. *Am J Vet Res* **58**:467-71.
115. **Podsiadly, E., T. Chmielewski, E. Sochon, and S. Tylewska-Wierzbanowska.** 2007. *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks removed from dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis* **7**:189-92.
116. **Pugh, C. W., and P. J. Ratcliffe.** 2003. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* **9**:677-84.
117. **Raoult, D., P. E. Fournier, M. Drancourt, T. J. Marrie, J. Etienne, J. Cosserat, P. Cacoub, Y. Poinsignon, P. Leclercq, and A. M. Sefton.** 1996. Diagnosis of 22 new cases of *Bartonella* endocarditis. *Ann Intern Med* **125**:646-52.
118. **Rar, V. A., N. V. Fomenko, A. K. Dobrotvorsky, N. N. Livanova, S. A. Rudakova, E. G. Fedorov, V. B. Astanin, and O. V. Morozova.** 2005. Tickborne pathogen detection, Western Siberia, Russia. *Emerg Infect Dis* **11**:1708-15.
119. **Regnery, R. L., B. E. Anderson, J. E. Clarridge, 3rd, M. C. Rodriguez-Barradas, D. C. Jones, and J. H. Carr.** 1992. Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin Microbiol* **30**:265-74.

120. **Regnery, R. L., J. G. Olson, B. A. Perkins, and W. Bibb.** 1992. Serological response to "*Rochalimaea henselae*" antigen in suspected cat-scratch disease. *Lancet* **339**:1443-5.
121. **Relman, D. A., P. W. Lepp, K. N. Sadler, and T. M. Schmidt.** 1992. Phylogenetic relationships among the agent of bacillary angiomatosis, *Bartonella bacilliformis*, and other alpha-proteobacteria. *Mol Microbiol* **6**:1801-7.
122. **Richter, D., D. B. Schlee, R. Allgower, and F. R. Matuschka.** 2004. Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. *Appl Environ Microbiol* **70**:6414-9.
123. **Richter, D., D. B. Schlee, and F. R. Matuschka.** 2003. Relapsing fever-like spirochetes infecting European vector tick of Lyme disease agent. *Emerg Infect Dis* **9**:697-701.
124. **Richter, D., A. Spielman, N. Komar, and F. R. Matuschka.** 2000. Competence of American robins as reservoir hosts for Lyme disease spirochetes. *Emerg Infect Dis* **6**:133-8.
125. **Ricketts, W. E.** 1949. Clinical manifestations of Carrion's disease. *Arch Med Interna* **84**:751-81, illust.
126. **Ridder, G. J., C. C. Boedeker, K. Technau-Ihling, R. Grunow, and A. Sander.** 2002. Role of cat-scratch disease in lymphadenopathy in the head and neck. *Clin Infect Dis* **35**:643-9.
127. **Riess, T., S. G. Andersson, A. Lupas, M. Schaller, A. Schafer, P. Kyme, J. Martin, J. H. Walzlein, U. Ehehalt, H. Lindroos, M. Schirle, A. Nordheim, I. B. Autenrieth, and V. A. Kempf.** 2004. *Bartonella* adhesin a mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp Med* **200**:1267-78.
128. **Riess, T., F. Dietrich, K. V. Schmidt, P. O. Kaiser, H. Schwarz, A. Schafer, and V. A. Kempf.** 2008. Analysis of a novel insect cell culture medium-based growth medium for *Bartonella* species. *Appl Environ Microbiol* **74**:5224-7.
129. **Rini, B. I., S. Halabi, J. E. Rosenberg, W. M. Stadler, D. A. Vaena, S. S. Ou, L. Archer, J. N. Atkins, J. Picus, P. Czaykowski, J. Dutcher, and E. J. Small.** 2008. Bevacizumab plus interferon alfa compared with interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: CALGB 90206. *J Clin Oncol* **26**:5422-8.
130. **Risau, W.** 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**:671-4.

131. **Rolain, J. M., C. Foucault, R. Guieu, B. La Scola, P. Brouqui, and D. Raoult.** 2002. *Bartonella quintana* in human erythrocytes. *Lancet* **360**:226-8.
132. **Sander, A., S. Kretzer, W. Bredt, K. Oberle, and S. Bereswill.** 2000. Hemin-dependent growth and hemin binding of *Bartonella henselae*. *FEMS Microbiol Lett* **189**:55-9.
133. **Sanogo, Y. O., Z. Zeaiter, G. Caruso, F. Merola, S. Shpynov, P. Brouqui, and D. Raoult.** 2003. *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks (*Acari: Ixodida*) removed from humans, Belluno province, Italy. *Emerg Infect Dis* **9**:329-32.
134. **Scherer, D. C., I. DeBuron-Connors, and M. F. Minnick.** 1993. Characterization of *Bartonella bacilliformis* flagella and effect of antflagellin antibodies on invasion of human erythrocytes. *Infect Immun* **61**:4962-71.
135. **Schmid, M. C., F. Scheidegger, M. Dehio, N. Balmelle-Devaux, R. Schulein, P. Guye, C. S. Chennakesava, B. Biedermann, and C. Dehio.** 2006. A translocated bacterial protein protects vascular endothelial cells from apoptosis. *PLoS Pathog* **2**:e115.
136. **Schmid, M. C., R. Schulein, M. Dehio, G. Denecker, I. Carena, and C. Dehio.** 2004. The VirB type IV secretion system of *Bartonella henselae* mediates invasion, proinflammatory activation and antiapoptotic protection of endothelial cells. *Mol Microbiol* **52**:81-92.
137. **Schmidt, K.** 2008. Untersuchung zur Regulation der Expression des *Bartonella*-Adhäsins A (BadA) Gens von *Bartonella henselae*. Dissertation, Eberhard Karls Universität Tübingen.
138. **Schmiederer, M., and B. Anderson.** 2000. Cloning, sequencing, and expression of three *Bartonella henselae* genes homologous to the *Agrobacterium tumefaciens* VirB region. *DNA Cell Biol* **19**:141-7.
139. **Schulein, R., and C. Dehio.** 2002. The VirB/VirD4 type IV secretion system of *Bartonella* is essential for establishing intraerythrocytic infection. *Mol Microbiol* **46**:1053-67.
140. **Schulein, R., P. Guye, T. A. Rhomberg, M. C. Schmid, G. Schroder, A. C. Vergunst, I. Carena, and C. Dehio.** 2005. A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of *Bartonella henselae* into human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:856-61.

141. **Schulte, R., G. A. Grassl, S. Preger, S. Fessele, C. A. Jacobi, M. Schaller, P. J. Nelson, and I. B. Autenrieth.** 2000. *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *Faseb J* **14**:1471-84.
142. **Schwartzman, W. A., C. A. Nesbit, and E. J. Baron.** 1993. Development and evaluation of a blood-free medium for determining growth curves and optimizing growth of *Rochalimaea henselae*. *J Clin Microbiol* **31**:1882-5.
143. **Seubert, A., R. Hiestand, F. de la Cruz, and C. Dehio.** 2003. A bacterial conjugation machinery recruited for pathogenesis. *Mol Microbiol* **49**:1253-66.
144. **Slater, L. N., D. F. Welch, and K. W. Min.** 1992. *Rochalimaea henselae* causes bacillary angiomatosis and peliosis hepatis. *Arch Intern Med* **152**:602-6.
145. **Spach, D. H., A. S. Kanter, M. J. Dougherty, A. M. Larson, M. B. Coyle, D. J. Brenner, B. Swaminathan, G. M. Matar, D. F. Welch, R. K. Root, and et al.** 1995. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* bacteremia in inner-city patients with chronic alcoholism. *N Engl J Med* **332**:424-8.
146. **Spach, D. H., and J. E. Koehler.** 1998. *Bartonella*-associated infections. *Infect Dis Clin North Am* **12**:137-55.
147. **Sreter-Lancz, Z., K. Tornyai, Z. Szell, T. Sreter, and K. Marialigeti.** 2006. *Bartonella* infections in fleas (*Siphonaptera: Pulicidae*) and lack of *bartonellae* in ticks (*Acari: Ixodidae*) from Hungary. *Folia Parasitol (Praha)* **53**:313-6.
148. **Stein, A., and D. Raoult.** 1995. Return of trench fever. *Lancet* **345**:450-1.
149. **Vermeulen, M. J., M. Herremans, H. Verbakel, A. M. Bergmans, J. J. Roord, P. J. van Dijken, and M. F. Peeters.** 2007. Serological testing for *Bartonella henselae* infections in The Netherlands: clinical evaluation of immunofluorescence assay and ELISA. *Clin Microbiol Infect* **13**:627-34.
150. **Wagner, C. L., T. Riess, D. Linke, C. Eberhardt, A. Schafer, S. Reutter, R. G. Maggi, and V. A. Kempf.** 2008. Use of *Bartonella* adhesin A (BadA) immunoblotting in the serodiagnosis of *Bartonella henselae* infections. *Int J Med Microbiol* **298**:579-90.
151. **Welker, N. E.** 1967. Purification and properties of a thermophilic bacteriophage lytic enzyme. *J Virol* **1**:617-25.

152. **Windsor, J. J.** 2001. Cat-scratch disease: epidemiology, aetiology and treatment. *Br J Biomed Sci* **58**:101-10.
153. **Wong, M. T., D. C. Thornton, R. C. Kennedy, and M. J. Dolan.** 1995. A chemically defined liquid medium that supports primary isolation of *Rochalimaea (Bartonella) henselae* from blood and tissue specimens. *J Clin Microbiol* **33**:742-4.
154. **Yamamoto, K., B. B. Chomel, L. J. Lowenstine, Y. Kikuchi, L. G. Phillips, B. C. Barr, P. K. Swift, K. R. Jones, S. P. Riley, R. W. Kasten, J. E. Foley, and N. C. Pedersen.** 1998. *Bartonella henselae* antibody prevalence in free-ranging and captive wild felids from California. *J Wildl Dis* **34**:56-63.
155. **Zahringer, U., B. Lindner, Y. A. Knirel, W. M. van den Akker, R. Hiestand, H. Heine, and C. Dehio.** 2004. Structure and biological activity of the short-chain lipopolysaccharide from *Bartonella henselae* ATCC 49882T. *J Biol Chem* **279**:21046-54.
156. **Zhang, P., B. B. Chomel, M. K. Schau, J. S. Goo, S. Droz, K. L. Kelminson, S. S. George, N. W. Lerche, and J. E. Koehler.** 2004. A family of variably expressed outer-membrane proteins (Vomp) mediates adhesion and autoaggregation in *Bartonella quintana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:13630-5.
157. **Zimmermann, R., V. A. Kempf, E. Schiltz, K. Oberle, and A. Sander.** 2003. Hemin binding, functional expression, and complementation analysis of Pap 31 from *Bartonella henselae*. *J Bacteriol* **185**:1739-44.
158. **Zingarelli, B.** 2005. Nuclear factor-kappaB. *Crit Care Med* **33**:S414-6.

7 Publikationen

Riess T, Dietrich F, Schmidt KV, Kaiser P, Schwarz H, Schäfer A, Kempf VA: Analysis of a novel insect-cell culture medium-based growth medium for *Bartonella* species. 2008, Applied and Environmental Microbiology (AEM)

Dietrich F, Schmidgen T, Maggi RG, Richter D, Matuschka FR, Vonthein R, Breitschwerdt EB, Kempf VA: Prevalence of *Bartonella henselae* and *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato DNA in *Ixodes ricinus* Ticks in Europe. 2010, Applied and Environmental Microbiology (AEM)

8 Abkürzungen

Nicht enthalten sind Abkürzungen für SI-Einheiten.

Tab. 18: Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrom</i>
BA	Bazilläre Angiomatose
BadA	<i>Bartonella</i> Adhäsion A
BAPGM	<i>Bartonella</i> alpha-proteobacteria growth medium
Bep	<i>Bartonella-translocated effector protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
CFU	<i>colony forming unit</i>
CLSM	<i>confocal laser scanning microscopy</i>
Cy5	Indodicarbocyanin
DAB	3,3`-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DAPI	4`-6-Diamidino-2-Phenylindol
DIF	Doppelimmunfluoreszenz
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-N,N,N`,N`- Tetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HIF	<i>hypoxia inducible factor</i>

HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{dest}	einfach destilliertes Wasser
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
HRP	<i>horse-radish peroxidase</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i>
ial	Invasion-assoziiertes Locus
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
KKK	Katzenkratzkrankheit
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
min	Minute
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
NF-κB	nukleärer Faktor- κB
OD _{600 nm}	optische Dichte
OMP	<i>outer membrane protein</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12 Myristat-13 Azetat
PNPP	P-Nitrophenyl-Phosphat
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>round per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
spp.	Spezies
TAA	trimeres Autotransporter-Adhäsion
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
TIVSS	Typ IV-Sekretionssystem
TLR	<i>toll like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U	<i>unit</i> (Einheit)
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WT	Wildtyp
YadA	<i>Yersinia</i> Adhäsion A
z. B.	zum Beispiel

9 Danksagung

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Volkhard Kempf für seine hervorragende Betreuung und geduldige Unterstützung, seinen unerschöpflichen Optimismus und sein Engagement zur gründlichen Korrektur dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Ingo Autenrieth danke ich für die exzellenten Rahmenbedingungen am Institut, welche diese Arbeit ermöglichten.

Bei Andrea Schäfer und Dr. Tanja Rieß möchte ich mich ganz herzlich für die überragende Unterstützung bei den Experimenten, das Engagement zur Korrektur dieser Arbeit und für das unvergesslich heitere Arbeitsklima bedanken.

Dank an Prof. Dr. Franz-Rainer Matuschka und Dr. Dania Richter für die gute Kooperation und das Bereitstellen der Zeckenproben.

Herrn Dr. Reinhard Vonthein vielen Dank für die Hilfe bei der statistischen Aufarbeitung der epidemiologischen Daten.

Bei Prof. Ricardo Maggi und Prof. Edward Breitschwerdt bedanke ich mich herzlich für die gelungene Kooperation.

Vielen Dank an Herrn Dr. Schwarz (MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen) für die unkomplizierte Unterstützung in der Elektronenmikroskopie.

Für das gute Arbeitsklima im Labor, die konsequente Unterstützung und die freundschaftliche Hilfsbereitschaft bedanke ich mich bei den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe Thomas Schmidgen, Patrick Kaiser, Diana Neumann, Dr. Christian Eberhardt, Katja Schmidt, Dr. Hanna Hartmann, Amro Amr und Dr. Nadine Werth.

Allen hier nicht erwähnten Institutsmitarbeitern danke ich für die angenehme Atmosphäre am Institut, ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Florian Dietrich
Geburtsdatum: 13.05.1984
Geburtsort: München

Schulische Ausbildung

1990 - 1992 Werdenfelsgrundschule München
1992 - 1994 Grundschule Hawangen
1994 - 2000 Ruppert-Ness Gymnasium Ottobeuren
2000 - 2003 Vöhlin Gymnasium Memmingen
2003 Abitur (Note:1,2)

Zivildienst

2003 - 2004 Rettungshelfer beim Bayrischen Roten Kreuz Memmingen

Studium

Seit 2004 Medizinstudium an der Eberhard Karls Universität Tübingen
2006 Physikum (1,0)
21.10.2010 Ärztliche Prüfung zweiter Abschnitt (1,5)

Promotion:

2005 - 2010 Promotion am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen zum Thema „Untersuchungen zum Einsatz eines neuartigen Flüssigmediums für *Bartonella* Spezies und Untersuchungen zum Nachweis von *B. henselae* DNA in europäischen Zecken“, betreut durch Prof. Dr. V. Kempf

Besondere Auszeichnungen:

2003 Bundessieg „Jugend Forscht“ mit dem Thema „Entwicklung und Bau einer computergestützten Kommunikationshilfe für einen autistischen Jugendlichen“
2004 - 2010 Stipendium der „Studienstiftung des Deutschen Volkes“